

Caractérisation, par spectroscopie RMN et modélisation moléculaire, de l'interaction entre la protéine MCL-1, impliquée dans l'apoptose, et de potentiels inhibiteurs.

Asma Bourafai-Aziez

► To cite this version:

Asma Bourafai-Aziez. Caractérisation, par spectroscopie RMN et modélisation moléculaire, de l'interaction entre la protéine MCL-1, impliquée dans l'apoptose, et de potentiels inhibiteurs.. Chimie analytique. Normandie Université, 2018. Français. NNT: 2018NORMR060. tel-03045406

HAL Id: tel-03045406 https://theses.hal.science/tel-03045406

Submitted on 8 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Caractérisation, par RMN et modélisation moléculaire, de l'interaction entre la protéine MCL-1, impliquée dans l'apoptose, et de potentiels inhibiteurs

Présentée et soutenue par Asma BOURAFAI AZIEZ

Thèse soutenue publiquement le (07 Décembre 2018) devant le jury composé de			
Mme Sophie ZINN-JUSTIN	Directeur de laboratoire CEA LBSR - Université Paris-Saclay	Rapporteur	
M. Ewen LESCOP	Chargé de Recherche CNRS ICSN - Université Paris-Saclay	Rapporteur	
M. Christian ROUMESTAND	Professeur des Universités CBS - Université de Montpellier	Examinateur	
M. Ludovic CARLIER	Maître de conférences LBM - Sorbonne Université	Examinateur	
M. Hassan OULYADI	Professeur des Universités COBRA - Université de Rouen Normandie	Examinateur	
Mme Anne-Sophie VOISIN-CHIRET	Professeur des Universités CERMN - Université de Caen Normandie	Co-directrice de thèse	
Mme Muriel SEBBAN	Maître de Conférences HDR COBRA - Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse	

Thèse dirigée par Muriel SEBBAN, laboratoire COBRA







« Celui qui, par quelque alchimie sait extraire de son cœur, pour les refondre ensemble, compassion, respect, besoin, patience, regret, surprise et pardon crée cet atome qu'on appelle l'amour. »

Gibran Khalil Gibran (1883 – 1931)

A ma défunte mère Jamila A ma princesse Mélina Jamila

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la région Normandie (réseau CRUNch), qui m'a permis, grâce à une allocation de recherche, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait l'ensemble des membres du jury en acceptant de lire et juger ce travail. Je tiens à remercier le Dr Sophie Zinn-Justin et le Dr Ewen Lescop pour avoir accepté d'être rapporteurs dans mon jury de thèse. Je remercie également les examinateurs qui ont accepté de faire partie de mon jury, le Pr Christian Roumestand et le Dr Ludovic Carlier. Je remercie particulièrement Ludovic Carlier et Delphine Ravault de m'avoir fourni la protéine, sans laquelle mes travaux n'auraient pas été possibles.

J'aimerais remercier le Pr Hassan Oulyadi de m'avoir donné la possibilité de rejoindre son équipe de recherche, pour son soutien et la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ces travaux de recherche que représentent ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse Muriel Sebban, pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. Tu m'as sans cesse épaulée et poussée pour avancer. Je te remercie pour ta disponibilité et pour nos échanges et débats qui m'ont permis d'aller au-delà de mes attentes. Je serai toujours reconnaissante pour le travail que nous avons accompli ensemble.

Je remercie également ma co-directrice de thèse, Pr Anne-Sophie Voisin-Chiret, ainsi que les membres du CERMN, en particulier, le Pr Jana Sopkova. Merci Jana pour le temps que vous avez consacré à m'expliquer la dynamique moléculaire.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe Analyse et Modélisation Moléculaire du laboratoire COBRA : Gaël, Laure, Isabelle M, Laurent, Vincent, Carlos, Hélène, Isabelle S, Corinne, Marie, et Albert. Merci Gaël pour les discussions sur l'avancée de mes travaux et pour la lecture et la correction du manuscrit. Merci Corinne et Marie de m'avoir permis d'utiliser vos instruments. Je n'oublierai pas Lina avec qui j'ai partagé le bureau. Merci d'avoir accepté de lire mon manuscrit. Merci pour ton aide, tes conseils et ta gentillesse.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance au groupe des thésards et post docs de notre équipe qui a été une grande famille pour moi. Riham (la copine à maman), tu es une quatrième sœur pour moi sur qui je peux compter. Merci pour ta présence et pour ton soutien moral. Merci pour les délicieux gâteaux libanais que tu nous as fait découvrir. Sébastien, avec qui j'ai partagé les durs moments de la rédaction, un grand merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Je te souhaite un bon courage pour ta soutenance. J'ai hâte d'assister à ton mariage avec Riham et vous souhaite tout le bonheur du monde. Guillaume (Mr Hoffman), merci beaucoup pour la relecture et les corrections de la thèse, tu es un vrai RMNiste maintenant. J'espère pouvoir faire pareil avec toi. Valentina, Merci beaucoup pour ton soutien moral, merci de m'avoir aidée à refaire les figures, merci pour ton encourageant « c'est presque fini ». C'est maintenant fini Valentina. Mattia, j'ai été parfois agaçante avec toi, surtout pendant les réunions RMN. Je te remercie d'avoir été à mon écoute quand j'avais envie de me plaindre. Je te souhaite un bon courage pour la fin de ta thèse. Andrea, merci pour ta gentillesse, ta bonté et ta modestie. Tu étais toujours prêt à m'aider. Matthieu, merci pour ta gentillesse et pour tes encouragements. Anaïs, Merci pour les bons moments qu'on a partagés. Merci pour ton aide sur les dernières expériences RMN, je ne te souhaite que du bonheur dans ta vie. Merci aux anciens thésards et post docs que j'ai côtoyés au début de ma thèse : Sami, Ghanem et Laura. Sami, tu as été un bon exemple pour moi. Merci pour ton aide précieuse au début de ma thèse. J'espère que tout passe bien pour toi. Ghanem, merci pour nos discussions RMN et pour ton aide à réaliser quelques expériences. Enfin, Merci aux étudiants de masse et aux théoriciens : Julien, Johann, Valentin, Ahmad, Mathilde, Anna-Luiza, Florent, Mathieu, Mézianne, Nicolas, Justine, Estelle et Clément.

Je remercie ma belle-famille, et en particulier, Tata Toutoune. Merci d'être présente pour moi.

Mes remerciements vont aussi à mes parents. Maman (paix à ton âme), tu n'es pas là mais j'espère que tu es fière de moi là où tu es ! Merci papa pour tout ce que tu as fait pour nous. Merci Papa et Maman d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. J'espère que je suis à la hauteur de vos espérances. Merci à mon frère Amine, à mes sœurs Imane, Selma et Nawel et à ma belle-sœur Yasmine. Malgré mon éloignement, votre confiance, votre tendresse, votre amour me portent et me guident tous les jours. Mille mercis...

Je remercie, également, ma deuxième mère, Souhila. Merci pour ta présence, ton affection, ton amour et ton soutien.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans dire merci à mon mari Ahmed, l'amour de ma vie, pour m'avoir soutenue pendant ces trois années de thèse. Merci pour ta patience, tes encouragements et ton immense affection.

TABLE DES MATIERES

Table des fig	gures	i
Liste des Ta	bleaux	v
Abréviations		vii
Glossaire		xi
Introduction	générale	1
Partie 1 -	Contexte biologique	5
Chapitre I.	L'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2	7
1. L'	apoptose	7
1.1.	Les différentes fonctions de l'apoptose	8
1.2.	Mécanismes de l'apoptose	9
1.3.	L'apoptose et la pathogénèse des maladies	11
1.4.	L'apoptose et la cancérogenèse	
2. La	famille Bcl-2	12
2.1.	Historique	
2.2.	Le profil de la famille Bcl-2	
2.3.	Les domaines d'homologie BH	
2.4.	Les modèles d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2	
3. Co	onclusion	18
Chapitre II	Le protéine MCL-1 et ses inhibiteurs	
1. D	escription fonctionnelle et structurale de la protéine MCL-1	19
1.1.	Expression et localisation	
1.2.	Structure	
1.3.	Rôle physiologique de la protéine MCL-1	
2. La	protéine MCL-1 : une cible thérapeutique	24
2.1.	Rôle de la protéine MCL-1 dans la résistance à la chimiothérapie	
2.2.	Les inhibiteurs de la protéine MCL-1	
3. Co	onclusion	35
Partie 2 -	Caractérisation des interactions protéine-Ligand : Méthodologie	
Chapitre I.	Aspects fondamentaux des interactions protéine-ligand	41
1. As	spect cinétique	41
2. As	spect thermodynamique	42
3. M	odèles d'interaction protéine-ligand	
Chapitre II	. Approches expérimentales utilisées pour l'étude des interactions protéine-ligand	
1. Ti	tration thermique calorimétrique	47
2. Ré	sonance plasmonique de surface	49
3. Po	plarisation de fluorescence	51
4. Sp	ectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire	
4.1.	Principe	52
4.2.	Intérêt de la RMN dans l'étude des interactions protéine-ligand	
4.3.	Principes fondamentaux de l'étude des interactions protéine-ligand par RMN	55
4.4.	Méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine	57
4.5.	Méthodes basées sur l'observation des signaux du ligand	68
5. Co	onclusion	75
Chapitre II	II. Approches théoriques utilisées pour l'étude des interactions protéine-ligand	
1. Pr	incipe	77
2. Le	s logiciels de Docking	79
2.1.	Autodock	
2.2.	Autodock Vina	
2.3.	GOLD	
2.4.	HADDOCK webserver	81
3. Co	onclusion	
Partie 3 -	Résultats & Discussion	

Chapitre I.	Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax	89
1. Etuc	de de l'interaction entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1 par RMN	89
1.1.	Caractérisation structurale de la protéine MCL-1172-327 et du Pyridoclax	90
1.2.	Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1172-327 et le Pyridoclax	94
2. Doc	king sous contraintes RMN	110
3. Sim	ulations de dynamique moléculaire	112
4. Con	clusion	115
Chapitre II.	Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et des fragments dérivés du Pyridoclax	117
1. Care	actérisation structurale des fragments	118
2. Cara	actérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et les différents fragments par RMN.	120
2.1.	Méthodes basées sur l'observation des signaux du ligand	120
2.2.	Méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine	125
3. Doc	king sous contraintes RMN	134
4. Con	clusion	141
Chapitre III.	Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et des médicaments existant	ts 143
1. Cho	ix des molécules à étudier	144
2. Doc	king à l'aveugle des médicaments avec la protéine MCL-1	145
3. Cara	actérisation de l'interaction entre les cinq médicaments et la protéine MCL-1 par RMN	148
3.1.	Mise en évidence de l'interaction	148
3.2.	Estimation de l'affinité du Torsémide et du Déférasirox pour la protéine MCL-1172-3	³²⁷ 154
3.3.	Estimation du k_{off} et du temps de résidence (τ)	156
3.4.	Docking sous contraintes RMN	156
4. Des	ien de nouvelles molécules dérivées du Torsémide et du Déférasirox pour mieux inhiber l	a
protéine N	ÅCL-1	161
4.1.	Dérivés du Torsémide	161
4.2.	Dérivés du Déférasirox	166
5. Con	clusion	168
Partie 4 - C	Conclusion & Perspectives	171
1. Con	clusion	173
2. Pers	pectives	174
Partie 5 - p	artie expérimentale	177
1. Proc	luction de la protéine	179
2. Synt	hèse des ligands	179
3. Les	expériences RMN	179
3.1.	Attribution des signaux de la protéine :	179
3.2.	Attribution des signaux des ligands	181
3.3.	L'effet de l'interaction sur les spectres 1D ¹ H des fragments	183
3.4.	Les expériences STD	184
3.5.	La titration de la protéine ¹⁵ N MCL- ¹¹⁷²⁻³²⁷ par les différents ligands	185
3.6.	Détermination des k _{off} et des temps de résidence des ligands en interaction avec la	
protéir	ne MCL-1 avec le logiciel TITAN	188
3.7.	Étude de la dynamique interne de la protéine	189
4. Doc	king sous contraintes RMN	191
5. Doc	king à l'aveugle des médicaments et leurs dérivés	192
Bibliographie	0	193
Annexes		205
Annexe I		207
Annexe II		
Annexe III		217
Annexe IV		<u>21</u> 7 210
Anneve V		217
Annexe VI		221
		225

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Quelques fonctions de l'apoptose nécessaires pour le développement de l'organisme	8
Figure 2. Les deux voies principales de l'apoptose	.10
Figure 3. Les membres de la famille Bcl-2	.14
Figure 4. Alignement des séquences des domaines BH3 de certaines protéines de la famille Bcl-2	. 16
Figure 5. Représentation des modèles d'activation directe et indirecte des membres pro-apoptotiques mu	lti-
domaines	. 18
Figure 6. Structures des isoformes de la protéine MCL-1	.20
Figure 7. Structures de la protéine MCL-1	. 21
Figure 8. La distribution des charges sur la surface de la protéine MCL-1	. 22
Figure 9. Définition des poches hydrophobes de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷	.24
Figure 10. Illustration schématique de l'agrafage peptidique	.26
Figure 11. La structure RX du complexe MCL-1 SAHB _D :MCL-1 (code PDB 3MK8, résolution 2,32Å)	.28
Figure 12. La famille du Gossypol	.30
Figure 13. Structures des composés proposés par Fesik et ses collaborateurs	. 31
Figure 14. La molécule S63845	. 31
Figure 15. Les structures d'autres inhibiteurs de la protéine MCL-1	. 32
Figure 16. Structure du Pyridoclax et sa superposition avec une hélice α poly-alanine	. 33
Figure 17. Évaluation de l'effet du Pyridoclax	. 34
Figure 18. Caractérisation de l'interaction entre le Pyridoclax et les protéines MCL-1 et Bcl-x ₁ , par SPR.	.34
Figure 19. Les différentes poses du Pyridoclax en interaction avec la protéine MCL-1	.35
Figure 20. Schéma illustratif des modèles d'interaction protéine-ligand.	.44
Figure 21 Titration thermique calorimétrique	48
Figure 22. Schéma illustratif du principe de la technique SPR	50
Figure 23. Allure d'un sensorgramme	50
Figure 24 Principe de la polarisation de fluorescence	51
Figure 25. Principe de la RMN	53
Figure 26. Schéma illustratif du signal détecté par RMN	53
Figure 27. Illustration des variations de déplacements chimiques dans les différents modèles d'échar	ige
inétique	56
Figure 28. Exemple d'une expérience basée sur l'observation des signaux de la protéine (spectre 1D ¹ H)	58
Figure 29. Séquence d'impulsions de l'expérience ¹ H- ¹⁵ N Fast-HSOC	59
Figure 30 Exemple de l'utilisation des spectres 2D ¹ H- ¹⁵ N HSOC pour la détermination de la constante	de
dissociation K _D	63
Figure 31 Échelle de temps des mouvements moléculaires qui peuvent être étudiés par RMN	64
Figure 32. Relation ontro los tomos do relavations $T_{\rm e}$ T, at la temps de corrélation π	65
Figure 32. Schémas illustratifs des séguences d'impulsions utilisées pour mesurer les temps de relevation	.05
Figure 34. Schéma illustratif de la séguence d'impulsions de l'expérience 15N hetNOE	.00
Figure 34. Schema indistratif de la sequence d'impuisions de l'experience «IN netrools	1
Figure 35. Evolution du facteur NOE theorique (η) pour un système homonucleaire en fonction	de
l'efficacite de la dynamique moleculaire	. 69
Figure 36. L'experience STD.	. 70
Figure 37. Exemple d'application de l'experience STD	. /1
Figure 38. L'experience WaterLOGSY	. 74
Figure 39. Procedure generale d'un protocole de Docking	/8
Figure 40. Representations schematiques du transfert d'aimantation dans les experiences enregistrees po	our
l'attribution des résonances (HN, N, C_{α} et C_{β}) du squelette peptidique	. 90
Figure 41. Exemple du point de départ de l'attribution séquentielle des résonances (HN, N, C_{α} et C_{β}) c	des
résidus (Ala190 et T191)	.91
Figure 42. Spectre 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC de la protéine ¹³ C- ¹⁵ N MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ humaine	.92
Figure 43. Spectre RMN 1D 1H du Pyridoclax	.93
Figure 44. Structures du Pyridoclax	. 94
Figure 45. Mise en évidence de l'interaction entre la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ et le DMSO par l'expérience STD	.95

Figure 46. Superposition des spectres 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC de la protéine ¹⁵ N-MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ enregistrés e	en
absence (bleu) et en présence (rouge) du DMSO (5% en volume).)6
Figure 47. Identification du site d'interaction du DMSO sur la protéine MCL-1172-327	97
Figure 48. Estimation de la constante d'affinité du DMSO pour la protéine MCL-1172-327	98
Figure 49. Étude de la dynamique interne de la protéine MCL-1172-327 en présence du DMSO10)0
Figure 50. Analyse des données de relaxation en absence et en présence du DMSO (5% en volume)10)2
Figure 51. Superposition des spectres 2D 1H-15N HSQC de la protéine 15N MCL-1172-327 enregistrés et	en
absence (bleu) et en présence (rouge) du Pyridoclax10)3
Figure 52. Identification du site d'interaction du Pyridoclax sur la protéine MCL-1172-32710)4
Figure 53. Estimation de la constante d'affinité du Pyridoclax pour la protéine MCL-1172-32710)6
Figure 54. Exemples des fits obtenus par TITAN10)7
Figure 55. Cartographie des résidus dont les groupements méthyles des chaînes latérales ont été perturbe	és
par l'ajout du Pyridoclax10)8
Figure 56. Analyse des données de relaxation en absence et en présence du Pyridoclax (Ratio 1:1)10)9
Figure 57. Les trois poses générées par le Docking sous contraintes RMN (avec le logiciel GOLD)11	12
Figure 58. RMSD du Pyridoclax par rapport à la position initiale pendant les simulations dynamiques de	es
trois poses11	13
Figure 59. Les structures représentatives des trois meilleurs clusters obtenus pour les deux poses retenue	es
lors des simulations dynamiques11	14
Figure 60. Structure représentative du complexe MCL-1172-327 : Pyridoclax11	16
Figure 61. Structure du Pyridoclax et de trois fragments dérivés du Pyridoclax11	17
Figure 62. Expansion de la zone aromatique des spectres RMN 1D 1H des trois fragments11	19
Figure 63. Superpositions des spectres RMN 1D 1H des trois fragments en absence (en bleu) puis e	en
présence de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ (en rouge)12	21
Figure 64. Superposition des spectres off-résonance (en bleu) avec les spectres STD (en rouge) pour chaqu	ıe
fragment en présence de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ 12	23
Figure 65. Superposition des spectres off-résonance (en bleu) et STD (en rouge) du fragment 4 (MR-3493)	9)
obtenus en présence de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ 12	25
Figure 66. Superposition des spectres 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absend	ce
(bleu) puis en présence du fragment 1 (MR-34911)12	26
Figure 67. Identification du site d'interaction du fragment 1 (MR-34911) sur la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ 12	27
Figure 68. Superposition des spectres 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC de la protéine MCL-1 ^{1/2-32/} humaine en absend	ce
(bleu) puis en présence du fragment 2 (MR-34916)	28
Figure 69. Identification du site d'interaction du fragment 2 (MR-34916) sur la protéine MCL-1 ^{1/2-32/} 12	29
Figure 70. Superposition des spectres 2D ⁻¹ H- ¹⁵ N HSQC de la protéine MCL-1 ^{1/2-32/} humaine en absend	ce
(bleu) puis en présence du fragment 3 (MR-34917)	30
Figure /1. Histogramme des variations des déplacements chimiques combinés des protons et des azotes de	es
fonctions amides la proteine ¹⁵ N MCL-1 ^{1/2-32/} humaine apres l'ajout du fragment 3	31
Figure 72. Cartographie des residus fortement perturbes (2*SIDEVA) par l'ajout du fragment	3
(MR-34917), sur la surface de la proteine MCL-1 ^{1/2-327} humaine	32
Figure 73. Estimation des constantes d'affinite des trois fragments pour la proteine MCL-1 ^{1/2-327}	53
Figure /4. Analyse des interactions entre le MR-34911 et la proteine MCL-11/2-327 dans les trois meilleure	es
poses issues du Docking sous contraintes RMN	55
Figure /5. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du fragment 1 dans le site d'interaction de	la
proteine MQL- $1^{1/2-327}$	5/
Figure /6. Analyse des interactions entre le MR-34916 et la proteine MCL- $1^{1/2-321}$ dans les deux meilleure	es
poses issues du Docking sous contraintes RMN.	5/
Figure //. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du fragment 2 dans le site d'interaction de	1a
proteine MQL- $1^{1/2-327}$	30
Figure 70. Analyse des interactions entre le MIK-54917 et la proteine MUL-1 ^{1/2-527} dans les deux meilleure	20
poses issues au Docking sous contraintes KIVIN	אצ 1.
Figure 19. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du tragment 3 dans le site d'interaction de	1a 40
$\frac{14}{12}$	4U 4 4
Figure δV . Les structures des cinq medicaments choisis.	+4 1
Figure 01. La doite utilisée pour le Docking (A). la cartographie des poches hydrophobes sur la surface o	ue ₄⊑
Ia protenie MUL-1 ¹⁷⁰⁻³³³ (modele 1 code PBD ZMHS)	+D

Figure 82. Structures des meilleures poses obtenues pour les cinq molécules en interaction avec la protéine
MCL-1 ¹⁷⁰⁻³³³
Figure 83. Les différents complexes obtenus par le Docking à l'aveugle des cinq médicaments avec protéine
MCL-1 ¹⁷⁰⁻³³³
Figure 84. Superposition des spectres 2D ¹ H ¹⁵ N HSQC enregistrés en absence (bleu) et en présence de :
Rispéridone (rouge), Lénalidomide (magenta), Oxcarbazépine (vert)
Figure 85. Superposition des spectres 2D 1H-15N HSQC de la protéine MCL-1172-327 humaine en absence
(bleu) puis en présence du Torsémide (rouge)
Figure 86. Identification du site d'interaction du Torsémide sur la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ 151
Figure 87. Superposition des spectres 2D 1H-15N HSQC de la protéine MCL-1172-327 humaine en absence
(bleu) puis en présence du Déférasirox
Figure 88. Identification du site d'interaction du Déférasirox sur la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷
Figure 89. Estimation de la constante d'affinité du Torsémide pour la protéine MCL-1172-327154
Figure 90. Estimation de la constante d'affinité du Déférasirox pour la protéine MCL-1172-327155
Figure 91. Les meilleures poses du Torsémide en interaction avec la protéine MCL-1172-327, issues du
Docking sous contraintes RMN avec l'Easy interface de HADDOCK Webserver
Figure 92. Les meilleures poses du Déférasirox en interaction avec la protéine MCL-1172-327, issues du
Docking sous contraintes RMN avec l'Easy interface de HADDOCK Webserver
Figure 93. : Structures du composé 1 et du Torsémide162
Figure 94. Les interactions établies entre la protéine MCL-1172-327 et le composé 1 (A) et entre la protéine
MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ et le Torsémide (B)162
Figure 95. Les structures des dérivés du Torsémide proposés163
Figure 96. : L'analyse des interactions observées entre les différents dérivés et la protéine MCL-1172-327164
Figure 97. Dérivé 4 du Déférasirox165
Figure 98. Comparaison des sites d'interaction occupés par les deux molécules166
Figure 99. Structures de la molécule S63845, du Déférasirox et ses dérivés167
Figure 100. Comparaison des sites occupés par les dérivés du Déférasirox168
Figure 101. Schéma illustratif de la Titration croisée

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Maladies liées à la dérégulation de l'apoptose
Tableau 2. Profils d'affinité de cinq protéines anti-apoptotiques envers les domaines BH3 de huit protéines pro-
apoptotiques
Tableau 3: Localisation des différents isomères de la protéine MCL-1
Tableau 4. La définition des poches dans différents modèles de complexes MCL-1:Inhibiteur (Cut-off=5Å) 23
Tableau 5: Peptides SAHB ^s décrits par Verdine et Walensky
Tableau 6. Comparaison des distances entre les différents protons du Pyridoclax dans les structures RMN et RX
Tableau 7. Les caractéristiques des différents clusters issus du Docking du Pyridoclax avec la protéine MCL-1 ¹⁷³⁻³²⁷
par HADDOCK
Tableau 8. L'énergie d'interaction movenne entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1172-327, calculée lors des
simulations dynamicules
Tableau 9 Les résidus de la protéine MCL -1 ¹⁷²⁻³²⁷ qui interagissent avec la Pyridoclay 115
Tableau 10 Les distances entre les différents protons pour les trois fragments 118
Tableau 10. Les distances entre les antérents protons pour les trois magnents magnents anrès l'ajout de la
protéine MCL -1172-327 non marquée
Tablese 12 Valuere des K de la teneration for exempted estimates estimates estimates estimates and beneficial TETANI
Tableau 12. Valeurs des K _D , k _{off} et l pour les trois tragments, estimees par le logiciel 111 AN
Tableau 13. Principales interactions observees dans les trois poses du tragments 1 en interaction avec la proteine
$MUL-1^{1/2-32}$
Tableau 14. Principales interactions observees dans les trois poses du fragments 2 en interaction avec la proteine
MCL-11/2-32/
Tableau 15. Principales interactions observees dans les trois poses du fragments 3 en interaction avec la proteine
MCL-1 ^{1/2-32/}
Tableau 16. Energies d'interaction des médicaments avec la protéine MCL-1 ^{1/2-32/} (kcal.mol-1) 144
Tableau 17. Valeurs des K _D , k _{off} et τ, estimées par le logiciel TITAN156
Tableau 18. Principales interactions observées dans les quatre poses du Torsémide en interaction avec la protéine
MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷
Tableau 19. Principales interactions observées dans les quatre poses du Déférasirox en interaction avec la protéine
MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷
Tableau 20. Energie d'interaction (kcal.mol-1) de la meilleure pose pour les dérivés du Torsémide issues du Docking
aveugle
Tableau 21. Énergie d'interaction (kcal.mol-1) de la meilleure pose pour les dérivés du Déférasirox issus du Docking
aveugle
Tableau 22. Principaux paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences
RMN utilisées pour l'attribution des signaux de la protéine (sous TopSpin 3.2)180
Tableau 23. Principaux paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences
RMN utilisées pour l'attribution des signaux 1H des ligands (sous TopSpin 3.2)
Tableau 24. Paramètres d'acquisition et de traitement des spectres enregistrés pour l'attribution des signaux ¹³ C du
Pyridoclax
Tableau 25. Préparation des échantillons utilisés pour enregistrer les spectres 1D 1H des trois fragments en absence
et en présence de la protéine MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷
Tableau 26. Échantillons utilisés pour l'enregistrement des expériences des titrations croisées
Tableau 27. Les paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences RMN
enregistrées pour la titration de la protéine avec le DMSO (sous TopSpin 3.2)
Tableau 28. Les paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences RMN
enregistrées pour l'étude de la dynamique interne de la protéine (sous TopSpin 3.2)
Tableau 29. Les principaux paramètres utilisés lors du Docking sous contraintes RMN avec HADDOCK
Tableau 30. Les paramètres utilisés lors du Docking des fragments sous contraintes RMN avec Autodock Vina
Tableau 31. Les principaux paramètres utilisés lors du Docking à l'aveugle des médicaments avec Autodock Vina 192

ABREVIATIONS

1D	Unidimensionnel
2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AML	Accute Myeloid Leukemia ou leucémie aiguë myéloblastique
BAG3	Bcl-2 Associated Athanogene 3
Bak	BH3 homologous agonist Killer
Bax	Bcl-2 associated-x
Bcl-w	Bcl-2-like 2
Bcl-x _L	B cell lymphoma x Long isoform
Bfl-1/A1	Bcl-2-related protein A1
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist protein
Bik	Bcl-2 interacting Killer
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BioTICLA	Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Agressifs
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
caspase	cysteinyl-aspartate protease
CCSP	Combined Chemical Shift Perturbation
Cdk9	Cyclin dependant kinase 9
CERMN	Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie
COBRA	Chimie Organique et Bioorganique -Réactivité et Analyse
COSY	COrrelation SpectroscopY
CSP	Chemical Shift Perturbation
DIABLO	Direct IAP Binding protein with LOw isoelectric point
DISC	Death-Induced Signalling Complex
DMSO	DiMethylSulfOxide
DTT	Dithiothréitol
EndoG	Endonucélase G
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FBDD	Fragment Based Drug Design
FBS	Fetal Bovine Serum
FEL	Free Energy Landscape
FID	Free Induction Decay
FPA	Fluorescence Polarization Assay
hetNOE	HeteroNuclear Overhauser Effect
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
Hrk	Harakiri
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation

Concentration inhibitrice médiane	
Interaction Protéine-Protéine	
Isothermal Titration Calorimetry	
Constante de dissociation	
$Dalton (1 Da = 1g.mol^{-1})$	
Myeloid Cell Leukemia -1	
Molecular Dynamic	
MCL-1 Inhibitor Molecule 1	
Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization	
Normal Mode Analysis	
Nuclear Magnetic Resonance	
Nuclear Overhauser Effect	
Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY	
NADPH Oxidase Activator	
Lignée cellulaire de type B cell lymphoma	
Omi/High temperature requirement protein A serine peptidase 2	
protéine 53	
Phospahte Buffered Saline	
Protein Data Bank	
P – Proline. E – Glutamic Acid. S – Serine. T – Threonine.	
Polarisation de Fluorescence	
Protein-Ligand Interaction Profiler	
Poids Moléculaire	
P53 Upregulated Modulator of Apoptosis	
Residual Dipolar Coupling	
Résonance Magnétique Nucléaire	
Root-Mean-Square Deviation	
RiboNucleic Acide	
Reactive Oxygen Species	
Unité de Résonance	
Stabilized Alpha Helix of Bcl-2 domain	
small interfering RNA	
Surface Plasmon Resonance	
Saturation Transfer Difference	
Saturation Transfer Difference- Amplification Factor	
Lignée cellulaire de type B lymphocyte	
Transformée de Fourrier	
TITration ANalysis	
TransMembranaire	
Tumor Necrosis Factor	
Tumor Necrosis Factor Receptor	
TNF-Associated Death Domain	
TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand	
Transferred-NOE	

Nomenclature des acides aminés

NOM	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	А
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	Ν
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	С
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	Н
Isoleucine	lle	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	К
Méthionine	Met	М
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	Р
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	Т
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

GLOSSAIRE

Antinéoplasique	Ou un anticancéreux, est un médicament destiné à bloquer la	
	prolifération des cellules cancéreuses.	
Autophagie	Autolyse ou autophagocytose, désigne une dégradation d'une partie du	
	cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes.	
Cellules ectopique	Cellules en dehors de leur localisation habituelle	
Cytokines	Substances de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du	
	système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus, agissant à distance	
	sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.	
Hypoxie	Est une inadéquation entre les besoins tissulaires en oxygène et les	
	apports.	
Mésothéliomatique	Forme rare et virulente de cancer, se développe dans une membrane qui	
	protège les organes.	
Nécrose	Forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non	
	programmée des cellules dans le tissu vivant	
Oncogène	Qui favorise le développement des tumeurs	
p53	Ou TP53 « tumor protein 53 » est un facteur de transcription régulant de	
	multiples fonctions cellulaires importantes comme la régulation du cycle	
	cellulaire, l'autophagie ou l'apoptose.	
Pan-inhibiteur	Inhibiteur non sélectif	
Protéines kinases	Sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate de	
	l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'hydroxyle (groupe OH) des chaîne	
	latérales des acides aminés ayant une fonction alcool : sérine, thréonine	
	et tyrosine.	
Quenching	Se réfère à tout processus qui diminue l'intensité de fluorescence d'une	
	substance donnée.	
Zymogène	Précurseur protéique d'une enzyme, c'est-à-dire un composé protidique	
	inactif, dépourvu d'activité enzymatique, mais qui peut donner après	
	activation une enzyme active.	

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer existe depuis que la vie existe, aussi bien chez les plantes que chez les animaux, de l'insecte à l'Homme. Il s'agit d'une pathologie grave qui se traduit par une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire. En détruisant son environnement, le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'être vivant.[1] Cette maladie apparait peu dans notre histoire, ce qui est normal car, d'une part, le diagnostic de cancer était méconnu dans de nombreux cas, et d'autre part, la moitié des cancers est diagnostiqué après 65 ans.

Parmi les divers cancers, le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus mortel, avec une incidence annuelle de plus de 150 000 cas dans le monde.[2] Il représente la cinquième cause de décès par cancer chez la femme en France et la septième dans le monde.[3] Dans 70% des cas, le premier diagnostic est établi au stade avancé (âge moyen 66 ans) à cause du caractère asymptomatique de la maladie au stade initial.[3] A ce stade, les patientes sont traitées initialement par la chirurgie de la zone tumorale et par une chimiothérapie standard (combinaison Paclitaxel et Cisplatine). Seulement 30% des femmes atteintes survivent jusqu'à 5 ans sous traitements.[4] Le Cisplatine est un antinéoplasique cytostatique. Il forme des liaisons covalentes avec l'ADN pour former des adduits. Ces derniers entraînent l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la mort cellulaire par apoptose.[5] Lorsque les dommages de l'ADN atteignent leur niveau maximum, les cellules résistantes se protègent contre l'apoptose pour permettre la réparation de ces lésions et la récupération d'une prolifération normale. Cette protection s'exprime dans l'activation des voies anti-apoptotiques (surexpression des protéines Bcl-x_L et MCL-1), qui semblent être essentielles pour la survie des cellules tumorales endommagées, au moins pendant les quelques jours qui suivent l'exposition au Cisplatine.[6]

L'équipe de Poulain *et al.* (BioTICLA) a souligné l'importance des stratégies thérapeutiques qui ciblent les protéines Bcl-x_L et MCL-1 dans le traitement des carcinomes ovariens chimiorésistants.[6] L'inhibition de la protéine Bcl-x_L peut être obtenue par l'utilisation de l'ABT-737 [7] ou de l'ABT-263 (Navitoclax, AbbVie).[8] **En revanche, l'inhibition de la protéine MCL-1 reste problématique et la recherche d'outils pharmacologiques utilisables en clinique est donc un enjeu majeur, d'autant que cette protéine est désormais désignée comme une cible thérapeutique prioritaire dans de nombreuses localisations tumorales**. L'identification de nouveaux médicaments ou nouvelles stratégies thérapeutiques capables de (re) sensibiliser les cellules du carcinome ovarien aux traitements chimio-thérapeutiques existants, présente un vrai challenge. Dans ce contexte de recherche, une collaboration entre le CERMN (équipe Interaction Protéine-Protéine, Pr Anne-Sophie Voisin-Chiret) d'une part, et l'unité BioTICLA dirigée par le Dr Laurent Poulain d'autre part, a donné naissance à une famille de **foldamères oligopyridiniques** dont le chef de fil est appelé le **Pyridoclax**. Ces foldamères ont la capacité d'adopter une conformation spatiale bien adaptée pour **mimer les hélices \alpha du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques**, inhibant ainsi la protéine MCL-1 surexprimée dans le cas du cancer de l'ovaire. Une étude par résonance plasmonique de surface (SPR) a démontré que le Pyridoclax se liait directement à la protéine MCL-1. En outre, les tests biologiques ont montré que le Pyridoclax induisait l'apoptose en association avec le *si*RNA ciblant la protéine Bcl-x_L ou avec l'ABT-737 dans les cellules cancéreuses ovariennes, pulmonaires et mésothéliomatiques.[9]

Dans ce cadre, l'objectif de mon projet de thèse est de définir les modes d'interactions entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax afin d'offrir, à plus long terme, de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patientes résistantes aux traitements chimiothérapeutiques existants. Ce manuscrit présente ma contribution à ce projet pluridisciplinaire. Il comprend trois parties.

Dans la première partie, le contexte biologique sera présenté en deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous détaillerons le phénomène de l'apoptose et son implication dans la prolifération cancéreuse des cellules. Le deuxième chapitre sera consacré à une description structurale et fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2, en particulier la protéine MCL-1, et de leur rôle crucial dans la régulation de l'apoptose. Les petites molécules inhibitrices de la protéine MCL-1, décrites dans la littérature seront également présentées dans ce chapitre.

La deuxième partie sera axée sur la description des principales méthodes expérimentales et théoriques utilisées dans la caractérisation des interactions Protéine-Ligand.

Dans la troisième partie, les résultats de la caractérisation de l'interaction Protéine-Ligand par résonance magnétique nucléaire et modélisation moléculaire seront présentés et discutés.

Partie 1 - CONTEXTE BIOLOGIQUE

Chapitre I. L'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2

Dans les cellules cancéreuses, le dérèglement de l'apoptose est l'une des causes principales de la prolifération anarchique des cellules et de l'apparition des résistances aux chimiothérapies. La restauration de l'apoptose présente l'une des voies thérapeutiques exploitées pour lutter contre le cancer. Dans ce chapitre nous allons expliquer le processus de l'apoptose, son intérêt dans le cycle de vie des cellules et ses principales voies de régulation.

1. L'apoptose

Le terme apoptose qui provient d'une locution grecque signifiant « chute des feuilles en automne », a été utilisé en 1972 par Kerr et ses collaborateurs pour désigner un nouveau modèle de mort cellulaire (autre que l'autophagie et la nécrose cellulaire).[10] L'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée, est un processus physiologique, génétiquement régulé, observé dans de nombreux types cellulaires et par lequel la cellule déclenche son autodestruction en réponse à un signal de mort. Il survient au cours de l'embryogénèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Ce « suicide cellulaire » est un évènement clé en biologie car il permet de contrôler finement l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire dans les organismes pluricellulaires en éliminant les cellules anormales ou endommagées. L'apoptose est un mécanisme protecteur qui permet la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.[11]

Les signaux de mort peuvent être très différents : physiologiques, pharmacologiques, intra ou extracellulaires. En dépit de cette diversité, les principales caractéristiques de la mort cellulaire programmée sont :

- Sa composante protéique qui est exprimée dans toutes les cellules animales eucaryotes.
- Son mode d'exécution qui implique une cascade protéolytique.
- Son mode d'activation qui est contrôlé par une famille de protéines régulatrices dédiées.
- Son activation pendant le développement qui est contrôlée par la transcription des gènes.[12]

1.1. Les différentes fonctions de l'apoptose

Le développement et la survie de l'organisme sont contrôlés par les fonctions multiples de l'apoptose. Parmi ces fonctions, les plus importantes sont les suivantes :

- Structures de sculpture (élimination des espaces interdigitaux lors de la formation des doigts) (Figure 1A)
- Suppression des structures inutiles (élimination des structures qui sont nécessaires dans un sexe mais pas dans l'autre) (Figure 1B).
- Régulation du nombre des cellules. (Figure 1C).
- Contrôle de la qualité des cellules (élimination des cellules anormales, ectopiques, non fonctionnelles, ou des cellules nuisibles). (Figure 1D).



Figure 1. Quelques fonctions de l'apoptose nécessaires pour le développement de l'organisme (HG) intestin grêle (SG) glande salivaire (M) muscle (MG) mésogastre. (extrait de la réf [13])

1.2. Mécanismes de l'apoptose

Au cours des années 90, il y a eu des progrès spectaculaires dans la compréhension du mécanisme intracellulaire de la mort cellulaire programmée ainsi que de son contrôle. Plusieurs revues ont été publiées à ce propos,[14],[15],[16] dans lesquelles, il a été montré que malgré l'extrême diversité des signaux intervenant dans l'exécution du programme apoptotique et sa régulation, on pouvait dégager des mécanismes généraux conservés au travers de l'évolution. **On reconnaît principalement deux voies qui conduisent à l'apoptose : la voie extrinsèque (ou la voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou mitochondriale)**. La Figure 2 représente les différentes étapes de l'apoptose depuis le signal d'induction jusqu'à l'exécution. Ces deux voies ont en commun de conduire à l'activation des caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving protease), ce qui constitue le point de non-retour pour la cellule. **Si les caspases sont activées, la mort est inévitable**.

1.2.1. La voie extrinsèque

La voie des récepteurs de mort, comme son nom l'indique, est contrôlée par l'interaction entre des récepteurs de mort et des ligands de mort (Figure 2). Plusieurs récepteurs connus appartiennent à la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) tels que Fas (récepteur de surface cellulaire), TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Les membres de la famille des récepteurs TNF partagent des domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine cytoplasmique de 80 acides aminés appelé le « domaine de mort ». Ce domaine de mort joue un rôle critique dans la transmission du signal de mort depuis la surface cellulaire jusqu'à la voie de signalisation intracellulaire.[17],[11]

Quand un ligand se lie au domaine extracellulaire du récepteur, le domaine intracellulaire recrute des protéines adaptatrices comme TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) et FADD (Fas-Associated Death Domain) pour la transmission du message. Ceci mène à la trimérisation « Ligand-Récepteur-Protéine adaptatrice » et à la formation d'un complexe appelé DISC (Death-Induced Signalling Complex). Ensuite, le complexe DISC déclenche l'assemblage et l'activation de la pro-caspase 8. La forme active de cette dernière, la caspase 8 est une caspase initiatrice, elle déclenche l'apoptose par clivage d'autre caspases exécutrices. [18],[19]



Figure 2. Les deux voies principales de l'apoptose (TNF) Tumoral Necrosis Factor, (TNFR) Tumoral Necrosis Factor Receptor (Fas) Cell Surface Receptor CD95, (FasL) Fas Ligand (TRADD) TNF Receptor-Associated Death Domain. (FADD) Fas-Assiciated Death Domain (IAP) Inhibitor of Apoptosis Protein. (Smac) Second Mitochondria-derived Activator of Caspase (DIABLO) Direct IAp Binding protein with LOw pI. (Omi/HtrA2) Omi/High temperature requirement protein A. (Apaf-1) Apoptosis protease-activating factor 1. (extrait de la réf [19])

1.2.2. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est déclenchée par des stimuli intracellulaires comme les dommages de la composante génétique (ADN),[20] l'hypoxie, la concentration élevée du Ca²⁺ cytosolique et le stress oxydatif (augmentation des espèces réactives oxygénées).[21] Malgré la diversité de ces stimuli, ces derniers convergent en un point dans la cellule : **la mitochondrie** (Figure 2). Cet organite essentiel à la vie joue également un rôle crucial dans l'apoptose. **Une fois que les signaux de mort y parviennent, la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP) est augmentée sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2**, en particulier des protéines Bax et Bak, qui sont indispensables à cette étape décisive de l'induction de l'apoptose. Ces protéines subissent une modification conformationnelle, s'associent en homo-oligomères et forment des pores au niveau de la membrane mitochondriale, [22] ce qui entraîne la rupture de la membrane externe et la libération dans le cytosol des facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C, Smac/DIABLO, EndoG (endocucléase G), Omi/HtrA2 et AIF.[22] Bien que chacun ait son rôle à jouer dans l'apoptose, seuls le cytochrome C, Omi/HtrA2 et les protéines Smac/DIABLO ont un effet sur l'activation des caspases.[23],[24],[25]

1.2.3. La voie commune d'exécution

Quelle que soit la voie de signalisation adoptée pour transmettre le signal de mort, la phase d'exécution de l'apoptose implique l'activation d'une série de caspases. Ces caspases présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartique. Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes.[19] Les caspases peuvent être réparties en fonction de leur structure et de leur réactivité en 3 groupes : les caspases initiatrices, effectrices et activatrices de cytokines (non impliquées dans l'apoptose). La maturation et l'activation des caspases effectrices dépendent des caspases initiatrices.[26] Pour exécuter l'apoptose, les voies intrinsèque et extrinsèque activent des caspases initiatrices : les

Pour executer l'apoptose, les voies intrinseque et extrinseque activent des caspases initiatrices : les caspases 9 et 8. Ensuite, elles convergent vers la caspase 3 qui clive l'inhibiteur de la désoxyribonucléase activée et déclenche l'apoptose nucléaire. De plus, la caspase exécutrice 3 induit le clivage des protéines kinases, des protéines du cytosquelette et des protéines de réparation de l'ADN, conduisant à des modifications morphologiques de la cellule jusqu'à sa destruction totale (Figure 2).[19]

1.3. L'apoptose et la pathogénèse des maladies

Dans l'état physiologique, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire sont en équilibre. Une altération de cet équilibre peut être impliquée dans la pathogénèse des maladies. Ainsi, un excès, ou un défaut d'apoptose est à l'origine de nombreuses pathologies. La liste de ces pathologies ne cesse de s'allonger (Tableau 1).

(extrait de la réf [27])			
Excessivité de l'apoptose	Déficience de l'apoptose		
 Maladies neurologiques dégénératives (Alzheimer, Huntington, Parkinson) Anémie aplasique Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) La thyroïdite de Hashimoto Lupus érythémateux Défaillance du foie 	 Syndrome lymphoprolifératif auto- immune (syndrome de Smith-Canale) Maladie de Graves Syndrome d'hyperéosinophilie Lymphome Leucémie Tumeurs solides Ostéoporose 		
 Sclérose multiple Syndrome myélodysplasique 	-		
 Diabète mellitus type I 			
• La colite ulcéreuse			

Tableau 1. Maladies liées à la dérégulation de l'apoptose (extrait de la réf [27])

1.4. L'apoptose et la cancérogenèse

Les cancers, quels qu'ils soient, sont caractérisés par un défaut d'apoptose.[1] Cette caractéristique est à l'origine des accumulations aberrantes des cellules, liées soit à une prolifération cellulaire excessive soit à une défectuosité de l'apoptose, soit au deux. Précédemment, les modèles de la carcinogenèse ont porté principalement sur des anomalies cellulaires associées à une prolifération accrue. La compréhension du processus de l'apoptose a permis d'élucider les mécanismes de carcinogénèse et d'établir de nouvelles pistes thérapeutiques.[28] Ainsi, la suppression et la mutation des gènes apoptotiques jouent un rôle très important dans la carcinogénèse, *via* le contrôle de la prolifération et la régression tumorales. Les gènes qui ont reçu le plus d'attention à cet égard sont les gènes Bcl-2 et p53.[27],[29] En général, le dysfonctionnement de p53 corrèle avec l'agressivité tumorale ; les patients qui héritent d'un défaut dans l'une de leurs deux allèles du gène p53 ont une susceptibilité élevée de développer des cancers.[27]

Enfin, les cellules tumorales peuvent acquérir une résistance à l'apoptose par la surexpression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et MCL-1 ou par la suppression/mutation des protéines pro-apoptotiques comme Bax. Certaines formes des lymphomes B présentent une surexpression de Bcl-2, confirmant que l'échec de la mort cellulaire programmée contribue à la prolifération cancéreuse.[11]

2. La famille Bcl-2

Comme nous avons pu le souligner précédemment, les protéines de la famille Bcl-2, dont fait partie la protéine MCL-1, font partie des acteurs clés de la voie intrinsèque de l'apoptose.[30] Ce sous-chapitre présente l'historique de découverte des membres de cette famille, leur caractéristiques de séquence et de structure ainsi que les modèles de mécanismes d'action proposés.

2.1. Historique

Il y a trente ans, la première protéine de cette famille découverte fut la protéine Bcl-2. Cet oncogène a été identifié lors de l'étude des mutations génétiques liées aux lymphomes folliculaires de type B, d'où il tire son nom « Bcl-2 : **B**- cell lymphoma 2 ».[31] Cette découverte clé et précoce a introduit un nouveau paradigme de cancérogenèse. En effet, la surexpression de la protéine Bcl-2 ne favorise pas la prolifération des cellules comme les oncogènes découverts précédemment mais elle inhibe la mort cellulaire.[32],[33] Depuis cette découverte originale, d'autres membres de la famille Bcl-2 ont été caractérisés, parmi lesquels (par ordre chronologique de leur découverte) :

MCL-1,[34] Bcl-x_L,[35] Bax,[36] Bak,[37] Bid,[38] Bfl-1[39] et A1 (chez la souris)[40], Bad,[41] Bcl-w, [42] Bim,[43] Boo (Bcl2L10),[44] Noxa,[45] Bcl2l12.[46]

2.2. Le profil de la famille Bcl-2

L'alignement des séquences des membres de la famille Bcl-2 a permis de mettre en évidence la présence de domaines conservés d'acides aminés appelés domaines BH (**B**cl-2 **H**omology). Ces domaines correspondent à des segments hélicoïdaux de moins de vingt acides aminés qui dictent la structure et la fonction des protéines. Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent entre un et quatre domaines, ainsi que, souvent en position C-terminale, une hélice α qui correspond à un segment transmembranaire (TM). Les membres de la famille Bcl-2 sont classés en deux groupes (Figure 3):

\Rightarrow Les protéines anti-apoptotiques :

Les membres de ce groupe sont : Bcl-2, Bcl-x_L, **MCL-1**, Bcl-w, et Bfl-1 (ou A1). Ils possèdent globalement la même structure tridimensionnelle qui consiste en un ensemble de 8 hélices α . Ces protéines possèdent un domaine transmembranaire (TM) et plusieurs domaines d'homologie (BH1, BH2, BH3 et BH4), formant un sillon hydrophobe qui présente le site d'homo- ou hétérodimérisation des protéines lors de l'apoptose.

⇒ Les protéines pro-apoptotiques, divisées en deux sous-groupes :

- Les protéines initiatrices, ne possédant que le domaine BH3 comme Bad, Bid et Noxa (BH3-only). Lorsqu'elles sont à l'état de monomère, elles ne sont pas structurées. En revanche, au contact de leur partenaire, elles forment des dimères et adoptent une structure en hélice α.[47]
- Les protéines effectrices à multi-domaines (Bax, Bak), possédant tous les domaines d'homologie et le domaine transmembranaire. Elles adoptent la même structure tridimensionnelle que les protéines anti-apoptotiques.


Toutes les protéines de la famille Bcl-2 ont en commun le domaine BH3 (Figure 3). Ce domaine, appelé **domaine de mort**, est impliqué dans un ensemble **d'interactions protéine protéine (IPP) qui permet l'association des protéines en dimères et régulent l'apoptose**.[49],[50]

Les protéines qui possèdent un domaine transmembranaire (Bcl-2, Bax, Bim...) sont insérées dans la membrane extracellulaire de la mitochondrie. Les autres sont présentes dans le cytosol.

Ces protéines s'engagent dans des couples de dimères, avec des propriétés spécifiques. Les hétérodimères, issus d'une interaction entre une protéine anti-apoptotique et une protéine proapoptotique, rendent la membrane mitochondriale imperméable. En revanche, les homo-dimères des protéines pro-apoptotiques permettent la formation de pores au sein de la membrane mitochondriale.

Les protéines BH3-only ont des profils d'interaction différents. Elles sont classées comme « ubiquitaires » (comme Bid et Bim), pour celles qui interagissent avec toutes les protéines anti-apoptotiques, ou « sélectives », pour celles qui interagissent sélectivement avec certaines protéines anti-apoptotiques (comme Noxa). Ainsi, les protéines pro-apoptotiques ont des affinités différentes pour les protéines anti-apoptotiques. Pour définir le profil d'affinité de ces protéines, Kong et *al.* ont mesuré l'affinité de huit domaines BH3 de protéines pro-apoptotiques pour cinq protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par SPR (Tableau 2).[51]

Anti Pro	Bid-BH3	Bim-BH3	Puma-BH3	Noxa-BH3	Bad-BH3	mBmf-BH3	Hrk-BH3	Bik-BH3
Bcl-x _L	48	0,65	2,2	ND	0,27	8,3	11	102
Bcl-2	122	61	6,0	ND	57	8,5	145	ND
Mcl-1	87	2,1	9,2	18	ND	340	50	1 100
Bcl-w	34	2,2	2,4	ND	12	1,7	53	73
Bfl-1	2,4	0,17	3,2	70	1 100	202	13	243

Tableau 2. F	Profils	d'affinité e	le cino	q protéines	anti-apoptotiqu	ies envers	les	domaines	BH3	de	huit
				protéines p	pro-apoptotique	s.					

Les valeurs du tableau correspondent aux constantes de dissociation (K_D en nM) mesurées par SPR. Code couleur : en vert, forte affinité ($K_D < 20$ nM), en jaune, affinité moyenne (20nM $< K_D < 200$ nM) et en orange, faible affinité (200nM $< K_D < 2000$ nM). En rouge, aucune interaction détectée. (extrait de la réf [51])

Cette étude a montré que les protéines Bcl-x_L et Bcl-w avaient des profils d'interaction similaires ; les deux protéines montrent une forte affinité pour les domaines BH3 des protéines Bim, Puma, Bad et Bmf, et une affinité moyenne pour les domaines BH3 des protéines Bid et Bik. La protéine Bcl-2 présente le même profil d'affinité que Bcl-x_L et Bcl-w pour les protéines proapoptotiques sauf pour la protéine Bik. Un autre point commun entre les trois protéines Bcl-x_L, Bcl-w et Bcl-2 est l'absence d'affinité pour la protéine Noxa.

Les protéines MCL-1 et Bfl-1 ont des profils d'affinité similaires ; ces deux protéines interagissent avec les domaines BH3 des protéines Bid, Bim, Puma, Hrk et Noxa. Les différences à souligner entre les profils d'affinité de ces deux protéines sont que la protéine MCL-1 a plus d'affinité pour Noxa et que la protéine Bfl-1 a plus d'affinité pour Bik. Les deux protéines n'interagissent pas avec le domaine BH3 de la protéine Bad.[51]

Ainsi, les taux relatifs de ces différentes protéines au niveau mitochondrial sont responsables d'une fine régulation de la voie intrinsèque mitochondriale.

2.3. Les domaines d'homologie BH

Les domaines d'homologies BH sont définis sur la base de la présence d'acides aminés conservés dans plusieurs séquences des protéines de la famille Bcl-2. En 1993, Oltval *et al.* ont défini les deux premiers motifs BH les plus conservés dans tous les membres de la famille Bcl-2 par une simple comparaison des séquences protéiques de deux protéines, Bcl-2 et Bax, de deux espèces différentes : *Homo sapiens* et *Mus musculus*.[52] Ces deux domaines d'homologie BH1 et BH2 sont présents dans tous les membres anti-apoptotiques ainsi que dans certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Ce sont des motifs constitués de 19 (ou 20) et 12 résidus, respectivement, et séparés l'un de l'autre par 30 résidus. Certains résidus conservés de ces deux domaines sont essentiels pour le fonctionnement des membres anti-apoptotiques en particulier pour les interactions de ces derniers avec les membres pro-apoptotiques.[53],[54] En 1995, Chittenden *et al.* ont identifié le domaine BH3 comme étant un segment de 16 acides aminés dans la protéine Bak, nécessaire à cette protéine pour former des hétéro-dimères avec des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et favoriser la mort cellulaire. La résolution de la structure (en solution) d'un complexe entre la protéine Bcl-x_L et le segment de 16 résidus de la protéine Bak (domaine BH3) a révélé que le domaine BH3 adopte la structure d'une hélice α amphipathique qui se lie avec une grande affinité à la poche hydrophobe créée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de la protéine Bcl-x_L *via* des interactions hydrophobes et électrostatiques. Les mutations qui perturbent les deux types d'interactions abrogent à la fois l'hétéro-dimérisation de la protéine et la capacité d'induire la mort.[37]

Toutes les protéines de la famille Bcl-2 contiennent un domaine BH3, de tailles différentes. L'alignement des séquences des domaines BH3 de la plupart des membres connus de la famille Bcl-2 a permis de définir les huit résidus du domaine impliqués dans l'hétéro-dimérisation (Figure 4). Ce domaine est particulièrement important pour l'activité des membres pro-apoptotiques.[55],[49]





Le domaine BH3 comporte trois positions assez conservées : un résidu hydrophobe, fréquemment une Leucine, en position 1 du noyau, une Glycine en position 5 et un résidu chargé négativement, généralement une Aspartate, en position 6 (Figure 4). Les deux résidus (Leu et Asp) sont essentiels à la formation des hétéro-dimères et à la promotion de la mort.[49]

Le domaine BH4 a été décrit pour la première fois par Reed *et al.* en 1996 bien que plusieurs groupes aient remarqué avant cette date l'importance de la partie N-terminale des protéines antiapoptotiques. Ce domaine est formé d'une hélice amphipathique sur la face opposée de la protéine.[56]

Le domaine BH4 permet de distinguer les membres anti- des pro-apoptotiques. En effet, ce motif est présent chez les protéines anti-apoptotiques mais absent chez les pro-apoptotiques. La mise en évidence de la présence et de la position de ce domaine reste difficile, en particulier dans les protéines MCL-1, Bcl2l10 et Bfl-1 malgré les efforts consacrés.[57]

Ce domaine semble être très important pour le fonctionnement de la protéine. Handa *et al.* ont montré que sa suppression abroge la fonction anti-apoptotique de la protéine Bcl-2 ainsi que son homo-dimérisation.[58] En outre, Peherstorfer *et al.* ont montré que le peptide BH4 seul a des propriétés anti-apoptotiques.[59]

2.4. Les modèles d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2

D.W. Andrews *et al.* ont décrit l'apoptose comme une danse. Les partenaires de cette danse sont les protéines de la famille Bcl-2, dont l'échange de partenaires est le régulateur de l'apoptose. Le résultat de cette danse – le sort de la cellule – dépend des interactions entre les protéines de la famille Bcl-2. Ces interactions sont régies par l'abondance des protéines et par l'affinité entre ces dernières.[60]

Les protéines anti-apoptotiques interagissent avec Bax et/ou Bak pour les empêcher de s'insérer dans la membrane mitochondriale. Elles interagissent également avec les protéines proapoptotiques BH3-only pour contrôler la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Pour comprendre les conséquences de ces interactions, plusieurs modèles ont été proposés.

2.4.1. Modèle d'activation directe

Dans ce modèle (Figure 5), les protéines BH3-only sont classées en deux groupes, selon leur profil d'interaction avec les protéines pro- « activatrices » et anti-apoptotiques « sensibilisatrices ».[61] En l'absence du signal de mort, les protéines BH3-only activatrices (Bid, Bim et Puma) sont séquestrées par les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines. Les sensibilisatrices comme Bad, Noxa, Bik et Bmf se trouvent libres et inactives jusqu'à la réception d'un signal de mort. Le signal de mort active les protéines sensibilisatrices, ce qui leur permet de se lier aux protéines anti-apoptotiques grâce à leur affinité plus importante pour ces dernières. Cette interaction entraîne la libération des protéines activatrices qui, à leur tour, activent Bax et Bak, induisant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale.[62],[63]

2.4.2. Modèle d'activation indirecte

Dans le modèle d'activation indirecte (Figure 5), les protéines anti-apoptotiques séquestrent Bax et Bak pour empêcher la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Quand un signal d'apoptose est détecté, l'expression des protéines BH3-only est augmentée, permettant leur interaction avec les protéines anti-apoptotiques et la libération des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.[64]



Figure 5. Représentation des modèles d'activation directe et indirecte des membres pro-apoptotiques multi-domaines (extrait de la réf [64])

2.4.3. Modèle d'activation commun ou combiné

Les deux modèles cités ci-dessus peuvent coexister pour amorcer l'apoptose. En effet, le modèle commun propose que les protéines anti-apoptotiques se lient et inhibent les protéines Bax et Bak à la membrane et séquestrent également les BH3-only activatrices. L'expression des protéines « sensibilisatrices » lors de l'apoptose entraîne une rupture entre les anti-apoptotiques et les autres protéines (activatrices et Bax/Bak), induisant ainsi la formation de pores membranaires.[65]

3. Conclusion

Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution aboutit à l'apoptose. La dérégulation de ce processus hautement régulé est à l'origine de nombreuses maladies, tels que les cancers. **Dans le cas du cancer de l'ovaire, les protéines de la famille Bcl-2 représentent l'un des acteurs majeurs responsables de cette dérégulation, notamment les protéines Bcl-x**_L et MCL-1. La surexpression de ces protéines est à l'origine des résistances aux traitements existants. Les inhibiteurs de la protéine **Bcl-x**_L existent déjà, tandis que l'inhibition de la protéine MCL-1 reste problématique. Dans le deuxième chapitre, nous allons donc nous focaliser sur la protéine MCL-1.

Chapitre II. La protéine MCL-1 et ses inhibiteurs

Lors de mes travaux de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à la protéine MCL-1, c'est pourquoi la partie suivante lui est dédiée.

Dans un premier temps, je réaliserai une description fonctionnelle et structurale détaillée de cette protéine qui est au cœur de notre étude, puis je détaillerai les différentes approches adoptées dans la littérature pour inhiber la protéine MCL-1.

1. Description fonctionnelle et structurale de la protéine MCL-1

1.1. Expression et localisation

La protéine MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia-1), ou Bcl2L3, est un membre anti-apoptotique de la famille des protéines Bcl-2. Il s'agit du deuxième membre identifié de cette famille, après Bcl-2.[34]

Le gène de la protéine MCL-1 humaine, composé de 3 exons (I, II et III), est localisé sur le chromosome 1q21,[66] et code pour trois isoformes : MCL-1_L,[34] MCL-1_s,[67],[68] et MCL-1_{ES},[69] (Figure 6).

La protéine MCL-1 est exprimée dans une grande variété de types de cellules chez l'adulte et pendant le développement embryonnaire et tissulaire, avec des niveaux d'expression spécifiques au stade de différenciation cellulaire.[70]



Figure 6. Structures des isoformes de la protéine MCL-1 (extrait de la réf [71])

La localisation intracellulaire de la protéine MCL-1 est principalement membranaire, via son domaine TM (Transmembranaire). On la trouve également au niveau mitochondrial. Les principales localisations des trois isoformes de la protéine MCL-1 sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 5. Flocalisation des differents isomeres de la proteine most r							
Isoformes	Localisation	Références					
MCL-1 _L	Membranes intracellulaires (mitochondrie et	[72]					
	réticulum endoplasmique)						
MCL-1 _s	Cytosol et réticulum endoplasmique	[67]					
MCL-1 _{ES}	Cytosol et mitochondrie	[69]					

a. La protéine MCL-1_L

La protéine prototypique MCL-1_L ou MCL-1 (dans la suite, elle sera désignée par MCL-1) est la plus longue des isoformes. C'est une protéine anti-apoptotique qui diffère des autres membres anti-apoptotiques par sa taille plus importante (37 kDa). Elle comprend 350 résidus (versus 239 pour Bcl-2 et 233 pour Bcl-x_L). Elle est essentiellement ancrée dans la membrane mitochondriale externe par un domaine transmembranaire C-terminal (TM) et ne contient que trois domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 (alors que Bcl-2 et Bcl-x_L en possèdent quatre).[72] La partie N-terminale de MCL-1 est plus longue que celle des autres membres anti-apoptotiques ; elle contient plusieurs domaines PEST, riches en Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T). Les domaines PEST sont souvent présents dans les protéines à demi-vie courte (t1/2 typiquement de l'ordre d'une à quelques heures).[73]

b. La protéine MCL-1s

L'épissage de l'exon II produit la protéine MCL-1_s (32 kDa, 271 résidus),[71] qui ne garde que le domaine BH3. Ce dernier lui confère une activité pro-apoptotique et lui permet ainsi d'inhiber la protéine MCL-1_L.[67],[68]

c. La protéine MCL-1_{ES}

La protéine MCL-1_{ES} est issue de l'épissage de l'exon I qui se traduit par l'absence de plusieurs acides aminés du domaine PEST (53 résidus). Elle est composée de 197 résidus (25 kDa) et contient les 3 domaines BH (1,2 et 3) et le domaine transmembranaire (TM).[71] Elle interagit avec la protéine MCL-1 et induit la mort cellulaire. Lorsque la protéine MCL-1_{ES} est co-exprimée avec la protéine MCL-1, cette dernière ne perd pas seulement son activité anti-apoptotique mais elle renforce également le potentiel pro-apoptotique de la protéine MCL-1_{ES}.[43]

1.2. Structure

En 2005, Day *et al.* ont publié la première structure tridimensionnelle déterminée par RMN du domaine C-terminal de la protéine MCL-1 murine en solution, sous forme d'un monomère. L'analyse de la structure obtenue a montré que la protéine MCL-1 possédait une structure similaire aux autres protéines anti-apoptotiques.[74] Cette structure comporte un noyau hélicoïdal globulaire bien défini, organisé en 8 hélices α : α 1 (résidus 155-172), α 2 (résidus 185- 205), α 3 (résidus 206-214), α 4 (résidus 224-233), α 5 (résidus 242-261), α 6 (résidus 265–282), α 7 (résidus 284–289) et α 8 (résidus 293–299). Le sillon hydrophobe de la protéine MCL-1 est formé à partir des hélices α 2, α 3 et α 4. Les hélices α 5 et α 8 forment la base de cette fente.

Des régions très peu structurées sont également repérées à l'extrémité N-terminale (résidus 152-154), à l'extrémité C-terminale (résidus 300-308), et au niveau d'une boucle de 12 résidus reliant les hélices α 1 et α 2 (résidus 173-184) (Figure 7A).



Figure 7. Structures de la protéine MCL-1 A. Structure RMN de la protéine MCL-1¹⁵²⁻³⁰⁸ murine (code PDB 1WSX, extrait de la réf [74]) B. Structure RMN de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ humaine (code PDB 2MHS, extrait de la réf [75])

En 2014, Liu *et al.* ont rapporté la première structure à résolution atomique, déterminée par RMN, de la forme *apo* de la protéine MCL-1 humaine. Cette structure contient les trois motifs d'homologies (BH1, BH2 et BH3) qui participent à la formation du site d'interaction.[75] La structure 3D obtenue est bien définie et organisée en 7 hélices α : α 1 (résidus 173–191), α 2 (résidus 204–235), α 3 (résidus 240–253), α 4 (résidus 262–280), α 5 (résidus 284–301), α 6 (résidus 303–308) et α 7 (résidus 311–319). La partie C-terminale et les boucles entre les hélices (α 1– α 2, α 3– α 4 et α 4– α 5) sont désordonnées (Figure 7B). Dans cette structure, l'hélice centrale α 4 est entourée par les six autres hélices : α 1, α 2, α 3 et α 5 d'un côté et α 6, α 7 de l'autre côté.

Le domaine BH3 est formé par les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 7$. La distribution des charges à la surface du domaine d'interaction BH3 est différente des autres protéines anti-apoptotiques ; le potentiel électrostatique est positif aux deux extrémités de domaine d'interaction BH3 à cause de la présence des résidus Arg233, Lys234, Arg248 et Arg263. Cependant, la présence de l'Asp256 sur le côté de l'hélice $\alpha 3$ confère un potentiel électrostatique négatif à cette surface (Figure 8A).

Liu et *al.* ont montré que, malgré l'identité de séquence de 89 % entre la protéine humaine et la protéine murine, il existait quelques différences structurales notamment concernant la taille du site d'interaction et la distribution des charges à la surface (Figure 8).[75]



Figure 8. La distribution des charges sur la surface de la protéine MCL-1. **A.** protéine MCL-1 humaine (170-333). **B.** Protéine MCL-1 Murine (152-308). La surface chargée positivement est colorée en bleu et la surface chargée négativement est colorée en rouge. Le potentiel électrostatique a été calculé en utilisant PyMol. (extrait de la réf [75])

La cavité hydrophobe de la protéine MCL-1 présente une conformation ouverte et prête à interagir avec son ligand contrairement aux autres protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-x_L). Cette différence joue un rôle très important dans la sélectivité de la protéine MCL-1 envers son ligand.[76]

La définition des poches hydrophobes constituant le site d'interaction de la protéine MCL-1 diffère d'une référence bibliographique à une autre et reste toujours ambiguë. Cependant, la règle générale dicte que toutes les protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine conservé, **le domaine BH3**. Ce domaine contient quatre résidus clés de nature hydrophobe, en positions (i (h1), i+4 (h2), i+7 (h3) *et i+11* (h4)) sur l'hélice BH3. Les chaînes latérales de ces quatre résidus sont projetées dans les cavités hydrophobes du sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques. Les cavités d'accueil de ces quatre résidus hydrophobes sont appelées P1(i), P2(i+4), P3(i+7) et P4(i+11), respectivement.[77]

Pour définir précisément le site d'interaction entre la protéine MCL-1 et ses ligands, nous avons souhaité adopter une définition unique de ses poches hydrophobes. Pour cela, nous avons choisi cinq structures (de la PDB) de la protéine MCL-1 humaine en complexe avec les domaines BH3 des différentes protéines pro-apoptotiques (Tableau 4). A l'exception de la structure 2KBW, ces structures sont obtenues par cristallographie. Le logiciel PyMol [78] a été utilisé pour analyser l'interface de contact entre la protéine MCL-1 et les différents partenaires **afin d'identifier les résidus proches des résidus clés (h1-h4)**, *i.e.* les résidus qui forment les poches hydrophobes du domaine BH3 de la protéine MCL-1.

Code PDB	MCL-1	Partenaire	Résolution de la structure	Résidus clés du Partenaire (h1-h4)	Résidus clés des poches hydrophobes de la protéine MCL-1 (P1-P4)	Réf
3MK8	Humain	hMCL-1-BH3	Diffraction-	h1 : L210	P1 : V249, M231	[79]
	158	21 résidus	RX	h2 : L213	P2 : F270, L267, V253, F228	
	résidus	(208-228)	(2,321 Å)	h3 : V216	P3 : A227, H224, T266	
	(170-			h4 : V220	P4 : V220, V265, V216	
	327)					
3PK1	Humain	hBax-BH3	Diffraction-	h1 : L59	P1 : K234, L235, M231, V249	[80]
	153	34 résidus	RX	h2 : L63	P2 : F270, L267, V53,	
	résidus	(48-81)	(2,486 Å)	h3 : I66	P3 : A227, F228, H224, T266	
	(174-			h4 : L70	P4 : V216, V220, V265	
	326)					
5C3F	Humain	hBid-BH3	Diffraction-	h1 : I86	P1 : L235, K234, V249	[81]
	156	24 résidus	RX	h2 : L90	P2 : M231, F270, F228, L267,	
	résidus	(79-102)	(1,430 Å)		V253	
	(172-			h3 : V93	P3 : H224, T266	
	327)			h4 :NLE97	P4 : V220, V216	
2KBW	Humain	hBid-BH3	RMN en	h1 : I86	P1 : L235, K234, V249, M231	[82]
	164	35 résidus	solution		P2 : F270, L267, V253	
	résidus	(72-106)		h2 : L90	P3 : H224, A227, T266	
	(163-			h3 : V93	P4 : V220, V216, V265	
	326)			h4 : M97		
2PQK	Humain	Bim-BH3	Diffraction-	h1 : I58	P1 : L235, K234	[83]
	158	29 résidus	RX	h2 : L62	P2 : M231, F270, L267, V253	
	résidus	(49-77)	(2,000 Å)	h3 : I65	P3 : H224, A227, F228, T266	
	(170-			h4 : F69	P4 : V220, V216, V265	
	327)					

Tableau 4. La définition des poches dans différents modèles de complexes MCL-1:Inhibiteur (Cut-off=5Å)

Notre analyse a montré que les principaux résidus formant les poches hydrophobes étaient (Figure 9) :

- i. Poche P1 : Leu235, Lys234, Val249, Met231
- ii. Poche P2 : Met250, Phe270, Leu267, Val253
- iii. Poche P3 : Ala227, Phe228, His224, Thr266
- iv. Poche P4 : Val216, Val220, Val265



Figure 9. Définition des poches hydrophobes de la protéine MCL-1172-327

1.3. Rôle physiologique de la protéine MCL-1

Comme nous l'avons vu, la principale fonction de la protéine MCL-1 est la régulation négative de la voie apoptotique intrinsèque. En séquestrant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, elle inhibe la perméabilisation de la membrane mitochondriale, ce qui empêche la libération du cyctochrome C, l'activation du Caspase-9, et finalement le déclenchement de l'apoptose.

La protéine MCL- 1 est soumise à la régulation négative par Noxa ainsi que par d'autres membres de la famille Bcl-2 tels que Bim, Puma et tBid. Ces derniers se lient spécifiquement au sillon de liaison BH3 en déplaçant MCL-1 de Bax et/ou Bak et favorisent ainsi l'apoptose.

La protéine MCL-1 joue d'autres rôles, que je ne décrirai pas ici, dans différents processus physiologiques, tels que l'embryogénèse [84] et la réparation de l'ADN.[85]

2. La protéine MCL-1 : une cible thérapeutique

2.1. Rôle de la protéine MCL-1 dans la résistance à la chimiothérapie

Pendant plusieurs décennies, il a été reporté que la résistance aux traitements chimiothérapeutiques était principalement liée à la protéine Bcl-2, mais récemment, la protéine MCL-1 a également été identifiée comme l'un des facteurs clés responsables de la survie des cellules cancéreuses. En effet, les composés ABT-737 et l'ABT-199 ont montré une très bonne efficacité dans l'inhibition des protéines Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w dans le cas des AML (Accute Myeloid Leukemia) mais une monothérapie prolongée conduit à l'acquisition d'une résistance médicamenteuse contre ces deux composés. Pour étudier les mécanismes potentiels de résistance à l'ABT-737, Yecies *et al.* ont utilisé des lignées cellulaires cancéreuses sensibles à l'ABT-737 (lymphomes OCI-Ly1 et SU-DHL-4). L'exposition à longue durée de ces lignées cellulaires à l'ABT-737 leur a permis d'acquérir une résistance vis-à-vis de ce dernier. Yecies *et al.* ont montré que cette résistance acquise n'était pas liée à l'incapacité du médicament à se lier à la protéine Bcl-2 mais à la surexpression des protéines Bfl-1 et/ou MCL-1, qui ne sont pas inhibées par l'ABT-737.[86] Dans les deux lignées cellulaires (résistantes et non résistantes), la protéine pro-apoptotique Bim a été déplacée de son partenaire anti-apoptotique Bcl-2 par l'ABT-737, mais dans les cellules résistantes, la protéine Bim a été séquestrée par les protéines Bfl-1 et/ou MCL-1 surexprimées, ce qui a empêché la restauration de l'apoptose. L'inhibition de la protéine MCL-1 avec le Flavopiridol a permis de re-sensibliser les cellules résistantes à l'ABT-737. La surexpression de la protéine MCL-1 n'était pas due à l'augmentation de sa durée de vie mais plutôt à une transcription accrue de son génome.

Par ailleurs, dans le cas des cellules résistantes aux Cisplatines, Michels *et al.* ont montré que seule la protéine MCL-1 était surexprimée. L'inhibition de cette dernière par des méthodes génétiques (*si*ARN) ou pharmacologiques (Obatoclax) a permis de restaurer l'apoptose dans ces cellules résistantes.[87]

De même, Lestini *et al.* ont montré que dans le cas des neuroblastomes, l'inhibition de la protéine MCL-1 permet de re-sensibiliser les cellules résistantes aux traitements couramment utilisés comme l'Etoposide, la Doxorubicin et l'ABT-737.[88]

Enfin, dans le cancer de l'ovaire, l'expression de MCL-1 avec BAG3 (Bcl-2-Associé Athanogène 3), l'une des six protéines de la famille des BAG, impliquées dans des processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et l'apoptose, serait associée à une résistance à la chimiothérapie. Habata *et al.* ont constaté que la surexpression combinée des protéines BAG3 et MCL-1 était significativement associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire.[89] *In vitro*, le knockdown de la protéine BAG3 et l'utilisation de MIM-1 (inhibiteur de la protéine MCL-1) dans des cellules cancéreuses ovariennes ont augmenté significativement l'efficacité du Paclitaxel, en absence et en présence de l'ABT-737. **Ces résultats suggèrent que l'inhibition des protéines BAG3 et MCL-1 peut être une stratégie thérapeutique utile pour le traitement des cancers de l'ovaire chimio-résistants.**

Il a également été montré que la prolifération tumorale dans le cas du cancer de l'ovaire est promue par la surexpression des deux protéines anti-apoptotiques (Bcl-x_L et MCL-1),[90] et que l'inhibition concomitante des protéines MCL-1 et Bcl-x_L permettait de rétablir l'apoptose.[6]

Une des stratégies thérapeutiques développées pour pallier la prolifération tumorale consiste à chercher des molécules BH3-mimétiques qui se lient à la cavité hydrophobe des protéines anti-apoptotiques. Cette stratégie a donné naissance à plusieurs produits tels que l'ABT-737 [7] et sa forme administrable par voie orale, l'ABT-263 [8], qui ont une forte affinité et sélectivité pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w.[91] Ainsi, il existe déjà des inhibiteurs de Bcl-x_L mais l'inhibition sélective de la protéine MCL-1 reste problématique ; ce n'est que récemment que des molécules inhibitrices de la protéine MCL-1 ont été publiées.[92]

2.2. Les inhibiteurs de la protéine MCL-1

La dernière demi-décennie a connu une hausse rapide de l'intérêt envers la recherche des inhibiteurs de la protéine MCL-1. Cela a donné lieu à un nombre important de petites molécules BH3-mimétiques de structures diverses (peptides ou petites molécules organiques), mais à l'heure actuelle, il n'y a pas, sur le marché, d'inhibiteur de MCL-1 présentant le niveau d'affinité requis pour inhiber cette protéine.[92]

Le vrai challenge est donc d'identifier des petites molécules capables d'interagir avec la protéine MCL-1 de la même manière que Noxa, son inhibiteur naturel. Les composés décrits ci-après sont les plus prometteurs qui font, ou ont fait, l'objet d'études cliniques.

2.2.1. Les inhibiteurs peptidiques

Les peptides présentent l'une des solutions utilisées pour stabiliser ou perturber les IPPs.[93] Toutefois, *in vivo*, l'efficacité des peptides est compromise en raison d'une perte de la structure secondaire, d'une mauvaise absorption cellulaire et d'une sensibilité à la protéolyse. Une approche synthétique prometteuse pour surmonter ces limitations est d'agrafer le peptide pour fixer son orientation (Figure 10).[94]





Le principe d'agrafage des peptides a été introduit pour la première fois par Verdine *et al.* [96] Ces auteurs ont montré que les propriétés pharmacologiques des peptides hélicoïdaux pouvaient être améliorées par des modifications synthétiques, et que les systèmes de réticulation entièrement hydrocarbonés pouvaient augmenter considérablement la propension hélicoïdale et la stabilité métabolique de ces peptides. Ce concept a été ensuite utilisé pour concevoir des inhibiteurs peptidiques des protéines de la famille Bcl-2 à partir du domaine BH3 de la protéine Bid. Ces peptides dérivés des domaines BH3 des protéines de la famille Bcl-2 sont appelés SAHB₈ (**S**tabilized **A**lpha **H**elix of **B**cl-2 domains) (Tableau 5). Le peptide synthétique Bid SAHB_A s'est avéré capable d'activer spécifiquement l'apoptose dans les cellules leucémiques et d'inhiber la croissance des xénogreffes de leucémie *in vivo*.[93] Après ce travail, plusieurs domaines peptidiques des BH3-only ont été utilisés pour synthétiser des peptides agrafés capables de moduler l'apoptose. En 2010, Walensky *et al.* ont développé une librairie de peptides de structure hélicoïdale stabilisée par des agrafes (SAHB₈) (Tableau 5).[79]

Tableau 5: Peptides SAHBs décrits par Verdine et Walensky

Composés	Séquences ^(a)	Hélicité [%] ^(b)	$K_D[nM]$
Bid BH3	EDIIRNIARHLAQVGDSN _L DRSIW	15,7±0,3	269 ^(c)
Bid SAHB _A	EDIIRNIARHLA*VGD*NLDRSIW	87,5±0,3	38,8 ^(c)
Bid SAHB _{A(G \rightarrow E)}	EDIIRNIARHLA*VED*N _L DRSIW	77 , 8±0,6	483 ^(c)
Bid SAHB _B	EDIIRNI*RHL*QVGDSNLDRSIW	85,5±1,3	n.d.
Bid SAHB _C	EDIIRNIA*HLA*VGDSNLDRSIW	59,7±6,5	n.d.
Bid SAHB _D	EDIIRNIAR*LAQVGD*N _L DRSIW	35,6±1,8	n.d.
MCL-1 BH3	KALETLRRVGDGVQRNHETAF	18	$245\pm29^{(d)}$
MCL-1 SAHB _A	KALETLR*VGD*VQRNHETAF	62	$43 \pm 16^{(d)}$
MCL-1 SAHB _B	KAL*TLR*VGDGVQRNHETAF	100 ^(e)	$18 \pm 4^{(d)}$
MCL-1 SAHB _C	KALETLRRV*DGV*RNHETAF	81	>1000 ^(d)
MCL-1 SAHB _D	KALETLRRVGDGV*RNH*TAF	91	10±3 ^(d)
MCL-1 SAHB _E	KALETLRRVGDGVQR*HET*F	68	$33 \pm 10^{(d)}$

^(a) * indique la localisation des agrafes. ^(b) valeurs déterminées par dichroïsme circulaire. ^(c) valeurs déterminées par des essais de polarisation de fluorescence. ^(d) valeurs déterminées par des essais de polarisation de fluorescence (MCL-1 FP). n.d. non déterminée. ^(e) dépasse la valeur idéale calculée pour le standard. (extrait de la réf [94])

Parmi tous les SAHB_s, le MCL-1 SAHB_D a montré une sélectivité et une très bonne affinité envers la protéine MCL-1 ($K_D = 10$ nM). Pour définir les interactions mises en jeu entre cet inhibiteur et la protéine MCL-1, la structure cristalline du complexe a été résolue (code PDB 3MK8).[79] L'analyse de ce complexe a révélé que le peptide MCL-1 SAHB_D adopte une structure en hélice α et interagit avec la protéine MCL-1 au niveau du sillon hydrophobe formé par l'hélice α 2 (BH3), des parties des hélices α 3, 4 et 5 (BH1) et de l'hélice α 8 (BH2) (Figure 11a). En effet, les résidus hydrophobes Leu213, Val216, Gly217 et Val220 du MCL-1 SAHB_D font un contact direct avec le sillon hydrophobe de la protéine MCL-1 (Figure 11b), ces interactions sont renforcées par la formation d'un pont salin entre le résidu Asp218 du peptide MCL-1 SAHB_D et le résidu Arg263 de la protéine MCL-1.

Il est également intéressant de noter que l'agrafe hydrocarbonée de MCL-1 SAHB_D établit des contacts hydrophobes avec le périmètre du site d'interaction de la protéine MCL-1 (Figure 11c). Ainsi, l'affinité supérieure de MCL-1 SAHB_D peut provenir à la fois de son hélicité améliorée (91% contre 18% pour MCL-1 BH3) (Tableau 5) et de l'implication de contacts hydrophobes par l'agrafe elle-même. MCL-1 SAHB_D cible efficacement la protéine MCL-1. Il perturbe son pouvoir anti-apoptotique et sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose.



Figure 11. La structure RX du complexe MCL-1 SAHB_D:MCL-1 (code PDB 3MK8, résolution 2,32Å)
A. La structure cristalline montre que l'interaction entre les deux partenaires se fait au niveau du domaine BH3. B. Les résidus L213, V216, G217 et V220 du peptide MCL-1 SAHB_D sont en contact direct avec les résidus clés du domaine BH3 de la protéine MCL-1. C. L'agrafe établit des contacts hydrophobes supplémentaires au niveau du site d'interaction. (extrait de la réf [79])

Dans le même contexte, Muppidi *et al.* ont proposé des peptides, issus de Noxa, avec une meilleure affinité et surtout une meilleure activité cellulaire comparé à leur parent.[97],[98] Le domaine BH3 de Bim a été également utilisé pour concevoir des inhibiteurs sélectifs de la protéine MCL-1 par Keating *et al.*[99] Finalement, ces études démontrent que l'utilisation des peptides agrafés est une stratégie prometteuse pour concevoir des peptides BH3-mimétiques perturbateurs des IPPs. La sélectivité de ces peptides est attribuée aux interactions faites par les chaînes latérales de ces derniers. Les études suggèrent également que le choix de la position et de l'agent de réticulation peut améliorer l'affinité. Les stratégies d'agrafages ainsi que les méthodes de vectorisation de ces peptides sont très importantes pour le passage cellulaire et la résistance à la protéolyse de ces derniers.

Une autre approche qui consiste à identifier des petites molécules BH3-mimétique a été également adoptée. Cette dernière permet de s'affranchir des problèmes de solubilité et de la perméabilité cellulaire rencontrés avec les peptides.

2.2.2. Les petites molécules inhibitrices de la protéine MCL-1

Les petites molécules proposées et décrites dans la littérature sont pour la plupart des BH3mimétiques, ont un poids moléculaire inférieur à 900 Da [100], et se présentent sous forme de molécules naturelles ou synthétiques issues de différents criblages de banques de molécules. Elles ont la capacité de traverser les membranes plasmiques, ce qui rend leur utilisation *in vivo* plus pratique comparé aux peptides. Elles interagissent avec le domaine BH3 de la protéine MCL-1 et peuvent ainsi bloquer l'hétéro-dimérisation de MCL-1 avec les protéines pro-apoptotiques.

Plusieurs molécules sont déjà en phase préclinique voire en phases cliniques (I, II et III), validant ainsi cette cible thérapeutique. On distingue deux catégories pour ces molécules : **les** *pan***inhibiteurs et les inhibiteurs sélectifs**. Nous allons illustrer ceci en décrivant trois exemples ayant fait l'objet d'études approfondies :

- Une famille de produits naturels (et semi-synthétiques).
- Des produits issus de l'approche SAR par RMN.
- Le dernier produit, décrit dans la littérature, présentant à ce jour la meilleure activité sur la protéine MCL-1.

2.2.2.1. La famille du Gossypol

Le (+) Gossypol est un aldéhyde polyphénolique naturel, dérivé des graines de coton, identifié initialement comme un agent contraceptif en Chine durant les années 50 avant la découverte de ses propriétés comme un *pan*-BH3-mimétique.[101] Il se lie à Bcl-2, Bcl-x_L et MCL-1 avec de faibles affinités, de l'ordre du micromolaire.[102] Son énantiomère (-) appelé AT-101 a été largement étudié durant la dernière décennie pour ses propriétés anti-apoptotiques et antitumorales prouvées *in vitro* et *in vivo* (sur des modèles animaux) dans plusieurs types de cancer. Il présente des affinités de l'ordre du micromolaire, pour Bcl-x_L (IC₅₀ = 0,48 μ M), Bcl-2 (IC₅₀ = 0,32 μ M) et MCL-1 (IC₅₀=0,18 μ M).[103] C'est donc le premier BH3-mimétique qui a été découvert. Malheureusement, ce composé s'est avéré fortement toxique et peu efficace lors des études cliniques.



Des modifications structurales introduites sur le Gossypol ont donné lieu à de nombreux dérivés semi-synthétiques, tels que : l'Apogossypol, l'Apogossypolone et le Sabutoclax (Figure 12). Ces différents dérivés sont actuellement en phase I/II d'essais cliniques.[104],[105],[106]

2.2.2.2. <u>Les dérivés de l'indole</u>

En utilisant une technique de criblage par RMN basée sur l'étude de la relation structure/activité, Fesik et ses collaborateurs ont conçu plusieurs petites molécules inhibitrices de la protéine MCL-1 (Figure 13), et susceptibles d'aboutir à de nouveaux médicaments contre différentes variétés de cancers.[107],[108],[109],[110]

L'affinité de ces composés pour la protéine MCL-1 a été mesurée en présence de 1% de FBS (Fetal Bovine Serum). Cette approche permet d'évaluer l'effet de la liaison des protéines sériques avec le ligand sur son activité inhibitrice de la protéine MCL-1. Les affinités mesurées dans ces conditions peuvent être un bon indicateur de l'activité des ligands dans les essais cellulaires. Le composé 3 semble être celui qui présente la meilleure affinité (K_i =2,8 nM) et la meilleure sélectivité pour la protéine MCL-1(50000 fois par rapport à Bcl-x_L).[110]



Figure 13. Structures des composés proposés par Fesik et ses collaborateurs (extrait des réf [107],[108],[109],[110])

2.2.2.3. La molécule S63845

Les chercheurs du laboratoire Servier ont également utilisé des approches guidées par la RMN pour identifier des inhibiteurs sélectifs de la protéine MCL-1. Leur étude a mené à la conception du composé S63845 (Figure 14A) comme un inhibiteur sélectif de la protéine MCL-1 (Ki<1,2 nM-FPA, KD=0,19 nM-SPR).[111]



Figure 14. La molécule S63845 A. Structure chimique. B. Structure RX du complexe MCL-1:S63845 (code PDB 5LOF [111])

La résolution de la structure cristalline du complexe S63845:MCL-1 (code PDB 5LOF [111]) a montré que la molécule S63845 est un BH3-mimétique. L'interaction se fait principalement au niveau des poches hydrophobes P2 et P4 (Figure 14B).[111]

Le composé S63845 inhibe efficacement la protéine MCL-1 *in vitro* et induit une apoptose massive dans des modèles cellulaires d'hémopathies malignes et cancers solides sur-exprimant la protéine MCL-1. Le composé S63845 a été également évalué pour son efficacité *in vivo* sur des xénogreffes de myélome multiple. L'administration par voie intraveineuse (IV) exerce une activité anti-tumorale dose-dépendante avec une régression complète des tumeurs de la plupart des souris traitées. Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres modèles de xénogreffes établies à partir de lignées hématologiques telles que les lymphomes et la leucémie myéloïde chronique.

Par conséquent, nous avons montré que la stratégie qui consiste à s'intéresser aux inhibiteurs mimant le domaine BH3 est pertinente et semble être prometteuse. Elle a conduit à de nombreuses molécules inhibitrices de la protéine MCL-1 qui ne sont pas présentées ici, et a mis en évidence la diversité chimique des composés capables d'interagir avec la protéine MCL-1 (Figure 15).[92]





C'est dans ce contexte de recherche d'inhibiteurs BH3-mimétiques que l'équipe du Pr. Voisin-Chiret a choisi de concevoir des foldamères hétéro-aromatiques adoptant la structure d'une hélice α et portant des substituants capables de mimer les chaînes latérales des résidus clés de protéines BH3-only, notamment de Noxa responsable de l'interaction avec MCL-1.

2.2.2.4. Les foldamères oligopyridiniques

Comme évoqué précédemment, les protéines BH3-only qui sont des inhibiteurs naturels de la protéine MCL-1, s'ancrent dans la cavité de la protéine MCL-1 principalement par des résidus aux positions *i*, *i*+4, *i*+7 et *i*+11, situés sur la face de contact de l'hélice BH3-only, et par un résidu d'Acide Aspartique (*i*+9) sur le côté opposé. Cet acide aspartique interagit avec l'Arg263 de la protéine MCL-1, qui est totalement conservée dans toutes les protéines anti-apoptotiques. En se basant sur une modélisation informatique pour mimer le domaine BH3 du Noxa, l'équipe du CERMN a développé des foldamères abiotiques basés sur une structure composée de pyridines arborant différents substituants capables d'interagir avec la poche hydrophobe de la protéine MCL-1. La caractérisation de ces foldamères abiotiques oligopyridiniques, mimétiques des hélices α , a montré que ces composés étaient capables de mimer les chaînes latérales des résidus clés d'une hélice α .[9]

Parmi la série d'oligopyridines synthétisées à Caen, le composé le plus prometteur est le MR-29072, nommé **Pyridoclax** (Figure 16). Ce dernier comporte en particulier un substituent plus hydrophobe (styryle), inspiré de Noxa, qui possède un résidu Phénylalanine dans cette position, non conservé dans les autres protéines BH3-only.



Figure 16. Structure du Pyridoclax et sa superposition avec une hélice α poly-alanine. Le groupement styryle mime le résidu en position (i+4) et le méthyle le résidu en position (i+7). (extrait de la réf [9])

L'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1 a été mise en évidence par différentes techniques (Figure 17). La technique de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a montré que le Pyridoclax a la capacité de dissocier Bim de MCL-1 *in cellulo*. Ceci indique qu'il pourrait favoriser l'activation de Bak et Bax. Toutefois, son association avec l'ABT-737 (anti-Bcl-x_L) induit une apoptose massive dans des lignées de cancer de l'ovaire (Figure 17A).[9]





A. Évaluation de l'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1 *in cellulo* par une étude de BRET.
B. l'effet de l'administration concomitante du Pyridoclax avec l'ABT-737 sur la prolifération des cellules tumorales ovariennes chimio-résistantes (IGROV-R10) (extrait de la réf [9])

La technique de résonance plasmonique de surface (SPR) a permis de montrer que le Pyridoclax cible bien la protéine MCL-1 avec une forte affinité ($K_D = 25$ nM) et qu'il n'interagit pas avec la protéine Bcl-x_L. Cependant, malgré une forte affinité moléculaire, les études *in vitro* ont montré que le Pyridoclax doit être utilisé à des concentrations relativement élevées (25 μ M), pour une meilleure efficacité. Les derniers résultats obtenus *in vivo* semblent toutefois indiquer une activité très intéressante dans différents modèles de tumeurs ovariennes humaines.[117]



Figure 18. Caractérisation de l'interaction entre le Pyridoclax et les protéines MCL-1 et Bcl-xL, par SPR. (extrait de la réf [9])

Ces méthodes expérimentales ont permis de mettre en évidence l'interaction et de quantifier l'affinité du Pyridoclax envers la protéine MCL-1. En revanche, ces méthodes ne confèrent aucune information sur le site d'interaction du Pyridoclax sur la protéine MCL-1.

Pour prédire le site d'interaction du Pyridoclax sur la protéine MCL-1, des études de Docking ont été effectuées sur la protéine MCL-1 humaine (code PDB : 2KBW [82]) et ont montré que le Pyridoclax est docké avec de bons scores et se positionne bien dans la poche hydrophobe de la protéine MCL-1. Deux orientations principales ont émergé des études de Docking. Dans ces deux poses, le groupement styryle en position *i*+7, toujours ancré dans la même poche, mime le résidu phénylalanine spécifique de Noxa en cette même position et augmente ainsi la sélectivité du Pyridoclax envers la protéine MCL-1. Il établit des interactions π - π avec les résidus Phe228, His224 et une interaction hydrophobe avec le résidu Met231 de la protéine MCL-1. Quant au groupement méthyle, selon les poses, il s'oriente vers différentes poches ou reste exposé au solvant. L'azote de l'une des pyridines terminales du Pyridoclax interagit avec l'Arg263 conservée de la protéine MCL-1, mimant ainsi l'Acide Aspartique du domaine BH3. À l'autre extrémité, le cycle pyridine est localisé dans la poche P1 de la protéine MCL-1 à côté du résidu Phe270 (Figure 19).



Figure 19. Les différentes poses du Pyridoclax en interaction avec la protéine MCL-1 (extrait de la réf [9])

3. Conclusion

A l'heure actuelle, la protéine anti-apoptotique MCL-1 constitue une cible thérapeutique pertinente. La recherche d'inhibiteurs sélectifs de la protéine MCL-1 est l'un des thèmes de recherche en vogue pour lutter contre le cancer mais, à ce jour, aucun inhibiteur n'a été validé par les agences du médicaments (aux USA et en Europe).

Toutefois, la stratégie de l'équipe de Pr A. S. Voisin-Chiret a conduit à des résultats prometteurs. Afin de comprendre le mode d'interaction du Pyridoclax, l'**étude théorique présentée ci-dessus** se doit d'être complétée et validée par une étude expérimentale. La caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax par RMN et modélisation moléculaire a ainsi fait l'objet de la première partie de mon travail de thèse.

Partie 2 - CARACTERISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND : METHODOLOGIE

La reconnaissance moléculaire est le processus par lequel des macromolécules biologiques interagissent entre elles ou avec diverses petites molécules ayant une spécificité et une affinité élevées pour former un complexe spécifique. Elle constitue la base de tous les processus des organismes vivants.[118]

Les protéines représentent une classe importante de macromolécules biologiques, elles remplissent leurs fonctions en se liant à d'autres protéines ou à d'autres petites molécules. La compréhension des mécanismes d'interaction entre les protéines et les ligands est donc essentielle pour comprendre les phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire. L'élucidation des mécanismes de la reconnaissance intermoléculaire facilite également la découverte, la conception et le développement de médicaments.[119]

Dans cette partie, je présenterai d'abord les mécanismes physico-chimiques qui régissent la liaison protéine-ligand, y compris la cinétique de complexation et les concepts et relations thermodynamiques. J'évoquerai également les trois modèles proposés pour décrire les interactions protéine-ligand. Enfin, les méthodes expérimentales et théoriques disponibles pour étudier l'affinité de l'interaction protéine-ligand seront présentées, et leurs avantages et inconvénients seront discutés.

Chapitre I. Aspects fondamentaux des interactions protéine-ligand

L'étude des interactions Protéine-Ligand se résume principalement à l'étude de l'affinité et de la spécificité entre les deux partenaires. Pour rendre compte de la force du lien Protéine-Ligand, on s'attache à évaluer les constantes cinétiques et thermodynamiques d'association et de dissociation, pour des molécules biologiques en solution.

1. Aspect cinétique

La cinétique de l'interaction protéine-ligand décrit le processus qui entraîne l'association entre la protéine et le ligand, en se concentrant particulièrement sur la vitesse à laquelle les deux partenaires se lient entre eux. Dans un cas simple, on définit la réaction d'association entre une protéine (P) et un ligand (L), formant un complexe (PL), par l'équilibre suivant :

$$P + L \stackrel{k_{on}}{\underset{k_{off}}{\longrightarrow}} PL$$

avec k_{on} (M⁻¹s⁻¹), la constante cinétique d'association, k_{off} (s⁻¹) la constante cinétique de dissociation, qui sont reliées à la vitesse de réaction *v* par :

$$v = \frac{d[PL]}{dt} = k_{on}[P][L] - k_{off}[PL]$$
(1)

Le système évolue vers un état d'équilibre, où les concentrations à l'équilibre sont décrites par l'équation suivante :

$$K_{A} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_{D}}$$
 (2)

où K_A (en M⁻¹) est la constante d'association, et K_D (en M) la constante de dissociation. Par conséquent, une vitesse d'association importante associée à une faible vitesse de dissociation donne une constante de dissociation faible qui reflète une forte affinité de la protéine pour le ligand.

2. Aspect thermodynamique

Un système (protéine-ligand-solvant) est un système thermodynamique composé du soluté (les molécules de protéine et du ligand) et du solvant (l'eau et les ions du tampon). Dans un tel système, il existe des interactions et des échanges thermiques très complexes entre les substances qui le constituent. La première loi de la thermodynamique démontre que l'énergie d'un système est conservée sous une forme ou une autre et ce peu importe les réactions impliquées. La deuxième loi de la thermodynamique exprime la tendance d'un système vers une augmentation d'entropie.

L'énergie libre de Gibbs, potentiel thermodynamique mesurant la capacité d'un système thermodynamique à effectuer un travail maximal ou réversible à température et pression constantes (isotherme, isobare), est une des grandeurs thermodynamiques les plus importantes pour la caractérisation des forces motrices.[119]

Dans le cadre qui nous intéresse, l'énergie libre de Gibbs ou enthalpie libre, (notée ΔG^0) se réfère à la variation de l'énergie libre mesurée dans les conditions d'une pression de 1atm, d'une température de 298 K et d'une concentration effective de réactifs [P] et [L] de 1M. Elle est reliée à la constante d'association K_A par la relation :

$$\Delta G^0 = -RTln(K_A) \tag{3}$$

où R est la constante des gaz (1,987 cal.K⁻¹.mol⁻¹) et T la température en degrés Kelvin. L'équation (3) montre que plus la constante d'association K_A est élevée, plus l'énergie libre standard de liaison est négative, indiquant que les paramètres cinétiques (k_{on} et k_{off}) déterminent les propriétés thermodynamiques du complexe, c'est-à-dire la stabilité du complexe et l'affinité entre la protéine et ligand.

En outre, l'énergie libre d'interaction est égale à la somme des contributions enthalpiques (Δ H) et entropiques (Δ S) à la stabilité du complexe, selon l'équation suivante :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \tag{4}$$

L'enthalpie est une mesure de l'énergie totale d'un système thermodynamique, c'est-à-dire la somme des énergies internes du soluté (ligand et protéine) et du solvant, et de la quantité d'énergie nécessaire pour faire place au système. Pour un processus d'interaction protéine-ligand, le Δ H reflète le changement d'énergie du système lorsque le ligand se lie à la protéine. Le changement d'enthalpie lors de l'interaction est le résultat de :

- La formation ou de la perturbation de nombreuses interactions individuelles, y compris la perte des liaisons hydrogène et des interactions van der Waals formées entre la protéine et le solvant et entre le ligand et le solvant.
- La formation des interactions non covalentes entre la protéine et le ligand, et la réorganisation du solvant près des interfaces de contact.

Ces composantes individuelles peuvent apporter des contributions favorables ou défavorables, et la variation de l'enthalpie nette est la combinaison de ces contributions.[120]

L'entropie est une mesure de la façon dont l'énergie thermique sera répartie uniformément sur l'ensemble du système thermodynamique. La deuxième loi de la thermodynamique détermine que la chaleur circule toujours spontanément des régions de température élevée vers les régions de température basse. Cela réduit le degré de l'ordre du système initial et, par conséquent, l'entropie est également considérée comme une mesure du désordre ou du caractère aléatoire des atomes et des molécules dans un système. ΔS est une propriété thermodynamique globale d'un système, avec ses signes positifs et négatifs indiquant l'augmentation et la diminution globale du degré de liberté du système, respectivement.[119]

3. Modèles d'interaction protéine-ligand

Trois modèles différents ont été proposés pour expliquer les mécanismes d'interaction protéine-ligand. En 1894, Emil Fisher a proposé le modèle « **clé-serrure** » pour poser les bases de reconnaissance moléculaire entre récepteur et ligand et expliquer comment les systèmes biologiques interagissent. Sous cette image d'une serrure et d'une clé, dont la complémentarité de forme permet l'ouverture de la porte, le ligand se fixe sur la protéine si leur formes respectives le permettent, en respectant l'idée de **complémentarité structurale** (Figure 20A).[121],[122]

Toutefois, les partenaires d'une interaction protéine-ligand sont loin d'être statiques comme une serrure ou une clé peuvent l'être. Ce modèle est donc beaucoup trop simpliste pour décrire la réalité d'une interaction entre une protéine et un ligand. En 1958, Daniel Koshland a donc introduit l'hypothèse de l'induction par la forme. Cette hypothèse implique les changements conformationnels subis par la protéine pour s'adapter à la structure du ligand, et permet de prendre en compte, en plus de la complémentarité structurale, les liaisons hydrogène, les interactions charge-charge et la plasticité de la protéine (Figure 20A).[123]



Figure 20. Schéma illustratif des modèles d'interaction protéine-ligand. A. Modèle « clé-serrure ». B. Modèle « induction par la forme ». C. Modèle « sélection conformationnelle ».(extrait de la réf [119])

Les modèles « clé-serrure » et « induction par la forme » considèrent que la protéine a une conformation unique et stable dans des conditions expérimentales données. Cependant, la plupart des protéines sont intrinsèquement dynamiques. Le modèle de « sélection conformationnelle » qui découle de la théorie du paysage énergétique (FEL : Free Energy Landscape) de la structure et de la dynamique des protéines libres, tient compte de cette flexibilité inhérente. Ce modèle suppose que l'état natif d'une protéine n'existe pas comme une conformation unique et rigide mais plutôt comme un vaste ensemble d'états et sous états conformationnels qui coexistent en équilibre avec différentes distributions en population, et que le ligand peut se fixer de façon sélective à l'état ou sous état conformationnel le plus approprié, et déplacer l'équilibre vers cet état/sous-état (Figure 20A).[124]

Pour résumer, nous pouvons dire que l'interaction ligand-récepteur est le résultat de plusieurs interactions, entre des surfaces ajustées et complémentaires, et qu'elle n'engendre pas de grande déformation.

Ainsi, la caractérisation structurale des interactions protéine-ligand s'est imposée comme une discipline essentielle dans le domaine de l'étude fondamentale et appliquée des complexes protéine-ligand. Elle permet notamment de mieux comprendre les relations structure-activité propres aux interactions entre molécules et se révèle essentielle pour mettre en place en aval des stratégies rationnelles de criblage et/ou de conception de molécules à visée thérapeutique.

Chapitre II. Approches expérimentales utilisées pour l'étude des interactions protéine-ligand

De nombreuses techniques expérimentales peuvent être utilisées pour étudier divers aspects de l'interaction protéine-ligand. Dans la suite, je détaillerai les quatre méthodes les plus utilisées pour étudier les interactions protéine-ligand en solution.

1. Titration thermique calorimétrique

La titration thermique calorimétrique (ITC) est une méthode qui permet de mesurer directement l'énergie associée à une réaction chimique mise en place en mélangeant deux composés. Lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur, la réaction s'accompagne d'une libération ou d'une absorption de chaleur selon le signe de l'enthalpie standard, ΔH^0 , de fixation. Les microcalorimètres modernes peuvent mesurer de très faibles variations de chaleur.[125]

Un instrument ITC se compose de deux cellules identiques constituées d'un matériau conducteur thermique hautement performant (en or ou hastelloy) entouré par une gaine adiabatique. La gaine est généralement refroidie par un bain d'eau circulant. Des circuits thermopile/thermocouple sensibles détectent les différences de température entre les deux cellules

et entre les cellules et la gaine. Des dispositifs de chauffage situés sur les deux cellules et la gaine sont activés lorsque cela est nécessaire pour maintenir des températures identiques entre tous les composants (Figure 21A).[126]



Figure 21. Titration thermique calorimétrique

A. Représentation schématique des composants essentiels d'un instrument ITC. **B.** Thermogramme (données brutes). **C.** Courbe de titration du ligand (données issues de l'intégration des aires sous les pics) (extrait de la réf [127])

Une expérience ITC typique est effectuée par l'addition progressive de l'un des réactifs (volume d'environ 10 µL par injection) dans la cellule de réaction contenant l'autre réactif. La réaction chimique provoquée par chaque injection dégage ou absorbe une certaine quantité de chaleur proportionnelle à la quantité du ligand qui se lie à la protéine et à l'enthalpie caractéristique de liaison. Comme les instruments ITC fonctionnent sur le principe de compensation de chaleur, la réponse instrumentale (signal mesuré) correspond à la quantité d'énergie (microcalories par seconde) nécessaire pour maintenir constante la différence de température entre la réaction et la cellule de référence. La chaleur après chaque injection est obtenue par le calcul de la surface sous chaque pic. Comme la quantité de la protéine non complexée disponible diminue progressivement après chaque injection successive, l'intensité des pics devient progressivement plus faible jusqu'à l'obtention de la saturation complète. Les mesures conduisent à l'obtention d'un thermogramme pour des quantités croissantes du ligand ajouté (Figure 21B).

En plus de sa capacité à déterminer les paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie (Δ H), la constante de dissociation (K_D), l'entropie (Δ S) et la stœchiométrie (N) (Figure 21C), en une seule expérience, l'ITC présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques biophysiques :

- C'est une technique non destructive car les paramètres thermodynamiques de l'interaction peuvent être mesurés en solution sans immobilisation, modification ou marquage des partenaires de l'interaction et sans restriction de poids moléculaire.[128]
- La haute précision et la reproductibilité ; l'erreur de constante de liaison déterminée est généralement de l'ordre de 5%.[129]
- iii. La capacité à mesurer des affinités de liaison dans la gamme de 10^{-2} à 10^{-3} µM, des effets thermiques aussi réduits que 0,1 µcal et des taux de chaleur aussi faibles que 0,1 µcal/s.
- iv. La capacité de mesurer des interactions de haute affinité avec une constante de dissociation de l'ordre de 10⁻⁸ à 10⁻⁹ M.[130],[131]

Toutefois, l'ITC présente certaines limitations :

- Comme la chaleur est un signal universel et que chaque processus contribue à la chaleur globale mesurée, l'évaluation de la contribution de la liaison est compliquée.
- Malgré une sensibilité élevée, l'extraction des effets thermiques liés à la formation d'un complexe reste difficile dans le cas où l'enthalpie de l'interaction est relativement faible (ce qui entraîne un signal relativement faible par rapport au bruit) et également quand les processus de liaison sont très lents (ce qui conduit à négliger les processus cinétiquement faibles).[132]

2. Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une méthode de caractérisation d'interaction d'un ligand avec un récepteur fixé à la surface d'une couche métallique. Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de réfraction quand le ligand se fixe au récepteur (Figure 22).[133]

Afin de détecter la liaison d'un ligand à un récepteur, la molécule de récepteur est généralement immobilisée sur la surface de détection et la molécule d'analyte est injectée dans la solution aqueuse à travers la cellule d'écoulement. La lumière polarisée, provenant d'une source laser est dirigée à travers un prisme vers la surface inférieure de la couche d'or où les plasmons de surface sont générés à un angle critique de la lumière incidente. Cette absorption de lumière est perçue comme une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie. L'angle critique dépend de l'indice de réfraction du milieu à la surface d'or et varie lorsque des molécules se lient à la surface, par exemple, lorsque les molécules d'analyte se lient à des molécules réceptrices immobilisées.


(inspiré de la réf [133])

La réponse en temps réel de l'expérience SPR est généralement présentée sous la forme d'un sensorgramme (Figure 23). Si une interaction entre les molécules de récepteur immobilisées et les molécules d'analyte se produit, l'indice de réfraction à la surface de film d'or change, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité du signal. Les unités de Résonance ou de Réponse (RU) sont utilisées pour décrire l'augmentation du signal ; une RU est égale à un décalage de l'angle critique de 10⁻⁴ degré.



Temps (s)

Figure 23. Allure d'un sensorgramme (extrait de la réf [133])

L'analyse du sensorgramme donne accès à plusieurs informations sur l'interaction. En effet, au début de l'expérience, toutes les molécules de récepteur sont immobilisées seules sur la surface métallique ; la valeur de RU correspond à l'angle critique de départ (Figure 23, a). Ensuite, les

molécules d'analyte sont injectées dans la cellule ; si elles se lient aux molécules de récepteur immobilisées, une phase d'association est observée, au cours de laquelle les sites de liaison deviennent occupés. L'allure de la courbe obtenue peut être utilisée pour mesurer la constante d'association (kon). Lorsque l'état d'équilibre est atteint la valeur RU correspond au changement final de l'angle critique (Figure 23, b).

La valeur maximale RU est liée directement aux concentrations des molécules de récepteur et d'analyte immobilisées, et donc peut être utilisée pour mesurer l'affinité de liaison (K_D).

A la fin de l'expérience, lorsque l'injection des molécules d'analyte est arrêtée, une phase de dissociation au cours de laquelle les sites de liaison deviennent inoccupés est observée. L'allure de la courbe obtenue peut être utilisée pour mesurer la constante de dissociation (k_{off}).[133]

Il est toutefois important de garder à l'esprit que l'immobilisation de la protéine affecte les différentes entropies (conformationnelles, translationnelles ou rotatives) ainsi que le taux d'association, ce qui présente la limitation majeure de l'expérience SPR.[134]

3. Polarisation de fluorescence

La polarisation de fluorescence (FP) est une méthode d'analyse qui fournit des informations sur la mobilité rotationnelle d'une molécule fluorescente.

Le principe de la polarisation de fluorescence repose sur le degré de polarisation d'un fluorophore qui est inversement proportionnel à sa rotation moléculaire, elle-même en grande partie entraînée par le mouvement brownien. Quantitativement, la polarisation de fluorescence est définie comme la différence de l'intensité de la lumière d'émission parallèle et perpendiculaire au plan de la lumière d'excitation normalisé par l'intensité totale d'émission de fluorescence.[135]



Figure 24. Principe de la polarisation de fluorescence.

Sur l'aspect pratique, un fluorophore est excité avec de la lumière polarisée linéairement en passant à travers un filtre polarisant ; la fluorescence polarisée est mesurée par un polariseur d'émission parallèle ou perpendiculaire au plan de polarisation de la lumière d'excitation. Deux mesures d'intensité sont ainsi obtenues (IL et I | |) et utilisées pour le calcul de l'anisotropie de fluorescence (AF) ou de la polarisation de fluorescence (PF) (Figure 24).

Cette méthode donne accès à la constante d'inhibition K_i , qui est un paramètre crucial dans le contexte de criblage de petites molécules et le développement des médicaments. Elle permet également de déterminer la valeur d'IC₅₀ (concentration du ligand qui entraîne l'inhibition de 50 % de récepteur). Le rapport K_i/K_D correspondant peut également être calculé.[135]

La polarisation de fluorescence est utilisée pour quantifier et étudier les interactions des systèmes biochimiques, telles que les interactions protéine-protéine et protéine-ligand, la dynamique des membranes, et plus récemment, les interactions protéine-ADN et ADN-ADN.[136] En effet, la mobilité d'une molécule fluorescente change si elle se lie à une autre molécule.

La première application de la polarisation de fluorescence pour caractériser les interactions entre petites molécules et protéine a été réalisée en 1952 par D. Laurence qui a étudié l'interaction entre de nombreux fluorophores, tels que la fluorescéine, éosine, acridine, et le sérum albumine bovin.[137]

Cette technique est robuste, sensible, rapide, économique, et relativement facile à mettre en place. Elle est bien adaptée à l'étude des interactions protéine-ligand et permet de réaliser des criblages à haut débit. Néanmoins, elle présente plusieurs inconvénients comme les phénomènes de quenching et le fait qu'elle soit incompatible avec l'utilisation de composés auto-fluorescents.[138]

4. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

4.1. Principe

La spectroscopie RMN étudie le comportement des noyaux des atomes placés dans un champ magnétique. Le principe élémentaire est que chaque noyau, possédant un nombre impair de neutrons et de protons, et caractérisé par son spin, va, lorsqu'il est soumis à la fois à un champ magnétique et à une onde magnétique, présenter des phénomènes d'échange d'énergie qui donneront naissance à un signal qui peut être mesuré. Ce signal est caractéristique du noyau dans le cadre de son contexte chimique et magnétique.

Seuls les noyaux possédant un nombre quantique de spin non nul, tels que ¹H, ¹³C, ¹⁵N peuvent être étudiés en RMN.[139]

Placés dans un champ magnétique statique B_0 , les moments magnétiques des noyaux de spin ¹/₂ (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P) s'orientent selon deux directions : parallèle (†) et antiparallèle (\downarrow) au champ B_0 (Figure 25A). Les noyaux se comportent alors comme de petits barreaux aimantés. Leur moment magnétique va osciller autour de la direction du champ B_0 avec une fréquence propre ω_0 (fréquence de Larmor). On parle de « précession » (Figure 25B).





A. Schéma de noyaux de spin ½ placés dans un champ magnétique B₀ (à droite) ou non (à gauche). Les moments magnétiques des noyaux ↑ (α) sont dans le sens parallèle au champ et ceux des noyaux ↓ (β) sont dans le sens antiparallèle au champ. B. Mouvement de précession des spins autour du B₀.

Si une onde électromagnétique est appliquée au système, cet état d'équilibre est rompu. En effet, l'onde électromagnétique va transmettre son énergie (transition énergétique) au système magnétique. L'énergie absorbée sera maximale lorsque la fréquence de l'onde émise sera égale à ω_0 . Lorsque l'émission électromagnétique est interrompue, l'énergie emmagasinée est restituée par un phénomène de relaxation. Cette dissipation d'énergie est à l'origine d'un signal appelé signal de précession libre qui peut être recueilli et analysé.



Figure 26. Schéma illustratif du signal détecté par RMN A. Signal détecté (FID). B. Spectre RMN obtenu après transformée de Fourier (TF).

Le traitement mathématique, par la transformée de Fourier, du signal accumulé donne naissance à un spectre. Ce dernier représente le signal comme une fonction de la fréquence et sur lequel chaque signal apparait sous la forme d'une raie dont la surface est proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent. La position de cette raie sur le spectre est fonction de la fréquence de résonance qui est spécifique pour chaque noyau dans des conditions bien définies.

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire est une technique d'analyse structurale. Elle permet donc de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules chimiques ou biologiques. En biologie structurale, la RMN s'est fait une place aux côtés de la cristallographie aux rayons X car elle permet l'étude de protéines en solution, dans des conditions proches du milieu physiologique.

4.2. Intérêt de la RMN dans l'étude des interactions protéine-ligand

La spectroscopie RMN peut être utilisée à chaque étape du processus de conception de médicament, depuis l'identification de hits jusqu'à la détermination de la structure du complexe final protéine-protéine [140] ou protéine-ligand.[141]

Elle donne accès à plusieurs paramètres observables (déplacements chimiques, constantes de couplage...) qui peuvent fournir des informations structurales et dynamiques des systèmes étudiés. C'est la modification des différents paramètres RMN lors de la liaison qui est généralement exploitée pour détecter les interactions. En pratique, seuls les paramètres que l'on peut obtenir aisément et avec une haute sensibilité sont utilisés : les perturbations @chimiques, les constantes de couplage, l'intensité des pics NOEs, les variations de temps de relaxation et de coefficients de diffusion.[142]

Ainsi, la spectroscopie RMN est une technique de choix pour étudier les interactions entre un ligand et une protéine. A l'échelle atomique, elle permet de déterminer, avec haute précision, les atomes des résidus les plus impliqués dans l'interaction. La spectroscopie RMN permet également de quantifier « la force de l'interaction » par la détermination de la constante d'équilibre K_D .

L'étude par spectroscopie RMN des processus d'interaction entre un ligand et sa cible macromoléculaire s'effectue en solution, en utilisant des méthodes sensibles et robustes. Certaines méthodes sont basées sur l'observation des signaux de la protéine. Dans ce cas, l'effet d'un ligand sur la protéine est directement détecté en collectant les spectres RMN de la protéine réceptrice en absence et en présence de concentrations variables du ligand. Ces méthodes nécessitent des échantillons de protéines enrichies en isotopes ^{15}N et/ou ^{13}C .

Une autre catégorie de mesures repose sur l'observation des signaux des ligands. Les spectres RMN des ligands étudiés sont collectés en absence et en présence de la protéine cible. Ces méthodes sont moins coûteuses car ne nécessitent pas de protéine marquée.[142],[143]

Dans la suite, je vais décrire en détail, d'un point de vue théorique et pratique, ces deux classes d'expériences RMN qui permettent de caractériser, en solution, les interactions entre une petite molécule organique et sa cible macromoléculaire.

4.3. Principes fondamentaux de l'étude des interactions protéine-ligand par RMN

Comme évoqué précédemment, la compréhension des aspects thermodynamique et cinétique qui gouvernent les interactions protéine-ligand est très importante.

L'équilibre thermodynamique est contrôlé par la constante de dissociation K_D . Cette dernière est contrôlée par les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} , selon l'équation (2) :

$$K_{\rm D} = \frac{k_{\rm off}}{k_{\rm on}} \tag{2}$$

Les constantes d'association et de dissociation ne sont pas des paramètres observables par RMN. Le paramètre observable est la vitesse d'échange k_{ex} , qui décrit la somme de tous les événements d'échange pour le ligand (k_{ex}^L) ou pour la protéine (k_{ex}^P) :

$$\mathbf{k}_{\text{ex}}^{\text{L}} = \mathbf{k}_{\text{on}} \left[\mathbf{P} \right]_{\text{libre}} + \mathbf{k}_{\text{off}} \tag{5}$$

 $\mathbf{k}_{\text{ex}}^{\text{P}} = \mathbf{k}_{\text{on}} [\text{L}]_{\text{libre}} + \mathbf{k}_{\text{off}}$ (6)

En utilisant l'équation (2), la vitesse d'échange peut être exprimée comme suit :

$$\mathbf{k}_{\text{ex}}^{\text{L}} = \mathbf{k}_{\text{on}} \left([\mathbf{P}]_{\text{libre}} + \mathbf{K}_{\text{D}} \right) \tag{7}$$

La cinétique de l'interaction joue un rôle important dans les expériences RMN utilisées pour étudier les interactions protéine-ligand. Il existe trois types de régime d'échange ou de régime cinétique : rapide, intermédiaire et lent à l'échelle de temps de la RMN. Ces trois régimes d'échange sont définis par rapport à la différence d'un paramètre RMN (a) entre les états lié et libre de la protéine ou du ligand. Le paramètre (a) peut-être par exemple la fréquence de résonance (en Hz) ou la vitesse de relaxation (en s⁻¹).[143],[144]

Si $\mathbf{k}_{ex} > |\mathbf{a}_{li\acute{e}} - \mathbf{a}_{libre}|$, ceci correspond à un régime d'échange rapide. Les signaux se déplacent lentement de leur position dans le spectre de la protéine libre vers leur position dans le spectre de la protéine liée. La fréquence du signal en tout point de titration est alors la moyenne, pondérée par les concentrations des différentes espèces, des déplacements chimiques des espèces libres et liées (Figure 27).

Dans le cas du régime rapide, de multiples modes de liaison peuvent être détectés. Pour un seul mode de liaison, les pics se déplacent selon une ligne droite avec l'augmentation de la concentration du ligand (Figure 27A). Au contraire, les sites ou modes de liaison multiples génèrent une trajectoire courbée car les interactions secondaires et primaires ont des effets différents sur les déplacements chimiques (Figure 27B).[143]



Figure 27. Illustration des variations de déplacements chimiques dans les différents modèles d'échange cinétique.
A. Régime rapide (un seul site d'interaction). B. Régime rapide (plusieurs sites d'interaction).
C. Régime intermédiaire. D. Régime lent (extrait de la réf [144])

Si $\mathbf{k}_{ex} \approx |\mathbf{a}_{li\acute{e}} - \mathbf{a}_{libre}|$, le régime d'échange est intermédiaire. Les signaux s'élargissent fortement et se déplacent de la même manière que dans le régime rapide (Figure 27C).[144]

Si $\mathbf{k}_{ex} < |\mathbf{a}_{li\acute{e}} - \mathbf{a}_{libre}|$, ceci correspond à un régime d'échange lent. Dans ce cas, le titrage de la protéine par le ligand entraîne une disparition progressive des signaux de la forme libre plus lente que l'apparition des signaux de la forme liée. Les intensités des deux pics sont proportionnelles aux concentrations de la protéine libre et liée, respectivement (Figure 27D).

4.4. Méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine

Les expériences RMN basées sur l'observation des signaux de la protéine reposent sur la comparaison des paramètres RMN des états lié et libre de la macromolécule.[141] La liaison du ligand à la surface de la protéine engendre des modifications de la densité électronique qui entoure certains noyaux de la protéine observée. Ces changements peuvent entraîner des effets de blindage ou de déblindage, qui se traduisent facilement par d'importants changements dans la fréquence de résonance des noyaux observés.[142]

Il existe plusieurs expériences basées sur l'observation des signaux de la protéine. Je détaillerai dans la suite les plus fréquemment utilisées.

4.4.1. Expériences 1D

La plus sensible et la plus simple des expériences RMN basées sur l'observation des signaux de la protéine consiste en la mesure des signaux RMN ¹H dans la région des aliphatiques de la protéine, habituellement en dessous de 0,7 ppm, en absence et en présence des ligands (Figure 28). Cette zone spectrale contient des signaux de la protéine appartenant aux protons méthyliques. L'ajout du ligand provoque le déplacement de leurs résonances vers les champs forts. Cette région (δ <0,7 ppm) n'est que très rarement peuplée par des signaux provenant de petits peptides ou de petites molécules. Ainsi, les chevauchements spectraux entre les résonances du ligand et de la protéine dans cette région sont très peu probables. En outre, les signaux des méthyles apparaissent généralement comme des pics plus intenses, car les protons méthyliques sont chimiquement équivalents.[140]





Figure 28. Exemple d'une expérience basée sur l'observation des signaux de la protéine (spectre 1D ¹H). Le spectre rouge correspond au spectre de la protéine enregistré en l'absence du ligand. Le spectre bleu représente le spectre de la protéine enregistré en présence du ligand (domaine SH2 de la protéine vSrc avec un ligand pY-mimétique) (extrait de la réf [140])

4.4.2. Expériences 2D : ¹H-X HSQC

4.4.2.1. <u>Principe</u>

Les expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC (et ¹H-¹³C HSQC) sont très efficaces et très fréquemment utilisées dans la caractérisation des interactions protéine-ligand. La comparaison des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC (et ¹H-¹³C HSQC) de la protéine cible, enregistrés avant et après l'ajout des ligands, permet en effet d'avoir des informations pertinentes sur l'interaction.

Les séquences d'impulsions utilisées pour enregistrer des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC contiennent des modules INEPT et INEPT-inverse pour transférer l'aimantation du proton ¹H vers l'azote ¹⁵N au début de la séquence, puis re-transférer l'aimantation vers le proton ¹H à la fin de l'expérience juste avant la détection du signal. Il existe plusieurs séquences d'impulsions, parmi lesquelles la séquence Fast-HSQC qui permet d'obtenir des spectres avec un bon rapport signal sur bruit (Figure 29).[145]



Figure 29. Séquence d'impulsions de l'expérience ¹H-¹⁵N Fast-HSQC Les rectangles larges (resp. étroits) représentent des impulsions 180° (resp. 90°). Sur le canal carbone, la demi ellipse bleu représente une impulsion d'inversion de type CHIRP (Crp60,0.5,20.1). Par défaut, les impulsions sont de phase x. Le délai Δ correspond à (1/4J_{NH}). La suppression du signal de l'eau est assurée par un Bloc Watergate. La forme des gradients est de type SMSQ10.100. (Séquence d'impulsions Bruker fhsqcf3gpph)

4.4.2.2. Aspect pratique

L'acquisition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC nécessite la disponibilité d'une protéine enrichie en ¹⁵N (et/ou ¹³C). Cela est assuré par l'utilisation d'un milieu contenant le ¹⁵NH₄Cl (et le Glucose ¹³C pour le marquage en ¹³C) lors de la production de la protéine. Lorsque la taille de la protéine est supérieure à 30 kDA, il est généralement nécessaire de préparer des échantillons deutérés. La concentration nécessaire de la protéine pour ces expériences est relativement importante et varie typiquement de 50 à 500 μ M.

La mise en évidence de l'interaction se déroule comme suit :

- i. Dans un premier temps, un spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine enrichie en ¹⁵N est enregistré (spectre de référence).
- Ensuite, des spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC sont enregistrés après l'ajout de quantités croissantes du ligand.
- Finalement, les spectres enregistrés en absence et en présence sont comparés. Si la position de résonance d'un pic croisé et/ou son intensité sont modifiées par rapport au spectre de référence, cela indique qu'il y a une interaction.

Certains paramètres expérimentaux tels que la température et le pH doivent être bien contrôlés lors de la titration. En effet, de petites variations de pH et/ou de température peuvent induire des variations de déplacement chimique et compliquer l'analyse des perturbations observées.

4.4.2.3. <u>Analyse qualitative des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC</u>: Identification du site d'interaction

Comme déjà évoqué, l'interaction protéine-ligand entraîne des modifications de l'environnement électronique autour des atomes des résidus de l'interface impliquée dans l'interaction. Ces modifications se traduisent par des perturbations de déplacements chimiques (CSP) des résidus concernés. L'analyse qualitative de ces perturbations est utilisée pour localiser les sites d'interaction au niveau de la protéine.

Sur les spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC, on mesure à la fois les perturbations dans la dimension du proton et dans la dimension de l'azote pour avoir une idée globale de la perturbation des fonctions amides de la protéine. En général, le blindage du proton est plus faible que celui des noyaux plus lourds comme l'azote ¹⁵N, ce qui implique que l'amplitude des variations du déplacement pour ¹H est plus petite que pour l'azote ¹⁵N. En général, on calcule donc une valeur combinée de CSP (CCSP ¹H et ¹⁵N) selon l'équation suivante [146] :

$$CCSP(ppm) = [\Delta\delta H^2 + (\alpha, \Delta\delta N)^2]^{1/2}$$
(8)

Le déplacement chimique de l'hétéroatome ¹⁵N est multiplié par un facteur de correction α . La valeur du facteur α peut varier de 0,1 à 0,45. Une valeur arbitraire du facteur α égal à 0,2 ou une valeur issue du rapport des facteurs gyromagnétiques entre le proton et l'azote est souvent utilisée. La valeur du facteur α peut être également liée au rapport des fenêtres spectrales de chaque atome (3 ppm pour les protons des fonctions amide, et 22 ppm environ pour l'azote).[143] La correction sur l'hétéroatome est appliquée car l'origine des perturbations des déplacements chimiques de proton ¹H et de l'azote ¹⁵N est différente. Certaines interactions peuvent provoquer des perturbations importantes sur le déplacement chimique du proton mais pas de l'azote et *vice-versa.*[147]

Pour identifier le site d'interaction, il faut savoir quelles sont les variations des déplacements chimiques à considérer comme importantes. Plusieurs facteurs peuvent déterminer la valeur seuil de variation de déplacement chimique au-dessus de laquelle les perturbations observées sont considérées comme significatives. L'un de ces facteurs est la résolution spectrale (Hz/point). Les variations de déplacements chimiques inférieures à la moitié de la différence entre deux points adjacents ne doivent pas être prises en compte. Cela se traduit par des valeurs limites de 0,01 à

0,02 ppm dans la dimension du proton et de 0,05 à 0,1 ppm dans la dimension de l'azote, dans un spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC.

Une analyse statistique permet ensuite de distinguer les perturbations de déplacements chimiques significatives. Classiquement, les perturbations de déplacements chimiques supérieures à un écarttype par rapport à la variation moyenne de l'ensemble des résidus de la protéine sont considérées comme significatives. Certains auteurs préfèrent utiliser un seuil égal à 1,5 voire 2 fois la valeur de l'écart-type. Étant donné que les pics qui présentent des variations de déplacements chimiques importantes sont inclus dans le calcul initial de l'écart-type, les calculs itératifs de ce dernier, après avoir exclu les valeurs aberrantes du cycle précédent, sont parfois utilisés pour mieux estimer la variation observée parmi les pics qui ne sont pas affectés par l'interaction. Cette approche est particulièrement utile lorsque l'interaction induit des variations de déplacements chimiques majeures.[146]

L'analyse qualitative de ces perturbations peut fournir certaines informations sur l'interaction observée. En effet, ces perturbations peuvent refléter soit un contact direct entre le ligand et la protéine, soit un contact indirect souvent lié à des modifications conformationnelles.[146],[147]

S'il est pratiquement impossible de passer à côté d'interactions fortes, il est cependant possible d'avoir des faux négatifs pour certaines interactions faibles. En effet, les interactions faibles entraînent souvent de faibles perturbations de déplacements chimiques. Dans ce cas, il est impossible de mener à bien le titrage.[147]

En outre, les valeurs des CCSP peuvent être exploitées pour estimer la constante d'affinité et la force d'interaction. en revanche, elles ne peuvent pas être traduites en contraintes de distance ou d'orientation comme les NOEs (Nuclear Overhauser Effect) et les RDC (Residual Dipolar Coupling).[147]

4.4.2.4. <u>Analyse quantitative des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC : Estimation de l'affinité du</u> <u>ligand pour la protéine</u>

En général, les interactions entre une petite molécule et une protéine cible sont caractérisées par un régime d'échange rapide. La constante de dissociation K_D , qui, je le rappelle, traduit l'affinité du ligand pour la protéine, s'exprime selon l'équation (2).

$$K_{\rm D} = \frac{[\rm P]_{libre}[\rm L]_{libre}}{[\rm PL]}$$
(2)

Selon l'échantillon, les trois espèces L, P et PL peuvent être observées, mais leur quantification est difficile. On utilise donc le rapport des concentrations du complexe [PL] au ligand total [L]_{tot} ou à la protéine [P]_{tot}, c'est-à-dire la fraction du ligand lié ($P_{liée}^{L}$) ou de la protéine ($P_{liée}^{P}$), respectivement.

$$P_{\text{Li\acute{e}}}^{\text{L}} = \frac{[\text{PL}]}{[\text{L}]_{\text{tot}}} = 1 - P_{\text{libre}}^{\text{L}} \qquad (9)$$

et $[\text{L}]_{\text{Libre}} = [\text{L}]_{\text{tot}} - [\text{PL}] \qquad (10)$
$$P_{\text{Li\acute{e}}}^{\text{P}} = \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}]_{\text{tot}}} = 1 - P_{\text{libre}}^{\text{P}} \qquad (11)$$

$$et [P]_{libre} = [P]_{tot} - [PL]$$
(12)

D'après les équations (2), (9) et (11), la concentration [PL] peut être déterminée à l'aide de l'équation (13) :

$$\frac{[PL]}{[P]_{tot}} = \frac{[L]_{tot} + [P]_{tot} + K_D - \sqrt{([L]_{tot} + [P]_{tot} + K_D)^2 - 4 [L]_{tot} [P]_{tot}}}{2 [P]_{tot}}$$
(13)

Donc :

$$\frac{[PL]}{[P]_{tot}} = \frac{1}{2} \left[1 + x + \frac{K_D}{[P]_{tot}} - \sqrt{\left(1 + \frac{K_D}{[P]_{tot}} + x\right)^2 - 4x} \right]$$
(14)

où x est le ratio $\frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}}$.

Or, dans le cas de l'échange rapide, que l'on s'intéresse aux signaux du ligand ou à ceux de la protéine, on mesure toujours un signal S_{RMN} moyen entre le signal RMN des formes complexée $S_{liée}$ et libre S_{libre} . De ce fait, si on s'intéresse aux variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$):

$$\Delta \delta = \delta_{moyen} - \delta_{libre} = x_{li\acute{e}e} \delta_{li\acute{e}e} + x_{libre} \delta_{libre} - \delta_{libre} = x_{li\acute{e}e} \delta_{li\acute{e}e} - (1 - x_{libre}) \delta_{libre} (15)$$

$$\Delta \delta = x_{\text{liée}} (\delta_{\text{liée}} - \delta_{\text{libre}}) = \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}]_{\text{tot}}} (\delta_{\text{liée}} - \delta_{\text{libre}}) = \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}]_{\text{tot}}} \Delta \delta_{\text{max}}$$
(16)
$$\Delta \delta = \frac{\Delta \delta_{\text{max}}}{2} \left[1 + x + \frac{K_{\text{D}}}{[\text{P}]_{\text{tot}}} - \sqrt{\left(1 + x + \frac{K_{\text{D}}}{[\text{P}]_{\text{tot}}}\right)^2 - 4x} \right]$$
(17)

 $\Delta\delta$ peut être désigné par CSP (Chemical Shift Perturbation) ou CCSP (Combined Chemical Shift Perturbation).

Cette équation permet donc d'obtenir la valeur de K_D en suivant les variations de déplacements chimiques des protons amides ou des azotes (ou les deux) en fonction de la concentration croissante du ligand. Un exemple des courbes de titration issues de cette méthode est présenté sur la Figure 30C.[148]



Figure 30. Exemple de l'utilisation des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC pour la détermination de la constante de dissociation K_D

(cas de l'interaction entre la protéine BrmGRX et le fragment RK207)
 A. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine BrmGRX en absence puis en présence de quantités croissantes du ligand (spectre référence, spectres en présence du ligand :0,2 mM, 0,5 mM, 2 mM, 5,2 mM, 6 mM). B. Zoom sur certains résidus perturbés lors de la titration. C. Exemples de courbes de titration utilisées pour la détermination des constantes de dissociation K_D. (extrait de la réf [149])

4.4.3. Étude de la dynamique interne de la protéine

Divers travaux illustrent le fait que les études de la dynamique des protéines permettent de mieux comprendre les interactions protéine-protéine, la reconnaissance des cibles, la liaison des ligands et la fonction enzymatique.[150],[151] Or, la RMN se présente comme un outil de choix grâce à sa capacité à sonder l'ensemble des mouvements moléculaires sur une gamme de temps très large, à l'échelle atomique. Le signal détecté par RMN est un signal décroissant qui traduit le retour du système vers l'état d'équilibre thermodynamique après excitation : c'est la relaxation. L'extrême sensibilité des spins nucléaires à leur environnement local fait que leur relaxation, liée aux mouvements des protéines, s'étale sur une gamme de fréquence très importante (Figure 31).



Figure 31. Échelle de temps des mouvements moléculaires qui peuvent être étudiés par RMN (inspiré de la réf [152])

La relaxation des spins nucléaires ¹⁵N et ¹³C, qui portent un seul proton, est utilisée pour étudier la dynamique interne des protéines. En pratique, les informations sont obtenues en mesurant trois paramètres expérimentaux : les temps de relaxation longitudinale T_1 et transversale T_2 , et la relaxation croisée NOE.[153],[154],[155],[156],[157]

La relaxation « spin-réseau » ou relaxation longitudinale est liée aux échanges d'énergie entre les spins et leur environnement. Elle est caractérisée par le temps de relaxation longitudinale T₁, que met l'aimantation M_z pour revenir à des conditions d'équilibre le long de l'axe z. Cette relaxation est favorisée par des fluctuations de champ magnétique à haute fréquence ($\omega \sim \omega_0$).

La relaxation « spin-spin » ou relaxation transversale décrit le retour à zéro de la composante M_{xy} de M dans le plan O_{xy} perpendiculaire au champ magnétique B_0 . Le temps de relaxation longitudinal T_2 est lié au déphasage des aimantations nucléaires sous l'effet de fluctuations du champ local à toutes les fréquences : les mouvements lents y contribuent aussi bien que les mouvements rapides.

La valeur de T₂ est toujours inférieure à celle de T₁ puisqu'un grand nombre de phénomènes contribuent au T₂. La courbe décrivant les variations de T₂ en fonction du temps de corrélation

 τ_c (temps moyen nécessaire pour qu'une molécule se réoriente d'un radian) est décroissante, indiquant que la relaxation est d'autant plus efficace que les mouvements sont lents. En effet, Pour des valeurs élevées du temps de corrélation τ_c (faible mobilité), la relaxation transversale est très efficace alors que la relaxation longitudinale est peu efficace. Cette situation est caractéristique de l'état solide. Pour de faibles valeurs de τ_c (forte mobilité moléculaire), les deux composantes de la relaxation sont peu efficaces et identiques. Cette situation est caractéristique de l'état liquide. Lorsque $\tau_c \omega_0$ est proche de 1, on observe un minimum pour T₁. La valeur de τ_c correspondant à ce minimum dépend de B₀ (Figure 32).

Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 sont définies par $R_{(1 \text{ ou } 2)} = 1/T_{(1 \text{ ou } 2)}$.



Figure 32. Relation entre les temps de relaxations T_1 , T_2 et le temps de corrélation τ_c (τ_c est le temps moyen nécessaire pour qu'une molécule se réoriente d'un radian). (extrait de la réf [158])

Les séquences d'impulsions utilisées pour mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 sont basées sur la séquence HSQC. Au cœur de ces séquences se trouve un délai t_r de relaxation, avec une série d'impulsions (spin lock pour la séquence de mesure des T_1 , et une boucle CPMG pour la séquence de mesure des T_2), qui permettent de conserver le simple processus de relaxation en supprimant les effets de relaxation croisée dipôle-dipôle et d'anisotropie de déplacement chimique. (Figure 33)

Lors des mesures des temps de relaxation T_1 , l'aimantation ¹⁵N est basculée le long de l'axe z, pendant le délai t_r , où chaque noyau individuel relaxe. L'intensité du signal enregistré va dépendre de la vitesse de relaxation $R_1(^{15}N)$. En revanche, lors des mesures des temps de relaxation T_2 , l'aimantation ¹⁵N n'est pas basculée sur l'axe z, et les spins relaxent dans le plan x, y pendant le délai t_r . L'intensité des pics de corrélations sera fonction de la vitesse de relaxation $R_2(^{15}N)$ de chaque noyau. En général, on utilise des expériences pseudo 3D, dont la troisième dimension correspond à la liste des délais t_r . Ces expériences permettent d'enregistrer une série d'expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC en faisant varier le délai de relaxation afin d'échantillonner au mieux la courbe de relaxation. Les délais t_r modulent les intensités des pics de corrélation en fonction des propriétés de relaxation de chaque noyau. L'intensité des pics de corrélation H^N-N décroit d'une manière exponentielle suivant l'équation (18) et tend vers zéro quand le délai t_r tend vers l'infini.[155]

$$I(t_r) = I_0 e^{-Rt_r}$$
(18)

où $I(t_r)$ est l'intensité du pic croisé pour le délai de relaxation t_r , I_0 est l'intensité pour le délai $t_r=0$ et R est la vitesse de relaxation (R_1 ou R_2).



Figure 33. Schémas illustratifs des séquences d'impulsions utilisées pour mesurer les temps de relaxation **A.** T₁ et **B.** T₂ des spins de l'azote ¹⁵N.

Les rectangles larges (resp. étroits) représentent des impulsions 180° (resp. 90°). La demi ellipse jaune sur le canal ¹H représente une impulsion (shape) de type Squa100.1000. Sur le canal ¹³C, la demi ellipse bleu représente une impulsion d'inversion de type CHIRP (Crp60,0.5,20.1). Par défaut, les impulsions sont de phase x. le délai Δ correspond à (1/4J_{NH}). La forme des gradients est de type SMSQ10.100. (Séquences d'impulsions Bruker hsqct1etf3gpsi3d et hsqct2etf3gpsi3d)

Les NOE hétéronucléaires ¹H-¹⁵N dépendent, quant à eux, uniquement des mouvements rapides (de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde) de la liaison H^N-N dans le référentiel de

l'aimant et de la distance H^N-N, fixe. Ils sont indépendants des protons environnants. La mesure de ces effets dans deux conditions d'irradiations radiofréquence en saturant ou non le spin observé, permet donc d'avoir une estimation des mouvements des NH de la protéine. L'expérience ¹⁵N hetNOE permet ainsi de distinguer les parties flexibles de la protéine, telles que les boucles ou les parties destructurées. Plus la liaison H^N-N est rigide, moins la perturbation des noyaux H^N affectera la relaxation des spin ¹⁵N et plus le paramètre NOE sera proche de 1.[159]

Pour mesurer l'effet ¹⁵N hetNOE, deux expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC sont enregistrées : dans l'une, les protons amides subissent une saturation ; dans l'autre on effectue une saturation hors résonance. Lors de la saturation, un train d'impulsions est appliqué sur les protons amides pendant le délai de retour à l'équilibre D₁. Cela rompt l'équilibre et le système se trouve à l'état stationnaire. On regarde ensuite l'effet de cette perturbation sur l'aimantation longitudinale du spin ¹⁵N (Figure 34).



Figure 34. Schéma illustratif de la séquence d'impulsions de l'expérience ¹⁵N hetNOE Les rectangles larges (resp. étroits) représentent des impulsions 180° (resp. 90°). La demi ellipse jaune sur le canal ¹H représente une impulsion (shape) de type Squa100.1000. Sur le canal ¹³C, la demi ellipse bleu représente une impulsion d'inversion de type CHIRP (Crp60,0.5,20.1). Par défaut, les impulsions sont de phase x. Le D1 représente le temps de relaxation. Le délai Δ correspond à (1/4J_{NH}). La forme des gradients est de type SMSQ10.100. (Séquence Bruker modifiée hsqcnoeef3gpsi3d)

Sur l'aspect pratique, les deux expériences sont enregistrées de manière enchevêtrée afin que les conditions soient aussi proches que possibles (shims, température...). La qualité des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC enregistrées est moins bonne que celle des spectres issus des expériences de relaxation (T₁, T₂) à cause de la faible sensibilité de l'expérience NOE hétéronucléaire, due à l'absence de transfert de polarisation du proton vers l'azote au début de la séquence.[159] L'équation (19) est utilisée pour obtenir les valeurs des NOEs hétéronucléaires.

$$NOE = \frac{I_{irr}}{I_{ref}}$$
(19)

où Iirr et Iref sont les intensités des pics croisés avec et sans saturation, respectivement.

4.5. Méthodes basées sur l'observation des signaux du ligand

Les méthodes basées sur l'observation des signaux du ligand reposent sur la grande sensibilité des paramètres RMN observables du ligand (déplacement chimique, relaxation, NOE...) aux différences entre les états lié et libre.

Les ligands sont souvent des petites molécules avec de faibles poids moléculaires (PM<500Da). Ces petites molécules sont caractérisées par de faibles vitesses de relaxation longitudinale $(R_1 \approx 0, 1 \text{ s}^{-1})$ et transversale $(R_2 \approx 0, 1 \text{ s}^{-1})$, des pics de corrélation 2D-NOESY d'intensité faible et de signe opposé à celui des pics diagonaux, et des temps de diffusion courts. En revanche, les macromolécules possèdent des vitesses de relaxation longitudinale $(R_1 \approx 1 \text{ s}^{-1})$ et transversale $(R_2 \approx 10 \text{ s}^{-1})$ plus importantes, des corrélations NOEs négatives et intenses, une diffusion de spin rapide et des coefficients de diffusion moléculaire longs.

L'interaction protéine-ligand influence les spectres RMN de la petite molécule. Si une petite molécule se lie à une macromolécule, elle assume la caractéristique globale de la macromolécule. Ce phénomène est observé même si le ligand se lie de façon transitoire à une macromolécule.[140],[143] Il existe de nombreuses méthodes basées sur l'observation des signaux des ligands.[142] Dans la suite, je ne décrirai que les plus fréquemment utilisées à savoir les expériences de transfert de saturation (STD), NOE transféré et WaterLOGSY.

4.5.1. Les expériences de NOE transféré (tr-NOE)

4.5.1.1. <u>Principe</u>

Avant de décrire l'expérience de NOE transféré, nous allons rappeler le principe de l'expérience 2D ¹H-¹H NOESY. C'est une expérience qui permet d'observer les corrélations dues aux interactions dipolaires entre des noyaux proches dans l'espace (r < 5 Å). Plus précisément, l'intensité du pic de corrélation est liée à la distance entre les deux protons ($l \sim \frac{1}{r^6}$). Le NOE maximum possible dépend du temps de corrélation de la molécule, qui est lié au poids moléculaire et à la viscosité du solvant. Les macromolécules sont caractérisées par un temps de corrélation court et de large NOEs négatifs. Par contre, le NOE est positif pour les petites molécules (poids moléculaire < 500 Da) et passe par le zéro pour les molécules de taille moyenne (poids moléculaire de 500 à 1000 Da) (Figure 35).[158]



Figure 35. Évolution du facteur NOE théorique (η) pour un système homonucléaire en fonction de l'efficacité de la dynamique moléculaire. (extrait de la réf [158])

Les effets NOE intramoléculaires d'un ligand sont observés sur un spectre 2D NOESY en l'absence de la protéine. Comme décrit ci-dessus, lorsqu'un ligand se lie à une macromolécule, il adopte alors les propriétés de relaxation de cette dernière (signal NOE fortement négatif), remplaçant son propre caractère NOE (faiblement positif). Ce phénomène, appelé NOE transféré (tr-NOE), se traduit en présence de protéine par l'inversion des signaux des NOEs du ligand, et/ ou l'apparition (ou disparition) des NOEs suite à une éventuelle modification conformationnelle du ligand lors de l'interaction avec la protéine.[160]

Les NOEs intra- et inter-moléculaires sont très importants pour l'analyse et la compréhension des modes d'interaction protéine-ligand. Ils témoignent de la fixation d'un ligand sur un récepteur et reflètent la conformation du ligand lié à la protéine. Les informations obtenues peuvent être exploitées dans le cadre des études « SAR by NMR » pour concevoir des ligands en se basant sur la relation structure-activité.[161]

4.5.1.2. <u>Aspect pratique</u>

Dans l'expérience NOESY transférée, un spectre NOESY est enregistré sur un échantillon du ligand en absence et en présence de la protéine. La concentration du ligand utilisée pour les expériences NOESY varie généralement de 200 à 1000 μ M. La concentration de la protéine dépend de son poids moléculaire, mais reste dans la gamme basse du micromolaire. Le ratio optimal L:P varie de 10:1 pour les petites protéines à > 100:1 pour les grandes protéines.

Les NOEs transférés sont observés dans des conditions d'échange rapide, correspondant généralement à des constantes de dissociation de l'ordre du μ M au mM.

Un paramètre majeur de l'expérience NOESY est le temps de mélange (τ_m). Les expériences tr-NOE nécessitent généralement des temps de mélange courts de l'ordre de 200 à 400 millisecondes. Bien que l'analyse soit rapide, et que plusieurs ligands peuvent être testés à la fois, le temps d'acquisition de l'expérience 2D NOESY reste important (de l'ordre de quelques heures).[143]

4.5.2. L'expérience STD

4.5.2.1. <u>Principe</u>

L'utilisation des expériences basées sur le transfert de saturation remontent aux années 1960 [162] et ont pris un nouvel essor dans les années 2000 avec l'utilisation de la RMN comme outil de caractérisation des interactions protéine-ligand.[163]

L'expérience STD (Saturation Transfer Difference) est une expérience basée sur le transfert de saturation entre une protéine cible et un ligand au travers de l'effet NOE. Le spectre STD résulte, comme son nom l'indique, de la soustraction de deux spectres, dits « On-résonance » et « Off-résonance » (Figure 36A). L'expérience « On-résonance » consiste en une saturation sélective de l'aimantation des protons de la protéine par un train d'impulsions radiofréquence (Figure 36B), classiquement dans la région aliphatique du spectre, c'est à dire entre -1 et 2 ppm où résonnent les groupements méthyles de la protéine fortement blindés et souvent hors de la fenêtre spectrale des petites molécules organiques. La saturation sélective se propage, grâce à la relaxation croisée, aux autres protons de la protéine. Lorsqu'une petite molécule se lie à la protéine, il y a alors un transfert de saturation *via* la diffusion de spin entre les deux partenaires. La diffusion de spin est d'autant plus efficace que la taille du récepteur est grande. La saturation transférée aux protons du ligand persiste une fois le ligand dissocié du récepteur en raison du temps de relaxation longitudinale long des petites molécules. Le site de liaison du récepteur est alors libre pour que d'autres ligands puissent également pouvoir recevoir une partie de la saturation.[164],[141]



Figure 36. L'expérience STD. **A.** Principe de transfert de saturation. **B.** Schéma illustratif de la séquence d'impulsions de l'expérience STD. (extrait de la réf [164])

En général, sur le spectre STD, les signaux de la protéine ne sont pas visibles car cette dernière est présente en faible quantité et les signaux correspondants sont plus larges. Si ce n'est pas le cas, un filtre T_{1p} ou T_2 en amont de la détection permet d'éliminer les signaux résiduels (Figure 36B).

Les protons du ligand les plus proches du récepteur présenteront un signal STD plus important que les protons plus exposés au solvant. Il est ainsi possible, à partir de l'intensité des signaux STD, d'identifier les protons du ligand les plus impliqués dans l'interaction avec la protéine cible ; on parle couramment d'« epitope mapping » (Figure 37). Pour quantifier la réponse STD, le facteur d'amplification STD (STD_{AF}) est calculé selon l'équation (20).



 $STD_{AF} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \frac{[L]}{[P]}$ (20)

Figure 37. Exemple d'application de l'expérience STD L'étude d'interaction entre la protéine RCA₁₂₀ et le β-D-GalOMe (Ratio 1 :100). **A.** Spectre référence. **B.** Spectre STD. L' « epitope mapping » est réalisé sur la structure du β-D-GalOMe. (extrait de la réf [142])

Pour un temps de saturation donné, le STD_{AF} peut également être représenté comme le nombre moyen de molécules du ligand saturées par molécule de protéine. En principe, plus le temps de saturation est long et plus la quantité du ligand utilisée est importante, plus la réponse STD et le facteur d'amplification STD sont importants.[164],[143] Par ailleurs, l'expérience STD permet également d'estimer la constante de dissociation K_D . Plusieurs méthodes basées sur l'expérience STD peuvent être utilisées. L'approche la plus commune repose sur les expériences de compétition par STD, où la valeur de K_D de la molécule d'intérêt est déterminée indirectement en utilisant un compétiteur avec une valeur de K_D connue. D'autres approches directes impliquent la détermination des effets STD pour différents rapports de concentration en ligand et en protéine et différentes approximations et expressions analytiques pour la détermination du K_D (équation (21)).[164],[165]

$$STD_{AF} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]}$$
(21)

où α_{STD} est la valeur maximale de facteur d'amplification,

[L] est la concentration du ligand,

K_D est la constante de dissociation.

A l'équation (21) correspond une courbe hyperbolique de type dose-réponse analogue à l'équation de Michaelis-Mentens (équation (22)).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}$$
(22)

où V₀ est la vitesse initiale stationnaire (en absence de produit)

 V_{max} est la vitesse initiale maximale : V_{max} correspond à la vitesse de la réaction quand la concentration en substrat est très grande.

[S]₀ est la concentration initiale en substrat

K_m est la constante de Michaelis de l'enzyme.

Le facteur d'amplification STD_{AF} augmente jusqu'au maximum d'amplification possible (α_{STD}) atteint, quand le récepteur est complètement saturé. Une titration par le ligand permet donc d'estimer la valeur de K_D. La gamme d'affinité détectée par STD est de 10⁻⁸ M à 10⁻³M.[163]

4.5.2.2. Aspect pratique

Les expériences STD sont enregistrées avec un grand excès du ligand : le ratio L:P est généralement compris entre 100:1 pour les protéines de taille moyenne et 1000:1 pour les grosses protéines (plus de 80 kDa).[143] La concentration de la protéine dépend du poids moléculaire (plus grosse est la protéine, plus basse doit être sa concentration) mais elle est généralement comprise entre 0,1 nM et 10 µM. Pour une expérience efficace, le poids moléculaire minimum de la protéine

doit être d'environ 15 kDA et le temps de saturation de 1 à 2 secondes. Pour réaliser un criblage, un seul temps de saturation est généralement requis. Pour une analyse quantitative des résultats des expériences STD permettant l'estimation des K_D ou la réalisation d' « epitope mapping », il est recommandé d'optimiser au préalable le temps de saturation.[142],[143]

Dans le cas d'un recouvrement important des résonances d'un composé, en particulier avec les composés carbohydrates, l'expérience STD peut être combinée avec d'autres séquences d'impulsions comme la COSY, TOCSY et HSQC pour résoudre les ambiguïtés lors de l'attribution des signaux.[166]

4.5.3. L'expérience WaterLOGSY

4.5.3.1. <u>Principe</u>

L'expérience WaterLOGSY (Water-Ligand Observed *via* Gradient Spectroscopy) repose sur le transfert d'aimantation entre les molécules d'eau, le récepteur et le ligand. Comme dans le cas de l'expérience STD, le transfert de l'aimantation entre les molécules se fait par le biais de l'effet NOE et la diffusion de spin.[167],[168]

L'originalité de l'expérience WaterLOGSY vient de l'intervention des molécules d'eau dans la voie de transfert (Figure 38A). Durant le temps de mélange (Figure 38B), l'aimantation de l'eau libre est excitée et transférée au ligand lié *via* des mécanismes différents :

- Transfert direct depuis les molécules d'eau immobilisées dans le site de liaison de la protéine (le temps de résidence de l'eau est alors supérieur à la nanoseconde)
- ii. L'échange chimique entre l'eau excitée et les protons labiles de la protéine (amide, hydroxyle, ...)
- La propagation de l'aimantation dans le ligand par le biais de la relaxation croisée dipôledipôle et la diffusion de spin.

La séquence d'impulsions de l'expérience WaterLOGSY (Figure 38B) est composée de trois blocs :

- 1. Inversion sélective des spins des noyaux ¹H des molécules d'eau.
- Transfert de l'aimantation par NOE vers les molécules voisines pendant un temps de mélange.
- 3. Élimination du signal de l'eau.



Figure 38. L'expérience WaterLOGSY.

A. Principe de transfert de saturation dans l'expérience WaterLOGSY(extrait de la réf [169]). B. Séquence d'impulsions de l'expérience WaterLOGSY (extrait de la réf [170])

Le spectre WaterLOGSY est classiquement phasé de telle sorte que les molécules ligands présentant des NOEs négatifs possèdent des signaux d'intensité positive et les molécules nonligands présentant des NOEs positifs possèdent des signaux d'intensité négative. Ainsi les molécules ligands et non-ligands sont de signe inverse sur le spectre obtenu.

Comme l'expérience STD, l'expérience WaterLOGSY est utilisée dans le criblage des fragments, l'identification des protons les plus impliqués dans l'interaction et la détermination de la constante de dissociation K_D par des essais de compétition ou des titrages.

Plusieurs auteurs, dont Antanasijevic *et al.* ont comparé les expériences STD et WaterLOGSY et ont montré que l'expérience WaterLOGSY est généralement plus sensible et nécessite moins d'optimisation (puissance et fréquence de saturation). Néanmoins, l'expérience STD reste l'outil de choix car elle confère des informations plus précises sur le degré d'implication des différents protons des ligands dans l'interaction avec la protéine.[171]

4.5.3.2. <u>Aspect pratique</u>

La concentration du ligand utilisée dans les expériences WaterLOGSY est plus faible que dans les expériences STD (de 40 μ M à 1 mM), avec un ratio P:L optimal égal à 1:100. Le temps de mélange varie généralement de 1 à 3 secondes.[143]

5. Conclusion

Nous avons décrit les méthodes expérimentales les plus fréquemment utilisées dans la caractérisation des interactions protéine-ligand. Les techniques ITC, SPR et FPA permettent de caractériser l'aspect thermodynamique et cinétique des interactions protéine-ligand étudiées. La RMN, quant à elle, donne accès à des informations structurales à l'échelle atomique : elle permet de définir le site d'interaction sur la protéine, de déterminer l'implication de chaque proton du ligand dans l'interaction et permet également d'estimer la constante de dissociation du système étudié.

Chapitre III. Approches théoriques utilisées pour l'étude des interactions protéine-ligand

La résolution de la structure tridimensionnelle des complexes ligand-protéine par les méthodes expérimentales classiques (RMN ou RX) est souvent longue et coûteuse.[172] De plus, il n'est pas toujours possible d'obtenir des cristaux de complexe ligand-protéine. L'utilisation des méthodes informatiques peut alors être un complément très puissant. L'une des techniques les plus populaires est appelée : l'arrimage moléculaire, ou le Docking.[173]

1. Principe

Le Docking est une technique informatique qui permet de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure d'une protéine.

La condition principale pour réaliser un Docking est de connaitre la structure tridimensionnelle des deux partenaires sous leur forme libre (structure RMN, RX ou modulée par homologie). Cette structure ne doit pas être trop modifiée lors de l'interaction. Si le site d'interaction de la protéine est connu, la boîte de Docking doit englober ce site. Lorsque le site de fixation du ligand étudié n'est pas connu, il est possible d'effectuer un Docking sur l'ensemble de la surface moléculaire : on parle alors du Docking à l'aveugle. La stratégie de ce Docking consiste à créer une boîte englobant l'ensemble de la surface moléculaire du récepteur. Le Docking est alors réalisé sur l'ensemble de la protéine ce qui conduit à une limitation majeure : le temps de calcul est long.[174],[119]

Un processus de Docking se déroule généralement en deux étapes distinctes : dans un premier temps une étape de positionnement du ligand dans le site choisi de la protéine. L'échantillonnage des positions du ligand sur la macromolécule cible est réalisé par des algorithmes de Docking tels que ceux de type Monte Carlo ou de type génétique, qui permettent l'exploration de l'espace conformationnel. Puis dans second temps, une étape d'évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine (Figure 39). Ces interactions sont modélisées par des équations de mécanique moléculaire prenant principalement en compte les interactions électrostatiques, de van der Waals et les liaisons hydrogène. Ainsi, les méthodes utilisées pour ces deux étapes diffèrent en fonction du programme de Docking utilisé.[175],[176]



Figure 39. Procédure générale d'un protocole de Docking

L'évaluation des énergies d'interaction entre la molécule dockée et le récepteur se fait à l'aide des fonctions de score, il en existe 3 types :

- Fonctions de score explicite « explicit force field scoring function » basées sur des champs de force (AMBER[177] ou CHARMM[178])
- Fonctions de score empiriques « empirical scoring function »
- Fonctions de score basées sur des données statistiques obtenues à partir de structures obtenues expérimentalement « knowledge based scoring function »

Ainsi, la réussite d'un Docking repose alors sur deux conditions :

- La capacité de l'algorithme générateur de conformations à produire au moins une conformation exacte parmi les *n* poses produites.
- La capacité de la fonction de score à classer la bonne conformation comme la meilleure conformation. La fonction de score est donc primordiale dans le processus de Docking.

Il existe plusieurs logiciels de Docking. Dans la suite, je détaillerai quatre parmi les plus utilisés : Autodock, Autodock Vina, GOLD et HADDOCK webserver.

2. Les logiciels de Docking

2.1. Autodock

Développé par le groupe de Arthur J. Olson au « Scripps Research Institute », Autodock est un programme de Docking libre de droit, [179] qui implémente trois algorithmes d'exploration de l'espace conformationnel suivant :

- Une méthode de recherche locale, basée sur un recuit simulé de type Monte Carlo, dans laquelle la conformation et le positionnement du ligand sont optimisés en même temps par perturbation aléatoire des variables définissant les degrés de liberté du complexe ligand/protéine.[180]
- Un algorithme génétique, chaque type de degré de liberté est codé dans un chromosome. Des mutations ou migrations chromosomales sont nécessaires pour faire évoluer les populations vers des solutions au sein d'un espace complexe.[181]
- Un algorithme génétique Lamarckien, basé sur les principes de génétique énoncés par Jean Baptiste Lamarck au début du 20^{ème} siècle.[179]

L'interface graphique AutoDockTools (ADT) facilite la préparation des fichiers pour réaliser le Docking et permet de visualiser les résultats, les étapes à suivre sont

- La préparation des fichiers de coordination en utilisant AutoDockTools : préparation du ligand et du récepteur en définissant les types des atomes leur charges partielles.
- Le calcul d'affinités des atomes avec AutoGrid : le récepteur est plongé dans une grille tridimensionnelle décrite par ses dimensions (longueur, largeur et profondeur), son volume (par l'intermédiaire du nombre de points n_x, n_y et n_z constituant cette grille) et l'espacement de ses points (maillage de la grille). À chaque point de la grille la valeur d'énergie est calculée en se basant sur le type d'atomes, les charges et la position au sein de la grille.

- Le Docking du ligand avec AutoDock
- Analyse des résultats avec AutoDockTools

Autodock utilise une fonction de score d'évaluation de l'énergie libre basée sur un champ de force semi-empirique.[182] Cette fonction comporte cinq termes :

 $\Delta G_{\text{interaction}} = \Delta G_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{électrostatique}} + \Delta G_{\text{liaison hydrogène}} + \Delta G_{\text{désolvatation}} + \Delta G_{\text{torsion}} (23)$

Les trois premiers termes traduisent respectivement les termes classiques de la mécanique moléculaire d'attraction et de répulsion entre les atomes (ΔG_{VDW}), d'interaction électrostatique ($\Delta G_{électrostatique}$) et de liaison hydrogène ($\Delta G_{liaison hydrogène}$). Le quatrième terme modélise les effets hydrophobes et la désolvatation ($\Delta G_{désolvatation}$) après la liaison du ligand au récepteur. Le dernier terme permet de prendre en compte les mouvements internes et les rotations/translations du ligand ($\Delta G_{torsion}$).

2.2. Autodock Vina

Comme son nom l'indique, Autodock Vina est un programme de Docking dérivé d'Autodock. Il a été développé par le même groupe. L'objectif principal du développement d'Autodock Vina était l'augmentation de la vitesse d'exécution tout en conservant des résultats à la hauteur voire meilleurs qu'Autodock. L'algorithme de positionnement des ligands de Vina est une application globale d'une recherche de type itérative locale.

La fonction de score de Vina est d'un type hybride entre une fonction de score empirique et une «Knowlegde-based », inspirée de la fonction X-Score,[183] qui diffère principalement par certains termes et par la méthode de paramétrage.[184]

2.3. GOLD

Développé par « Cambridge Crystallographic Data Center », ce logiciel de Docking utilise un algorithme génétique. Cet algorithme est de type stochastique, car il permet d'explorer de façon aléatoire les différentes conformations du ligand, et de tester leurs interactions avec le site actif. La protéine, quant à elle, est rigide, fixée dans sa conformation cristallographique. Pour rendre compte de la flexibilité de celle-ci, quelques résidus du site actif peuvent être rendus flexibles localement, ou plusieurs conformations différentes de la même cible peuvent être utilisées pour introduire une flexibilité plus globale. En outre, GOLD permet de réaliser des Docking en utilisant des contraintes au niveau du site actif de la protéine ; une région du site actif peut être spécifiée. Il permet également d'introduire des contraintes impliquant des atomes spécifiques du ligand.

Le logiciel GOLD fournit par défaut quatre fonctions de score différentes : GlodScore, ChemScore, ASP et ChemPLP.

La fonction de score utilisée par défaut dans les dernières versions du logiciel est ChemPLP, qui est une fonction de type empirique et utilise le terme énergétique des liaisons hydrogène ainsi que plusieurs potentiels linéaires pour rendre compte des interactions de type van der Waals et de termes de répulsion. C'est la fonction la plus rapide, généralement la plus précise pour le Docking et le criblage virtuel.[185]

2.4. HADDOCK webserver

HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein Docking) est une méthode de Docking guidée par des données expérimentales. Ces données expérimentales peuvent provenir, par exemple, de la mutagénèse ou de mesures spectroscopiques. Les données RMN telles que, la perturbation de déplacements chimiques (CSP), les couplages dipolaires résiduels (RDC), l'échange hydrogène/deutérium, ou les contraintes de distance (NOE) sont également très utilisées. Lorsque l'information expérimentale est absente, les prédictions d'interface d'interaction par méthodes bioinformatiques peuvent également être utilisées.[186],[187]

La version 2.2 de HADDOCK supporte un large éventail de données expérimentales et fournit des protocoles de Docking améliorés. Contrairement à de nombreux autres programmes de Docking, HADDOCK permet l'exploration conformationnelle des partenaires (squelette et chaînes latérales) pendant la formation du complexe. De plus, HADDOCK permet de traiter les structures RMN contenant plusieurs modèles.[188]

Les principales limitations du logiciel HADDOCK, quand il fonctionne sur une machine locale, sont qu'il nécessite un environnement Unix avec CNS (Crystallographic and NMR system) [189] et autres programmes complémentaires installés. De plus, l'exécution de HADDOCK peut prendre des centaines d'heures CPU (Computer Processing Unit), nécessitant l'utilisation d'un ensemble d'ordinateurs pour obtenir le résultat en un temps raisonnable. Ces exigences pourraient ne pas poser de problème aux spécialistes de la biologie structurale, qui ont l'habitude d'effectuer des calculs de structure avec les logiciels CNS ou Xplor-NIH[190] et qui constituent une bonne partie des utilisateurs de base de HADDOCK. Cependant, ils peuvent constituer un obstacle aux non spécialistes lors de la réalisation des Docking guidés par les données expérimentales. Pour surmonter cet obstacle, un ensemble d'interface de Webserver pour HADDOCK a été développé. La plus simple de ces interfaces est l'interface Easy, qui implémente l'ensemble des paramètres pris en charge par le programme HADDOCK et offre le même degré de contrôle sur le processus de Docking que l'exécution de HADDOCK sur une machine locale.[191],[188]

L'interface Easy ne nécessite que des structures de départ des deux partenaires et des listes de résidus en interaction. Cette interface cache la plupart des paramètres, en les réglant implicitement à leur valeur par défaut ou en les déterminant automatiquement en cas de besoin. Ceci est suffisant pour les applications les plus courantes de HADDOCK, telles que le Docking guidé par les CSP, les données de mutagenèse ou les prédictions d'interface bioinformatique.[191],[188]

Dans le protocole de Docking sous HADDOCK, les données expérimentales sont saisies sous forme de résidus actifs et passifs. Les résidus dit « actifs » sont caractérisés par des CSP (ou CCSP) supérieurs à une valeur limite et doivent se trouver en surface de la protéine (accessibles au solvant). Les résidus « passifs » qui sont également à la surface de la protéine, ont des CCSP plus faibles que les résidus « actifs » ou sont proches de ces derniers dans l'espace. Ceci définit alors les contraintes intermoléculaires ambiguës qui représentent des contraintes entre n'importe quel atome d'un résidu « actif » de l'un des deux partenaires et de n'importe quel atome d'un résidu « passif » de l'autre partenaire, utilisés pour guider le Docking.[191],[188]

HADDOCK génère automatiquement la topologie des molécules à docker. Le protocole de Docking se compose alors de trois étapes, à savoir :

- Une minimisation de l'énergie du corps rigide.
- Un affinement semi-flexible dans l'espace de l'angle de torsion.
- Un affinement final dans un solvant explicite.

Après chacune de ces étapes, les structures sont notées et classées, et les meilleures structures sont conservées pour l'étape suivante. Le score HADDOCK est la somme pondérée des valeurs des énergies de van der Waals, des interactions électrostatiques, de l'énergie de désolvatation et de la violation des contraintes ainsi que de la surface enfouillée. Pour chaque étape, le nombre de structures et les fonctions de score peuvent être modifiés par l'utilisateur. Il en est de même pour plusieurs autres paramètres tels que la température, le nombre d'itération et les constantes de force, contrôlant le protocole Docking/affinement. Enfin, le programme HADDOCK prend en charge le Docking simultané de jusqu'à six molécules.[191],[188]

3. Conclusion

Les approches théoriques permettant la prédiction du mode d'interaction d'un ligand avec son récepteur sont complémentaires des expériences *in vitro* et *in vivo*, et permettent parfois leur interprétation. Elles donnent un éclairage irremplaçable sur les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, le socle à partir duquel une conception ou une optimisation rationnelle de molécules actives, prenant en compte des critères structuraux, peut être envisagée. De plus, elles permettent de réduire significativement les expériences *in vitro* en focalisant la recherche sur une petite fraction intéressante d'une base de données de molécules par ailleurs trop volumineuse pour être explorée expérimentalement. Les données expérimentales sont néanmoins absolument nécessaires au développement des outils théoriques et à leurs validations. Cette synergie entre les approches théoriques et expérimentales est cruciale pour une évolution optimale des connaissances en biologie, pharmacie et médecine. Un tel environnement de recherche est très certainement l'une des clés vers un chemin de plus en plus court entre l'identification d'un besoin thérapeutique à la délivrance du médicament *ad hoc* au patient.

Partie 3 - RESULTATS & DISCUSSION
Le Pyridoclax, conçu par nos collaborateurs au CERMN, a montré une excellente activité anti tumorale et fait l'objet d'un brevet international depuis 2014.

La première partie des résultats porte sur la caractérisation, par RMN et modélisation moléculaire, de l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax. Le but de cette étude est de définir le site et le mode d'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1, et de proposer un modèle de la structure tridimensionnelle du complexe MCL-1:Pyridoclax.

Afin de confirmer les résultats obtenus pour le Pyridoclax, nous avons également étudié l'interaction entre la protéine MCL-1 et différents fragments dérivés du Pyridoclax. Ces fragments ont été conçus dans le cadre de la thèse de C. Denis au CERMN et ont l'avantage d'être solubles dans les milieux aqueux proches des conditions physiologiques.

Cette étude permet d'autre part de guider l'approche FBDD (Fragment Based Drug Design) adoptée par nos collègues à la recherche des inhibiteurs duaux de MCL-1 et Bcl-_{xL}.

Enfin, nous avons souhaité élargir notre étude à d'autres inhibiteurs potentiels de la protéine MCL-1.

Chapitre I. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax

1. Étude de l'interaction entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1 par RMN

Afin de fournir une preuve expérimentale de l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax et de préciser le site d'interaction sur la surface de la protéine, une étude par spectroscopie RMN a été réalisée. Dans un premier temps, nous avons réalisé l'attribution des signaux du Pyridoclax et du domaine 172-327 de la protéine MCL-1 humaine. Ce domaine a déjà été étudié par RMN par Liu *et al.* en 2014, et les données sont disponibles dans la base de données de déplacements chimiques RMN (BMRB) sous le code 19654.[75] Toutefois, dans la structure publiée, la Cystéine en position 286 a subi une mutation en Sérine. Selon les auteurs, cette mutation permet d'obtenir une meilleure stabilité de la protéine, mais elle est susceptible de modifier les déplacements chimiques des résidus au voisinage du résidu muté. Par ailleurs, nous avons utilisé des conditions d'analyse légèrement différentes (pH, température et concentration), ce qui peut entraîner une légère modification des déplacements chimiques des ¹H et ¹⁵N de certains résidus. Pour ces raisons, il nous était indispensable de reprendre l'attribution des signaux de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non mutée dans nos conditions expérimentales. Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de la préparation des échantillons et la caractérisation de l'interaction à l'échelle atomique entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax.

1.1. Caractérisation structurale de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et du Pyridoclax

1.1.1. Attribution des signaux de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

Nous avons utilisé un échantillon doublement marqué (¹⁵N-¹³C) de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine afin de réaliser l'attribution des signaux ¹H, ¹³C et ¹⁵N. L'acquisition du spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de l'échantillon a révélé un bon éclatement spectral, indiquant que la protéine était bien structurée (Figure 42).

Les données de la BMRB (code 19654) [75] ont été utilisées pour réaliser une attribution par analogie de la majeure partie des signaux du spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Pour compléter l'attribution des résonances des noyaux du squelette peptidique (HN, N, C_{α} et C_{β}), nous avons utilisé trois expériences 3D dont le principe est de corréler l'azote et le proton amide d'un résidu *i* avec un troisième atome (ou un quatrième) appartenant soit au même résidu *i*, soit au résidu précédent *i*-1. Ainsi, l'expérience 3D HNCA corrèle les noyaux HN_{$(\beta$}-N_{$(\beta)}-C_{<math>\alpha(\alpha)$} et les noyaux HN_{$(\beta)$}-N_{$(\beta)}-C_{<math>\alpha(\alpha)$} (Figure 40B).[192] L'expérience 3D HN(CO)CA permet de corréler les noyaux HN_{(β)}-N_{$(\beta)}-C_{<math>\alpha(\alpha)$} (Figure 40C).[192] L'expérience CBCA(CO)NH lie par transfert de polarisation les résonances du couple HN_{$(\beta)} aux résonances C_{<math>\alpha(\alpha)$} et C_{$\beta(\alpha)} (Figure 40D).[193] Par comparaison, il$ devient aisé d'exploiter les informations inter- et intra-résidus et d'attribuer les résonances des $atomes (HN, N, C_{<math>\alpha$} et C_{$\beta$}) du squelette peptidique.</sub></sub></sub></sub></sub>



Figure 40. Représentations schématiques du transfert d'aimantation dans les expériences enregistrées pour l'attribution des résonances (HN, N, C_{α} et C_{β}) du squelette peptidique. **A.** ¹H-¹⁵N HSQC – **B.** HNCA – **C.** HN(CO)CA – **D.** CBCA(CO)NH

Le spectre ¹H-¹⁵N HSQC sert de spectre de référence car à chaque pic est associé un résidu (à l'exception des Prolines). Les résonances des C_{α} et C_{β} (et les NH pour les Glycines) permettent d'identifier formellement la nature de certains acides aminés grâce à leurs déplacements chimiques canoniques, comme l'Alanine ($\delta C_{\alpha} \approx 19 \text{ ppm}$), la Glycine ($\delta N \approx 110 \text{ ppm}$, $\delta C_{\alpha} \approx 45 \text{ ppm}$ et pas de C_{β}) et la Thréonine ($\delta C_{\alpha} \approx 62 \text{ ppm}$ et $\delta C_{\beta} \approx 70 \text{ ppm}$).[194] Grâce à la détermination de la nature des acides aminés et l'information de connectivité entre résidus, nous avons pu compléter l'attribution du spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹³C-¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine. La Figure 41 montre un exemple de la méthode adoptée lors de l'attribution des signaux de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.



Figure 41. Exemple du point de départ de l'attribution séquentielle des résonances (HN, N, C_α et C_β) des résidus (Ala190 et T191)
 A.¹H-¹⁵N HSQC – B. HNCA – C. HN(CO)CA et D. CBCA(CO)NH. Spectres enregistrés en utilisant 250 µM de la protéine ¹³C-¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (PBS - pH 7, 298 K, 600 MHz)

Par analogie aux travaux de Liu *et al.*[75] les groupements NH_2 des chaînes latérales des Asparagines et Glutamines, les groupements imines de l'indole de deux Tryptophanes (sur trois) et également les imines secondaires des groupes guanidines de cinq Arginines (sur quatorze) ont été attribués sur la carte 2D ¹H-¹⁵N HSQC.

Finalement, l'utilisation d'un échantillon de la protéine MCL- $1^{172-327}$ doublement marquée (¹⁵N/¹³C) a permis d'attribuer :

- 96% des protons et azotes de fonctions amides,
- 96% des atomes C_{α} ,
- 92% des atomes C_{β} ,
- 100% des groupement NH₂ des chaînes latérales des Asparagines et Glutamines.

Le tableau des déplacements chimiques (¹H, ¹⁵N et ¹³C) du domaine (172-327) de la protéine MCL-1 humaine est présenté en annexe I.



Figure 42. Spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹³C-¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine Spectre enregistré en utilisant 250 μM de la protéine ¹³C-¹⁵N marquée (PBS - pH 7, 298 K, 600 MHz). Les corrélations annotées en rouge correspondent aux protons des fonctions NH en position ε des chaînes latérales des Arginines, l'observation de ces signaux est due à un repliement spectral.

1.1.2. Attribution des signaux du Pyridoclax

Le Pyridoclax étant insoluble en milieu aqueux, sa caractérisation a été réalisée dans le DMSO-d₆ à l'aide des expériences RMN classiques : 1D ¹H et 2D homonucléaires (¹H-¹H) COSY et NOESY. La Figure 43 montre le spectre 1D ¹H du Pyridoclax avec l'attribution des signaux de ses protons. L'attribution complète (¹H et ¹³C) des signaux du Pyridoclax est donnée en annexe III.



Figure 43. Spectre RMN 1D ¹H du Pyridoclax Attribution des signaux réalisée grâce aux corrélations observées sur les cartes 2D présentées en annexe III (5 mM, DMSO-d₆, 313 K, 600 MHz)

Une étude conformationnelle du Pyridoclax a été également réalisée. A l'aide du spectre 2D ¹H-¹H NOESY, nous avons pu identifier des corrélations dues aux interactions dipolaires (flèches bleues, Figure 44A), en particulier, entre :

- i. Les protons du groupement méthyle B₆ et les protons A₃ et A₅.
- ii. Le proton éthylénique H_{10} et les protons B_3 et B_5 .
- iii. Le proton D_5 et les protons C_3 et C_5 .
- iv. Le proton D_3 et les protons C_3 et C_5 .

Ces corrélations mettent en évidence la conformation non plane due à un « flip » des cycles pyridiniques (flèches rouges) (Figure 44A).



Figure 44. Structures du Pyridoclax

A. Effets NOEs présentés sur la structure du Pyridoclax. B. Structures des deux conformères obtenus par RX. Les flèches bleues sur la structure du Pyridoclax indiquent les effets NOEs observés et les flèches rouges les « flips » des pyridines.

L'intégration des pics de corrélations sur la carte NOESY a permis d'estimer les distances entre les différents protons. Les distances obtenues par RMN ont été comparées à celles mesurées sur les structures RX obtenues au CERMN. Les résultats montrent qu'en solution, le Pyridoclax adopte une conformation légèrement différente de celle de l'état solide (Tableau 6).

Couples	Structures RX Structure RMN							
d'atomes	r(Å) PyMol	r(Å), (estimé des NOEs, ref A ₁ /A ₂)						
A_3/B_6	4,9	/						
A_5/B_6	2,9	2,3						
B_3/B_6	3,0	2,4						
C_{3}/D_{3}	4,4	3,0						
C_5/D_3	2,2	2,9						
C_{3}/D_{5}	2,3	2,8						
C_5/D_5	4,4	3,5						
B ₃ /10	4,3	2,8						
B ₅ /10	2,4	2,7						
La distança antre las protons (A, et A) qui a servi de référence est de 2.3 Å								

Tableau 6. Comparaison des distances entre les différents protons du Pyridoclax dans les structures RMN et RX

La distance entre les protons (A_1 et A_2) qui a servi de référence est de 2,3 Å.

1.2. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax

L'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax doit être étudiée en solution dans un milieu proche du milieu physiologique (solution aqueuse, pH neutre). Or le Pyridoclax s'étant avéré insoluble dans un tel milieu, nous avons dû utiliser un co-solvant organique. Le DMSO-d₆ a été choisi par analogie à des études décrites dans la littérature.[107],[195]

1.2.1. Effet du co-solvant DMSO sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

Le DMSO est un solvant polaire, aprotique, miscible à l'eau qui permet d'améliorer la solubilité des composés hydrophobes. Par ailleurs, le DMSO a la capacité de déstabiliser les membranes biologiques, permettant un accès aux zones profondes des cellules. La présence du DMSO est généralement sans effet nocif à 0,1 % sur les lignes cellulaires et jusqu'à 5-10 % pour les essais biochimiques et biophysiques.[196] Cependant, certaines études, dont celle de Dalvit (publiée en 1999), ont montré que le DMSO était susceptible d'interagir avec certaines protéines.[197],[198],[199]

À notre connaissance, l'effet du DMSO sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ n'a pas été caractérisé à ce jour. Il nous est donc paru indispensable de vérifier quel était l'effet du DMSO sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ avant d'aborder l'étude de l'interaction de cette dernière avec le Pyridoclax en présence du DMSO. Pour cela, nous avons utilisé deux expériences RMN, la première basée sur l'observation des signaux du DMSO et la deuxième sur l'observation des signaux de la protéine.

1.2.1.1. Méthode basée sur l'observation des signaux du DMSO : expérience STD

La vérification de l'interaction entre le DMSO et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a été réalisée à l'aide de l'expérience STD. Comme évoqué précédemment, cette expérience consomme peu de protéine non marquée (20 µM par expérience) et son analyse est rapide : la présence de signal indique la présence d'une interaction. La Figure 45 montre les spectres off-résonance et STD obtenus en enregistrant une expérience STD du mélange MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:DMSO (ratio 1:1150). Sur le spectre STD (Figure 45), la présence du signal vers 2,66 ppm, caractéristique du DMSO, est l'indication d'une interaction du DMSO avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.



Figure 45. Mise en évidence de l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le DMSO par l'expérience STD L'étoile indique le signal du DTT. ([MCL-1¹⁷²⁻³²⁷]=20 μM, [DMSO]=23 mM, temps de saturation 2s, PBS – pH 7, 298 K, 600 MHz)

1.2.1.2. <u>Méthode basée sur l'observation des signaux de la protéine : expérience</u> 2D ¹H-¹⁵N HSQC

a. Mise en évidence de l'interaction

Deux spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ ont été enregistrés, en absence puis en présence du DMSO (5% en volume).

La comparaison qualitative des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC, obtenus avant et après l'ajout du DMSO, montre le même éclatement des fréquences de résonance des protons amidiques H^N et de l'azote ¹⁵N. **La protéine ¹⁵N MCL-1**¹⁷²⁻³²⁷ **n'est donc pas dénaturée en présence du DMSO**. La variation des déplacements chimiques, de quelques pics de corrélations sur le spectre 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ en présence du DMSO (Figure 46), met en évidence l'interaction de la molécule du DMSO avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'amplitude relativement faible de ces variations, reflète une faible affinité de la molécule du DMSO pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.



Figure 46. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N-MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ enregistrés en absence (bleu) et en présence (rouge) du DMSO (5% en volume). ([¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷]=50 μM, [DMSO]=690 mM, PBS - pH7, 298 K, 600MHz)

L'analyse détaillée des cartes 2D obtenues en absence et en présence du DMSO (5% en volume) nous a permis de calculer les valeurs des variations de déplacements chimiques combinés (CCSP) selon l'équation (8), de tracer l'histogramme des variations de déplacements chimiques pour chaque résidu (Figure 47A) et de cartographier ces résidus sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 47B).



$CCSP(ppm) = [\Delta \delta H^2 + (0, 2, \Delta \delta N)^2]^{1/2}$ (8)

Figure 47. Identification du site d'interaction du DMSO sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Histogramme des variations de déplacements chimiques combinés des H^N-N de tous les résidus de la protéine ¹⁵N-MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ calculées après l'ajout du DMSO (5% en volume). Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les Prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel.

B. Cartographie des résidus fortement perturbés sur la surface de la protéine MCL-1172-327.

L'histogramme montre que les résidus les plus affectés sont : Thr295, Phe319, Thr280, Glu189, Lys244, Gly219, Phe270, Asp236, Asp313, Met199, Val220, His320, Leu235, Lys279, Glu317, Gly326, Val253, Arg248, Ile237, Gly217, Leu232, Gln309, Thr301, Arg215 et Gln283, dans l'ordre décroissant des valeurs des CCSP. Ces résidus sont localisés principalement sur la

surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Certains d'entre eux se trouvent au niveau des poches hydrophobes P1 et P2 du site d'interaction (Phe270, Val253, Leu 235) et sont donc susceptibles de perturber l'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ avec le Pyridoclax.

b. Estimation du K_D

Une titration croisée de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le DMSO a été réalisée à partir de deux échantillons initiaux avec des ratios DMSO:¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ de 0:1 et 22388:1 (10% DMSO en volume), respectivement. Au total, 10 points de titration ont été obtenus, pour lesquels des spectres 2D ¹H ¹⁵N HSQC ont été enregistrés. La Figure 48A montre que les variations de déplacements chimiques, observées lors de la titration, suit une ligne droite. Cela indique que l'échange entre les états libre et lié de la protéine se fait selon un régime rapide à l'échelle de temps de la RMN.



Figure 48. Estimation de la constante d'affinité du DMSO pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ **A.** Expansion des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC obtenues lors de la titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le DMSO. **B.** Exemples de courbes de titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le DMSO

Le suivi des variations de déplacements chimiques, obtenues à partir des 10 points expérimentaux de titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le DMSO, a permis d'obtenir la valeur de la constante de dissociation (K_D), par ajustement de la courbe de variation de déplacements chimiques combinés des résidus (Phe270, Arg263, Lys197 et Leu213) en fonction du ratio [DMSO]/[¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷] selon l'équation (17).

$$\frac{[PL]}{[P]_{tot}} = \frac{1}{2} \left[1 + x + \frac{K_D}{[P]_{tot}} - \sqrt{\left(1 + \frac{K_D}{[P]_{tot}} + x\right)^2 - 4x} \right]$$
(17)

Les valeurs de K_D obtenues sont de l'ordre de la centaine de millimolaire. Ces valeurs reflètent la faible affinité du DMSO pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Elles sont du même ordre de grandeur que la valeur de K_D de 275 mM déterminée auparavant par Dalvit *et al.* pour quantifier l'affinité du DMSO pour une autre protéine (FKBP12).[199] Par conséquent, même si le DMSO occupe en partie le site d'interaction, il ne devrait pas empêcher le Pyridoclax d'interagir avec la protéine-MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

c. Effet du DMSO sur la dynamique interne de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

Afin de compléter ces résultats, une étude de l'effet du DMSO sur la dynamique de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a enfin été réalisée au moyen de la mesure des vitesses de relaxation longitudinale (R_1 =1/ T_1), transversale (R_2 =1/ T_2) ainsi que par la mesure du NOE hétéronucléaire ¹H-¹⁵N.

La mesure des vitesses de relaxation du spin azote 15 a été menée sur un échantillon de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ marquée ¹⁵N, en l'absence et en présence de 5% (en volume) du DMSO.

La Figure 49 (A et B) montre quelques spectres enregistrés au moyen des expériences pseudo 3D (voir Partie 2 -4.4.3) pour différents délais t_r afin de déterminer les temps de relaxation (T_1 et T_2) des résidus de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Certaines zones des cartes obtenues présentent des recouvrements importants. Dans ces régions, les données de relaxation n'ont pas pu être extraites.

Les paramètres de relaxations longitudinale ($R_1=1/T_1$) et transversale ($R_2=1/T_2$) des ¹⁵N de 85 résidus du squelette ont été obtenus par l'ajustement de l'intensité des pics croisés en fonction de t_r selon une fonction exponentielle décroissante (équation (18)). La Figure 49 (C et D) montre deux exemples de courbes utilisées pour estimer les valeurs de T₁ et T₂.

$$I(t_r) = I_0 e^{-Rt_r}$$
(18)



Figure 49. Étude de la dynamique interne de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ en présence du DMSO
A. Exemples de spectres enregistrés lors des mesures des temps de relaxation T₁. B. Exemples de spectres enregistrés lors des mesures des temps de relaxation T₂. C. Exemples des courbes d'ajustement de T₁ et D. de T₂ du résidu Thr191 en utilisant l'équation (18).

Pour les T₁ le spectre bleu est enregistré avec un délai (t_r) de 20 ms et le spectre rouge est enregistré avec un délai (t_r) de 1500 ms. Pour les T₂, le spectre bleu est enregistré avec un délai (t_r) de 17 ms et le spectre rouge avec un délai (t_r) de 100 ms.

Les valeurs moyennes des vitesses de relaxation longitudinale ($R_1 = \frac{1}{T_1}$) extraites, en absence et en présence du DMSO, sont de 1,33 s⁻¹ et 1,28 s⁻¹, respectivement, avec des écarts-types moyens de 0,06 s⁻¹ (Figure 50A). Les valeurs de R₁ sont globalement uniformément réparties autour des valeurs moyennes. Ainsi, l'effet du DMSO sur le paramètre R₁ est négligeable.

Les valeurs moyennes des vitesses de relaxation transversales ($R_2 = \frac{1}{T_2}$)) extraites, en absence et en présence du DMSO, sont de 11,30 s⁻¹ et 12,50 s⁻¹, avec des écarts-types moyens de 1,06 s⁻¹ et 1,28 s⁻¹, respectivement. Dans les deux conditions, la dispersion des valeurs de R₂ est plus importante que celle des R₁ (Figure 50B).

Pour mesurer le NOE hétéronucléaire, une expérience pseudo 3D a été utilisée pour enregistrer deux spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC avec et sans saturation.

La Figure 50C montre que les résidus de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ possèdent une valeur moyenne de NOEs hétéronucléaires de 0,82±0,12 en absence du DMSO, et de 0,75±0,14 en présence du DMSO. Nous avons observé une grande dispersion des valeurs des NOEs hétéronucléaires (de 0,4 à 1,0), sur les parties structurées et non structurés de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, en absence et en présence du DMSO. Cela suggère une flexibilité de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Ainsi, l'ajout du DMSO n'entraîne pas de modifications significatives sur la mobilité globale de la protéine. Cependant, quelques résidus ont vu leurs valeurs de R₁, R₂ et NOEs hétéronucléaires modifiées. Ces résidus ne correspondent pas aux « hotspots » définis lors de la titration et se trouvent loin du site d'interaction, et très majoritairement à la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 50D, E et F). Ces observations peuvent être expliquées par un simple effet de solvatation sur la dynamique de la protéine.[200]

En conclusion de cette première partie, nous avons tenté de comprendre et d'évaluer l'effet du DMSO sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'observation du signal du DMSO dans l'expérience STD, le suivi des variations des déplacements chimiques sur les spectres ¹H-¹⁵N HSQC lors de la titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par l'ajout du DMSO mettent en évidence une interaction, avec une faible affinité (quelques centaines de millimolaires), du DMSO avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Les mesures des vitesses de relaxation (R₁ et R₂) et le NOE hétéronucléaire ont permis de vérifier que cette interaction n'a pas un effet significatif sur la dynamique de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'ensemble de ces observations permet de valider l'étude de l'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ en présence du DMSO comme co-solvant.



Figure 50. Analyse des données de relaxation en absence et en présence du DMSO (5% en volume)
A. Vitesses de relaxation longitudinale (R₁). B. Vitesses de relaxation transversale (R₂). C. NOE hétéronucléaire, des spins de l'azote 15 en absence (en noir) puis en présence de 5% du DMSO (en rouge). Toutes les valeurs obtenues sont en annexe II. Les histogrammes représentent les valeurs absolues des écarts entre les valeurs obtenues en absence et en présence du DMSO. D. Cartographie des résidus dont les valeurs de R₁, E. R₂ ont été modifiées après l'ajout du DMSO ((|écart|>2stdeva en bleu) et F. cartographie des résidus dont les valeurs des représentent les blauches représentent les blauches représentent les blauches représentent les blauches et les blaues les hélices.

1.2.2. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax par RMN

En raison de la faible solubilité du Pyridolcax dans le milieu utilisé, l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax n'a été étudiée qu'au moyen des méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine, qui ne nécessitent que de très faibles concentrations en ligand. Ainsi, des séries des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N marquée ont été enregistrées en absence et en présence de quantités croissantes du ligand (jusqu'au ratio L:P =5:1) pour identifier les résidus impliqués dans l'interaction et estimer la valeur de la constante d'affinité.

1.2.2.1. Identification des « hotspots »

La Figure 51 présente la superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ enregistrés en absence (ratio 1:0) puis en présence du Pyridoclax (ratio 1:1). La comparaison qualitative des cartes montre que la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ ne semble pas subir de réarrangement structural majeur au cours de l'interaction avec le Pyridoclax car les deux spectres montrent le même jeu de résonance.



Figure 51. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ enregistrés en absence (bleu) et en présence (rouge) du Pyridoclax.

([¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷] = 50 µM, [Pyridoclax] = 50 µM, PBS (5%DMSO-d₆) - pH 7, 298 K. 600 MHz)

L'analyse des spectres obtenus pour les deux échantillons (ratios L:P = 0:1 et 1:1) et le calcul des valeurs de perturbations des déplacements chimiques combinés pour chaque résidu selon l'équation (8) (Voir Partie 2 -4.4.2.3) ont permis de tracer l'histogramme présenté dans la Figure 52A.



Figure 52. Identification du site d'interaction du Pyridoclax sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Variations de déplacements chimiques des pics des H^N-N de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ lors de l'ajout du Pyridoclax (ratio 1:1). Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les Prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel. B. Cartographie des résidus fortement (en rouge) et moyennement (en vert) perturbés, par la présence du Pyridoclax, sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Pour définir l'interface d'interaction entre les deux partenaires, les résidus fortement perturbés (CCSP > 2xdéviation standard) et moyennement perturbés (1xdéviation standard < CCSP < 2xdéviation standard) ont été cartographiés sur la surface de la structure tridimensionnelle de la protéine MCL-1 (Figure 52B). Ces résidus forment une large zone de contact centrée principalement autour des poches P2 (Met250, Phe270, Leu267 et Val253) et P1 (Lys234, Val249

et Met231). Certains résidus des poches P3(His224) et P4 (Val216, Val220) sont également perturbés. Ces résultats suggèrent que le site d'interaction du Pyridoclax est centré sur les poches hydrophobes P1 et P2.

La perturbation des résidus situés hors de la poche P2 peut être expliquée par une éventuelle fluctuation conformationnelle de la protéine lors de l'interaction avec le Pyridoclax, incluant probablement des mouvements du squelette de la protéine et une réorientation de ses chaînes latérales, notamment pour les résidus localisés sur les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 4$ (Arg215, Val216, Gly219, Val220, Val243, Ser247, His252). En effet, Sankararamakrishnan *et al.* ont montré que l'hélice $\alpha 2$ subit une déstructuration lors des simulations dynamiques des complexes MCl-1:peptides BH3. Cela a été expliqué par la présence de trois Glycines sur cette hélice, et l'absence d'interaction stable entre les résidus de l'hélice $\alpha 2$ et les résidus des autres hélices.[201] Wang *et al.* ont également montré que l'interaction hydrophobe entre le résidu Val253 et un groupement isopropyle de leur ligand a entraîné la rupture des liaisons hydrogène entre les résidus (Val243-Ser247 et Leu246-Met250), et donc la déformation de l'hélice $\alpha 4$. Cette hélice est l'une des hélices qui limitent le domaine BH3 de la protéine MCL-1 et sa mobilité lui permet d'adapter la poche d'interaction et d'adopter une conformation optimale pour recevoir le ligand.[202]

Les autres résidus fortement perturbés situés hors du site d'interaction sont : le résidu Thr295, au niveau de l'hélice α 6, les résidus Lys302 et Asp313, au niveau des extrémités des hélices α 6 et α 8, respectivement, et le résidu Asp236, au niveau de la boucle entre les hélices α 3 et α 4. Il s'agit de résidus comportant des chaînes latérales chargées, probablement impliquées dans des interactions électrostatiques. Leur perturbation ne peut être expliquée que par un effet indirect de l'interaction.[203]

1.2.2.2. Estimation de la constante de dissociation

La trajectoire linéaire de la majorité des tâches de corrélation observées sur une série de cartes 2D 1 H- 15 N HSQC enregistrées pour 10 ratios L:P traduit un régime d'échange intermédiaire-rapide (Figure 53). La constante de dissociation K_D estimée, à partir des courbes de titration (Figure 53) de la protéine MCL- $1^{172-327}$ par le Pyridoclax, est de l'ordre de 15 μ M. Cette valeur reflète une **importante affinité du Pyridoclax envers la protéine MCL-1^{172-327}**.

La valeur de la constante de dissociation a été estimée précédemment à 25 nM par SPR. La différence entre les deux valeurs obtenues par RMN et SPR peut être expliquée par la différence dans les conditions expérimentales entre les deux mesures, ainsi que par la faible solubilité du

Pyridoclax, qui empêche le contrôle précis de sa concentration dans l'échantillon. En revanche, la valeur de K_D obtenu par RMN est plus en accord avec la concentration efficace du Pyridoclax de l'ordre de 25 μ M définie par les tests biologiques.[9]



Figure 53. Estimation de la constante d'affinité du Pyridoclax pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (**A. B. C.**). Expansions des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC obtenues lors de la titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le Pyridoclax. **D.** Exemples des courbes de titration obtenues.

1.2.2.3. <u>Temps de résidence du Pyridoclax dans son site d'interaction</u>

Dans le but de confirmer la valeur de K_D et de déterminer celle de la constante cinétique k_{off} , nous avons réalisé une analyse des formes de raies sur les cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC enregistrées lors de la titration, à l'aide du logiciel TITAN (TITration ANalysis)[204] en nous basant sur un modèle d'interaction à deux états.

Les spectres expérimentaux sont très bien reproduits par ce modèle (Figure 54). L'analyse des pics de 29 résidus fortement perturbés en présence du Pyridoclax a conduit à une valeur de K_D de l'ordre de 29,2±0,5 μ M. Cette valeur de K_D est en accord avec celles obtenues par l'ajustement des courbes de variations de déplacements chimiques en fonction de la concentration du ligand pour chaque résidu.



Figure 54. Exemples des fits obtenus par TITAN

Cette analyse nous a permis également d'extraire une valeur de la constante cinétique k_{off} de l'ordre de 208,3±7,7 s⁻¹. A partir de la valeur de k_{off} obtenue, le temps de résidence du Pyridoclax ($\tau=1/k_{off}$) dans son site d'interaction a pu être estimé à 4,8 ms, valeur relativement importante, en accord avec une forte affinité.

1.2.2.4. Effet de l'interaction sur les groupements méthyles des chaînes latérales

Il a été montré que les groupements méthyles constituent des sondes utiles dans la caractérisation des interactions protéine-ligand.[205] Dans notre cas, plusieurs résidus contenant des groupements méthyles sont localisés au niveau du sillon hydrophobe de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ comme les résidus : Leu235, Met231(P1), Met250, Leu267 (P2), Ala227 (P3) et V216 (P4). Pour cela deux spectres 2D ¹H-¹³C SOFAST-HMQC focalisés sur la zone des méthyles de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ doublement marquée (¹³C-¹⁵N) ont été enregistrés en l'absence puis en présence du Pyridoclax (en annexe IV). L'ajout du Pyridoclax a entrainé l'élargissement et la perturbation des déplacements chimiques des signaux des groupements méthyles en position ε des Méthionines 231 et 250, en position β de la Leucine 213 et en position γ de la Valine 253. Les déplacements chimiques des fonctions amides de ces résidus ont été également perturbés sur les cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC.

La cartographie de ces résidus sur la structure de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 55) montre que la distance entre les groupements méthyles des résidus Val253 et Met231 est de 2,7Å, ce qui indique la présence d'une interaction hydrophobe entre les chaînes latérales de ces deux résidus. L'ajout du Pyridoclax peut perturber cette interaction hydrophobe, et donc affecter ces groupements méthyles. La Met250 est située dans la partie profonde de la poche hydrophobe P2, qui forme le site d'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. La Leu213, quant à elle, est située loin des poches hydrophobes mais au niveau de l'hélice α 2. Sa perturbation est probablement liée à un effet indirect de l'interaction.



Figure 55. Cartographie des résidus dont les groupements méthyles des chaînes latérales ont été perturbés par l'ajout du Pyridoclax.

1.2.2.5. Effet du Pyridoclax sur la dynamique interne de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

Pour déterminer l'effet du Pyridoclax sur la dynamique interne de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, nous avons effectué une mesure de temps de relaxation (T_1 et T_2) et des NOEs hétéronucléaires en absence et en présence du Pyridoclax. Nous avons donc pu d'obtenir un jeu complet de paramètres (R_1 et R_2) pour 91 résidus (Figure 56). En revanche, nous n'avons pas pu obtenir les valeurs de NOEs hétéronucléaires, en raison de la mauvaise qualité des spectres enregistrés (rapport signal/bruit insuffisant).

Les valeurs moyennes de la vitesse de relaxation longitudinale (R_1) extraites en absence et en présence du Pyridoclax sont de 1,18 s⁻¹ et 1,17 s⁻¹, avec des écarts-types moyens de 0,06 s⁻¹ et 0,08 s⁻¹(soit 5%). Les valeurs sont globalement uniformément réparties autour des valeurs moyennes. Néanmoins, certains résidus voient leur valeur de R_1 modifiées par l'ajout du Pyridoclax. Ces résidus sont localisés principalement sur les hélices : $\alpha 2$ (Glu211, Val216, Asp218), $\alpha 4$ (Arg248) et $\alpha 5$ (Ile268, Ser269, Val274, Lys276, Thr280, Ile281) (Figure 56C).

De même, nous avons observé que les valeurs des vitesses de relaxation transversale (R_2), pour la majorité des résidus, sont réparties autour des valeurs moyennes : 13,50 s⁻¹ (en absence du Pyridoclax) et 13,54 s⁻¹ (en présence du Pyridoclax). Toutefois, les variations des valeurs des (R_2) sont supérieures aux variations des valeurs des (R_1). En effet, certains résidus présentent des écarts d'au moins 2 s⁻¹ (soit 15%) entre les valeurs de R_2 obtenues avant et après l'ajout du Pyridoclax. Ces résidus sont situés principalement au niveau des hélices $\alpha 2$ (Arg214, Val216 et Asp218), $\alpha 4$ (Asp241, Arg248) et $\alpha 5$ (Arg263, Ile268, Ser269, Phe270, Ala272, Ala275 et His277) (Figure 56D)



Figure 56. Analyse des données de relaxation en absence et en présence du Pyridoclax (Ratio 1:1)
A. Vitesses de relaxation longitudinal (R₁). B. Vitesses de relaxation transversale (R₂), des spins de l'azote 15 en absence (en noir) puis en présence du Pyridoclax (en rouge). Toutes les valeurs obtenues sont en annexe V. Les histogrammes représentent les valeurs absolues des écarts entre les valeurs obtenues en absence et en présence du Pyridoclax. C. Cartographie des résidus dont les valeurs des R₁ et D. R₂, ont été modifiées après l'ajout du Pyridoclax ((|écart|>2stdeva en bleu). (PBS - pH 7, 5%DMSO-d6, 298 K, 600 MHz)

En conclusion, la mesure des paramètres de relaxation (notamment la mesure de R_2) montre que l'interaction modifie la mobilité moléculaire de l'hélice $\alpha 5$ qui constitue le cœur hydrophobe de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, et également celle des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 4$, décrites dans la littérature comme ayant une dynamique particulièrement importante.[201]

Par conséquent, la caractérisation de l'interaction entre le Pyridoclax et la protéine MCL 1¹⁷²⁻³²⁷ par RMN nous a permis d'une part **d'identifier les principaux résidus impliqués dans l'interaction, d'estimer l'affinité et le temps de résidence du Pyridoclax dans son site d'interaction**. D'autre part, l'étude de la dynamique interne de la protéine en absence et en présence du Pyridoclax a montré que les vitesses de relaxation de certains résidus localisés au voisinage du site d'interaction (hélice α 5) ont été modifiées par la présence du Pyridoclax, ce qui reflète une **modification de la mobilité locale de ces résidus due aux effets direct et indirect de l'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. De même, la perturbation des résidus portés par les hélices \alpha2 et \alpha4 reflète probablement les fluctuations conformationnelles** résultant de l'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Pyridoclax.

2. Docking sous contraintes RMN

Pour affiner la caractérisation du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax et tenter de définir la position du Pyridoclax dans le site d'interaction, un Docking sous contraintes RMN a été réalisé. La structure reconstruite de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Voir Partie 5 -4) et la structure RX du Pyridoclax ont été utilisées comme structures de départ.

Dans un premier temps, l'Easy interface de HADDOCK webserver [188], a été utilisée pour obtenir un modèle du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax. L'avantage de ce logiciel est qu'il permet de définir des contraintes floues (ambiguës) spécifiant qu'une liste de résidus de la protéine, issue des expériences RMN, est en contact avec le ligand, sans définir précisément ces contacts. Comme nous l'avons vu ci-dessus, les expériences RMN (¹H-¹⁵N HSQC) indiquent que les pics H^N-N de onze résidus localisés sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ sont fortement perturbés par l'ajout du Pyridoclax. Cette perturbation reflète soit un contact direct entre le Pyridoclax et le résidu de la protéine auquel appartiennent ces atomes N et H^N, soit une perturbation induite par un contact entre le ligand et un autre résidu adjacent (ou en contact avec un résidu perturbé). Pour valider ces hypothèses, nous avons inclus, dans la liste des résidus « actifs », l'ensemble des résidus fortement affectés par la présence du Pyridoclax et localisés sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ : Arg215,

Val216, Gly219, Asp236, Met250, His252, Val253, Leu267, Phe270, Lys302 et Asp313. Tous les atomes du ligand ont été définis comme étant « passifs ».

Ce Docking a permis d'obtenir 183 structures classées dans 8 clusters. Le cluster 1 avec 68 structures correspond au meilleur cluster avec un HADDOCK score de -40,6 \pm 2,9 et z-score de -1,3 (Tableau 7). Dans les quatre meilleures structures du cluster 1, le Pyridoclax n'adopte pas sa conformation initiale en « hélice », mais une structure plane, probablement artéfactuelle. Nous n'avons donc pas pu exploiter les résultats de ce Docking bien que les 4 meilleures poses du cluster 1 montrent que le Pyridoclax occupe la poche hydrophobe P2, et semble ne pas avoir de contact avec les résidus situés loin de cette poche (α 2, α 4).

Clusters	Population	HADDOCK score	Z-Score
1	83	-40,3±4,8	-1,3
2	44	-37,7±2,0	-1,1
3	26	-31,7±3,4	-0,5
4	13	-27,6±3,4	-0,1
5	7	-16,0±4,6	0,9
6	5	-20,4±1,4	0,5
7	5	-8,4±11.1	1,6

Tableau 7. Les caractéristiques des différents clusters issus du Docking du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷³⁻³²⁷ par HADDOCK

Nos collaborateurs à Caen (Pr Jana Sopkova) ont alors décidé d'adopter le logiciel GOLD pour réaliser un autre Docking sous contraintes RMN. Le logiciel GOLD tient compte de la flexibilité totale des ligands acycliques et de la flexibilité partielle des ligands cycliques. Quelle que soit la conformation initiale du ligand, sa conformation peut donc varier pendant le Docking, sans pour autant altérer les longueurs de liaisons et les angles.

La cartographie des « hotspots » sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a été utilisée pour définir le site d'interaction. En effet, une sphère de 10 Å englobant tous les résidus perturbés a été définie pour réaliser le Docking.

Deux poses principales ont été mises en évidence lors de ce Docking, la première pose avec le Pyridoclax positionné à 180° par rapport à la seconde (Figure 57A-B). En plus de ces deux poses, une troisième pose occupée par une population minoritaire est observée (Figure 57C).



Figure 57. Les trois poses générées par le Docking sous contraintes RMN (avec le logiciel GOLD)

Dans les deux premières poses, nous avons observé que le groupement styryle du Pyridoclax est ancré dans la poche P2 de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷; il se positionne toujours contre le résidu Phe270 de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, même si les orientations du Pyridoclax dans le sillon hydrophobe dans les deux poses sont différentes (Figure 57A-B). De plus, l'une des pyridines terminales (A ou D) du Pyridoclax est toujours proche du résidu Arg263 de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Le groupement méthyle est orienté vers différentes poches dans les différentes poses du ligand. Dans la troisième pose, contrairement aux deux précédentes, la poche P2 est occupée par une pyridine terminale et non par le groupement styryle. Cette pyridine s'est enfoncée plus profondément dans la poche P2 comparativement au groupement styryle dans les deux poses précédentes, et le groupement styryle est situé à la surface de la protéine, accessible au solvant (Figure 57C).

Pour évaluer la pertinence des trois structures représentatives du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax issues du Docking sous contraintes RMN (avec le logiciel GOLD), nos collègues au CERMN ont soumis ces trois structures à une simulation de dynamique moléculaire de 100 ns.

3. Simulations de dynamique moléculaire

Dans un premier temps, la flexibilité du squelette de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a été évaluée et a révélé que le RMSD ne dépasse pas 2,5 Å pour les trois poses. Cela montre la stabilité des trois complexes. Le calcul des fluctuations des parties structurées du squelette a conduit à des valeurs

ne dépassant pas 1 Å, ce qui reflète la conservation et la stabilité des segments hélicoïdaux de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'hélice α 4, avec une valeur de 1,6 Å, fait l'exception. Cette observation est en accord avec la littérature [202] et avec nos données RMN (mesures des R₂, R₁). Un degré de flexibilité très important a été enfin observé pour les parties non structurées, en particulier les parties C- et N- terminales et la boucle entre les hélices α 1 et α 2.

Pour comprendre le comportement du Pyridoclax dans son site d'interaction, l'évolution de la position du Pyridoclax, dans les trois poses obtenues, a été évaluée à travers les valeurs de RMSD. Pour les poses 1 et 2, le Pyridoclax reste dans le site d'interaction pendant toute la durée de la simulation (100 ns), et sa position devient stable au bout de 70 ns et 40 ns, respectivement. En revanche, pour la pose 3, le Pyridoclax quitte son site d'interaction à la fin des simulations, avec un RMSD de 12 Å (Figure 58). Cette pose est donc éliminée et dans la suite, seules les poses 1 et 2 seront discutées.



Figure 58. RMSD du Pyridoclax par rapport à la position initiale pendant les simulations dynamiques des trois poses. A. pose 1, **B.** pose 2 et **C.** pose 3

L'énergie d'interaction moyenne entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a également été analysée, pour les deux poses, tout au long de la trajectoire des simulations. La différence entre les valeurs obtenues pour les deux poses est faible, mais selon ces résultats, la pose la plus favorable semble être la pose 1 (Tableau 8).

des simulations dynamiques									
	L'énergie d'interaction moyenne sur	L'énergie d'interaction moyenne							
	toute la trajectoire [kcal.mol ⁻¹]	sur les 30 ns dernières [kcal.mol ⁻¹]							
Pose 1	$-31,1 \pm 5,4$	$-31,0 \pm 5,0$							
Pose 2	$-29,5 \pm 3,7$	$-29,8 \pm 2,5$							

Tableau 8. L'énergie d'interaction moyenne entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, calculée lors des simulations dynamiques

L'analyse de toutes les positions que le Pyridoclax peut occuper durant les périodes de simulations à partir des poses 1 et 2, a permis d'obtenir 6 groupes de poses (clusters) pour chaque pose de départ. Les populations des trois premiers clusters pour chaque pose sont les plus importantes (Figure 59).



Figure 59. Les structures représentatives des trois meilleurs clusters obtenus pour les deux poses retenues lors des simulations dynamiques
A. Pose 1. B. Pose 2. Les structures les plus favorables sont encadrées en rouge.

Le calcul et l'analyse des énergies d'interaction par résidu a permis d'identifier les principaux résidus impliqués dans l'interaction pour chaque structure et de conclure que **la structure** représentative du cluster 2 de la pose 1 et celle du cluster 1 de la pose 2 semblent représenter les modes d'interaction les plus favorables (Tableau 9).

Nous avons constaté que quatre résidus, parmi les treize identifiés comme fortement perturbés par l'étude RMN, ont une contribution énergétique importante dans le cluster 2 de la pose 1. Trois autres résidus moyennement perturbés semblent également contribuer à cette interaction. Pour le cluster 1 de la pose 2, seulement deux résidus identifiés par l'étude RMN ont une contribution énergétique importante.

(Energie superieure a 1 Kcal.mol ⁻¹)									
P	ose1 cluster 2	Pose 2 cluster 1							
Résidus	Résidus Énergie d'interaction		Énergie d'interaction						
	[kcal.mol ⁻¹]		[kcal.mol ⁻¹]						
Lys234	-10,02	Met231	-7,30						
Met231	-5,08	Leu235	-3,97						
Thr266	-3,24	Lys234	-3,69						
His224	-2,82	Val249	-2,36						
Phe270	-2,82	Ala227	-2,26						
Arg263	-2,39	Val253	-2,11						
Ala227	-2,31	Met250	-1,86						
Phe228	-2,09	Gly230	-1,41						
Val253	-2,01								
Met250	-1,31								
Leu267	-1.08	Ì							

Tableau 9. Les résidus de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ qui interagissent avec la Pyridoclax (Énergie supérieure à 1 kcal mol⁻¹)

Les résidus moyennement perturbés lors de l'étude RMN sont en vert, et ceux fortement perturbés sont en rouge

Par ailleurs, dans la structure représentative du cluster 2 de la pose 1, l'azote de l'une des pyridines terminales du Pyridoclax établit un contact électrostatique avec le résidu K234. Ce contact est absent dans la pose représentative du cluster 1 de la pose 2. Or, l'étude de SAR réalisé sur les membres de la famille du Pyridoclax a montré que le remplacement des pyridines terminales par des phénols supprime l'activité pro-apoptotique de ce composé.[9] **Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus est donc en faveur de la pose représentative du cluster 2 de la pose 1**.

4. Conclusion

L'étude de l'interaction du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par RMN, a montré que les résidus de la poche hydrophobe P2 étaient tous perturbés par l'ajout du Pyridoclax suggérant que **la poche P2 de la protéine MCL-1**¹⁷²⁻³²⁷ **est le centre du site d'interaction du Pyridoclax**. D'autres résidus localisés loin de la poche P2 ont été également identifiés comme « hotspots ». La taille du Pyridoclax ne lui permettant pas d'occuper toute la surface perturbée, **cela suggère que la perturbation de ces résidus n'est pas liée à un contact direct avec le ligand**. En outre, la mesure des paramètres de relaxation a permis de révéler des modifications de dynamique pour certains résidus, au niveau du site d'interaction et également au niveau des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 4$, ces

deux hélices étant connues pour leur mobilité importante. L'hélice α 4 en particulier est connue pour adapter sa structure pour mieux recevoir le ligand.

Les données obtenues par l'étude RMN ont été utilisées pour réaliser un Docking sous contraintes RMN du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, puis des simulations dynamiques ont été menées **pour définir la structure la plus favorable du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax, du point de vue énergétique**. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis de caractériser le complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax dont la structure la plus probable est représentée ci-dessous (Figure 60).



Figure 60. Structure représentative du complexe MCL-1172-327 : Pyridoclax

Chapitre II. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et des fragments dérivés du Pyridoclax

Le très faible solubilité du Pyridoclax dans le milieu utilisé (PBS/DMSO) n'a pas permis l'étude complète du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax par RMN ; aucun « epitope mapping » n'a pu être réalisé. Pour pallier ce problème, nous avons considéré trois fragments plus petits, issus de la structure du Pyridoclax et solubles en milieu aqueux (PBS à pH 7). Ces fragments conservent la pyridine portant le groupement styryle et une pyridine terminale avec des fonctionnalisations différentes. Ces fragments ont été définis et synthétisés dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs des IPPs à partir des fragments spécifiques des sites d'interaction. (Thèse de C. Denis)



Figure 61. Structure du Pyridoclax et de trois fragments dérivés du Pyridoclax

Ainsi, dans le but de s'affranchir de l'effet du DMSO, de confirmer et de préciser les résultats obtenus pour le Pyridoclax, une caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et ces trois fragments a été réalisée, en utilisant à la fois des méthodes **basées sur l'observation des signaux des ligands** et des méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine

1. Caractérisation structurale des fragments

Les trois fragments choisis (Figure 61) ont été caractérisés au moyen des expériences RMN classiques 1D et 2D (¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY).

La Figure 62 montre les spectres RMN 1D ¹H des fragments avec l'attribution de chaque signal.

L'étude conformationnelle à l'aide des spectres 2D ¹H-¹H NOESY a mis en évidence la conformation non plane de ces fragments. Les distances entre les différents protons sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Les distances entre les différents protons pour les trois fragments								
Couples	MR-34911	MR-34916	MR-34917					
d'atomes	r(Å)	r(Å)	r(Å)					
D_5/C_3	2,4	2,6	2,4					
D_5/C_5	2,5	2,6	2,1					
D_{3}/C_{5}	2,5	2,6	2,4					
D ₃ / C ₃	2,5	2,6	2,2					
D_2/D_3	2,3	2,7	1,8					
C ₃ /10	/	/	1,7					
C ₃ /11	2,0	2,2	1,7					
B ₅ /10	/	3,0	/					
B ₃ /10	/	3,0	/					
10/13-17	/	2,2	/					
11/13-17	/	2,5	/					
17/10-11	/	/	1,7					
13/10-11	/	/	1,0					
17/E ₁	/	/	1,8					

r(Å), estimé à partir de l'intégration de tâches de corrélation sur les cartes NOESY. Réf : $r_{D1-D2} = 2,3$ Å



Figure 62. Expansion de la zone aromatique des spectres RMN 1D ¹H des trois fragments Attribution des signaux grâce aux corrélations observées sur les cartes 2D présentées en annexe VI Les NOEs observés sur les cartes NOESY sont représentés par des flèches bleues sur la structure de chaque fragment et les « flips » entre les pyridines par des flèches rouges. (PBS/D₂O – pH 7, 298 K, 600 MHz)

2. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et les différents fragments par RMN

2.1. Méthodes basées sur l'observation des signaux du ligand

2.1.1. L'effet de l'interaction sur les spectres 1D ¹H des ligands

Les spectres 1D ¹H des différents fragments, en absence et en présence de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non marquée, en solution dans un tampon PBS (pH 7) ont été enregistrés (Figure 63). Les déplacements chimiques des protons des trois fragments, avant et après l'ajout de la protéine, sont reportés dans le Tableau 11.

MR-34911				MR-34916			MR-34917				
Protons	δ (ppm) sans protéine	δ (ppm) avec protéine	Δδ (ppm)	Protons	δ (ppm) sans protéine	δ (ppm) avec protéine	Δδ (ppm)	Protons	δ (ppm) sans protéine	δ (ppm) avec protéine	Δδ (ppm)
D ₅	8,80	8,80	0,00	D ₅	8,79	8,78	0,01	D ₅	8,82	8,81	0,01
C5	8,56	8,55	0,00	C5	8,70	8,70	0,00	C5	8,57	8,57	0,00
D ₁	8,54	8,54	0,00	B5	8,67	8,66	0,01	D1	8,54	8,53	0,01
C ₃	8,36	8,35	0,01	D ₁	8,52	8,51	0,01	C ₃	8,42	8,39	0,03
D3	8,14	8,13	0,01	C ₃	8,35	8,33	0,02	D ₃	8,16	8,14	0,02
13/17	7,59	7,58	0,01	D ₃	8,11	8,10	0,01	17	7,98	7,94	0,04
D_2	7,55	7,55	0,00	B ₂	8,02	8,00	0,02	E_2/E_3	7,89	7,86	0,03
14/16	7,40	7,39	0,01	B3	7,95	7,94	0,01	14	7,86	7,82	0,04
11/10	7,33	7,33	0,00	D ₂	7,53	7,51	0,02	13	7,81	7,78	0,03
15	7,33	7,32	0,01	13/17	7,38	7,35	0,03	D_2	7,56	7,54	0,02
10/11	7,29	7,28	0,01	15	7,31	7,28	0,03	E_1/E_4	7,49	7,45	0,04
				14/16	7,27	7,23	0,04	11/10	7,47	7,45	0,02
				11	7,21	7,18	0,03				
				10	6,95	6,94	0,01				

 Tableau 11. Variations de déplacements chimiques des différents protons des trois fragments après l'ajout de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non marquée

Les protons en gras sont ceux significativement perturbés par l'ajout de la protéine

La comparaison des spectres 1D ¹H du MR-34911 enregistrés, en absence puis en présence de la protéine, a permis de montrer que l'ajout de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non marquée à la solution du fragment entraîne de très faibles perturbations de déplacements chimiques ($\leq 0,01$ ppm) de certains protons tels que les protons du groupement styryle (Figure 63A et Tableau 11). Cela reflète l'implication de ce groupement dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.




Pour le MR-34916, des variations de déplacements chimiques particulièrement importantes (entre 0,03 et 0,04 ppm) ont été observées pour les protons du groupement styryle (Figure 63B et Tableau 11). Les déplacements chimiques des autres protons ne sont que peu perturbés après l'ajout de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Cette observation est en faveur, encore une fois, de l'implication importante du groupement styryle dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Pour le MR-34917, les valeurs des variations de déplacements chimiques sont importantes (entre 0,03 et 0,04 ppm) pour les protons du groupement naphtyle (13, 14, 17, E_1 , E_2 , E_3 et E_4). Cela suggère que ce groupement est le plus impliqué dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

En outre, un élargissement de certains signaux des deux fragments MR-34916 et MR-34917 a été observé après l'ajout de la protéine. La largeur des raies à mi-hauteur étant inversement proportionnelle à la valeur du temps de relaxation transversale T₂ ($\Delta \upsilon \sim \frac{1}{T_2}$), cet élargissement des raies traduit une modification de la mobilité du fragment, qui, en raison de son interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ adopte le régime de mobilité (et de relaxation) de cette protéine.

La différence de l'amplitude des variations de déplacements chimiques des protons des trois fragments ainsi que l'élargissement des raies de certains signaux peuvent refléter la force de l'interaction ; les protons du fragment 1 sont moins affectés que ceux des fragments 2 et 3. Il semble donc que le fragment 1 ait moins d'affinité pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ que les fragments 2 et 3. Cette différence d'affinité peut s'expliquer par la présence de la troisième pyridine (pour le MR-34916) et du groupement naphtyle (pour le MR-34917). Ces deux groupements semblent fournir des points d'ancrage supplémentaires, favorisant ainsi leur interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

2.1.2. Expériences STD

Afin de s'assurer que ces fragments interagissent bien spécifiquement avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, des expériences STD ont été enregistrées. Les spectres STD obtenus pour les fragments 1, 2 et 3 sont présentés en Figure 64. La présence des signaux sur ces spectres a permis de confirmer la présence d'une interaction entre les trois fragments et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

a. Fragment 1 (MR-34911)

Tous les protons du fragment 1 présentent un signal sur le spectre STD. Toutefois, l'intensité des différents signaux diffèrent en fonction de la proximité des protons correspondant avec les protons de la protéine. Cela indique que l'interaction se fait selon un mode préférentiel.[206]



Figure 64. Superposition des spectres off-résonance (en bleu) avec les spectres STD (en rouge) pour chaque fragment en présence de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

La réponse STD a été quantifiée en calculant les facteurs d'amplification (STD-_{AF}) pour réaliser l' « epitope mapping » représenté sur la structure de chaque fragment. (Ratio 1:100, PBS – pH7, 298 K, 600 MHz)

Pour déterminer quels sont les protons du fragment 1 (MR-34911) les plus impliqués dans l'interaction, une normalisation à 1 (ou 100 %) est appliquée aux protons dont la valeur du STD_{AF} (équation 20) est la plus importante (protons 14 et 16 du styryle). Le pourcentage d'implication des autres protons a été calculé en se référant aux intensités des signaux protons normalisés à 1.

Le recouvrement spectral dans la zone entre (7,25 et 7,36 ppm), dans laquelle résonnent le proton 15 du styryle et les deux protons éthyléniques 10 et 11, rend difficile la quantification de l'effet STD pour ces protons. Par conséquent, pour calculer l'intensité relative STD_{AF} (équation (20)) pour chaque proton, nous avons considéré que :

i. Le proton 15 répondait de la même manière que ses voisins (protons 14 et 16)

ii. Les deux protons 10 et 11 étaient impliqués de la même manière dans l'interaction.

La Figure 64A montre les résultats de l'« epitope mapping » pour le fragment MR-34911 en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Pour ce fragment, l'interaction se fait principalement par le groupement styryle (100 %), les protons C_5 et D_5 semble être les plus exposés au solvant avec de faibles pourcentage d'implication de 34 % et 39 %, respectivement.

b. Fragment 2 (MR-34916)

Dans le cas de l'interaction du fragment 2 avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, il n'a pas été possible de réaliser un « epitope mapping » bien détaillé car le rapport signal sur bruit du spectre STD était très faible. Toutefois, malgré la faible réponse STD, il apparait que le groupement styryle est la partie la plus impliquée dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 64B).

c. Fragment 3 (MR-34917)

Pour le fragment 3, la superposition et la normalisation du spectre STD avec le spectre de référence a montré que les signaux des protons du groupement naphtyle (E₁-E₄, E₂-E₃, 13, 14 et 17) sur le spectre STD présentent des intensités relatives maximales (de 70 à 100 %). Cela indique que ces protons sont les plus proches des protons de la protéine et donc les plus impliqués dans l'interaction avec la protéine. Les intensités relatives des autres protons varient de 22 % pour le proton C₅ à 68 % pour le proton D₁. Les protons C₅ et D₅ présentent les plus faibles intensités relatives de 22 % et 45 % respectivement, suggérant que ces deux protons sont moins impliqués dans l'interaction (Figure 64C).

En conclusion, les expériences STD supposent une orientation similaire du motif commun du type styryle ou naphtyle des trois fragments dans le site d'interaction ; les protons de ces derniers sont les plus impliqués dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Les orientations des cycles C et D pour les 2 fragments 1 et 3 sont de tel sorte que les protons C₅ et D₅ soient les moins impliqués dans l'interaction pour les deux fragments. Pour confirmer l'importance des groupements styryle et naphtyle, portés par les pyridines C, dans l'interaction des fragments (1, 2 et 3) avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, nous avons utilisé un quatrième fragment (MR-34939) dépourvu de ces groupements pour enregistrer une expérience STD.



Figure 65. Superposition des spectres off-résonance (en bleu) et STD (en rouge) du fragment 4 (MR-34939) obtenus en présence de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. (Ratio 1 : 100, PBS – pH7, 298 K, 600 MHz)

L'absence du signal sur le spectre STD (Figure 65) obtenu pour le fragment 4 indique l'absence d'une interaction entre ce fragment et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. **Ce résultat met en évidence le rôle crucial des groupements (styryle et naphtyle) portés par la pyridine C dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.** Il confirme ainsi les conclusions issues du Docking du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

2.2. Méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine

2.2.1. Identification des sites d'interaction des fragments

Pour tous les fragments, des expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC ont été enregistrées pour cartographier les variations de déplacements chimiques des résidus de la protéine suite à l'interaction.

a. Fragment 1 (MR-34911)

La superposition des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ en absence puis en présence du fragment 1 (MR-34911) est présentée dans la Figure 66. La comparaison des deux spectres obtenus montre que les déplacements chimiques de certains pics ont été modifiés.



Figure 66. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absence (bleu) puis en présence du fragment 1 (MR-34911) ([¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷] = 50 μM, [MR-34911] = 1mM, PBS - pH7, 298 K, 600 MHz)

Pour chaque résidu de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, la variation de déplacements chimiques combinés du proton et azote de la fonction amide est indiquée sur l'histogramme (Figure 67A). Les résidus possédant une valeur de CCSP supérieur à 0,054 ppm (valeur seuil définie égale à deux fois la déviation standard de l'ensemble des valeurs des CCSP) sont représentés en rouge et annotés. Les principaux résidus impliqués dans l'interaction, dans l'ordre décroissant de la variation observée pour chaque résidu, sont : Gly257, Val265, Leu267, Lys302, Met250, Val243, Ile237, Leu235, Thr301, His224, Phe270, Val216, His252, Arg215, Gly271, Val253, Arg263, Gly219 et Arg184.



Figure 67. Identification du site d'interaction du fragment 1 (MR-34911) sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Histogramme des variations de déplacements chimiques combinés des protons et des azotes des fonctions amides la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine après l'ajout du fragment 1. Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les Prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel. B. Cartographie des résidus fortement perturbés (2*STDEVA) sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine.

Comme on peut le voir sur la Figure 67B, les résidus affectés forment une zone de contact principalement sur une seule face de la protéine. L'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le fragment 1 semble donc être spécifique.

Tous les résidus de la poche hydrophobe P2 sont perturbés (Met250, Leu267, Phe270 et Val253). Quelques résidus des poches P1, P3 et P4 sont également affectés (P1 : Leu235, P3 : His224, P4 : Val216, Val265). Enfin, d'autres résidus perturbés sont localisés autour des poches hydrophobes, tels que : Arg215 et Gly219 (autour de la poche P4). Leur perturbation peut être liée à un effet indirect de l'interaction comme pour le Pyridoclax. Les résidus Gly257 et Ile237 sont situés au niveau des boucles non structurées entre les hélices α 3- α 4 et α 4- α 5, respectivement. Les résidus Thr301 et Lys302 se trouvent au niveau d'une zone de torsion entre les hélices $\alpha 6-\alpha 7$. La perturbation de ces résidus peut être expliquée par la haute flexibilité de ces segments de la protéine. Le résidu Arg263, conservé dans la famille des protéine BCL-2, est également perturbé. Ce résidu chargé, localisé sur la partie supérieure de la poche P3, joue un rôle très important dans l'interaction de la protéine MCL-1 avec ses partenaires naturels.

A partir de ces résultats, nous avons montré que l'addition du fragment 1 entraîne la perturbation des résidus situés principalement au niveau et autour des poches hydrophobes de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, en particulier la poche P2 au niveau du site d'interaction connu de la protéine. Les résidus des autres poches sont également perturbés mais vue la taille du fragment, il semble impossible que ce dernier puisse occuper plusieurs poches à la fois. La perturbation des résidus de la poche P4, éloignée de la poche P2, doit donc être liée à un effet indirect de l'interaction.

b. Fragment 2 (MR-34916)

La Figure 68 montre la superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ enregistrés en absence puis en présence du fragment 2.



Figure 68. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absence (bleu) puis en présence du fragment 2 (MR-34916)
 ([¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷] = 50 μM, [MR-34916] = 1mM, PBS - pH7, 298 K, 600 MHz)

Le calcul des variations de déplacements chimiques des protons et des azotes des fonctions amides de tous les résidus de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a permis de tracer l'histogramme de la Figure 69A.



Figure 69. Identification du site d'interaction du fragment 2 (MR-34916) sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Histogramme des variations de déplacements chimiques combinés des protons et des azotes des fonctions amides la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine après l'ajout du fragment 2. Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel. B. Cartographie des résidus fortement perturbés (2*STDEVA) sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine.

L'analyse détaillée de l'histogramme a permis d'identifier les résidus suivants comme étant les plus perturbés par cette interaction : Arg215, Gly219, Leu267, His252, Thr266, Lys302, Val243, Val216, Thr301, Val253, Ile264, Phe270, Ile268, Ser255, Glu221, Arg248, Leu235, Ser269 et His224 dans l'ordre décroissant des variations observées.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour le fragment 1 montre que douze des résidus les plus perturbés en présence du fragment 2 (Arg215, Gly219, Leu267, His252, Lys302, Val243, Val216, Thr301, Val253, Phe270, Leu235 et His224) l'étaient également en présence du fragment 1. Les résidus Thr266, Ile268, et Ser269 sont localisés au niveau et autour de la poche hydrophobe P3. Cela indique qu'en plus de la poche hydrophobe P2, le fragment 2 qui possède un cycle pyridine de plus que le fragment 1, se lie également à la poche P3.

Enfin, les valeurs des CCSP mesurées pour le fragment 2 sont plus importantes que pour le fragment 1, par exemple : pour le résidu Leu267, la valeur de CCSP obtenue en présence du fragment 1 est de 0,099 ppm, alors que celle obtenue en présence du fragment 2 est de 0,197 ppm. Cette différence est en faveur d'une plus grande affinité du fragment 2 pour la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ comparé au fragment 1.

c. Fragment 3 (MR-34917)

La même méthode a été adoptée pour caractériser l'interaction entre le fragment 3 et la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. La superposition des deux spectres obtenus est présentée dans Figure 70.



Figure 70. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absence (bleu) puis en présence du fragment 3 (MR-34917) ([¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷] = 50 μM, [MR-34917] = 1mM, PBS - pH7, 298 K, 600 MHz)

L'histogramme obtenu après la comparaison des deux cartes et le calcul des CCSP (Figure 71) montre que les résidus perturbés par la présence du fragment 3 sont les suivants : Val243, Gln221, Ser206, Val216, Val253, Asp218, Leu235, Asp236, Ile264, Met250, Ser255, Arg263, Ser247, Thr266, His252, Ile237, Phe270, Val220, Gly219, Thr205, Lys234, Ile268, Met231, His224 et Ile251, dans l'ordre décroissant des valeurs des CCSP. L'ensemble des résidus forme une surface de contact bien continue au niveau du domaine BH3 de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 72). Dix de ces résidus sont localisés au niveau des poches hydrophobes P1 (Lys234, Leu235, Me231), P2 (Met250, Phe270, Val253), P3 (His224, Thr266) et P4 (Val216, Val220). Les résidus Val243, Gln221, Ser206, Asp218, Ser255, Ser247, His252, Gly219, Thr205 et Ile251 sont situés au niveau des deux hélices très dynamiques α 2 et α 4. Leur perturbation est probablement liée à une légère fluctuation conformationnelle de ces hélices en présence du fragment 3.





La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les fragments 1 et 2 montre que parmi les 24 « hotspots » identifiés dans le cas du fragment 3, huit ont été déjà définis comme « hotspots » dans le cas des fragments 1 et 2. Ces résidus (Val216, Gly219, His224, Leu235, Val243, His252, Val253 et Phe270) sont situés principalement au niveau des poches hydrophobes (P1, P2, P3 et P4), ce qui reflète un mode d'interaction commun entre les trois fragments.



Figure 72. Cartographie des résidus fortement perturbés (2*STDEVA) par l'ajout du fragment 3 (MR-34917), sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine

En conclusion, nous avons montré que l'ajout des 3 fragments entraîne la perturbation des atomes N et H^N de nombreux résidus. Cette perturbation reflète soit un contact direct entre les trois fragments et le résidu de la protéine auquel appartienne ces atomes N et H^N (résidus de l'hélice α 5), soit à un effet indirect (résidus des hélices α 2 et α 4) lié à une fluctuation conformationnelle au moment de l'interaction.

Nous avons également observé que les résidus perturbés forment des zones de contact continues, localisées principalement au niveau du site d'interaction connu de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

L'ensemble de ces résultats sont en accord et confortent ceux obtenus pour le Pyridoclax.

2.2.2. Mesure de l'affinité des fragments pour la protéine MCL-1 – estimation des valeurs des K_D

Pour chaque fragment, des résidus situés au niveau du site d'interaction ont été choisis pour estimer la valeur de K_D . Des exemples de spectres obtenus et des courbes de titration correspondantes sont présentés en Figure 73.



Figure 73. Estimation des constantes d'affinité des trois fragments pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ Zooms sur les régions des résidus fortement perturbés par l'ajout des fragments 1, 2 et 3 (à gauche). Détermination des constantes de dissociation par l'ajustement des courbes de variations de déplacements chimique en ¹H et ¹⁵N du squelette peptidique, en fonction de la concentration relative du ligand par rapport à la concentration de la protéine, avec un modèle d'interaction d'une stœchiométrie 1:1

Les valeurs moyennes des K_D obtenues sont de 1 mM pour le fragment 1, 536 μ M pour le fragment 2 et 246 μ M pour le fragment 3. Ces résultats montrent que le fragment 3 a l'affinité la plus importante pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, probablement grâce à une meilleure occupation du site d'interaction par le groupement naphtyle.

2.2.3. Estimation des k_{off} et des temps de résidence (τ) pour les trois fragments

Pour chaque fragment, nous avons utilisé le logiciel TITAN[204] pour analyser les formes de raies sur l'ensemble des spectres 2D 1 H- 15 N HSQC enregistrés lors de la titration. Nous avons utilisé un modèle d'interaction à deux états afin de confirmer les valeurs de K_D et d'estimer les valeurs de k_{off} et de temps de résidence (τ) pour chaque fragment dans son site d'interaction. Les valeurs obtenues pour chaque fragment sont reportées dans le Tableau 12. Nous observons un accord entre les valeurs de K_D obtenues par l'ajustement des courbes des variations des CCSP en fonction de la concentration des fragments et les valeurs obtenues par TITAN.

Partie 3 -	CHAPITRE II : CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTEINE
	MCL-1 ET DES FRAGMENTS DERIVES DU PYRIDOCLAX

Ligand	K _D (μM) (CCSP)	K _D (μM) (TITAN)	k _{off} (s ⁻¹)	τ (ms)
Pyridoclax	≈ 15	≈29	≈208	≈4,8
1 (MR-34911)	≈ 1000	≈879	≈1178	≈ 0,8
2 (MR-34916)	≈ 536	≈423	≈2613	≈ 0,4
3 (MR-34917)	≈ 246	≈107	≈438	≈ 2

Tableau 12. Valeurs des K_D, k_{off} et τ pour les trois fragments, estimées par le logiciel TITAN

Ces résultats, comparés à ceux obtenus pour le Pyridoclax, montrent une affinité décroissante pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ dans l'ordre suivant : Pyridoclax > fragment 3 > fragment 2 > fragment 1. La modulation de l'affinité observée est due d'une part à la longueur de chaîne (nombre de pyridine dans la chaîne) et d'autre part à la taille du groupement porté par la pyridine C (groupement styryle pour les fragments 1 et 2 ou naphtyle pour le fragment 3). Pour les molécules portant un groupement styryle sur la pyridine C (Pyridoclax, fragments 1 et 2), plus la longueur de la chaîne est importante meilleure est l'affinité. Dans le cas du Pyridoclax, la longueur de la chaîne, plus importante que celle des fragments 1 et 2, permet de mieux mimer le domaine BH3 structuré en hélice α et d'ajouter des points d'ancrage supplémentaires, lui conférant ainsi une meilleure affinité que les fragments. Ainsi, le rôle important de la pyridine terminale et du groupement méthyle du Pyridoclax est mis en évidence.

Par ailleurs, les structures des fragments 1 et 3 possèdent la même chaîne mais diffèrent par le groupement porté par la pyridine C : groupement naphtyle pour le fragment 3 et styryle pour le fragment 1. La différence d'affinité mesurée pour les deux fragments est due à cette différence structurale et peut s'expliquer par une meilleure occupation du site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le groupement naphtyle dans le cas du fragment 3.

3. Docking sous contraintes RMN

Les données expérimentales obtenues par RMN ont ensuite été exploitées par la modélisation moléculaire. Un Docking sous contraintes RMN a été réalisé, au moyen du logiciel Autodock Vina [184], afin d'obtenir des modèles des complexes de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et les différents fragments. Nous avons utilisé la cartographie des « hotspots » déterminés par RMN pour définir une boîte de Docking englobant tous les résidus perturbés.

La structure reconstruite de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Voir Partie 5 -4) et les structures des fragments générées par MolView [207] et minimisées par le serveur PRODRG[208], ont été utilisées comme structures de départ. Pour chaque fragment nous avons obtenu neuf poses possibles, classées en

fonction de leur énergie d'interaction. Dans la suite, je ne présenterai pour chaque fragment que les meilleures poses obtenues du point de vue énergétique.

a. Fragment 1 (MR-34911)

A l'aide du serveur PLIP [209], nous avons analysé les interactions mises en place entre les résidus de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le fragment 1 dans les trois meilleures poses obtenues par le Docking (Figure 74). Ces interactions sont résumées dans le Tableau 13.

Dans les poses 1 et 3, le groupement styryle occupe les poches P2 et P3 avec des orientations différentes. En revanche, dans la pose 2, la poche P2 est occupée par la pyridine D. Dans les trois poses, les interactions observées sont majoritairement de nature hydrophobe. Le Tableau 13 récapitule les principaux contacts établis entre les différents résidus de la protéine et les différents groupements du fragment 1.



Figure 74. Analyse des interactions entre le MR-34911 et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ dans les trois meilleures poses issues du Docking sous contraintes RMN Pose 1 (-7,3 kcal.mol⁻¹), Pose 2 (-7,0 kcal.mol⁻¹) et Pose 3 (-7,0 kcal.mol⁻¹)

	Interactions Hydrophobes		Liaisons hyd	lrogène	Interactions cation- π Po		Pon	onts salins	
	L	Р	L	Р	L	Р	L	Р	
Pose 1	Styryle	V253, F254, T266, L267, F270	A.C	V253 (f.a)	Pyridine C	R263 (c.l)	А. С.	R263 (c.l)	
	Pyridine D	R263 (c.l)	Pyridine D (N)	D260 (c.l)					
	Styryle	A227	A. C	T266 (c.l)			A. C.	R263 (c.l)	
2	Pyridine C	T266 (c.l)	Pyridine C (N)	R263 (c.l)					
Pose	Pyridine D	V253, M250, F254, L267							
	Styryle	L267,	Pyridine C (N)	H224 (c.l)			A. C.	H224 (c.l)	
		F270,							
se 3		M250, V253							
Pos		F254							
	Pyridine C	T266 (c.l)							
	Pyridine D	R263 (c.l)							

Tableau 13. Principales interactions	observées dans les trois p	oses du fragments	1 en interaction avec la
	protéine MCL-1172-32	27	

L = Ligand. P = Protéine. (c.l) = chaîne latérale. (N)=azote. (f.a) = fonction amide. A. C. = acide carboxylique. Les « hotspots » définis par RMN sont en rouge.

L'analyse des contacts présents dans les différentes poses montre que dans le cas de la pose 2, le groupement styryle établit peu de contacts avec les résidus du site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Cette observation est en total désaccord avec les résultats de l'expérience STD. En effet, l'expérience STD a montré que le groupement styryle est impliqué à 100 % dans l'interaction du fragments 1 avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Cette pose est donc éliminée.

Pour les deux poses 1 et 3, des énergies d'interaction similaires et des contacts avec les « hotspots » définis par RMN n'ont pas permis, de définir la pose la plus favorable. En revanche, l'alignement de ces deux poses avec la structure du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax (Figure 74A) est en faveur de la pose 3 (Figure 75C). En effet, dans les deux poses 1 et 3, le groupement styryle occupe la poche P2 avec des orientations légèrement différentes, mais seule la pose 3 montre une orientation des deux pyridines du fragment MR-34911 proche de celle observée pour le Pyridoclax.



Figure 75. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du fragment 1 dans le site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
 A. Pyridoclax (pose 1 cluster 2). B. Pose 1 du fragment 1. C. Pose 3 du fragment 1

b. Fragment 2 (MR-34916)

Les deux premières poses issues du Docking du fragment 2 avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ se distinguent par une meilleure énergie d'interaction. Nous avons donc analysé les interactions observées dans chaque pose à l'aide du serveur PLIP [209] (Figure 76 et Tableau 14).



Figure 76. Analyse des interactions entre le MR-34916 et la protéine MCL-11⁷²⁻³²⁷ dans les deux meilleures poses issues du Docking sous contraintes RMN. Pose 1 (-8,0 kcla.mol⁻¹) pose 2 (-7,9 kcal.mol⁻¹)

	Interactions Hydrophobes		Liaisons hyd	lrogène	Interaction	s cation- π
	L	Р	L	Р	L	Р
ose 1	Styryle	L267, F254, V253	A.C	M231 (c.l)		
$\mathbf{P}_{\mathbf{C}}$	Pyridine C	T266 (c.l)	Pyridine C (N)	H224 (c.l)		
	Pyridine B	R263 (c.l)	Pyridine B (N)	T266 (c.l)		
	Styryle	A227, M231	Pyridine B(N)	R263 (c.l)	Pyridine C	R263 (c.l)
7	Pyridine B	R263 (c.l)				
ose	Pyridine C	T266				
Р	Pyridine D	V253,				
		F254,				
		L267				

Tableau 14. Principales interactions observées dans les trois poses du fragments 2 en interaction avec la protéine MCL-1172-327

L = Ligand. P = Protéine. (c.l) = chaîne latérale. (N)=azote. A. C. = acide carboxylique. Les « hotspots » définis par RMN sont en rouge.

La poche hydrophobe P2 est occupée par le groupement styryle dans la pose 1 et par la Pyridine D dans la pose 2. Les contacts présents dans les deux poses, comparés avec les observations expérimentales obtenues par RMN sont en faveur de la pose 1. En effet, l'expérience STD a montré que le groupement styryle a une implication plus importante (100 %) dans l'interaction du fragment 2 avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ que les pyridines. De plus, la pose 2 est analogue à la pose 3 issue du Docking du Pyridoclax avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ sous contraintes RMN, qui avait été éliminée lors des simulations dynamiques (Voir Partie 3 -3) Enfin, l'alignement des deux poses avec la structure du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax obtenue précédemment a montré un accord entre l'orientation du fragment 2 dans la pose 1 et l'orientation du Pyridoclax (Figure 77).



Figure 77. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du fragment 2 dans le site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
 A. Pyridoclax (pose 1 cluster 2). B. Pose 1 du fragment 2. C. Pose 2 du fragment 2

c. Fragment 3 (MR-34917)

La comparaison des trois meilleures poses du fragment 3 obtenues par le Docking (Figure 78) et les principales interactions observées dans ces trois poses (Tableau 15) montre que le

groupement naphtyle occupe toujours la poche P2, avec une position plus profonde dans la poche pour la pose 1.

Le groupement naphtyle dans les poses 1 et 3 établit de nombreux contacts avec les résidus de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, en accord avec le résultat de l'expérience STD. Dans les poses (1 et 3), quatre « hotspots » issus de la RMN établissent des interactions avec le MR-34917, contre trois dans la pose 2. L'orientation des pyridines est similaire dans les poses 2 et 3 et diffère de celle observée dans la pose 1.



Figure 78. Analyse des interactions entre le MR-34917 et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ dans les deux meilleures poses issues du Docking sous contraintes RMN. Pose 1 (-8,2 kcal.mol⁻¹), Pose 2 (-8,0 kcal.mol⁻¹) et Pose 3 (-7,9 kcal.mol⁻¹)

	Interactions		Interactions Liaisons hydrogène		Interactions cation- π		Ponts salins	
	Hydrop	ohobes						
	L	Р	L	Р	L	Р	L	Р
	Naphtyle	F228,	Pyridine C	R263 (c.l)	Pyridine C	R263 (c.l)	A. C.	R263 (c.l)
1		F270,			-			
se		M250,						
Po		V253						
, .	Pyridine D	R260 (c.l)	Pyridine D (N)	D260 (c.l)				
	5	· · /	, , ,	· · ·				
~	Naphtyle	V253,	A. C	T266 (c.l)			A. C.	H224 (c.l)
e j		F254,						
06		Leu267						
1	Pyridine D	V258 (c.l)	Pyridine D (N)	D260 (c.l)				
	Naphtyle	T266,	Pyridine D (N)	V258(f.a),			A. C.	H224 (c.l)
3		V253,		D260(c.l)				
se		F254,		~ /				
$\mathbf{P}_{\mathbf{O}}$		L267						
	Pyridine C	R263 (c.l)	A. C	T266 (c.l)				

Tableau 15. Principales interaction	s observées dans les trois poses	du fragments 3 en interaction avec la
	protéine MCL-1172-327	

L = Ligand. P = Protéine. (c.l) = chaîne latérale. (N)=azote. (f.a) = fonction amide. A. C. = acide carboxylique. Les « hotspots » définis par RMN sont en rouge.

Enfin, la comparaison des trois structures avec le modèle MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ :Pyridoclax (Figure 79A) montre que les orientations des deux pyridines du fragment 3 dans les poses 2 et 3 (Figure 79C et D) sont très différentes à celle du Pyridoclax alors que dans la pose 1(Figure 79B), elles adoptent une orientation très proche. L'ensemble des observations est en faveur d'un modèle d'interaction MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ :fragment 3 représenté par la pose 1. Dans cette pose le groupement naphtyle a une meilleure occupation de la poche P2 comparé au groupement styryle du Pyridoclax (Figure 79).



B. C. D.

Figure 79. Comparaison de l'orientation du Pyridoclax et du fragment 3 dans le site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Pyridoclax (pose 1 cluster 2). B. Pose 1 du fragment 3. C. Pose 2 du fragment 3. D. Pose 3 du fragment 3

4. Conclusion

Dans cette partie, nous avons caractérisé l'interaction entre des fragments dérivés du Pyridoclax et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'avantage de ces fragments est leur solubilité dans le milieu utilisé, qui nous a permis de mettre en évidence l'effet de l'interaction sur les deux partenaires.

Dans un premier temps, des méthodes basées sur l'observation des signaux des ligands ont été utilisées pour caractériser ces interactions, en observant l'effet de l'interaction sur les signaux des fragments. Les spectres 1D ¹H des différents ligands ont subi des modifications après l'ajout de la protéine, telles que des variations de déplacements chimiques et des élargissements de certains signaux. Si ces variations indiquent la présence d'une interaction entre les trois fragments et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, nous **avons montré que la force d'interaction du fragment 1 est moins importante que celle des autres fragments. L'expérience STD quant à elle, a mis en évidence le rôle important des groupements styryle et naphtyle dans la présence de l'interaction.** Ce groupement avait été initialement introduit dans la structure du Pyridoclax pour mimer la chaîne latérale d'un résidu clé de Noxa (l'inhibiteur naturel sélectif de la protéine MCL-1). Ce résultat est donc en accord avec l'étude SAR réalisé préalablement par nos collègues au CERMN.[9]

Dans un deuxième temps, l'utilisation des méthodes basées sur l'observation des signaux de la protéine a permis d'identifier le site d'interaction pour chaque fragment. En revanche, les zones de contacts identifiées sont très importantes par rapport à la taille des fragments, ce qui suggère que la perturbation de tous les résidus n'est pas liée seulement à des contacts directs entre les fragments et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, mais plutôt à des fluctuations conformationnelles induites par l'interaction.

Enfin, le suivi des variations de déplacements chimiques des résidus fortement perturbés a permis d'estimer les constantes de dissociation de chaque fragment et de les classer selon leur l'affinité : les fragment 2 et 3 sont les plus affins, probablement grâce à la présence de la troisième pyridine pour le fragment 2 et le groupement naphtyle pour le fragment 3.

Pour finir, le Docking sous contraintes RMN (résidus perturbés) a permis de définir la pose la plus favorable pour chaque fragment. La comparaison entre les trois complexes MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:fragment obtenus et le complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax défini précédemment a montré une grande similarité dans l'orientation des groupements communs. **Par conséquent,** l'ensemble de ces résultats ont permis de conforter et de préciser ceux précédemment décrits pour le Pyridoclax, en appréciant l'implication de chaque groupement du Pyridoclax, dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Chapitre III. Caractérisation de l'interaction entre la protéine MCL-1 et des médicaments existants

Comme indiqué au début de ce manuscrit, l'intérêt pour le développement d'inhibiteurs de la protéine MCL-1 est en constante progression. Parmi les nombreux auteurs intéressés par ce sujet, Samson *et al.* [210] ont réalisé en 2017 une étude consistant en un criblage virtuel de deux bases de données à la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et concluant sur l'affinité de certains médicaments, déjà sur le marché, pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Samson *et al.* ont ainsi défini un certain nombre de molécules *lead-like* (ZINC database) et des médicaments (FDA-database) pouvant avoir une affinité pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Nous avons souhaité valider par l'expérience cette étude théorique. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux médicaments pouvant avoir une affinité envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Nous avons donc choisi cinq médicaments, parmi les trente cités dans le Tableau 16, afin de prouver et caractériser à l'échelle atomique leur interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'objectif ultime de notre étude est de proposer des modifications structurales pour améliorer l'affinité de ces molécules pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

Domla	Méthodes				
панк	RMN	NMA	MD		
1	Exemestane (-6,13)	Nilotinib (-7,65)	Azelastine (-6,43)		
2	Levorphanol (-6,1)	Ergotamine (-7,56)	Nebivolol (-6,30)		
3	Cyproheptadine (-6,04)	Miltefosine (-7,57)	Lenalidomide (-6,23)		
4	Dextromethorphan (-6,03)	Déférasirox (-7,53)	Dolasetron (-6,18)		
5	Epinastine (-6,01)	Lurasidone (-7,47)	Droperidol (-6,15)		
6	Lenvatinib (-6,0)	Eltrombopag (-7,38)	Torsemide (-6,13)		
7	Sibutramine (-5,99)	Paliperidone (-7,35)	Mazindol (-6,13)		
8	Oxcarbazepine (-5,99)	Adapalene (-7,35)	Déférasirox (-6,03)		
9	Mirtazapine (-5,99)	Cabergoline (-7,23)	Thalidomide (-6,03)		
10	Darifenacin (-5,98)	Risperidone (-7,22)	Trazodone (-6,00)		

Tableau 16. Énergies d'interaction des médicaments avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (kcal.mol-1) (extrait de la réf [210])

NMA : Normal Mode Analysis. MD : Molecular Dynamics

1. Choix des molécules à étudier

Le choix des cinq molécules suivantes (Oxcarbazépine, Déférasirox, Rispéridone, Lénalidomide et Torsémide) (Figure 80) a été basé principalement sur :

- i. Leur énergie d'interaction.
- ii. Leur solubilité en milieux aqueux d'après la base de données « Drug Bank ».
- iii. La volonté d'avoir une molécule de chaque groupe (NMR, NMA et MD).



Figure 80. Les structures des cinq médicaments choisis.

L'Oxcarbazépine, est un composé tricyclique à activité histaminergique et sérotoninergique, utilisé pour contrôler la douleur, la dépression et également comme un antiémétique chez les cancéreux.

La Rispéridone, est un antipsychotique atypique à activité sérotoninergique et dopaminergique.

Le Lénalidomide, est un analogue structural du dérivé de la rhodamine, BH3I, développé par Degterev *et al.* [211]. La molécule BH3I a une affinité de l'ordre du micromolaire pour le domaine BH3 de la protéine MCL-1. Le Lénalidomide est déjà associé au traitement du cancer : il induit l'apoptose et il est utilisé dans le traitement du myélome multiple et des syndromes myélodysplasiques.

Le Torsémide, est un diurétique de type pyridine-sulfonylurée principalement utilisé dans la prise en charge des œdèmes associés à l'insuffisance cardiaque congestive. Il est intéressant de noter que le Torsémide présente des similitudes structurales avec l'ABT-737, en particulier dans la fraction benzyl-sulfonyl-amide.

Enfin, le Déférasirox, ne semble pas être associé aux traitements des cancers ni à la pharmacologie de la dopamine/sérotonine. Il s'agit d'un chélateur du fer administré par voie orale et utilisé pour réduire la surcharge chronique en fer.

2. Docking à l'aveugle des médicaments avec la protéine MCL-1

Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire l'étude de Docking de Samson *et al.* [210]. En utilisant le logiciel Autodock Vina [184], le site d'interaction à la surface de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ a été défini par une boîte de 16, 18 et 20 Å. Les coordonnées du centre de la boîte de Docking sur les axes X, Y et Z sont (-2,2), (-19,8) et (2,9), respectivement. Selon les auteurs, cette boîte englobe bien les poches P1, P2, P3 et P4 du domaine BH3 de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ (Figure 81).



Figure 81. La boîte utilisée pour le Docking (A). la cartographie des poches hydrophobes sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ (modèle 1 code PBD 2MHS)

De manière similaire, nous avons utilisé le modèle 1 de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ (code PDB 2MHS [74]) pour réaliser le Docking des cinq médicaments à la surface de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. Le résultat obtenu est différent de celui présenté dans la littérature. En effet, la molécule 2 (Rispéridone) ne semble pas interagir avec la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. Pour les 4 autres composés, le Docking a permis d'obtenir des structures de complexes avec des énergies d'interactions de -4,0 à -6,7 kcal.mol⁻¹ (Figure 82). L'analyse des interactions observées entre les différents médicaments et la protéine montre qu'il s'agit principalement d'interactions hydrophobes.



Figure 82. Structures des meilleures poses obtenues pour les cinq molécules en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ (code PDB 2MHS-modèle 1)

Sur la base de ces résultats, nous avons constaté que la taille de la boîte utilisée pour le Docking était trop restreinte : les ligands n'ont pas tous les degrés de liberté nécessaires pour se positionner correctement au niveau du site d'interaction ; pour le Déférasirox en particulier, nous avons obtenu seulement deux solutions avec de faibles énergies d'interaction.

Nous avons donc décidé de refaire un Docking à l'aveugle en définissant une boîte plus grande englobant toute la protéine. La taille de la nouvelle boîte est de 48, 50 et 54 Å, et les coordonnées de son centre sont -2,2 (x), -19,8 (y) et -2,263 (z), respectivement.

Comme attendu, le résultat obtenu est totalement différent du résultat précédent. Nous avons obtenu plusieurs solutions différentes pour chaque molécule, y compris pour le Rispéridone qui était exclu lors du premier Docking.



Figure 83. Les différents complexes obtenus par le Docking à l'aveugle des cinq médicaments avec protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ (code PDB 2MHS-modèle 1)

La Figure 83 montre la meilleure solution pour chaque molécule. Nous avons constaté que pour l'Oxcarbazépine, Rispéridone, Lénalidomide et Déférasirox, le site d'interaction défini dans les meilleures poses ne correspond pas au site d'interaction connu de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ mais plutôt à un site formé par le tag-Histidine ajouté lors de la production de la protéine. Il s'agirait donc d'une interaction non spécifique avec la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³.

Pour le Lénalidomide et le Déférasirox, les neuf poses obtenues par Autodock Vina [184] ne montrent pas d'interaction entre ces molécules et le site d'interaction connu de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³.

Pour l'Oxcarbazépine et le Rispéridone, deux et trois poses, respectivement, montrent que ces derniers peuvent interagir avec la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ au niveau de son site d'interaction connu. De même, pour le Torsémide, la meilleure solution montre que le site d'interaction est bien celui connu pour la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. La meilleure pose du Torsémide est différente de celle obtenue dans les conditions du premier Docking. En effet, dans le premier Docking, la pyridine occupe la poche P2 alors que dans les conditions du deuxième Docking, cette dernière est occupée par le groupement phényle méthylé.

Ces résultats suggèrent que dans le premier Docking **le choix de la taille de la boîte n'était pas judicieux** ; les ligands étaient forcés de rester dans la boîte pour interagir avec le site connu de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. Les conditions du deuxième Docking ont montré que si ces molécules interagissent avec la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³, le site d'interaction n'est pas forcément celui connu pour cette protéine.

En conclusion, nous avons montré que les résultats de Docking aveugle étaient paramètresdépendants. Les criblages virtuels en utilisant des logiciels de Docking peuvent être à l'origine de faux positifs ou de faux négatifs, et doivent être validés par des données expérimentales, **d'où l'intérêt d'utiliser des méthodes expérimentales, dans notre cas la spectroscopie RMN, pour mettre en évidence et caractériser les interactions.**

Caractérisation de l'interaction entre les cinq médicaments et la protéine MCL-1 par RMN

3.1. Mise en évidence de l'interaction

Nous avons choisi d'utiliser une méthode basée sur l'observation des signaux de la protéine pour vérifier la présence ou l'absence d'une interaction entre la protéine MCL- $1^{172-327}$ et les cinq médicaments, identifier les sites d'interaction « hotspots » et quantifier l'affinité de ces derniers pour la protéine MCL- $1^{172-327}$ (estimation des valeurs des K_D). Pour cela, nous avons utilisé la protéine MCL- $1^{172-327}$ marquée en azote 15 pour enregistrer des expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC en absence puis en présence de chaque médicament.

L'ajout des trois premiers médicaments (Rispéridone, Lénalidomide et Oxcarbazépine) à la solution de la protéine n'a entrainé aucune modification des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC. Les spectres enregistrés en présence de ces molécules sont totalement superposés au spectre référence (Figure 84). Cela traduit l'absence d'interaction entre ces molécules et la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.



Figure 84. Superposition des spectres 2D ¹H ¹⁵N HSQC enregistrés en absence (bleu) et en présence de : Rispéridone (rouge), Lénalidomide (magenta), Oxcarbazépine (vert). (Ratio 1:20, PBS - pH7, 298 K, 600MHz)

En revanche, la comparaison des spectres obtenus pour le Torsémide et le Déférasirox montre que les déplacements chimiques H^N-N de certains résidus de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ ont été perturbés après l'ajout de ces molécules. Cela indique la présence d'une interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et ces deux molécules. Dans la suite, nous nous sommes donc concentrés sur l'étude de ces deux composés.

d. Torsémide

La comparaison des spectres enregistrés en absence puis en présence du Torsémide (Figure 85) et les calculs des CCSP (en ppm) pour chaque résidu de la protéine ont permis d'identifier les résidus fortement perturbés par l'ajout de ce médicament.



Figure 85. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absence (bleu) puis en présence du Torsémide (rouge) (Ratio L:P=20:1). (PBS - pH7, 298 K, 600 MHz)

Les principaux « hotspots » sont mis en évidence sur l'histogramme (Figure 86A), et cartographiés sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ (Figure 86B).

Le mapping de ces « hotspots » sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ indique que ces résidus forment une zone de contact continue sur une seule face de la protéine et sont localisés principalement au niveau et autour des poches hydrophobes (P1, P2, P3 et P4). Ces résidus sont : Leu267, Trp261, His252, Met250, Ile264, Leu235, Leu232, Phe270, Val253, Val216, Gly219, Glu221, Val220 et le résidu chargé Arg263.



Figure 86. Identification du site d'interaction du Torsémide sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
A. Histogramme des variations de déplacements chimiques combinés des protons et des azotes des fonctions amides de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine après l'ajout du Torsémide. Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les Prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel. B. Cartographie des résidus fortement perturbés (2*STDEVA) sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine

Nous avons observé également la perturbation des résidus suivants : Val243, Ser245 et Arg248, localisés au niveau de l'hélice α 4 qui porte quelques « hotspots » du site d'interaction (Met250, His252, Val253). La Lys238, située au niveau de la boucle entre les hélices α 3 et α 4, a été également perturbée. En effet, la perturbation de ces résidus est probablement liée à un effet indirect de l'interaction du Torsémide avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

La surface de contact formée par les résidus perturbés est beaucoup plus large comparée à la taille du Torsémide, autrement dit, dans un modèle de stœchiométrie 1:1, le Torsémide ne pourrait pas occuper simultanément les poches hydrophobes P2 et P4. La perturbation des résidus de la P4 (Val216, Gly219, Val220 et Glu221) a également été observée lors de l'étude de l'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ avec le Pyridoclax et les fragments dérivés du Pyridoclax (Voir Partie 3 -1.2.2). Nous en avons alors conclu que cette perturbation est liée à un effet indirect de l'interaction. Cette conclusion est également valable ici.

e. <u>Déférasirox</u>

L'analyse des cartes 2D ¹H-¹⁵N HSQC (Figure 87) indique que les principaux résidus perturbés dans l'ordre décroissant des valeurs des CCSP (en ppm) sont : Gly219, Val216, Arg263, Val243, Leu267, Val220, Phe270, Val253, Lys234, Ile264, Asp256, Trp261, Asp236, Gly271, Leu235, Arg248, Gly217, Lys238, Thr259, Phe228 et Leu232.



Figure 87. Superposition des spectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine en absence (bleu) puis en présence du Déférasirox (Ratio L:P=20:1). (PBS - pH7, 298 K, 600 MHz)

Le mapping des résidus perturbés sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ montre qu'ils forment une zone de contact continue sur une seule face de la protéine et centrée au niveau de la poche P2. Nous avons constaté également que les valeurs des CCSP sont plus importantes dans le cas du Déférasirox comparativement au Torsémide. Cela peut indiquer que le Déférasirox a une meilleure affinité pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

La surface de contact identifiée est très importante par rapport à la taille du Déférasirox. Cela suggère, comme pour le Torsémide et les autres ligands étudiés, que la perturbation de certains résidus est liée à un effet indirect de l'interaction.



Figure 88. Identification du site d'interaction du Déférasirox sur la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷
 A. Histogramme des variations de déplacements chimiques combinés des protons et des azotes des fonctions amides la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine après l'ajout du Déférasirox. Une valeur de 0 ppm désignée par une * ou P a été donnée pour les Prolines et pour les pics superposés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence un déplacement éventuel. B. Cartographie des résidus fortement perturbés (2*STDEVA) sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ humaine

3.2. Estimation de l'affinité du Torsémide et du Déférasirox pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

a. Torsémide

La titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par le Torsémide (Figure 89), nous a permis d'estimer la valeur de la constante de dissociation, par l'ajustement des courbes des variations de déplacements chimiques de quelques résidus perturbés en fonction des ratios (L:P). Le Torsémide semble avoir une faible affinité envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, avec un K_D moyen d'environ 1 mM.



Figure 89. Estimation de la constante d'affinité du Torsémide pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ **A.** Zooms sur les régions des résidus fortement perturbés par l'ajout du Torsémide. **B.** Détermination des constantes de dissociation par l'ajustement des courbes des variations de déplacements chimiques en ¹H et ¹⁵N du squelette peptidique, en fonction de la concentration relative du ligand par rapport à la

concentration de la protéine, avec un modèle d'interaction avec une stœchiométrie 1:1. Les ratios L:P vont de 0:1 (bleu) à 0:20 (rouge) dans le sens des flèches noires.

b. Déférasirox

À partir des expériences de titration, la constante de dissociation K_D a été déterminée par ajustement de la courbe des variations de déplacements chimiques des H^N-N de quelques résidus, situés au niveau du site d'interaction, en fonction du ratio L:P. La valeur moyenne du K_D est d'environ 300 μ M. (Figure 90)



Figure 90. Estimation de la constante d'affinité du Déférasirox pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ **A.** Zooms sur les régions des résidus fortement perturbés par l'ajout du Déférasirox. **B.** Détermination des constantes de dissociation par l'ajustement des courbes des variations de déplacements chimiques en ¹H et ¹⁵N du squelette peptidique, en fonction de la concentration relative du ligand par rapport à la

concentration de la protéine, avec un modèle d'interaction avec une stœchiométrie 1:1. Les ratios L:P vont de 0:1 (bleu) à 0:20 (rouge) dans le sens des flèches noires

3.3. Estimation du k_{off} et du temps de résidence (τ)

Afin de confirmer les valeurs des constantes de dissociation d'une part, et d'estimer les valeurs de la constante cinétique k_{off} et du temps de résidence (τ) pour chaque médicament d'autre part, nous avons utilisé le logiciel TITAN pour analyser les formes de raies sur les spectres obtenus lors de la titration de la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ par chaque médicament (Tableau 17).

Tableau 17. Valeurs des K_D , k_{off} et τ , estimées par le logiciel TITAN					
Molécules	K _D (μM) (CCSP)	K _D (μM) (TITAN)	k _{off} (s ⁻¹)	τ (ms)	
Torsémide	≈1000	≈841	≈818	≈ 1,22	
Déférasirox	≈ 300	≈262	≈368	≈ 2,71	
Pyridoclax	≈ 15	≈29	≈208	≈4,8	
1 (MR-34911)	≈ 1000	≈879	≈1178	≈ 0,8	
2 (MR-34916)	≈ 536	≈423	≈2613	≈ 0,4	
3 (MR-34917)	≈ 246	≈107	≈438	≈ 2	

Le temps de résidence des deux médicaments dans le site d'interaction sont relativement plus importants que ceux des fragments, et moins importants que celui du Pyridoclax. Ces résultats nous permettent de classer ces ligands, selon leur affinité décroissante, comme suit : Pyridoclax, MR-34917, Déférasirox, MR-34916, Torsémide et MR-34911.

Afin de rationaliser ces résultats et mieux comprendre les interactions mises en jeu, un Docking sous contraintes RMN a été réalisé.

Docking sous contraintes RMN 3.4.

a. Torsémide

Nous avons utilisé l'Easy interface du HADDOCK Webserver [188] pour réaliser un Docking sous contraintes RMN. Les résidus dont les déplacements chimiques des fonctions H^N-N sont fortement perturbés lors de l'ajout du Torsémide, et situés à la surface de la protéine MCL-1¹⁷²⁻ ³²⁷ ont été utilisés pour définir le site actif.

Nous avons obtenu 197 structures classées dans trois clusters. Le cluster 1, le meilleur cluster, contient 179 structures avec un score HADDOCK de -30,5±2,2 et Z-score de -1,4. La Figure 91 présente les quatre meilleures poses du cluster 1.

Le Torsémide adopte des orientations différentes dans son site d'interaction. L'analyse des interactions mises en place dans les quatre poses montre qu'elles sont principalement des interactions hydrophobes (Tableau 18).

Pour les deux poses similaires 1 et 3 (Figure 91), le groupement isopropyle est orienté vers la poche P2 et établit des interactions hydrophobes avec les résidus (Phe270, Met250, Ile294, Leu246) dans la pose 1 et les résidus (Phe270, Ile294, Leu235, Leu246, Val249) dans la pose 2. La pyridine, dans ces deux poses, s'oriente vers la poche P1 et n'établit aucun contact avec les résidus de la protéine. Le groupement phényle méthylé, quant à lui, s'oriente vers la poche P3 et l'Arginine 263. Dans les deux poses, il établit des interactions hydrophobes avec les résidus Val253, Thr266, Leu267 et Phe254 (seulement dans la pose 3).

Dans la pose 2 (Figure 91 et Tableau 18), le groupement phényle méthylé occupe la poche P2 et établit des interactions hydrophobes avec les résidus Val253, Phe270, Phe254, Leu267, un contact de type π -stacking est également observé entre ce groupement et la chaîne latérale de la Phe270. La pyridine se positionne entre les poches P1 et P2 et établit des interactions hydrophobes avec les résidus Leu235 (P1) et Phe270 (P2). Le groupement isopropyle établit un seul contact avec la Thr266.

Dans la pose 4 (Figure 91 et Tableau 18), le Torsémide occupe la poche P2 par le groupement phényle méthylé. Ce dernier établit des interactions hydrophobes avec les résidus Val253, Met250, Phe270 et Leu267. La poche P1 est occupée par le groupement isopropyle qui établit un seul contact hydrophobe avec le résidu Met231. La poche P3 est occupée par la pyridine, des interactions hydrophobes avec les résidus Thr266, Leu267 et Phe254 sont observées. Dans cette pose (4), une liaison hydrogène est observée entre l'azote de la fonction sulfonamide et la fonction amide de la Val253.


Figure 91. Les meilleures poses du Torsémide en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, issues du Docking sous contraintes RMN avec l'Easy interface de HADDOCK Webserver.

Tableau 18. Principales interactions	observées dans les quatre pos	ses du Torsémide en interaction avec la
	protéine MCL-1172-327	

	Pose	1	Pose 2		Pose 3		Pose 4	
	L	Р	L	Р	L	Р	L	Р
Interactions Hydrophobes	Phényle méthylé	V253, T266, L267	Phényle méthylé	V253, F270, F254, L267	Phényle méthylé	V253, F254, L267, T266	Phényle méthylé	V253, M250, F270, L267
	Pyridine	/	Pyridine	F270, L235	Pyridine	/	Pyridine	T266, L267, F254
	Isopropyle	F270, M250, I294, L246	Isopropyle	T266	Isopropyle	F270, I294, L235, L246, V249	Isopropyle	M231
Liaisons Hydrogène							N du groupement sulfonamide	V253 (CO)
π -stacking			Phényle méthyle	F270 (c.l)				

L = Ligand. P = Protéine. (c.l) = chaîne latérale. (CO) = groupement CO de la fonction amide. Les « hotspots » définis par RMN sont en rouge.

Par conséquent, le Docking sous contrainte RMN a permis de montrer que malgré la présence des poses différentes, le Torsémide occupe principalement la poche hydrophobe P2, et les limites des poches hydrophobes P1 et P3 du site d'interaction de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

b. Déférasirox

Le Docking du Déférasirox sous contraintes RMN a permis d'obtenir 190 structures, réparties en deux clusters. Le meilleur cluster regroupe 183 structures avec un score HADDOCK de -38,8±3,6 et Z-score de -1,0.

Les 4 meilleures poses du cluster 1 sont présentées dans la Figure 92. Les quatre poses sont très ressemblantes. L'analyse des interactions mises en évidence dans chaque pose montre que :

Dans la première pose (Figure 92 et Tableau 19), le cycle central (B) établit un contact de type π -stacking avec le Phe270. Le phénol (A) établit des contacts hydrophobes avec les résidus Val253, Phe254, Leu267 et son groupement hydroxyle s'engage dans une liaison hydrogène avec le groupement (NH₂) de la chaîne latérale de l'Arg263. Le phénol (D) établit des contacts hydrophobes avec les résidus Thr266, Ala227 et Phe228, et s'engage également dans une liaison hydrogène, par son groupement hydroxyle, avec le résidu Thr266. Finalement, la fonction carboxylique portée par le cycle (C) établit un pont salin avec le groupement (NH₂) du résidu Lys234.



Figure 92. Les meilleures poses du Déférasirox en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, issues du Docking sous contraintes RMN avec l'Easy interface de HADDOCK Webserver

Dans la deuxième pose (Figure 92 et Tableau 19), les cycles (A) et (C) établissent les mêmes contacts que dans la pose précédente. En revanche, Le cycle central (B) n'établit aucun contact avec les résidus de la protéine, et le cycle (D) a seulement le contact hydrophobe avec le résidu Ala227.

Dans la troisième pose (Figure 92 et Tableau 19), le cycle (A) établit un contact de type π -stacking avec le résidu Phe270, ainsi que des contacts hydrophobes avec les résidus Phe 270, Met250 et Leu267. Le cycle (D) établit un contact de type π -stacking avec le résidu His224, et un contact hydrophobe avec le résidu Thr266. Le pont salin entre la fonction carboxylique du cycle (C) et le groupement (NH₂) du résidu Lys234 est également présent. Le cycle central quant à lui n'établit aucun contact avec les résidus de la protéine.

Dans la quatrième pose (Figure 92 et Tableau 19), le phénol (A) établit des contacts hydrophobes avec les résidus Val253, Phe254 et Leu267, et également un contact de type cation- π avec le carbone central du groupement guanidine du résidu Arg263. Le phénol (D) établit un contact de type π -stacking avec le résidu His224 et un contact hydrophobe avec le résidu Ala227. Le cycle (C) établit un pont salin avec le résidu Lys234 et un contact hydrophobe avec le résidu Met231. Le cycle central n'établit aucun contact.

	Pose	1	Pose 2	2	Pose 3		Pose	24		
	L	Р	L	Р	L	Р	L	Р		
Interactions Hydrophobes	Phénol (A)	L267, V253, F254	Phénol (A)	L267, V253, F254	Phénol (A)	L267, F270, M250	Phénol (A)	L267, V253, F254		
	Cycle B	/	Cycle B	/	Cycle B	/	Cycle B	/		
	Cycle C	V253	Cycle C	V253	Cycle C	A227, M231	Cycle C	M231		
	Phénol (D)	A227, F228, T266	Phénol (D)	A227	Phénol (D)	T266, H224	Phénol (D)	H224, A227		
Liaisons hydrogène	Phénol (A)	R263 (c.l)	Phénol (A)	R263 (c.l)						
	Phénol (D) (OH)	T266 (CO)								
π -stacking	Cycle B	F270 (c.l)			Phénol (A)	F270(c.l)	Phénol (D)	H224(c.l)		
					Phénol (D)	H224 (c.l)				
Ponts Salins	Cycle C (COOH)	K234 (c.l)	Cycle C (COOH)	K234 (c.l)	Cycle C (COOH)	K234 (c.l)	Cycle C (COOH)	K234 (c.l)		
π -cation							Cycle A	R263 (c.l)		

Tableau 19. Principales interactions observées dans les quatre poses du Déférasirox en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

L = Ligand. P = Protéine. (c.l) = chaîne latérale. Les « hotspots » définis par RMN sont en rouge.

Cette analyse montre que le Déférasirox occupe le même site d'interaction et ce quelle que soit la pose : le groupement phénol (A) occupe la partie profonde de la poche hydrophobe P2, et le cycle central (B) occupe sa partie supérieure. Le cycle C s'oriente vers la poche P1 et établit un pont salin avec le résidu Lys234 dans toutes les poses. Le cycle (D) s'oriente vers la poche P3. Étant donnée la ressemblance des poses, ce docking donne une idée assez précise sur le complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Déférasirox.

Design de nouvelles molécules dérivées du Torsémide et du Déférasirox pour mieux inhiber la protéine MCL-1

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il nous est paru intéressant de proposer de nouvelles molécules dérivées du Torsémide et du Déférasirox afin d'améliorer leur affinité envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

4.1. Dérivés du Torsémide

Pour proposer des dérivés du Torsémide, nous nous sommes basés sur la littérature, notamment sur les travaux de Fesik *et al.*[107] Ces auteurs décrivent en particulier le composé 1 (Figure 93), qui a une affinité et une sélectivité très importante pour la protéine MCL-1 (K_i =55 nM). La comparaison de la structure des complexes de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ avec le Torsémide d'une part et avec le composé 1 d'autre part a montré que les deux ligands occupent la poche hydrophobe P2. De plus, ces deux molécules ont quelques points communs. Par exemple : les deux molécules possèdent des groupements polaires, le groupement phényle tri-substitué dans le produit de Fesik est homologue au groupement phényle méthylé dans le Torsémide. En revanche, l'affinité du composé 1 est bien supérieure à celle du Torsémide, d'où l'intérêt de s'inspirer de la structure de ce produit pour proposer des modifications chimiques sur la structure du Torsémide en vue d'obtenir des dérivés ayant une affinité améliorée pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.



Figure 93. : Structures du composé 1 et du Torsémide

Les interactions observées entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le composé 1 (structure RX code PDB 4HW2 [107]) d'une part et entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Torsémide (structure issue du Docking) d'autre part sont présentées dans la Figure 94.



Figure 94. Les interactions établies entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le composé 1 (A) et entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le Torsémide (B)

L'analyse des interactions dans le cas du composé 1 est réalisée à partir de la structure RX du composé 1 (code PDB 4HW2 [107]). Dans le cas du Torsémide, la structure est issue du docking sous contraintes RMN

Pour le composé 1, l'unité hydrophobe (phényl tri-substitué) se lie dans la partie inférieure de la poche P2 (partie plus profonde). En outre, le groupement indole est positionné dans la partie supérieure de la poche P2, dirigeant l'acide carboxylique vers le résidu Arg263 pour établir une liaison hydrogène, et formant une interaction hydrophobe avec les résidus : Met231, Ala227,

Phe228 et Phe270 *via* le cycle aromatique. En revanche pour le Torsémide, nous avons observé que le phényle méthylé occupe la partie profonde de la poche P2, et que le groupement isopropyle s'oriente vers le Phe270 (partie supérieure de la poche P2). La liaison hydrogène avec le résidu Arg263 est absente.

A partir des différences constatées et des travaux menés sur les fragments dans le chapitre précédant, nous proposons de remplacer le groupement phényle méthylé du Torsémide par un groupement naphtyle pour mieux occuper la poche hydrophobe P2, d'où la proposition du dérivé 1 du Torsémide (Figure 95).



 Dérivé 1 du Torsémide
 Dérivé 2 du Torsémide
 Dérivé 3 du Torsémide

Figure 95. Les structures des dérivés du Torsémide proposés

Ensuite, nous avons constaté que la structure du composé 1 contient un espaceur de quatre atomes (cinq liaisons) entre le groupement indole et le groupement phényle tri-substitué. Le Torsémide possède une pyridine à la place de cet espaceur. Le remplacement de cette pyridine par un espaceur de trois atomes (quatre liaisons) conduit à la proposition du dérivé 2 du Torsémide, plus flexible (Figure 95).

Finalement, pour que le dérivé du Torsémide interagisse également avec la partie supérieure de la poche hydrophobe P2, nous avons donc envisagé dans un premier temps de remplacer le groupement isopropyle par un groupement indole (dérivé 3 du Torsémide, Figure 95).

Pour évaluer l'affinité de ces dérivés envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et caractériser le mode d'interaction pour chaque dérivé, un Docking à l'aveugle a été réalisé en présence de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ sous le logiciel Autodock Vina[184]. L'énergie d'interaction des trois dérivés est plus importante que celle du Torsémide (Tableau 20). La meilleure pose pour chaque dérivé a été analysée en utilisant le serveur PLIP[209] pour identifier le type et la nature des interactions mises en place.

Composé	$\frac{1}{2} \frac{1}{1} \frac{1}{1}$
Torsémide (sous contraintes RMN)	-6.5
Dérivé 1	-7.8
Dérivé 2	-7.8
Dérivé 3	-8.8

Tableau 20. Energie d'interaction (kcal.mol-1) de la meilleure pose pour les dérivés du Torsémide issues du Docking aveugle



Figure 96. : L'analyse des interactions observées entre les différents dérivés et la protéine MCL-1172-327

De manière similaire au groupement phényle tri-substitué du composé 1, le groupement naphtyle occupe bien la poche hydrophobe P2 pour les trois dérivés (Figure 96). Cependant, la liaison hydrogène avec le résidu Arg263 est absente dans les trois modèles. En revanche, d'autres liaisons hydrogène sont établies entre les azotes du groupement sulfonyl-amide et les résidus Thr266 et His224 (sous réserve de son état de protonation) dans le modèle du dérivé 1, et les résidus Asp260 et Thr266 dans les modèles des dérivés 2 et 3.

D'après les valeurs des énergies d'interaction (Tableau 20), le dérivé 3 semble avoir plus d'affinité (\approx 100 fois plus) pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ comparé à la molécule mère et aux deux autres dérivés. Afin d'améliorer l'occupation de la poche P2 dans le cas du dérivé 3, nous avons proposé d'une part l'introduction d'un groupement CF₃ au niveau du groupement naphtyle pour

mieux occuper la poche P2 en profondeur (le choix du Fluor est fait sur la base de ses propriétés particulières intéressantes en chimie médicinale [212] et également en RMN) et d'autre part de modifier la position du groupement sulfonyle pour favoriser la formation de la liaison hydrogène avec le résidu Arg263. Ces modifications ont abouti au dérivé 4 du Torsémide (Figure 97). Le Docking à l'aveugle du dérivé 4 avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ sous Autodock Vina [184] montre que l'énergie d'interaction de ce dernier est de -9,7 kcal.mol⁻¹, beaucoup plus importante que celles des dérivés 1, 2 et 3. **Cette énergie reflète un gain en affinité d'un facteur 1000 par rapport à**

la molécule mère (le Torsémide), c'est-à-dire une affinité théorique de l'ordre de 1 µM.

Figure 97. Dérivé 4 du Déférasirox



L'analyse des interactions établies entre le dérivé 4 et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ dans le modèle obtenu a montré la présence de la liaison hydrogène entre le groupement sulfonyle et le résidu Arg263. Une liaison halogène entre le fluor porté par le groupement naphtyle et le résidu Leu267 a été également observée. Ce produit semble occuper totalement la poche hydrophobe P2 dans sa profondeur et également sa partie supérieure, exactement comme le composé 1 (Figure 97).

En conclusion les modulations proposées pour le Torsémide permettent d'améliorer notablement l'affinité du Torsémide pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

4.2. Dérivés du Déférasirox

Afin de proposer des modifications structurales à introduire sur la structure du Déférasirox, nous avons comparé le complexe MCL -1¹⁷²⁻³²⁷ : Déférasirox obtenu par le Docking sous contraintes RMN avec des complexes obtenus avec d'autres petites molécules, ayant une meilleure affinité pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. En particulier, la comparaison des complexes MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Déférasirox et MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:S63845 (meilleur inhibiteur à ce jour) a montré que la différence majeure entre les deux composés réside dans le fait que la molécule S63845 occupe toutes les poches hydrophobes, alors que le Déférasirox n'occupe que la P2 et les limites des poches P1 et P3 (Figure 98). En nous basant sur ces différences, nous avons proposé d'introduire des modifications sur la structure du Déférasirox afin d'améliorer son affinité.



Figure 98. Comparaison des sites d'interaction occupés par les deux molécules A. Déférasirox et B. S63845 Les zones colorées définissent les poches hydrophobes P1(rouge), P2(bleu), P3(vert) et P4(magenta).

Une série de molécules dérivées du Déférasirox a ainsi été proposée (Figure 99). Pour chaque modification proposée, un Docking à l'aveugle a été réalisé en utilisant le logiciel Autodock Vina [184], afin d'évaluer l'affinité de ces dérivés pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Les complexes obtenus et les contacts établis entre chaque dérivé et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ ont été analysés pour comprendre l'effet de chaque modification.



Figure 99. Structures de la molécule S63845, du Déférasirox et ses dérivés

Le premier dérivé montre une meilleure affinité par rapport au Déférasirox (Tableau 21). L'analyse du complexe obtenu a révélé que :

- La liaison hydrogène observée précédemment entre la fonction carboxylique du Déférasirox et le résidu Lys234 est absente dans le cas du dérivé 1.
- La poche P2 n'est pas bien occupée en profondeur.
- Certaines parties du groupement ajouté n'établissent aucun contact avec la protéine.

En nous basant sur ces observations, nous avons introduit d'autres modifications sur la structure du dérivé 1 pour obtenir le dérivé 2. Nous avons ajouté un groupement CF₃ sur l'un des deux groupements phénols pour l'orienter vers la poche P2 et rétablir la liaison hydrogène entre le groupement carboxylique et le résidu Lys234. Dans le complexe, le cycle aromatique n'établit aucun contact avec les poches hydrophobes ; il se dirige vers la partie supérieure de la poche P3. De ces observations est venue l'idée de supprimer ce groupement aromatique dans le dérivé 3, et de remplacer le groupement (-O-C(COOH)-C) par un groupement sulfonyle.



Figure 100. Comparaison des sites occupés par les dérivés du Déférasirox A. dérivé 1. B. dérivé 2. C. dérivé 3. D. dérivé 4 Les zones colorées définissent les poches hydrophobes P1(rouge), P2 (bleu), P3 (vert) et P4(magenta).

Dans le dérivé 4, une simple modification de la position du groupement sulfonyle a permis d'améliorer légèrement l'énergie d'interaction (Tableau 21). Les modulations de la structure du Déférasirox ont permis d'obtenir le dérivé 4 qui semble avoir une affinité 10 fois plus importante que le Déférasirox ($K_D \approx 30 \mu M$).

Tableau 21. Énergie d'interaction (kcal.mol⁻¹) de la meilleure pose pour les dérivés du Déférasirox issus du Docking

Composé	Énergie d'interaction (kcal.mol ⁻¹)
Déférasirox (sous contraintes RMN)	-8,1
Dérivé 1	-8,2
Dérivé 2	-8,8
Dérivé 3	-9,0
Dérivé 4	-9,2

5. Conclusion

Dans cette partie, nous avons caractérisé l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et des médicaments déjà commercialisés pour d'autres indications thérapeutiques. Ces médicaments ont été choisis sur la base d'une étude théorique décrite dans la littérature. Dans un premier temps, nous avons souhaité reproduire l'étude théorique de Samson *et al.*, sans succès. **Nous avons constaté que les paramètres de Docking utilisés par ces auteurs n'étaient pas judicieusement choisis (boite trop petite).** Nous avons donc réalisé un autre Docking à

l'aveugle afin d'explorer tous les sites d'interaction sur la surface de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. Ce Docking a montré que, parmi les médicaments choisis, seul le Torsémide occupait le site d'interaction connu de la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³. Les autres médicaments se positionnent loin du site d'interaction connu de la protéine ; au niveau du tag histidine ou à l'opposé du site d'interaction.

Pour confirmer les résultats de Docking et vérifier expérimentalement la présence ou l'absence d'une éventuelle interaction, nous avons réalisé une étude RMN. Les résultats obtenus montrent que la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ n'interagit qu'avec deux des cinq médicaments choisis : le Torsémide et le Déférasirox.

Les sites d'interaction définis pour les deux médicaments sont centrés principalement autour de la poche hydrophobe P2, comme pour les fragments et le Pyridoclax. Pour le Torsémide, les valeurs des CCSP des résidus fortement perturbés ainsi que l'affinité estimée sont du même ordre que ceux du fragment 1 (MR-34911), reflétant une faible affinité. En revanche, le profil d'interaction du Déférasirox est similaire à celui du fragment 2 (MR-34916) pour les valeurs des CCSP, et celui du fragment 3 (MR-34917) pour l'affinité.

Finalement, le Docking sous contraintes RMN nous a permis de définir les poses possibles des deux médicaments en interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. L'analyse et la comparaison des structures obtenues avec des données de la littérature nous a permis de **proposer des modifications structurales à introduire sur les structures du Torsémide et du Déférasirox, afin d'améliorer leur affinité pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Le Docking à l'aveugle des dérivés proposés a montré une meilleure affinité de ces derniers pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Par conséquent, les dérivés du Torsémide et du Déférasirox présentent des pistes intéressantes à explorer pour concevoir de nouveaux inhibiteurs de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.**

Partie 4 - CONCLUSION & PERSPECTIVES

1. Conclusion

La surexpression des protéines anti-apoptotiques MCL-1 et Bcl-x_L dans le cas du cancer de l'ovaire est à l'origine de la résistance aux chimiothérapies existantes. Des inhibiteurs de la protéine Bcl-x_L existent déjà et montrent une bonne efficacité. En revanche, **l'inhibition de la protéine MCL-1 reste problématique**. A ce jour, malgré les efforts consacrés à la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la protéine MCL-1, aucune molécule n'a vu le jour sur le marché des médicaments. Le Pyridoclax est un inhibiteur sélectif de la protéine MCL-1, développé par nos collaborateurs au CERMN. Ce produit a montré une bonne activité anti-tumorale (tests biologiques *in vivo* et *in vitro*), mais les mécanismes d'interaction mises en jeu restaient à élucider.

Dans un premier temps, et avant de caractériser l'interaction entre le Pyridoclax et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, **nous avons caractérisé l'effet du DMSO**, utilisé comme co-solvant pour améliorer la solubilité du Pyridoclax, sur **la protéine MCL-1**¹⁷²⁻³²⁷. Nous avons démontré une faible affinité du DMSO pour la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ traduite par de légères variations de déplacements chimiques de certains résidus, localisés principalement sur la surface de la protéine, liées à la solvatation. Par ailleurs, l'étude de la dynamique de la protéine par RMN, en présence et en absence du co-solvant, a montré que la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ est caractérisée par une dynamique importante. Ces observations sont en accord avec des études de simulation dynamique décrites précédemment. **Ainsi, nous avons montré que le DMSO n'a qu'un faible effet sur la protéine MCL-1**¹⁷²⁻³²⁷.

La compréhension de l'effet du co-solvant sur la protéine nous a permis dans un deuxième temps de caractériser l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷et le Pyridoclax en présence du DMSO. Nous avons montré que le Pyridoclax se lie au niveau du site d'interaction connu de la protéine MCL-1 avec une forte affinité et un temps de résidence relativement long. Nous avons également relevé un effet du Pyridoclax sur la dynamique de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. En effet, la fixation du Pyridoclax entraîne une modification de la dynamique locale des résidus en contact avec le site d'interaction, et également de certains résidus distants du site d'interaction.

Enfin, le docking sous contraintes RMN et les simulations dynamiques ont permis de définir la structure la plus favorable du complexe MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Pyridoclax.

Afin de conforter les résultats obtenus pour le Pyridoclax, nous avons également étudié l'interaction entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et différents fragments dérivés du Pyridoclax. Nous nous sommes intéressés à ces fragments pour leur solubilité en milieu aqueux, proche des conditions physiologiques (Tampon PBS à pH 7). Ces fragments présentent des affinités moins importantes que le Pyridoclax avec des temps de résidence relativement courts. A partir de cette étude, nous avons pu démontrer le rôle de chaque pyridine de la chaine et l'importance du groupement styryle dans l'interaction avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, et nous avons constaté que le remplacement du groupement styryle par un groupement naphtyle permet de mieux occuper la poche hydrophobe P2, une piste à exploiter pour améliorer l'affinité du Pyridoclax.

Pour finir, nous avons souhaité élargir notre étude à d'autres inhibiteurs et valider une étude théorique réalisée en 2017 par Samson et al. Ces auteurs ont conclu sur l'affinité de certains médicaments, existant sur le marché, envers la protéine MCL-1¹⁷⁰⁻³³³ par des méthodes théoriques. Nous nous sommes proposés de confirmer expérimentalement leurs résultats théoriques sur l'interaction entre certains de ces médicaments (Oxcarbazépine, Déférasirox, Rispéridone, Lénalidomide et Torsémide) et la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Les deux médicament (parmi les cinq choisis) qui montrent expérimentalement une affinité envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ sont le Torsémide et le Déférasirox. Il s'agit bien d'une interaction spécifique. En effet, le site d'interaction défini dans le cas des deux médicaments correspond bien au site d'interaction connu de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Les deux médicaments présentent des affinités différentes, beaucoup moins importances que celle du Pyridoclax et proches de celles des fragments. Le Docking sous contraintes RMN a permis d'élucider les structures des complexes MCL-1¹⁷²⁻³²⁷:Torsémide et MCL-1¹⁷⁻³²⁷:Déférasirox, et de comprendre les interactions mises en jeu entre la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et ces partenaires. L'analyse de ces structures et la comparaison avec la littérature, nous ont permis de proposer des modifications structurales afin d'améliorer l'affinité de ces médicaments envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Le résultat du Docking des dérivés proposés est encourageant : une meilleure énergie d'interaction est obtenue pour les dérivés du Torsémide et du Déférasirox, donc une meilleure affinité est escomptée.

2. Perspectives

En perspective, il serait très intéressant de concevoir des dérivés du Pyridoclax solubles et avec une meilleure affinité en s'appuyant sur nos résultats. En effet, le remplacement du groupement styryle par un groupement naphtyle pourrait lui permettre de mieux occuper la poche P2, et donc d'améliorer son affinité. L'introduction d'une fonction carboxylique sur l'une des pyridines terminales, comme pour les fragments pourrait probablement améliorer sa solubilité en milieu aqueux et favoriser la formation des liaisons hydrogène avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷. Finalement, l'insertion d'un espaceur entre les deux pyridines centrales (B et C) pourrait peut-être permettre l'occupation de la poche P4 par la pyridine terminale A, et augmenterait ainsi la sélectivité du produit dérivé envers la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷.

En outre, une deuxième génération de dérivés du Pyridoclax est déjà conçue au CERMN.[213] le chef de fil présente une activité comparable à celle du Pyridoclax à des faibles concentrations. La caractérisation de l'interaction de cette molécule avec la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷, par RMN et modélisation moléculaire, pourrait dès lors être réalisée en suivant la même stratégie que pour le Pyridoclax. Ce composé pourrait également être comparé avec les dérivés que nous proposons.

Par ailleurs, les travaux réalisés sur les fragments s'inscrivent dans une étude réalisée dans le cadre de la thèse de C. Denis (CERMN), à la recherche d'inhibiteurs duaux des protéines MCL- $1^{172.327}$ et Bcl-x_L. Les données RMN et les résultats des tests cellulaires réalisés à l'unité BioTICLA, pour ces trois fragments, ont conduit à l'optimisation et la conception d'une nouvelle molécule MR-36102. Cette molécule montre une très bonne activité sur des lignes cellulaires des tumeurs ovariennes humaines (résultats non publiés). Les résultats préliminaires de l'étude RMN sont également encourageants. La caractérisation de l'interaction de cette nouvelle molécule avec la protéine MCL- $1^{172-327}$ et avec la protéine Bcl-x_L pourrait être réalisée par RMN et modélisation moléculaire.

Pour finir, les résultats obtenus pour le Torsémide et le Déférasirox sont très prometteurs. Il serait intéressant de compléter cette étude par une évaluation de l'activité cellulaire de ces deux molécules. Il serait également très intéressant de synthétiser les dérivés proposés afin de valider expérimentalement, par RMN et modélisation moléculaire, les hypothèses formulées dans ce manuscrit. Enfin, cette étude pourrait être élargie à d'autres médicaments cités par Samson *et al.* et à d'autres cibles telles que Bcl-x_L afin de proposer des inhibiteurs duaux.

Partie 5 - PARTIE EXPERIMENTALE

1. Production de la protéine

Nous avons utilisé le domaine 172-327 de la protéine MCL-1 humaine pour réaliser les expériences d'interaction avec les différents ligands :

23 <u>0</u>	22 <u>0</u>	21 <u>0</u>	20 <u>0</u>	19 <u>0</u>	18 <u>0</u>
VQRNHETAFQ	LETLRRVGDG	grsgatsrka	ATGAKDTKPM	EIISRYLREQ	GPDELYRQSL
29 <u>0</u>	28 <u>0</u>	27 <u>0</u>	26 <u>0</u>	25 <u>0</u>	24 <u>0</u>
TINQESCIEP	FGAFVAKHLK	NWGRIVTLIS	MIHVFSDGVT	EDDVKSLSRV	GMLRKLDIKN
		HVEDLEGG	32 <u>0</u> RGWDGFVEFF	31 <u>0</u> rtkrdwlvkQ	30 <u>0</u> Laesitdvlv

La production de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non marquée, simplement ou doublement marquée (¹⁵N, ¹⁵N-¹³C) a été réalisée par notre collaborateur (Dr L. CARLIER) à l'UPMC, selon le protocole décrit par Friberg *et al.*[107]. La protéine a été conservée soit sous forme de lyophilisat soit en solution dans un tampon phosphate salin à pH 7,0 (Phosphate 20 mM, NaCl 130 mM, DTT 2 mM).

2. Synthèse des ligands

Le Pyridoclax a été synthétisé par nos collègues au CERMN (Pr A.S. Voisin Chiret) selon le protocole publié précédemment.[9] Les fragments dérivés du Pyridoclax, ont été également synthétisés au CERMN dans le cadre de la thèse de (C. Denis). Les médicaments quant à eux, étaient disponibles chez des fournisseurs connus (Sigma Aldrich et VWR).

3. Les expériences RMN

Toutes les expérience RMN ont été réalisées à 298 K au laboratoire COBRA sur un spectromètre Bruker 600 MHz équipé d'une cryosonde 5 mm triple résonance et piloté grâce au logiciel TopSpin 3.2 (Bruker). Les spectres ont été traités et analysés avec les logiciels TopSpin (Bruker), NMRPipe[214], Sparky[215], CCPNMR[216] et TITAN [204].

3.1. Attribution des signaux de la protéine :

L'attribution des résonances H^N, ¹⁵N et ¹³ C de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ a été réalisée, en utilisant un échantillon de 600 μ L de la protéine uniformément marquée ¹⁵N-¹³C à 250 μ M, dissoute dans un Tampon PBS à pH 7 en présence de 5% du D₂O, à partir des expériences classiques d'attributions : ¹H-¹⁵N HSQC, HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH. Les séquences d'impulsions

de la bibliothèques Bruker ont été utilisées, l'ensemble des paramètres expérimentaux sont détaillés dans le Tableau 22. Le traitement des spectres a été réalisé avec le logiciel TopSpin 3.2 (Bruker), l'attribution des signaux de la protéine a été réalisée à l'aide du logiciel Sparky.[215]

Expériences	Paramètres d'acquisition			Paramètres de Processing				
^		F1(1H)				F1(1H)		
	Fn Mode	/			FT_mode	Fqc		
	TD	16348			SI	32768		
$^{1}\mathrm{H}$	SW (ppm)	15,00			WDW	EM		
	O1(ppm)	4,70			LB(Hz)	0,3		
(PEW5)	D1(s)	1,00			BC_mode	quad		
	P1(µs)	11,67						
	PL1(W)	6,00						
	ns	128						
		F1(15N)	F2(1H)	F3(¹³ C)		F1(¹⁵ N)	F2(1H)	F3(¹³ C)
	Fn Mode	States- TPPI	/	/	FT_mode	States-TPPI	/	/
¹ H- ¹⁵ N HSOC	TD	256	1536	/	SI	512	2048	/
	SW (ppm)	40,00	16,00	/	WDW	QSINE	QSINE	/
(61-)	O1(ppm)	118,00	4,70	/	SSB	2	2	/
(insqci3gppn)	D1(s)	1,00			BC_mode	quad	/	/
	P1(µs)	/	11,67	/				
Suppression de l'eau	PL1(W)	/	6,00	/				
avec un bloc	P15(us)	33.50	/	/				
Watergate 5-9-19	$\mathbf{D} \mathbf{I} 3 (\mathbf{W})$	160.00	/	/				
(Shapes par défaut)		Walter65	/	/				
(onapes par derade)		05 Walt203						
	J-NH (HZ)	95						
	ns	64						
	Gradients	Sine1.100				21 (11.0)	-	
	D 16 1	F1(¹⁵ C)	F2(1H)	F3(¹⁵ N)	-	F1(¹⁵ C)	F2('H)	F3(¹⁵ N)
	Fn Mode	States- TPPI	/	/	FT_mode	Echo- Antiecho	/	/
	TD	256	772	/	SI	512	2048	/
	SW (ppm)	50,00	13,00	/	WDW	QSINE	QSINE	/
	O1(ppm)	20,00	4,70	/	SSB	2	2	/
	D1	0,20			BC_mode	qpol	/	/
	P1(µs)	/	11,67	/				
	PL1(W)	/	6,00					
¹ H- ¹³ C HMOC	P3(µs)	15,00	/	/				
BB SOFAST	PL2(W)	34.38	/	/				
HMQC	Cnst1(ppm)	0.00	,					
IBS-Template	(fréquence	.,						
(Shapes par défaut)	d'excitation							
	HC)							
	Cnst2(ppm)	4,00						
	(bande							
	d'excitation							
	HC)	400						
	Cnst4(Hz)	120						
	(constante							
	ns	128						
	Gradients	SMSO10	100					
	Gradicilito	F1/1H)	F2(15ND)	E3(13C)		F1(4H)	F2(15N)	E3(13C)
LINICA	Fn Mode	/	States-TF		FT mode	/	Echo-	States-
(hncappwo3d)		/	0	-		,	Antiecho	TPPI
Suppression de l'eau	TD	2048	48	128	SI	2048	128	256
avec un bloc	SW (ppm)	14	32	40	WDW	QSINE	QSINE	QSINE
Watergate 3-9-19	O1(ppm)	4,7	119,5	51,0	SSB	2	2	2
(Shape et Gradients	D1(s)	1			BC_mode	qpol	/	/
par défaut)	P1(μs)	11,67	/	/				
	PL1(W)	6.00	/	/				

Tableau 22. Principaux paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences RMN utilisées pour l'attribution des signaux de la protéine (sous TopSpin 3.2)

		1	1	45.00	1			
	P3(µs)	/	/	15,00				
	PL2(W)	/	/	34,38				
	P15(µs)	/	33,50	/				
	PL3(W)	/	160,00	/				
	CPDPRG1	DIPSI2	/	/				
	CPDPRG2	/	Garp	/				
	Cnst21(ppm)	176						
	(offset, de							
	déplacements							
	chimiques							
	CO)							
	ns	16						
	Gradients	SMSQ 1.1	100					
		F1 (1H)	F2(15N)	F3(13C)		F1(1H)	F2(15N)	F3(13C)
	Fn Mode	/	States-TP	PI	FT_mode	/	Echo-	States-
							Antiecho	TPPI
	TD	2048	80	128	SI	2048	256	512
	SW (ppm)	14	32	32	WDW	OSINE	OSINE	OSINE
	O1 (ppm)	47	119.5	54.0	SSB	2	2	2
	D1(e)	1	,0	,0	BC mode	Opel		
	D1(5)	11.67			Defdiation	/	/ I Df= (22)	/ I Df- (22)
	P1(µs)	11,0/			linéaire	/	LPIC (32)	LPIC (32)
HN(CO)CA		6.00			micane			
(hncocagpwg3d)	PLI(W)	6,00	1					
Suppression de l'eau	P3(µs)	/	/	15,00				
avec un bloc	PL2(W)	/	/	34,38				
Watergate 3-9-19	P15(µs)	/	33,50	/				
(Shapes et Gradients	PL3(W)	/	160.00	/				
par détaut)	CPDPRG1	DIPSI2	,	/				
	CPDPPC2	DII 012	Caro					
	CFDFKG2	E 4	Garp					
	Linst //(nnm)	54						
	(affect de	51						
	(offset, de	01						
	(offset, de déplacements	01						
	(offset, de déplacements chimiques							
	$(offset, de déplacements chimiques C_{\alpha})$	- 24						
	(offset, de déplacements chimiques C_{α})	24						
	(offset, de déplacements chimiques C _a) ns Gradients	24 SMSQ 1.7	100					
	(offset, de déplacements chimiques C _α) ns Gradients	24 SMSQ 1.7 F1 ('H)	100 F2(15N)	F3(¹³ C)		F1('H)	F2(¹⁵ N)	F3(¹³ C)
	(offset, de déplacements chimiques C _α) ns Gradients	24 SMSQ 1.: F1 ('H) /	100 F2(¹⁵ N) States	F3(13C) -TPPI	FT_mode	F1('H) /	F2(¹⁵ N) Echo-	F3(¹³ C) States-
	(offset, de déplacements chimiques C _a) ns Gradients Fn Mode	24 SMSQ 1.2 F1 ('H) /	100 F2(15N) States	F3(13C) -TPPI	FT_mode	F1('H) /	F2(⁵N) Echo- Antiecho	F3(¹³C) States- TPPI
	(offset, de déplacements chimiques C _a) ns Gradients Fn Mode TD	24 SMSQ 1.3 F1 ('H) / 2048	100 F2(15N) States 80	F3(13C) -TPPI 128	FT_mode SI	F1('H) / 2048	F2(¹⁵N) Echo- Antiecho 256	F3(¹³ C) States- TPPI 512
	Constant (ppm) (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00	F3(1³C) -TPPI 128 75 ,00	FT_mode SI WDW	F1('H) / 2048 QSINE	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE
	(offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm)	24 SMSQ 1.3 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70	100 F2(1⁵N) States 80 32,00 117,00	F3(I³C) -TPPI 128 75,00 43,00	FT_mode SI WDW SSB	F1('H) / 2048 QSINE 2	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2
	(offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s)	24 SMSQ 1 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00	FT_mode SI WDW SSB BC_mode	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 /	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 /
	(offset, de déplacements chimiques C _a) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(ue)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11.67	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 /	F3(¹³C) -TPPI 128 75,00 43,00	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
	(offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs)	24 SMSQ 1.2 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 /	F3(¹³C) -TPPI 128 75,00 43,00 /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH	constant (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Gradients Fn Mode SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 /	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(15N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d)	constant (ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) Pl5(ua)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 /	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / 33,50	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(15N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau	constant (ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) D1 (a)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 /	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 140,00	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(I⁵N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Waterente 3 a 10	constant (ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) PL3(W)	24 SMSQ 1.7 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / /	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(I⁵N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shanes et Gradiente	$\begin{array}{c} \text{Gradients}\\ \text{(offset, de déplacements chimiques}\\ \text{C}_{\alpha} \text{)}\\ \text{ns}\\ \hline \\ \text{Gradients}\\ \hline \\ \hline \\ \text{Fn Mode}\\ \hline \\ \hline \\ \text{TD}\\ \hline \\ \text{SW (ppm)}\\ \hline \\ \text{O1 (ppm)}\\ \hline \\ \text{O1 (ppm)}\\ \hline \\ \text{O1 (ppm)}\\ \hline \\ \text{O1 (ppm)}\\ \hline \\ \text{P1(s)}\\ \hline \\ \text{P1(us)}\\ \hline \\ \hline \\ \text{P15(\mu s)}\\ \hline \\ \text{PL3(W)}\\ \hline \\ \text{P3(\mu s)}\\ \hline \end{array}$	24 SMSQ 1.7 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / /	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 /	F3(1³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / / / / 15,00	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(I⁵N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	Constant (Ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) PL3(W) P3(µs) PL2(W)	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / / / / /	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 / /	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / 15,00 34,38	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	Constant (Ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) PL3(W) P3(µs) PL2(W) CPDPRG1	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / / DIPSI2	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 / / / / /	F3(I³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / 15,00 34,38 /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(13C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	Child Control (offset, de déplacements chimiques) Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) PL3(W) P3(µs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / DIPSI2 /	100 F2(¹⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / 33,50 160,00 / / / Garp	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / / / / / / / 34,38 / / /	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(13C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	 child (ppm) (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(μs) PL1(W) P15(μs) PL3(W) P3(μs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) 	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / DIPSI2 / /	100 F2(1 ⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 / / / Garp /	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / 15,00 34,38 / / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	constat_(ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) PL3(W) P3(µs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) (offset, de	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / DIPSI2 / /	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 / / / Garp /	F3(1³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / 15,00 34,38 / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	constat_(ppm) (offset, de déplacements chimiques Ca) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(µs) PL1(W) P15(µs) PL3(W) P3(µs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) (offset, de déplacements	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / J DIPSI2 / /	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00 / / / 33,50 160,00 / / / Garp /	F3(1³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / 15,00 34,38 / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	 child (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(μs) PL1(W) P15(μs) PL3(W) P3(μs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) (offset, de déplacements chimiques 	24 SMSQ 1.: F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / JIPSI2 / /	100 F2(15N) States 80 32,00 117,00 / / 33,50 160,00 / / / Garp /	F3(I³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / 15,00 34,38 / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	 child (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(μs) PL1(W) P15(μs) PL2(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) (offset, de déplacements chimiques Cα) 	24 SMSQ 1.3 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / / / / / / DIPS12 / /	100 F2(1 ⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / 33,50 160,00 / / Garp /	F3(¹³C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / / 15,00 34,38 / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³ C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)
CBCA(CO)NH (cbcaconhgpwg3d) Suppression de l'eau avec un bloc Watergate 3-9-19 (Shapes et Gradients par défaut)	 child (offset, de déplacements chimiques Cα) ns Gradients Fn Mode TD SW (ppm) O1 (ppm) D1(s) P1(μs) P15(μs) PL3(W) P12(W) CPDPRG1 CPDPRG2 Cnst22(ppm) (offset, de déplacements chimiques Cα) ns 	24 SMSQ 1.3 F1 ('H) / 2048 14,00 4,70 1 11,67 6 / / / / DIPSI2 / / 24	100 F2(1 ⁵ N) States 80 32,00 117,00 / / 33,50 160,00 / / Garp /	F3(13C) -TPPI 128 75,00 43,00 / / / / / 15,00 34,38 / / 53,20	FT_mode SI WDW SSB BC_mode Prédiction linéaire	F1('H) / 2048 QSINE 2 qpol /	F2(¹⁵ N) Echo- Antiecho 256 QSINE 2 / LPfc (32)	F3(¹³C) States- TPPI 512 QSINE 2 / LPfc (32)

3.2. Attribution des signaux des ligands

Différents échantillons ont été préparés pour attribuer les signaux RMN ¹H des différents ligands. Pour le Pyridoclax, 600 μ L d'une solution stock dans du DMSO-d₆ à 5mM a été préparée.

Pour les fragments, des échantillons de 600 μ L à une concentration de 1mM ont été préparés dans un tampon PBS à pH 7 (570 μ L), en présence de 5% de D₂O (30 μ L).

Des expériences 1D et 2D homonucléaires 1D ¹H, 2D ¹H-¹H COSY, NOESY ont été enregistrées afin de permettre une attribution complète de l'ensemble des signaux ¹H. Les principaux paramètres sont résumés dans le Tableau 23.

Expériences	Paramètres d'acquisition			Parame	ètres de Pr	ocessing
		F1(1H)			F1	
	TD	66560		SI	66560	
	SW (ppm)	16,00		WDW	EM	
	O1(ppm)	4,70		LB	0,3	
114	D1(s)	3,00				
-11 (zgesop)	P1(µs)	Pyridoclax : 8,00				
Suppression de l'eau en utilisant		Fragment 1 : 11,91				
le bloc Excitation Sculpting		Fragment 2 : 12,80				
× ~		Fragment 3 : 12,18				
	PL1(W)	5,40				
	Shape pulse pour la	Sinc1.1000				
	suppression de reau	6.1				
111 111 COSV	ns	04 E1/(LI)	E9/11J)		E1/1LI)	E2/1LI)
'H-'H COSI (cosygnpraf)	E- Modo	<u> </u>	F2('FI)	ET mode	/	<u>F2('F)</u>
(cosygppidi)	Th Mode	2049	QF 257	F1_moue	/	<u>Qr</u> 510
		2048	256	SI	2048	512 CDUE
	SW (ppm)	12,00	12,00	WDW COD	SINE	SINE
	O1(ppm)	4,70	4,70	SSB	0	0
	D1(s)	3,00				
	P1(µs)	Pyridoclax : 8,00				
		Fragment 1 : 11,91				
		Fragment 2 : 12,80 Errorment 3 : 12,18				
	DI 1/W/)	5 40				
		16				
1H 1H NOESV	115	10 F1/1U)	E2/1LI)		F1/1U)	E2/111)
(noesygpph)	En Modo	/	States TDDI	ET mode	/	States TDDI
Suppression de l'eau en utilisant	TD	2049	512	r1_mode	2049	1024
le bloc Excitation Sculpting	ID SW/ (normal)	2048	12.00	51 W/DW/	2048 SINIE	1024 SINIE
1 0	Sw (ppm)	12,00	12,00	WDW LD	SINE	SINE
	D1(ppm)	4,70	4,/0	LB	2	2
	DI(s)	3,00				
	P1(µs)	Pyridoclax : 8,00				
		Fragment 2 : 12 80				
		Fragment 3 : 12,18				
	PL1(W)	5 40				
	D8(s) (temps de	Pyridoclax · 1 00				
	mélange)	Fragments : 0,50				
	Shape pulse pour la	Sinc1.1000		1		
	suppression de l'eau	omernooo				
	ns	16				

Tableau 23. Principaux paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériences RMN utilisées pour l'attribution des signaux ¹H des ligands (sous TopSpin 3.2)

Pour le Pyridoclax et ses dérivés, les contraintes de distance internucléaires ont été obtenues à l'aide du logiciel Topspin3.2 (Bruker) par intégration des volumes des tâches de corrélation des spectres 2D 1 H- 1 H NOESY. Les tâches de corrélations entre les protons en position A₁ et A₂ pour le Pyridoclax et D₁ et D₂ pour les fragments (2,3Å), ont servi de référence. Pour le Pyridoclax les signaux des carbones ¹³C ont été également attribués à l'aides des expériences 1D ¹³C, 2D ¹H-¹³C HMQC et ¹H-¹³C HMBC. Les principaux paramètres sont résumés dans Tableau 24.

Expériences	Parar	nètres d'acquisition		Parame	ètres de Pr	ocessing
		F1(¹³ C)			F1	
	TD	65536		SI	66560	
	SW (ppm)	250,00		WDW	EM	
¹³ C	O1(ppm)	125,00		LB	0,5	
(zgpg)	D1(s)	2,00				
	P1(µs)	18,00				
	PL1(W)	100,00				
	CPDRG2	Waltz16				
	ns	512				
		F2(1H)	F1(¹³ C)		F1(1H)	F2(1H)
	Fn Mode	/	QF	FT_mode	/	QF
	TD	2048	256	SI	2048	1024
¹ H- ¹ C HMQC	SW (ppm)	12,00	200,00	WDW	SINE	SINE
(Gradients définis par défaut	O1(ppm)	4,80	100,00	SSB	0	0
d'après la séquence d'impulsions	D1(s)	1,00				
Bruker)	P1(µs)	12,50		_		
	PL1(W)	6		_		
	ns	64		_		
	CNST2 (JCH)(Hz)	145		_		
	CPDPRG2	Garp				
		F2(1H)	F1(¹³ C)		F1(1H)	F2(1H)
	Fn Mode	/	QF	FT_mode	/	States-TPPI
	TD	2048	256	SI	2048	1024
	SW (ppm)	12,00	250,00	WDW	SINE	SINE
¹ H- ¹³ C HMBC	O1(ppm)	4,80	125,00	LB	2	2
(hmbcgplpndqf)	D1(s)	1,00				
(Gradients définis par défaut	P1(µs)	12,50				
d'après la séquence d'impulsions Bruker)	PL1(W)	6				
	CNST2 (J _{CH}) (Hz)	145		1		
	CNST13 (J _{CH} long range) (Hz)	8				
	ns	18				

Tableau 24. Paramètres d'acquisition et de traitement des spectres enregistrés pour l'attribution des signaux ¹³C du Pyridoclax

3.3. L'effet de l'interaction sur les spectres 1D ¹H des fragments

Pour étudier l'effet de la présence de la protéine sur les signaux ¹H des fragments, nous avons préparé pour chaque fragment deux échantillons : le premier correspond au ratio L:P (100:0) et le deuxième au ratio (100:1). La préparation des échantillons est détaillée dans le Tableau 25. Une expérience 1D ¹H pour chaque fragment a été enregistrée en absence et en présence de la protéine, en utilisant les mêmes paramètres cités dans le Tableau 23 (expérience 1D ¹H).

Fragments	Ratio 100 :0	Ratio 100 :1
MR-34911	[MR-34911] = 1 mM	[MR-34911] = 1 mM
	175 μg	(178 µg dans 555 µL PBS à pH 7
	+ 570 μL PBS à pH 7	$+ 30 \ \mu L \ D_2 O)$
	$+ 30 \mu\text{L}\text{D}_2\text{O}$	
	$[MCL-1^{172-327}] = 0 \ \mu M$	$[MCL-1^{172-327}] = 10 \ \mu M$
		(15 µL d'une solution stock de la protéine
		MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ non marquée (à 400 µM))
MR-34916	[MR-34916] = 1 mM	[MR-34916] = 1 mM
	244 µg	(235 μg dans 555 μL PBS à pH 7
	+ 570 μL PBS à pH 7	$+ 30 \ \mu L D_2 O)$
	+ 30 μL D ₂ O	
	$[MCL-1^{172-327}] = 0 \ \mu M$	$[MCL-1^{172-327}] = 10 \ \mu M$
		(15 µL d'une solution stock de la protéine
		MCL-1172-327 non marquée (à 400 µM))
MR-34917	[MR-34917] = 1 mM	[MR-34917] = 1 mM
	215 µg	(220 µg dans 555 µL PBS à pH 7
	+ 570 μL PBS à pH 7	+ 30 µL D ₂ O)
	+ 30 µL D ₂ O	
	$[MCL-1^{172-327}] = 0 \ \mu M$	$[MCL-1^{172-327}] = 10 \ \mu M$
		(15 µL d'une solution stock de la protéine
		MCL-1 ¹⁷²⁻³²⁷ non marquée (à 400 µM))

Tableau 25. Préparation des échantillons utilisés pour enregistrer les spectres 1D ¹H des trois fragments en absence et en présence de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷

3.4. Les expériences STD

3.4.1. En présence du DMSO

Pour enregistrer l'expérience STD, un échantillon de 600 μ L contenant 20 μ M de la protéine MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ non marquée (soit 30 μ L d'une solution mère à 420 μ M dilué dans 569 μ L d'un mélange PBS/D₂O (95/5)) et 23 mM du DMSO (ce qui correspond à 1 μ L) a été utilisé. L'expérience STD a été enregistrée en utilisant la séquence d'impulsions Bruker stddiffesgp.3, qui permet d'enregistrer des spectres on- et off-résonance d'une manière enchevêtrée. Le spectre de référence a été obtenu par la saturation d'une région sans signal à -16,0 ppm (off-résonance), et le spectre on-résonance avec une fréquence de saturation sélective de la protéine à 8 ppm. La saturation sélective a été assurée par un train d'impulsions Eburp1 de 50 ms (avec une puissance de 8,45*10⁻⁵ W). La durée de saturation était égale à 2 s. Le signal de l'eau a été supprimé par la méthode « excitation sculpting ». Les signaux résiduels de la protéine ont été éliminés à l'aide d'un spin-lock de 40 ms. Le nombre de scans était de 64 (ns 8 * L4 8), la valeur de gain du récepteur était de 512 et le délai de relaxation à 5 s. L'expérience STD a été traitée sous le logiciel TopSpin 3.2 (Bruker). Le calcul des facteurs d'amplifications (STD_{AF}) a été réalisé à l'aide de l'équation (20).

3.4.2. En présence des fragments

Pour chaque fragment, deux expériences STD ont été enregistrées en utilisant les échantillons préparés précédemment (Tableau 25). Nous avons utilisé les mêmes paramètres d'acquisition et de processing adoptés lors de la caractérisation de l'interaction entre la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ et le DMSO, sauf pour la fréquence de la saturation qui était placée à 1,5 ppm.

3.5. La titration de la protéine ¹⁵N MCL-¹¹⁷²⁻³²⁷ par les différents ligands

3.5.1. Optimisation de la préparation des échantillons pour les expériences de titration

La méthode habituelle de titrage consiste à préparer un échantillon qui contient la protéine marquée (ou doublement marquée) et ajouter progressivement une solution stock du ligand de façon à obtenir des différents ratios L:P. Deux spectres RMN de référence (1D et 2D) de la protéine seule sont enregistrés, puis pour chaque ajout de la solution stock du ligand, deux spectres RMN (1D et 2D) sont enregistrés. Les spectres RMN correspondant aux différents ratios L:P sont enfin comparés pour identifier les modifications spectrales liées à l'ajout du ligand. Cependant, l'ajout du ligand peut entraîner des modifications autres que celles liées à l'interaction (variation de pH, dilution, ...), ce qui peut modifier les spectres malgré l'absence d'interaction.

Afin de minimiser le nombre de manipulations au cours d'une expérience de titrage et de réduire ainsi la probabilité d'erreurs systématiques, la procédure suivante a été adoptée : deux échantillons de 600 μ L ont été préparés : le premier contient la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ seule dans un tampon (PBS:D₂O (ou DMSO) = 95:5) et le deuxième contient la protéine ¹⁵N MCL-1¹⁷²⁻³²⁷ avec le ligand, au ratio maximum P:L (Figure 101).

Deux spectre RMN 1D ¹H et 2D ¹H-¹⁵N HSQC sont enregistrés pour chaque échantillon, donnant le point initial et le point final de la série de titrage. La série de titrage est incrémentée par étapes de 0,5, 1 ou 2 équivalents molaires du ligand (Tableau 26). Pour chaque incrémentation, deux spectres RMN 1D ¹H et 2D ¹H-¹⁵N HSQC sont enregistrés. Cette méthode permet de conserver la concentration de la protéine fixe tout au long de titrage évitant ainsi tout effet de dilution par addition du ligand. En outre, parce qu'il y a un point final clairement défini, toute erreur ou changement soudain dans l'état de l'échantillon ne passe pas inaperçue.



Figure 101. Schéma illustratif de la Titration croisée

Tableau 26. Échantillons	utilisés pour	l'enregistrement	des expéi	riences des	titrations	croisées

	Échantillon (1)		Échantillon (2)		Ratios	
					intern	nédiaires
	Ratio P : DMSO =	1:0	Ratio P : DMSO = 1 : 22 38	88	V	Ratios
					10 µL	1:373 (1)
			1^{15} N MCL-IJ = 67 μ M 500 μ L de la solution mère de la protéine		10 µL	1:733 (1)
0	$I^{15}N$ MCL-1]=67 μ M	100I DDC à		1 20 L DPS	10 µL	1:1082(1)
DMS	$500 \mu\text{L}$ de la solution mere de	+00 μL PDS a	a sound	+20 μL PBS	10 µL	1:1588 (1)
	la proteine a south		$[DMSO] = 1500 \dots M$		10 µL	1:2867 (1)
	$+20\mu\mathrm{E}\mathrm{D}_2\mathrm{O}$	[DMSO] = 1500 mM	$+ 20 \mu L D_2 O$	10 µL	1:4532 (1)	
			(10% en volume)	1	10 µL	1:6308 (1)
	[BM30]=0		(1070 en volume)		10 µL	1:8750 (1)
	Ratio $P: L = 1:$	0	Ratio $P : L = 1 : 5$		V	Ratios
	[¹⁵ N MCL-1] = 50 μ M 83 μ L de la solution mère de		$[^{15}N MCL-1] = 50 \mu M$		60uI	1:0,5 (1)
		$MOL_{1} = 50 \mu M$	83 μL de la solution mère de la protéine		oopil	1:4,5 (2)
×			à 363 µM		60 µL	1:1 (1)
cla		+ 30 μL	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			1:4 (2)
ido		DMSO-d ₆	$[Pyridoclax] = 250 \mu M$	+ 487 μL PBS à pH 7	400 T	1:1,5 (1)
yr	la protenie a 305 µm	+ 487 μL PBS	30 µL d'une Sol. Stock du Pyridoclax		100µL	1:3,5 (2)
Ι		à pH 7	à pH 7 dans DMSO-d ₆ à 5 mM.		150T	1:2 (1)
			(Sol. stock préparée avec 1,3mg du		150 µL	1:3 (2)
	[Pyridoclay] = 0 mM		Pyridoclax dans 610 µL du DMSO-d ₆)		200 uT	1:2,5 (1)
					500 µL	1:2,5 (2)
ت ہہ	Ratio P : L = 1 :	0	Ratio $P: L = 1:20$	n	V	Ratios
MF 349	[¹⁵ N MCL-1] = 50 µM	[MR-34911]= 0 mM	[¹⁵ N MCL-1] = 50 µM	[MR-34911] = 1 mM	30 µL	1:1 (1) 1:19 (2)

	83 µL de la solution mère de		83 uL de la solution mère de la protéine	Masse pesée		
	la protéine à 363 µM		à 363 µM	$= 190 \mu g$		
	$\pm 30 \text{ µL} \text{ D}_2\text{O}$		1 000 priz	+ 487 µL	35 µL	1:2 (1)
	1 497 IL DBS			PBS-pH7	p	1:18 (2)
	$+ 46/ \mu L PBS$			+ 30 µL D20		
	pri /			IMR-349161		1.3 (1)
				= 1 mM	40 µL	1.17(2)
16				Masse pesée		, (2)
349		[MR-34916]		$= 230 \mu g$		
r,		= 0 mM		± 487 µI	45 u I	1:4 (1)
Σ				$PBS_{-p}H7$	+5 μL	1:16 (2)
				$\pm 30 \text{ µL D} \cdot 0$		
				1 30 μL D ₂ O		1.6 (1)
				= 1 mM	85 µL	1.0(1) 1.14(2)
17				– Tinni Masse pesée		1.14 (2)
349		[MR-34917]		200 µg	150 µL	1.0(1) 1.12(2)
4		= 0 mM		200 μg		1.12 (2)
Σ				$+ 48/ \mu L$	200T	1:10 (1)
				PDS-pH/	300 µL	1:10 (2)
	\mathbf{D}_{-}	0	$D_{-4} = D_{-1} = 1.20$	$+ 50 \mu L D_2 O$	V	Detine
	$\mathbf{Katto} \mathbf{P} : \mathbf{L} = \mathbf{I} :$	0	Katio P : L = 1 :20		v	1.1 (1)
					$30 \ \mu L$	1.1(1) 1.10(2)
						1.17 (2)
					35 µL	1.2(1) 1.18(2)
	$[^{15}N MCL-1] = 50 \mu M$		$[^{15}N MCL-1] = 50 \mu M$			1:3 (1)
ide	83 μ L de la solution mère de		83 μL de la solution mère de la protéine		40 µL	1.3(1) 1.17(2)
ém	la protéine à 363 μ M	$+ 30 \mu L D_2O$	à 363 μM	+ 487 μL		1:4 (1)
ors		+ 487 μL PBS	PBS	PBS à pH 7	45 µL	1:16 (2)
H		pH 7		$+ 30 \mu\text{L}\text{D}_2\text{O}$		1:6 (1)
					85 µL	1:14 (2)
					450 T	1:8 (1)
	[Torsémide] = 0 mM		[Torsémide] = 1 mM		150 µL	1:12 (2)
	[l'olocimue] o min		Masse pesée = $220 \ \mu g$		300 µT	1:10 (1)
					500 µL	1:10 (2)
	Ratio $P: L = 1:$	0	Ratio P : L = 1 :20	1	V	Ratios
					30 uL	1:1 (1)
						1:19 (2)
					35 µL	1:2 (1)
	[¹⁵ N MCL-1] = 50 μM		$[^{15}N MCL-1] = 50 \mu M$		•	1:18 (2)
rox	95 μL de la solution mère de		95 μL de la solution mère de la protéine		40 µL	1:3(1) 1:17(2)
asi	la protéine à 315 µM	$+ 30 \ \mu L D_2O$	à 315 µM	+475 μL		1:17(2)
Déféra	1 .	+ 475 μL PBS		PBS à pH7	45 µL	1.4(1) 1.16(2)
		à pH 7		$+ 30 \ \mu L D_2O$		1.10 (2)
		Â			85 µL	1.0(1) 1.14(2)
		1				1.17 (2)
			[Déférasirox] = 1 mM		$150 \ \mu L$	1.0(1) 1.12(2)
	[Déférasirox] = 0 mM		$Masse pesée = 220 \mu \alpha$			1.12 (2)
			masse pesee - 220 µg		$300 \ \mu L$	1.10 (1)

3.5.2. Paramètres expérimentaux

Pour chaque ratio, des spectre 1D ¹H et 2D ¹H-¹⁵N HSQC ont été enregistrés avec les paramètres expérimentaux cités dans le Tableau 27.

Expériences	Paramètres d'acquisition				Para	mètres de P	rocessir	ng
		F1(1H)				F1		
	TD	66560			SI	66560		
	SW (ppm)	16,00			WDW	EM		
111	O1(ppm)	4,70		LB	0,3			
	D1(s)	3,00						
Suppression de	P1(µs)	Pyridocla	x:8,00					
l'eau en		Fragmen	t 1 : 11,91					
utilisant le bloc		Fragmen	t 2 : 12,80					
Excitation		Fragmen	t 3 : 12,18					
beulpting	PL1(W)	5,40			1			
	Shape pulse pour la suppression de l'eau	Sinc1.100	00					
	ns	128						
		F1(15N)	F2(1H)	E3(13C)		F1(15N)	F2(1	F3(13
		()	()				H)	C)
	Fn Mode	States-	Traditional	/	FT_mo	States-TPPI	1	Í
		TPPI			de			
	TD	128	1152	/	SI	512	2048	/
¹ H- ¹⁵ N HSQC	SW (ppm)	40,00	12,00	/	WDW	QSINE	QSI NE	/
(fhsacf3epph)	O1(ppm)	118,00	4,70	/	SSB	2	2	/
(moderosppn)	D1(s)	1,00			BC_mo	quad	/	/
. .					de	-		
Suppression	P1(µs)	/	Pyridoclax : 11,54	/	Prédiction	LPFc		
de reau avec			Fragment 1 : 12,00		linéaire	32		
Watergate 3-			Fragment 2 : 13,00			64		
9-19	DI 4 AVD	/	Fragment 3 : 13,56	/				
IBS-Template	PLI(W)	/ 22.50	5,4	/				
(Shapes par	P15(µs)	33,50	/	/				
défaut)	PL3(W)	196 W. h. ć	/	/				
	CPDPKG	waltz6 5						
	I NILI (LI2)	05						
	J-1111 (112)	64						
	Gradients	Sine1.100)					

Tableau 27. Les paramètres expérimentaux utilisés pour l'enregistrement et le traitement des expériencesRMN enregistrées pour la titration de la protéine avec le DMSO (sous TopSpin 3.2)

Le logiciel Sparky[215] a été utilisé pour générer les listes des résonances des différents résidus. Les variations combinées des déplacements chimiques (CCSP) ont été calculés sous Excel selon l'équation (8). L'estimation de la valeur de K_D selon l'équation (17) a été effectuée à l'aide du logiciel CCPNMR[216].

3.6. Détermination des k_{off} et des temps de résidence des ligands en interaction avec la protéine MCL-1 avec le logiciel TITAN

Tous les spectres ¹H ¹⁵N HSQC de la protéines MCL-1 enregistrés lors des expérience des titrations croisées par les différents ligands ont été traités avec NMRPipe. Le script utilisé est le suivant :

```
#!/bin/csh
# "POLY -time" subtracts solvent by polynomial fitting.
# "EXT -left" extracts left half of HN dimension.
nmrPipe -in test.fid \
    nmrPipe -fn SOL \
    nmrPipe -fn EM -lb 4.0 -c 0.5 \
    nmrPipe -fn ZF -size 2048 \
    nmrPipe -fn FT -auto \
}
```

```
-p0 65.0 -p1 0.0 -di -verb
nmrPipe -fn PS
nmrPipe -fn EXT -x1 11.0ppm -xn 5.5ppm -sw
nmrPipe -fn BASE -nw 10 -nl 0% 2% 98% 100%
nmrPipe -fn TP
nmrPipe -fn LP
nmrPipe -fn EM
                   -auto -fb
                   -1b 8.0 -c 1.0.
nmrPipe -fn ZF
                   -size 512
nmrPipe -fn FT
                   -auto
                  -p0 0.0 -p1 0.0 -di
nmrPipe -fn PS
nmrPipe -fn POLY -auto
nmrPipe -fn TP
nmrPipe -fn POLY -auto
nmrPipe -fn TP
nmrPipe -out ./hsqc.ft2 -verb -ov
```

Pour calculer les spectres théoriques, un modèle d'interaction à deux sites a été adopté. Les paramètres définis par défaut ont été utilisés pour estimer les valeurs des K_D et des k_{off}.[204]

١

~~~~~~~~~~

#### 3.7. Étude de la dynamique interne de la protéine

#### 3.7.1. En présence du DMSO

L'étude de la dynamique interne de la protéine a été réalisée en utilisant deux échantillons de 600  $\mu$ L de la protéine MCL-1<sup>172-327</sup> doublement marqué (<sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C) à 237  $\mu$ M. Pour le premier échantillon, la solvant était un mélange PBS/D<sub>2</sub>O (95:5). En revanche, pour le deuxième échantillon, 5% (en volume) du DMSO-d<sub>6</sub> a été rajouté, le solvant était un mélange PBS/D<sub>2</sub>O/DMSO (90:5:5).

Les séquences d'impulsions pseudo-3D décrites dans la partie méthodologie (Voir Partie 2 -4.4.3) ont été utilisées pour mesurer les paramètres de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . Ces expériences permettaient d'enregistrer des séries d'expériences <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC en faisant varier le délai de relaxation  $t_r$ . Un échantillonnage correct des courbes de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  imposait de prendre des points répartis de façon homogène jusqu'à l'extinction du signal. Pour cela nous avons défini une liste de 16 délais pour mesurer le  $T_1$  (vd\_list=20, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 2000, 2300, 2600 et 3000 ms), et une liste des nombres de boucles pour la mesure des  $T_2$  (vc\_list = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20 et 22). Les spectres ont été enregistrés d'une manière aléatoire pour éviter toute erreur systématique. Les principaux paramètres utilisés pour l'acquisition et le traitement des expériences sous TopSpin 3.2 (Bruker) sont résumés dans le Tableau 28.

La mesure de la relaxation croisée ou effet NOE, en absence et en présence du DMSO, a été réalisée à l'aide de deux expériences pseudo 3D. Chacune permet d'avoir deux spectres <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC : un avec saturation des protons amides et l'autre sans saturation. Les principaux paramètres utilisés sont résumés dans le Tableau 28.

| Expériences                                    | P       | Paramètres d'acquisition |                   |             | Paramètres de Processing |        |                               |    |
|------------------------------------------------|---------|--------------------------|-------------------|-------------|--------------------------|--------|-------------------------------|----|
| HSQC <b>T1</b> ETF3GPSI3D                      |         | F3(1H)                   | F2(15N)           | F1          |                          | F3(1H) | F2( <sup>15</sup> N)          | F1 |
|                                                | Fn_mode | DQD                      | Echo-<br>Antiecho | QF          | SI                       | 2048   | 512                           | 16 |
|                                                | TD      | 1536                     | 256               | 16(vd_list) | WDW                      | QSINE  | QSINE                         | /  |
|                                                | SW(ppm) | 16                       | 40                | /           | SSB                      | 2      | 2                             | /  |
|                                                | O1(ppm) | 4,7                      | 118,0             | /           | L_predic                 | /      | LPFC<br>Ncoef 64<br>LPBIN 256 | /  |
|                                                | D1 (s)  | 1                        |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | P1(µs)  | 12,42                    |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | PL1(W)  | 5,4                      |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | P15(µs) |                          | 33,50             |             |                          |        |                               |    |
|                                                | PL3(W)  |                          | 196               |             |                          |        |                               |    |
|                                                | ns      | 64                       |                   |             |                          |        |                               |    |
| HSQC <b>T2</b> ETF3GPSI3D                      |         | F3(1H)                   | F2(15N)           | F1          |                          | F3(1H) | F2(15N)                       | F1 |
|                                                | Fn_mode | DQD                      | Echo-<br>Antiecho | QF          | SI                       | 2048   | 512                           | 16 |
|                                                | TD      | 2048                     | 256               | 16(vc_list) | WDW                      | QSINE  | QSINE                         | /  |
|                                                | SW(ppm) | 16                       | 40                | /           | SSB                      | 2      | 2                             | /  |
|                                                | O1(ppm) | 4,7                      | 118,0             | /           | L_predic                 | /      | LPFC<br>Ncoef 64<br>LPBIN 256 | /  |
|                                                | D1 (s)  |                          | 1                 |             |                          |        |                               |    |
|                                                | P1(µs)  | 12,42                    | /                 | /           |                          |        |                               |    |
|                                                | PL1(W)  | 5,4                      | /                 | /           |                          |        |                               |    |
|                                                | P15(µs) | /                        | 33,50             | /           |                          |        |                               |    |
|                                                | PL3(W)  | /                        | 196               | /           |                          |        |                               |    |
|                                                | ns      |                          | 64                |             |                          |        |                               |    |
| HSQC <b>NOE</b> F3GPSI3D                       |         | F3(1H)                   | F2(15N)           | F1          |                          | F3(1H) | F2(15N)                       | F1 |
| (Modifié)<br>Impulsion de saturatio de 180° au | Fn_mode | DQD                      | Echo-<br>Antiecho | QF          | SI                       | 2048   | 256                           | /  |
| lieu de 120° (spectre on-resonance)            | TD      | 1536                     | 512               | 2           | WDW                      | QSINE  | QSINE                         | /  |
|                                                | SW(ppm) | 16                       | 32                | /           | SSB                      | 2      | 2                             | /  |
|                                                | O1(ppm) | 4,7                      | 115,0             | /           | L_predic                 | /      | LPFC<br>Ncoef 64<br>LPBIN 256 | /  |
|                                                | D1 (s)  | 5                        |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | P1(µs)  | 12,42                    |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | PL1(W)  | 5,4                      |                   |             |                          |        |                               |    |
|                                                | P15(µs) |                          | 33,50             |             |                          |        |                               |    |
|                                                | PL3(W)  |                          | 196               |             |                          |        |                               |    |
|                                                | ns      | 64                       |                   |             |                          |        |                               |    |

| Tableau 28. Les paramètres | expérimentaux u   | utilisés pour l'er | registrement o   | et le traitemen | t des expériences |
|----------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| RMN enregistrées p         | our l'étude de la | dynamique inte     | erne de la prote | éine (sous Toj  | pSpin 3.2)        |

L'estimation des valeurs de T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> et  $NOE_{hétéronucléaire}$  pour l'azote <sup>15</sup>N de chaque résidu a été réalisée à l'aide du logiciel CCPNMR [216].

#### 3.7.2. En présence du Pyridoclax

Pour étudier l'effet du Pyridoclax sur la dynamique interne de la protéine MCL-1<sup>172-327</sup>, les mêmes expériences décrites précédemment ont été enregistrées. Pour des raisons de disponibilité d'échantillon, la concentration en protéine utilisée est moins importante que la première série, 131  $\mu$ M au lieu de 237  $\mu$ M. La fenêtre spectrale de la dimension indirecte a été réduite, de 40 ppm à 21 ppm,

pour augmenter la résolution spectrale. Le reste des paramètres d'acquisition et de processing sont les mêmes que ceux cités dans le Tableau 28.

## 4. Docking sous contraintes RMN

Au cours de notre analyse préliminaire de divers complexes MCL-1 co-cristallisés avec des ligands peptidiques (ou synthétiques), nous avons observé que l'ouverture des poches hydrophobes du domaine BH3, en particulier P2, dépendait des ligands fixés. Par exemple, dans la structure 5FC4 ou 6B4U, la poche hydrophobe P2 est bien ouverte alors que dans la structure 5UUM, elle est fermée. De plus, diverses mutations sont introduites dans la séquence de la protéine MCL-1co-cristallisée et la boucle très flexible entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  a été supprimée pour faciliter la co-cristallisation de MCL-1 avec des ligands synthétiques. Pour ces raisons, nos collègues au CERMN (Caen) ont construit un modèle d'homologie représentatif de la protéine MCL-1 avec une poche P2 assez ouverte. Cette structure a été utilisée pour le Docking, et pour cartographier les « hotspots ».

Le Docking sous contraintes RMN (du Pyridoclax, Torsémide et Déférasirox) a été réalisé en utilisant l'Easy interface de HADDOCK[188]. Le fichier PDB de la protéine MCL-1<sup>172-327</sup> reconstruite a été utilisé comme fichier d'entrée. Pour les ligands, le serveur PRODRG[208] a été utilisé pour générer le fichier PDB sous le format nécessaire pour HADDOCK, à partir de la structure cristallographique, ou les fichiers (.mol) générés par MolView. Les résidus fortement perturbés ont été définis comme résidus actifs. Tous les atomes des ligands ont été définis comme passifs (Tableau 29).

| Licondo     | Protéine                                          | Ligand          |       |            |
|-------------|---------------------------------------------------|-----------------|-------|------------|
| Liganus     | Résidus actifs                                    | Résidus passifs | Actif | Passif     |
| Pyridoclax  | 215, 216, 219, 236, 250, 252, 253, 267, 270, 302, | /               | /     | Toutes les |
|             | 313                                               |                 |       | atomes     |
| Torsémide   | 207, 216, 219, 220, 221, 232, 235, 238, 243, 245, | /               | /     | Toutes les |
|             | 248, 250, 252, 253, 261, 263, 264, 267, 270       |                 |       | atomes     |
| Déférasirox | 216, 217, 219, 220, 228, 232, 234, 235, 236, 238, | /               | /     | Toutes les |
|             | 243, 248, 253, 256, 259, 261, 263, 264, 267, 270  |                 |       | atomes     |

Tableau 29. Les principaux paramètres utilisés lors du Docking sous contraintes RMN avec HADDOCK

Le Docking de la protéine MCL-1<sup>172-327</sup> et le Pyridoclax, avec le logiciel GOLD (v5.5) a été réalisé en utilisant les paramètres par défaut. Le site d'interaction a été défini par une sphère de 10 Å englobant les « hotspots » définis par RMN et centré sur la poche P2.

Pour les fragments, le Docking sous contraintes RMN a été réalisé avec le logiciel Autodock vina [184]. L'interface graphique Autodock Tools 1.5.6 a été utilisée pour préparer les fichiers de la protéine et des fragments pour le Docking ainsi que la boîte de Docking. Les paramètres sont résumés dans le Tableau 30.

| Tableau 30. Les paramètres utilisés lors du Docking des fragments sous contraintes RMN avec Autodock Vina |                          |            |              |              |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|--------------|--------------|--|--|--|--|
| Structure de la protéine                                                                                  | Structure des ligands    | Pas de la  | Taille de la | Centre de la |  |  |  |  |
|                                                                                                           |                          | maille (Å) | boîte (Å)    | boîte        |  |  |  |  |
| Structure reconstruite                                                                                    | Fichier .mol généré par  | 1          | 24 (x)       | -5,4 (x)     |  |  |  |  |
|                                                                                                           | MolView et transformé en |            | 26 (y)       | 5,9 (y)      |  |  |  |  |
|                                                                                                           | format .pdbqt sous       |            | 20 (z)       | -60,0 (z)    |  |  |  |  |
|                                                                                                           | Autodock Tools.          |            |              |              |  |  |  |  |

# 5. Docking à l'aveugle des médicaments et leurs dérivés

Le Docking à l'aveugle des médicaments et leurs dérivés a été réalisé sur toute la surface la protéine MCL-1, soit issue de la structure reconstruite ou bien du modèle 1 de la structure RMN (code PDB 2MHS). Les structures des médicaments et leurs dérivés ont été générées par le serveur MolView et minimisées par le serveur PRODRG[208].

L'interface graphique Autodock Tools 1.5.6 a été utilisée pour préparer les fichiers de la protéine et des médicaments pour le Docking ainsi que la boîte de Docking. Tous les paramètres sont résumés dans Tableau 31.

| Autodock Vina |                          |                         |           |           |           |  |  |
|---------------|--------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|--|--|
| Ligands       | Structure de la protéine | Structure des ligands   | Pas de    | Taille de | Centre de |  |  |
|               |                          |                         | la maille | la boîte  | la boîte  |  |  |
|               |                          |                         | (Å)       | (Å)       |           |  |  |
| Médicaments   | Modèle 1 de la structure | Fichier .mol généré par | 1         | 16 (x)    | -2,2 (x)  |  |  |
| (Docking 1)   | RMN (code PDB 2MHS)      | MolView et transformé   |           | 18 (y)    | -19,8 (y) |  |  |
| Selon la      |                          | en format .pdbqt sous   |           | 20 (z)    | 2,9 (z)   |  |  |
| littérature   |                          | Autodock Tools.         |           |           |           |  |  |
|               |                          |                         |           |           |           |  |  |
| Médicaments   | Modèle 1 de la structure | Fichier .mol généré par | 1         | 48 (x)    | -2,2 (x)  |  |  |
| (Docking 2)   | RMN (code PDB 2MHS)      | MolView et transformé   |           | 50 (y)    | -19,8 (y) |  |  |
|               |                          | en format .pdbqt sous   |           | 54 (z)    | -2,3 (z)  |  |  |
|               |                          | Autodock Tools.         |           |           |           |  |  |
| Dérivés des   | Structure reconstruite   | Fichier .mol généré par | 1         | 40 (x)    | -7,1 (x)  |  |  |
| Torsémide et  |                          | MolView et transformé   |           | 40 (y)    | 0,2 (y)   |  |  |
| Déférasirox   |                          | en format .pdbqt sous   |           | 40 (z)    | -50,0 (z) |  |  |
|               |                          | Autodock Tools.         |           |           |           |  |  |

Tableau 31. Les principaux paramètres utilisés lors du Docking à l'aveugle des médicaments avec

Afin de définir les types d'interactions établies entre les différents ligands et la protéine MCL-1<sup>172-327</sup>, tous les modèles obtenus par Docking ont été analysés par le serveur PLIP [209]. Les résultats ont été visualisés à l'aide du logiciel PyMol.[214]

# BIBLIOGRAPHIE
[1] D. Hanahan *et al.*, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, 144(5), 646–674, **2011**.

[2] C. Fitzmaurice *et al.*, "The Global Burden of Cancer 2013," *JAMA Oncol.*, 1(4), 505–527, **2015**.

[3] B. Trétarre *et al.*, "Ovarian cancer in France: trends in incidence, mortality and survival, 1980-2012," *Gynecol. Oncol.*, 39(2), 324–329, **2015**.

[4] R. Agarwal *et al.*, "Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, 3(7), 502–516, **2003**.

[5] Z. H. Siddik, "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance," *Oncogene*, 22(47), 7265–7279, **2003**.

[6] E. Brotin *et al.*, "Bcl-x<sub>L</sub> and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis," *Int. J. Cancer*, 126(4), 885-895, **2010**.

[7] M. F. van Delft *et al.*, "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized," *Cancer Cell*, 10(5), 389–399, **2006**.

[8] C. Tse *et al.*, "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor," *Cancer Res.*, 68(9), 3421–3428, **2008**.

[9] C. Gloaguen *et al.*, "First Evidence That Oligopyridines, α-Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-xL-Targeting Strategies," *J. Med. Chem.*, 58(4), 1644–1668, **2015**.

[10] J. F. Kerr *et al.*, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, 26(4), 239-257, **1972**.

[11] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicol. Pathol.*, 35(4), 495–516, **2007**.

[12] M. D. Jacobson *et al.*, "Programmed Cell Death in Animal Development," *Cell*, 88(3), 347–354, **1997**.

[13] Y. Fuchs *et al.*, "Programmed cell death in animal development and disease," *Cell*, 147(4), 742–758, **2011**.

[14] S. J. Martin *et al.*, "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?," *Cell*, 82(3), 349–352, **1995**.

[15] A. M. Chinnaiyan et al., "The cell-death machine," Curr. Biol., 6(5), 555–562, 1996.

[16] E. White, "Life, death, and the pursuit of apoptosis.," *Genes Dev.*, 10(1), 1–15, **1996**.

[17] A. Ashkenazi *et al.*, "Death receptors: signaling and modulation," *Science*, 281(5381), 1305–1308, **1998**.

[18] P. Schneider *et al.*, "Apoptosis induced by death receptors," *Pharm. Acta Helv.*, 74(2–3), 281–286, **2000**.

[19] R. S. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, 30:87, **2011**.

[20] A. Cuconati *et al.*, "DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells," *Genes Dev.*, 17(23), 2922–2932, **2003**.

[21] H. Puthalakath *et al.*, "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim," *Cell*, 129(7), 1337–1349, **2007**.

[22] D. Westphal *et al.*, "Molecular biology of Bax and Bak activation and action," *Biochim. Biophys. Acta*, 1813(4), 521–531, **2011**.

[23] J. E. Chipuk *et al.*, "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario," *Cell Death Differ.*, 13(8), 1396–1402, **2006**.

[24] X. Saelens *et al.*, "Toxic proteins released from mitochondria in cell death," *Oncogene*, 23(16), 2861–2874, **2004**.

[25] G. Kroemer *et al.*, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiol. Rev.*, 87(1), 99–163, **2007**.

[26] I. N. Lavrik *et al.*, "Caspases: pharmacological manipulation of cell death," J. Clin. Invest., 115(10), 2665–2672, **2005**.

[27] P. Saikumar *et al.*, "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease," *Am. J. Med.*, 107(5), 489–506, **1999**.

[28] S. Kalimuthu *et al.*, "Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds," *Int. J. Mol. Sci.*, 14(2), 2334–2354, **2013**.

[29] P. Engel *et al.*, "Expression of bcl-2 in fetal thymus, thymomas and thymic carcinomas," *Apmis*,

106(4), pp. 449–455, **1998**.

[30] N. N. Danial, "BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death," *Clin. Cancer Res.*, 13(24), 7254–7263, **2007**.

[31] Y. Tsujimoto *et al.*, "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation," *Science*, 226(4678), 1097–1099, **1984**.

[32] D. L. Vaux *et al.*, "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells," *Nature*, 335(6189), 440–442, **1988**.

[33] R. J. Youle *et al.*, "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(1), 47–59, **2008**.

[34] K. M. Kozopas *et al.*, "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(8), 3516–3520, **1993**.

[35] L. H. Boise *et al.*, "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death," *Cell*, 74(4), 597–608, **1993**.

[36] Z. N. Oltvai *et al.*, "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death," *Cell*, 74(4), 609–619, **1993**.

[37] T. Chittenden *et al.*, "Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak," *Nature*, 374(6524), 733–736, **1995**.

[38] K. Wang et al., "BID: a novel BH3 domain-only death agonist," Genes Dev., 10(22), 2859–2869, **1996**.

[39] E. Y. Lin *et al.*, "Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2.," *J. Immunol.*, 151(4), 1979–1988, **1993**.

[40] S. S. Choi *et al.*, "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow," *Oncogene*, 11(9), 1693–1698, **1995**.

[41] E. Yang *et al.*, "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death," *Cell*, 80(2), 285–291, **1995**.

[42] L. Gibson *et al.*, "bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival," *Oncogene*, 13(4), 665–675, **1996**.

[43] L. O'Connor *et al.*, "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis," *EMBO J.*, 17(2), 384–395, **1998**.

[44] Q. Song *et al.*, "Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1.," *EMBO J.*, 18(1), 167–178, **1999**.

[45] E. Oda *et al.*, "Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis," *Science*, 288(5468), 1053–1058, **2000**.

[46] A. Scorilas *et al.*, "Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family," *Genomics*, 72(2), 217–221, **2001**.

[47] M. G. Hinds *et al.*, "Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets," *Cell Death Differ.*, 14(1), 128–136, **2007**.

[48] G. Dewson, "Interplay of Bcl-2 Proteins Decides the Life or Death Fate," *Open Cell Signal. J.*, 3, 3–8, **2011**.

[49] A. Kelekar *et al.*, "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis," *Trends Cell Biol.*, 8(8), 324–330, **1998**.

[50] L. Vela *et al.*, "Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside," *Curr. Opin. Pharmacol.*, 23, 74–81, **2015**.

[51] W. Kong *et al.*, "Experimental Characterization of the Binding Affinities between Proapoptotic BH3 Peptides and Antiapoptotic Bcl-2 Proteins," *ChemMedChem*, 13(17), 1763–1770, **2018**.

[52] Z. N. Oltval *et al.*, "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death," *Cell*, 74(4), 609–619, **1993**.

[53] T. W. Sedlak *et al.*, "Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(17), 7834–7838, **1995**.

[54] X.-M. Yin *et al.*, "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax," *Nature*, 369(6478), 321–323, **1994**.

[55] T. Chittenden et al., "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell

death and protein binding functions," EMBO J., 14(22), 5589–5596, 1995.

[56] J. C. Reed *et al.*, "Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 406, 99–112, **1996**.

[57] M. Kvansakul *et al.*, "Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands," *Cell Death Differ.*, 15(10), 1564–1571, **2008**.

[58] M. Hanada, C. Aimé-Sempé, T. Sato, and J. C. Reed, "Structure-Function Analysis of Bcl-2 Protein identification of conserved domains important for homodimerizationwith Bcl-2 and heterodimerization with Bax," *J. Biol. Chem.*, 270(20), 11962–11969, **1995**.

[59] E. Peherstorfer *et al.*, "Effects of microinjection of synthetic Bcl-2 domain peptides on apoptosis of renal tubular epithelial cells," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 283(1), 190-196, **2002**.

[60] D. W. Andrews *et al.*, "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death," *Cell Death Differ.*, 25(1), 65–80, **2018**.

[61] A. Letai *et al.*, "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics," *Cancer Cell*, 2(3), 183–192, **2002**.

[62] T. Kuwana *et al.*, "BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly," *Mol. Cell*, 17(4), 525–535, **2005**.

[63] A. Shamas-Din *et al.*, "Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(4), a008714, **2013**.

[64] M. Giam *et al.*, "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death," *Oncogene*, 27 (Suppl 1), S128-136, **2008**.

[65] B. Leber *et al.*, "Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions," *Oncogene*, 29(38), 5221–5230, **2010**.

[66] R. W. Craig *et al.*, "Human and mouse chromosomal mapping of the myeloid cell leukemia-1 gene: MCL1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in preneoplastic and neoplastic disease," *Genomics*, 23(2), 457–463, **1994**.

[67] J. Bae *et al.*, "MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain," *J. Biol. Chem.*, 275(33), 25255– 25261, **2000**.

[68] C. D. Bingle *et al.*, "Exon Skipping in Mcl-1 Results in a Bcl-2 Homology Domain 3 Only Gene Product That Promotes Cell Death," *J. Biol. Chem.*, 275(29), 22136–22146, **2000**.

[69] J.-H. Kim *et al.*, "MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death," *FEBS Lett.*, 583(17), 2758–2764, **2009**.

[70] J. Michels *et al.*, "Mcl-1," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37(2), 267–271, **2005**.

[71] G. Morciano *et al.*, "Intersection of mitochondrial fission and fusion machinery with apoptotic pathways: Role of Mcl-1," *Biol. Cell*, 108(10), 279–293, **2016**.

[72] L. W. Thomas *et al.*, "Mcl-1; the molecular regulation of protein function," *FEBS Lett.*, 584(14), 2981–2989, **2010**.

[73] T. Yang *et al.*, "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2.," *J Cell Biol*, 128(6), 1173–1184, **1995**.

[74] C. L. Day *et al.*, "Solution Structure of Prosurvival Mcl-1 and Characterization of Its Binding by Proapoptotic BH3-only Ligands," *J. Biol. Chem.*, 280(6), 4738–4744, **2005**.

[75] G. Liu *et al.*, "High-Quality NMR Structure of Human Anti-Apoptotic Protein Domain Mcl-1(171-327) for Cancer Drug Design," *PLoS ONE*, 9(5), e96521, **2014**.

[76] E. F. Lee *et al.*, "Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family," *Cell Death Differ.*, 14(9), 1711–1713, **2007**.

[77] P. E. Czabotar *et al.*, "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(1), 49–63, **2014**.

[78] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.2.0 Schrödinger, LLC.

[79] D. L. Walensky *et al.*, "The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer," *Nat. Chem. Biol.*, 6(8), 595–601, **2010**.

[80] P. E. Czabotar *et al.*, "Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with prosurvival proteins and promotes apoptosis," *J.Biol.Chem.*, 286(9), 7123–7131, **2011**. [81] J. A. Miles *et al.*, "Hydrocarbon constrained peptides - understanding preorganisation and binding affinity.," *Chem Sci*, 7(6), 3694–3702, **2016**.

[82] Q. Liu *et al.*, "Apoptotic Regulation by MCL-1 through Heterodimerization," *J. Biol. Chem.*, 285(25), 19615–19624, **2010**.

[83] E. Fire *et al.*, "Mcl-1-Bim complexes accommodate surprising point mutations via minor structural changes.," *Protein Sci*, 19(3), 507–519, **2010**.

[84] J. L. Rinkenberger *et al.*, "Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality," *Genes Dev.*, 14(1), 23–27, **2000**.

[85] S. Jamil *et al.*, "An Essential Role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 Phosphorylation," *Mol. Biol. Cell*, 19(8), 3212–3220, **2008**.

[86] D. Yecies *et al.*, "Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1," *Blood*, 115(16), 3304–3313, **2010**.

[87] J. Michels *et al.*, "MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells," *Biochem. Pharmacol.*, 92(1), 55–61, **2014**.

[88] B. J. Lestini *et al.*, "Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists," *Cancer Biol. Ther.*, 8(16), 1587–1595, **2009**.

[89] S. Habata *et al.*, "BAG3-mediated Mcl-1 stabilization contributes to drug resistance via interaction with USP9X in ovarian cancer," *Int. J. Oncol.*, 49(1), 402–410, **2016**.

[90] K. Shigemasa *et al.*, "Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas," *Jpn. J. Cancer Res. Gann*, 93(5), 542–550, **2002**.

[91] T. Oltersdorf *et al.*, "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours," *Nature*, 435(7042), 677–681, **2005**.

[92] M. Abid *et al.*, "Recent Advances in Cancer Drug Development: Targeting Induced Myeloid Cell Leukemia-1 (Mcl-1) Differentiation Protein," *Curr. Med. Chem.*, 24(40), 4488–4514, **2017**.

[93] L. D. Walensky *et al.*, "Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix," *Science*, 305(5689), 1466–1470, **2004**.

[94] A. M. Beekman *et al.*, "Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1," *ChemMedChem*, 11(8), 802–813, **2016**.

[95] Q. Chu *et al.*, "Towards understanding cell penetration by stapled peptides," *MedChemComm*, 6(1), 111–119, **2015**.

[96] G. L. Verdine *et al.*, "An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides," *J. Am. Chem. Soc.*, 122(24), 5891–5892, **2000**.

[97] A. Muppidi *et al.*, "Rational Design of Proteolytically Stable, Cell-Permeable Peptide-Based Selective Mcl-1 Inhibitors," *J. Am. Chem. Soc.*, 134(36), 14734–14737, **2012**.

[98] A. Muppidi *et al.*, "Synthesis of cell-permeable stapled BH3 peptide-based Mcl-1 inhibitors containing simple aryl and vinylaryl cross-linkers," *Tetrahedron*, 70(42), 7740–7745, **2014**.

[99] A. E. Keating *et al.*, "Designed BH3 Peptides with High Affinity and Specificity for Targeting Mcl-1 in Cells," *ACS Chem. Biol.*, 9(9), 1962–1968, **2014**.

[100] M. R. Arkin *et al.*, "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality," *Chem. Biol.*, 21(9), 102–1114, **2014**.

[101] D. Kögel, "Exploiting BH3 Mimetics for cancer Therapy," in J. Neuzil et al. (eds.), "Mitochondria: The Anti-cancer Target for the Third Millennium," 39–58, **2014**.

[102] C. Billard, "BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments," *Mol. Cancer Ther.*, 12(9), 1691–1700, **2013**.

[103] M. De Giorgi *et al.*, "Targeting the BH3 domain of Bcl-2 family proteins. A brief history from natural products to foldamers as promising cancer therapeutic avenues," *Curr. Med. Chem.*, 20(24), 2964–2978, **2013**.

[104] J. Wei *et al.*, "Apogossypol Derivatives as Pan-Active Inhibitors of Antiapoptotic B-Cell Lymphoma/Leukemia-2 (Bcl-2) Family Proteins," *J. Med. Chem.*, 52(14), 4511–4523, **2009**.

[105] J. Wei *et al.*, "Apogossypol derivatives as antagonists of antiapoptotic Bcl-2 family proteins," *Mol. Cancer Ther.*, 8(4), 904–913, **2009**.

[106] G. Lessene *et al.*, "BCL-2 family antagonists for cancer therapy," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7(12), 989–1000, **2008**.

[107] A. Friberg et al., "Discovery of Potent Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using

Fragment-Based Methods and Structure-Based Design," J. Med. Chem., 56(1), 15-30, 2013.

[108] J. P. Burke *et al.*, "Discovery of Tricyclic Indoles That Potently Inhibit Mcl-1 Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design," *J. Med. Chem.*, 58(9), 3794–3805, **2015**.

[109] N. F. Pelz *et al.*, "Discovery of 2-Indole-acylsulfonamide Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods," *J. Med. Chem.*, 59(5), 2054–2066, **2016**.

[110] T. Lee *et al.*, "Discovery and Biological Characterization of Potent Myeloid Cell Leukemia-1 (Mcl-1) Inhibitors," *FEBS Lett.*, 591(1), 240–251, **2017**.

[111] A. Kotschy *et al.*, "The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models," *Nature*, 538(7626), 477–482, **2016**.

[112] R. M. Mohammad *et al.*, "Preclinical Studies of TW-37, a New Nonpeptidic Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, in Diffuse Large Cell Lymphoma Xenograft Model Reveal Drug Action on Both Bcl-2 and Mcl-1," *Clin. Cancer Res.*, 13(7), 2226–2235, **2007**.

[113] M. Nguyen *et al.*, "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(49), 19512–19517, **2007**.

[114] A. Ashkenazi *et al.*, "From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 16,(4), 273–284, **2017**.

[115] F. Abulwerdi *et al.*, "A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo," *Mol. Cancer Ther.*, 13(3), 565–575, **2014**.

[116] J. D. Leverson *et al.*, "Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate ontarget cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax)," *Cell Death Dis.*, 6(1), e1590, **2015**.

[117] S. Hedir, "Évaluation préclinique du potentiel thérapeutique des molécules inhibitrices de Mcl-1 au sein de la famille des oligopyridines pour le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants," Thèse de doctorat en Biologie, sous la direction de Laurent Poulain, Caen, 2017, 323 pages.

[118] J. Janin, "Protein-protein recognition," Prog. Biophys. Mol. Biol., 64(2), 145–166, 1995.

[119] X. Du *et al.*, "Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods," *Int. J. Mol. Sci.*, 17(2), E144, **2016**.

[120] H. Li *et al.*, "Physicochemical bases for protein folding, dynamics, and protein-ligand binding," *Sci. China Life Sci.*, 57(3), 287–302, **2014**.

[121] F. W. Lichtenthaler, "100 Years'Schlüssel-Schloss-Prinzip': What Made Emil Fischer Use this Analogy?," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33(2324), 2364–2374, **1995**.

[122] S. M. Sullivan *et al.*, "Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(37), 13829–13834, **2008**.

[123] D. E. Koshland, "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis\*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 44(2), 98–104, **1958**.

[124] P. Csermely *et al.*, "Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events," *Trends Biochem. Sci.*, 35(10), 539–546, **2010**.

[125] S. Leavitt *et al.*, "Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11(5), 560–566, **2001**.

[126] Michael M. Pierce *et al.*, "Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions," *METHODS*, 19(2), 213–221, **1999**.

[127] "Calorimètre de titration isotherme MicroCal VP-ITC de Malvern." https://www.malvernpanalytical.com

[128] K. Bouchemal, "New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry," *Drug Discov. Today*, 13(21–22), 960–972, **2008**.

[129] T. Krell, "Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology," *Microb. Biotechnol.*, 1(2), 126–136, **2008**.

[130] M. W. Freyer *et al.*, "Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions," *Methods Cell Biol.*, 84, 79–113, 2008.
[131] M. L. Doyle *et al.*, "Tight binding affinities determined from thermodynamic linkage to protons by titration calorimetry," in *Methods in Enzymol.*, 259, 183–194, 1995.

[132] R. Ghai et al., "Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research--

survey of the literature from 2010," J. Mol. Recognit. JMR, 25(1), 32–52, 2012.

[133] S. G. Patching, "Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery," *Biochim. Biophys. Acta*, 1838(1), 43–55, **2014**.

[134] P. L. Kastritis *et al.*, "On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact," *J. R. Soc. Interface*, 10(79), p. 20120835, **2013**.

[135] W. A. Lea *et al.*, "Fluorescence polarization assays in small molecule screening," *Expert Opin*. *Drug Discov.*, 6(1), 17–32, **2011**.

[136] D. Jameson *et al.*, "Fluorescence Polarization: Past, Present and Future," *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 6(3), 167–176, **2003**.

[137] D. J. R. Laurence, "A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence," *Biochem. J.*, 51(2), 168–180, **1952**.

[138] H. Zhang *et al.*, "Fluorescence anisotropy (polarization): from drug screening to precision medicine," *Expert Opin. Drug Discov.*, 10(11), 1145–1161, **2015**.

[139] J. Keeler, "Comprendre la RMN," Lausanne, PPUR, 2015

[140] E. Barile *et al.*, "NMR-Based Approaches for the Identification and Optimization of Inhibitors of Protein–Protein Interactions," *Chem. Rev.*, 114(9), 4749–4763, **2014**.

[141] O. Cala *et al.*, "NMR-based analysis of protein–ligand interactions," *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(4), 943–956, **2014**.

[142] B. Meyer *et al.*, "NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42(8), 864–890, **2003**.

[143] C. Aguirre *et al.*, "Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR: Probing Protein-Ligand Interactions By NMR," in J. E. Coligan *et al.* (eds), "Current Protocols in Protein Science," 17.18.1-17.18.24, **2015**.

[144] J. Orts *et al.*, "Structure determination of protein-ligand complexes by NMR in solution," *Methods*, 138–139, 3–25, **2018**.

[145] S. Mori *et al.*, "Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation," *J. Magn. Reson. B*, 108(1), 94–98, **1995**.

[146] A. Marintchev *et al.*, "NMR methods for studying protein-protein interactions involved in translation initiation," *Methods Enzymol.*, 430, 283–331, **2007**.

[147] M. P. Williamson, "Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 73, 1–16, **2013**.

[148] L. Fielding, "NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 51(4), 219–242, **2007**.

[149] R. Khattri *et al.*, "An NMR-Guided Screening Method for Selective Fragment Docking and Synthesis of a Warhead Inhibitor," *Molecules*, 21(7), E846, **2016**.

[150] L.E. Kay, "Protein dynamics from NMR," Biochem. Cell Biol., 76, 513-517, 1998.

[151] R. Ishima et al., "Protein dynamics from NMR," Nat. Struct. Mol. Biol., 7(9), 740–743, 2000.

[152] D. M. Dias *et al.*, "NMR approaches in structure-based lead discovery: Recent developments and new frontiers for targeting multi-protein complexes," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 116(2–3), 101–112, **2014**.

[153] L. E. Kay *et al.*, "The measurement of heteronuclear transverse relaxation times in ax3 spin systems via polarization-transfer techniques," *J. Magn. Reson. 1969*, 100(3), 538–558, **1992**.

[154] L. E. Kay, "NMR studies of protein structure and dynamics," J. Magn. Reson., 173(2), 193–207, 2005.

[155] I. R. Kleckner *et al.*, "An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, 1814(8), 942–968, **2011**.

[156] G. Zhu *et al.*, "Protein Dynamics Measurements by TROSY-Based NMR Experiments," J. Magn. Reson., 143(2), 423–426, 2000.

[157] J. Cavanagh *et al.*, "Protein NMR Spectroscopy," USA, Elsevier, **2007**.

[158] S. Akoka, "Une introduction à la RMN," cours accessible en ligne (http://www.sciences.univ-nantes.fr/CEISAM)

[159] C. Renner et al., "Practical aspects of the 2D 15N-{1H}-NOE experiment," J. Biomol. NMR,

23(1), 23-33, 2002.

[160] M. P. Williamson, "The Transferred NOE," in G. A. Webb (eds), "Modern Magnetic Resonance," 1357–1362, **2006**.

[161] P. Balaram *et al.*, "Negative nuclear Overhuaser effects as probes of macromolecular structure," *J. Am. Chem. Soc.*, 94(11), 4015–4017, **1972**.

[162] S. Forsén *et al.*, "Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance," *J. Chem. Phys.*, 39(11), 2892–2901, **1963**.

[163] M. Mayer *et al.*, "Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor," *J. Am. Chem. Soc.*, 123(25), 6108–6117, **2001**.

[164] A. Viegas *et al.*, "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding," *J. Chem. Educ.*, 88(7), 990–994, **2011**.

[165] J. Angulo *et al.*, "Ligand–Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates," *Chem. – Eur. J.*, 16(26), 7803–7812, **2010**.

[166] J. Fisher, "Modern NMR Techniques for Synthetic Chemistry," UK, CRC Press, 2014.

[167] C. Dalvit *et al.*, "Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water\*," *J. Biomol. NMR*, 18(1), 65–68, **2000**.

[168] C. Dalvit *et al.*, "WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability," *J. Biomol. NMR*, 21(4), 349–359, **2001**.

[169] M. del C. Fernández-Alonso *et al.*, "Protein-Carbohydrate Interactions Studied by NMR: From Molecular Recognition to Drug Design," *Curr. Protein Pept. Sci.*, 13(8), 816–830, **2012**.

[170] J. Hu *et al.*, "Aroma WaterLOGSY: a fast and sensitive screening tool for drug discovery," *Magn. Reson. Chem.*, 48(12), 909–911, **2010**.

[171] A. Antanasijevic *et al.*, "Comparison of the sensitivities of WaterLOGSY and saturation transfer difference NMR experiments," *J. Biomol. NMR*, 60(1), 7–44, **2014**.

[172] T. L. Blundell *et al.*, "High-throughput crystallography for lead discovery in drug design," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1(1), 45–54, **2002**.

[173] I. D. Kuntz *et al.*, "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions," *J. Mol. Biol.*, 161(2), 269–288, **1982**.

[174] S. F. Sousa *et al.*, "Protein-ligand docking in the new millennium--a retrospective of 10 years in the field," *Curr. Med. Chem.*, 20(18), 2296–2314, **2013**.

[175] R. D. Taylor *et al.*, "A review of protein-small molecule docking methods," *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 16(3), 151–166, **2002**.

[176] D. B. Kitchen *et al.*, "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(11), 935–949, **2004**.

[177] J. Scott *et al.*, "An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids," *J. Comput. Chem.*, 7(2), 230-252, **1986**.

[178] B. R. Brooks *et al.*, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations," *J. Comput. Chem.*, 4(2), 187-217, **1983**.

[179] G. M. Morris *et al.*, "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function," *J. Comput. Chem.*, 19(14), 1639–1662, **1998**.

[180] N. Metropolis *et al.*, "Equation of State Calculations by Fast Computing Machines," *J. Chem. Phys.*, 21(6), 1087–1092, **1953**.

[181] J. H. Holland, "Adaptation in Natural and Artificial Systems : An Introductory Analysis with Applications to Biology, Control and Artificial Intelligence," USA, MIT Press, **1992**.

[182] R. Huey *et al.*, "A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation," *J. Comput. Chem.*, 28(6), 1145–1152, **2007**.

[183] R. Wang *et al.*, "Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction," *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 16(1), 11–26, **2002**.

[184] O. Trott *et al.*, "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading," *J. Comput. Chem.*, 31(2), 455–461, **2010**. [185] M. L. Verdonk *et al.*, "Improved protein-ligand docking using GOLD," *Proteins*, 52(4), 609–623, **2003**. [186] S. J. de Vries *et al.*, "WHISCY: what information does surface conservation yield? Application to data-driven docking," *Proteins*, 63(3), 479–489, **2006**.

[187] S. J. de Vries *et al.*, "How proteins get in touch: interface prediction in the study of biomolecular complexes," *Curr. Protein Pept. Sci.*, 9(4), 394–406, **2008**.

[188] G. C. P. van Zundert *et al.*, "The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes," *J. Mol. Biol.*, 428(4), 720–725, **2016**.

[189] A. T. Brünger *et al.*, "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination," *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 54(Pt 5), 905–921, **1998**.

[190] C. D. Schwieters *et al.*, "The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package," *J. Magn. Reson.*, 160(1), 65–73, **2003**.

[191] S. J. de Vries *et al.*, "The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking," *Nat. Protoc.*, 5(5), 883–897, **2010**.

[192] S. Grzesiek *et al.*, "Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein," *J. Magn. Reson.*, 96(2), 432–440, **1992**.

[193] S. Grzesiek *et al.*, "Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly 13C/15N-enriched proteins," *J. Biomol. NMR*, 3(2), 185–204, **1993**.

[194] D. S. Wishart *et al.*, "1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects," *J. Biomol. NMR*, 5(1), 67–81, **1995**.

[195] Z. Zhang *et al.*, "Novel soluble myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) inhibitor (E,E)-2-(benzylaminocarbonyl)-3-styrylacrylonitrile (4g) developed using a fragment-based approach," *Eur. J. Med. Chem.*, 59, 141–149, **2013**.

[196] D. A. Pereira *et al.*, "Origin and evolution of high throughput screening," *Br. J. Pharmacol.*, 152(1), 53–61, **2007**.

[197] R. L. Perlman *et al.*, "Dimethyl sulfoxide: an inhibitor of liver alcohol dehydrogenase," *Science*, 160(3825), 317–319, **1968**.

[198] H. Jóhannesson *et al.*, "Dimethyl sulfoxide binding to globular proteins: A nuclear magnetic relaxation dispersion study," *Protein Sci.*, 6(8), 1756–1763, **1997**.

[199] C. Dalvit *et al.*, "Use of organic solvents and small molecules for locating binding sites on proteins in solution\*," *J. Biomol. NMR*, 14(1), 23–32, **1999**.

[200] C. A. Hunter, "Quantifying Intermolecular Interactions: Guidelines for the Molecular Recognition Toolbox," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43(40), 5310–5324, **2004**.

[201] Sankararamakrishnan *et al.*, "Binding affinity of pro-apoptotic BH3 peptides for the antiapoptotic Mcl-1 and A1 proteins: Molecular dynamics simulations of Mcl-1 and A1 in complex with six different BH3 peptides," *J. Mol. Graph. Model.*, 73, 115–128, **2017**.

[202] A. Wang *et al.*, "Mechanism of Mcl-1 Conformational Regulation Upon Small Molecule Binding Revealed by Molecular Dynamic Simulation," *Chem. Biol. Drug Des.*, 87(4), 551–561, **2016**.

[203] M. Krzeminski *et al.* "minoes: a new approach to select a representative ensemble of structures in nmr studies of (partially) unfolded states. application to d25-pyp," *Proteins*, 74, 894-905, **2009**.

[204] C. A. Waudby *et al.*, "Two-Dimensional NMR Lineshape Analysis," *Sci. Rep.*, 6, p. 24826, **2016**.

[205] S. Wiesner *et al.*, "Methyl groups as NMR probes for biomolecular interactions," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 35, 60–67, **2015**.

[206] O. Cala *et al.*, "Ligand-Orientation Based Fragment Selection in STD NMR Screening," *J. Med. Chem.*, 58(21), 8739–8742, **2015**.

[207] H. Bergwerf, "MolView: an attempt to get the cloud into chemistry classrooms," Fall 2015 Newsletter.

[208] A. W. Schüttelkopf *et al.*, "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of proteinligand complexes," *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60(Pt 8), 1355–1363, **2004**.

[209] S. Salentin *et al.*, "PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler," *Nucleic Acids Res.*, 43(Web Server issue), W443–W447, **2015**.

[210] A. O. Samson *et al.*, "Virtual screening for potential inhibitors of Mcl-1 conformations sampled by normal modes, molecular dynamics, and nuclear magnetic resonance," *Drug Des. Devel. Ther.*, 11, 1803–1813, **2017**.

[211] A. Degterev *et al.*, "Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl- $x_L$ ," *Nat. Cell Biol.*, 3(2), 173–182, **2001**.

[212] E. P. Gillis *et al.*, "Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry," J. Med. Chem., 58(21), 8315–8359, **2015**.

[213] S. Hedir *et al.*, "Structure-guided design of pyridoclax derivatives based on Noxa / Mcl-1 interaction mode," *Eur. J. Med. Chem.*, 159, 357–380, **2018**.

[214] F. Delaglio *et al.*, "NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes," *J. Biomol. NMR*, 6(3), 277–293, **1995**.

[215] W. Lee *et al.*, "NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy," *Bioinforma. Oxf. Engl.*, 31(8), 1325–1327, **2015**.

[216] W. F. Vranken *et al.*, "The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline," *Proteins*, 59(4), 687–696, **2005**.

## **ANNEXES**

## Annexe I

#### • Attribution des signaux ( $H^N$ , N, $C\alpha$ et $C\beta$ ) de la protéine MCL-1<sup>172-327</sup>

L'attribution a été menée en utilisant un échantillon doublement marqué (<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N MCL-1) à 298 K et à pH 7 en utilisant un spectromètre Bruker 600MHz équipé d'une cryosonde.

| Numéro | Résidu | N(ppm) | H(ppm) | C <sub>α</sub> (ppm) | C <sub>β</sub> (ppm) |
|--------|--------|--------|--------|----------------------|----------------------|
| 172    | Asp    | /      | /      | 50,76                | 38,52                |
| 173    | Glu    | 124,83 | 8,66   | -60,60               | -78,43               |
| 174    | Leu    | 120,93 | 8,35   | 55,83                | 38,47                |
| 175    | Tyr    | 124,28 | 8,41   | 60,27                | 35,97                |
| 176    | Arg    | 118,63 | 8,51   | 57,34                | 27,45                |
| 177    | Gln    | 119,68 | 8,91   | 56,37                | 26,55                |
| 178    | Ser    | 113,89 | 8,04   | 59,52                | 61,22                |
| 179    | Leu    | 121,59 | 8,62   | 54,49                | 38,85                |
| 180    | Glu    | 121,08 | 7,85   | 57,36                | 27,18                |
| 181    | Ile    | 118,04 | 7,41   | 63,27                | 36,82                |
| 182    | Ile    | 117,97 | 8,40   | 64,10                | 34,80                |
| 183    | Ser    | 114,22 | 9,08   | 59,91                | 59,75                |
| 184    | Arg    | 119,29 | 7,68   | 56,38                | 27,36                |
| 185    | Tyr    | 120,06 | 8,36   | 58,60                | 40,56                |
| 186    | Leu    | 118,92 | 8,62   | 57,01                | 37,83                |
| 187    | Arg    | 116,47 | 8,07   | 57,77                | 27,43                |
| 188    | Glu    | 121,44 | 8,27   | 56,47                | 27,35                |
| 189    | Gln    | 120,23 | 8,22   | 55,58                | 26,72                |
| 190    | Ala    | 118,02 | 7,89   | 51,96                | 17,77                |
| 191    | Thr    | 104,04 | 8,03   | 59,84                | 68,84                |
| 192    | Gly    | 111,86 | 8,18   | 43,06                | -                    |
| 193    | Ala    | 123,19 | 7,78   | 48,36                | 18,00                |
| 194    | Lys    | 121,74 | 8,37   | 53,38                | 30,84                |
| 195    | Asp    | 124,62 | 8,83   | 51,18                | 39,02                |
| 196    | Thr    | 116,45 | 8,36   | 58,90                | 66,55                |
| 197    | Lys    | 125,74 | 8,35   | 52,77                | 39,76                |
| 198    | Pro    | -      | -      | /                    | /                    |
| 199    | Met    | 121,63 | 8,55   | 50,42                | 29,74                |
| 200    | Gly    | 110,11 | 8,89   | 44,02                | -                    |
| 201    | Arg    | /      | /      | 54,31                | /                    |
| 202    | Ser    | /      | /      | /                    | /                    |
| 203    | Gly    | 109,17 | 8,24   | 43,92                | -                    |
| 204    | Ala    | 123,91 | 8,47   | 52,45                | 16,14                |
| 205    | Thr    | 116,07 | 8,29   | 65,75                | 65,75                |
| 206    | Ser    | 118,35 | 8,41   | 59,78                | 60,33                |

| 207 | Arg | 121,38 | 8,22  | 57,35 | 27,19 |
|-----|-----|--------|-------|-------|-------|
| 208 | Lys | 119,55 | 8,00  | 56,81 | 30,38 |
| 209 | Ala | 126,03 | 9,22  | 53,13 | 16,56 |
| 210 | Leu | 120,37 | 8,21  | 55,56 | 39,13 |
| 211 | Glu | 118,54 | 8,24  | 56,97 | 27,14 |
| 212 | Thr | 117,29 | 8,23  | 64,98 | 65,74 |
| 213 | Leu | 123,35 | 8,53  | 55,80 | 38,80 |
| 214 | Arg | 117,44 | 8,42  | 57,08 | 27,82 |
| 215 | Arg | 117,51 | 7,46  | 56,08 | 27,97 |
| 216 | Val | 114,73 | 8,55  | 61,05 | 29,97 |
| 217 | Gly | 110,48 | 8,94  | 44,02 | -     |
| 218 | Asp | 121,75 | 7,42  | 55,27 | 38,38 |
| 219 | Gly | 106,90 | 8,10  | 44,28 | -     |
| 220 | Val | 122,32 | 7,51  | 63,94 | 28,76 |
| 221 | Gln | 118,35 | 8,41  | 57,77 | 27,09 |
| 222 | Arg | 116,88 | 7,85  | 56,61 | 27,72 |
| 223 | Asn | 117,19 | 8,15  | 52,60 | 35,97 |
| 224 | His | 115,51 | 7,58  | 53,39 | 26,60 |
| 225 | Glu | 122,28 | 7,08  | 58,78 | 27,62 |
| 226 | Thr | 113,16 | 8,36  | 63,88 | 65,78 |
| 227 | Ala | 126,96 | 7,94  | 52,23 | 15,66 |
| 228 | Phe | 119,70 | 9,06  | 54,62 | 32,36 |
| 229 | Gln | 120,15 | 8,75  | 56,75 | 31,95 |
| 230 | Gly | 106,47 | 8,05  | 44,53 | -     |
| 231 | Met | 121,26 | 8,03  | 56,03 | 29,47 |
| 232 | Leu | 119,47 | 8,46  | 55,45 | 39,67 |
| 233 | Arg | 117,91 | 7,98  | 56,02 | 27,51 |
| 234 | Lys | 117,51 | 7,53  | 55,04 | 30,24 |
| 235 | Leu | 119,30 | 7,82  | 52,96 | 40,77 |
| 236 | Asp | 120,08 | 8,09  | 51,41 | 38,00 |
| 237 | Ile | 120,37 | 8,21  | 58,84 | 37,77 |
| 238 | Lys | 126,62 | 10,00 | 53,44 | 31,72 |
| 239 | Asn | 114,20 | 7,83  | 49,62 | 37,46 |
| 240 | Glu | 118,45 | 8,96  | 57,44 | 27,31 |
| 241 | Asp | 121,09 | 8,16  | 55,02 | 37,64 |
| 242 | Asp | 120,11 | 8,23  | 54,36 | 39,43 |
| 243 | Val | 118,13 | 7,71  | 63,69 | 28,65 |
| 244 | Lys | 120,22 | 8,13  | 56,69 | 28,54 |
| 245 | Ser | 115,27 | 7,96  | 57,76 | 60,66 |
| 246 | Leu | 122,20 | 7,87  | 54,53 | 39,63 |
| 247 | Ser | 115,35 | 8,14  | 59,66 | 59,66 |
| 248 | Arg | 119,09 | 7,63  | 57,07 | 27,82 |

| 249 | Val | 117,51 | 7,46 | 61,93 | 38,92 |
|-----|-----|--------|------|-------|-------|
| 250 | Met | 117,77 | 8,19 | 63,92 | 29,70 |
| 251 | Ile | 116,88 | 7,85 | 61,51 | 30,10 |
| 252 | His | 119,77 | 7,53 | 56,22 | 27,75 |
| 253 | Val | 117,21 | 7,72 | 62,18 | 27,48 |
| 254 | Phe | /      | /    | /     | /     |
| 255 | Ser | 115,00 | 7,66 | 57,69 | 60,72 |
| 256 | Asp | 121,26 | 8,03 | 54,70 | /     |
| 257 | Gly | 108,52 | 8,17 | 42,49 | -     |
| 258 | Val | 121,97 | 7,94 | 59,31 | /     |
| 259 | Thr | 122,16 | 8,23 | 60,14 | 65,77 |
| 260 | Asn | 115,34 | 6,85 | /     | /     |
| 261 | Trp | 118,45 | 8,96 | 57,44 | 37,24 |
| 262 | Gly | 108,74 | 8,74 | 44,98 | -     |
| 263 | Arg | 123,35 | 8,41 | 56,19 | /     |
| 264 | Ile | 120,47 | 7,55 | 63,12 | 27,54 |
| 265 | Val | 119,70 | 9,06 | 64,78 | 34,97 |
| 266 | Thr | 122,49 | 8,64 | 65,93 | 64,48 |
| 267 | Leu | 123,19 | 7,78 | 57,78 | /     |
| 268 | Ile | 118,20 | 8,17 | 63,98 | 38,65 |
| 269 | Ser | 117,26 | 9,02 | 60,71 | 60,41 |
| 270 | Phe | 124,94 | 8,55 | 58,06 | 35,37 |
| 271 | Gly | 106,46 | 8,13 | 45,58 | -     |
| 272 | Ala | 125,34 | 8,48 | 53,16 | /     |
| 273 | Phe | /      | /    | 59,96 | 37,55 |
| 274 | Val | 120,59 | 8,52 | 63,59 | 37,34 |
| 275 | Ala | 124,55 | 8,83 | 53,23 | 15,82 |
| 276 | Lys | 116,52 | 7,94 | 57,94 | 29,70 |
| 277 | His | 121,16 | 7,26 | 57,26 | 27,85 |
| 278 | Leu | 118,62 | 8,69 | 54,57 | 37,48 |
| 279 | Lys | 118,68 | 7,81 | 56,41 | 29,75 |
| 280 | Thr | 116,60 | 7,87 | 63,48 | 66,54 |
| 281 | Ile | 112,49 | 7,26 | 58,66 | 34,54 |
| 282 | Asn | 116,33 | 7,83 | 52,04 | 34,15 |
| 283 | Gln | 117,01 | 8,48 | 50,95 | 25,17 |
| 284 | Glu | 121,83 | 9,08 | 57,44 | 26,49 |
| 285 | Ser | /      | /    | 58,23 | 59,61 |
| 286 | Cys | 117,33 | 7,97 | 58,17 | 59,56 |
| 287 | Ile | 121,97 | 7,94 | 63,88 | /     |
| 288 | Glu | 120,06 | 8,36 | 57,00 | 34,28 |
| 289 | Pro | -      | -    | 63,39 | 27,74 |
| 290 | Leu | 121,45 | 7,64 | 55,67 | 38,78 |

| 291 | Ala | 122,49 | 8,64 | 52,76 | 15,59 |
|-----|-----|--------|------|-------|-------|
| 292 | Glu | 120,89 | 8,55 | 57,55 | 26,85 |
| 293 | Ser | 116,52 | 8,28 | 59,73 | 60,78 |
| 294 | Ile | 120,31 | 8,30 | 61,86 | 34,74 |
| 295 | Thr | 116,47 | 8,07 | 66,18 | 65,48 |
| 296 | Asp | 121,18 | 8,83 | 55,61 | 39,45 |
| 297 | Val | 117,38 | 8,03 | 64,19 | 39,26 |
| 298 | Leu | 121,44 | 8,27 | 56,18 | 39,82 |
| 299 | Val | 114,94 | 8,89 | 63,47 | 39,88 |
| 300 | Arg | 116,85 | 8,70 | 56,70 | 28,62 |
| 301 | Thr | 106,68 | 7,53 | 61,24 | 67,28 |
| 302 | Lys | 118,13 | 7,71 | 50,63 | 29,00 |
| 303 | Arg | 121,10 | 7,41 | 59,13 | 27,67 |
| 304 | Asp | 114,81 | 8,44 | 55,03 | 37,79 |
| 305 | Trp | 122,20 | 7,87 | 59,79 | 37,55 |
| 306 | Leu | 117,80 | 8,68 | 55,76 | 36,27 |
| 307 | Val | 118,92 | 8,62 | 64,03 | 29,23 |
| 308 | Lys | 122,49 | 7,73 | 56,31 | 29,37 |
| 309 | Gln | 115,88 | 7,37 | 51,64 | 25,18 |
| 310 | Arg | 110,70 | 7,70 | 54,97 | 23,49 |
| 311 | Gly | 108,25 | 8,97 | 43,16 | -     |
| 312 | Trp | 124,67 | 9,04 | 56,79 | 26,21 |
| 313 | Asp | 119,82 | 8,07 | 55,52 | 38,24 |
| 314 | Gly | 109,96 | 7,50 | 44,28 | -     |
| 315 | Phe | 124,61 | 7,27 | 57,91 | 36,31 |
| 316 | Val | 116,84 | 7,72 | 63,62 | 29,53 |
| 317 | Glu | 118,68 | 7,81 | 56,41 | 27,31 |
| 318 | Phe | 120,28 | 8,27 | 58,98 | 36,69 |
| 319 | Phe | 112,86 | 6,94 | 56,35 | 37,35 |
| 320 | His | 119,49 | 7,49 | 54,86 | /     |
| 321 | Val | 121,26 | 8,03 | 59,46 | 30,54 |
| 322 | Glu | 123,91 | 8,47 | 54,12 | 27,74 |
| 323 | Asp | 120,93 | 8,35 | 51,56 | 38,41 |
| 324 | Leu | 122,41 | 8,18 | 52,66 | 39,95 |
| 325 | Glu | 121,49 | 8,45 | 54,20 | 27,61 |
| 326 | Gly | 110,41 | 8,39 | 42,76 | -     |
| 327 | Gly | 115,27 | 7,96 | 43,31 | -     |

• Attribution des signaux des groupements NH<sub>2</sub> des Asparagines et Glutamines et les NH des fonctions indole des Tryptophanes.

| Numéro | Résidu | Νε      | Ηε2    | Hɛ1   |
|--------|--------|---------|--------|-------|
| 177    | Gln    | 110,394 | 7,005  | 7,315 |
| 189    | Gln    | 117,138 | 7,427  | 7,028 |
| 221    | Gln    | 110,553 | 6,81   | 6,938 |
| 223    | Asn    | 111,851 | 7,235  | 6,787 |
| 229    | Gln    | 110,94  | 6,859  | 7,639 |
| 239    | Asn    | 113,061 | 7,403  | 6,895 |
| 260    | Asn    | 114,997 | 6,748  | 7,608 |
| 282    | Asn    | 112,759 | 6,804  | 7,595 |
| 283    | Gln    | 109,998 | 6,62   | 7,104 |
| 309    | Gln    | 111,973 | 5,761  | 6,468 |
|        |        | Νε      | Нε     |       |
| 261    | Trp    | 129,357 | 10,204 |       |
| 312    | Trp    | 127,531 | 10,381 |       |

#### Annexe II

Valeurs des vitesses de relaxation (R<sub>1</sub>et R<sub>2</sub>) et NOEs hétéronucléaires des azotes <sup>15</sup>N des fonctions amides des résidus de la protéine <sup>15</sup>N MCL-1<sup>172-327</sup>, mesurées en absence et en présence du DMSO (5% en volume).

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz, les spectres ont été traités à l'aide du logiciel Topspin3.2 et analysés à l'aide du logiciel CCPNMR.

|     | Résidu | Résidu Mesures des R <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> ) Mesure des R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ) |         |       |         |         | Mesure des | hétNOE (Sans | unité)  |        |
|-----|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|---------|---------|------------|--------------|---------|--------|
| Nº  |        | (-)DMSO                                                                                           | (+)DMSO | écart | (-)DMSO | (+)DMSO | écart      | (-)DMSO      | (+)DMSO | ecart  |
| 172 | Asp    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 173 | Glu    | 1,29                                                                                              | 1,23    | -0,07 | 12,32   | 11,87   | -0,46      | /            | /       | /      |
| 174 | Leu    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 175 | Tyr    | 1,41                                                                                              | 1,24    | -0,18 | 11,65   | 12,27   | 0,62       | 0,97         | 0,92    | -0,05  |
| 176 | Arg    | 1,32                                                                                              | 1,23    | -0,09 | 10,86   | 12,98   | 2,12       | 0,89         | 0,82    | -0,07  |
| 177 | Gln    | 1,41                                                                                              | 1,21    | -0,20 | 11,35   | 13,10   | 1,75       | 0,78         | 0,68    | -0,10  |
| 178 | Ser    | 1,43                                                                                              | 1,19    | -0,24 | 11,06   | 12,00   | 0,95       | 1,05         | 0,68    | -0,37  |
| 179 | Leu    | 1,40                                                                                              | 1,30    | -0,10 | 10,49   | 10,96   | 0,47       | 0,60         | 0,69    | 0,10   |
| 180 | Glu    | 1,31                                                                                              | 1,21    | -0,09 | 12,15   | 11,87   | -0,28      | /            | /       | /      |
| 181 | Ile    | 1,42                                                                                              | 1,16    | -0,26 | 11,96   | 11,24   | -0,72      | 0,79         | 0,87    | 0,08   |
| 182 | Ile    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 183 | Ser    | 1,38                                                                                              | 1,28    | -0,10 | 10,71   | 14,07   | 3,36       | 0,97         | 0,62    | -0,35  |
| 184 | Arg    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 185 | Tyr    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 186 | Leu    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 187 | Arg    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | 0,85         | 0,95    | 0,11   |
| 188 | Glu    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 189 | Gln    | 1,38                                                                                              | 1,24    | -0,14 | /       | /       | /          | 0,81         | 0,83    | 0,02   |
| 190 | Ala    | 1,32                                                                                              | 1,18    | -0,14 | 11,10   | 16,59   | 5,49       | 0,98         | 1,05    | 0,07   |
| 191 | Thr    | 1,38                                                                                              | 1,12    | -0,27 | 10,29   | 10,83   | 0,53       | /            | /       | /      |
| 192 | Gly    | 1,45                                                                                              | 1,31    | -0,15 | 9,80    | 12,56   | 2,76       | 1,03         | 0,76    | -0,28  |
| 193 | Ala    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | 0,97         | 0,79    | -0,18  |
| 194 | Lys    | 1,23                                                                                              | 1,21    | -0,02 | 8,52    | 10,39   | 1,87       | 0,47         | 0,67    | 0,20   |
| 195 | Asp    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | 0,71         | 0,60    | -0,11  |
| 196 | Thr    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 197 | Lys    | 1,44                                                                                              | 1,41    | -0,03 | 9,92    | 10,11   | 0,19       | 0,57         | 0,54    | -0,03  |
| 198 | Pro    | /                                                                                                 | /       |       | /       | /       |            | /            | /       | /      |
| 199 | Met    | /                                                                                                 | /       |       | /       | /       |            | /            | /       | /      |
| 200 | Gly    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 201 | Arg    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 202 | Ser    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 203 |        | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 204 | The    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 205 | Sor    | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 200 |        | /                                                                                                 | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 207 | Lun    | / 1.20                                                                                            | /       | /     | /       | /       | /          | /            | /       | /      |
| 208 |        | 1,30                                                                                              | 1,23    | -0,10 | 11.22   | 11,02   | -0,34      | /            | 0.74    | / 0.21 |
| 207 | Lou    | 1,42                                                                                              | 1,52    | -0,10 | /       | /       |            | 0,79         | 0,74    | -0,21  |
| 210 | Ghu    | 1 36                                                                                              | / 1.23  | -0.14 | / 11 72 | / 13.69 | / 1.96     | 0.94         | 0,09    | -0.24  |
| 212 | Thr    | 1 41                                                                                              | 1.20    | -0.15 | 10.41   | 13.02   | 2.84       | /            | /       | -0,24  |
| 212 | Leu    | 1 32                                                                                              | 1.20    | -0.07 | 11.60   | 12 57   | 0.88       | 0.86         | 0.65    | -0.21  |
| 213 | Ara    | 1 35                                                                                              | 1,23    | -0.14 | 11.07   | 11.70   | 0.33       | 0.83         | 1.00    | 0.17   |
| 214 | ng     | 1,55                                                                                              | 1,41    | -0,14 | 11,57   | 11,/0   | 0,55       | 0,05         | 1,00    | 0,17   |

| 215                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Arg                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,00                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,00                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 216                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Val                                                                                                                                                                                              | 1,39                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,19                                                                                                                                                         | 11,10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13,69                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2,59                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,60                                                                                                                                                                                             | -0,32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 217                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gly                                                                                                                                                                                              | 1,34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,11                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 218                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asp                                                                                                                                                                                              | 1,33                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,10                                                                                                                                                         | 9,96                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 12,44                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2,48                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,83                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,94                                                                                                                                                                                             | 0,11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 219                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gly                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,00                                                                                                                                                          | 12,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13,58                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,56                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,87                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,83                                                                                                                                                                                             | -0,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 220                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Val                                                                                                                                                                                              | 1,33                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,11                                                                                                                                                         | 11,78                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13,78                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2,00                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,82                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,96                                                                                                                                                                                             | 0,14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 221                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gln                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,48                                                                                                                                                                                             | -0,15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 222                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Arg                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 223                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asn                                                                                                                                                                                              | 1,31                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,09                                                                                                                                                         | 11,15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 12,15                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,99                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,91                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,62                                                                                                                                                                                             | -0,29                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 224                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | His                                                                                                                                                                                              | 1,30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,08                                                                                                                                                         | 10,48                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13,26                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2,78                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1,00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,75                                                                                                                                                                                             | -0,25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 225                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Glu                                                                                                                                                                                              | 1,26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,16                                                                                                                                                         | 10,84                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 12,79                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,95                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,57                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,45                                                                                                                                                                                             | -0,11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 226                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Thr                                                                                                                                                                                              | 1,27                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,19                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,08                                                                                                                                                         | 9,83                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 11,35                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,52                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,76                                                                                                                                                                                             | -0,28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 227                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ala                                                                                                                                                                                              | 1,29                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,18                                                                                                                                                         | 10,92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 5,51                                                                                                                                                                                                                                                                                    | -5,41                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,82                                                                                                                                                                                             | -0,06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 228                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Phe                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 229                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gln                                                                                                                                                                                              | 1,25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,03                                                                                                                                                         | 11,74                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13,66                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,92                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,77                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,46                                                                                                                                                                                             | -0,32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gly                                                                                                                                                                                              | 1,17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,02                                                                                                                                                         | 11,42                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 16,86                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5,43                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 231                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Met                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,80                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1,07                                                                                                                                                                                             | 0,27                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 232                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Leu                                                                                                                                                                                              | 1,22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,12                                                                                                                                                         | 11,37                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 12,57                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,21                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,80                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,61                                                                                                                                                                                             | -0,19                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 233                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Arg                                                                                                                                                                                              | 1,30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,13                                                                                                                                                         | 11,50                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 12,05                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,55                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 234                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Lys                                                                                                                                                                                              | 1,34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,19                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,15                                                                                                                                                         | 11,49                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 14,93                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3,44                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 235                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Leu                                                                                                                                                                                              | 1,30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,21                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,09                                                                                                                                                         | 11,69                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 11,20                                                                                                                                                                                                                                                                                   | -0,49                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,99                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,88                                                                                                                                                                                             | -0,11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 236                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asp                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 237                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ile                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 238                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Lys                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | 11,92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 17,51                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5,60                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 239                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asn                                                                                                                                                                                              | 1,25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,09                                                                                                                                                         | 9,73                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 13,64                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3,91                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,64                                                                                                                                                                                             | 0,01                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 240                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Glu                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 241                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asp                                                                                                                                                                                              | 1,35                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | -0,12                                                                                                                                                         | 10,80                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 11,72                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,91                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,67                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,78                                                                                                                                                                                             | 0,11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 242                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asp                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,74                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,70                                                                                                                                                                                             | -0,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Val                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Lys                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ,                                                                                                                                                                                                                                                                                       | ,                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 245                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ser                                                                                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,92                                                                                                                                                                                             | 0,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 245<br>246                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ser<br>Leu                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /                                                                                                                                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,92                                                                                                                                                                                             | 0,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 245<br>246<br>247                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ser<br>Leu<br>Ser                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>1,36                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | /////                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | / / -0,09                                                                                                                                                     | /<br>/<br>10,34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | / / 6,96                                                                                                                                                                                                                                                                                | ////-3,38                                                                                                                                                                                                                                                             | 0,88<br>/<br>0,68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0,92<br>/<br>0,45                                                                                                                                                                                | 0,03 / -0,23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 245<br>246<br>247<br>248                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg                                                                                                                                                                         | /<br>/<br>1,36<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>1,27<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>-0,09<br>/                                                                                                                                          | /<br>/<br>10,34<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>6,96<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                     | / / / -3,38 /                                                                                                                                                                                                                                                         | 0,88<br>/<br>0,68<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,92<br>/<br>0,45<br>/                                                                                                                                                                           | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val                                                                                                                                                                  | /<br>/<br>1,36<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/                                                                                                                                     | /<br>/<br>10,34<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                             | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/                                                                                                                                                                      | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met                                                                                                                                                           | /<br>/<br>1,36<br>/<br>/<br>1,34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /<br>/,<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04                                                                                                                             | /<br>/<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57                                                                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35                                                                                                                                                                                                                                    | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                 | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile                                                                                                                                                    | /<br>/<br>1,36<br>/<br>/<br>1,34<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,39<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/                                                                                                                        | /<br>/<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/                                                                                                                                                                                                                                                  | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/                                                                                                                                                                                                                               | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                       | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His                                                                                                                                             | /<br>/<br>1,36<br>/<br>/<br>1,34<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | /<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/                                                                                                                        | /<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                          | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                  | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val                                                                                                                                      | /<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>/<br>1,43                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>/<br>1,42                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | /<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>/<br>-0,01                                                                                                          | /<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>/<br>11,85                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/<br>13,84                                                                                                                                                                                                                               | /<br>//<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,99                                                                                                                                                                                        | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86                                                                                                                                | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>253<br>254                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe                                                                                                                               | /<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | /<br>-0,09<br>/<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/                                                                                                     | /<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>/<br>11,85<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/<br>13,84<br>/                                                                                                                                                                                                                          | /<br>/-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/                                                                                                                                                                                                  | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/                                                                                                                           | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser                                                                                                                        | /<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13                                                                                             | /<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61                                                                                                                                                                                                                 | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>/<br>4,17                                                                                                                                                                                      | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86                                                                                                                             | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                          |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>256                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp                                                                                                                 | /<br>/<br>1,36<br>/<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | /<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/                                                                                             | /<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/                                                                                                                                                                                                                 | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/                                                                                                                                                                                           | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/                                                                                                              | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>0,34<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>256<br>257                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly                                                                                                          | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/<br>/                                                                                        | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                            | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                 | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/                                                                                                         | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val                                                                                                   | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/<br>/<br>/                                                                              | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                            | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                    | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>259                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr                                                                                            | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                               | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                        | /<br>/-3,38<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                         | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                        | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                          |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn                                                                                     | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                | /<br>/<br>10,34<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                    | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                              | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                         | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp                                                                              | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>0,13<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | /<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                               | /<br>/-3,38<br>/<br>/<br>/-1,35<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                          | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                      | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>0,34<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                               |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly                                                                       | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>0,13<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/             | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                               | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                       | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/               | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                      |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Gly                                                                | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,36<br>/<br>1,36<br>/<br>1,36<br>/<br>1,36                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,13        | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>11,92                                                                                                                                                                                                                                                                                          | /<br>/<br>6,96<br>/<br>11,57<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/      | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                           | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,85<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                         | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                 |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile                                                         | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,35                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>11,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/ | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/ | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                    | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,57<br>0,70<br>0,77                                                                       | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263<br>264<br>265                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val                                                  | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,36<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,44<br>11,97<br>12,25<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                              | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                 | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,57<br>0,70<br>0,77<br>/<br>/                                                   | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>0,34<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                   |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263<br>264<br>265<br>264                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val                                                  | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,36<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,94<br>11,97<br>12,25<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                         | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/ | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,77<br>0,70<br>0,77<br>/<br>/<br>/<br>/                       | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263<br>264<br>265<br>266<br>265<br>266<br>267<br>276                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val<br>Thr<br>Leu                                    | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,36<br>1,32<br>1,35<br>/<br>1,35<br>/<br>1,27                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>/<br>/<br>/<br>1,32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>/-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                             | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,44<br>11,97<br>12,25<br>/<br>/<br>11,01<br>14,07                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                  | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                   | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                 | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263<br>264<br>265<br>266<br>267<br>266<br>267<br>268                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val<br>Thr<br>Leu<br>Ile                             | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,36<br>1,32<br>1,35<br>/<br>1,35<br>1,42                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>/<br>/<br>/<br>1,32<br>1,30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,44<br>11,97<br>12,25<br>/<br>/<br>11,01<br>11,07<br>40,52                                                                                                                                                                                                                                                                             | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                  | /<br>/<br>/<br>1,35<br>/<br>/<br>/<br>1,99<br>/<br>4,17<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,74<br>0,80<br>0,88<br>0,74<br>0,88<br>0,88<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                           | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                      |
| 245           246           247           248           249           250           251           252           253           254           255           256           257           258           259           260           261           262           263           264           265           266           267           268           267           268           267           268           267           268           267           268           267           268           269           262 | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val<br>Thr<br>Leu<br>Ile                             | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,36<br>1,32<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,22<br>1,35<br>1,22<br>1,35<br>1,22<br>1,35<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,22<br>1,35<br>1,22<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,22<br>1,35<br>1,22<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,35<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,25<br>1,2 | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,41<br>/<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,30<br>1,21<br>1,21<br>1,30<br>1,21<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,30<br>1,21<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,20<br>1,21<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,20<br>1,2 | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,44<br>11,97<br>12,25<br>/<br>/<br>11,01<br>11,07<br>10,52<br>0,72                                                                                                                                                                                                                                                                          | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>13,84<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                  | /<br>/<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                           | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,54<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55<br>0,55                                        | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                   | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                      |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255<br>255                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Gly<br>Arg<br>Ile<br>Val<br>Thr<br>Leu<br>Ile                      | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,36<br>1,27<br>/<br>1,36<br>1,32<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,38<br>1,38                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | /<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,39<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/ | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>12,24<br>11,97<br>12,25<br>/<br>/<br>11,01<br>11,07<br>10,52<br>9,78<br>10,052                                                                                                                                                                                                                                                                     | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                    | /<br>/<br>-3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,52<br>/<br>0,54<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,57<br>0,56<br>0,57<br>0,57<br>0,56<br>0,57<br>0,57<br>0,56<br>0,57<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,57<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>00<br>0,56<br>0 | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                   | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                      |
| 245<br>246<br>247<br>248<br>249<br>250<br>251<br>252<br>253<br>254<br>255<br>256<br>257<br>258<br>259<br>260<br>261<br>262<br>263<br>264<br>265<br>266<br>267<br>268<br>269<br>270<br>271                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ser<br>Leu<br>Ser<br>Arg<br>Val<br>Met<br>Ile<br>His<br>Val<br>Phe<br>Ser<br>Asp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Asn<br>Trp<br>Gly<br>Val<br>Thr<br>Cly<br>Val<br>Thr<br>Leu<br>Ile<br>Val<br>Ser<br>Phe | /<br>/<br>1,36<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,34<br>/<br>1,43<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>1,43<br>/<br>1,27<br>/<br>/<br>/<br>1,36<br>1,27<br>/<br>/<br>1,36<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,35<br>1,38<br>1,38<br>1,39<br>1,39<br>1,35                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | /<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,27<br>/<br>1,39<br>/<br>1,39<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>1,42<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | /<br>/<br>-0,09<br>/<br>/<br>0,04<br>/<br>/<br>-0,01<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/           | /<br>/<br>10,34<br>/<br>12,92<br>/<br>/<br>11,85<br>/<br>10,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | /<br>/<br>/<br>6,96<br>/<br>/<br>11,57<br>/<br>/<br>13,84<br>/<br>14,61<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                  | /<br>/<br>3,38<br>/<br>/<br>/<br>-1,35<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                 | 0,88<br>/<br>0,68<br>/<br>/<br>/<br>/<br>1,05<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,52<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,92<br>/<br>0,45<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>0,86<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>0,57<br>0,70<br>0,77<br>/<br>/<br>0,63<br>0,67<br>/<br>0,69<br>1,00<br>1,00 | 0,03<br>/<br>-0,23<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>-0,19<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/<br>/ |

| 273 | Phe  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|
| 274 | Val  | 1,26 | 1,15 | -0,11 | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 275 | Ala  | 1,22 | 1,11 | -0,12 | 12,71 | 13,01 | 0,29  | /    | /      | /     |
| 276 | Lys  | 1,24 | 1,20 | -0,04 | 11,94 | 12,06 | 0,12  | 0,68 | 1,02   | 0,34  |
| 277 | His  | 1,32 | 1,23 | -0,09 | 12,96 | 14,48 | 1,52  | 0,59 | 1,07   | 0,48  |
| 278 | Leu  | 1,27 | 1,28 | 0,01  | 12,00 | 13,25 | 1,25  | 1,06 | 0,64   | -0,42 |
| 279 | Lys  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 280 | Thr  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | 0,81 | 0,94   | 0,12  |
| 281 | Ile  | 1,29 | 1,18 | -0,11 | 15,21 | 21,51 | 6,30  | /    | /      | /     |
| 282 | Asn  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | 0,62 | 0,88   | 0,26  |
| 283 | Gln  | 1,19 | 1,25 | 0,06  | 17,22 | 18,28 | 1,07  | /    | /      | /     |
| 284 | Glu  | 1,33 | 1,18 | -0,15 | 13,04 | 13,59 | 0,55  | 0,64 | 0,72   | 0,08  |
| 285 | Ser  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 286 | Cys  | 1,35 | 1,19 | -0,16 | 10,72 | 11,88 | 1,15  | 0,98 | 0,86   | -0,12 |
| 287 | Ile  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 288 | Glu  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 289 | Pro  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 290 | Leu  | 1,38 | 1,15 | -0,23 | 12,55 | 13,24 | 0,69  | 0,98 | 0,67   | -0,31 |
| 291 | Ala  | 1,35 | 1,22 | -0,13 | 11,09 | 12,54 | 1,45  | /    | /      | /     |
| 292 | Glu  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 293 | Ser  | 1,36 | 1,22 | -0,14 | 10,99 | 12,43 | 1,43  | 0,70 | 0,97   | 0,26  |
| 294 | Ile  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 295 | Thr  | 1,27 | 1,22 | -0,05 | 12,32 | 13,21 | 0,90  | 0,79 | 0,93   | 0,14  |
| 296 | Asp  | 1,38 | 1,16 | -0,22 | 12,26 | 13,45 | 1,19  | 1,07 | 0,55   | -0,53 |
| 297 | Val  | /    | /    | /     | 11,78 | 12,69 | 0,92  | /    | /      | /     |
| 298 | Leu  | 1,38 | 1,42 | 0,03  | 8,48  | 7,95  | -0,54 | /    | /      | /     |
| 299 | Val  | 1,42 | 1,26 | -0,16 | 11,65 | 11,94 | 0,29  | /    | /      | /     |
| 300 | Arg  | 1,31 | 1,22 | -0,09 | 10,89 | 13,00 | 2,10  | 0,90 | 0,59   | -0,32 |
| 301 | Thr  | 1,42 | 1,29 | -0,13 | 9,70  | 10,69 | 1,00  | /    | /      | /     |
| 302 | Lys  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 303 | Arg  | 1,28 | 1,14 | -0,14 | 11,29 | 12,72 | 1,43  | /    | /      | /     |
| 304 | Asp  | 1,23 | 1,15 | -0,07 | 12,00 | 12,87 | 0,87  | 0,95 | 1,02   | 0,07  |
| 305 | Trp  | 1,23 | 1,03 | -0,20 | 14,09 | 13,29 | -0,81 | /    | /      | /     |
| 306 | Leu  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 307 | Val  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 308 | Lys  | 1,25 | 1,09 | -0,16 | 15,59 | 17,44 | 1,85  | 0,98 | 0,49   | -0,49 |
| 309 | Gln  | 1,25 | 1,15 | -0,09 | 13,98 | 13,47 | -0,52 | 0,55 | 1,04   | 0,49  |
| 310 | Arg  | 1,39 | 1,27 | -0,13 | 11,29 | 12,16 | 0,87  | 0,91 | 0,42   | -0,49 |
| 311 | Gly  | 1,24 | 1,21 | -0,04 | 11,29 | 12,38 | 1,10  | 0,85 | 0,72   | -0,13 |
| 312 | Trp  | 1,31 | 1,18 | -0,13 | 10,97 | 9,98  | -0,99 | 0,91 | 0,77   | -0,14 |
| 313 | Asp  | 1,30 | 1,24 | -0,05 | 11,62 | 11,/8 | 0,16  | /    | /      | /     |
| 314 |      | 1,55 | 1,11 | -0,21 | 11,54 | 13,02 | 1,69  | 0,89 | 0,94   | 0,05  |
| 216 | Val  | 1,30 | 1,22 | -0,14 | 11,00 | 10,74 | -0,01 | /    | /      | /     |
| 217 |      | 1,32 | 1,23 | -0,09 | /     | 12,03 | 0,92  | 0,70 | /      |       |
| 318 | Phe  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      |       |
| 310 | Phe  | 1 3/ | 1 22 | 0.12  | 10.06 | 13.67 | 3.61  | /    | / 0.84 | /     |
| 320 | Hie  | 1,54 | 1,22 | -0,12 | 11,00 | 13,07 | 2.82  | 0,70 | 0,54   | 0,05  |
| 320 | Val  | /    | /    | -0,15 | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 321 | Ghu  | 1 43 | 1 42 | -0.01 | 7 87  | 8.60  | 0.73  | 0.50 | 0.49   | -0.01 |
| 323 | Asp  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 324 | Leu  | 1.42 | 1.44 | 0.02  | 5.00  | 5.68  | 0.68  | /    | /      | /     |
| 325 | Glu  | 1,12 | 1.45 | 0.04  | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
| 326 | Glv  | 1.19 | 1,13 | 0.06  | 3,73  | 4.25  | 0.52  | /    | /      | /     |
| 327 | Glv  | /    | /    | /     | /     | /     | /     | /    | /      | /     |
|     | 2-19 | '    | /    | /     |       | /     | /     | '    | /      | /     |



## Annexe III

Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du Pyridoclax (5 mM, DMSO-d6, 313 K, 600 MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY du Pyridoclax (5 mM, DMSO-d6, 313 K, D8 1s, 600 MHz)

| ( <sup>1</sup> H, ppm, | , 600MHz) | ( <sup>13</sup> C, ppm, 150MHz) |        |  |  |
|------------------------|-----------|---------------------------------|--------|--|--|
| Température            | 313°K     | Température                     | 313°K  |  |  |
| Concentration          | 5 mM      | Concentration                   | 5 mM   |  |  |
| A1                     | 8,67      | A1                              | 149,97 |  |  |
| A2                     | 7,56      | A2                              | 123,09 |  |  |
| A3                     | 8,11      | A3                              | 136,45 |  |  |
| A4                     | -         | A4                              | 135,31 |  |  |
| A5                     | 8,89      | A5                              | 149,61 |  |  |
| B1                     | -         | <b>B</b> 1                      | 154,46 |  |  |
| B2                     | -         | B2                              | 130,80 |  |  |
| B3                     | 8,08      | B3                              | 139,53 |  |  |
| B4                     | -         | <b>B</b> 4                      | 133,81 |  |  |
| B5                     | 8,78      | B5                              | 147,36 |  |  |
| <b>B</b> 6             | 2,48      | <b>B</b> 6                      | 19,50  |  |  |
| C1                     | -         | C1                              | 152,64 |  |  |
| C2                     | -         | C2                              | 131,41 |  |  |
| C3                     | 8,64      | C3                              | 132,42 |  |  |
| C4                     | -         | C4                              | 132,12 |  |  |
| C5                     | 9,04      | C5                              | 146,56 |  |  |
| D1                     | 8,70      | D1                              | 149,29 |  |  |
| D2                     | 7,60      | D2                              | 123,87 |  |  |
| D3                     | 8,36      | D3                              | 134,53 |  |  |
| D4                     | -         | D4                              | 132,12 |  |  |
| D5                     | 9,16      | D5                              | 147,97 |  |  |
| 10                     | 7,28      | 10                              | 124,28 |  |  |
| 11                     | 7,58      | 11                              | 133,01 |  |  |
| 12                     | -         | 12                              | 136,65 |  |  |
| 13,17                  | 7,56      | 13,17                           | 126,68 |  |  |
| 14,16                  | 7,40      | 14,16                           | 128,77 |  |  |
| 15                     | 7,32      | 15                              | 128,17 |  |  |

#### Attribution des signaux RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du Pyridoclax



#### Annexe IV

Superposition des spectre <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C SOFAST HMQC de la protéine <sup>15</sup>N MCL-1 (50 μM) en absence et en présence du Pyridoclax. (250 μM) (PBS à pH7, 5% DMSO, 298 K, 600MHz)

#### Annexe V

# Valeurs des vitesses de relaxation ( $R_1$ et $R_2$ ) des azotes <sup>15</sup>N des fonctions amides des résidus de la protéine <sup>15</sup>N MCL-1<sup>172-327</sup>, mesurées en absence et en présence du Pyridoclax.

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz, les spectres ont été traités à l'aide du logiciel Topspin3.2 et analysés à l'aide du logiciel CCPNMR.

|     |        |               | Valeurs des R <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> ) |       |               | Valeurs des R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ) |       |  |  |
|-----|--------|---------------|-----------------------------------------------|-------|---------------|-----------------------------------------------|-------|--|--|
| N°  | Résidu | (-)Pyridoclax | (+)Pyridoclax                                 | Écart | (-)Pyridoclax | (+)Pyridoclax                                 | Écart |  |  |
| 172 | Asp    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 173 | Glu    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 174 | Leu    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 175 | Tyr    | 1,23          | 1,21                                          | -0,02 | 12,50         | 11,46                                         | -1,04 |  |  |
| 176 | Arg    | 1,11          | 1,27                                          | 0,16  | 13,26         | 12,94                                         | -0,31 |  |  |
| 177 | Gln    | 1,18          | 1,23                                          | 0,05  | 13,29         | 13,08                                         | -0,21 |  |  |
| 178 | Ser    | 1,21          | 1,11                                          | -0,10 | 11,91         | 10,74                                         | -1,16 |  |  |
| 179 | Leu    | 1,16          | 1,29                                          | 0,13  | 14,09         | 12,70                                         | -1,39 |  |  |
| 180 | Glu    | 1,22          | 1,22                                          | 0,00  | 12,93         | 13,23                                         | 0,30  |  |  |
| 181 | Ile    | 1,16          | 1,13                                          | -0,03 | 11,46         | 12,78                                         | 1,32  |  |  |
| 182 | Ile    | 1,11          | 0,99                                          | -0,12 | 11,50         | 14,54                                         | 3,04  |  |  |
| 183 | Ser    | 1,12          | 1,22                                          | 0,10  | 13,39         | 15,43                                         | 2,05  |  |  |
| 184 | Arg    | 1,17          | 1,20                                          | 0,03  | 15,22         | 13,67                                         | -1,55 |  |  |
| 185 | Tyr    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 186 | Leu    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 187 | Arg    | 1,22          | 1,19                                          | -0,03 | 14,13         | 14,45                                         | 0,32  |  |  |
| 188 | Glu    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 189 | Gln    | 1,16          | 1,12                                          | -0,04 | 12,66         | 13,54                                         | 0,88  |  |  |
| 190 | Ala    | 1,16          | 1,16                                          | 0,00  | 12,64         | 14,16                                         | 1,53  |  |  |
| 191 | Thr    | 1,21          | 1,12                                          | -0,09 | 13,99         | 10,22                                         | -3,78 |  |  |
| 192 | Gly    | 1,20          | 1,22                                          | 0,02  | 13,44         | 11,30                                         | -2,14 |  |  |
| 193 | Ala    | 1,17          | 1,19                                          | 0,01  | 13,04         | 12,57                                         | -0,47 |  |  |
| 194 | Lys    | 1,20          | 1,20                                          | -0,01 | 8,95          | 9,44                                          | 0,49  |  |  |
| 195 | Asp    | 1,39          | 1,31                                          | -0,08 | 9,66          | 10,24                                         | 0,58  |  |  |
| 196 | Thr    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 197 | Lys    | 1,33          | 1,31                                          | -0,02 | 11,39         | 11,09                                         | -0,30 |  |  |
| 198 | Pro    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 199 | Met    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 200 | Gly    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 201 | Arg    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 202 | Ser    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 203 | Gly    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 204 | Ala    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 205 | Thr    | 1,23          | 1,13                                          | -0,10 | 12,73         | 11,52                                         | -1,22 |  |  |
| 206 | Ser    | /             | /                                             | /     | 15,65         | 14,24                                         | -1,40 |  |  |
| 207 | Arg    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 208 | Lys    | 1,17          | 1,26                                          | 0,09  | 12,51         | 13,67                                         | 1,16  |  |  |
| 209 | Ala    | 1,29          | 1,21                                          | -0,08 | 15,02         | 13,63                                         | -1,39 |  |  |
| 210 | Leu    | 1,16          | 1,12                                          | -0,03 | 13,17         | 12,68                                         | -0,49 |  |  |
| 211 | Glu    | 1,08          | 1,24                                          | 0,16  | 13,28         | 12,35                                         | -0,93 |  |  |
| 212 | Thr    | 1,26          | 1,13                                          | -0,12 | 13,63         | 13,14                                         | -0,49 |  |  |
| 213 | Leu    | 1,23          | 1,35                                          | 0,11  | 12,90         | 13,75                                         | 0,86  |  |  |
| 214 | Arg    | 1,22          | 1,22                                          | 0,00  | 11,42         | 13,74                                         | 2,32  |  |  |
| 215 | Arg    | /             | /                                             | /     | /             | /                                             | /     |  |  |
| 216 | Val    | 1,09          | 1,29                                          | 0,20  | 16,19         | 21,08                                         | 4,89  |  |  |

| 217 | Gly | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
|-----|-----|------|--------|-------|---------|-------|-------|
| 218 | Asp | 1,21 | 1,07   | -0,15 | 14,28   | 11,78 | -2,50 |
| 219 | Gly | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 220 | Val | 1,21 | 1,27   | 0,06  | 12,77   | 12,38 | -0,39 |
| 221 | Gln | /    | /      | /     | 15,00   | 13,90 | -1,10 |
| 222 | Arg | 1,09 | 1,13   | 0,04  | 14,73   | 13,50 | -1,23 |
| 223 | Asn | 1,16 | 1,22   | 0,06  | 13,07   | 12,89 | -0,18 |
| 224 | His | 1,17 | 1,13   | -0,04 | 12,17   | 11,95 | -0,22 |
| 225 | Glu | 1,06 | 1,08   | 0,02  | 14,03   | 12,94 | -1,10 |
| 226 | Thr | 1,12 | 0,99   | -0,13 | 14,26   | 13,96 | -0,29 |
| 227 | Ala | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 228 | Phe | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 229 | Gln | 1 16 | 1.20   | 0.04  | 13.68   | 13 54 | -0.13 |
| 230 | Gly | 1,10 | 1,20   | 0.00  | 13,63   | 16 54 | 2.92  |
| 230 | Mot | /    | 1,2.5  |       | /       | /     | /     |
| 231 | Lou | /    | / 1.22 | /     | / 14.40 | /     | /     |
| 232 | Leu | 1,09 | 1,22   | 0,13  | 14,40   | 12,70 | 0,20  |
| 233 | Arg | 1,17 | 1,17   | 0,00  | 13,65   | 13,/6 | 0,11  |
| 234 | Lys | 1,17 | 1,19   | 0,02  | 14,//   | 16,05 | 1,29  |
| 235 | Leu | 1,13 | 1,02   | -0,10 | 15,13   | 14,11 | -1,02 |
| 236 | Asp | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 237 | lle | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 238 | Lys | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 239 | Asn | 1,10 | 1,07   | -0,04 | 13,43   | 14,87 | 1,44  |
| 240 | Glu | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 241 | Asp | 1,13 | 1,22   | 0,08  | 6,77    | 13,15 | 6,38  |
| 242 | Asp | 1,21 | 1,20   | -0,01 | 13,37   | 13,16 | -0,21 |
| /   | Val | 1,18 | 1,21   | 0,02  | /       | /     | /     |
| /   | Lys | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 245 | Ser | 1,03 | 1,13   | 0,10  | /       | /     | /     |
| 246 | Leu | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 247 | Ser | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 248 | Arg | 1,26 | 1,52   | 0,26  | 13,58   | 17,54 | 3,96  |
| 249 | Val | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 250 | Met | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 251 | Ile | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 252 | His | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 253 | Val | /    | /      | /     | 13,75   | 12,80 | -0,95 |
| 254 | Phe | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 255 | Ser | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 256 | Asp | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 257 | Gly | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 258 | Val | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 259 | Thr | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 260 | Asn | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 261 | Trp | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 262 | Gly | 1,22 | 1,23   | 0,01  | 10,98   | 11,11 | 0,14  |
| 263 | Arg | /    | /      | /     | 15,85   | 19,65 | 3,79  |
| 264 | Ile | 1,13 | 1,03   | -0,10 | 14,28   | 14,57 | 0,29  |
| 265 | Val | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 266 | Thr | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 267 | Leu | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 268 | Ile | 1,27 | 1,03   | -0,24 | 14,58   | 9,83  | -4,75 |
| 269 | Ser | 1,10 | 1,27   | 0,17  | 13,89   | 16,88 | 2,99  |
| 270 | Phe | 1,15 | 1,21   | 0,06  | 15,50   | 13,40 | -2,10 |
| 271 | Gly | 1,16 | 1,04   | -0,13 | 14,28   | 13,63 | -0,65 |
| 272 | Ala | 1,17 | 1,09   | -0,08 | 11,26   | 14,49 | 3,24  |
| 273 | Phe | /    | /      | /     | /       | /     | /     |
| 274 | Val | 1,19 | 1,03   | -0,16 | 13,76   | 14,13 | 0,37  |
|     |     |      |        |       |         |       |       |

| 275 | Ala        | 1,18   | 1,14   | -0,03 | 10,89 | 13,25 | 2,36  |
|-----|------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 276 | Lys        | 1,21   | 1,00   | -0,21 | 12,84 | 14,81 | 1,97  |
| 277 | His        | 1,14   | 1,14   | 0,00  | 13,41 | 15,58 | 2,17  |
| 278 | Leu        | 1,11   | 1,14   | 0,03  | 13,72 | 13,08 | -0,64 |
| 279 | Lys        | 1,19   | 1,08   | -0,10 | 14,07 | 13,36 | -0,72 |
| 280 | Thr        | 1,15   | 0,95   | -0,19 | 14,04 | 14,58 | 0,54  |
| 281 | Ile        | 1.06   | 1.36   | 0.30  | 16.22 | 15.89 | -0.33 |
| 282 | Asn        | 1.18   | 1.12   | -0.06 | 14.70 | 13.93 | -0.77 |
| 283 | Gln        | 1.20   | 1.26   | 0.07  | 21.55 | 15.99 | -5.56 |
| 284 | Gh         | 1,20   | 1,20   | -0.02 | 14 90 | 14.02 | -0.88 |
| 285 | Ser        | /      | /      | /     | /     | /     |       |
| 205 | Cre        | / 1.12 | / 1.10 | /     | 13.37 | 13.80 | 0.43  |
| 287 | Ups<br>The | 1,12   | 1,17   |       | 13,37 | 13,00 | /     |
| 207 | Chu        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 200 | Blu        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 289 | Pro        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 290 | Leu        | 1,22   | 1,15   | -0,09 | 13,67 | 13,/8 | 0,11  |
| 291 | Ala        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 292 | Glu        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 293 | Ser        | 1,24   | 1,18   | -0,06 | 13,62 | 13,12 | -0,51 |
| 294 | Ile        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 295 | Thr        | 1,18   | 1,07   | -0,11 | 15,22 | 12,66 | -2,57 |
| 296 | Asp        | 1,13   | 1,21   | 0,08  | 12,84 | 13,66 | 0,82  |
| 297 | Val        | 1,16   | 1,19   | 0,02  | 14,10 | 13,70 | -0,40 |
| 298 | Leu        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 299 | Val        | 1,15   | 1,30   | 0,15  | 15,08 | 12,54 | -2,54 |
| 300 | Arg        | 1,24   | 1,25   | 0,01  | 12,60 | 11,54 | -1,07 |
| 301 | Thr        | 1,22   | 1,14   | -0,08 | 14,18 | 16,89 | 2,71  |
| 302 | Lys        | 1,15   | 1,19   | 0,05  | 12,03 | 11,70 | -0,34 |
| 303 | Arg        | 1,15   | 1,03   | -0,11 | 12,74 | 12,59 | -0,16 |
| 304 | Asp        | 1,14   | 1,07   | -0,07 | 13,52 | 12,51 | -1,01 |
| 305 | Trp        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 306 | Leu        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 307 | Val        | /      | /      | /     | 15,56 | 14,52 | -1,04 |
| 308 | Lys        | 1,10   | 1,22   | 0,12  | 15,60 | 15,36 | -0,25 |
| 309 | Gln        | 1,05   | 1,08   | 0,03  | /     | /     | /     |
| 310 | Arg        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 311 | Gly        | 1,12   | 1,24   | 0,12  | 14,23 | 11,99 | -2,24 |
| 312 | Trp        | 1,07   | 1,07   | 0,00  | 11,98 | 12,08 | 0,11  |
| 313 | Asp        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 314 | Gly        | 1,14   | 1,28   | 0,14  | 12,04 | 11,62 | -0,43 |
| 315 | Phe        | 1,13   | 1,28   | 0,15  | 11,40 | 13,26 | 1,86  |
| 316 | Val        | 1,26   | 1,23   | -0,03 | 13,25 | 13,59 | 0,33  |
| 317 | Glu        | 1,14   | 1,16   | 0,01  | 12,53 | 14,88 | 2,35  |
| 318 | Phe        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 319 | Phe        | 1,18   | 1,11   | -0,07 | 12,84 | 13,04 | 0,20  |
| 320 | His        | 1,11   | 1,17   | 0,05  | 15,07 | 13,65 | -1,42 |
| 321 | Val        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 322 | Glu        | /      |        | /     |       | /     |       |
| 323 | Asp        | /      | /      | /     | /     | /     | /     |
| 324 | Leu        | 1.48   | 1,41   | -0,07 | . /   | . /   | . /   |
| 325 | Glu        | 1,45   | 1.43   | -0,01 | /     | /     | /     |
| 326 | Glv        | 1,06   | 1,18   | 0,12  | /     | /     | . /   |
| 327 | Glv        | 0.78   | 0.81   | 0.03  | /     | /     | /     |
|     | ~          | ~,. 0  | ~,~.   | -,~~  | /     | /     | /     |



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du MR-34911 (1mM, PBS/ 5% D<sub>2</sub>O) à pH 7, 298 K, 600 MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY du MR-34911 (1 mM, PBS/ 5% D<sub>2</sub>O) à pH 7, 298 K, D8 0,5 s, 600MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du MR-34916 (1 mM, PBS/ 5%D<sub>2</sub>O) à pH 7, 298 K, 600 MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY du MR-34916 (1 mM, PBS/5%  $D_2O$ ) à pH 7, 298 K, D8 0,5 s,

600MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du MR-34917 (1 mM, PBS/5% D<sub>2</sub>O) à pH 7, 298 K, 600 MHz)



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY du MR-34917 (1 mM, PBS/5% D<sub>2</sub>O à pH 7, 298 K, D8 0,5 s, 600MHz)
## Résumé

Le cancer de l'ovaire est la cinquième cause de décès par cancer chez la femme en France. La prolifération tumorale dans ce cancer est liée principalement à la dérégulation de l'apoptose. Cette dérégulation joue un rôle clé principalement dans la pathogénèse et la progression tumorale mais aussi dans le développement des résistances aux chimiothérapies existantes. La croissance accrue des cellules tumorales dans le cas du cancer de l'ovaire est liée à une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, en particulier les protéines MCL-1 et Bcl-x<sub>L</sub>. L'inhibition concomitante de ces deux protéines conduit à la mort des cellules chimiorésistances. A ce jour, seuls les inhibiteurs de Bcl-xL ont démontré une efficacité en clinique, et l'inhibition de MCL-1 reste problématique dans un contexte clinique. Dans ce contexte, l'objectif principal de ces travaux de thèse consiste à caractériser, par RMN et modélisation moléculaire, l'interaction entre la protéine MCL-1 et le Pyridoclax, foldamère oligopyridinique très prometteur, synthétisé au CERMN. La spectroscopie RMN nous a permis de définir le site d'interaction, d'estimer la constante d'affinité et de guider le Docking pour obtenir une structure tridimensionnelle du complexe MCL-1:Pyridoclax. Afin de conforter notre étude sur l'implication du Pyridoclax dans l'interaction, des fragments dérivés de ce dernier ont été utilisés. La caractérisation de l'interaction entre ces fragments et la protéine MCL-1 a permis de relever l'importance du groupement styryle du Pyridoclax dans l'interaction avec la protéine MCL-1.

Par ailleurs, nous avons élargi notre étude à d'autres inhibiteurs potentiels de MCL-1 tels que certains médicaments existant sur le marché. La spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence et de caractériser l'interaction entre deux de ces médicaments (le Torsémide et le Déférasirox) et la protéine MCL-1.

Pour finir, afin d'améliorer l'affinité de ces médicaments pour la protéine MCL-1, des modifications structurales ont été proposés en se basant sur la littérature. Les dérivés proposés semblent avoir une affinité très importante pour la protéine MCL-1.

## Abstract

Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death of women in France. Tumor proliferation in this cancer is mainly related to the deregulation of apoptosis. This one plays a main role in pathogenesis and tumor progression but also on the term of development of resistance to existing chemotherapies. The increased growth of tumor cells in ovarian cancer is linked to an overexpression of the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, in particular the MCL-1 and Bcl- $x_L$  proteins. The concomitant inhibition of these two proteins leads to the death of chemoresistance cells. To date, only Bcl- $x_L$  inhibitors have demonstrated clinical efficacy and inhibition of MCL-1 remains problematic in a clinical context.

In this context, the aim of this thesis is to characterize, by NMR and molecular modeling, the interaction between MCL-1 protein and potential inhibitors including Pyridoclax, an oligopyridine foldamer. NMR spectroscopy allowed us to define the interaction site, estimate the affinity constant and guide Docking to obtain a three-dimensional structure of the MCL-1:Pyridoclax complex. In order to obtain more information on the involvement of Pyridoclax in this interaction, fragments derived from it has been used. The characterization of the interaction between these fragments and MCL-1 protein revealed the importance of the styryl group of Pyridoclax in the interaction with MCL-1 protein.

Furthermore, we expanded the scope of our study to include some existing drugs able to interact with MCL-1. NMR spectroscopy allowed us to identify and characterize the interaction between two of these drugs (Torsemide and Deferasirox) and the MCL-1 protein. Finally, in order to improve the affinity of these drugs for MCL-1 protein, structural modifications had been proposed based on the literature. The proposed derivatives appear to have a very high affinity for MCL-1 protein.