



HAL
open science

Simulations de dynamique moléculaire à haute résolution des isoformes 1 et 2 de la pyruvate kinase musculaire

Quentin Delobelle

► **To cite this version:**

Quentin Delobelle. Simulations de dynamique moléculaire à haute résolution des isoformes 1 et 2 de la pyruvate kinase musculaire. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS067 . tel-04617892

HAL Id: tel-04617892

<https://theses.hal.science/tel-04617892>

Submitted on 19 Jun 2024

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.



- *Manuscrit de thèse* -

Thèse de Doctorat
Sorbonne Université

École Doctorale 394 – Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Réalisée

au Centre de Recherche Saint-Antoine UMRS_938 INSERM
et au Laboratoire de Chimie Théorique UMR7616 CNRS

Sujet de thèse

**Simulations de dynamique moléculaire à haute
résolution des isoformes 1 et 2 de la pyruvate kinase
musculaire**

par Quentin DELOBELLE

pour l'obtention du grade de :

Docteur de Sorbonne Université

Soutenu le 02 Avril 2024

Devant un jury composé de :

Présidente	Professeure Chahrazade El Amri	Sorbonne Université
Rapportrices	Professeure Isabelle Segalas-Milazzo	Université de Rouen
	Professeure Nathalie Dupont	Université Sorbonne Paris Nord
Examineur	Professeur Mathieu Montes	CNAM Paris
Membre Invité	Docteur Nohad Gresh	Sorbonne Université
Directeur de thèse	Professeur Vincent Maréchal	Sorbonne Université
Codirecteur de thèse	Professeur Jean-Philip Piquemal	Sorbonne Université

Remerciements

Ces travaux de thèse font l'objet d'une cotutelle entre le Laboratoire de Chimie Théorique de Sorbonne Université et le Centre de Recherche Saint-Antoine de Sorbonne Université.

Je remercie chaleureusement le Professeur Vincent MARECHAL, cofondateur du réseau OBEPINE et le Professeur Jean-Philip PIQUEMAL, directeur du Laboratoire de Chimie Théorique pour avoir initié mon sujet et m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je tiens également à remercier Professeure Chahrazade EL AMRI pour avoir honorée la présidence de mon jury de thèse. Il en va de même aux Professeures Nathalie DUPONT et Isabelle SEGALAS-MILAZZO qui ont ma gratitude la plus sincère pour avoir accepté la tâche de rapporteurs et ainsi juger mes travaux de thèse. Enfin, je tiens à adresser mes remerciements chaleureux au Professeur Mathieu MONTES et au Docteur Nohad GRESH pour avoir accepté d'examiner mes travaux de fin de thèse en tant qu'examineur et membre invité respectivement.

Je remercie mes directeurs de thèse Vincent MARECHAL et Jean-Philip PIQUEMAL pour leur accompagnement dans ce long voyage pour la réalisation à terme de ce projet. Mais aussi de leur rendre gré de leurs disponibilités ainsi que leurs rigueurs pour m'orienter vers la bonne direction et d'avoir la chance de mettre en forme cette thèse.

Je rends aussi de chaleureux remerciements à mes différents encadrants & collègues de travail de cette thèse ;

En débutant par les membres du Centre de Recherche Saint-Antoine (UMR_S 938), je remercie Alexandre ESCARGUEUIL, Elodie PRAMIL, Clémentine DILLARD & tout particulièrement Chloé BORDE, pour leur soutien, leurs connaissances et leurs nombreux retours notamment lors des débuts de ce projet de thèse.

Je remercie ensuite les nombreux soutiens que j'ai pu avoir au sein du Laboratoire de Chimie Théorique (UMR7616) qui ont permis ma formation dans ce nouveau domaine qui m'était étranger qu'est la chimie théorique. Ils ont su répondre avec précision et bienveillance à mes

nombreuses questions pour m'aider à acquérir une certaine autonomie dans la réalisation de ce projet. Je tiens tout particulièrement à remercier Théo JAFFRELOT INIZAN, Frédéric CELERSE, Louis LAGARDERE, Luc-Henry JOLLY, Olivier ADJOUA & Salem TACINE pour leurs accueils chaleureux au sein du laboratoire.

Je tiens enfin à remercier Brandon WALKER, de l'Université du Texas à Austin aux Etats-Unis, pour ses connaissances majeures ainsi que son aide dans nos discussions en ligne pour m'initier à l'utilisation et la mise en pratique du logiciel Poltype, élément crucial de mon projet de thèse.

Je remercie aussi mes amis et amies pour leur apport de soutien pendant ces années de doctorat.

Enfin, c'est avec une émotion immense que je relie cette thèse avec ma famille pour leurs soutiens inépuisables et les précieux moments partagés. Un merci ému à ma mère, mon père et mon petit frère dont l'accompagnement moral, tel un roc insubmersible, a permis l'aboutissement de ce projet personnel. Je leur adresse tout mon amour.

Résumé

Le métabolisme glycolytique joue un rôle essentiel dans les processus physiologiques normaux et dans la croissance des cellules cancéreuses. Les isoformes 1 et 2 de la pyruvate kinase musculaire, appelées PKM1/2, sont des protéines cruciales qui régulent ce métabolisme. La caractérisation de la dynamique structurale de ces biomolécules est donc importante pour développer de nouveaux médicaments dirigés contre les formes exprimées dans les cellules tumorales. Pour ce faire, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire (DM) de ces deux protéines à haute résolution, en nous appuyant sur des techniques d'échantillonnage adaptatif couplées au champ de forces polarisable AMOEBA afin de comprendre la flexibilité conformationnelle de l'enzyme dans ses différents états d'oligomérisation. Nous proposons une analyse structurale à haute résolution pour PKM2 et apportons de nouvelles données structurales pour PKM1. En effet, nous étudions le processus d'oligomérisation de l'enzyme PKM2 (du monomère au tétramère) et nous sommes notamment attachés à analyser la structuration de sites structuraux clés, notamment le site actif et la poche de fixation du Fructose Biphosphate (FBP), un inducteur conformationnel physiologique. Nous montrons également que la fixation du TEPP-46, un activateur pharmacologique de PKM2, induit des modifications structurales très proches de celles induites par la fixation du FBP, bien que les domaines d'interaction soient distincts. Enfin, nous décrivons la première simulation DM à haute résolution de la forme active de PKM1, qui présente de fortes similitudes structurales avec la forme tétramérique de PKM2 liée au FBP. Ces résultats fournissent de nouvelles informations sur la dynamique structurale et la structuration des sites clés pendant l'oligomérisation de PKM2, qui pourraient s'avérer cruciales pour la découverte de nouvelles molécules actives.

Mots-clés : PKM1/PKM2, cancer, TEPP-46, métabolisme, dynamique moléculaire, AMOEBA

Abstract

In both normal physiological processes and cancer cell growth, glycolytic metabolism plays a pivotal role. The Pyruvate Kinase Muscle isoforms 1 and 2, denoted PKM1/2, are crucial proteins that regulate this metabolism. Characterizing the structural dynamics of these biomolecules is thus imperative in order to develop new drugs targeting PMK enzymes in tumor cells. To address this, we performed extensive molecular dynamics (MD) simulations of these two proteins at high-resolution. To do so, we employed adaptive sampling techniques coupled with the polarizable AMOEBA force field to understand the conformational flexibility of the enzyme. We propose a high-resolution structural analysis for PKM2 and introduce structural insights for PKM1. We are studying the oligomerization process of the PKM2 enzyme (from monomer to tetramer) while focusing on the structuring of key structural sites, in particular the active site and the binding pocket for Fructose Biphosphate (FBP), a physiological conformational inducer. We also provide data explaining the impact of TEPP-46, a pharmacological activator, on PKM2 structure and their similarity with PKM2 bound to FBP in conformity to biological results. Finally, we propose the first high-resolution MD simulation of the biological active PKM1 and reveal important structural information in link with strong structural similarities with PKM2 when linked to FBP. These findings provide new insights concerning the structural dynamics and key sites structuration during PKM2 oligomerization that could be critical in drug discovery.

Keywords : PKM1/PKM2, cancer, TEPP-46, metabolism, molecular dynamics, AMOEBA

Table des matières

INTRODUCTION.....	19
CHAPITRE 1. GLYCOLYSE ET PYRUVATE KINASE	19
1.1. <i>Déroulement du métabolisme glycolytique et rôle de la pyruvate kinase</i>	19
1.2. <i>Expression du gène PKM</i>	23
1.2.a. Isoformes et distribution tissulaire	23
1.2.b. Expression et régulation des isoformes PKM.....	24
1.2.b.i. Expression du gène PKM et structure protéique	24
1.2.b.ii. Régulation de l'expression et la localisation de PKM2	27
1.3. <i>Fonctions de PKM2</i>	31
1.3.a. Fonctions liées à la glycolyse.....	32
1.3.b. Fonctions Non glycolytiques	33
1.3.c. Implication structurale de l'allostérie	39
1.4. <i>Pathologies humaines associées à PKM</i>	39
1.4.a. Pathologies cardiaques, musculaires et neurodégénératives	40
1.4.b. Pathologies métaboliques, inflammatoires et immunitaires.....	43
1.4.c. Implication dans le cancer : effet Warburg.....	47
1.4.d. Rôle de PKM2 dans les infections virales	50
1.5. <i>Molécules naturelles et synthétiques capables de réguler PKM2</i>	52
1.5.a. Modulateurs physiologiques.....	52
1.5.b. Molécules naturelles non humaines ou d'origine synthétique	54
1.5.c. Rôles des ARNs non codants	57
CHAPITRE 2. DYNAMIQUE MOLECULAIRE	59
2.1. <i>Introduction et principe</i>	59
2.1.a. Histoire et principe de base	60
2.1.b. Ensemble de coordonnées et vitesses initiales.....	62
2.1.c. Choix du champ de forces	63
2.1.c.i. Généralités.....	63
2.1.c.ii. Caractéristiques du champ de forces polarisable AMOEBA	68
2.1.c.iii. Quelques exemples de modèle de polarisation.....	73
2.1.d. Modèle de solvatation en conditions périodiques	75
2.1.e. Méthode de minimisation et algorithme d'intégration	76
2.1.f. Ensemble thermodynamique.....	79
2.1.g. Logiciels Tinker/Tinker-HP.....	82
2.2. <i>Protocole général d'une dynamique moléculaire</i>	84
2.2.a. Construction du système et modèle initial	84
2.2.b. Paramétrisation des ligands manquants clés.....	85
2.2.c. Minimisation	88
2.2.d. Dynamique initiale et Stratégie d'échantillonnage adaptative	88
2.3. <i>Outil d'analyse</i>	91
CHAPITRE 3. OBJECTIF DE LA THESE	91
MODELISATION A HAUTE RESOLUTION DE LA DYNAMIQUE STRUCTURELLE DE PKM1/PKM2	95
CHAPITRE 1. PREPARATION DES SIMULATIONS	95
CHAPITRE 2. RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA DYNAMIQUE STRUCTURELLE POUR PKM1/PKM2	97
2.1. <i>Comprendre la structuration PKM1/2 pendant le processus d'oligomérisation</i>	97
2.2. <i>PKM1/2 : Analyse des résidus et de la stabilité des domaines pendant la simulation de dynamique moléculaire</i>	101

2.3. Analyse structurale des sites clés de la protéine PKM.....	103
2.3.a. Structuration du site actif et lien causal avec l'état oligomérique de PKM2.....	103
2.3.b. Dynamique structurale de la poche de fixation FBP : allostérie et modulations oligomériques	107
2.4. Impact structural de l'activateur pharmacologique TEPP-46 par comparaison avec le	
ligand naturel FBP	110
2.5. Analyse comparative de la druggabilité : recherche de poches cryptiques spécifiques à	
PKM2113	
2.6. Publication.....	117
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	143
BIBLIOGRAPHIE.....	164

Liste des abréviations et symboles

Abréviations

Å	Angström
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AKT	Protéine Kinase B
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
AMOEBA	Atomic Multipole Optimized Energetics for Biomolecular Applications
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BCL	Lymphome à Cellules B
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
CCND	Cycline D1
CG	Cancer Gastrique
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
CPU	Central Processing Unit
DASA-58	N,N'-diarylsulfonamide
DHAP	Dihydroxyacétone Phosphate
DM	Dynamique Moléculaire
DMA	Analyse de Distribution des Multipôles
EBV	Virus Epstein-Barr
EGF	Facteur de Croissance Épidermique
EGFR	Récepteur au Facteur de Croissance Épidermique
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ETC	Système de Transport des Électrons
FBP	Fructose Biphosphate
fs	femtoseconde
G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GC	Gradient Conjugué
GLUT	Transporteur du Glucose
GPU	Graphics Processing Unit
GROMACS	GRONingen MACHine for Chemical Simulations
GROMOS	GRONingen MOlecular Simulation package
HDAC	Histone Désacétylase
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HK	Hexokinase
HMGB	High-mobility group box 1
hnRNP	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins
HPV	Papillomavirus Humain
HSP	Heat Shock Protein

IL	Interleukine
K	Kelvin
LDH	Lactate Déshydrogénase
LMP	Latent Membrane Protein 1
lncARN	ARN Long Non Codants
μs	Microseconde
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
MKK	Mitogen-activated protein Kinase Kinase
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide + Hydrogène (H)
NASH	Stéatose Hépatique Non Alcoolique du foie
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NLRP	Pyrin-Like Receptor family containing Pyrin domain 3
NLS	Séquence de Localisation Nucléaire
n-pFF	Champ de forces non polarisable
ns	Nanoseconde
Oct	Octamer-binding Transcription factor
OXPPOS	Phosphorylation Oxydative
PDB	Protein Data Bank
PCA	Analyse des composantes principales
PEP	Phosphoénolpyruvate
pFF	Champ de forces polarisable
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIN	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase-NIMA interacting
PK	Pyruvate Kinase
PKL/R	Pyruvate Kinase Liver-type/in Red blood cells
PKM1/2	Pyruvate Kinase Muscle isoform 1/2
PME	Particule Mesh Ewald
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PTB	Polypyrimidine Tract Binding protein
QM/MM	Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSE	Root Mean Square Error
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène
SAICAR	Succinylaminoimidazole-carboxamide riboside
SD	Steepest Descent
SIRT	Sirtuine
SMARTS	Simplified Molecular Input Line Entry System
SRSF	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUMO	Small Ubiquitin Modifying Protein
TCA	Cycle de l'Acide Tricarboxylique
TEPP-46	Thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinone

TGF	Transforming Growth Factor
UTR	Région Non Traduite
vdW	van der Waals
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Symbole des résidus

A Ala	→ Alanine
C Cys	→ Cystéine
D Asp	→ Acide aspartique
E Glu	→ Acide glutamique
F Phe	→ Phénylalanine
G Gly	→ Glycine
H His	→ Histidine
I Ile	→ Isoleucine
K Lys	→ Lysine
L Leu	→ Leucine
M Met	→ Méthionine
N Asn	→ Asparagine
P Pro	→ Proline
Q Gln	→ Glutamine
R Arg	→ Arginine
S Ser	→ Serine
T Thr	→ Thréonine
V Val	→ Valine
W Trp	→ Tryptophane
Y Tyr	→ Tyrosine

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'ensemble du métabolisme glycolytique (Glycolyse aérobie ou Fermentation, Cycle de Krebs, ETC et OXPHOS)	20
Figure 2 : Représentation schématique des étapes de la glycolyse	22
Figure 3 : Analyse comparative entre les séquences des deux isoformes PKM	24
Figure 4 : Représentation structurale de PKM2 et cycle de régulation dimère/tétramère	25
Figure 5 : Représentation de la séquence et des différents domaines de PKM2 avec site spécifique de différence PKM1/PKM2	27
Figure 6 : Représentation de l'ensemble des voies de biosynthèses intrinsèquement liées au métabolisme glycolytique et ses métabolites	32
Figure 7 : Représentation schématique des fonctions non métaboliques majeures de PKM2	36
Figure 8 : Représentation schématique des différents états oligomériques de PKM2 associés à leurs implications cellulaires	38
Figure 9 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans la pathologie Alzheimer	42
Figure 10 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans quelques exemples de l'immunité cellulaire	45
Figure 11 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans la pathologie du lupus neuropsychiatrique	47
Figure 12 : Représentation schématique de l'expression de PKM2 en contexte tumoral et de son impact sur le métabolisme glycolytique	48
Figure 13 : Représentation du rôle de quelques agents viraux sur le métabolisme glycolytique	51
Figure 14 : Implication et effet de quelques régulateur naturels sur l'activité de PKM2	53
Figure 15 : Exemples de régulateurs pharmacologiques sur l'activité de PKM2	55
Figure 16 : Exemples de l'action régulatrice de quelques ARN non codants sur l'activité de PKM2	58
Figure 17 : Représentation graphique illustrant les paramètres de vdW	66
Figure 18 : Représentations schématiques des différents types d'interactions mesurées par un champ de forces classique	67
Figure 19 : Représentation schématique du modèle d'oscillateur de Drude	74
Figure 20 : Schématisation d'un possible protocole de décomposition spatiale tridimensionnelle	83
Figure 21 : Visualisation du processus de solvatation d'un système PKM	85
Figure 22 : Découpage des différentes étapes de la paramétrisation Poltype pour le champ de forces AMOEBA	86
Figure 23 : Exemple du résultat final de la paramétrisation Poltype	87
Figure 24 : Représentation schématique du protocole de l'échantillonnage adaptatif	89
Figure 25 : Représentation graphique du profil d'exploration des simulations DM	98
Figure 26 : L'analyse globale du RMSD vs RG montre des changements structurels et du volume de PKM2 au cours du processus d'oligomérisation	99
Figure 27 : L'analyse RMSF montre la structuration de PKM2 au cours des processus d'oligomérisation et de fixation de FBP et confirme les analogies tétramériques de PKM1/2 sur des domaines clés	102
Figure 28 : Représentation structurale du site actif de PKM2	103
Figures 29/32 : La structuration du site actif est associée à la conformation oligomérique de PKM2	104/106

Figure 30 : Dynamique de la partie interne du côté actif de la PKM2 monomérique	105
Figure 31 : Dynamique de la partie interne du côté actif de la PKM2 dimérique	105
Figure 33 : Représentation structurale du site allostérique des isoformes de PKM	108
Figure 34 : Structuration globale de la poche de fixation FBP pendant le processus d'oligomérisation et de docking du FBP et comparaison avec le site de fixation possible de PKM1	109
Figure 35 : Dynamique de la poche de fixation du FBP pour le tétramère PKM2 lié au FBP	109
Figure 36 : Représentation structurale du site de fixation du TEPP-46 sur PKM2	110
Figure 37 : Représentation graphique du profil d'exploration des simulations DM	111
Figure 38 : Résultats structuraux issus de la fixation du TEPP sur un PKM2 tétramérique	112
Figure 39 : Représentation de l'emplacement des principales poches de la PKM1 du 3SRF	113
Figure 40 : Représentation schématique d'un échantillon de poches détectées avec DoGSite	114
Figure 41 : Boxplot de la distribution du DrugScore pour chaque nouvelle poche obtenue par notre échantillonnage structurel	115
Figure 42 : Structures et propriétés de nouvelles poches potentielles spécifiques de PKM2 déterminées par un petit échantillon des simulations Tinker-HP	116

Liste des Tables

Tableau 1 : Tableau non exhaustif de quelques agents biologiques naturels ou non pouvant altérer la structure et fonctions associés de PKM2	56
Tableau 2 : Tableau énumérant les différentes possibilités de valeurs des couples n/Φ_0 pour l'ordre de calcul des énergies de torsions des angles dièdres	64
Tableau 3 : Tableau comparatif des programmes principaux de DM corrélés avec leur champs de forces majoritaires.	82

Introduction

Chapitre 1. Glycolyse et Pyruvate Kinase

L'ensemble des processus essentiels orchestré par la cellule au cours de sa vie est lié à un réseau métabolique complexe. Celui-ci se doit d'être finement régulé par rapport aux variations physico-chimiques qui se produisent en dehors de la cellule ainsi qu'à l'intérieur de celle-ci. Cette régulation permet ainsi à la cellule d'acquiescer à la fois l'énergie, mais aussi les métabolites requis à la croissance cellulaire ou au maintien de l'homéostasie générale¹. Le glucose – acteur clef de la voie du métabolisme glycolytique – intervient à la fois dans la production d'énergie et comme brique essentielle à plusieurs voies de biogenèse, dont les régulations croisées sont déterminées pour partie par la présence ou l'absence d'oxygène².

1.1. Déroulement du métabolisme glycolytique et rôle de la pyruvate kinase

Le métabolisme glycolytique est un processus qui permet la production d'Adénosine Triphosphate (ATP) afin de contribuer aux besoins énergétiques de la cellule. Ce métabolisme implique trois voies majeures : la glycolyse, dans le cytoplasme cellulaire, le cycle de Krebs (ou Cycle de l'Acide Tricarboxylique (TCA)) et pour finir soit le système de transport des électrons (ETC) ou la Phosphorylation Oxydative (OXPHOS), se déroulant dans la mitochondrie. Toutes ces voies permettent ainsi la métabolisation du glucose en ATP selon des voies dépendantes de la présence en oxygène, couplées au renouvellement des transporteurs d'électrons FAD/NADH dans la mitochondrie (voie OXPHOS & ETC) en parallèle de la décarboxylation totale du pyruvate dans le cycle de Krebs. En condition aérobie, l'ensemble de ces voies est mis à contribution et permet ainsi de générer un total de 36 molécules d'ATP. En revanche, l'absence d'oxygène dans le milieu induit la métabolisation du glucose en lactate sans passer par la mitochondrie et les voies TCA/ETC/OXPHOS. N'étant pas mises à contribution, cela n'entraîne la synthèse que de 2 molécules d'ATP provenant de la glycolyse en elle-même mais où le renouvellement des transporteurs d'électrons se réalise grâce à la transformation du pyruvate en acide lactique ou en éthanol³ (**Figure 1**). On peut donc considérer que la glycolyse, découverte pour la première fois en 1897 par les chercheurs allemands Hans Buchner et Eduard Buchner, est la voie métabolique centrale permettant de relier à la fois production énergétique continue (avec les voies mitochondriales) et besoins anaboliques chez les espèces procaryotes et eucaryotes⁴.

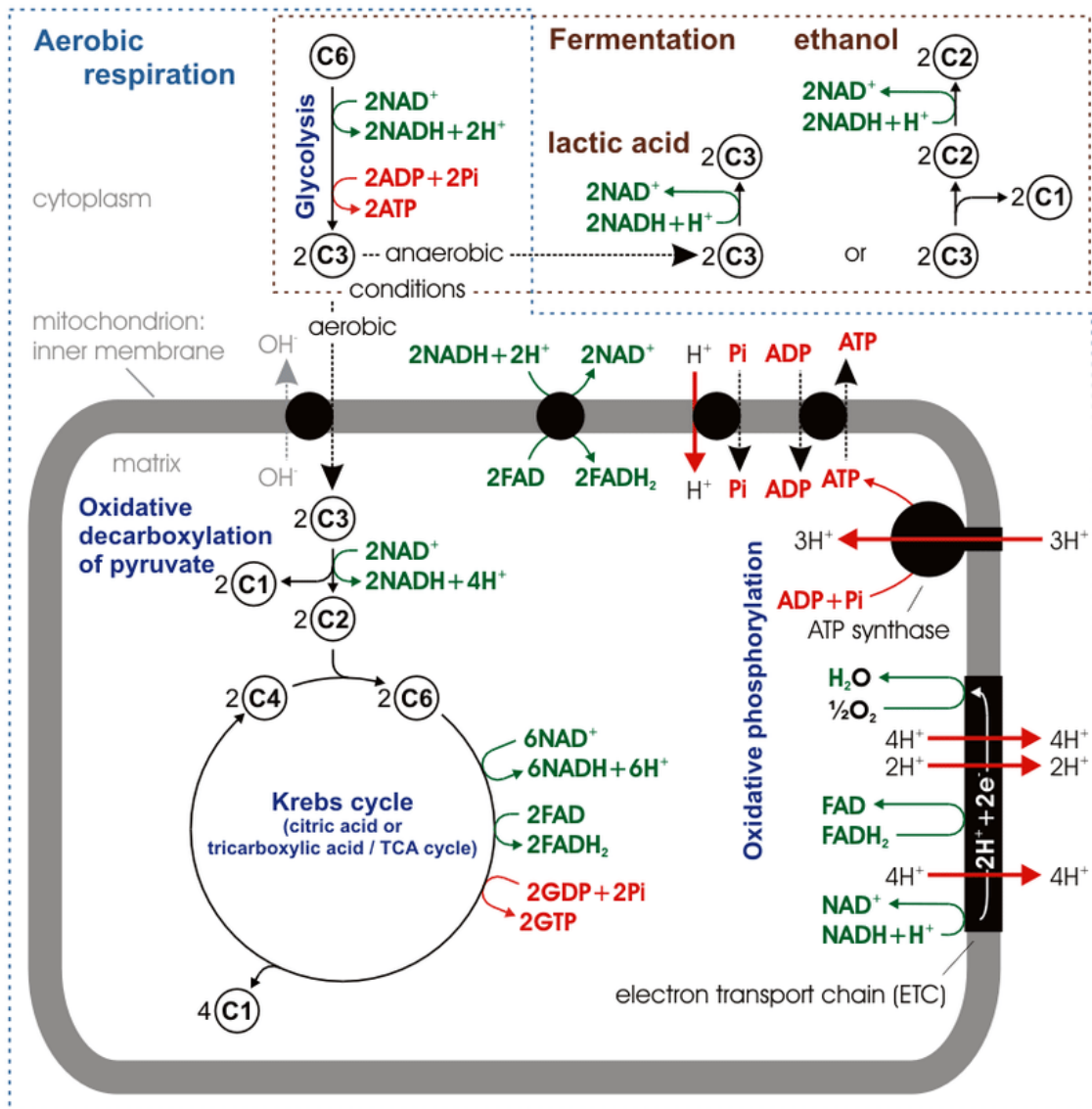


Figure 1 : Représentation schématique de l'ensemble du métabolisme glycolytique (Glycolyse aérobie ou Fermentation, Cycle de Krebs, ETC et OXPHOS)⁵. La membrane plasmique externe de la mitochondrie n'est pas représentée ici.

Dans les cellules humaines, le glucose est internalisé dans la cellule à l'aide de canaux de transports membranaires appelés GLUT (GLUT1 principalement en condition physiologique⁶). La glycolyse implique l'oxydation d'une molécule de glucose dans le cytoplasme pour aboutir à la formation de deux molécules de pyruvate. Elle consiste en une succession de dix réactions enzymatiques séparables en deux parties (**Figure 2**). La première (étapes 1 à 5) génère des métabolites intermédiaires critiques pour les voies de biosynthèse et la consommation d'ATP :

1. Phosphorylation du groupe hydroxyle sur le Carbone 6 du glucose par l'hexokinase (HK), générant ainsi le **glucose-6-phosphate (G6P)**,

2. G6P est transformé en **fructose-6-phosphate** (F6P) par la phosphoglucose isomérase (PI),
3. F6P est à nouveau phosphorylé en Carbone 1 par la phosphofructokinase 1 (PFK-1), donnant ainsi le **fructose-1,6-biphosphate** (FBP),
4. FBP est ensuite scindé en deux molécules tri-carbonées par l'aldolase, générant ainsi la **dihydroxyacétone phosphate** (DHAP) et le **D-glycéraldéhyde-3-phosphate** (G3P),
5. DHAP est isomérisé par la triose-phosphate isomérase (TPI) pour former une seconde molécule de **G3P**,

La seconde partie de la voie (étapes 6 à 10) implique des réactions redox permettant la formation d'ATP et de pyruvate :

6. Chaque G3P est par la suite oxydé et phosphorylé par le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), générant ainsi deux **D-1,3-biphosphoglycérate** (1,3-BPG). Cette étape utilise la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme cofacteur, générant ainsi par réduction deux molécules de **NADH** ayant un rôle direct dans le métabolisme respiratoire des mitochondries pour la suite du processus de synthèse de l'ATP,
7. Chaque molécule de 1,3-BPG est déphosphorylée par la phosphoglycérate kinase (PGK), permettant ainsi de générer deux **3-phosphoglycérate** (3-PG). En parallèle chacun des groupements phosphates retirés par cette réaction est transféré sur une molécule d'Adénosine Diphosphate (ADP) générant ainsi deux **ATP**, ramenant le bilan énergétique net à 0 ATP,
8. Le groupement phosphate en Carbone 3 du 3-PG est transféré sur le Carbone 2 par la phosphoglycérate mutase (PGM), formant ainsi deux **2-phosphoglycérate** (2-PG),
9. Le 2-PG est ensuite déshydraté par l'action de l'énolase, générant ainsi deux molécules de **phosphoénolpyruvate** (PEP),
10. La dernière étape - irréversible - de la glycolyse implique la déphosphorylation du PEP par la pyruvate kinase (PK), permettant finalement d'obtenir deux molécules de **pyruvate**. De la même manière, les groupements phosphates obtenus sont transférés sur deux ADP pour générer à nouveau deux **ATP** amenant le bilan énergétique global de la glycolyse à 2 ATP synthétisées.

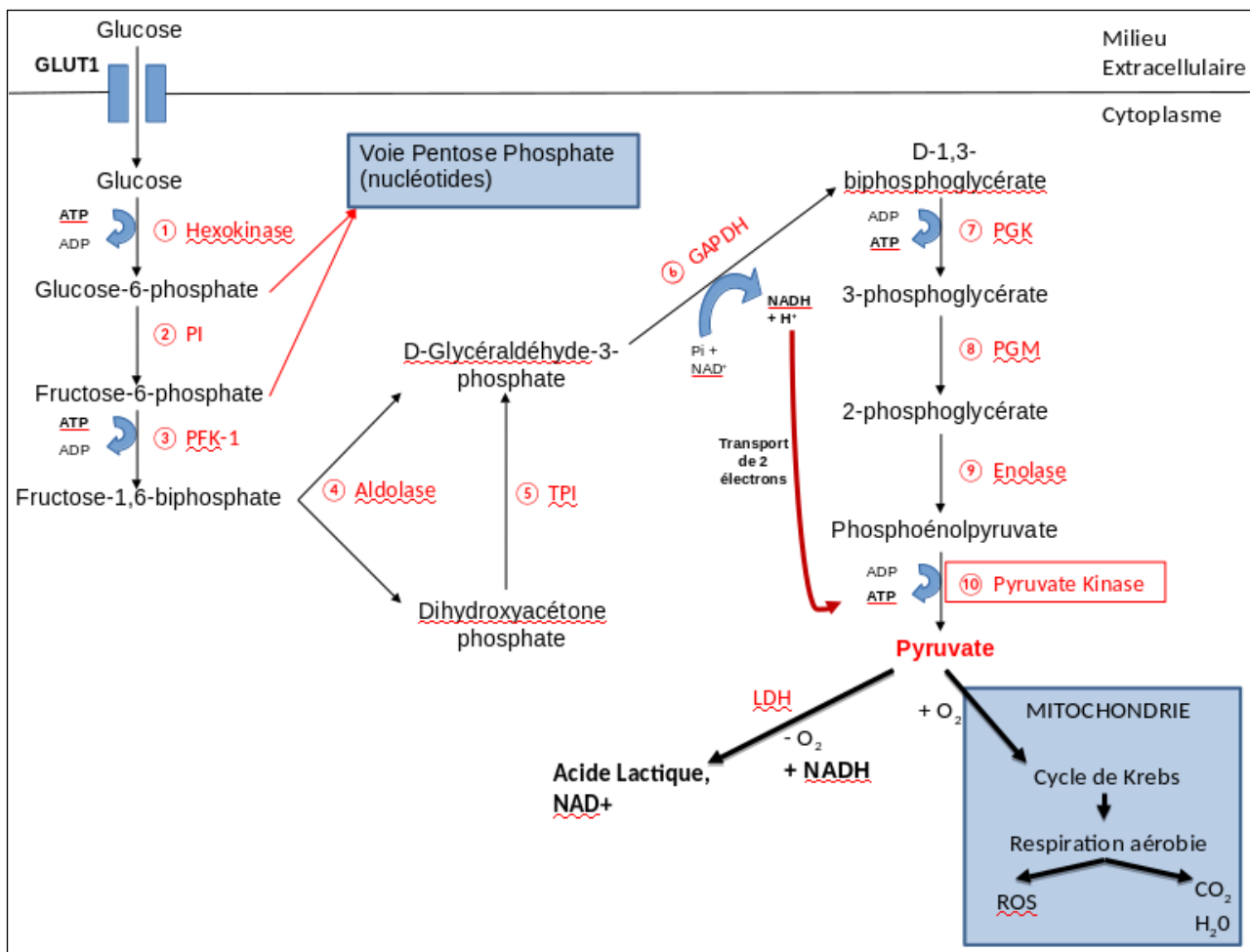


Figure 2 : Représentation schématique des étapes de la glycolyse. Après être internalisée dans la cellule à l'aide de GLUT1 (famille des transporteurs SLC (Solute Carrier)), une molécule de glucose est métabolisée dans un processus comprenant 10 réactions enzymatiques permettant la synthèse de 2 ATP, 2 NADH et 2 pyruvates. La dernière étape catalysée par la pyruvate kinase (PK) est une réaction limitante de par la présence de différentes isoformes plus ou moins réactives au phosphoénolpyruvate (PEP) pouvant ainsi agir sur la rapidité de la glycolyse (importance de la voie Pentose Phosphate (PP)) mais aussi le devenir du pyruvate synthétisé (voie TCA...).

Au total, ce processus permet ainsi de générer, à partir d'une molécule de glucose, deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH (qui devront être réoxydées) et deux molécules de pyruvate. Ce dernier entre dans le TCA au sein de la mitochondrie par transformation oxydative en Acétyl-CoA, en condition aérobie. En effet, en absence d'oxygène, le pyruvate mais aussi le NADH formé ne peuvent être oxydés totalement et efficacement, provoquant un effet limitant sur la consommation du glucose et aussi de l'activité de la GAPDH. Dans ce cas, le pyruvate est réduit en lactate, à l'aide de la lactate déshydrogénase (LDH), permettant aussi en parallèle l'oxydation d'un NADH pour renouveler le réservoir en NAD⁺. Ce phénomène est aussi observé dans les érythrocytes (n'ayant pas de mitochondrie), mais aussi dans de nombreuses cellules cancéreuses (effet Warburg, voir infra)⁷.

1.2. Expression du gène *PKM*

L'étape finale de la glycolyse (n°10), menant à la synthèse limitante et irréversible du pyruvate, est catalysée par la PK.

1.2.a. *Isoformes et distribution tissulaire*

La PK existe sous différentes isoformes tissu-spécifiques chez les mammifères : (1) la **PKR** (PK in Red-blood cells), longue de 574 résidus, dont l'expression est restreinte aux érythrocytes⁸, (2) la **PKL** (PK Liver-type) possédant 543 acides aminés avec une présence prédominante dans les tissus ayant un besoin plus faible pour le PEP comme le foie, le rein et les intestins⁹. Ces deux isoformes proviennent de l'expression du gène *PKLR* situé sur le chromosome 1 et possèdent une similarité de 71-72 % avec les autres isoformes¹⁰. (3) **PKM1** (PK Muscle isoform 1) présente une forte activité catalytique. Elle est principalement localisée dans les tissus ayant un fort besoin en énergie comme le cerveau, le cœur ou les muscles. (4) Enfin, **PKM2** (PK Muscle isoform 2) est exprimée principalement dans les cellules à fortes capacités prolifératives comme les cellules embryonnaires et les cellules cancéreuses. Elle peut aussi se trouver dans d'autres tissus à des taux variables¹¹. Ces isoformes sont actives à l'état d'homotétramères, mais alors que PKM1 est constitutivement active, les autres isoformes -R, -L et M2 sont soumises à une régulation positive requérant leur liaison au FBP¹².

La prépondérance de PKM2 au sein des tissus embryonnaires illustre bien l'importance de cette enzyme dans le métabolisme des cellules à haut besoin prolifératif. Au cours du développement embryonnaire, PKM2 joue la fonction d'isoforme prototype des PK qui sera ensuite substituée par les autres PK-tissus spécifiques au cours de la différenciation cellulaire¹³. Cette substitution de la forme PKM2 par les autres enzymes pendant le développement embryonnaire démontre l'importance d'un haut niveau de régulation de l'expression des différentes isoformes en fonction des besoins de chaque type cellulaire au fur et à mesure de leur différenciation embryonnaire et de la perte de leur capacité de prolifération. Plusieurs études indiquent que la transition de l'expression vers la PKM2 est possible pendant la tumorigenèse comme par exemple le passage de la forme PKL vers PKM2 dans la phase tardive de la formation d'hépatocarcinomes¹⁴. Christofk *et al.* ont également montré une transition de l'isoforme M1 vers l'isoforme M2 et la mise en place d'un métabolisme de type glycolyse aérobie dans un contexte tumoral¹⁵. Cette étude démontre

également que le passage de PKM2 à PKM1 provoque à l'inverse une importante réduction de la croissance tumorale, confirmant le rôle essentiel de l'isoforme M2 dans la carcinogénèse. Une autre étude a observé, par analyse des génomes de 16 lignées cancéreuses, une expression augmentée de PKM2, même si la transition M1→M2 n'a été observée que dans les glioblastomes¹⁶.

1.2.b. Expression et régulation des isoformes PKM

1.2.b.i. Expression du gène PKM et structure protéique

Les isoformes PKM sont issues d'un gène commun, le gène *PKM*, situé sur le chromosome 15 chez l'Homme. Le gène comprend 12 exons et 11 introns¹⁷. Un épissage alternatif - grâce à l'action d'un complexe de splicéosome contenant les ribonucléoprotéines hétérogènes hnRNPA1 et hnRNPA2 en complexe avec la Polypyrimidine Tract Binding protein (PTB)¹⁸ - conduit à l'expression du transcrit PKM1, par perte de l'exon 10, ou de celui de PKM2, par perte de l'exon 9 (**Figure 3**). Des études plus récentes montrent que la conservation de l'exon 10 est augmentée en présence du facteur Serine/Arginine-Rich

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1054 bits(2726)	0.0	Compositional matrix adjust.	509/531(96%)	521/531(98%)	0/531(0%)
Query 1	1	MSKPHSEAGTAFIQQLHAAMADTFLEHMCRLDIDSPITARNTGIICTIGPASRSVET	60		
Sbjct 1	1	60		
Query 61	61	LKEMIKSGMNVARLNFSGHTHEYHAETIKNVRTATESFASDPILYRPVAVALDTKGPEIR	120		
Sbjct 61	61	120		
Query 121	121	TGLIKGSGTAEVELKKGATLKITLDNAYMEKCDENILWLDYKNICKVVEVGSKIYVDDGL	180		
Sbjct 121	121	180		
Query 181	181	ISLQVKQKGADFLVTEVENGGSLGSKKGVNLPAAVDLPAVSEKDIQDLKFGVEQDVMV	240		
Sbjct 181	181	240		
Query 241	241	FASFIRKASDVHEVRKVLGEKGKNIKIISKIENHEGVRRFDEILEASDGIMVARGDLGIE	300		
Sbjct 241	241	300		
Query 301	301	IPAEEKVFLAQKMMIGRCNRAGKPVICATQMLESMIKKPRPTRAEGSDVANAVLDGADCIM	360		
Sbjct 301	301	360		
Query 361	361	LSGETAKGDYPLEAVRMQHLIAREAEAAIYHLQLFEELRRLAPITSDPTEATAVGAVEAS	420		
Sbjct 361	361MF.RK.....V.ASSHST.LM..M.M.S.....	420		
Query 421	421	FKCCSGAIIIVLTKSGRSAHQVARYRPRAPIIAVTRNPQATARQAHLRYGIFPVLCKDPVQE	480		
Sbjct 421	421	Y..LAA.L...E.....	480		
Query 481	481	AWAEDVDLRVNFAMNVGKARGFFKKGDVVIVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP	531		
Sbjct 481	481	531		

Figure 3 : Analyse comparative entre les séquences des deux isoformes PKM. Les protéines PKM1 (Sbjct) et PKM2 (Query) sont comparées au niveau protéique à l'aide de Blast. Les résidus soulignés en bleu correspondent aux résidus respectifs des exons 9 (PKM1) ou 10 (PKM2) avec une région différente correspondant au rectangle rouge. Les acides aminés participants à la liaison avec le FBP sont marqués par un cercle vert.

Splicing Factor 3 (SRSF3)¹⁹. De plus, comme le contexte métabolique est différent selon les besoins en PKM1 ou PKM2, le gène *PKM* est la source de nombreux mécanismes de régulation. Dans le cas de cellules cancéreuses, le facteur oncogène c-Myc favoriserait l'expression de transcrits épissés contenant l'exon 10²⁰. L'isoforme PKM2 est modulée positivement par la voie HIF-1 α /c-Myc liée à la voie de signalisation PI3K (phosphoinositide-

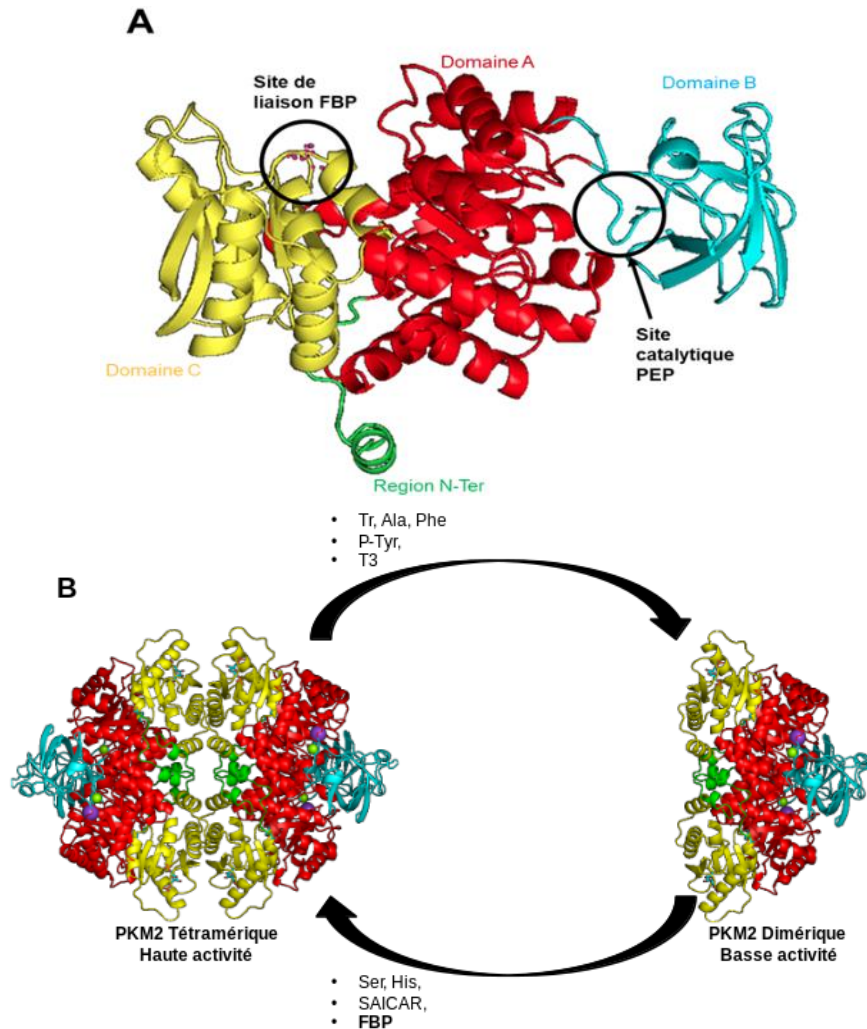


Figure 4 : Représentation structurale de PKM2 et cycle de régulation dimère/tétramère. (A) Visualisation PyMOL d'un monomère de PKM2 et de ses différents domaines A, B, C et N-Ter colorés respectivement en rouge, cyan, jaune et vert. Les régions structurales du site catalytique et du site allostérique sont aussi indiquées. (B) Représentation de l'ensemble des modulateurs naturels régulant le ratio entre forme dimérique et tétramérique de PKM2.

3-kinase)/AKT/mTOR en contexte tumoral²¹. Le glucose, qui sert de base à la cascade enzymatique à laquelle appartient PKM2, semble également jouer un rôle majeur dans la régulation de l'isoforme M2 dans des lignées de type adipocytaires ou d'hépatomes du rat²². En condition d'hypoxie, fréquente dans les tissus tumoraux, le gène *PKM* est surexprimé en raison de la stabilisation du facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factors)-1 α ²³. La régulation du gène *PKM* permet d'assurer l'expression de chaque isoforme dans le contexte

opportun répondant aux besoins cellulaires. Ces mêmes processus sont actifs dans les cellules tumorales, où l'isoforme M2 est majoritairement exprimée. Les exons 9 et 10 codent le même nombre de résidus, au total 56, entre les positions 380-435 mais se distinguent par 22 acides aminés différents (**Figure 3**). Les deux isoformes PKM1 et PKM2 ont une homologie de 96 %. Même si ces deux entités ont des fonctions enzymatiques identiques, leur cinétique et leur affinité pour le substrat PEP diffèrent. En effet, PKM1 est constitutivement active et n'est sujette à aucune régulation allostérique homotrope ou hétérotrope²⁴. Ce n'est en revanche pas le cas pour PKM2, dont l'activité enzymatique basale est la plus faible. Cette activité est régulée par plusieurs métabolites endogènes ayant un effet allostérique, le dimère étant considéré comme la forme la moins active²⁵. Malgré le manque de données expérimentales, le monomère présenterait une activité encore plus réduite, mais manifeste des fonctions nucléaires qui seront présentées dans un autre chapitre. Le tétramère PKM2 se présente sous deux formes dites tendues (T) ou relâchées (R, la plus active) selon la présence et la nature des métabolites qui lui sont liés¹². Cette propriété de PKM2 permet une large diversité de dynamique conformationnelle, et donc de modulations de son activité. Ces métabolites (**Figure 4**) peuvent avoir un effet activateur : Serine (Ser) et Histidine (His) ou la molécule Succinylaminoimidazole-carboxamide riboside (SAICAR) présente en tant qu'intermédiaire pendant la synthèse des purines dans la cellule et agissant positivement sur l'activité de pyruvate kinase de PKM2²⁶⁻²⁷. D'autres composés provoquent l'effet inverse en déstabilisant la forme tétramérique de PKM2 : le tryptophane (Trp), l'alanine (Ala), la phénylalanine (Phe), la phospho-tyrosine (P-Tyr) ou bien l'hormone thyroïdienne T3²⁸⁻²⁹. Parmi les molécules activatrices se trouve le FBP, un intermédiaire de la voie de la glycolyse qui permet de stabiliser PKM2 sous son état tétramérique de plus haute affinité pour le PEP (forme R)³⁰. Le ratio monomère/dimère/tétramère de l'isoforme PKM2 est en lien étroit avec la concentration intracellulaire de FBP qui favorise l'état tétramérique. Une concentration faible en FBP favorise inversement l'accumulation des formes dimériques et monomériques³¹. A l'opposé, l'activité de PKM1 ne semble pas affectée par le FBP. Une région partiellement homologue au site de fixation du FBP sur PKM2 existe sur PKM1, mais aucune donnée n'est disponible qui permettrait d'évaluer la capacité du FBP à s'y fixer²⁴ (**Figure 3**). Les effets conjugués des régulateurs allostériques jouent un rôle critique dans le contexte tumoral et notamment dans les régulations métaboliques nécessaires dans un environnement souvent limité en nutriments³². Chaque monomère de PKM2 est composé de trois domaines majeurs A/B/C et

d'une région N-terminale. La région A couvre les résidus 44 à 116 (A1) et 219 à 389 (A2). Le domaine B correspond à une région externe (résidus 117 à 218). La région entre ce domaine et la région A1 (résidus 44-116) de la protéine forme le site actif de PKM2 pour la

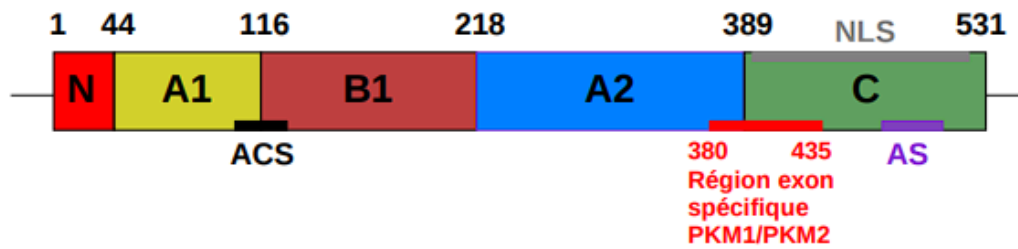


Figure 5 : Domaines de PKM2 et région spécifique aux isoformes PKM1/PKM2. ACS correspondant au site actif de catalyse, AS au site de fixation naturel du FBP et NLS à la région contenant la séquence de localisation nucléaire (D'après Iqbal *et al.* 2014³³).

fixation du PEP (ACS). Le domaine C, constitué des résidus 390 à 531, contient le site allostérique (AS) pour la fixation du FBP. L'extrémité N-terminale est présente dans cette structure sur les résidus 1-43 (**Figure 5**)³⁴.

1.2.b.ii. Régulation de l'expression et la localisation de PKM2

Les PK sont fréquemment observées sous forme tétramérique. Toutefois, notre projet s'est attaché en priorité à comparer la structure des deux formes les plus étroitement conservées, à savoir PKM1 et PKM2³⁵⁻³⁶. Au niveau génétique, des études sur des patients ayant le syndrome de Bloom ont permis d'identifier des mutations faux-sens pro-cancéreuses et spécifiques à PKM2. Celles-ci sont localisées sur l'exon 10 et ont un effet sur l'augmentation de la prolifération cellulaire en agissant par exemple sur l'import et l'accumulation du glucose, en particulier grâce au rôle transactivateur positif de PKM2 sur le gène de *GLUT1* servant de transporteur du glucose³³. A l'échelle protéique, d'autres facteurs qui diffèrent de ceux précédemment cités contribuent aussi à la modulation de la configuration spatiale et physico-chimique de PKM2 mais aussi à sa localisation et son activité enzymatique. L'isomérisation en *cis-trans* est un mécanisme chimique qui modifie l'organisation spatiale de différents groupes conformationnels autour d'une région précise d'une molécule (*cis* pour même côté et *trans* pour plan opposé). Celle-ci a son importance dans des fonctions non enzymatiques de PKM2 en jouant un rôle dans le ratio des formes monomérique, dimérique et tétramérique de PKM2³⁷. En contexte tumoral, on observe la prédominance de la forme dimérique de PKM2, ce qui est lié à une augmentation de la production en lactate et une accumulation en phospho-métabolites en amont de la glycolyse³⁸.

De plus, la transition dimère/tétramère et le phénomène transitionnel en *cis-trans* modifient sa fonction et sa localisation subcellulaire. Dans les cellules tumorales, l'état dimérique de PKM2 permet aux cellules cancéreuses d'accumuler des composés métaboliques essentiels (acides aminés, nucléotides...) pour toutes les voies de biosynthèse nécessaires à la prolifération cellulaire³⁵. Des modifications post-traductionnelles ont également un rôle régulateur de l'isomérisation de PKM2. Ainsi, la phosphorylation sur la sérine en position 37 de PKM2 (Ser37) par les protéines ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) permet de recruter la peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase-NIMA interacting 1, ou PIN1, permettant la régulation de l'état tétramérique de PKM2. Ce processus aboutit à un changement conformationnel qui expose une séquence de localisation nucléaire (NLS) spécifique de PKM2 permettant de recruter une protéine de la famille des importines, l'importine $\alpha 5$, conduisant à l'import nucléaire du dimère PKM2 nouvellement formé³⁹.

PKM2 est également la cible de processus d'oxydation, de phosphorylation et d'acétylation qui participent également à la modulation de l'activité, de la structure oligomérique et de la localisation de PKM2 selon le contexte cellulaire :

- **La phosphorylation** sur une tyrosine en position 105 (Tyr105) par la protéine Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) stabilise la forme dimérique de plus faible affinité pour le substrat, conduisant ainsi à une diminution de l'activité enzymatique. Celle-ci agit aussi sur l'allostérie en gênant la fixation du FBP⁴⁰. En parallèle, diverses phosphorylations (sérine/thréonine spécifiques) sont possibles pour assurer la translocation nucléaire de PKM2. Dans le contexte d'une stimulation par le facteur de croissance épidermique (EGF), la voie ERK1/2 (pour Extracellular signal-Regulated Kinase 2) permet une phosphorylation en Ser37 conduisant à la translocation nucléaire de PKM2. Une autre sérine en position 202 (Ser202) est phosphorylable par la protéine AKT après activation cellulaire par le facteur de croissance insuline-like (IGF-1). Elle conduit elle aussi à la translocation nucléaire par l'importine $\alpha 5$ ⁴¹. Une phosphorylation de PKM2 sur un résidu thréonine en position 454 (Thr454) par PIM2 (Proviral Insertion in Murine lymphomas 2) peut également favoriser les fonctions non glycolytiques nucléaires du dimère PKM2 car la mutation de ce résidu conduit à la réduction de la transactivation par HIF-1 α dépendante de PKM2⁴².
- **L'acétylation** des lysines en position 305 et 433 (Lys305/Lys433) stimule la forme

dimérique de PKM2. L'acétylation Lys305 survient dans un contexte de forte concentration en glucose intracellulaire, via la protéine PCAF (P300/CBP-Associated Factor). Cette modification post-traductionnelle permet à PKM2 d'être prise en charge par la machinerie de dégradation lysosomale via le processus d'autophagie contrôlé par une chaperonne, ce qui entraîne une accumulation significative en glucose et en métabolites intermédiaires⁴³. L'acétylation sur Lys433 est réalisée par l'acétyltransférase p300, induite en réponse à divers stimuli oncogéniques ou mitogéniques. Cette modification favorise la formation du dimère PKM2 et sa translocation nucléaire⁴⁴. Ce processus est régulé négativement par des désacétylases afin de limiter la croissance tumorale. C'est par exemple le cas de la Sirtuine 6 (SIRT6) capable d'enlever le marqueur d'acétylation sur le résidu Lys433, ce qui conduit au retour du dimère PKM2 du noyau vers le cytoplasme, inhibant de fait des fonctions non glycolytiques qui contribuent au développement des tumeurs⁴⁵. Dans le cas de la lysine Lys305, SIRT2 joue le rôle de désacétylase et empêche la dégradation de PKM2 par la voie lysosomale⁴⁶.

- **L'hydroxylation** affecte deux prolines en position 403 et 408 (Pro403/Pro408). Celles-ci sont réalisées par l'enzyme PHD3 (Prolyl Hydroxylase 3) qui favorise la translocation nucléaire puis l'interaction entre PKM2, sous forme dimérique, et HIF-1 α . Cela permet ensuite de faciliter diverses fonctions non glycolytiques de cette enzyme sous sa forme dimérique⁴⁷.
- **L'oxydation** se produit dans un contexte de haute concentration en espèce réactive de l'oxygène (ROS), ce qui est le cas des cellules cancéreuses notamment. Elle affecte une cystéine en position 358 (Cys358). Cette modification entraîne l'accumulation de PKM2 sous forme dimérique. Cette forme oxydée joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie redox globale de la cellule en contexte tumoral⁴⁸. En dehors d'un contexte d'hypoxie, l'insuline peut aussi stimuler la production de ROS intracellulaire, ce qui aboutit à une augmentation de l'oxydation sur les cystéines de PKM2⁴⁹.
- **La glycosylation** peut affecter la thréonine 405 et la sérine 406 (Thr405/Ser406). Il s'agit de modifications du type O-glycosylation causées par une glycosyl-transférase conduisant à la liaison entre un N-acétylgalactosamine (GalNAc) et un oxygène du groupement hydroxyle d'une sérine ou thréonine⁵⁰. Cette modification est soumise à

une régulation dynamique selon les teneurs en nutriments intracellulaires. Dans un contexte tumoral, on observe une forte prépondérance de cette O-glycosylation sur PKM2⁵¹. En conséquence, l'activité enzymatique de PKM2 s'en trouve réduite car elle induit une gêne stérique pour la formation de certaines liaisons hydrogènes requises pour la tétramérisation du dimère PKM2. Cette modification induit une baisse du flux glycolytique au profit des voies de biosynthèses alternes et donc de la prolifération tumorale. Une mutation de ces résidus (Thr405→Ala405/Ser506→Ala406) inhibe fortement cette modification du type O-glycosylation et induit une réversion du phénotype pro-tumoral. Enfin, il est montré que la glycosylation Thr405/Ser406 est un événement précédant la phosphorylation Ser37 en vue de la translocation nucléaire ERK-dépendante de PKM2⁵².

- **La méthylation** peut aussi affecter PKM2. La méthylase CARM1 (Co-activator-associated arginine methyltransferase 1) modifie les résidus arginine 445/447/455 (Arg445/Arg447/Arg455) du domaine C de la forme dimérique de PKM2. Le ligand allostérique FBP, capable de stimuler la forme tétramérique de PKM2, joue un rôle limitant de cette méthylation même s'il est important de noter que l'activité de PKM2 est peu impactée par cette modification. Toutefois, celle-ci entraîne une reprogrammation du phénotype métabolique vers la voie de la glycolyse aérobie plus favorable au contexte tumoral. La forme méthylée de PKM2 se localise au niveau mitochondrial sur les récepteurs inositols de la membrane externe. Elle réduit leur expression, ce qui entraîne une baisse du potentiel mitochondrial et de l'import en calcium, composé important pour le cycle de phosphorylation oxydative⁵³.
- Les modifications du type **ubiquitination/sumoylation** peuvent aussi réguler l'isoforme PKM2. Cette dernière peut interagir avec le domaine HECT (domaine homologue trouvé dans les ligases d'ubiquitine) de la protéine HERC1 capable de jouer la fonction d'enzyme E3-ubiquitine ligase. L'association PKM2-HERC1 ne semble produire aucun effet délétère que ce soit sur l'activité enzymatique ou sur la possible dégradation de PKM2 par la voie du protéasome. En revanche, cette modification pourrait avoir un effet négatif sur la fixation du FBP car la poche de fixation de HERC1 contient des résidus critiques de cette interaction⁵⁴. Une autre protéine du type E3-ubiquitine ligase, la Parkine, peut interagir avec PKM2 et participer à la mono-ubiquitination de PKM2 (une modification observée également

pour PKM1) sur les lysines 186 ou 206 (Lys186/Lys206). Cette modification affecte négativement l'activité des isoformes PKM, ayant ainsi un impact suppressif sur la croissance tumorale, sans toutefois moduler leur stabilité. Le mécanisme d'interaction PKM2-Parkine est favorisé lors d'une carence en glucose. L'inhibition de l'expression de la Parkine peut restaurer d'une part l'activité enzymatique de la PK mais aussi la concentration des métabolites en amont de la glycolyse, qui auront un effet positif sur le métabolisme tumoral⁵⁵. Un autre complexe de poly-ubiquitination, l'ubiquitine ligase Malin, est impliquée dans la maladie neurodégénérative de Lafora où elle s'y trouve mutée⁵⁶. Celle-ci est capable d'effectuer des modifications ubiquitines sur les mêmes résidus des isoformes PKM, toujours sans affecter de façon conséquente l'activité enzymatique. Cependant, il existe une différence dans la translocation nucléaire, où cette modification de type ubiquitination peut perturber l'activité catalytique de PKM2 mais ne semble pas avoir d'impact sur celle de PKM1⁵⁷. A l'opposé, PKM2 interagit avec USP20 (Protéase Ubiquitine-Spécifique), une enzyme de la famille des déubiquitinases, ce qui favoriserait la stabilisation de PKM2⁵⁸. Un autre type de modification analogue à l'ubiquitination, appelé SUMOylation, peut aussi affecter l'isoforme PKM2. Dans ce cas précis, PKM2 peut interagir avec la protéine PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT), qui joue le rôle de ligase SUMO (Small Ubiquitin Modifying Protein), et ainsi promouvoir la sumoylation de PKM2. Cela permet par la suite d'induire la translocation nucléaire de ce complexe protéique contenant PKM2. Les conséquences de cette modification, observées pour PKM1, sont encore mal connues⁵⁹.

En plus des interactions et modifications décrites précédemment, PKM2 interagit avec plusieurs oncoprotéines virales. PKM2 interagit avec l'oncoprotéine E7 du papillomavirus type 16⁶⁰ mais aussi la kinase pp60v-src du virus du sarcome de Rous, qui est capable de phosphoryler PKM2⁶¹. Dans les deux cas, ces interactions stimulent la formation de la forme dimérique de PKM2, ce qui promeut le métabolisme pro-tumoral.

1.3. Fonctions de PKM2

Dans cette partie, les fonctions de l'isoforme PKM2 seront rappelées dans un contexte physiologique, et dans les cellules tumorales.

1.3.a. Fonctions liées à la glycolyse

Le métabolisme glycolytique est essentiel à la fois pour la production d'énergie et l'alimentation de plusieurs voies de biosynthèse. Dans le tissu musculaire, les liaisons C-C riches en énergie du pyruvate servent à la production d'ATP et de métabolites (cycle de Krebs ou TCA), un processus couplé en présence d'oxygène à la réoxydation des transporteurs d'électrons par la chaîne respiratoire. En absence d'oxygène, le renouvellement des transporteurs se fait à partir du pyruvate par les voies fermentaires, ce qui aboutit à la

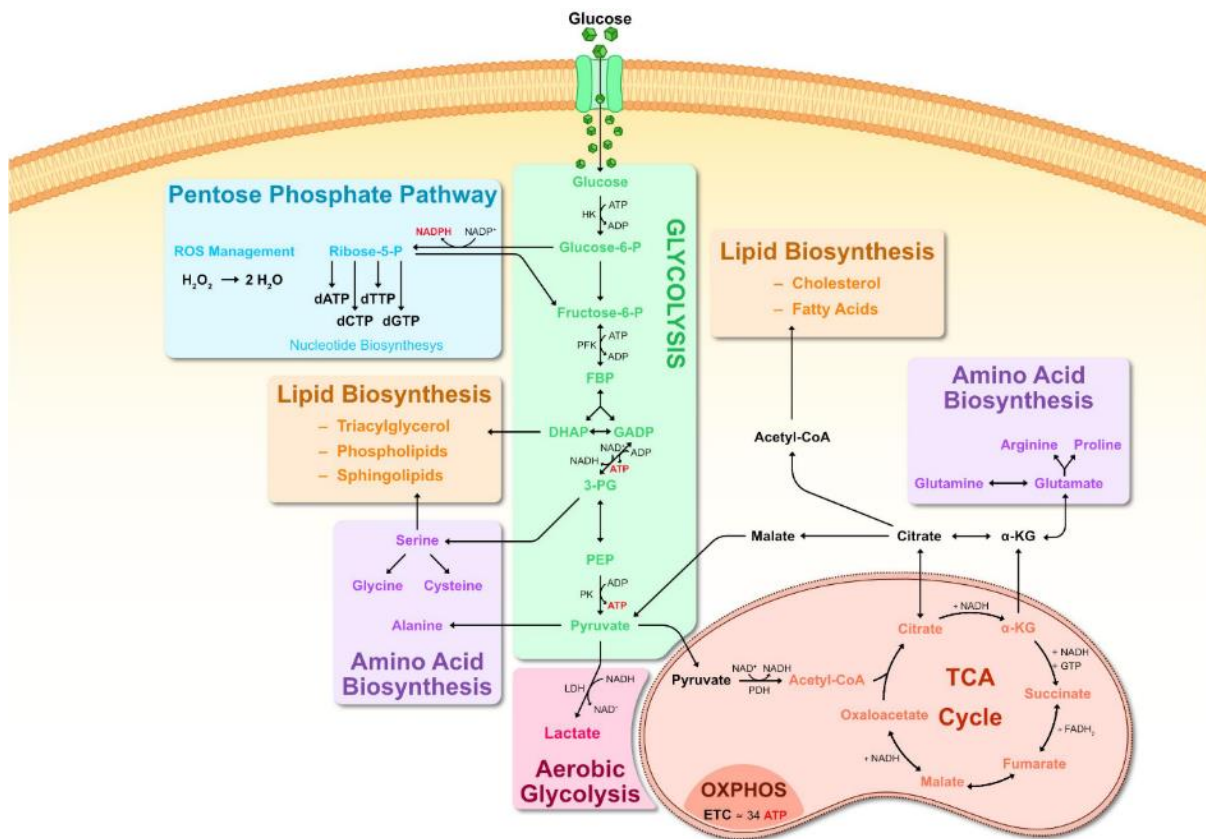


Figure 6 : Représentation de l'ensemble des voies de biosynthèses intrinsèquement liées au métabolisme glycolytique⁶².

production de lactate. Les intermédiaires métaboliques comme le G6P, le DHAP et le G3P peuvent devenir les substrats pour des voies de biosynthèses alternes comme celle des acides nucléiques et des acides aminés mais aussi des phospholipides et des sphingolipides (**Figure 6**). Rappelons ici que l'expression de l'isoforme M2 de la Pyruvate kinase joue un rôle dans l'étape ultime de la réaction enzymatique menant du PEP au pyruvate avec production parallèle d'ATP. Cette étape se produit indépendamment de la présence d'oxygène ; or les cellules tumorales, dans le cas de tumeurs solides notamment, se trouvent souvent dans un contexte d'hypoxie. PKM2 est donc un agent régulateur essentiel de l'intégralité du cycle

glycolytique, et notamment de l'accumulation des métabolites en amont de cette voie. Si l'activité enzymatique de PKM2 atteint un niveau significatif (forme tétramérique), cela augmente la conversion du PEP en pyruvate et aboutit par conséquent à une production plus importante d'ATP⁶³. A l'inverse, une plus faible activité enzymatique (forme dimérique de PKM2) entraîne un ralentissement de cette ultime conversion enzymatique, ce qui induit un ralentissement de la glycolyse et une accumulation des différents intermédiaires en amont de cette étape. La capacité de PKM2 à réguler le niveau de métabolites de la voie glycolytique en fonction de sa capacité enzymatique est notamment contrôlée par le FBP, un activateur allostérique⁶⁴. De plus, PKM2 est impliqué dans la synthèse de composés annexes à la voie glycolytique dont la cAMP par interaction avec l'Adénylyl Cyclase soluble (sAC). La synthèse de cAMP induit la voie de régulation de β 1-caténine médiée par EPAC/RAP1 résultant en une perte globale de la polarité cellulaire⁶⁵. Dans les cellules tumorales, l'activité catalytique faible de PKM2 permet notamment de ralentir le flux glycolytique et de fournir à la cellule des métabolites intermédiaires essentiels pour alimenter les voies de biosynthèse privilégiant la prolifération cellulaire au détriment de la production d'énergie. Cette orientation métabolique, observée même en présence d'oxygène, est appelée « effet Warburg », du nom de son découvreur (Otto Heinrich Warburg, 1883-1970). Une stratégie de lutte antitumorale consisterait donc à rétablir une activité PKM2 maximale, pour inverser ce processus.

1.3.b. Fonctions Non glycolytiques

En parallèle des fonctions enzymatiques de PKM2, cette protéine est douée de fonctions alternes qui contribuent au processus de tumorigenèse. Ces fonctions non glycolytiques sont majoritairement liées à la forme dimérique moins active de PKM2 et se manifestent dans le compartiment nucléaire.

Rôle régulateur de PKM2 :

Dans le noyau, PKM2 peut ainsi interagir de façon directe avec HIF-1 α et promouvoir la transactivation d'un ensemble de gènes soumis à un contrôle par le facteur de transcription HIF-1 (composé de deux sous-unités α et β). Cette interaction augmente la capacité de liaison de HIF-1 à ces séquences de fixation (Hypoxia Responsive Element [HRE]) et favorise le recrutement du facteur p300, un coactivateur transcriptionnel⁶⁶. La transcription du gène

codant l'isoforme PKM2 est elle aussi soumise à un contrôle par HIF-1 α , créant ainsi une boucle rétroactive positive de régulation qui favorise l'effet transactivateur de HIF-1. Ceci aboutit à une altération du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses via une régulation de gènes clés comme *GLUT1* (récepteur glucose) ou *LDHA* (Lactate Déshydrogénase A)⁶⁷. Dans un contexte cancéreux (modèle cellulaire MCF-7), la protéine JMJD5 (Jumonji-C (JmjC) domain-containing protein 5) interagit directement avec PKM2, entraînant ensuite la translocation de cette dernière dans le noyau pour permettre son action positive sur les activités transcriptionnelles de HIF-1 α . Cette interaction implique la région d'interface de PKM2 au niveau des résidus 366-421 et 422-476 du domaine C contenant des acides aminés clés dans l'interaction dimère-dimère. Elle limite la tétramérisation de PKM2 et réduit de fait son activité enzymatique tout en favorisant ses fonctions nucléaires sous l'état dimérique⁶⁸. PKM2 est sensible aux changements redox liés au micro-environnement tumoral, en lien avec une régulation de l'activité de la protéine suppressive de tumeur p53. En effet selon le contexte intracellulaire, PKM2 peut réduire ou augmenter son activité. Dans un environnement très oxydé, la forme tétramérique de l'isoforme M2 inhibe l'expression de p53, ce qui limite l'apoptose p53-dépendante. A l'inverse, dans un milieu plus réducteur, PKM2 a l'effet opposé. Elle stimule l'expression de p53 et favorise son effet pro-apoptotique⁶⁹. Ce rôle de l'isoforme M2 est important pour le contrôle de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif⁷⁰.

La translocation de PKM2 peut également se produire en réponse à l'activation du récepteur EGFR, provoquant ensuite la liaison directe entre la Lys433 de PKM2 et la Tyr333 de la β -caténine, ayant au préalable été phosphorylée par Src, et menant *in fine* au recrutement de ce complexe protéique sur le promoteur de la cycline D1 (ou CCND1). L'association entre l'activité kinase de Src et l'accumulation de PKM2 dans le noyau se retrouve dans différents modèles cancéreux de glioblastomes humains⁷¹. Ce recrutement entraîne la perte de fixation de l'Histone Désacétylase 3 (HDAC3) sur le promoteur de CCND1, une modification consécutive à la phosphorylation de l'histone H3 par PKM2, induisant ensuite positivement l'expression de CCND1⁷². Dans un modèle de cancer colorectal, la perte d'expression de la protéine PKM2 est associée à une plus forte signalisation de la voie nucléaire de la β -caténine qui permet ainsi de produire, de façon c-Myc dépendante, des composants du métabolisme de la glutamine⁷³. La phosphorylation en Ser37 médiée par ERK1/2, présentée précédemment, permet la translocation nucléaire de PKM2 en association avec PIN1. Cette interaction expose

un site de localisation nucléaire où se fixe l'importine $\alpha 5$, permettant l'import nucléaire de PKM2. Une fois dans le noyau, le recrutement de la β -caténine induit l'expression du gène *c-Myc*. La surexpression de *c-Myc* induit une boucle de rétrocontrôle positive, car *c-Myc* induit l'expression des hnRNPs. Dans ce contexte, ces derniers contribuent à augmenter le ratio PKM1/PKM2 et, par voie de conséquence, stimulent le métabolisme glycolytique tout en réduisant l'implication du métabolisme de biosynthèse de la voie sérine⁷⁴.

Activité kinase de PKM2 :

PKM2 est aussi capable de phosphoryler des facteurs impliqués dans la reprogrammation métabolique. Ainsi, la forme dimérique de PKM2 localisée dans le noyau peut phosphoryler STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) qui s'active en réponse à des cytokines inflammatoires comme l'Interleukine-6 (IL-6)⁷⁵. Dans ce processus de phosphorylation, PKM2 utilise le PEP comme molécule donatrice d'un groupement phosphate pour modifier STAT3 (phosphorylation en Tyr705), ce qui induit l'expression de MKK5 (Mitogen-activated protein Kinase 5)⁷⁶. L'activation de STAT3 dans un modèle de lignées cancéreuses malignes est un marqueur important de progression tumorale. De manière attendue, la surexpression de PKM2 facilite sa translocation nucléaire et favorise la phosphorylation de STAT3, ce qui est corrélé au caractère agressif des tumeurs de cancer colorectal. Une étude menée par Yang *et al.* a démontré que la forme dimérique de PKM2 active FAK (pour $\beta 1$ integrin-Focal Adhesion Kinase) et la voie de signalisation E-cadhérine par Snail2. Il en est de même pour l'expression de MMP-2 et MMP-9 (pour Matrix Metalloproteinase) qui sont surexprimées en réponse à PKM2. Leur accumulation stimule la migration cellulaire⁷⁷. D'autre part, PKM2 est capable de phosphoryler l'histone H3 sur la Thr11, conduisant par la suite à la perte de fixation de HDAC3 au niveau des régions des promoteurs des gènes *CCND1* et *Myc* (mécanisme assez similaire à l'acétylation en lysine K9)⁷⁸. PKM2 peut aussi phosphoryler la protéine Bub3, servant de point de contrôle de la formation du fuseau mitotique, en Tyr207, afin d'optimiser la formation du complexe protéique Bub3-Bub1-Blinkin. Ce processus permet de réguler l'attachement des microtubules et la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire⁷⁹.

Rôle de PKM2 dans la différenciation cellulaire :

La PKM2 interagit avec de nombreuses protéines nucléaires impliquées dans la

différenciation cellulaire. Elle est capable de se lier au facteur Oct4 (pour Octamer-binding Transcription factor 4), un régulateur clé dans le renouvellement et la différenciation des cellules souches cancéreuses. Dans le cas de cellules souches de gliome, l'interaction PKM2-Oct4 inhibe la capacité qu'à PKM2 à maintenir un réservoir de cellules souches. Cette interaction permet de promouvoir la différenciation cellulaire et de rendre ces cellules plus

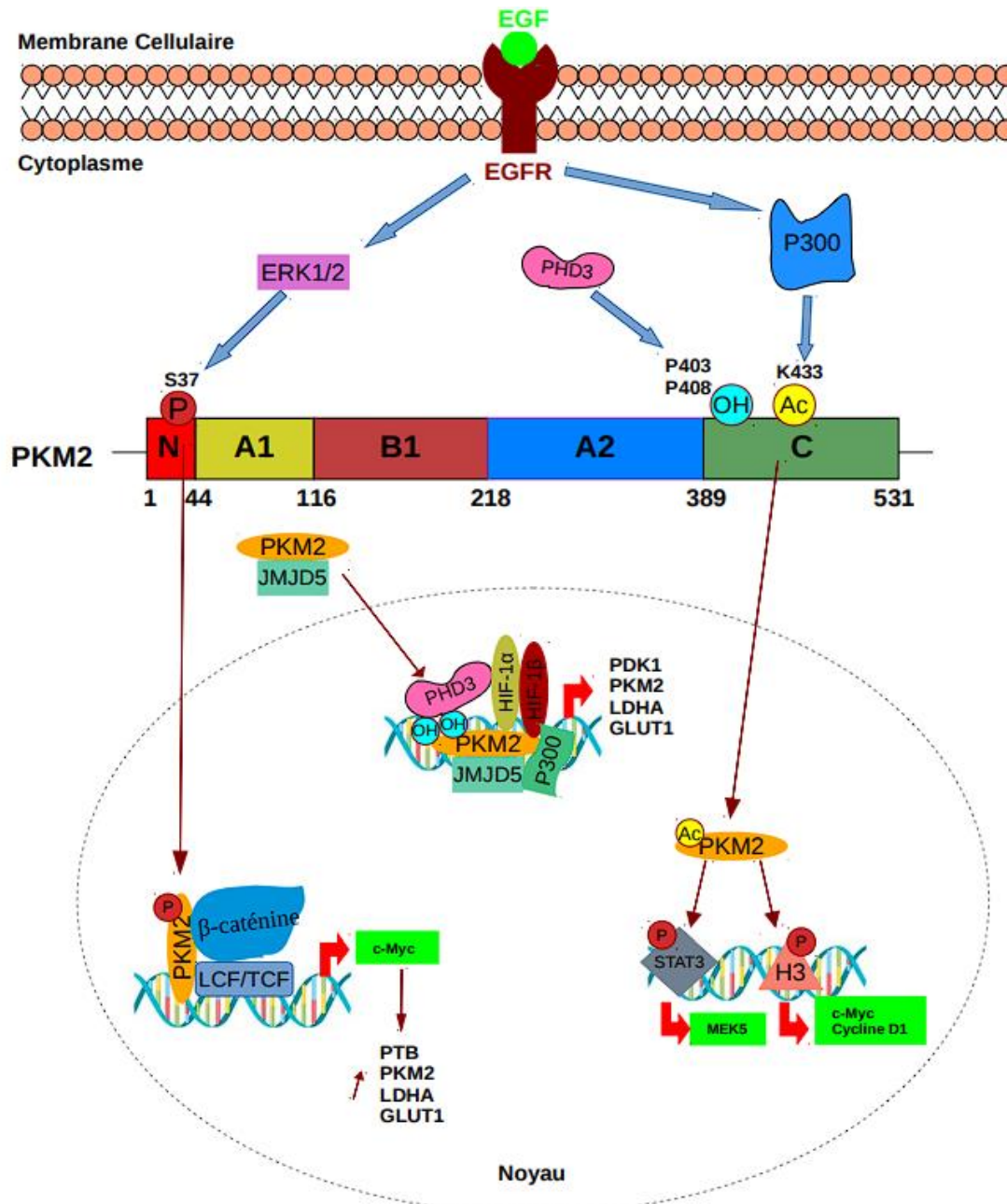


Figure 7 : Représentation schématique des fonctions non métaboliques majeures de PKM2. Ce schéma montre la mécanistique globale, partant de la translocation nucléaire par voie EGFR ou PHD3, des fonctions nucléaires de PKM2 sous sa forme dimérique comme celle de kinase ou de transactivateur de la transcription pouvant promouvoir la croissance et la prolifération tumorale. OH→ Hydroxylation, Ac→ Acétylation, P→ Phosphorylation (adapté de Iqbal *et al.* 2014³³).

sensibles à des stimuli de mort cellulaire, un processus concomitant à la modulation dans le

ratio dimère/tétramère de PKM2 en faveur de l'état tétramérique⁸⁰. Dans ce contexte, le dichloroacétate, un inhibiteur de PDK1 (pour Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1) favorise l'accumulation du complexe PKM2-Oct4, conduisant à la réduction d'expression de différents gènes modulés par Oct4 et menant à un effet antitumoral chez des patients présentant un glioblastome multiforme⁸¹⁻⁸⁰.

La **Figure 7** regroupe quelques-unes des fonctions non glycolytiques que peut exercer PKM2.

Rôle émergent dans la circulation sanguine :

La détection de PKM2 dans le sang de différents patients atteints de cancer (pancréas, poumon, ovaire, rein et gastro-intestinal) démontre un relargage de cette isoforme dans la circulation⁸². Les niveaux en PKM2 sanguins pourraient servir comme un marqueur de diagnostic pour de nombreux cancers⁸³. Une étude de Li *et al* émet l'hypothèse d'un rôle facilitant de PKM2 sous forme extracellulaire - dans le sang - vis-à-vis de la croissance et de l'angiogenèse tumorale. De plus, il a été constaté que PKM2 joue un rôle pro-angiogénique sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales, en notant toutefois que seule la forme dimérique, dans un contexte extracellulaire, semble impliquée⁸⁴.

Rôle dans le contrôle de l'apoptose :

L'apoptose permet de maintenir une balance homéostatique cruciale entre prolifération et mort d'une population cellulaire. La perte de cet équilibre induit diverses perturbations biologiques et métaboliques favorables à la progression tumorale, aux pathologies auto-immunes et à d'autres maladies⁸⁵. PKM2 joue un rôle régulateur de cette voie apoptotique, notamment par une interaction directe et indirecte avec la protéine Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2), une protéine anti-apoptotique. Dans un modèle de glioblastome, le tétramère de PKM2 peut se déplacer vers la mitochondrie après un stress oxydatif où elle peut ainsi phosphoryler Bcl-2 sur la Thr69, conduisant ainsi à bloquer son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cette modification est améliorée par l'activité ATPase de la sous-unité Hsp90 α 1 de la protéine Hsp90 (Heat Shock Protein 90). Contrecarrer le contrôle de Bcl-2 par PKM2 permet de sensibiliser des cellules dérivées de gliome à l'apoptose liée au stress oxydatif conduisant ainsi à réduire la formation de tumeurs cérébrales⁸⁶. Cette hypothèse a été validée en utilisant des shRNA dirigés contre PKM2⁸⁷. Par ailleurs, une perte d'expression de Bcl-2 dans un modèle de cancer de l'ovaire résulte en une réduction du niveau de PKM2 selon une

voie de régulation passant par l'axe SIRT3-HIF1 α . Ces observations soulignent un rôle régulateur de Bcl-2 sur l'expression de PKM2 dont il reste à définir précisément les modalités⁸⁸. La protéine BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death) est également impliquée dans la régulation des propriétés anti-apoptotique de PKM2. L'absence de PKM2 dans un modèle d'hépatocarcinome entraîne une stabilisation de l'expression de BIM, menant à la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale externe, résultant en l'activation de l'apoptose⁸⁹. De nombreux membres de la famille Bcl-2 ont une régulation transcriptionnelle

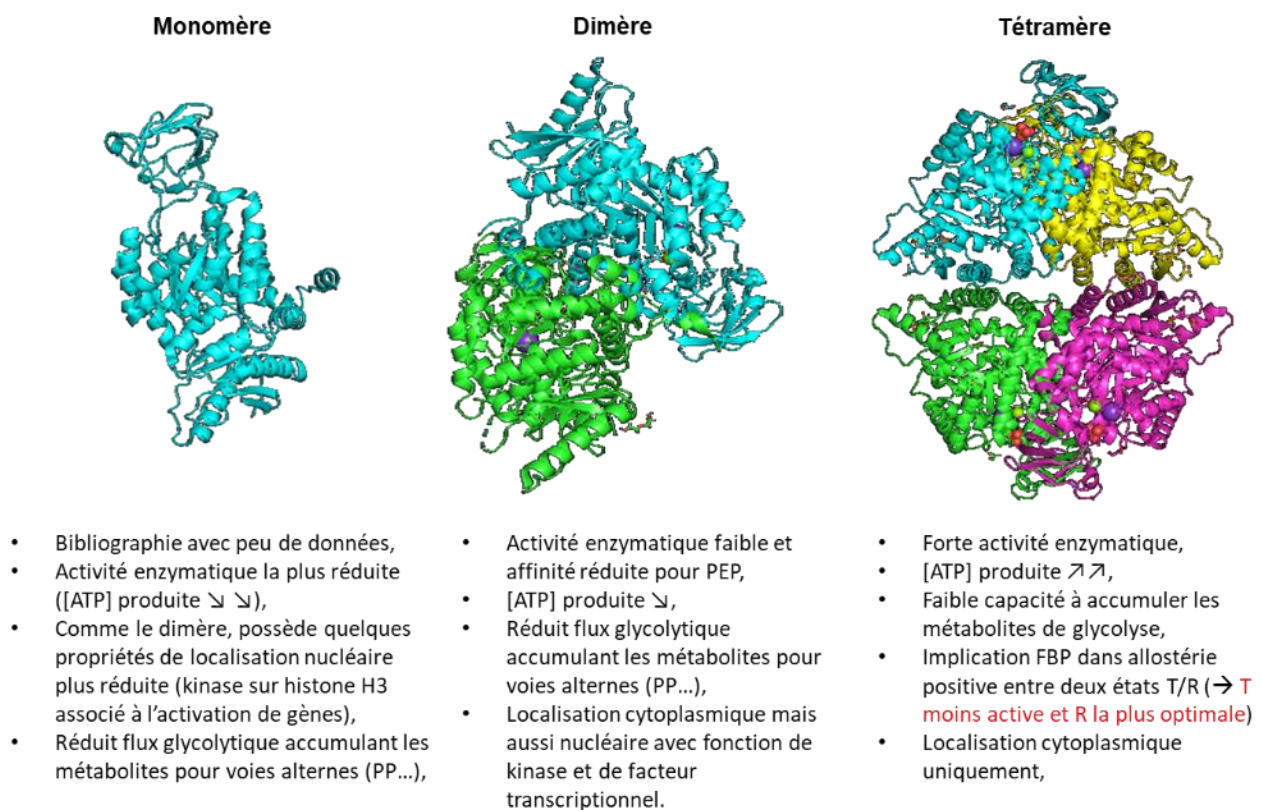


Figure 8 : Représentation schématique des différents états oligomériques de PKM2 associés à leurs implications cellulaires.

dépendante de p53⁹⁰. Comme indiqué précédemment, p53 est une protéine anti-oncogène majeure notamment en raison de sa capacité à induire un arrêt du cycle cellulaire et/ou à induire la mort des cellules en réponse à divers stimuli. En effet, plus de la moitié des cancers humains exprime une forme mutée de celle-ci ayant une finalité de perte de fonction⁹¹. Il a été montré que PKM2, sous forme dimérique, pouvait former un complexe avec p53, ce qui entraîne une ubiquitination de cette dernière et sa dégradation⁹².

La **Figure 8** regroupe les différents états connus de PKM2 associés avec leurs fonctions métaboliques majeures (glycolytiques et non glycolytiques).

1.3.c. Implication structurale de l'allostérie

De nombreux éléments mettent en évidence le lien entre la liaison du ligand allostérique FBP à PKM2 et les changements conformationnels au sein même de la structure du tétramère. Dans un premier temps, le FBP augmente la cinétique enzymatique de la PKM2 sur le PEP. La poche de fixation du FBP se situe sur le domaine C de la protéine PKM2 et dans tous les états oligomériques possibles du monomère au tétramère (mais aussi dans d'autres isoformes comme PKL et PKR). Plusieurs résidus de PKM2 sont impliqués dans cette interaction, dont Lys433, Ser434/437 et Gly520 pour l'atome d'oxygène en position 6-Phosphate. Il est important de noter que quelques résidus comme la Lys433 sont spécifiques à PKM2 (absent dans le cas de PKM1), ce qui pourrait expliquer que le FBP ne semble pas modifier l'activité enzymatique de PKM1. Par ailleurs, certaines interactions sont possibles grâce à une boucle de régulation (résidus Gly514-Thr522) localisée à proximité de la poche de fixation et orientée vers celle-ci, afin d'encapsuler et stabiliser la structure du site de liaison. Ces deux particularités font partie des conditions nécessaires pour la fixation du FBP mais aussi pour la transduction du signal allostérique comme indiqué par des études structurales utilisant des formes mutées de PKM2, dépourvues de modulation allostérique⁹³. Dans le cas de PKM1, ces deux conditions sont altérées par l'absence d'une lysine au profit d'un acide glutamique Glu433, car la différence des propriétés électrostatiques semble jouer un rôle majeur. S'ajoute à cela l'orientation opposée de cette boucle de régulation pour PKM1 qui est externalisée par rapport à la poche de fixation potentielle, ce qui pourrait déstabiliser la structure d'une poche de fixation du FBP dans PKM1. La proximité de cette boucle régulatrice par rapport à la zone d'interface de tétramérisation entre deux dimères de PKM et sa proximité avec la poche de fixation du ligand FBP participe à l'effet allostérique. Celui-ci joue un rôle primordial sur l'équilibre oligomérique des formes R et T de PKM2 sachant que la structure présentant une boucle plus rapprochée de la poche de fixation au FBP est observée dans la forme R, la plus active, de PKM2.

1.4. Pathologies humaines associées à PKM

L'intérêt grandissant du rôle des isoformes PKM ces dernières années a permis de révéler un lien de cause à effet entre d'une part une dérégulation métabolique des PKM et de l'autre leur implication dans de multiples situations pathologiques. Sera ainsi discuté dans ce chapitre l'implication des PKM dans les maladies neurodégénératives, musculaires,

cardiaques, métaboliques, inflammatoires, immunitaires mais aussi et surtout du rôle majeur dans l'association entre PKM2, infections virales et cancer⁹⁴.

1.4.a. Pathologies cardiaques, musculaires et neurodégénératives

La maladie coronarienne se manifeste par une réduction progressive des artères coronaires (partant de l'aorte cardiaque) pouvant conduire à leurs obstructions. Parmi ses symptômes est l'athérosclérose, qui se caractérise par un dépôt graisseux et de cholestérol réduisant le flux sanguin. L'implication de macrophages pro-inflammatoires de type M1 est aussi observée au niveau de lésions athérosclérotiques pouvant conduire à la nécrose⁹⁵. Dans ce contexte, le stress oxydatif est un facteur de risque⁹⁶, la production d'H₂O₂ provenant majoritairement de l'activité mitochondriale des cellules immunitaires de type macrophages présentes sur ces lésions⁹⁷. De plus, la cytokine IL-1 β est un des marqueurs de régulation de cette population de macrophages, notamment par son interaction avec les voies de signalisation HIF-1 α ⁹⁸. PKM2 permettrait dans ce contexte la mise en place de la réaction inflammatoire. En effet, PKM2 est surexprimée dans les macrophages où elle induit l'activité transactivatrice de HIF-1 α par interaction directe, ce qui stimule la production d'IL-1 β ⁹⁹. PKM2 est stabilisée sous forme dimérique nucléaire, et active l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β . Cette activité amène les macrophages M1 dans un état hyper-inflammatoire favorable à la pathologie coronarienne¹⁰⁰. Dans le cas de l'hypertrophie cardiaque, l'isoforme PKM1 agirait comme un facteur protecteur. Chez l'Homme, cette pathologie met en lien une faiblesse du muscle cardiaque avec une demande réduite en acide gras et une augmentation dans les besoins en glucose des cellules¹⁰¹. Dans un processus de constriction de l'aorte, souvent utilisé comme modèle d'étude de l'hypertrophie, la perte des fonctions contractiles des muscles est due à l'incapacité de produire suffisamment d'ATP pour subvenir à la demande nécessaire, conduisant ainsi à une augmentation de la mort cellulaire. Dans ce contexte, il a été montré que la perte d'expression de PKM1 aggrave le dysfonctionnement cardiaque. Lorsque son expression retourne à un niveau normal, cette dernière protège les cellules cardiaques contre une élévation de la pression sanguine pouvant conduire à la cardiomyopathie¹⁰². Il a également été récemment démontré que PKM2 joue un rôle protecteur dans l'insuffisance cardiaque. Cette maladie se définit comme un syndrome clinique complexe causé par plusieurs dérèglements fonctionnels et structuraux qui affectent le pompage du sang au niveau du ventricule cardiaque¹⁰³. Dans cette pathologie, une

déficience en PKM2 dans les cardiomyocytes accélère sa progression par une perte de régulation de la pression sanguine. La surexpression de PKM2 permet de réduire ce phénomène en modulant la voie RAC1 (petite GTPase)-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). La fonction kinase de PKM2 permet de phosphoryler la sérine Ser74 de RAC1, ce qui permet sa dégradation. Ce processus serait lié au rôle de RAC1 dans l'initiation d'un mécanisme hypertrophique¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

La dystrophie myotonique de type 1, aussi appelée maladie de Steinert, est une maladie neuromusculaire qui constitue l'une des formes les plus communes de dystrophie musculaire avec de nombreux symptômes de faiblesse musculaire¹⁰⁶. La principale cause est une expansion anormale des répétitions CTG en 3'UTR du gène *DMPK* (Dystrophia Myotonica Protein Kinase) induisant une perturbation dans la production de cette protéine dans les cellules musculaires¹⁰⁷. Par ailleurs, des études ont également indiqué que la cause de cette pathologie musculaire serait un déséquilibre dans la synthèse protéique et dans le métabolisme anabolique/catabolique¹⁰⁸. Le squelette musculaire a aussi besoin d'un métabolisme glycolytique fonctionnel. Il a été démontré une surexpression de l'isoforme PKM2 ainsi qu'une transition entre PKM1 et PKM2, ce qui peut être lié à des modulations des protéines MBNL et CELF provoquant des épissages 'aberrants'¹⁰⁹. Ce processus conduit à une altération du métabolisme énergétique et glycolytique conduisant à des symptômes d'atrophies des fibres musculaires de type 1¹¹⁰.

L'hypertrophie myofibrillaire se caractérise par une augmentation de la taille des fibres musculaires au niveau du cœur qui peut entraîner une obstruction sanguine et des dérèglements du muscle cardiaque. Il existe trois types de fibres musculaires (I/IIa/IIb) selon l'isoforme de chaîne lourde Myosine qui est exprimée (Myn7/2/1 respectivement)¹¹¹. Les fibres de type II sont plus souvent impactées par les pathologies hypertrophiques, car celles-ci dépendent davantage du métabolisme glycolytique afin de répondre à leurs besoins énergétiques¹¹². Dans la littérature, il est démontré que l'hypertrophie musculaire provoque une reprogrammation métabolique analogue au contexte cancéreux, où le blocage du flux glycolytique abolit la croissance des myotubes (fusion de plusieurs myoblastes)¹¹³. Pendant le développement humain, l'épissage alternatif de PKM est un processus important au sein des lignées musculaires : PKM2 est présent lors du stade embryonnaire pour contrôler la prolifération puis vient progressivement une transition de cette dernière vers l'isoforme PKM1 à l'âge adulte. Or c'est précisément PKM2 qui est plus prévalente chez ces fibres

musculaires de type II (celles qui sont les plus fréquentes dans l'hypertrophie). PKM2 voit par ailleurs son expression augmentée après un effort musculaire. Dans un modèle de myoblaste, la perte de PKM2 (mais pas de PKM1) réduit la taille des fibres musculaires saines mais aussi des fibres hypertrophiques, indiquant ainsi le rôle important de PKM2 dans l'hypertrophie et la reprogrammation métabolique¹¹⁴.

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative qui affecte principalement les régions motrices du cerveau et provoque une dégénérescence des neurones dopaminergiques. Des données récentes ont indiqué un lien entre cette dégénérescence et le diabète¹¹⁵ notamment parce que la résistance à l'insuline est un moteur pour la progression de la maladie de Parkinson dont elle favorise les symptômes¹¹⁶. De plus, l'hyperglycémie est aussi un facteur de risque de neurodégénération de la voie nigrostriatale (transport dopamine) pour le contrôle des mouvements volontaires et associée aux troubles moteurs de type Parkinson¹¹⁷⁻¹¹⁸. Dans ce contexte, le phénotype de Parkinson est affecté négativement par PKM2. En effet, l'utilisation d'un modèle neuronal traité par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), qui stimule l'évolution de la maladie de Parkinson, est associée à une surexpression

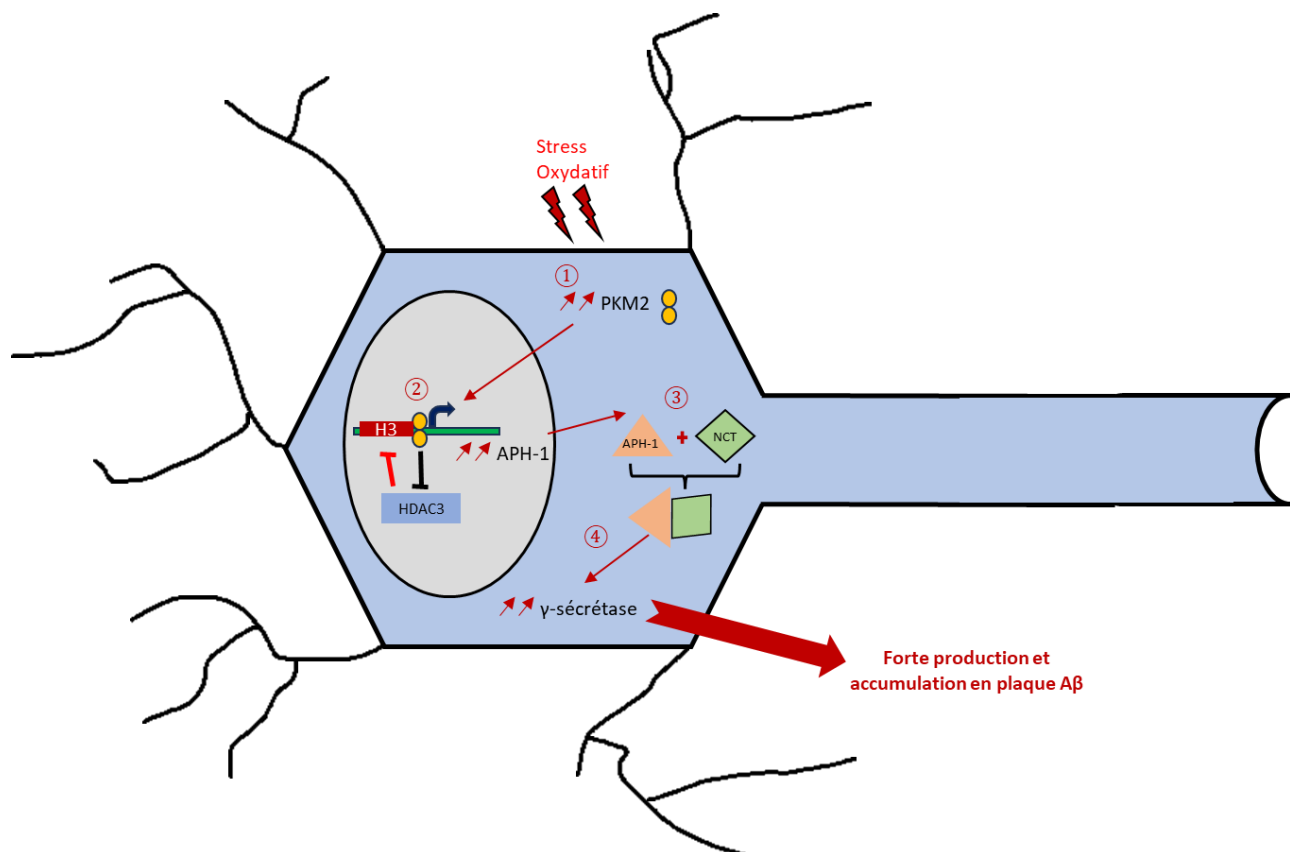


Figure 9 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans la pathologie Alzheimer. Dans un contexte de stimuli hypoxique, le dimère de PKM2 est prédominant (1). Son accumulation dans le noyau active la transcription de *Aph-1a* (2) et favorise ainsi le nombre de complexe avec NCT dans le cytoplasme menant en aval à une plus forte concentration en γ -sécrétase (3-4), conduisant finalement à l'accumulation de A β .

de PKM2 et une altération de l'homéostasie mitochondriale. L'inhibition de PKM2 permet d'inverser ce processus et d'améliorer la tolérance au 6-OHDA, réduisant ainsi le risque de Parkinson¹¹⁹.

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones menant à une atrophie cérébrale. Ces symptômes sont liés à deux processus qui sont l'agrégation de la protéine Tau d'une part (dégénérescence neurofibrillaire) et l'accumulation en plaque de protéines β -amyloïde ($A\beta$). Ces dernières sont le produit d'un processus cellulaire séquentiel qui cible le précurseur amyloïde de la β - et la γ -secrétase¹²⁰, dont la seconde est notamment régulée par divers signaux comme l'hypoxie¹²¹ ou la production de ROS¹²². Alors que PKM1 est plus exprimée dans les neurones, les astrocytes expriment préférentiellement PKM2¹²³. Par ailleurs, des analyses protéomiques de tissu cérébral et de liquide céphalo-rachidien de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ont montré un plus haut profil d'expression des isoformes PKM par rapport à des individus sains, pouvant indiquer l'implication de ces dernières dans la pathologie¹²⁴. L'hypoxie stimule une transition vers PKM2 dans les neurones mais pas dans les astrocytes, plus résistants aux stress externes. La forme dimérique de PKM2 régule positivement l'expression de APH-1. En effet, son expression, qui forme une des composantes clés de la γ -secrétase, est augmentée grâce à PKM2 par son action inhibitrice de l'histone désacétylase HDAC3. Une fois transportée dans le cytoplasme, APH-1 forme le complexe précurseur de la secrétase avec la protéine NCT, ce qui augmente le niveau de γ -secrétase. Ce processus conduit finalement à l'accumulation en plaque $A\beta$, contribuant à la progression de la maladie d'Alzheimer (**Figure 9**)¹²⁵. En parallèle, le dimère PKM2 a la capacité de cibler d'autres protéines nucléaires comme STAT3 et HIF-1 α qui ont, dans le contexte neuronal de patients âgés, un rôle promoteur fatal menant à une plus grande sensibilité de ces neurones à des stimulus apoptotiques. Privilégier la forme tétramérique et cytoplasmique de PKM2 permet d'abolir ce mécanisme de mort cellulaire¹²⁶.

1.4.b. Pathologies métaboliques, inflammatoires et immunitaires

La microangiopathie diabétique correspond à une aggravation sur le temps long de la pathologie du diabète. Elle est souvent associée à une hyperglycémie, une résistance à l'insuline et un ensemble de mécanismes inflammatoires. PKM2 affecte de nombreuses voies cellulaires allant de l'activité métabolique en passant par l'inflammation et la production de tissu adipeux dans le contexte du diabète¹²⁷⁻¹²⁸. Des études ont montré une association entre

le diabète et un ensemble de dérégulation impactant le métabolisme glycolytique, les fonctions mitochondriales et la production en ROS¹²⁹. Dans les cellules pancréatiques β , PKM2 est capable de promouvoir la voie Wnt/CTNNB1 et plus particulièrement CTNNB1 (aussi appelé β -caténine). Ce mécanisme améliore la prolifération des cellules β et la sécrétion d'insuline pour réduire le taux de glucose sanguin¹³⁰. En parallèle, on observe une relation entre PKM2 et la mise en place d'une inflammation chronique. En condition hyperglycémique, la forme tétramérique de PKM2 contrôle négativement la production d'inflammasomes NLRP3 (Pyrin-Like Receptor family containing Pyrin domain 3)-dépendants dans les macrophages. L'inflammasome NLRP3 permet la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires de type IL-18 et IL-1 β stimulant la formation de plaques d'athérosclérose chez les personnes diabétiques¹³¹. PKM2 est aussi un modulateur de HIF-1 α et des voies de réponse à l'insuline. Il existe une régulation fine entre mTOR/miR-99a/HIF-1 α et PKM2. En effet, la surexpression de miR-99a inhibe mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), conduisant ensuite à une diminution de l'expression en HIF-1 α qui mène au final à un métabolisme de consommation du glucose altéré. La production de PKM2 induite par l'insuline - en tant que coactivateur de HIF-1 α - conduit à diminuer la glycémie. Enfin, PKM2 peut aussi influencer l'apparition de possibles complications du diabète comme la rétinopathie et la néphropathie diabétique, via son interaction avec les voies TGF (Transforming Growth Factor)- β et HIF-1 α respectivement¹³²⁻¹³³.

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMSCs) ont des propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence par leur capacité à donner diverses lignées cellulaires dont les adipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes¹³⁴. Réguler plus particulièrement l'équilibre entre adipogenèse et ostéogenèse est important pour éviter tout problème de balance des tissus adipeux mais aussi permettre la formation d'un tissu osseux sain. La voie Wnt/ β -caténine¹³⁵ stimule la différenciation ostéogénique (cellules ostéoblastiques) au détriment de l'adipogenèse (adipocytes)¹³⁶. Plusieurs études montrent que la dynamique et la morphologie mitochondriale sont cruciales pour la différenciation des BMSCs dans le cadre de l'ostéogenèse¹³⁷ avec un rôle suppresseur ou promoteur selon des concentrations en ROS élevées ou réduites respectivement¹³⁸. C'est dans ce processus que PKM2 intervient car son activation a pour effet global de réduire l'expression de gènes pro-ostéogènes essentiels (Ostéopontine, phosphatase alcaline, RUNX2...). Pendant l'initiation de l'ostéogenèse, les fonctions mitochondriales augmentent pour suivre la hausse de la

demande métabolique¹³⁹, avec une augmentation de la phosphorylation oxydative pour répondre à la forte demande en ATP lors de la différenciation¹⁴⁰. La surexpression de la forme tétramérique de PKM2 à un rôle pro-adipogénèse en stimulant l'expression de gènes clés (Adipsine, PPAR γ) au détriment de l'ostéogénèse, même si la mécanistique précise reste à élucider¹⁴¹.

PKM2 joue également un rôle important dans l'immunité et notamment au cours des tempêtes cytokiniques, qui correspondent à une réaction disproportionnée du système immunitaire au niveau cellulaire (macrophages/lymphocytes) et sécrétoire (cytokines pro-inflammatoires)¹⁴². Des hypothèses ont été avancées concernant l'implication d'une transition métabolique - de la phosphorylation oxydative à la glycolyse aérobie - dans cette dérégulation¹⁴³. La polarisation des macrophages vers le type M2, avec activité anti-inflammatoire, est liée au métabolisme du glucose dont ces macrophages sont fortement dépendants. Dans ce processus, PKM2 est impliquée dans la régulation de la production d'IL-1 β mais aussi dans la polarisation M1/M2 des macrophages, situation dans laquelle PKM2 est surexprimée dans sa forme dimérique phosphorylée nucléaire⁴⁷. Elle active ainsi la transcription du gène codant l'IL-1 β . La forme tétramérique de PKM2 induit la polarisation M1 des macrophages à l'opposé du dimère. Dans le cas d'une réponse inflammatoire, les

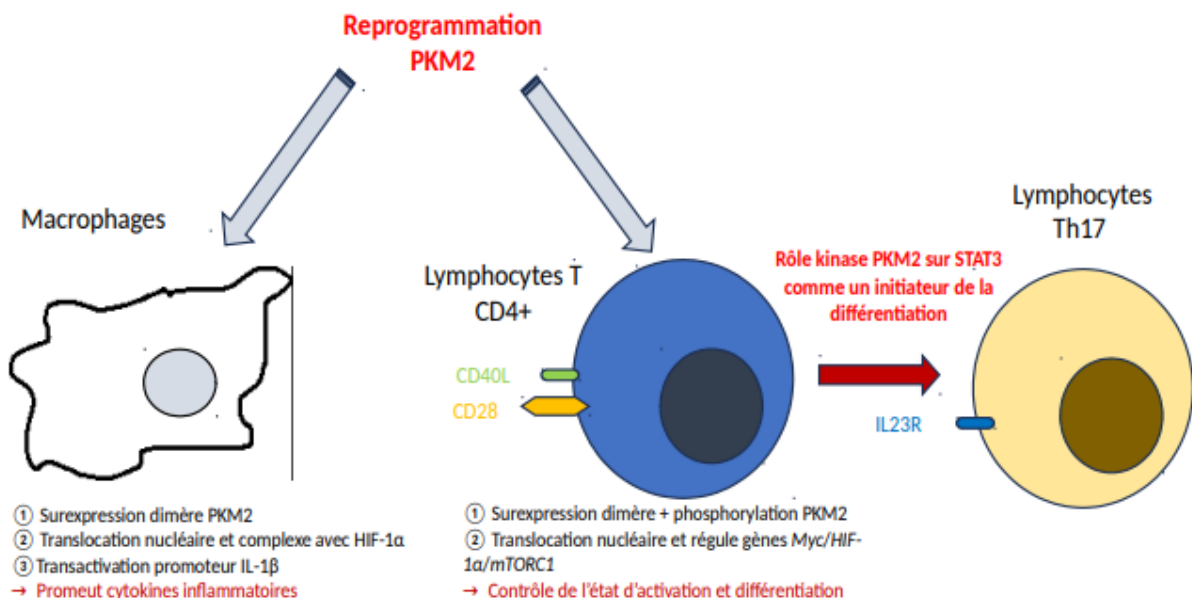


Figure 10 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans des exemples de l'immunité cellulaire. Dans ces exemples, PKM2 impacte l'activité inflammatoire des macrophages mais aussi les propriétés d'activation et de différenciation des populations de lymphocytes T_{CD4+}.

HDACs de classe IIa peuvent interagir avec PKM2 pour induire une glycolyse aérobie induite par l'activation des récepteurs Toll-like (TLR), ce qui stimule la réponse inflammatoire

immunométabolique dans les macrophages M1¹⁴⁴. Les lymphocytes T_{CD4+} requièrent aussi PKM2 pour leur activation et leur différenciation. Cette population cellulaire contribue à la maturation des lymphocytes B pour la réponse anticorps, l'activation macrophages/neutrophiles et au relargage de cytokines pour préparer la réponse immunitaire¹⁴⁵. Une suractivation des lymphocytes T_{CD4+} conduit à nombre de pathologies immunitaires et ce processus est intrinsèquement liée à des variations métaboliques¹⁴⁶. PKM2 est l'isoforme dominante dans les lymphocytes T, préférentiellement sous un état dimérique nucléaire. Elle joue également un rôle de coactivateur transcriptionnel sur les gènes *Myc/HIF-1α/mTORC1* qui ont un impact significatif sur l'activation et la différenciation des lymphocytes T_{CD4+}¹⁴⁷. PKM2 est aussi impliquée dans la différenciation en population Th₁₇, un sous-groupe de lymphocytes ayant un rôle important dans les réactions immunitaires de l'hôte, mais aussi dans les maladies auto-immunes¹⁴⁸. En effet, même si sa contribution n'est pas un prérequis obligatoire dans la reprogrammation métabolique, l'activation du TCR (récepteur des cellules T) induit l'expression de PKM2. Celle-ci se retrouve phosphorylée en Tyr105 puis transloquée dans le noyau où elle interagit avec STAT3, ce qui permet d'initier l'un des signaux pour la différenciation en Th₁₇¹⁴⁹. Ces exemples de l'implication de PKM2 au niveau immunitaire¹⁵⁰ sont représentés en **Figure 10**.

Enfin, PKM2 joue un rôle dans certaines maladies auto-immunes. La polyarthrite rhumatoïde (PR) est à l'origine de gênes et gonflements des articulations. Cette maladie se manifeste par un déséquilibre entre prolifération et apoptose conduisant à une inflammation synoviale qui touche les tissus fibreux (tendons...) et entraîne la destruction du cartilage articulaire¹⁵¹. Des études ont souligné le caractère hypoxique du tissu synovial au cours de la PR, associée à une augmentation de l'activité glycolytique¹⁵². L'hypoxie s'explique par un comportement biologique des cellules synoviales proche de celles des cellules tumorales concernant leur prolifération, leur migration et leur invasion¹⁵³. Dans un modèle simulant la polyarthrite, La forme dimérique et nucléaire de PKM2 est surexprimée permettant ainsi l'activation du TLR2 et la mise en place d'un métabolisme de type glycolyse aérobie (baisse de la production en ATP et de la respiration mitochondriale)¹⁵⁴⁻¹⁵⁵. La forte quantité de lactate promeut le caractère invasif de cellules aux propriétés proches du tissu synovial. Dans cet environnement, PKM2 pourrait moduler le métabolisme, soit de façon positive en privilégiant la voie lactique (état dimérique) ou inversement (état tétramérique)¹⁵⁶.

Le second cas de maladie auto-immune impliquant PKM2 est le lupus systémique et

plus particulièrement l'une de ses complications présentant des manifestations neurologiques qu'est le lupus neuropsychiatrique¹⁵⁷. Parmi les syndromes récurrents, le dysfonctionnement cognitif est l'un des plus prévalents avec une temporalité d'apparition plus ou moins indépendante de la progression et de la gravité du lupus présent chez le patient¹⁵⁸. Dès le début des années 2000, il a été démontré que le lupus neuropsychiatrique est associé à une importante altération du métabolisme glycolytique sur des régions du cerveau de patients atteints du lupus systémique¹⁵⁹. Cette étude suggère notamment que PKM2 intervient dans les symptômes de spasme infantile, associés à des problèmes cognitifs sévères. Elle contribuerait également à l'aggravation de l'inflammation et à la destruction synaptique. Dans cette situation, le métabolisme glycolytique adopte un profil de glycolyse avec une surexpression de PKM2 sous forme tétramérique. Une augmentation de la forme dimérique activerait la voie

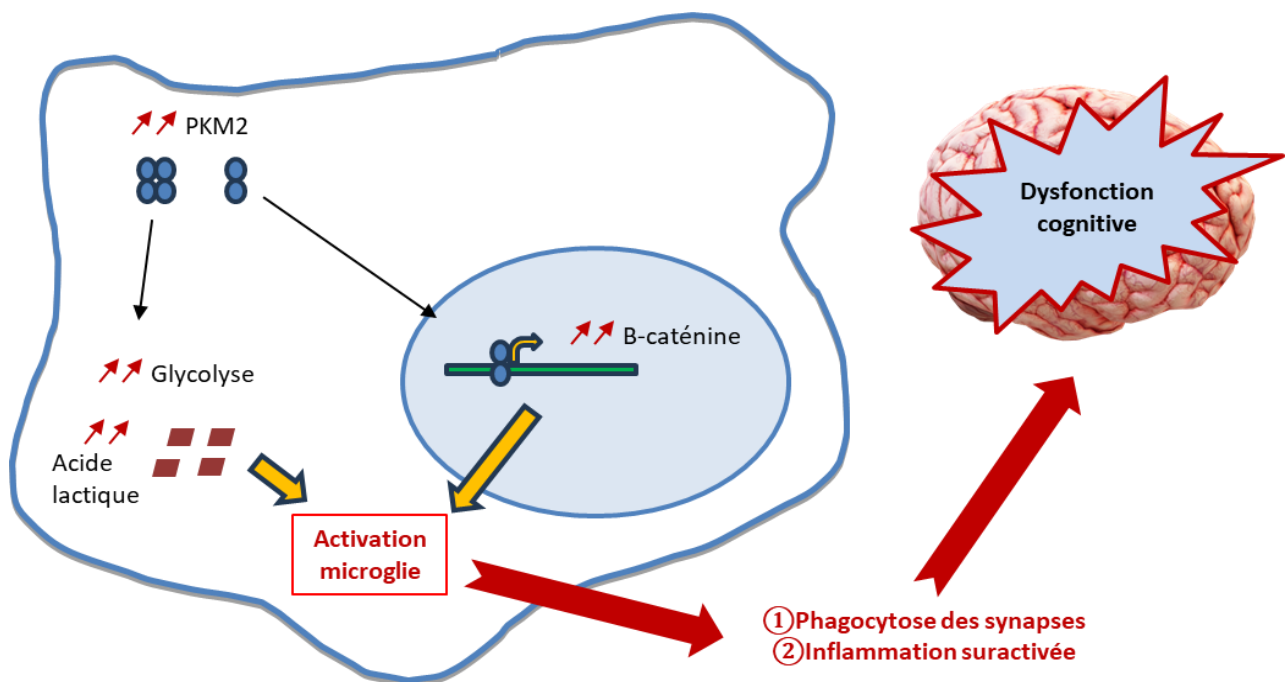


Figure 11 : Représentation schématique de l'impact de PKM2 dans la pathologie du lupus neuropsychiatrique. La suractivation de PKM2 provoque un double effet métabolique, par forte glycolyse et production en acide lactique, et transcriptionnel par activation de la β -caténine conduisant à l'activation de la microglie. En résulte ainsi une réaction phagocytaire et inflammatoire disproportionnée conduisant à une aggravation cognitive du lupus systémique.

β -caténine. Ces deux phénomènes contribuent à l'activation de la microglie et de ses propriétés phagocytaires. En conséquence, l'activation exacerbée de ces cellules aggrave la destruction des synapses neuronales et l'inflammation, phénotype associé à une plus forte prévalence de dissonances cognitives (Figure 11)¹⁶⁰.

1.4.c. Implication dans le cancer : effet Warburg

Le cancer se manifeste par une prolifération cellulaire anormale ayant de multiples causes externes (environnement, composé chimique...) et internes (mutations, actions hormonales...)¹⁶¹. Un des marqueurs majeurs du développement cancéreux est la reprogrammation métabolique car les cellules tumorales sont dépendantes de la glycolyse aérobie pour leurs besoins énergétiques et l'activation des voies de biosynthèse. En effet, même en présence d'oxygène, les cellules utilisent la conversion du pyruvate en lactate, un processus appelé effet Warburg¹⁶². Dans les cellules tumorales, PKM2 voit son expression augmentée contrairement aux autres pyruvates kinases PKM1/PKL et PKR¹⁶³. De plus, PKM2 s'accumule préférentiellement sous une forme dimérique, un état de plus faible activité enzymatique qui ralentit la glycolyse et entraîne l'accumulation des métabolites en amont de cette cascade enzymatique. La synthèse des métabolites intermédiaires peut ainsi alimenter des voies de biosynthèse comme celle des acides nucléiques (voie des Pentoses Phosphates) pour soutenir la réplication de l'ADN lors de la prolifération tumorale (**Figure 12**)¹⁶⁴. La forme dimérique nucléaire a également des propriétés pro-tumorales comme nous l'avons

Tumoral cell

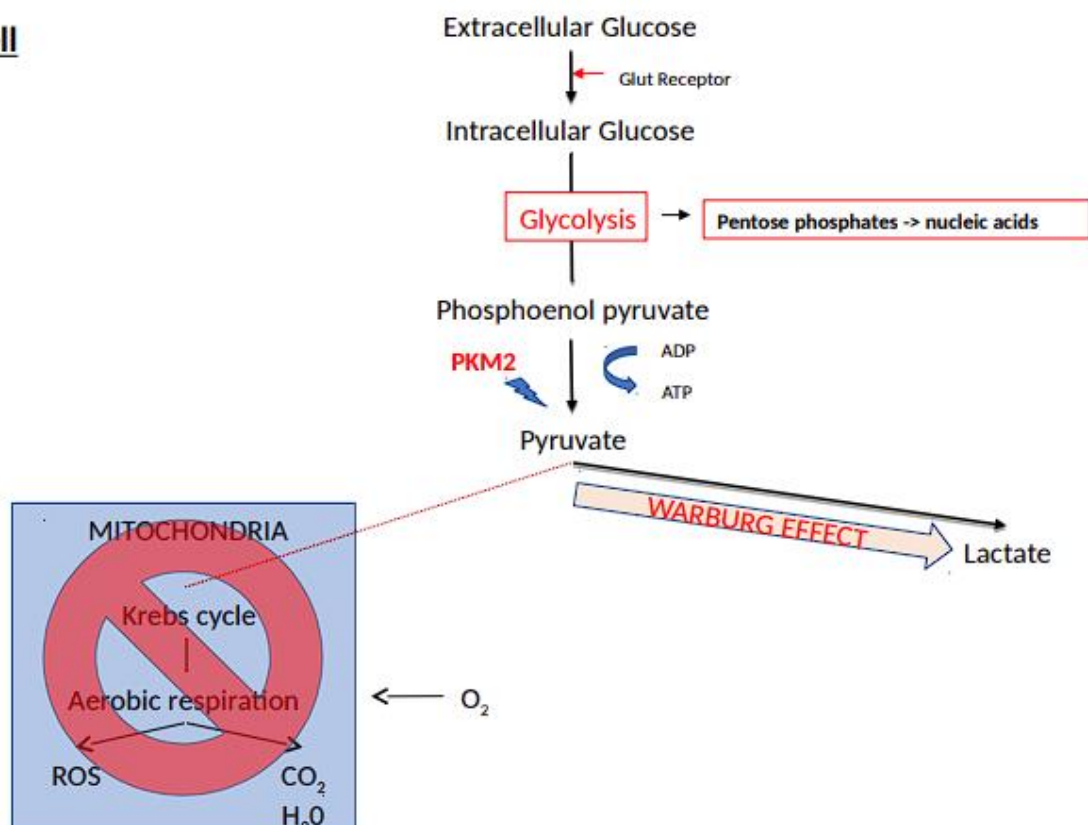


Figure 12 : Représentation schématique de l'expression de PKM2 en contexte tumoral et de son impact sur le métabolisme glycolytique.

souligné plus haut¹⁶⁵. Dans les cellules tumorales, la faible activité enzymatique de PKM2 prévient également l'accumulation des ROS⁷⁰. Le rôle de c-Myc dans la régulation de PKM2

est aussi crucial dans les tumeurs, car elle active l'expression des hnRNPs ce qui favorise l'épissage alternatif au profit de l'expression de PKM2, et donc au détriment de PKM1. Ce mécanisme est lié à mTOR qui active HIF-1 α pour initier la régulation de l'épissage via la voie c-Myc/hnRNPs¹⁶⁶. Pour leur réplication, les cellules cancéreuses ont un besoin important en précurseurs pour les voies de biosynthèse des lipides, hydrocarbonates et nucléotides. Le ralentissement du flux glycolytique en présence de la forme dimérique de PKM2 joue donc un rôle primordial. En plus de la voie de synthèse des acides nucléiques précédemment décrite, la voie de synthèse lipidique peut aussi se servir du glucose par la voie sérine/glycine pour produire le glycérol-phosphate, un précurseur des voies de synthèse lipidique¹⁶⁷.

PKM2 est également impliqué dans la production d'exosomes. Il s'agit de structures endosomales proches des microvésicules membranaires¹⁶⁸ servant majoritairement de moyen de transport pour divers métabolites (protéines, acides nucléiques...) vers les cellules environnantes, ce qui permet d'en modifier l'activité¹⁶⁹. Le relargage d'exosomes, corps apoptotiques et microparticules par les tumeurs impacterait le micro-environnement tumoral¹⁷⁰. PKM2, sous un état dimérique phosphorylé, joue le rôle de kinase en phosphorylant SNAP23 (Synaptosome-Associated Protein 23) qui est une des composantes du complexe SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), un acteur majeur dans la formation et la sécrétion des exosomes¹⁷¹. PKM2 modulerait également la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), une phase essentielle dans l'acquisition du pouvoir métastatique des tumeurs. L'EMT est caractérisée par la perte de polarité et d'adhésion entre cellules au profit d'un gain en propriété de migration et d'invasion¹⁷². Un des mécanismes impliqués est la perte d'activité de l'E-cadhérine, une conséquence de l'accumulation de PKM2. Cette dernière se complexe avec TGIF2 (TGF- β Induced Factor homeobox 2) pour promouvoir la liaison de HDAC3 sur le gène *CDH1*. Il en résulte une désacétylation de l'histone H3 induisant la perte de l'expression du gène *CDH1* et donc de la concentration en E-cadhérine¹⁷³. Enfin, PKM2 modulerait l'angiogenèse, un mécanisme avantageux pour la tumeur cancéreuse où de nouveaux vaisseaux sanguins sont générés pour alimenter les cellules tumorales. Pour cela, des processus biologiques sont nécessaires comme la régulation de la matrice endothéliale vasculaire mais aussi de la migration et de la prolifération du tissu endothélial. La forme dimérique de PKM2 a un rôle initiateur dans le processus angiogénique¹⁷⁴. L'activation de la voie IGF-1R est un événement critique où PKM2 provoque une dérégulation de la boucle de contrôle NF- κ B/miR-148a/miR-152 conduisant à un phénotype

de croissance et d'angiogenèse pro-tumoral¹⁷⁵. Sous condition hypoxique, une stimulation IGF-1 initie l'interaction entre HIF-1 α et le complexe nucléaire composé de la sous-unité p65 et de PKM2 pour stimuler l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et ainsi promouvoir l'angiogenèse¹⁷⁶⁻¹⁷⁷.

1.4.d. Rôle de PKM2 dans les infections virales

Les virus détournent les voies cellulaires métaboliques pour assurer leur multiplication. Ce phénomène n'est pas sans rappeler la réorientation des voies métaboliques observées lorsqu'une cellule normale devient tumorale, notamment pour assurer la production de précurseurs nucléotidiques¹⁷⁸. Un apport plus important en métabolites lipidiques est particulièrement important dans le cas des virus enveloppés¹⁷⁹.

Des travaux ont été conduits dans le cadre de l'infection par le virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)¹⁸⁰, virus à ARN simple-brin diploïde de la famille des *Retroviridae* responsable du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise). Ces études soulignent une altération du métabolisme cellulaire (glycolyse, voie PP et acide gras) lors de l'infection par VIH-1¹⁸¹. PKM2 a un rôle positif sur la prolifération virale en agissant par inhibition de la voie autophagique, ce qui conduit à une meilleure transcription du génome viral par la protéine virale Tat. Les résultats indiquent qu'un traitement par Tat induit une accumulation de p62, indicateur d'une inhibition de l'autophagie. Ce processus cellulaire vise à éliminer les composants cellulaires déficients ou non nécessaires. L'autophagie est contrôlée par les voies mTOR, AMPK (AMP-activated protein kinase) et PI3K/AKT¹⁸². Tat joue son rôle inhibiteur de l'autophagie en activant mTOR et PI3K/AKT, inhibant ensuite AMPK. Dans cette régulation de mTOR et PI3K/AKT, PKM2 est surexprimée suite à une induction par Tat et semble impliquée dans l'inhibition de l'autophagie¹⁸³.

PKM2 serait également impliquée dans l'infection par le Papillomavirus Humain 18 (HPV-18) un virus à ADN double-brin circulaire de la famille des *Papillomaviridae* responsable de cancers affectant les muqueuses orales et ano-génitales¹⁸⁴. Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont capables d'influencer positivement le déroulement du cycle glycolytique notamment en améliorant la captation du glucose et en favorisant la production de lactate. Ce processus implique les enzymes HK2, LDHA et PKM2. L'inactivation transcriptionnelle des gènes codants E6/E7 par siRNA provoque un basculement d'expression du variant PKM de la forme PKM2 (préférentiellement à l'état de dimère) vers PKM1 (exclusivement tétramérique). Le

mécanisme supposé implique la réduction de l'expression de c-Myc, qui serait donc induite par les protéines E6/E7. Comme nous l'avons évoqué, c-Myc joue un rôle important dans la progression tumorale¹⁸⁵, et elle régule notamment deux enzymes du cycle glycolytique, HK¹⁸⁶ et LDHA¹⁸⁷. D'autres études démontrent le rôle de c-Myc dans la transition PKM2 vers PKM1. Cette activité serait liée à l'induction des hnRNPs (hnRNPA1/2 & PTB1), qui favorisent l'épissage alternatif du transcrite du gène *PKM* vers PKM2.

Un dernier exemple illustrant le rôle clé de PKM2 porte sur l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV), un virus à ADN double-brin de la famille des *Herpesviridae*. Son infection peut conduire à diverses pathologies dont la plus courante est la mononucléose infectieuse. L'EBV est aussi associé à des cancers comme le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin. L'EBV est associé aussi à des cancers épithéliaux comme le cancer gastrique ou le cancer indifférencié du nasopharynx¹⁸⁸. Dans le cancer indifférencié du nasopharynx (NPC), la protéine virale oncogène LMP1 (Latent Membrane Protein 1) stimule la glycolyse aérobie. Elle régule négativement HoxC8, permettant ainsi d'augmenter le flux glycolytique¹⁸⁹. Une autre étude a révélé son rôle activateur de la voie AKT conduisant à réduction de la voie OXPHOS¹⁹⁰. L'activation de la voie PI3K/AKT par LMP1 active la voie FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) menant à une voie glycolytique plus efficace en jouant

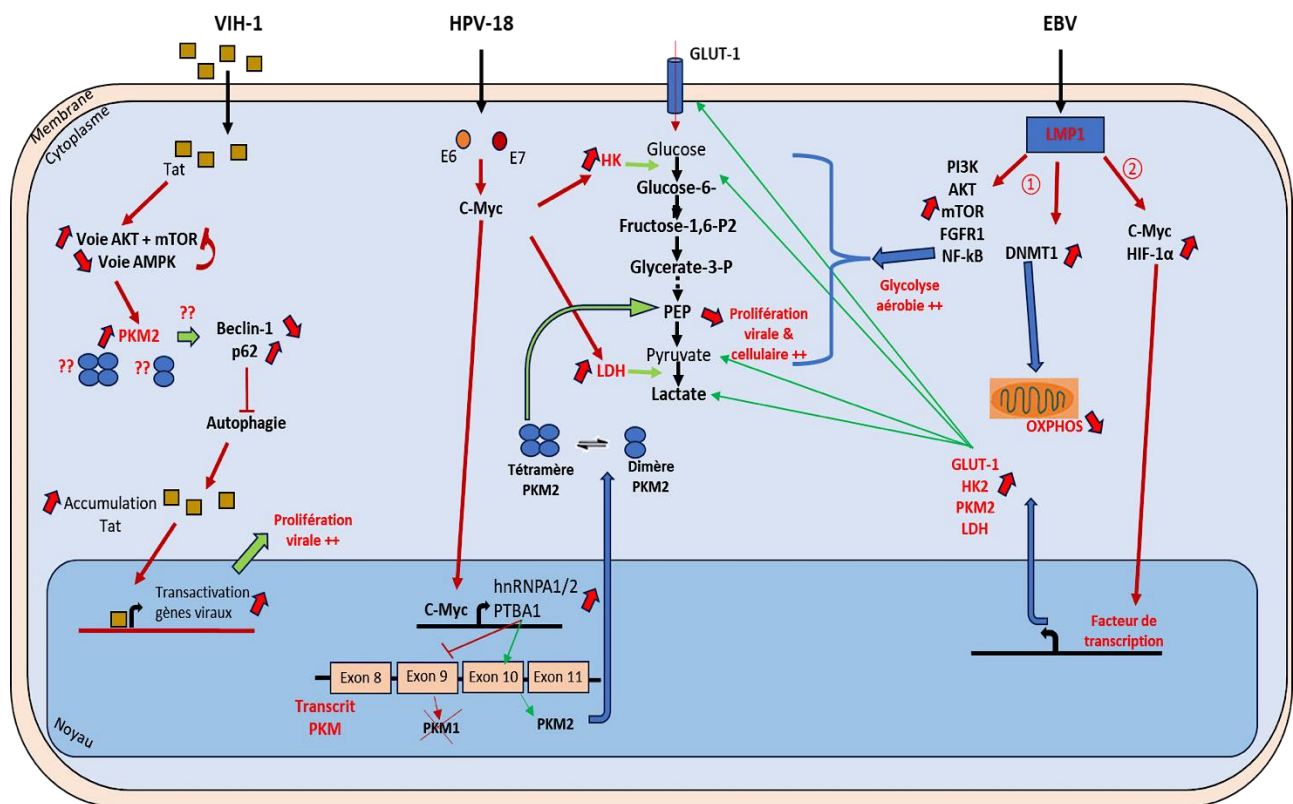


Figure 13 : Représentation du rôle de quelques agents viraux sur le métabolisme glycolytique. Ici sont représentées les données portant sur le rôle potentiel de PKM2 dans les infections à HIV-1, HPV-18 et EBV.

positivement sur l'expression de diverses protéines dont HIF-1 α , LDHA, PDHK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1). LMP-1 module négativement PKM2 notamment par augmentation de la phosphorylation favorisant la forme dimérique pro-tumorale¹⁹¹. LMP1 favorise également l'influx du glucose en activant le canal GLUT1. L'impact de LMP-1 sur la progression tumorale, dans le cadre du NPC, conduit à la mise en place d'un métabolisme de type Warburg qui favorise la production de lactate, dont de nombreuses activités pro-tumorales ont été décrites¹⁹². La contribution de PKM2 dans les infections virales décrites supra est résumée sur la **Figure 13**.

Ainsi, les rôles multiples de PKM2 dans les cancers et infections virales la désigne de fait comme une cible majeure pour le développement de molécules thérapeutiques innovantes, ce qui est l'un des attendus de mon projet de thèse.

1.5. Molécules naturelles et synthétiques capables de réguler PKM2

En parallèle à l'action allostérique du FBP, l'activité de PKM2 est aussi modulable par d'autres molécules naturellement présentes dans l'organisme ou via des molécules synthétiques utilisables à des fins thérapeutiques.

1.5.a. Modulateurs physiologiques

L'un des modulateurs physiologiques de l'activité de PKM2 est la sérine. En contexte tumoral, sa concentration joue un rôle essentiel dans plusieurs voies métaboliques. Il est donc important pour la tumeur de promouvoir les voies de biosynthèse de la sérine¹⁹³. Quand la concentration en sérine est faible, l'activité du tétramère PKM2 est réduite, permettant par la suite un flux glycolytique ralenti où les intermédiaires du glucose peuvent être utilisés dans la biosynthèse de sérine. Dans des tests *in vitro* avec un apport en sérine, l'activité de PKM2 intracellulaire est augmentée. Cet effet positif résulte d'une interaction directe entre la sérine et PKM2. Une étude cristallographique montre une poche de fixation pour la sérine par monomère (**Figure 14**). La position de cette poche est conservée entre les différentes PK (PKM1 et PKL/R) mais comme pour le FBP, l'activité enzymatique de PKM1 n'est pas modulable par la sérine. PKL/R est régulée de façon allostérique par FBP - comme PKM2 - mais n'est pas sensible à la sérine¹⁹⁴. D'autres acides aminés peuvent interagir avec cette poche mais avec des effets inverses, conduisant à l'inhibition de l'activité de PKM2, comme la phénylalanine ou la cystéine¹⁹⁵.

Le composé naturel SAICAR, intermédiaire de la synthèse des purines, a été identifié lors de recherches portant sur de nouveaux métabolites pouvant moduler spécifiquement l'activité de PKM2. Celle-ci interagit directement avec SAICAR et cette interaction est suffisante pour entraîner une plus forte activité enzymatique de PKM2 dans des modèles tumoraux *in vitro*¹⁹⁶. Une poche de fixation (par monomère) pour SAICAR est présente sur PKM2 (**Figure 14**)¹⁹⁷. Le complexe protéique PKM2-SAICAR est capable de phosphoryler plus d'une centaine de protéines humaines dont une grande partie reste peu caractérisée. Plus précisément, le complexe PKM2-SAICAR peut directement activer ERK1 *in vitro*. Toutefois, l'activation de la voie ERK1/2 phosphoryle PKM2 dans le cytoplasme, ce qui stimule sa dimérisation et sa translocation nucléaire, créant ainsi au final une boucle de rétrocontrôle positive. Tout stimulus activant EGFR provoque une augmentation de la concentration en SAICAR intracellulaire, ce qui permet de maintenir cette boucle positive au profit de la transcription de gènes requis pour la prolifération cellulaire¹⁹⁸.

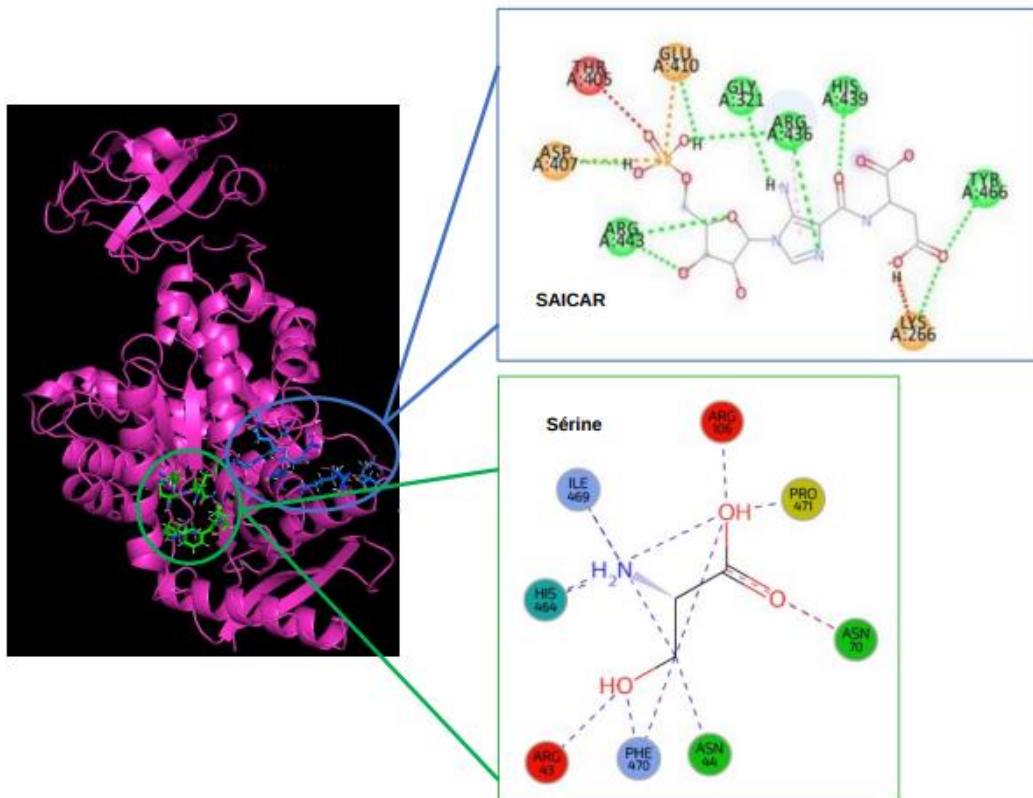


Figure 14 : Implication et effet de quelques régulateurs naturels sur l'activité de PKM2. Ici sont représentés les poches de fixation pour les acides aminés, avec un exemple comme la sérine (zone verte), mais aussi pour le composé SAICAR (zone bleue) avec les interactions indiquées.

L'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) est une hormone sécrétée par la glande thyroïde. Elle a un impact global dans la régulation du métabolisme. Dans un modèle de cancer du sein, il a été montré que T3 induit une forte activité mitochondriale dont l'action

est dépendante de la lignée cellulaire analysée¹⁹⁹. T3 est aussi capable d'induire la surexpression de PKM2 dont la prévalence est plus grande en lignée tumorale, plus particulièrement dans son état dimérique. Néanmoins, à ce jour la structure et la localisation précise de la poche de fixation de T3 à PKM2 reste non caractérisées²⁰⁰. Enfin, un dernier exemple d'intérêt dans la genèse de mon projet de thèse est la protéine HMGB1 (High-mobility group box 1) aux fonctions multiples que ce soit dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire. Dans le noyau, HMGB1 peut interagir avec l'ADN mais aussi les histones pour réguler les processus de transcription. Sous forme extracellulaire, HMGB1 peut agir comme une molécule de signalisation de stress (Alarmine)²⁰¹. Sécrétée par les cellules de l'immunité ou libérée par les cellules nécrotiques, HMGB1 active des voies de signalisation pro-inflammatoire en se fixant à des récepteurs cellulaires dédiés²⁰². HMGB1 est un acteur majeur dans l'induction de l'inflammation en réponse à des stress septiques et non septiques²⁰³. Dans les tumeurs, HMGB1 pourrait interagir avec le tétramère de PKM2. Cette interaction pourrait se faire au niveau de la poche de fixation du FBP (en Lys433) car la présence de FBP ou même de la phosphorylation en Tyr105 entraîne une gêne stérique bloquant toute fixation de HMGB1 sur PKM2²⁰⁴.

1.5.b. Molécules naturelles non humaines ou d'origine synthétique

Plusieurs modulateurs d'origine naturelle, non humaine, ou synthétiques de PKM2 ont été identifiés (**Figure 15**). La gliotoxine issue du métabolisme fongique d'*Aspergillus fumigatus* cible NF- κ B (Nuclear factor kappa B) menant ensuite à la phosphorylation de l'histone H3 et à un processus de mort par apoptose²⁰⁵. Il a également été démontré que cette molécule est capable de lier directement PKM2 et que cette interaction induit une inhibition spécifique de PKM2 par rapport à son homologue PKM1. Par sa fixation, cette molécule induit une perte de l'effet Warburg provoquant une baisse de production en lactate dans des lignées de gliome. La gliotoxine inhiberait la phosphorylation de STAT3 par le dimère PKM2²⁰⁶ sans altérer l'expression globale de l'isoforme PKM2²⁰⁷.

La shikonine est une molécule produite par une plante de la variété *Lithospermum erythrorhizon*. Elle est traditionnellement utilisée comme produit médicinal en Chine pour ses propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes²⁰⁸. Cette molécule agit notamment comme un inhibiteur du métabolisme glycolytique grâce, notamment, à sa capacité à interagir de façon directe avec PKM2²⁰⁹. Cette interaction réduit la progression tumorale d'une part²¹⁰,

et stimulerait l'apoptose en favorisant la production de ROS. En effet, l'accumulation des ROS augmente la perméabilité mitochondriale provoquant le relargage de cytochrome C et la formation d'apoptosomes. La shikonine induit également une baisse de l'expression de différents gènes impliqués dans la glycolyse comme l'hexokinase 2 (*HK2*) ou *GLUT1*. Cet

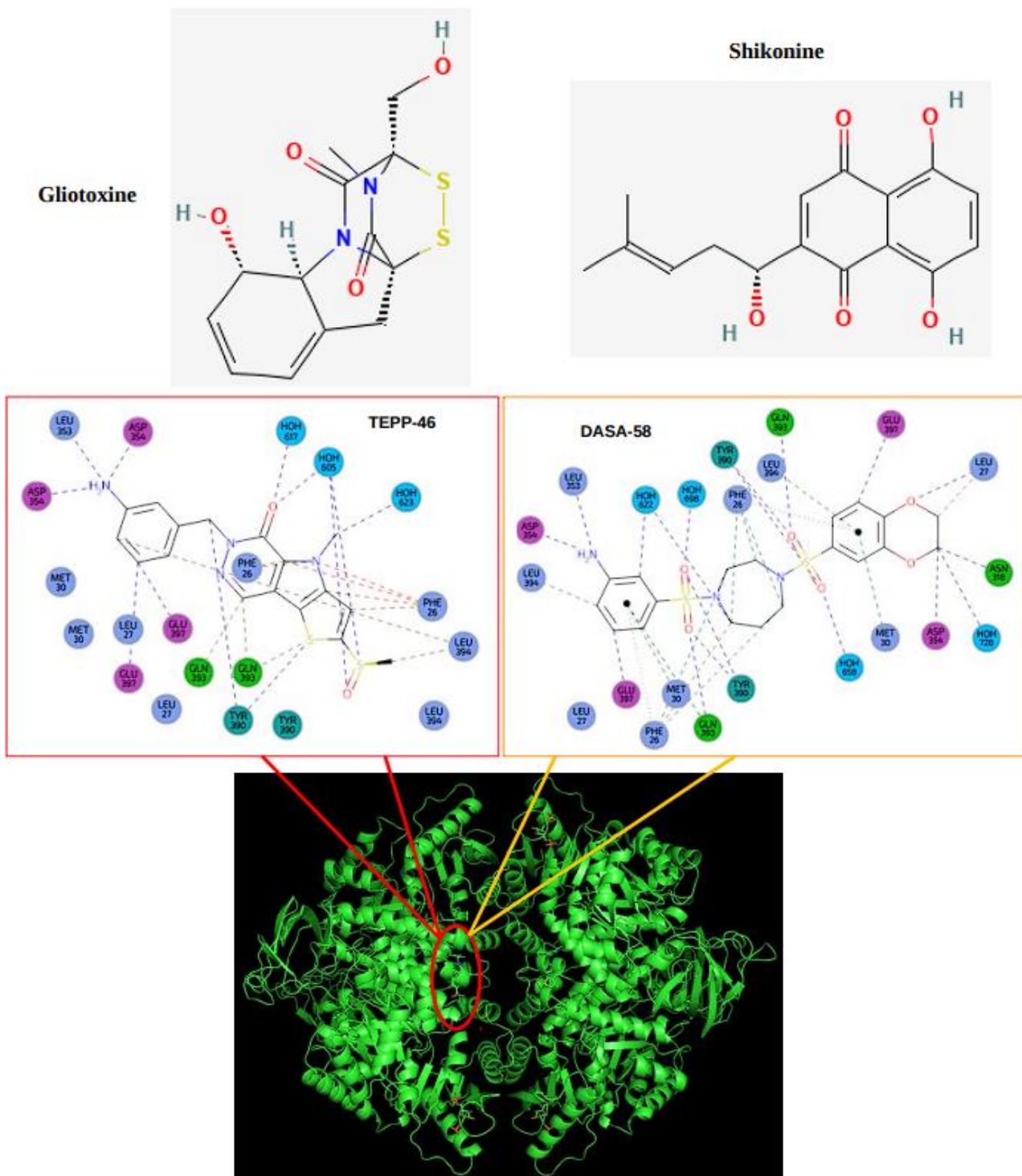


Figure 15 : Exemples de régulateurs synthétiques sur l'activité de PKM2. Sont présentés ici les quelques exemples de molécules pharmaceutiques pouvant interagir avec PKM2. Seule la fixation de TEPP-46/DASA-58 est caractérisée d'un point de vue structural.

effet est notamment en lien avec l'inhibition d'une modification de type phosphorylation sur

PKM2, ce qui provoque une réduction de l'expression de la forme dimérique de PKM2. Par ce biais, la shikonine agit négativement sur STAT3, qui est modifiée par PKM2²¹¹⁻²¹². Des molécules activatrices de PKM2 ont été synthétisées, dont le TEPP-46 (thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinone) ainsi que le DASA-58 (N,N'-diarylsulfonamide)²¹³. Ces deux composés agissent de façon positive et spécifique sur l'activité enzymatique de PKM2 sans affecter PKM1. Ces molécules agissent par interaction directe avec PKM2. Elles induisent un changement d'activité comparable à celui causé par le FBP où PKM2 se stabilise dans une forme tétramérique à haute activité enzymatique analogue à celle de PKM1. De façon surprenante, des analyses structurales de PKM2 associées à chacune de ces molécules montrent que leur site de fixation n'est pas situé au niveau de la poche allostérique du FBP³¹. Il se trouve en effet au niveau de la zone d'interaction entre deux chaînes du tétramère PKM2 qui stabilise l'interface A-A' (interaction des domaines A de deux monomères formant le dimère PKM2), région qui permet la transition de la forme monomérique à la forme dimérique de PKM2. Il a d'ailleurs été noté que la présence supplémentaire du FBP en plus du TEPP-

Molécule	Origine	Effet sur activité enzymatique catalytique	Impact sur Oligomérisation	Implication rôle nucléaire (Kinase...)
SAICAR	Exprimée chez l'Homme	Inhibiteur	Dimère ++	Activateur (surtout à faible [Glucose])
Sérine		Activateur (coopération possible avec FBP)	Tétramère (Forme R) ++	Inhibiteur
Phénylalanine		Inhibiteur	Dimère ++	Activateur
Cystéine		Inhibiteur	Tétramère (Forme T)	Pas caractérisé
Hormone T3		Inhibiteur	Dimère ++	Activateur
Gliotoxine	Exprimée chez des espèces non humaines	Inhibiteur	A confirmer	Inhibiteur fonction tyrosine kinase du dimère
Shikonine		Inhibe l'activité de pyruvate kinase	Inhibe le dimère et le tétramère	Resteint l'activité de protéine kinase
TEPP-46	Synthétique	Considéré comme des activateurs de type FBP	Privilégie la forme tétramérique	Reste à étudié mais hypothèse inhibitrice (prépondérance tétramère)
DASA-58				

Tableau 1 : Tableau non exhaustif de quelques agents biologiques naturels ou non pouvant altérer la structure et fonctions associées de PKM2.

46 ou du DASA-58 reste possible, et que sa présence pourrait favoriser la fixation de ces activateurs pharmacologiques. Cette observation suggère que la fixation de FBP serait

nécessaire pour la fixation de ces drogues, qui ne pourraient se fixer sur la forme apo (libre de tout ligand fixé sur sa structure) du tétramère de PKM2³¹. Par ailleurs, ces deux activateurs pourraient gêner la prolifération tumorale en privilégiant la voie glycolytique classique par décarboxylation du pyruvate au détriment des voies alternes pour le métabolisme des tumeurs notamment la production de lactate ou lipides²¹⁴. Les lipides étant l'un des éléments essentiels car la perte de capacité de synthèse de ces composés induit une inhibition de la prolifération cellulaire.

L'ensemble de ces exemples de molécules ciblant PKM2 est résumé en **Tableau 1**.

1.5.c. Rôles des ARNs non codants

Des ARNs non codants modulent l'activité de PKM2. Une première catégorie d'ARN non codants est celle des microARNs (miARNs) qui se caractérisent comme de courtes séquences (19 à 25 nucléotides) impliquées dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel²¹⁵. Un seul d'entre eux peut néanmoins cibler plusieurs centaines d'ARN messagers (ARNm) et ainsi moduler l'activation de nombreuses voies fonctionnelles dans la cellule²¹⁶. Leur rôle a été invoqué dans les cas de stéatose hépatique non alcoolique du foie (NASH), pathologie présentant une symptomatique inflammatoire avec dérégulation des hépatocytes couplée ou non à une fibrose²¹⁷. En effet, des études ont souligné un lien causal entre NASH et l'effet Warburg bien que la mécanistique impliquée, notamment au sein des cellules de Kupffer (macrophages du foie), reste à étudier²¹⁸. L'un des acteurs pourrait être le miR-122-5p, spécifique du foie notamment chez l'Homme et la souris²¹⁹. Chez les patients NASH, l'expression de miR-122-5p est réduite²²⁰. Dans cette situation, PKM2 est surexprimée et les cellules présentent un profil glycolytique plus actif. Ce phénotype pourrait s'expliquer par la réduction d'expression de miR-122-5p, qui inhibe l'expression de PKM2. La région de fixation de ce miARN se localise au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm venant de la transcription du gène *PKM* (**Figure 16A**) ce qui conduit à la perte d'expression de PKM2²²¹⁻²²².

La protéine PTB1, membre des hnRNPs, est impliquée dans l'épissage alternatif du transcrit *PKM*²²³. Parmi les miARNs existants, près d'une dizaine ont la capacité de cibler l'ARNm codant cette protéine²²⁴. Ils pourraient impacter l'effet Warburg en modulant l'expression des isoformes M1/M2 en contexte tumoral²²⁵. C'est le cas de miR-124. D'autres miARNs pourraient affecter l'expression de PTB1, comme miR-1 ou miR-133 dans le muscle, ou miR-

9 ou miR-137 dans le cerveau.

Les ARN long non codants (lncARNs) sont également impliqués dans la régulation de PKM2. A l'inverse des miARNs, ce sont des ARN non codants d'une taille supérieure à 200 nucléotides. Une expression aberrante des lncARNs est impliquée dans de nombreux processus cancéreux et métaboliques²²⁶, notamment en raison de leur capacité à interférer avec les miARNs pour empêcher leur fixation sur les ARNm²²⁷. Ce type d'observation a été fait dans le cadre de cancers pulmonaires²²⁸. Dans ce contexte pathologique, lncARN HOXA11-AS aurait une action oncogène²²⁹. Dans le cas de l'adénocarcinome pulmonaire, la surexpression de lncARN HOXA11-AS s'associe à une plus forte prolifération, invasion et angiogenèse du cancer non à petites cellules (CBNPC)²³⁰. Les lncARNs interviendraient dans le contrôle de la glycolyse aérobie en réponse à la forte demande énergétique des tumeurs²³¹. Il a été notamment montré par Chen *et al.* que l'inhibition du lncARN HOXA11-AS inhibe la prolifération tumorale et l'activité glycolytique, un effet réversible par surexpression du miARN miR-148b-3p (**Figure 16B**). La perte d'expression de HOXA11-AS entraînerait une inhibition de l'expression de PKM2 par l'action inhibitrice du miR-148b-3p²³².

Un effet du lncARN VAL sur l'activité de PKM2 a été démontré dans les cancers gastriques (CG). En effet, une étude de l'équipe de Dai *et al.* a constaté qu'une surexpression de VAL n'a que peu d'influence sur le taux en protéines PKM2 mais agit plutôt sur son activité enzymatique. Ce mode d'action serait dû à l'interaction directe de ce lncARN avec le domaine kinase de PKM2. Cette région comprend la partie N-terminale (1-44) de PKM2 et plus largement la région 44-388, la région où la Parkine peut se lier à PKM2 et jouer son rôle de

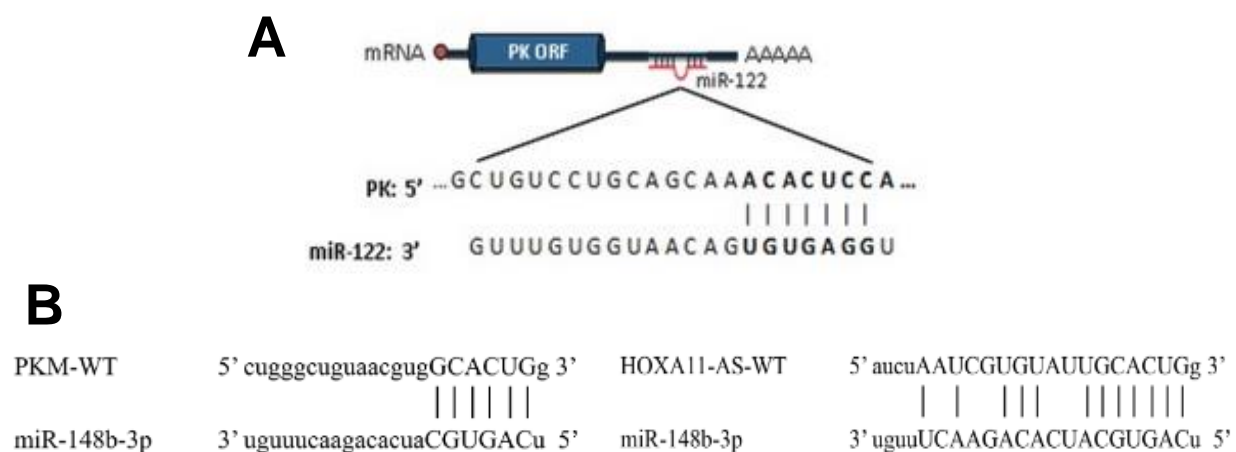


Figure 16 : Exemples de l'action régulatrice de quelques ARN non codants sur l'activité de PKM2. (A) Représentation schématique du site de fixation du miR-122-5p au niveau du 3'UTR du gène *PKM*, tirée de l'article de Inomata (B) Représentation schématique des interactions nucléotidiques entre *PKM*/miR-148b-3p/HOXA11-AS où la **ligne rouge** représente la concordance de séquence pouvant être ciblée par *PKM* ou HOXA11-AS (tirée de l'article de Chen *et al.*).

ligase E3. C'est donc par effet de compétition dose-dépendante que VAL se lie à PKM2 en empêchant la fixation de la Parkine et en provoquant la perte de l'ubiquitination de PKM2, ce qui permet d'augmenter l'activité enzymatique de PKM2. De plus, la surexpression de VAL entraîne un abaissement de l'activité de la pyruvate carboxylase, enzyme clef de la gluconéogenèse. En combinant de façon synergique ces deux rôles, VAL promeut la progression maligne de type CG. Il a d'ailleurs été montré que le taux en ce lncARN est associé négativement avec la progression tumorale et le pronostic des patients CG. L'expression de VAL permet à la fois une meilleure consommation en glucose mais aussi une production optimale de lactate et d'ATP grâce à son action régulatrice positive sur PKM2. Dans un contexte de déficience en glucose, l'expression du lncARN VAL est stimulée. Il aurait donc un rôle important dans la résistance au manque de nutriments en contexte tumoral CG²³³.

En conclusion, PKM2 est une enzyme clef de la glycolyse qui permet un contrôle fin basé sur des modifications transcriptionnelles, traductionnelles mais aussi post-traductionnelles. Celle-ci est aussi impliquée dans de nombreuses pathologies, dont nombres d'entre elles avec une origine virale mais aussi un devenir cancéreux. C'est dans cette optique que nous avons cherché, dans ce projet, à mieux comprendre la dynamique moléculaire à haute résolution de la PKM2 dans ses différents états mais aussi de son isoforme PKM1.

Chapitre 2. Dynamique moléculaire

2.1. Introduction et principe

Dans un contexte de recherche de sites moléculaires ayant la capacité à se lier à un composé thérapeutique, il est important de pouvoir connaître la position de chacun des atomes qui constituent un système moléculaire dans un espace donné afin de mieux comprendre son activité et ses potentielles interactions avec son environnement biologique immédiat. En effet, dans un contexte cellulaire, une grande partie des protéines peuvent interagir entre elles ou avec d'autres composés moins complexes, et la connaissance de la structure tridimensionnelle de ce système peut ainsi déterminer l'effet de certaines mutations sur la capacité d'interaction d'une protéine avec un autre élément de son environnement. De plus, une proportion non négligeable de protéines présente des sites de liaisons potentiels difficilement observables dans un contexte de non-interaction avec d'autres ligands, on les qualifie de sites cryptiques.

Ceux-ci sont souvent considérés comme des régions qui se forment dans un système lié à un ligand (ou système *holo*) mais qui reste peu, voire non détectable, dans un système libre (i.e. sans ligand ou système *apo*)²³⁴. D'où l'importance de pouvoir disposer du plus grand nombre possible de conformations moléculaires pour un système donné afin d'avoir une compréhension précise à l'échelle atomique. Il est connu depuis longtemps que les protéines sont des systèmes complexes « dynamiques », et que chacun des sites moléculaires qui les constituent peut présenter des modifications conformationnelles dans un contexte de liaison avec un ligand. Les méthodes de la chimie théorique, et plus précisément ici la dynamique moléculaire (DM), permettent de déterminer un ensemble de conformations moléculaires pour des systèmes allant de l'atome à des composés beaucoup plus complexes allant jusqu'au milliard d'atomes. Les approches de DM permettent de simuler le mouvement au cours du temps d'un ensemble d'atomes ayant des positions initiales données et qui vont ensuite évoluer en suivant les lois de Newton de la mécanique dite classique. Chaque atome est ainsi caractérisé comme un objet avec une masse ponctuelle initiale, mais aussi par l'addition d'un ensemble de forces s'exerçant sur lui, analogue ici au mouvement. Ainsi, à partir d'une particule ayant une masse et une position initiale, la dynamique moléculaire permet d'extraire les mouvements atomiques de chaque atome d'un système dans un intervalle de temps donné, générant ainsi un ensemble de conformation que peut prendre le système.

2.1.a. Histoire et principe de base

Les méthodes DM ont été conçues à l'origine au sein de la communauté de la physique théorique dans les années 1950 par les travaux de Berni Alder et Tom Wainwright²³⁵. Ils ont notamment démontré le potentiel du traitement informatique et de la vitesse des ordinateurs dans l'étude de l'évolution dans le temps d'un système à N atomes. Étant intimement lié aux ressources informatiques, des premiers algorithmes de DM permettant de prendre en compte un ensemble avec un nombre d'atomes, un volume et une énergie totale fixée ont permis la génération d'une simulation DM à température constante dans des travaux de Leslie WOODCOCK de 1970²³⁶. Par la suite, ces simulations ont évolué en suivant l'évolution des ressources informatiques, permettant désormais d'accéder à des systèmes utiles à la compréhension de processus biologiques comme des protéines dans un solvant ou bien des complexes protéiques plus gros comme le ribosome²³⁷⁻²³⁸.

La mécanique quantique n'étant adaptée que pour des systèmes de petite taille, la DM couplée à une méthode empirique d'évaluation de l'énergie est la candidate idéale pour pallier le temps de calcul nécessaire pour générer l'ensemble des conformations dynamiques voulues en fonction du temps dans l'étude d'un système biologique complexe. En effet, le choix du pas de temps nécessaire pour résoudre les équations numériques de DM est crucial et, en pratique très court, de l'ordre de la femtoseconde (fs, 10^{-15} s), afin de pouvoir mimer les phénomènes les plus rapides de vibration entre les atomes. C'est pour cette raison que jusqu'à très récemment les calculs de DM étaient limités à des simulations de l'ordre de la nanoseconde (ns, 10^{-9} s) pour simuler, à l'aide des plus récents champs de forces, des systèmes dans des conditions les plus proches possible de la réalité. Néanmoins, de nombreuses nouvelles stratégies de DM ont permis de pousser les simulations jusqu'au domaine de la microseconde (μ s, 10^{-6} s) voir, plus rarement, de la milliseconde (ms, 10^{-3} s)²³⁹. Ces améliorations sont liées à l'utilisation massive de cartes graphiques types GPU (Graphic Processor Unit) pour le calcul et à la mise en place de stratégies d'échantillonnage accéléré permettant de mieux explorer l'espace conformationnel des systèmes²⁴⁰.

La DM permet de produire une trajectoire d'un système à N atomes en intégrant la deuxième loi de Newton. Pour cela, différentes étapes sont nécessaires :

1. Connaître les positions xyz ainsi que les vitesses v_{xyz} pour chacun des atomes de notre système en condition initiale,
2. Choisir un champ de forces agissant sur chacun des atomes et qui soit bien adapté, i.e. qui possède une paramétrisation permettant d'être prédictif,
3. Décider du modèle de solvation optimal (explicite ou continu),
4. Choisir un algorithme d'intégration des forces robuste et numériquement stable,
5. Décider de l'ensemble thermodynamique à considérer (nombre atomes, volume...),
6. **En option**, utiliser des méthodes accélératrices d'échantillonnage de la DM,
7. Faire le choix judicieux du logiciel de DM (efficacité parallèle, stabilité numérique).

Dans le cas d'une simulation de DM et après avoir pu obtenir les différentes forces, une intégration selon la 2ème loi de Newton (**1.1**) est réalisable :

$$m_i \frac{d^2 \cdot r_i}{dt^2} = f_i = \frac{-\delta}{\delta \cdot r_i} \cdot U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (1.1)$$

avec r_i représentant la position atomique à l'instant t, f_i étant la force qui agit sur cet atome et U son énergie potentielle totale dépendante de la position de chacun des atomes du système N. Ces simulations se placent dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer

consistant à découpler le mouvement des électrons avec celui du noyau, c'est-à-dire de considérer que le mouvement des électrons, en raison de leur masse bien inférieure au noyau, est considérablement plus rapide que celui du noyau. Cela permet de considérer les noyaux comme immobiles et ainsi simplifier les calculs pour l'étude du mouvement électronique au sein du système. Résoudre ces équations permet d'obtenir, pour chaque atome, son accélération ainsi que sa vitesse et sa position individuelle. Il est ainsi possible de créer une trajectoire dans le temps qui décrit et relie le mouvement de chacun des atomes au sein du système étudié.

2.1.b. Ensemble de coordonnées et vitesses initiales

Les premières informations cruciales à connaître avant de lancer une simulation de DM sont les jeux de positions et de vitesses initiales pour chacun des N atomes de notre système. Concernant les positions respectives des atomes, celles-ci peuvent provenir, par exemple, d'une structure cristallographique issue d'un fichier PDB accessible en libre accès sur la Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Dans le cas de structures de liquides ou de complexes moléculaires, il est souvent approprié de partir de la structure cristalline qui sera ensuite chauffée à une température adaptée. Pour obtenir les informations sur les vitesses initiales, celles-ci peuvent être attribuées par une approche aléatoire reproduisant une distribution de Maxwell-Boltzmann. Celle-ci permet de donner une distribution de probabilité de vitesse pour un atome en fonction de sa propre masse mais aussi de la condition de température voulue. Il est aussi important de savoir qu'au début d'une simulation, le système présente toujours des conditions de températures et pressions non optimales. Pour amener notre modèle à son état d'équilibre, une phase d'équilibration doit se produire. En effet, cet état initial n'est pas représentatif de ce qui est appelé l'état thermodynamique à l'équilibre. C'est pour cela que les premiers pas d'une simulation, souvent de l'ordre de quelques milliers, sont clé afin de relaxer progressivement la structure pour qu'elle puisse acquérir cet état d'équilibre. De nombreux moyens permettent de vérifier l'acquisition de cet état comme la lecture des paramètres de l'énergie potentielle ou aussi de la pression et température dont les valeurs montrent une dérive majeure avant de se stabiliser autour d'un plateau. Une précision pour le début de la simulation : il est important de chauffer progressivement le système vers la température que l'on souhaite et ainsi de permettre au système de prendre sa configuration énergétique de plus bas niveau²⁴¹.

2.1.c. *Choix du champ de forces*

2.1.c.i. *Généralités*

Pour la mise en place de toute simulation de DM, des équations mathématiques paramétriques caractéristiques de chacune des forces (et énergies) pouvant agir sur tous les atomes d'un système sont nécessaires : c'est ce qu'on appelle le champ de forces. Celui-ci est nécessaire dans l'optique de bien définir l'ensemble des paramètres nécessaires à un système donné pour reproduire au mieux la réalité. Chaque équation est donc associée au calcul d'une contribution spécifique de l'énergie potentielle totale. Celles-ci permettent de donner diverses informations sur les interactions entre atomes 'liés' (énergies de liaison, d'angle de valence et de la torsion), ou 'non liés' (interactions de van der Waals (vdW), électrostatiques et liaisons hydrogènes).

De manière courante, les champs de forces sont souvent employés sur la base d'un modèle à charge fixe. Ainsi, chaque atome se voit donner une charge électrostatique qui ne prend pas en compte l'effet de l'environnement local, on parle de champ de forces non polarisable²⁴². Néanmoins, dans le cadre de l'étude de système plus complexe en vue de comprendre des mécanismes biologiques (protéines...), de nouveaux champs de forces ont été développés pour y inclure cet effet de polarisabilité pour représenter correctement la densité de charge de chaque particule tout en prenant en compte l'influence exercée par les atomes voisins. Leur adoption fut retardée initialement par un besoin plus important en capacité de calcul du fait d'équations plus complexes. En pratique, l'effet de polarisabilité peut être inclus dans les champs de forces en utilisant divers modèles : dipôles induits, particules de Drude etc... Malgré une diversité importante du nombre de champs de forces dans la littérature, l'expression générale d'un champ de forces classique est restée pratiquement inchangée au cours de son histoire et peut s'écrire sous la forme fonctionnelle suivante :

$$U = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{impropres}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{El}}$$

Les quatre premiers termes concernent les interactions intramoléculaires et les deux derniers les interactions intermoléculaires. Plus en détail, chacun des termes ²⁴³ correspond à :

Termes intramoléculaires

- E_{liaisons} pour l'énergie d'élongation des liaisons (ou 'Stretching') qui est représenté par un potentiel harmonique ayant l'équation (1.2) :

$$E_{\text{liaisons}} = \sum_{\text{liaisons}} \frac{k_d}{2} (d - d_0)^2 \quad (1.2)$$

avec k_d symbolisant la constante de force de la liaison. d_0 représentant la longueur de référence lorsque le système est à l'équilibre et d , la longueur dite 'instantanée' de la liaison.

- E_{angles} représente l'énergie potentielle obtenue lors du phénomène de déformation des angles et a pour équation (1.3) :

$$E_{\text{angles}} = \sum_{\text{angles}} \frac{k_{\theta}}{2} (\theta - \theta_0)^2 \quad (1.3)$$

avec k_{θ} représentant la constante de force de flexion pour chaque angle indépendamment (valeur souvent inférieure à celle de k_d car plus 'facilement' perturbable) et θ/θ_0 caractérisant respectivement les valeurs d'angles instantanées ou à l'équilibre entre 3 atomes).

- E_{torsion} correspond au terme du potentiel énergétique de torsion du système moléculaire et qui est représenté comme une fonction des différentes rotations autour de chacun des angles dièdres. Cette valeur a pour équation (1.4) :

$$E_{\text{torsion}} = \sum_{\text{dièdres}} \frac{k_{\Phi}}{2} (1 + \cos(nt - \Phi_0)) \quad (1.4)$$

où k_{Φ} correspond à la constante de force de courbure, avec n le nombre de minima d'énergie possibles entre 0 et 2π associé à l'angle de torsion t et au facteur de phase Φ_0 permettant de déterminer la position des minima. Différentes combinaisons n/Φ_0 sont possibles (**Tableau 2**).

Valeur de n	valeur de Φ_0	Valeur des minimums locaux	Signification sur l'environnement structural
1	0	180	conformation en <i>-trans</i>
	180	0	conformation en <i>-cis</i>
2	0	90 et 270	X
	180	0 et 180	phénomène planaire forcé
3	0	60/180 et 300	carbone en sp^3 à conformation décalée (énergie potentielle plus basse par rapport aux autres conformations possibles)
	180	0/120 et 240	carbone en sp^3 à conformation éclipsée (énergie potentielle plus élevée par rapport aux autres conformations possibles) → Instable

Tableau 2 : Tableau énumérant les différentes possibilités de valeurs des couples n/Φ_0 pour l'ordre de calcul des énergies de torsions des angles dièdres.

- $E_{\text{impropres}}$ est nécessaire dans le cas de la préservation de l'aspect planaire de certaines géométries moléculaires ou bien afin d'inclure le caractère chiral de groupements chimiques dans l'énergie de torsion. Elle est déterminée par l'équation suivante (1.5) :

$$E_{\text{impropres}} = \sum_{\text{impropres}} \frac{k_{\psi}}{2} (\psi - \psi_0)^2 \quad (1.5)$$

où k_ψ est une constante de force, avec $(\psi-\psi_0)$ correspondant à une valeur d'angle pour l'instant t correspondant à la déviation par rapport au plan du système.

L'ensemble de ces constantes empiriques est déterminé sur la base de diverses données d'origine expérimentales (spectroscopie...) ou théoriques (calcul quantique...) et est ainsi stocké dans ce fichier de paramétrage pour notre champ de forces.

Termes intermoléculaires

Les deux derniers termes définissant le champ de forces caractérisent les interactions entre atomes de nature non covalentes. En général, ces termes ne s'appliquent qu'aux atomes avec un certain degré de distance les séparant, généralement au moins trois liaisons covalentes pour éviter tout risque de divergence lors de la résolution des calculs numériques. Ces divergences sont liées à des interactions de type 1-2 ou 1-3 (1 ou 2 liaisons covalentes de séparation respectivement) et peuvent en effet entraîner des phénomènes répulsifs ou attractifs de courte distance. Néanmoins, ces termes sont couramment éliminés en considérant qu'ils sont déjà amplement décrits dans les parties intramoléculaires du calcul. Des interactions de type 1-4 (3 liaisons qui séparent les deux atomes) sont possibles mais peuvent être largement exclues à l'aide de différents facteurs de correction qui sont propres à chacun des choix de champ de forces, d'où la nécessité de faire preuve de prudence dans le choix d'un jeu de paramètres de champ de forces issu de la littérature²⁴⁴. Ces termes intermoléculaires sont nombreux et propres à chacun des champs de forces mais deux d'entre eux sont couramment utilisés :

- E_{vdW} correspondent aux interactions de type vdW et effectuent la balance entre des forces répulsives, issues de la superposition des régions électroniques de chacun des atomes (échange de Pauli), et attractives, provenant de l'interaction entre dipôles instantanés (dispersion de London). Son potentiel se détermine par l'équation suivante **(1.6)** :

$$E_{vdW} = \sum_{vdW} 4 \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1.6)$$

Deux paramètres sont ajustables : σ qui représente la distance minimale où le potentiel intermoléculaire entre les deux particules est de 0, et ε qui indique la valeur d'énergie potentielle minimale et représentatif de la force d'interaction entre deux particules (**Figure 17**)^{245, 246}. Cette force de vdW intervient entre n'importe quelle paire d'atomes

appartenant à des molécules différentes ou non. Ces deux paramètres σ/ϵ sont définis pour chaque atome individuel dans un champ de forces donné par soucis de simplification. Le potentiel « 12-6 » de Lennard-Jones est le plus souvent choisi comme équation descriptive de ces interactions même si d'autres sont également possibles comme celui de Buckingham qui est plus adapté pour certains systèmes comme les composés organiques²⁴⁷⁻²⁴⁸.

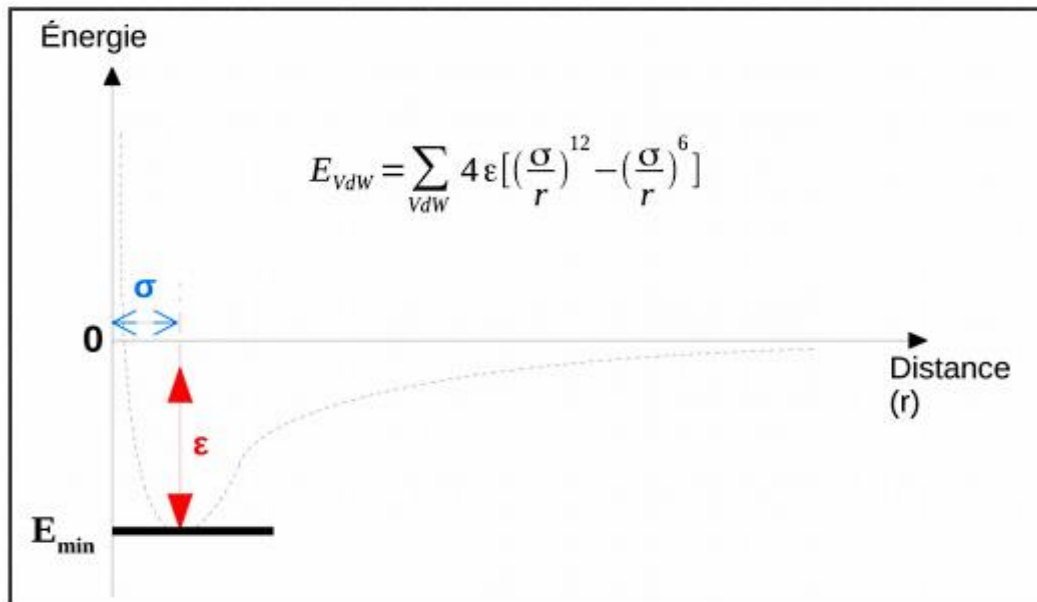


Figure 17 : Représentation graphique illustrant les paramètres de vdW. Ici est indiqué un exemple du potentiel de vdW entre les centres de deux atomes donnés. Lorsque la distance r diminue, la possibilité d'interaction augmente et est corrélée à une diminution du potentiel énergétique. Une fois la distance suffisante, les deux atomes atteignent un état d'équilibre, symbolisé par la distance σ où le minimum de l'énergie potentielle est atteint ($E_{\min} = \epsilon$). Si l'on cherche à continuer l'approche entre les deux atomes (r proche de 0), des forces de répulsion débutent de par une superposition de leurs couches électroniques, marquant une augmentation rapide du potentiel.

- Enfin, le dernier terme de l'équation est E_{el} et décrit les forces électrostatiques qui sont déterminées à l'aide de l'équation suivante (1.7) et impliquent des couples de charges atomiques partielles localisées sur les noyaux :

$$E_{El} = \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \times \frac{1}{r_{ij}} \quad (1.7)$$

L'équation a comme paramètres les charges partiels q_i/q_j des atomes i/j étudiés le vide (i.e. permittivité diélectrique dans le vide donné par $4\pi\epsilon_0\epsilon_1$) où les deux noyaux atomiques sont séparés par une distance r_{ij} .

La **Figure 18** regroupe l'ensemble des interactions calculées dans un champ de force.

Apparut dans le courant des années 50-60 en lien avec l'avènement et le développement des technologies de DM, les champs de forces ont pour objectif principal

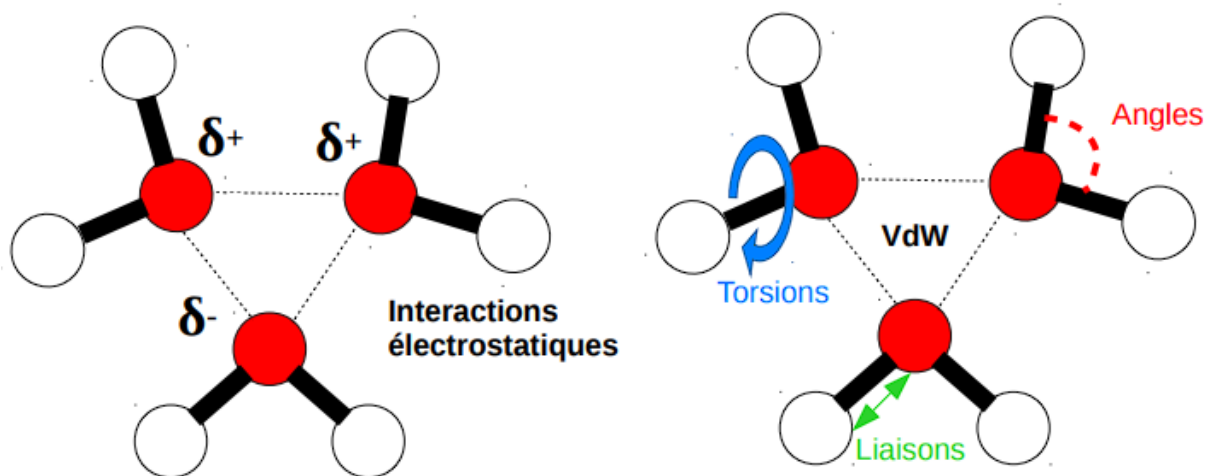


Figure 18 : Représentations schématiques des différents types d'interactions mesurées par un champ de forces classique. Les interactions de type vdW sont représentées par les distances en pointillés séparant les atomes en rouge sur l'image de droite, ceux en image de gauche représentent des interactions électrostatiques mettant en jeu des charges dipolaires sur chacun des atomes séparés par une distance en pointillés interagissant dans ce schéma.

l'obtention réaliste des structures moléculaires et de leurs paramètres associés (énergies, spectre...)²⁴⁹. Ainsi, les premiers d'entre eux ont été créés pour l'étude des composés hydrocarbonés²⁵⁰ puis de groupements plus complexes comme les alcools ou les amides. Le développement du domaine a depuis continué à progresser pour l'étude de système de plus en plus larges et complexes. On distingue d'une part les champs de forces classiques/non polarisables (n-pFF) comme AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)²⁵¹, GROMOS (GRoningen MOlecular Simulation package)²⁵², COMPASS (Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies)²⁵³ ou CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics)²⁵⁴. Ceux-ci sont encore très souvent utilisés de nos jours mais, comme évoqué précédemment, ne sont pas capable de prendre compte des effets de polarisation du à leur environnement. C'est ainsi que les années 80-90 dévoilent les premiers champs de forces polarisables (pFF) tels SIBFA (Sum of Interactions Between Fragments Ab initio computed)²⁵⁵, PIPF (pour Polarizable Intermolecular Potential Function)²⁵⁶, DRF90²⁵⁷ ou plus particulièrement AMOEBA (Atomic Multipole Optimized Energetics for Biomolecular Applications)^{258, 259}. Aussi, certains des anciens champs de forces non polarisables énumérés précédemment se sont modernisés pour fournir des versions polarisables comme pour CHARMM²⁶⁰, AMBER²⁶¹ ou encore GROMOS²⁶². Une liste plus complète peut se trouver dans une référence de Cieplak *et al.*²⁶³⁻²⁶⁴⁻²⁶⁵. Dans le cadre de cette thèse, le champ de forces AMOEBA a été choisi pour sa capacité à prédire avec précision la dynamique conformationnelle d'un système protéique notamment en se basant sur de

précédents exemples sur l'étude d'un autre modèle de protéines, la protéase du COVID-19²⁶⁶. Ce champ de forces permet de modéliser toutes sortes de propriétés physico-chimiques en milieu aqueux avec une bonne flexibilité intramoléculaire, un gros avantage surtout couplé à sa prise en charge de la polarisation électrostatique (par un modèle des multipôles distribués) lui permettant, par exemple de déterminer fidèlement les spectres de vibration moléculaire. Par des études comparatives menées par Jensen *et al.*²⁶⁷, il a été montré que des champs de forces n'utilisant que des charges ponctuelles pour le calcul de l'énergie électrostatique de type AMBER/CHARMM ne peuvent prédire qu'à peine la moitié des conformations des acides aminés, quand l'usage d'AMOEBA, avec la prise en compte des effets de polarisation et l'utilisation de multipôles distribués, permet d'atteindre une meilleure couverture allant jusqu'à 80 % des conformations possibles²⁶⁸.

2.1.c.ii. *Caractéristiques du champ de forces polarisable AMOEBA*

Ce champ de forces se différencie des approches non polarisables par des équations plus étendues au niveau des interactions non covalentes. Les interactions covalentes prennent en compte $E_{liaisons}/E_{angles}/E_{torsion}/E_{impropres}$ comme présenté précédemment et un autre élément appelé E_{sb} (couplant la mesure d'étirement et de flexion des angles de liaisons), alors que les interactions non covalentes déterminent E_{vdW} pour les liaisons vdW ainsi que les potentiels électrostatiques permanents et induit $E_{El-perm}/E_{El-ind}$. L'équation du champ de forces AMOEBA a donc la forme fonctionnelle générale suivante **(1.8)** :

$$E_{AMOEBA} = E_{liaisons} + E_{angles} + E_{torsion} + E_{impropres} + E_{sb} + E_{vdW} + E_{El-perm} + E_{El-ind} \quad (1.8)$$

Outre la prise en charge du caractère polarisable du système, ce qui différencie principalement AMOEBA d'une approche n-pFF est la prise en charge de multipôles atomiques allant jusqu'aux quadrupôles pour calculer les interactions électrostatiques. Ceci permet de mieux modéliser certaines propriétés directionnelles de certains types d'interaction comme les liaisons hydrogènes, les effets de pi-stacking... De plus, la prise en charge de la polarisabilité permet au champ de forces AMOEBA de répondre dynamiquement aux changements de l'environnement du système, ce qui le rend utilisable dans des milieux biologiques variés allant des kinases²⁶⁹ aux canaux ioniques²⁷⁰. Lors de sa conception, AMOEBA a été paramétré à l'aide d'un ensemble de données expérimentales en phase condensées couplé à des calculs de chimie quantique de haute précision réalisés en phase gaz. Grâce à cela, ce champ de forces a été paramétré pour de nombreux types de composés allant de l'eau²⁷¹ à des composés

organiques complexes comme des protéines²⁵⁸ ou acides nucléiques²⁵⁹. Le but initial de la création d'AMOEBA était d'approcher une précision de 0,5 kcal/mole sur les énergies libres d'interaction dans un contexte d'étude d'une interaction protéine-ligand. Nous allons donc présenter ci-dessous plus en détail les composantes de l'équation **1.8** d'AMOEBA²⁷²⁻²⁷³:

- Interactions covalentes à faible distance :

Pour la représentation de ces interactions, AMOEBA dispose d'un ensemble de paramètres et d'équations pour décrire la flexibilité intramoléculaire de façon complète. $E_{liaisons}$ décrit ainsi l'étirement des liaisons (**1.9**), E_{angles} la flexion de l'angle (**1.10**) et E_{sb} le couplage étirement-flexion (**1.11**). Ces équations ayant pour origine un précédent modèle de champ forces nommé MM3²⁷⁴, elles permettent aussi la prise en charge de l'anharmonicité en incluant les écarts par rapport aux longueurs et angles idéaux (r_{eq}/θ_{eq}) :

$$E_{liaisons} = \sum_{liaisons\text{uniques}} k_r (r - r_{eq})^2 (1 - 2.55(r - r_{eq}) + 3.793125(r - r_{eq})^2) \quad (1.9)$$

$$E_{angles} = \sum_{angles\text{uniques}} k_a (\theta - \theta_{eq})^2 (1 - 0.014(\theta - \theta_{eq}) + 5.6 \times 10^{-5}(\theta - \theta_{eq})^2) \quad (1.10)$$

$$E_{sb} = \sum_{sb\text{uniques}} k_{ra} [(r - r_{eq}) + (r' - r'_{eq})](\theta - \theta_{eq}) \quad (1.11)$$

Avec : les paramètres d'angles θ (en degrés (°)) et de longueurs de liaisons (r/r'), en Angström (Å) et la constante de force $k_r/k_a/k_{ra}$ (kcal/mol). De plus, le champ de forces AMOEBA présente un caractère anharmonique (modèle non linéaire avec des géométries moins stables dans le temps) qui se traduit par une expansion vers un niveau supérieur de la surface d'énergie potentielle du système moléculaire par rapport à une géométrie de référence généralement définie comme la structure à son état d'équilibre. Une fonction de type Wilson-Decius-Cross (**1.12**) est utilisée pour caractériser les énergies de flexion 'hors plan' ($E_{impropres}$) qui sont restreintes aux atomes portant des centres sp^2 , i.e. centres trigonaux hybridés (combinaison d'une orbitale atomique s avec deux orbitales p et concernant tout atome ayant un centre atomique de géométrie électronique trigonale) :

$$E_{impropres} = \sum_{impropres} 0.02191418_x \chi^2 \quad (1.12)$$

Où χ caractérise l'angle entre un vecteur jl et le plan de géométrie ijk dans le cas des centres atomiques i, j, k, l séquentiellement liés. Pour finir sur les interactions covalentes prise en compte dans AMOEBA, l'énergie potentielle de torsion ($E_{torsion}$) est calculée par une expansion de Fourier classique (**1.13**) limitée à $n=6$ et de la forme

suivante :

$$E_{torsion} = \sum_{torsionsuniques} \sum_n V_n [1 + \cos(n\beta - \varphi_j)] \quad (1.13)$$

Où V_j correspond à une constante de force de torsion, β à l'angle dièdre entre le plan $a-b-c$ et la région de torsion $a-b-c-d$ et enfin φ_j à la constante de phase définie précédemment. Dans un contexte impliquant deux centres atomiques de géométries trigonales ayant une plus forte barrière énergétique de rotation (comme la liaison amide), l'usage de la fonction de Bell permet une meilleure flexibilité de ces atomes impliqués (hydrogènes en contexte de cycle aromatique par exemple)²⁷⁵.

- Interactions de van der Waals

Afin d'évaluer les effets de répulsion et d'attraction entre deux atomes décrits par AMOEBA, il faut généralement utiliser l'équation de Lennard-Jones précédemment décrite afin de mesurer les interactions de vdW, mais ici plus particulièrement AMOEBA la forme fonctionnelle tamponnée 14-7 ou équation de Halgren (1.14) :

$$E_{vdW} = \sum_i \sum_{j,j \neq i} \varepsilon_{ij} \left(\frac{1.07}{\rho_{ij} + 0.07} \right)^7 \left(\frac{1.12}{\rho_{ij}^7 + 0.12} - 2 \right) \quad (1.14)$$

Avec : ε_{ij} indiquant la profondeur du puit (ou valeur d'énergie potentielle minimale) en kcal.mol⁻¹ et ρ_{ij} tel que $\rho_{ij} = R_{ij}/R_{ij}^0$ faisant le lien avec d'une part la distance réelle séparant les centres atomiques i et j en Å mais d'autre part avec R_{ij}^0 , la distance énergétique minimale. Ce terme n'est considéré ici qu'entre des paires d'atomes de nature hétérogène, ces paramètres étant donnés en résolvant les lois de combinaison suivantes (1.15) :

$$\varepsilon_{ij} = \frac{4\varepsilon_{ii}\varepsilon_{jj}}{(\varepsilon_{ii}^{1/2} + \varepsilon_{jj}^{1/2})^2} \quad \text{et} \quad R_{ij}^0 = \frac{(R_{ii}^0)^3 + (R_{jj}^0)^3}{(R_{ii}^0)^2 + (R_{jj}^0)^2} \quad (1.15)$$

La fonction de Halgren permet de déterminer des zones répulsives plus souples que la forme fonctionnelle 6-12 mais dans un but précis d'avoir un modèle plus reproductif des interactions répulsives de courtes distances. Pour cette raison, la forme 14-7 fournit un modèle plus réaliste et conforme aux résultats *ab initio* en phase gaz ainsi qu'aux propriétés des liquides²⁷⁶ dont sont issus les paramètres vdW dans AMOEBA. En pratique, chaque atome possède un type de site vdW dans la paramétrisation d'AMOEBA. Dans un contexte d'une liaison X-H, liaison entre un hydrogène et un atome X quelconque, on caractérise une valeur appelée 'facteur de réduction',

correspondant à un site vdW placé sur la liaison H-X de telle sorte que la distance entre X et le site vdW de l'hydrogène corresponde à un certain pourcentage de la longueur totale de la liaison, indiquant ainsi un phénomène de déplacement de la densité électronique le long de la liaison (caractère électro-négatif d'un atome). L'usage de ce facteur réductif a à la fois permis d'améliorer les modèles moléculaires quantiques structuraux des dimères d'eau, mais aussi au niveau énergétique dans le cas d'autres types de configurations²⁷⁷.

- Interactions électrostatiques permanentes

La prise en charge de l'énergie électrostatique dans AMOEBA inclut à la fois les multipôles induits (i.e. liés à la polarisation) et permanents. Pour le cas des multipôles atomiques permanents, ceux-ci comprennent les moments monopolaires caractérisant la charge, dipolaires pour les dipôles et quadripolaires pour les quadripôles, selon la loi suivante **(1.16)** :

$$M_i = [q_i, d_{ix}, d_{iy}, d_{iz}, Q_{ixx}, Q_{ixy}, Q_{ixz}, Q_{iyx}, Q_{iyy}, Q_{iyz}, Q_{izz}, Q_{ixy}, Q_{izz}]^t \quad (1.16)$$

avec q_i représentant la charge ponctuelle au centre de l'atome i (moment monopolaire), d correspondant à chacun des différents dipôles et Q à chacun des quadripôles. Dipôles et quadripôles d'un atome sont définis par rapport à des référentiels locaux définis par les centres atomiques des voisins qui lui sont liés. Dans un contexte d'interaction énergétique entre une paire d'atomes ij séparée par une distance r_{ij} , on peut ainsi calculer $E_{EL-perm}$ par l'équation **(1.17)** :

$$E_{EL-perm} = \sum_{unique\ pair\ d'atomes} (M_i)^T T_{ij} M_j \quad (1.17)$$

Il est aussi important de préciser que l'obtention des moments multipolaires peut se faire par diverses approches comme l'analyse de distribution des multipôles (DMA) après un calcul *ab initio* sur de petites molécules. Ces multipôles ainsi obtenus par DMA peuvent ensuite être convertis en paramètres électrostatiques finaux en utilisant la relation **(1.18)**, avec R étant une matrice rotationnelle utilisée pour la rotation des moments multipolaires, permettant la transformation de ces coordonnées locales vers un ensemble de référence global :

$$M_{local} = R^{-1}M \quad (1.18)$$

- Polarisation électronique

La méthodologie régissant les effets de polarisation électronique E_{El-ind} réside dans le mécanisme de redistribution des différentes densités électroniques du système étudié lorsque celui-ci est soumis à une distorsion par un champ électrique externe. Cet effet de polarisation représente une contribution majeure dans la description de l'énergie globale d'un système à plusieurs corps aussi bien en phase gaz que dans sa phase condensée. Dans AMOEBA, le modèle utilisé est celui des moments dipolaires induits classiques. Ils sont localisés sur des noyaux atomiques polarisables pour représenter au mieux l'effet du champ externe sur chaque site. La polarisation moléculaire est obtenue par un modèle à induction utilisant la distribution de polarisabilités sur chaque atome et basée sur la méthode de Thole²⁷⁸. Cette représentation interactive implique la création de dipôles induits potentiels sur différents sites (notés i). Ces dipôles induits vont ensuite propager leurs effets de polarisation à travers tous les autres sites. Ce phénomène inductif se poursuit jusqu'à ce que tous les dipôles induits sur chaque site convergent vers une configuration stable. Une action importante de la méthode de Thole consiste à amortir la polarisation sur les courtes distances pour empêcher un événement de catastrophe de polarisation, un artéfact du modèle de polarisation classique faisant augmenter exponentiellement l'énergie de polarisation en l'absence de répulsion de Pauli. La forme fonctionnelle (1.19) permet d'inclure une fonction d'amortissement :

$$\rho = \frac{3a}{4\pi} \exp(-au^3) \quad \text{avec} \quad u = \frac{r_{ij}}{\alpha_i \alpha_j^{1/6}} \quad (1.19)$$

Avec u représentant la distance effective qui est fonction de la distance r_{ij} mais aussi de la polarisabilité de chacun des atomes des sites i (α_i) et j (α_j). Entre en jeu aussi le rôle d'un facteur sans dimension a caractérisant l'« étalement » des distributions des charges afin de contrôler l'amortissement de la polarisation. La résolution de ces équations permet de déterminer la composante de l'énergie électrostatique induite E_{el-ind} qui modélise l'effet de polarisation (1.20) :

$$E_{El-ind} = -\frac{1}{2} \sum (\mu_i^{ind})^T E_i \quad (1.20)$$

L'utilisation de ce modèle de Thole est très avantageuse sur le plan de la simplicité mais aussi pour sa transférabilité sur différents systèmes permettant de reproduire les polarisations moléculaires de nombreuses petites molécules avec un unique facteur

d'amortissement global et une unique polarisabilité atomique pour chaque élément. Pour résumer, malgré un coût de temps de calcul plus important, l'utilisation du champ de forces polarisable AMOEBA est un atout important dans la considération de la polarisation de systèmes complexes, allant des ions aux systèmes biologiques, pour en obtenir une représentation la plus fidèle possible²⁶⁵.

2.1.c.iii. *Quelques exemples de modèle de polarisation*

La mécanistique des effets de polarisation se manifeste dans la méthode hybride Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM) permettant de simuler un système chimique ou biologique. Celle-ci repose sur l'analyse combinatoire des interactions quantiques, pour décrire avec précision la structure électronique ainsi que la réactivité chimique d'un sous-groupe d'atomes du système, et classiques pour caractériser les interactions mécaniques des atomes restants. Afin d'inclure les effets de polarisation sur un système, l'inclusion de charges ponctuelles est nécessaire mais peut provoquer néanmoins un problème de relaxation (interactions artificielles, convergence difficile du modèle...). Plusieurs méthodes permettant d'inclure ces effets de polarisation tout en limitant ces problématiques sont présentées ici :

1. **Le modèle de « l'oscillateur de Drude »²⁷⁹ :**

Ce modèle utilise des « particules de Drude » sur chaque atome polarisable afin de permettre aux dipôles atomiques de s'ajuster en réponse au champ électrique externe. Une des différences avec le modèle de charges fluctuantes (voir point 3) est l'absence de modification des charges partielles, chaque atome étant connecté avec une particule fictive à travers un ressort, l'ensemble formant l'équivalent d'un dipôle atomique (**Figure 19**). Ce modèle a l'avantage d'être associé à un ensemble d'algorithmes relativement simples à implémenter et pouvant être efficacement parallélisés. Néanmoins, les effets d'une catastrophe de polarisation sont l'un des risques de cette méthode dans un contexte où la particule de Drude est redistribuée à une distance trop éloignée du noyau atomique de l'atome à laquelle elle est liée, provoquant une énergie d'interaction aberrante et non physique. Il existe une méthode préventive qui consiste à l'introduction de contraintes bloquant le mouvement de ces particules à partir d'un certain seuil, souvent à 0,2 Å du noyau atomique²⁸⁰. De plus, le choix du pas de temps reste important dans ce modèle car ces particules sont incorporées dans

l'équation de mouvement. Un intervalle typique de 1 fs est souvent choisi pour prévenir les forces importantes potentielles et associées à ces particules ayant une masse typique de 0.4 unité de masse atomique (amu) et une constante de force d'environ 500 kcal/mol.Å^2 ²⁸¹.

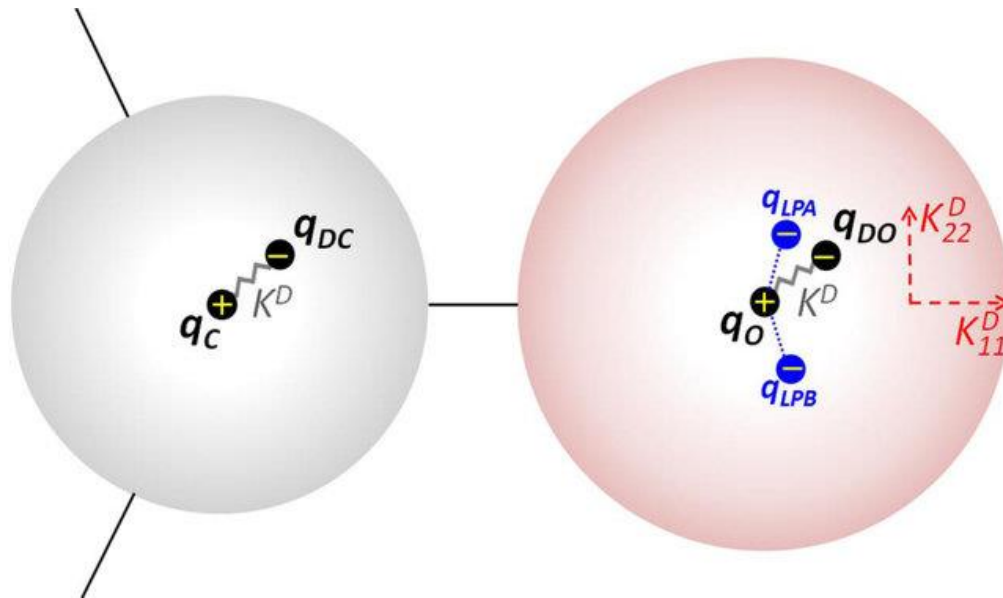


Figure 19 : Représentation schématique du modèle d'oscillateur de Drude. L'ajout de particules de Drude sur les atomes de Carbone (C) et d'Oxygène (O) se fait à l'aide d'un ressort possédant une constante de force K^D . La distribution atomique respective des charges (q_C et q_O) et des oscillateurs de Drude (q_{DC} et q_{DO}) est aussi indiquée. Afin de mimer les doublets non liants sur l'Oxygène, des particules virtuelles LPA e LPB sont aussi présentes avec leurs charges respectives q_{LPA} et q_{LPB} . De plus, les électrons de l'atome d'oxygène sont capables de polarisation anisotrope pour mieux représenter la structure électronique dans les différentes directions (comme indiqué par K_{22}^D et K_{11}^D ²⁸²).

2. Le modèle des dipôles induits²⁸³ :

Cette méthodologie des dipôles induits est une alternative pour répondre aux modulations subies par un système dans un champ électrique environnant. Contrairement au modèle de Drude, aucun ajout de particules virtuelles supplémentaires ne se fait dans cette méthode. Les dipôles induits sont souvent placés sur les noyaux des atomes du système mais une modulation de ce placement reste possible dans un contexte où l'on veut mieux reproduire le caractère anisotrope de la structure électronique, c'est à dire qui présente des caractéristiques différentes selon son orientation (paires libres etc...). Ce modèle est plus précis que la méthode de l'oscillateur de Drude pour définir le comportement global du système simulé (exemple des liaisons hydrogènes...) mais nécessite pour cela une plus grande ressource computationnelle.

3. Le modèle des charges fluctuantes²⁸⁴ :

Dans ce contexte, la détermination des énergies électrostatiques provient d'une redistribution des charges atomiques partielles au sein du système (liée à l'application d'un champ électrique) qui engendre des modifications des dipôles moléculaires. Cette redistribution se base sur les propriétés d'électronégativité et de dureté chimique (énergie nécessaire pour un transfert de charge interatomique) tout en conservant la charge globale du système. Cette méthode définit sur chaque atome une charge électrostatique qui fluctue au cours du temps. Une des limites de ce modèle est son incapacité à décrire certains phénomènes de polarisation hors plan pour des systèmes planaires comme l'eau. Il existe aussi un inconvénient supplémentaire de ce modèle qui intervient dans le cas de système monoatomique (ions...) car il ne peut se produire de redistribution de charge pour un unique site porteur d'une charge partielle.

2.1.d. Modèle de solvation en conditions périodiques

En vue de la réalisation d'une simulation de dynamique moléculaire, l'utilisation d'un champ de forces a généralement lieu en phase aqueuse et un solvant doit être ajouté (l'eau en général). Il devient alors important de conserver une bonne densité de solvant. Afin d'appliquer des conditions périodiques, le système que l'on veut étudier est placé dans une 'boîte' de simulation de dimensions suffisamment grandes pour éviter un phénomène de contamination par effet de bord entre les répliques voisines. Cela est d'autant plus important si l'objectif est d'étudier des propriétés basées sur des corrélations à longue portée. En pratique, on utilise la méthode de Somme d'Ewald²⁸⁵ pour calculer les énergies d'interaction de systèmes périodiques (comme les cristaux) et plus particulièrement leurs énergies électrostatiques. Cette méthode est assez coûteuse en temps de calcul, complexité en $N^{3/2}$, N étant le nombre d'atomes.²⁸⁶ D'autres possibilités existent et sont plus efficaces comme les méthodes Particule Mesh Ewald (PME)²⁸⁷, Smooth Particle Mesh Ewald (SPME)²⁸⁸, le Particle-Particle/Particle-Mesh (PPPM)²⁸⁹ et Fast Fourier Poisson (FFP)²⁹⁰ qui permettent de traiter de larges systèmes avec une complexité en $N \log N$. Comme précisé précédemment, le temps de calcul reste l'inconvénient majeur pour de grands systèmes biologiques. Dans le cadre de nos travaux de dynamique moléculaire, l'approche PME a été utilisée.

2.1.e. *Méthode de minimisation et algorithme d'intégration*

Après avoir choisi son système et l'avoir entièrement paramétré en vue de la simulation de DM, une étape importante consiste à minimiser l'énergie totale du système afin de pouvoir relaxer la structure des molécules. Cette étape de minimisation permet d'optimiser la géométrie globale du système afin de déterminer le minimum local sur la surface du potentiel. Ce minimum peut ainsi être obtenu à l'aide de méthodes algorithmiques numériques permettant de changer graduellement les coordonnées de chaque atome du système afin de générer des configurations ayant des niveaux énergétiques de plus en plus bas jusqu'à atteindre ce minimum local²⁹¹. Ces algorithmes peuvent être classés en deux groupes : l'un prenant en compte les dérivées de l'énergie en correspondance avec les coordonnées du système, tandis que le second ne les prend pas en compte. Cette prise en charge des dérivées est importante pour obtenir des détails sur la configuration de la surface d'énergie potentielle de la structure afin de mieux localiser le minimum local. Généralement, la phase de minimisation dans le cadre des DM se réalise sur une molécule de N atomes, avec un jeu de coordonnées cartésiennes où l'énergie à minimiser est fonction de 3N variables. Nous avons opté pour des méthodes basées sur la prise en compte des dérivées (famille des protocoles de minimisation du premier ordre) et appelées « steepest descent » (SD), pour algorithme de plus grande pente et « conjugated gradient » (GC) pour une méthode de gradient conjugué. Dans un tel contexte, les coordonnées atomiques du système sont modifiées itération après itération, au fur et à mesure qu'elles approchent vers le minimum local. Notre choix pour l'étude de protéines s'est porté sur le SD du fait de sa plus grande rapidité de convergence vers le minima.

Vient ensuite l'utilisation d'algorithmes d'intégration pour effectuer les calculs de l'accélération, des vitesses et des coordonnées pour chaque atome à chaque pas de la DM. Pour cela, l'équation (1.1) est intégrée en fonction du temps grâce à l'ensemble des forces ayant été déterminé grâce au champ de forces. L'intégration se fait sur un ensemble de N équations différentielles, uniquement résolues par voie numérique avec la nécessité d'avoir recours à une discrétisation de la variable du temps nécessitant un intégrateur mathématique selon le calcul suivant (1.21) (réalisé à chaque pas de DM) :

$$r_i(t_0) \rightarrow r_i(t_0 + \Delta t) \rightarrow r_i(t_0 + 2\Delta t) \rightarrow \dots \rightarrow r_i(t_0 + n\Delta t) \quad (1.21)$$

où n représente le nombre de pas issu de la DM et Δt représentant le pas de temps discrétisé de ceux-ci. Dans ce contexte, l'intégrateur représente un élément permettant de résoudre

numériquement la deuxième loi de Newton. Il est pour cela important que celui-ci soit à la fois robuste et efficace, d'où la nécessité que l'intégrateur ait les caractéristiques suivantes :

1. Un coût moindre dans le cadre du calcul des forces puisque cela représente l'effort computationnel principal d'une simulation de DM,
2. Une bonne stabilité numérique en fonction de la valeur du pas de temps,
3. Une bonne conservation des différentes énergies ainsi que des moments,
4. Une réversibilité mathématique de l'intégration par le temps.

Une fois ces différentes propriétés réunies, une solution directe se fait par un simple développement de Taylor prenant la formulation suivante :

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + \frac{dr_i(t_0)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 r_i(t_0)}{dt^2} \Delta t^2 + O(\Delta t^3) \quad (1.22)$$

$$\text{avec } v_i = \frac{dr_i(t_0)}{dt} \quad \text{et} \quad \alpha_i = \frac{d^2 r_i(t_0)}{dt^2}$$

où v_i représente la vitesse correspondant à la dérivée première issue de la position r_i et α_i correspond à l'accélération indiquée par la dérivée seconde provenant de la position r_i . Néanmoins, cette méthode de résolution induit une instabilité et une imprécision numérique dans la conservation de l'énergie et des différents moments. Suite à de nombreuses études afin de pallier ce problème, la meilleure solution a été proposée par Loup Verlet en 1967²⁹² à travers un protocole d'addition des termes de Taylor en $+\Delta t$ et $-\Delta t$, où les valeurs Δt impaires s'annulent et transforment (1.22) en la forme ci-dessous :

$$r_i(t_0 + \Delta t) = -r_i(t_0 - \Delta t) + 2r_i(t_0) + \alpha_i(t_0)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (1.23)$$

Dans cette configuration, le calcul des vitesses n'est pas corrélé avec celui des positions mais un calcul simple et direct est facilement calculable :

$$v_i(t_0) = \frac{1}{2\Delta t} [r_i(t_0 + \Delta t) - r_i(t_0 - \Delta t)] \quad (1.24)$$

Néanmoins, deux autres versions de l'algorithme de Verlet ont été proposées :

- Le leap-frog Verlet²⁹³ :

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + v_i\left(t_0 + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (1.25)$$

$$v_i\left(t_0 + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t_0 - \frac{\Delta t}{2}\right) + \alpha_i(t_0)\Delta t \quad (1.26)$$

- Le Velocity Verlet²⁹⁴ :

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + v_i(t_0)\Delta t + \frac{1}{2}\alpha_i(t_0)\Delta t^2 \quad (1.27)$$

$$v_i(t_0 + \Delta t) = v_i(t_0) + \frac{1}{2}[\alpha_i(t_0) + \alpha_i(t_0 + \Delta t)]\Delta t \quad (1.28)$$

Chacune d'elles a comme propriétés d'être relativement simple mais aussi de faire preuve de

robustesse, précision et d'être réversibles en temps. D'autre part, pour résoudre l'équation de Newton, d'autres familles d'intégrateurs sont utilisables avec un protocole utilisant un couple prédicteur-correcteur. Ceux-ci ont l'avantage de la précision par rapport aux intégrateurs de Verlet ou autres équivalents concernant un faible pas de temps. Néanmoins un défaut reste, celui de mal conserver les valeurs énergétiques obtenues lors de longues simulations dues à l'absence de propriétés réversibles en temps, un problème majeur pour de plus grands systèmes²⁹⁵.

Dans le cadre de cette résolution de la seconde loi de Newton, un autre paramètre majeur se localise dans le choix de la taille du pas de temps. Il ne doit être ni trop faible ni trop grand. En effet, l'algorithme de Verlet permet par exemple la détermination par le calcul à la fois des vitesses et des positions de chaque atome du système simulé pour chaque temps ($t + \Delta t$). Si Δt serait trop petit, le temps global pour chaque calcul d'une DM augmenterait fortement. Dans le cas inverse avec un pas de temps grand, des fluctuations énergétiques seraient observées avec une augmentation de l'instabilité du système, ce qui entraînerait une perte graduelle de la précision et de la validité de la simulation. Dans un contexte où on considère les molécules au sein du système comme flexibles, le pas de temps est généralement fixé à une valeur faible ($\Delta t = 0.5/1$ fs). En conséquence, cet intervalle de temps permet ainsi d'égaliser l'ordre de grandeur des vibrations des liaisons C-H. Dans le but de pouvoir augmenter considérablement ce pas de temps, pour un maximum de 2 à 2.5 fs, l'utilisation d'algorithmes de type SHAKE ou RATTLE imposés sur ces types de liaison (i.e. pour les rigidifier) est possible²⁹⁶⁻²⁹⁷. Cependant, il est crucial de souligner que la sélection du pas de temps ne doit pas avoir d'interférence sur le mécanisme de conservation de l'énergie au sein du système étudié. Afin de s'en assurer pour pouvoir vérifier la conformité de la DM, deux expressions mathématiques (1.29/1.30) permettent la détermination des fluctuations énergétiques²⁹⁸ selon ces deux équations :

$$|\Delta E| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{E_i - E_0}{E_0} \right| \leq 0.003 \quad (1.29)$$

où E_0 représente l'énergie totale à l'état initiale du système et N indiquant le nombre de pas de temps en cours lors de la dynamique. Vient ensuite la seconde équation de la forme suivante :

$$\Delta E^{rms} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (E_i - \langle E_i \rangle)^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (K_i - \langle K_i \rangle)^2}} \leq 0.01 \quad (1.30)$$

où ici K représente l'énergie cinétique. À noter également que dans un contexte de long temps de simulation, il n'est pas possible de déterminer une solution exacte de cette équation de Newton. Une des causes principales provient de l'extrême sensibilité du choix des conditions initiales de la DM, liée à un mécanisme dénommé instabilité de Lyapunov²⁹⁹. Dans ce contexte, on suppose que deux trajectoires partant du même point de départ possèdent des moments cinétiques différents à cause d'une faible perturbation initiale ε de l'une d'entre elles. Ainsi cette instabilité dite de Lyapunov indique que sur des temps très courts, ces deux simulations sont relativement proches mais dans le cas inverse pour des durées plus longues, celles-ci s'éloignent graduellement jusqu'à un point de non-corrélation où la prédiction de la trajectoire n'est plus possible.

2.1.f. Ensemble thermodynamique

Dans un contexte de résolution de la seconde loi de Newton, l'intégration par défaut se fait avec les conditions suivantes :

- Avoir un nombre de particules N fixé et constant,
- En considérant un volume optimal constant V de la boîte de simulation pour éviter de possibles effets de bord,
- Conserver à un niveau constant l'énergie totale E du système.

L'addition de ces précédentes caractéristiques correspond à l'ensemble thermodynamique microcanonique, appelé plus généralement NVE et qui correspond généralement à l'ensemble thermodynamique naturel utilisé en DM d'un système dit conservatif car caractérisé par une énergie conservée au cours du temps. Néanmoins, l'utilisation de ce type d'ensemble peut être affectée par certaines erreurs d'intégrations, par d'importantes variations au sein du système mais aussi de potentielles déviations énergétiques provoquées par l'utilisation d'un paramètre de cutoff etc... Afin de pouvoir parer à ces difficultés, l'utilisation d'autres types d'ensembles thermodynamiques est possible pour pouvoir travailler dans des conditions de dynamique différentes. Un tel besoin peut être rendu nécessaire du fait qu'il est bien plus aisé de faire des analyses comparatives entre différents résultats de simulation d'un système lorsque ces différentes variables (température, pression...) sont régulées et ainsi pouvoir se rapprocher au mieux des observations issues d'une validation par l'expérimentation. Parmi ces autres ensembles, les deux ensembles les plus utilisés aujourd'hui en DM classique sont :

1. **Ensemble NVT** : ce modèle permet une conservation du nombre de particules N , du volume total V de la boîte de simulation et ainsi que de la température T du système. Étant donné le lien entre la température d'un système et son énergie cinétique (K), une méthode assez simple pour réguler cette température tout au long de la simulation consiste à changer les vitesses pour chacun des atomes du système et pour chaque pas de temps. Cette méthodologie se nomme « velocity scaling »²³⁶. Elle possède cependant l'inconvénient de ne pas permettre d'échantillonner de façon réelle le « vrai » ensemble canonique NVT dû à la possibilité d'entraîner l'apparition d'effets non-physiques. De nombreuses méthodes plus efficaces sont disponibles afin de permettre un meilleur contrôle de la température en effectuant un couplage du système avec un « thermostat ». Voici ici quelques exemples de thermostats utilisables :
 - (a) Le thermostat de Berendsen³⁰⁰ offre la possibilité de jouer sur la seconde équation de Newton en introduisant une force de friction pour limiter les perturbations. Cette force dépend d'un paramètre qui est proportionnel à l'écart de température entre la valeur initiale du système et celle voulue. Par exemple, si on considère que la valeur initiale est supérieure à la température cible, cette friction joue le rôle de ralentisseur sur chaque particule visant ainsi à réduire la température globale du système,
 - (b) Un thermostat dit d'Andersen³⁰¹ qui régule de façon stochastique les vitesses des différents atomes constitutifs du système par l'utilisation d'un modèle de distribution gaussienne type Maxwell-Boltzmann. Un tel modèle introduit une déviation standard proportionnelle à la température du système et qui permet au final de maintenir cette dernière constante en permettant les échanges d'énergie entre chaque particule avec son environnement,
 - (c) Le thermostat de Nose-Hoover^{302 303 304} où l'on considère ici un thermostat comme une partie intégrante du système de la DM, avec l'ajout d'une variable dite artificielle et d'une masse fictive au système en condition de base. Une de ces limites est que ce système requiert l'ajout de degré de liberté supplémentaire (nombre de variables qui caractérise le mouvement des atomes selon différentes catégories de translation, de rotation autour du centre de masse, de vibration de liaison et de distribution des électrons), ce qui alourdit encore légèrement le coût computationnel d'une simulation,

- (d) Le thermostat de Bussi³⁰⁵ est un modèle hybride qui combine à la fois des caractéristiques du thermostat de Berendsen et de ceux de Nose-Hoover. En effet, il permet d'une part de réévaluer les vitesses de chacun des atomes du système, comme le modèle Berendsen, et aussi l'ajout d'un facteur de friction qui dépend du temps pour réduire les inconvénients de forces de gênes. Et comme pour le modèle de Nose-Hoover, l'utilisation d'un autre degré de liberté est faite pour jouer le rôle de bain thermique et ainsi contrôler la température. Cependant, cela entraîne néanmoins une augmentation en coût de calcul en raison de cet ajout,
- (e) Et enfin un thermostat de Langevin³⁰⁶, l'une des approches les plus utilisées actuellement en DM consistant à mettre en œuvre un paramètre de force de friction mais aussi un bruit blanc stochastique sur l'ensemble des particules du système. Ce bruit blanc réfère à une force aléatoire de densité constante pour chaque fréquence afin de modéliser précisément les échanges énergétiques entre le système et le milieu externe intervenant au sein d'une modélisation de systèmes dynamiques.
2. **Ensemble NPT** : Dans le cas de ce modèle, le nombre d'atomes N , mais aussi la pression P ainsi que la température T du système sont maintenus constants. Dans le cas de la pression, la méthode de contrôle se fait avec une approche similaire à celle précisée plus haut pour la température. Il est donc mis en place, en plus du thermostat, un système de « barostat » pour le contrôle direct de la pression du système global à travers une action précise sur son volume V . Du fait que le volume d'un système peut légèrement varier dans chacune des directions possibles, cet ensemble se rapproche le plus des conditions expérimentales. De la même façon, différents types de barostat existent :
- (a) Le barostat de Berendsen³⁰⁷ par utilisation d'une force de « barostat » au sein de la boîte de simulation et, dans le même principe que le thermostat de Berendsen, que la valeur y soit proportionnelle à la différence entre pression initiale et pression voulue. Néanmoins, l'un des défauts majeurs de cette méthode est une imprécision dans l'échantillonnage de l'ensemble NPT et c'est pour cela que son utilisation est bien souvent limitée à la phase d'équilibrage et non à la phase de production dans une dynamique,
- (b) La méthode de Parrinello-Rahman³⁰⁸, qui est une extension de la méthode de pression constante d'Andersen, afin de permettre une modulation de la taille et de

la forme de la boîte de simulation mais aussi plus tardivement pour prendre en compte les phénomènes de stress externe au modèle. Néanmoins, son utilisation relève plus des modèles en phase solide qu'en phase liquide, et l'un de ces défauts entraîne une fluctuation incontrôlée du volume et dont la fréquence est liée à la masse,

- (c) L'algorithme Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein (MTTK)³⁰⁹ découle d'une étude pour résoudre un problème lié à la méthode de Nose-Hoover. En effet, ce modèle permet d'utiliser l'équation de mouvement sur des modèles plus larges avec une propriété de réversibilité dans le temps qui permet d'intégrer cette équation,
- (d) Le piston de Langevin³¹⁰ dont les caractéristiques se basent sur le thermostat du même nom. De plus, l'équation de mouvement contient des ressemblances avec la méthode MTTK mais rajoute à la fois une force stochastique et un paramètre de friction.

2.1.g. Logiciels Tinker/Tinker-HP

Tout au long du projet de cette thèse, la totalité des simulations a été réalisée en utilisant le champ de forces polarisable AMOEBA et à l'aide du logiciel Tinker-HP. Ce programme a été développé au sein de notre Laboratoire de Chimie Théorique (LCT) par mon co-directeur de thèse, le Professeur Jean-Philip PIQUEMAL et l'ingénieur de recherche Louis LAGARDERE. Étant un membre de la famille importante des logiciels de DM (**Tableau 3**), Tinker-HP est aussi l'un des seuls, avec OPENMM, à pouvoir se servir de façon optimale des champs de forces polarisables de type AMOEBA.

Nom	Date de création	Principaux champs de forces
AMBER ³¹¹	1981	AMBER
CHARMM ³¹²	1983	CHARMM, DRUDE
GROMACS ³¹³	1995	GROMOS, AMBER
Tinker	2004	AMOEBA, SIBFA, HIPPO
NAMD ³¹⁴	2005	CHARMM, DRUDE, AMBER
OPENMM ³¹⁵	2013	AMOEBA
Tinker-HP ³¹⁶	2018	AMOEBA

Tableau 3 : Tableau comparatif des programmes principaux de DM corrélés avec leur champs de forces majoritaires.

Ayant pour origine le code historique Tinker, logiciel développé par Jay PONDER et son équipe à Saint Louis aux États-Unis³¹⁷, Tinker-HP constitue une évolution de ce dernier qui permet d'améliorer les calculs de DM classiques en utilisant les champs de forces polarisables. Tinker-HP conserve la simplicité du code Tinker et fonctionne à la fois sur des plateformes de calcul CPUs mais aussi plus récemment avec les GPUs. Chacun de ces sous-programmes a pour fonction majeure de simuler le mouvement d'une structure dans un modèle de mécanique classique. Plusieurs aspects spécifiques du programme Tinker-HP sont précisés ici :

1. Le protocole de décomposition spatiale tridimensionnelle

Dans le domaine de la simulation de DM, ce processus de décomposition spatiale 3D indique le procédé qui découpe la région de l'espace simulée en des sous-régions plus restreintes de tailles équivalentes (**Figure 20**) et qui permet d'attribuer chacun de ces nouveaux espaces à un cœur de calcul. La répartition de la charge de calcul, qui garantit qu'un nombre précis de sous-régions soit assigné à chaque processeur, est l'un des avantages de cette méthodologie sur la communication entre processeurs. Cela est particulièrement important dans le contexte de la croissance rapide du système de départ.

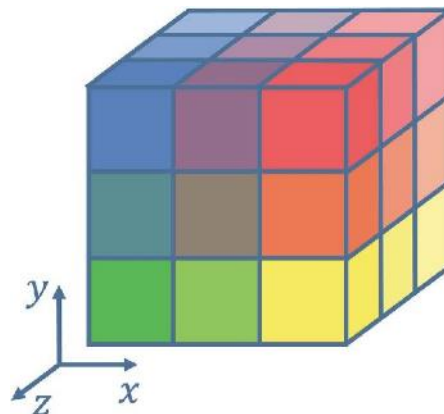


Figure 20 : Schématisation d'un possible protocole de décomposition spatiale tridimensionnelle (extrait de l'article de Lagardère *et al.*³¹⁸).

2. L'algorithme de polarisation

L'inclusion de la polarisation constitue l'aspect critique dans le coût des simulations de DM polarisables, il est donc crucial d'avoir différents algorithmes permettant le calcul du champ électrique et d'autres quantités d'importance. Parmi les méthodes possibles, on retrouve

toujours la sommation d'Ewald³¹⁹ pour le calcul des interactions en conditions périodiques. Cette sommation est souvent utilisée sous sa forme Particle Mesh Ewald²⁸⁷ et couplée à un groupe d'algorithmes que sont les solveurs de Krylov tel que le gradient conjugué (GC), méthode itérative pour résoudre un système d'équations linéaires. Des travaux du LCT ont considérablement contribué à améliorer cet algorithme par un mécanisme de troncation, d'où son appellation de GC tronqué (TCG) et permis ainsi d'accélérer en matière de temps de calcul par rapport au GC de base par une prise en compte des contraintes à chaque itération³²⁰.

3. Architecture de calcul de Tinker-HP

Le code que possède le logiciel Tinker-HP lui confère la capacité d'être utilisable sur divers types d'infrastructures informatiques pouvant être utilisé sur les ordinateurs en connexion locale du laboratoire jusqu'aux imposantes machines de centres de calcul nationaux disposant de plusieurs milliers de cœurs de type CPU dont font partie le calculateur Jean Zay de GENCI (Grand Équipement National de Calcul Intensif) ou encore Irène Joliot Curie du TGCC (Très Grand Centre de calcul du CEA). En parallèle, le code parallélisé de Tinker-HP a aussi été adapté pour une utilisation en GPU afin de diminuer fortement le temps de calcul CPU (accélération de l'ordre d'un facteur 10). En effet, de nombreux facteurs dont la taille, le nombre de cœurs ou la bande passante de la mémoire ont un impact significatif sur les performances des microprocesseurs, comme les CPU. Cependant, à chaque nouvelle génération, l'architecture et la technologie de la mémoire sont nettement en retard par rapport aux CPU, ralentissant considérablement leurs performances générales. Ces travaux de portage du calcul GPU en Tinker-HP ont pu être effectués en grande majorité par Olivier ADJOUA et Louis LAGARDERE pour profiter des nombreux avantages du calcul GPU en termes de faible coût et de haute efficacité de calcul pour des systèmes plus complexes, ainsi que pour l'utilisation du champ de forces polarisable AMOEBA³¹⁶.

2.2. Protocole général d'une dynamique moléculaire

L'ensemble des étapes nécessaires à la mise en place des systèmes et de leurs conditions de simulation par la DM est discuté dans ce chapitre.

2.2.a. Construction du système et modèle initial

Afin de réaliser les différentes simulations de DM, les structures de départ ont été sélectionnées sur le site de la Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) et proviennent

d'études expérimentales soit en cristallographie par diffraction rayons-X, par études de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou par Cryo-électromicroscopie (CryoEM). Par la suite vient la nécessité de vérifier l'intégrité du système en éliminant de potentiels ligands ou atomes indésirables à l'étude, puis de rajouter les hydrogènes manquants. Dans le but de réaliser une simulation dans un environnement proche des conditions réelles, des conditions périodiques aux limites sont utilisées. Dans ce cas, il faut choisir une boîte de simulation aux dimensions fixes et compatibles avec la taille de la protéine d'intérêt à solvater. Dans le contexte de cette thèse, il a été choisi de réaliser l'ensemble des simulations en prenant en compte une modélisation du solvant explicite dans le but de représenter des dynamiques les plus réalistes possible par rapport au contexte physiologique. VMD est utilisé pour générer ce cube d'eau (**Figure 21**) puis Tinker pour intégrer le système à simuler dans cette boîte. S'ensuit l'étape cruciale de la neutralisation des charges du système si celui-ci possède une charge électrostatique totale différente de 0. Cette démarche est indispensable pour la

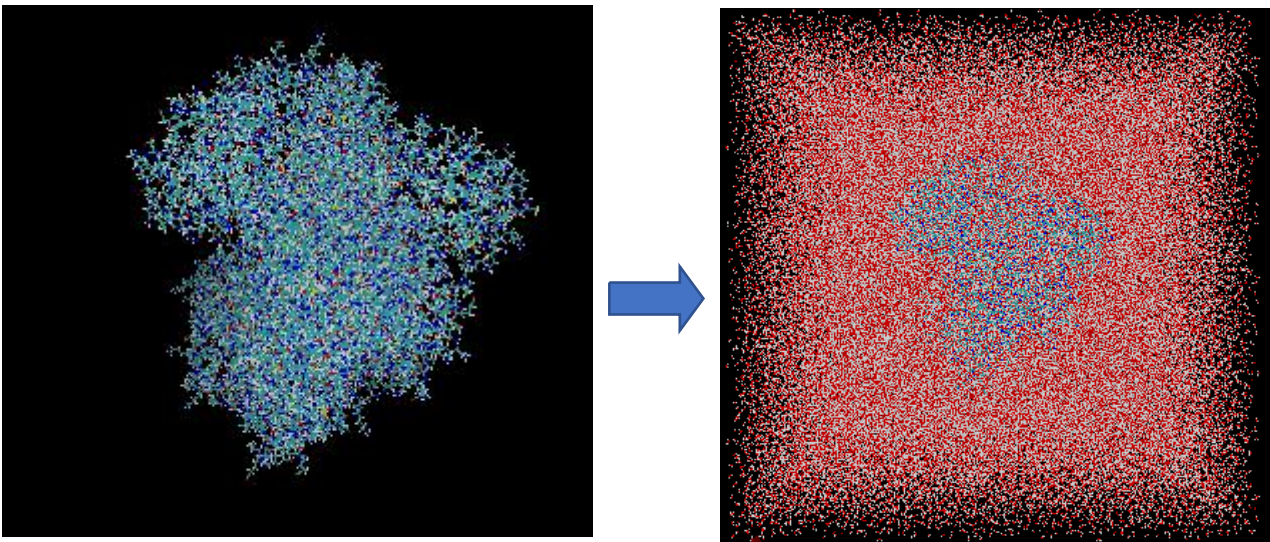


Figure 21 : Visualisation du processus de solvation d'un système PKM. Dans cet exemple, la protéine PKM1 (PDB : 3SRF) est utilisée avec d'un côté le système initial (à gauche) puis ce même système après un processus de solvation (à droite).

méthodologie PME permettant le calcul des interactions électrostatiques car elle nécessite un environnement électrostatique globalement neutre afin d'éviter des divergences numériques qui pourraient porter atteinte à la stabilité de la simulation. Dans ce but, il est nécessaire d'ajouter des ions (généralement les ions sodium Na^+ ou chlorure Cl^-). Il est cependant important de préciser que nombres de systèmes simulés pour cette thèse contiennent des ligands non paramétrés dans le champ de forces AMOEBA.

2.2.b. Paramétrisation des ligands manquants clés

Dans l'optique de simuler les systèmes PKM1/PKM2, au centre de cette thèse, certaines expériences numériques impliquent l'association de PKM2 avec quelques ligands physiologiques (FBP) ou pharmacologiques (TEPP-46). Ces ligands de nature non protéique ne sont pas présents de manière standard dans le champ de forces AMOEBA utilisé et il est donc nécessaire de définir leurs paramètres.

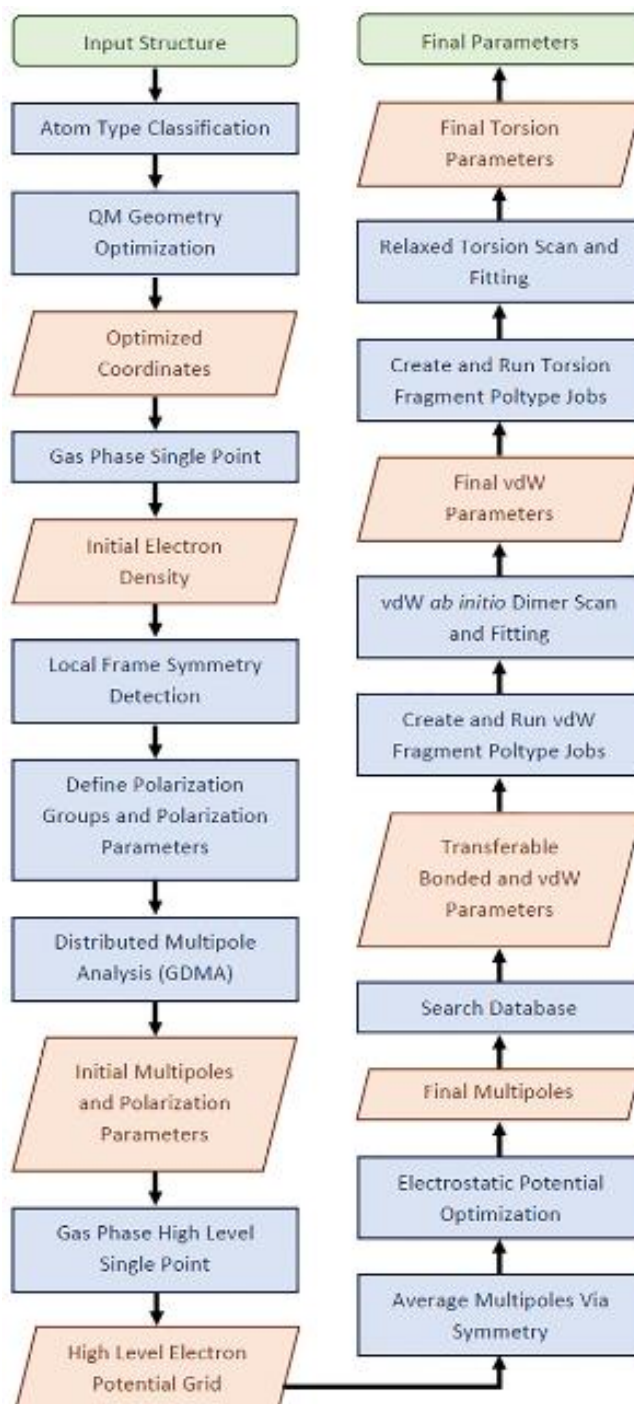


Figure 22 : Découpage des différentes étapes de la paramétrisation Polype pour le champ de forces AMOEBA. Ici les étapes en bleu correspondent à des actions qui sont faites par Polype et les indications en rouge montrent différents outputs intermédiaires pendant la paramétrisation de la molécule (tirée de l'étude Walker²⁷²).

Pour cela, nous avons utilisé le logiciel Poltype. Cet outil, développé par l'équipe de Pengyu REN, Université du Texas à Austin³²¹, permet de générer les différents paramètres de forces AMOEBA d'une petite molécule à travers une procédure semi-automatique qui combine des calculs QM et MM réalisés en plusieurs grandes étapes (**Figure 21**) :

1. Une première étape de calcul QM sur le petit système pour déterminer avec précision les propriétés électroniques (énergie, densité électronique...). Pour cela, plusieurs logiciels sont utilisés dans Poltype comme Gaussian ou Psi4³²² pour réaliser les premiers calculs de chimie quantique (optimisation en MP2/6-31G),
2. Une étape de génération des multipôles atomiques à l'aide du logiciel GDMA qui nécessite un calcul QM MP2/6-311G³²³. Vient ensuite une étape de refitting de ces premières valeurs de multipôles pour mieux reproduire le potentiel électrostatique de la molécule obtenu en MP2/aug-cc-pVTZ par Gaussian ou Psi4³²⁴,

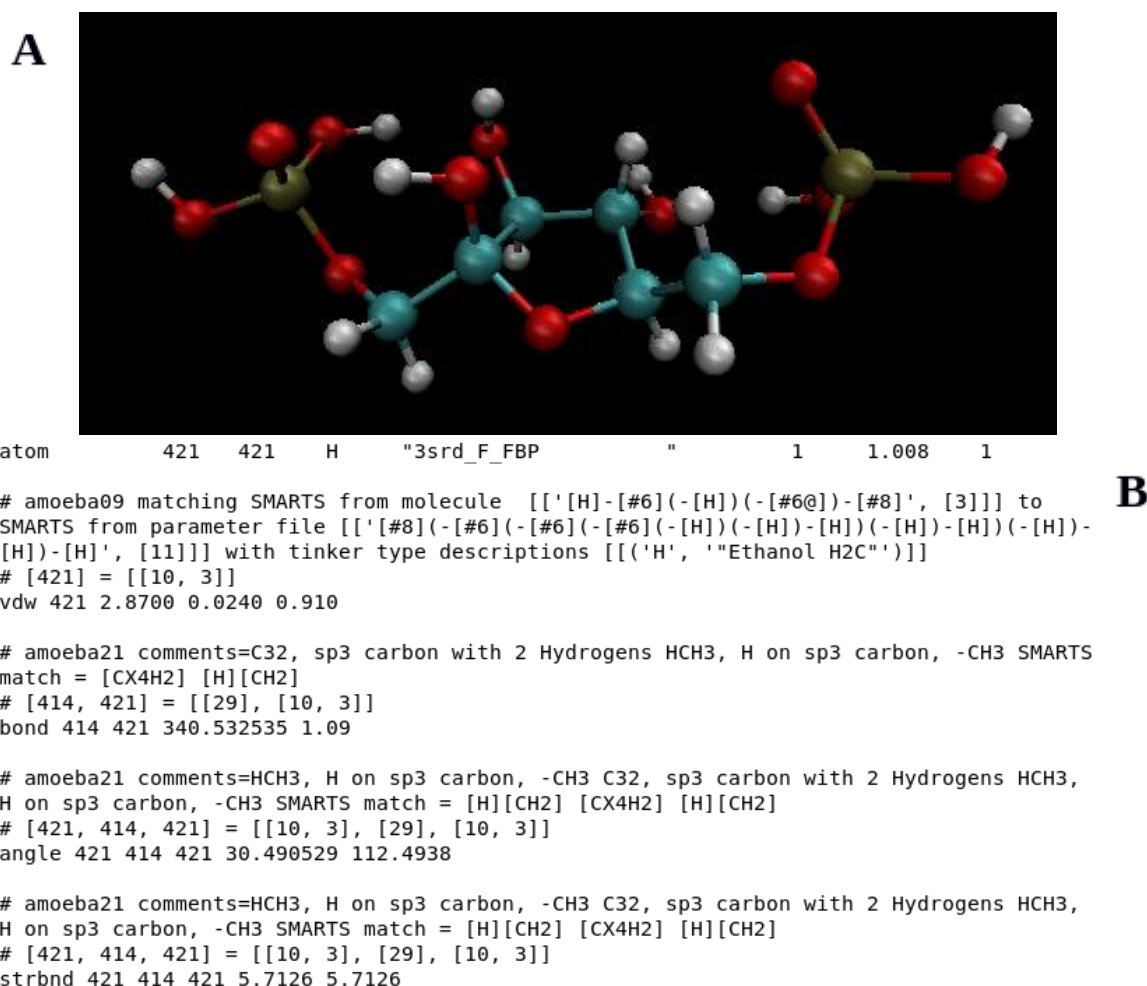


Figure 23 : Exemple du résultat final de la paramétrisation Poltype. (A) Représentation moléculaire du FBP (format CPK) à l'aide de l'outil de visualisation VMD, (B) Quelques exemples des paramètres obtenus pour le ligand FBP, ici pour un atome d'hydrogène à « atom type » 421, après la paramétrisation Poltype.

3. Recherche sur la base de données SMARTS (Simplified Molecular Input Line Entry

- System) pour déterminer un maximum de paramètres sur les liaisons covalentes et de vdW (énergie de torsion, angle, liaison...)³²⁵ afin de cibler les sous-structures spécifiques au sein de la molécule ayant besoin d'une paramétrisation nouvelle et ainsi générer les paramètres du champ de forces (polarisabilité, valence, torsion...),
4. Par la suite et dans le cas des molécules complexes ayant une taille plus importante (comme c'est le cas des ligands FBP & TEPP), Poltype dispose d'un protocole de fragmentation pour diviser de tels systèmes en plusieurs courts fragments dont le coût computationnel est plus gérable pour la détermination de nombreux paramètres (vdW, torsion...) par optimisation QM.
 5. Phase d'optimisation des paramètres vdW ayant été générés pour correctement prédire des interactions moléculaires. Un calcul ab initio sur un dimère est mise en place pour comparer les énergies d'interaction de la molécule cible avec une molécule d'eau qui sert de sonde au calcul. L'évaluation de la qualité de cette étape est réalisée à l'aide d'une comparaison Root Mean Square Error (RMSE) et RMSE relatif avec une tolérance de 1,6 et 0,2 respectivement,
 6. Dernière phase de l'affinage des paramètres, cette fois pour les paramètres de torsion très sensibles à des changements dans l'environnement chimique proche. Pour cela, chaque structure QM est minimisée et l'énergie totale de celle-ci est soumise à Tinker (commande ANALYZE) puis à Psi4 pour optimisation et détermination des énergies QM. Le résultat final (exemple FBP, **Figure 23**) produit ainsi un système minimisé où chaque atome est paramétré au niveau du champ de forces AMOEBA avec son association à un « atom type » qui relie l'atome aux paramètres générés (vdW, torsion...) dans le champ de forces.

2.2.c. Minimisation

Le système doit passer par une phase de minimisation de son énergie totale pour réorganiser de façon plus réaliste la distribution des molécules d'eau de la solvation explicite mais aussi des ions placés autour du système moléculaire étudié. Cette étape cruciale permet de diminuer le risque d'apparition d'artéfact indésirable pendant la simulation de DM.

2.2.d. Dynamique initiale et Stratégie d'échantillonnage adaptative

Une fois le système minimisé, la production des dynamiques peut être mise en place. Le contexte utilisé est celui de l'ensemble NPT décrit précédemment (nombre d'atomes,

pression et température constants). Ces calculs ont pu ainsi être réalisés sur des cartes GPUs, à l'aide du module GPU de Tinker-HP.

La stratégie de calcul réalisée pour chacun des systèmes se base aussi sur un protocole d'échantillonnage adaptatif dit « non supervisé ». Ces dernières années, ce protocole a permis d'amplifier l'exploration des surfaces de potentiel de systèmes complexes, comme les protéines³²⁶⁻³²⁷. Une telle approche se base sur la mise en place de plusieurs itérations de simulations de DM indépendantes à partir des dynamiques des itérations précédentes et se fait entièrement en automatique et celui-ci n'est pas restreint à un système particulier et est utilisable sur tout centre de calcul compatible avec le logiciel Tinker-HP³¹⁸ ou n'importe quel logiciel analogue. En conséquence, les simulations réalisées lors de cette thèse ont été réalisées par itérations comme indiqué. Après la finalisation des DM de l'itération précédente, un échantillon de structures ayant été parcouru pendant cette dynamique est sélectionné parmi l'ensemble des configurations obtenues dans les itérations précédentes et qui serviront chacune de point initial pour une nouvelle itération de simulations de DM indépendantes (**Figure 24**) permettant ainsi d'agrandir la quantité de configuration possible de notre système à chaque nouvelle itération, résultant ainsi à une extension de l'exploration conformationnelle du modèle étudié. Afin d'expliquer de façon plus concrète, à partir d'un premier jeu de configuration, la protéine est alignée sur toutes ces configurations en prenant comme base les

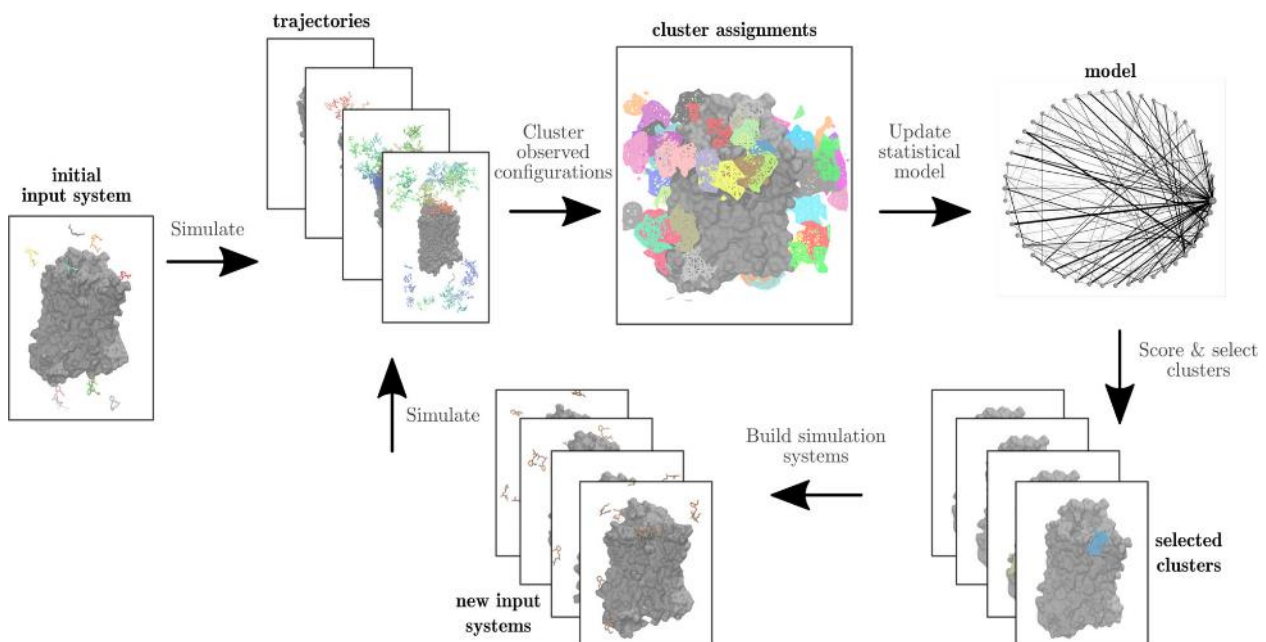


Figure 24 : Représentation schématique du protocole de l'échantillonnage adaptatif³²⁸

atomes du squelette de la structure de référence. Viens ensuite l'utilisation d'un algorithme de clusterisation par analyse de la composante principale (PCA, voir détail au prochain

chapitre) sur chacun des atomes du système en considérant les $n = 4$ modes principaux (ici x , y , z et k) pour pouvoir ainsi réaliser une projection orthogonale sur ces n modes, en sachant que ces modes sont choisis par rapport à leur contribution dans la variance globale d'un jeu de données. Une telle projection orthogonale permet de réduire la complexité d'un jeu de données tout en conservant le maximum d'informations. Pour cela, et à partir des dernières itérations, toutes les valeurs sont explorées pour améliorer l'échantillonnage des données et ainsi en ressortir de nouvelles structures initiales. Cette méthodologie à la spécificité d'apposer un critère pénalisant des régions ayant une plus forte concentration dans l'ensemble des itérations précédentes sauf que ce biais ajouté se fait par une phase sélective entre chaque itération plutôt que sur l'ensemble de la trajectoire. Cette particularité a l'avantage de s'affranchir du choix d'une variable initiale en début de programme pour améliorer l'automatisation de ce processus d'échantillonnage adaptatif « non supervisé ».

L'ensemble de ce processus fait partie d'un ensemble d'algorithmes basé sur le comptage qui permet d'exploiter le nombre de passages dans chacun des états visités pour chaque itération qui précède pour pouvoir ensuite faire le choix du point de relance des prochaines trajectoires. Ces modèles présentent un avantage certain dans le but purement exploratoire pour optimiser et augmenter la zone d'exploration voulue sur un système, mais il est toujours possible d'affiner ces processus avec des algorithmes mieux guidés³²⁹. De plus, chaque état n'est pas défini avec un algorithme de clustering sur des états structuraux déjà explorés mais par cette projection orthogonale des composantes principales par PCA sur toutes les données des itérations précédentes. En plus de cette projection des données, lorsque le nombre d'itérations devient important, il se produit un biais statistique dans la distribution des configurations obtenues qui ne converge pas vers une forme canonique. Ainsi la détermination des valeurs thermodynamiques nécessite la prise en compte de ce biais pour en déterminer un score se basant sur le rapport de probabilité d'obtenir une conformation dans une simulation biaisée et une simulation débiaisée (correspondant à des conditions initiales choisies uniformément sur chaque conformation disponible de probabilité équivalente). Ce point reste important afin que le temps total de la simulation de DM puisse être utilisable dans le cas d'étude statistique débiaisée et donc mieux explicable. Dans son intégralité, cette procédure est « non supervisée » mais aussi assez peu coûteuse en temps de calcul tout en pouvant être utilisée dans Tinker-HP par processus automatique.

2.3. Outil d'analyse

Dans l'optique de l'analyse d'un jeu de données issue d'une simulation de DM, il devient nécessaire d'utiliser des outils de type PCA pour effectuer une clusterisation des structures. Cette méthodologie se base sur une dualité géométrique et statistique pour identifier la relation potentielle d'un jeu de données pour en ressortir une représentation plus simple d'analyse. L'approche géométrique représente ainsi les variables dans un nouvel espace avec les nouvelles variables appelées « composantes principales » (CP) tandis que la partie statistique porte sur la recherche sur des axes indépendants qui permettent de mieux prendre en compte la variance des données³³⁰. De façon générale, le résultat d'une PCA est réalisé par projection des données sur un espace 2D sur un nombre plus ou moins conséquent des premières CP (souvent les deux premières comme axes) pour permettre d'en ressortir la plus grande dispersion de l'ensemble des données dans ce nouveau plan défini. En pratique, cet algorithme consiste à réduire la dimensionnalité (décrit par le nombre de CP choisi) d'un système pour en ressortir les composantes majeures présentant son dynamisme (= sa variance)³³¹.

Pour approfondir la compréhension d'un système plus complexe ainsi que des fluctuations possibles de ses conformations, l'analyse des trajectoires est majeure pour l'exploitation des résultats de calcul pouvant ainsi permettre d'en ressortir de nombreuses informations structurales (Root Mean Square Deviation/Root Mean Square Fluctuation (RMSD/RMSF)...) mais aussi sur les propriétés physico-chimiques (liaisons hydrogènes, énergies libres...). L'interprétation de ces données permet ainsi de faire des relations de causalité entre la structure, la dynamique, la stabilité et l'activité d'un composé biologique par exemple comme pour le cas d'une protéine ou d'un acide nucléique. D'autres natures d'analyse sont exploitables se basant sur l'étude de corrélation entre des mouvements de différentes sections d'une protéine ou sur le potentiel électrostatique d'un ligand au niveau de sa poche de fixation.

Chapitre 3. Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse consiste à construire des modèles à haute résolution des différentes isoformes issues du gène *PKM* et de réaliser des simulations sur des temps longs afin de faire une analyse structurale comparative entre les différentes possibilités structurales, principalement PKM2 mais aussi PKM1. Cet objectif s'insère dans une perspective plus globale de la recherche prospective de nouvelles poches cryptiques capables d'interagir avec

de nouveaux candidats médicament afin de moduler l'expression de PKM2. Durant ce projet doctoral, nous nous sommes attardés sur l'étude de chaque état oligomérique possible de PKM2 en lien avec leur importance dans de nombreux contextes pathologiques par comparaison avec celui de PKM1 uniquement disponible naturellement sous son état tétramérique. De plus, l'étude s'attarde aussi sur l'impact structural de la fixation du ligand naturel FBP sur PKM2 mais aussi en s'intéressant au TEPP-46 qui est un des ligands pharmacologiques à actions activatrices de celle-ci. En pratique, ces systèmes présentent un intérêt majeur dans la conception de nouvelles molécules pour la mise en place de thérapie antitumorale mais aussi antivirale à cause de l'implication majeure de chacune de ces protéines dans les processus pathologiques du cancer et de la subversion métabolique virale. En effet, ce projet a pour origine une étude provenant d'une des équipes à l'origine de mon projet au sein du Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA) concernant le rôle émergent de PKM2 dans la prolifération virale. Cet article montre notamment que l'inhibition de l'expression de l'isoforme M2 par la protéine HMGB1, provenant d'une interaction directe entre chacun d'eux²⁰⁴, résulte en une réduction de la production en ADN viral venant de la réaction du virus Epstein-Barr (EBV) mais aussi dans la prolifération de lignée de lymphomes de Burkitt étant infectée par ce virus³³². Dans cette optique, il est donc intéressant de déterminer de nouvelles stratégies de ciblage pour la pharmacologie contre PKM2 en faisant attention à ne pas cibler de façon non spécifique son isoforme PKM1.

Afin de parvenir à cet objectif, une codirection a été choisie entre l'équipe « Biologie et thérapeutiques du cancer » du laboratoire du Centre de Recherche Saint-Antoine à laquelle appartient mon premier directeur de thèse le Professeur Vincent MARECHAL avec l'équipe du Laboratoire de Chimie Théorique dirigé par mon second directeur le Professeur Jean-Philip PIQUEMAL pour pouvoir profiter des percées technologiques tant du côté du niveau computationnel que de celui des outils d'analyse pour l'exploration des dynamiques générées à l'aide du champ de forces AMOEBA.

Associé à cela, nous utiliserons un protocole d'échantillonnage adaptatif non supervisé développé au sein du LCT se basant sur l'extraction des données issues de différentes simulations de dynamiques moléculaires, ceci dans un but d'exploration plus vaste de structures et d'états possibles pouvant représenter les protéines PKM1/PKM2. Il s'agira donc par la suite de valider le choix de chacune de ces conditions choisies pour les isoformes M1/M2 ainsi que les paramètres utilisés pour le champ de forces polarisable AMOEBA. Pour

cela nous étudierons chacune des conditions en effectuant une analyse globale sur l'entièreté de leurs chaînes protéiques par des analyses des premières PCA et des informations sur leurs flexibilités structurales (RMSD & rayon de gyration). Ensuite, des régions plus ciblées seront étudiées au niveau structural comme, par exemple, au niveau du site actif de ces protéines mais aussi sur la région du site de fixation du ligand FBP dont l'intégrité et la spécificité varient dans le contexte de PKM1/PKM2. Enfin, une étude de l'effet de la fixation du TEPP-46 sur le tétramère de PKM2 sera étudiée notamment par comparaison avec les formes non liées et liée à FBP de PKM2 en connaissance de l'effet activateur « FBP-like » du TEPP-46 précédemment décrit.

Modélisation à haute résolution de la dynamique structurelle de PKM1/PKM2

Chapitre 1. Préparation des simulations

Choix des conditions initiales et paramétrisation des ligands d'intérêts

Dans l'optique de la mise en place d'une simulation en échantillonnage adaptatif, le choix des conditions initiales est primordial pour une simulation de DM utilisant un pFF. Dans notre cas pour l'étude de la dynamique de PKM2, différentes structures ont été choisies pour évaluer la structuration de celle-ci en conditions physiologiques ou pathologiques. Par comparaison, seulement une seule structure de PKM1 correspondant à sa forme tétramérique (PDB code : *3SRF*) a pu être déterminée mais en concordance avec les données expérimentales par rapport à son activité principalement sous cet état. Pour en revenir à notre étude de l'isoforme PKM2, quatre structures ont été choisies afin de parcourir chacun de ses états oligomériques du monomère (PDB code : *IZJH*) en passant par le dimère (PDB code : *6B6U*) pour se finir sur son état tétramérique (PDB code : *3SRH*). Ensuite pour caractériser l'impact de l'allostérie subi par PKM2, une structure holo du tétramère de PKM2 liée au FBP a aussi été choisie (PDB code : *3SRH*). De plus, dans un souci de fidélité pour mieux représenter la dynamique de ces protéines, le pH physiologique pour chacune des conditions a été choisi à une valeur de **7.5** en cohérence avec une étude expérimentale en vue d'analyser le pH optimal de l'activité enzymatique de PKM2 dans le contexte du métabolisme cancéreux⁹³.

En parallèle à ces choix stratégiques des différentes conditions initiales des isoformes PKM, un autre volet important pour la préparation du système de départ porte sur les ligands naturels ou pharmacologiques pouvant cibler PKM2. En effet, ces molécules de nature non protéique ne sont pas renseignées dans le fichier de paramétrage du champ de forces AMOEBA utilisé en laboratoire. Ils nécessitent ainsi une phase de paramétrisation en vue de renseigner précisément le comportement et les interactions entre chacun des atomes constituant ces petits ligands. Dans notre cas, l'utilisation du logiciel Poltype a été faite pour procéder à cette préparation des ligands et plus globalement comme un outil d'automatisation majeur pour générer les paramètres moléculaires nécessaires (force de liaison...) pour n'importe quel petit ligand en champ de forces AMOEBA. Son principe de fonctionnement se base sur un ensemble successif de calcul QM et MM dans le but de déterminer les propriétés électroniques

mais aussi de recherche croisée avec d'autres bases de données type SMARTS pour les paramètres de liaisons covalentes et vdW. De plus, des étapes finales d'optimisation et raffinement sont réalisées pour s'assurer de la concordance du paramétrage réalisé sur de tels systèmes²⁷². En ressort ainsi un fichier de paramétrage pouvant être incorporé dans les données déjà connues pour notre champ de forces AMOEBA.

Début suite à tous ces prérequis la préparation des systèmes en vue de la production des dynamiques par utilisation du logiciel Tinker où chacune des structures est solvatée dans un cube d'eau par un modèle de solvation explicite pour mimer une dynamique structurale en modèle *in vivo*. Pour éviter des phénomènes de divergence numérique des calculs mathématiques pendant la dynamique, le dernier processus de préparation consiste à neutraliser l'ensemble des charges de la protéine pour obtenir une charge électrostatique totale à 0.

Protocole de production des dynamiques

Chaque structure solvatée est ensuite minimisée énergétiquement en utilisant le champ de forces AMOEBA par l'utilisation d'un algorithme *steepest descent* pour rapidement atteindre une déviation de la valeur quadratique moyenne du gradient, ou RMS, inférieure ou équivalente à 1 kcal.mol⁻¹. Dans l'optique d'une simulation de dynamique moléculaire tout atome, nous avons utilisé un module de Tinker-HP (incorporé chez la plateforme Tinker 8³¹⁶) développé au LCT et utilisant les cartes graphiques GPUs. Un tel module permet en effet d'exploiter plus efficacement la méthodologie des champs de forces en précision mixte et ainsi d'augmenter la production de calculs permettant de plus longues simulations. Les structures initiales entièrement solvatées du monomère/dimère/tétramère-*apo*/tétramère-FBP de PKM2 et du tétramère PKM1 comportent respectivement 95 267 / 212 664 / 394 651 / 394 679 / 394 828 atomes ont été extraite de la banque de données de protéines PDB. Afin de décrire tous les atomes du système (protéine et solvant) avec leurs comportements, le pFF AMOEBA a donc été choisi²⁵⁸. Un modèle périodique de condition aux limites est utilisé en lien avec le modèle de solvation explicite où le cube de solvant à un côté de longueur 100 / 130 / 160 Å pour les conformations monomériques, dimériques et tétramériques respectivement (sans distinction PKM1/PKM2). Le déroulé de calcul de la DM est réalisé grâce à l'utilisation d'un intégrateur à pas de temps de type BAOAB-RESPA1³³³ pour permettre l'usage d'un pas de 10 fs avec le processus de répartition de masse des Hydrogènes

(HMR) pour une meilleure redistribution des masses sur les atomes lourds³³⁴. De plus, une sauvegarde de structures est effectuée toutes les 5 picosecondes (ps, 10^{-9} s) pour permettre une analyse plus approfondie des différents modèles. Associé à cela plusieurs cutoffs ont été définis pour restreindre des distances limites pour les paramètres vdW à 9 Å mais aussi pour le seuil Ewald à 7 Å. Enfin, un critère de convergence à 10^{-5} est défini pour le calcul des multipôles.

La production des dynamiques moléculaires pour chaque structure est ensuite lancée avec dans un premier temps une DM classique d'une durée de 5 ns pour chaque structure étudiée. L'ensemble thermodynamique choisi est le NVT pour une température et volume constant à 300 Kelvins (K), à l'aide d'un thermostat de Bussi³⁰⁵, puis de même en ensemble NPT, en ajoutant un barostat de type Monte-Carlo³³⁵, pour vérifier la stabilité des systèmes. A l'issue de cette première simulation, la production débute en ensemble NPT pour une simulation de 20 ns. Viens ensuite le processus d'échantillonnage adaptatif non supervisé³³⁶ en choisissant pour la sélection un espace conformationnel comprenant les quatre premières composantes de la PCA, capturant plus de 90 % de la diversité structurale. Ce processus permet d'en extraire 10 structures différentes de telle sorte que cette sélection, selon les mêmes critères que l'étude de Jaffrelot Inizan *et al.*²⁴⁰, priorise les états structuraux énergétiques qui ont été peu visités pendant la simulation précédente. S'ensuit par la suite une seconde vague de DM indépendantes sur chacune des 10 nouvelles conditions initiales extraites pour un temps plus court de 9 ns dans ce même ensemble NPT. Ce processus a été répété sur 11 itérations pour obtenir un total de 1.01 μ s de simulation de DM par condition. Pour chacune de ces simulations indépendantes de DM, l'utilisation de cartes GPU NVIDIA V100 a été nécessaire en se servant de deux supercalculateurs : les calculateurs Jean Zay (IDRIS, GENCI/CNRS, France) et Joliot-Curie (TGCC, GENCI/CEA, France). Pour les différentes analyses de post-traitement, celles-ci ont été réalisées par l'usage de scripts Python à l'aide de différents modules MDTraj³³⁷, Numpy³³⁸, Scikit-Learn³³⁹, Scipy³⁴⁰ avec aussi l'apport du module Matplotlib pour les représentations graphiques³⁴¹.

Chapitre 2. Résultats de l'analyse de la dynamique structurale pour PKM1/PKM2

2.1. Comprendre la structuration PKM1/2 pendant le processus d'oligomérisation

Pour débiter une évaluation rapide des performances obtenues par notre protocole d'échantillonnage adaptatif, une analyse des trajectoires DM avec la PCA a été faite. Ce choix permet de révéler plus efficacement la diversité conformationnelle des systèmes simulés. En conséquence, celle-ci est considérable en tant que moyen de quantification de l'échantillonnage tout en aidant au discernement de mouvements structuraux importants et explicites. Les résultats en **Figure 25** présentent une projection sur ses deux premières PCA pour chacun des états de PKM1/PKM2. Il apparaît clairement qu'une portion conséquente de l'espace conformationnel de ces protéines a été parcourue avec quelques distinctions. De plus, plus le niveau d'oligomérisation est élevé (monomère→dimère→tétramère) et plus cette exploration est large comme l'indique l'amplitude des variations des PC1/PC2 (-20/40 et -20/30 pour le monomère contre -40/70 et -35/40 pour le tétramère PKM2 par exemple). Des résultats attendus concernant notamment le monomère et les formes apo/holo-FBP de PKM2. En effet, le monomère de PKM2 (**Figure 25A**) étant peu caractérisé comme ayant une activité enzymatique en étude expérimentale, nous retrouvons une structure assez rigide avec une unique région concentrique de structure issue de la dynamique. De la même façon le tétramère

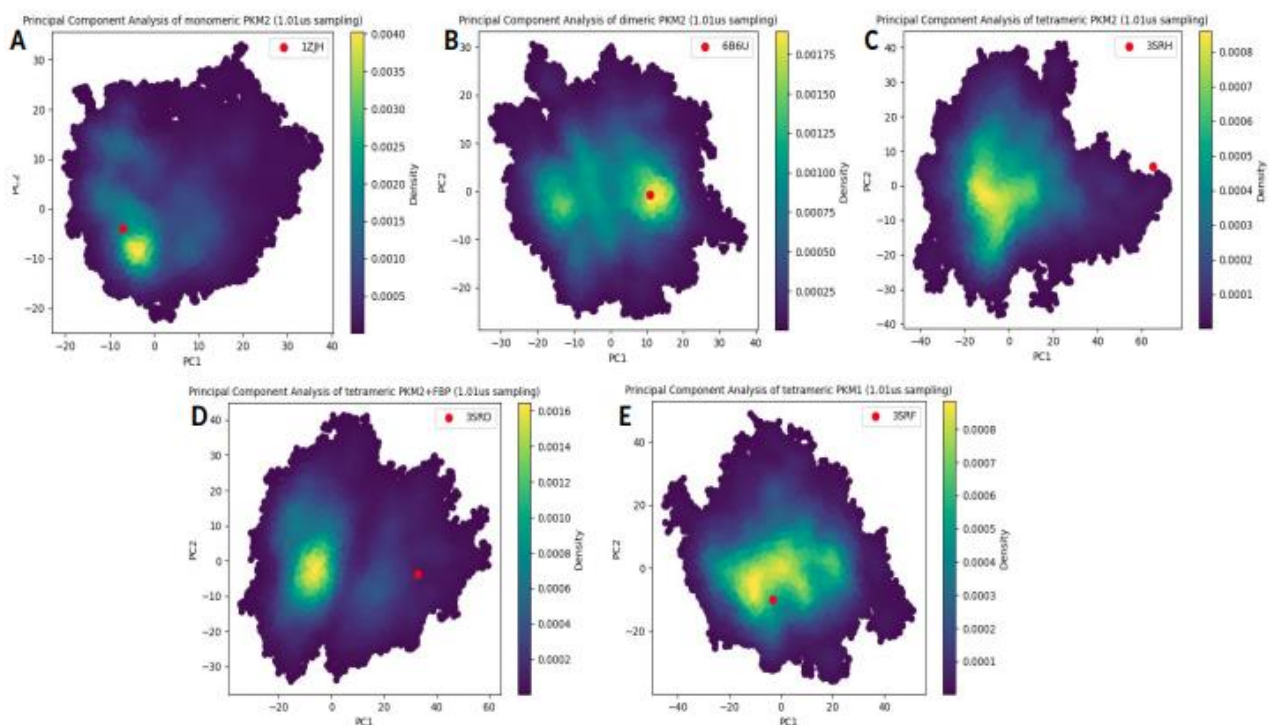


Figure 25 : Représentation graphique du profil d'exploration des simulations DM. (A-D) Représentation graphique du profil PC1 en fonction de PC2 pour chaque état oligomérique de la dynamique moléculaire de PKM2 avec le monomère (A), le dimère (B) ainsi que le tétramère libre (C) ou associé à son ligand naturel FBP (D), (E) Même représentation pour la forme tétramérique de PKM1.

libre de PKM2 (**Figure 25C**) présente une région étendue de plus haute prévalence structurale

en cohérence avec un équilibre assez dynamique entre différents états biologiques connus de PKM2 dont il sera question plus tard dans cette discussion. L'ajout d'un ligand naturel tel que l'est le FBP, et que nous avons fixé à PKM2 (**Figure 25D**), confirme une structuration vers un état préférentiel. Plus surprenant la forme dimérique de PKM2 (**Figure 25B**) présente une flexibilité structurale conséquente avec certes une région à forte densité de structure mais néanmoins avec l'observation d'une nébuleuse assez large de structure à plus faible prévalence, caractérisant une importante flexibilité structurale. Dans la même situation, alors que PKM1 est connue comme une protéine à haute activité enzymatique et de meilleure stabilité à l'opposé de PKM2, son profil (**Figure 25E**) est à un état relativement intermédiaire des deux structures tétramériques de PKM2 avec ou sans le ligand FBP.

En second temps de cette analyse globale de nos simulations, une comparaison entre l'écart quadratique moyen (RMSD) et le rayon de giration (RG) pour PKM1 et chacun des différents états de PKM2 a été effectuée. L'écart quadratique moyen est une quantité de référence qui

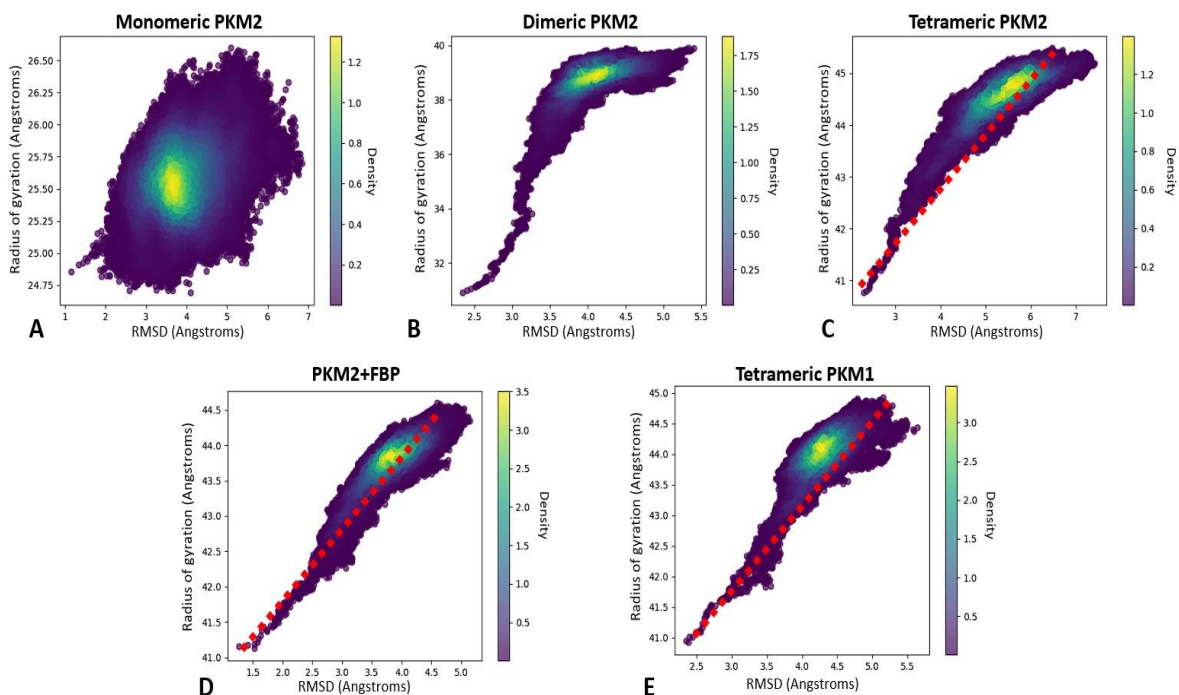


Figure 26 : L'analyse globale du RMSD vs RG montre des changements structuraux mais aussi du volume de PKM2 au cours du processus d'oligomérisation. Nous analysons également les similitudes des profils PKM1/2 (A-D) Représentation graphique de l'analyse RMSD/RG pour chaque condition de simulation de la dynamique moléculaire de PKM2 : monomère (A), dimère (B) tétramère libre (C) ou associé à son ligand naturel FBP (D), (E) Même représentation pour la forme tétramérique de PKM1.

permet d'étudier la flexibilité globale d'un système sur les positions de l'ensemble des résidus d'une protéine donnée par rapport à un état de référence qui est, en général, choisi comme la

structure PDB. Le RG donne une indication sur la variation de volume d'un système au cours de la simulation DM par rapport à l'état initial. Les résultats (**Figure 26**) ont révélé une corrélation croissante entre RMSD et RG au fur et à mesure que l'oligomérisation de PKM2 se complexifie. La **Figure 26A** montre les variations de RG en fonction de la RMSD dans le cas du monomère PKM2. Nous avons constaté une région spécifique de grandes variations de RMSD et RG (2-7 Å et 24.75- 26.50 Å respectivement) pendant la simulation. Des densités élevées de structures ont été trouvées à RMSD 3.6 Å et RG 25.5 Å. Dans l'ensemble, l'état monomérique est caractérisé par une flexibilité importante comme le suggère l'absence de corrélation globale entre RMSD et RG. Comme les simulations nous ont permis d'explorer de vastes espaces conformationnels, cela indique que le monomère était mal structuré. Il en va différemment pour le dimère (**Figure 26B**), pour lequel nous avons observé une distribution plus étroite de RMSD autour de 2.5-5.5 Å avec quelques variations plus importantes de RG à 31-40 Å. Dans l'ensemble, une forte densité de structures est observée présentant une corrélation RMSD-RG significative, ce qui indique une structuration supérieure du dimère de PKM2 par rapport au monomère. Dans le cas du tétramère PKM2 sous forme apo (**Figure 26C**), nous avons observé une plus large distribution de RMSD par rapport au dimère (2.2-7.4 Å) en corrélation avec des valeurs RG plus élevées (40.7-45.5 Å). Une fois de plus, une concentration de densités élevées est trouvée mais, cette fois, une corrélation RMSD/RG presque linéaire est observée. Cette observation est encore plus frappante lorsque nous associons le tétramère PKM2 à son substrat FBP (**Figure 26D**). En effet, le FBP semble avoir un effet stabilisateur sur la flexibilité structurale de l'enzyme comme indiqué par une distribution des valeurs RMSD plus restreinte (de 1.7 à 5.2 Å). Une fois de plus, une région extrêmement dense de structures (valeur 3.5 de densité à 3.75 Å RMSD et 43.75 Å RG) a été observée, démontrant ainsi la structuration complète de l'enzyme. Nous avons ensuite comparé les différentes structures de PKM2 avec le tétramère PKM1. Comme indiqué dans la **Figure 26E**, le profil de la PKM1 semble être très proche de la PKM2 tétramérique lorsqu'elle est associée à son substrat FBP. En effet, les valeurs RMSD sont limitées entre 2.5 à 5.6 Å avec des RG variés de 41 à 45 Å. En conséquence, une région dense de structures presque identique a été observée par rapport à PKM2-FBP (3.4 de densité à 4.25 Å en RMSD et 44 Å en RG), avec une corrélation RMSD/RG presque linéaire. Dans l'ensemble, ces résultats ont confirmé une structuration progressive et une corrélation avec la modulation structurale de PKM2 à mesure que le processus d'oligomérisation se complexifie. Plus

important encore, nous avons observé une proximité structurale étroite entre le tétramère de PKM1 et le tétramère de PKM2 lié au FBP.

2.2. PKM1/2 : Analyse des résidus et de la stabilité des domaines pendant la simulation de dynamique moléculaire

L'étape suivante de notre analyse a été d'étudier la stabilité des acides aminés et domaines clés qui pourraient être des marqueurs importants de la flexibilité structurale de sites clés des deux protéines. Pour ce faire, nous avons étudié la valeur du Root-Mean Square Fluctuation (RMSF) afin de quantifier la déviation moyenne de chaque résidu au cours des simulations par rapport à leur position de départ sur la référence PDB définie. Une première conclusion immédiate relie la stabilité de la protéine PKM2 avec le processus d'oligomérisation. En effet, dans le cas du monomère PKM2 (**Figure 27A**), nos résultats ont montré une flexibilité importante affectant la structure dans son ensemble. La plus forte source de flexibilité est observée dans le domaine B (résidus 116-217) qui est le plus variable allant jusqu'à des valeurs RMSF supérieures à 4 Å. Nous avons aussi observé cette importante flexibilité pour trois grandes régions localisées sur le domaine A1 (résidus 45-115) mais aussi sur des résidus supplémentaires (résidus 290-425 et 475-525) qui composent respectivement une grande partie des domaines A2 et C. S'ensuit une stabilisation structurale qui est observée pour la forme dimérique de PKM2 (**Figure 27B**). Le domaine A2 (résidus 290-400) a perdu la majeure partie de sa flexibilité avec des valeurs RMSF centrées à 1.5-2 Å par rapport aux valeurs du monomère qui dépasse les 3 Å. Néanmoins cet état dimérique conserve de la flexibilité structurale sur les domaines A1 (résidus 50-107) et C (résidus 400-457 et 470-531) limitant la structuration complète de l'enzyme qui ne semble être achevée qu'au niveau de l'état oligomérique du tétramère PKM2 en état apo (**Figure 27C**). Ici, les résidus des domaines A1 et C ont perdu la majeure partie de leur flexibilité structurale par rapport à l'état dimérique. Quelques poches conservées présentant une flexibilité significative ont été observées autour des résidus 30-110 et 470-531 qui participent respectivement à la structuration du site actif et de la poche de fixation du FBP chez PKM2. Il est également important de noter que chaque état oligomérique a conservé une flexibilité importante du domaine B en raison de son rôle central dans la constitution du site actif. Nous avons ensuite évalué l'effet allostérique de la fixation du FBP sur le tétramère de PKM2 (**Figure 27D**). Si nos résultats ont montré des profils RMSF globaux qui sont extrêmement proches entre les

systèmes holo et apo, des différences locales sont visualisées. En effet, une stabilisation supplémentaire de la poche de fixation du FBP est trouvée aux résidus 470-531 tandis que des flexibilités relatives subsistent pour les domaines A1 (résidus 70-110) et B, plus précisément pour quelques résidus localisés aux positions 75-80 et 115-120. Ceux-ci correspondent à des acides aminés impliqués dans le site actif (voir flèches vertes, **Figures 27C/D**).

Nos résultats ont également montré une grande proximité entre le tétramère PKM1 (**Figure 27E**) et la forme holo de PKM2 liée à FBP, notamment au niveau du domaine B. Cependant, plusieurs zones spécifiques restent différentes. Certains couples de résidus (résidus 325-335,

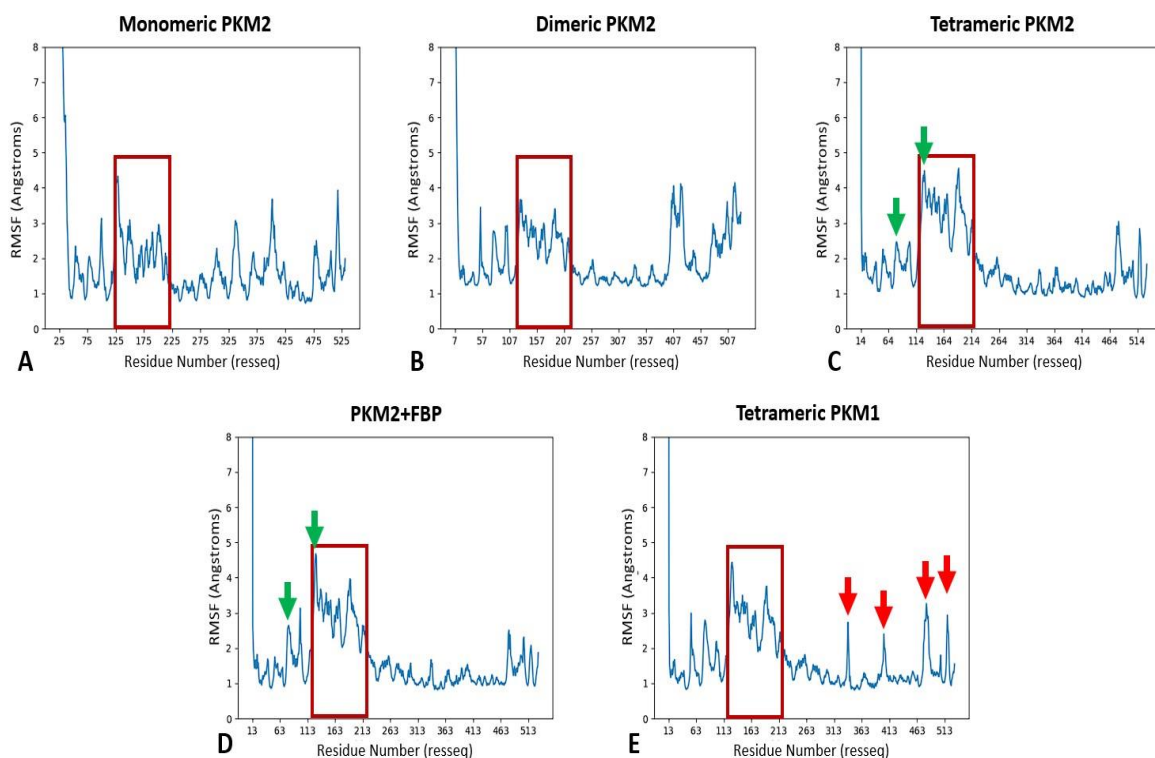


Figure 27 : L'analyse RMSF montre la structuration de PKM2 au cours des processus d'oligomérisation et de fixation du FBP et confirme les analogies tétramériques de PKM1/2 sur des domaines clés. (A-D) Représentation graphique de l'analyse RMSF pour chaque état de la dynamique moléculaire de PKM2 : monomère (A), dimère (B) tétramère libre (C) ou associé à la molécule FBP (D), (E) Même représentation pour la forme tétramérique de PKM1. Ici, les domaines de PKM2 contiennent les résidus suivants : 44-115 pour A1, **116-217 pour B (carré rouge)**, 218-388 pour A2 et 389-531 pour le domaine C. Les différences locales entre les formes apo et holo PKM2 liée à FBP (flèches vertes) et entre les formes holo de PKM2 liée à FBP et PKM1 respectivement (flèches rouges) sont aussi indiquées.

390-405, 470-490, 515-525) présentent une flexibilité relativement élevée (flèches rouges, **Figure 27E**).

Pris ensemble, ces résultats donnent une image complète des effets structuraux locaux de la structuration progressive de la PKM2 au cours du processus d'oligomérisation. Ils ont

aussi confirmé les fortes analogies structurales entre PKM2-FBP et PKM1.

2.3. Analyse structurale des sites clés de la protéine PKM

Cette section s'attardera à discuter des résultats sur les principaux sites clés de réactivité de PKM2 en analysant plus particulièrement le site actif de fixation du PEP et le site de fixation du ligand naturel et allostérique qu'est le FBP.

2.3.a. Structuration du site actif et lien causal avec l'état oligomérique de PKM2

Nous nous sommes ensuite attardés sur les principaux sites de réactivité clés de PKM2 en commençant par analyser le site actif de l'enzyme. Pour ce faire, les distances entre des couples clés de résidus définissant des marqueurs structuraux ont été étudiées afin d'évaluer la flexibilité du domaine B. Dans notre étude, nous avons mesuré la distance séparant le résidu

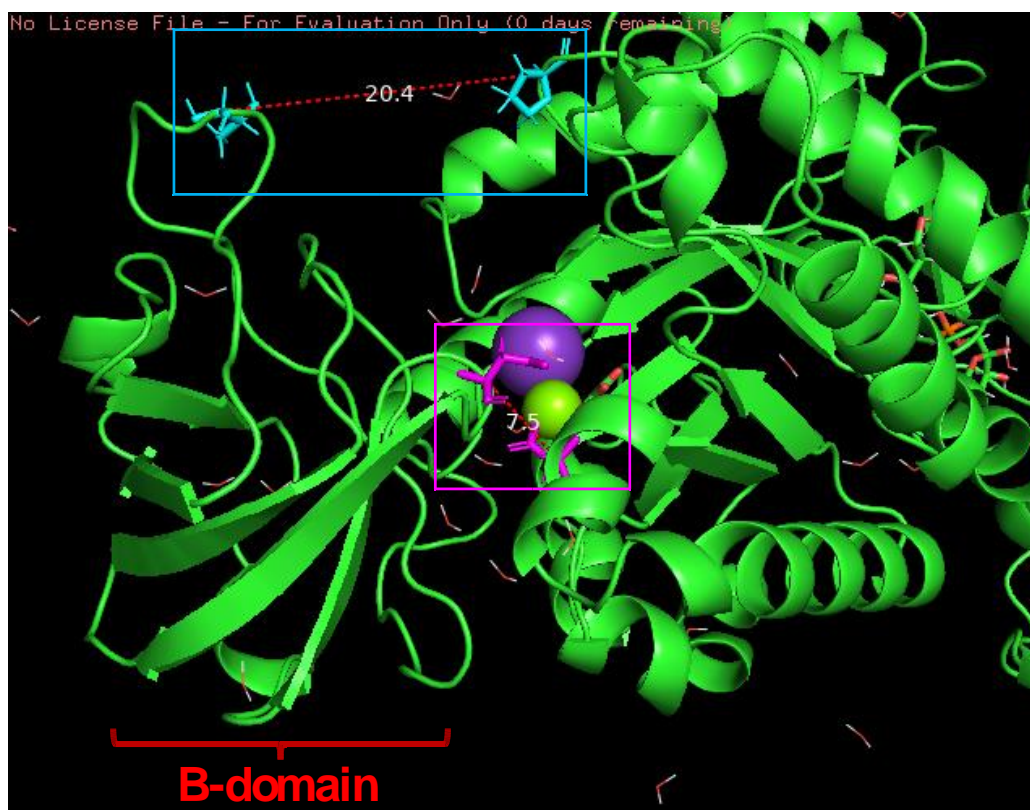


Figure 28 : Représentation structurale du site actif de PKM2. Modèle cartonné représentant un seul monomère du tétramère PKM2 associé à FBP. Ici, les deux couples de résidus **Pro53 à Thr129** (entre les régions A et B) et **Asp178 à Asp296** (près de la jonction A-B à la base de la région B) sont mis en évidence respectivement en bleu et en rose pour caractériser leurs importances dans la dynamique structurale globale se produisant sur le site actif de la protéine, qui est localisé entre le domaine A1 (côté droit) et le domaine B (côté gauche).

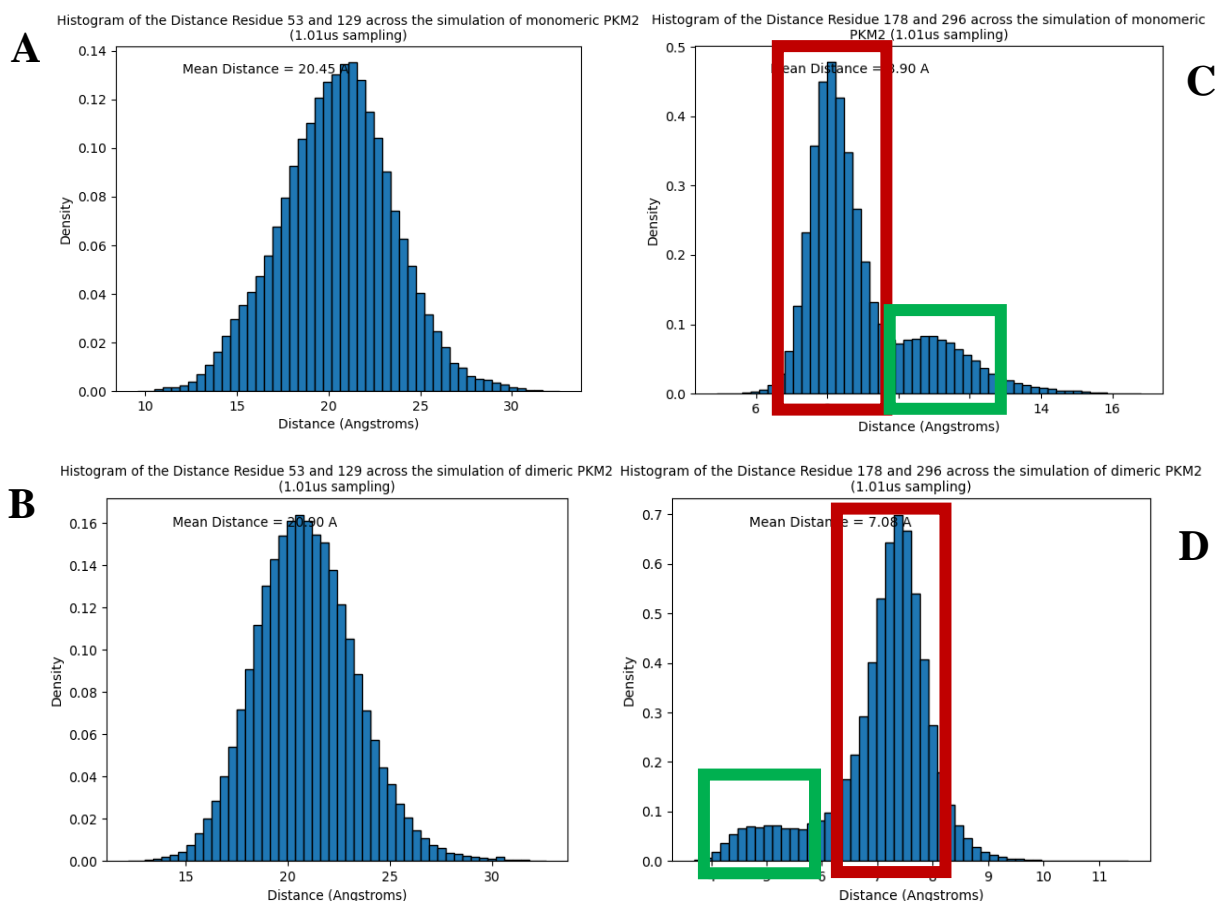


Figure 29 : La structuration du site actif est associée à la conformation oligomérique de PKM2. (A-B) Représentation graphique de la distance entre les résidus 53 et 128 (dans le site actif) pour chaque état de la dynamique moléculaire de PKM2 avec le monomère (A) et le dimère (B) (C-D) Même représentation pour la distance entre les résidus 178 et 296 avec le monomère (C) et le dimère (D).

53, appartenant au domaine A, et le résidu 129 contenu dans le domaine B. Ces deux résidus sont localisés dans la partie plus externe du site actif de la protéine et ont été choisis pour caractériser le mouvement global du domaine B. Pour mesurer la structuration du site actif, nous avons surveillé la distance séparant les résidus 178 et 296 (Figure 28) qui sont localisés à la jonction des domaines A et B. Les simulations ont montré que le site actif se structure progressivement au cours du processus d'oligomérisation de la PKM2. Alors que l'état monomérique (Figures 29A et 29C) présentait une distance restreinte entre les résidus 53 et 129 (environ 20.5 Å), une distribution bimodale des distances a été observée entre les résidus 178 et 296 à des distances de 8 et 11 Å. Une telle distribution bimodale est présente dans les autres oligomères de PKM2. En examinant le dimère (Figures 29B et 29D), nous avons observé un profil similaire à celui du monomère pour la distance entre les résidus 53 et 129. Une distribution bimodale différente est observée pour la distance séparant les résidus 178 et 296 (au niveau de la jonction des domaines A et B) avec des valeurs centrées à 5 et 7.5 Å qui

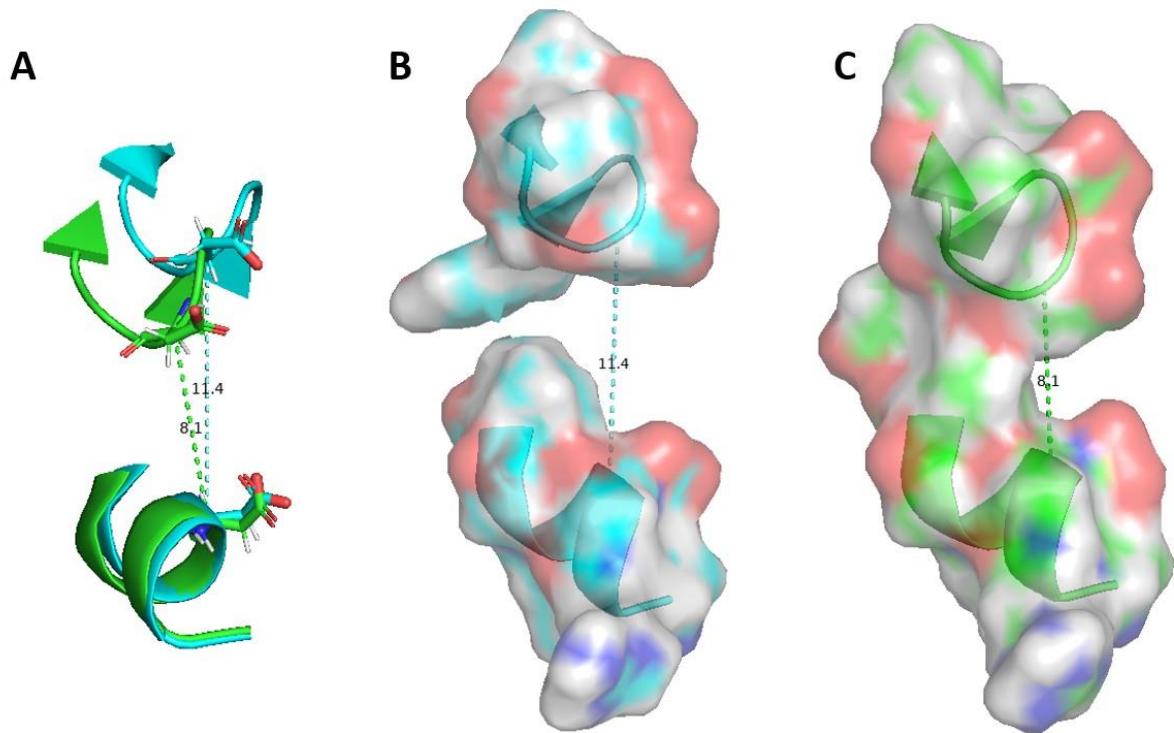


Figure 30 : Dynamique de la partie interne du côté actif de la PKM2 monomérique. (A) Représentation graphique de la distance entre les résidus 178 et 296 pour deux frames différentes de la distribution bimodale, (B) Modèle de surface montrant l'état à haute distance (C) ou l'état plus fermé. Trois acides aminés avant et après les résidus 178 et 296 sont aussi représentés pour obtenir un meilleur modèle de surface.

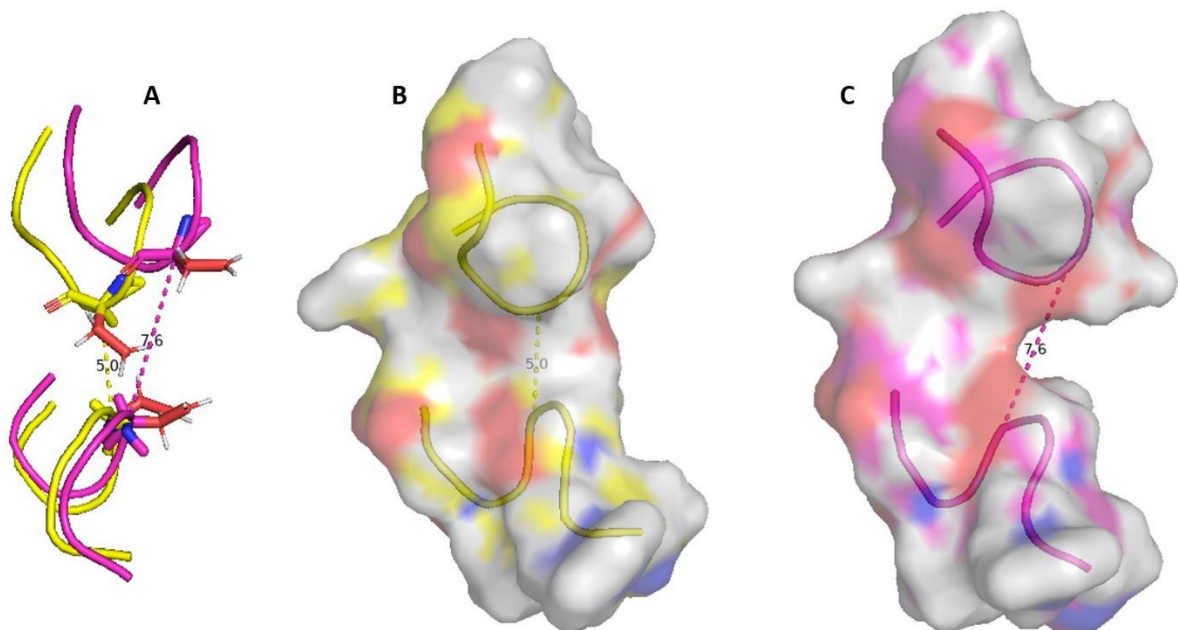


Figure 31 : Dynamique de la partie interne du côté actif de la PKM2 dimérique. (A) Représentation graphique de la distance entre les résidus 178 et 296 pour deux frames différentes de la distribution bimodale, (B) Modèle de surface montrant l'état de plus faible distance (C) ou l'état le plus ouvert. Trois acides aminés avant et après les résidus 178 et 296 sont aussi représentés pour obtenir un meilleur modèle de surface.

indiquent une extension spatiale plus contrainte du site actif. Une visualisation structurale de

ces deux états est visualisable en **Figures 30 et 31**. Enfin, nous avons considéré le tétramère PKM2 dans son état apo (c'est-à-dire sans son ligand naturel, **Figures 32A et 32D**). Ici, nous avons remarqué une valeur plus élevée de la distance entre les résidus 53 et 129 couplée à une distance entre les résidus 178 et 296 d'environ 8-8.5 Å. Un tel résultat indique une plus grande flexibilité du domaine B qui est liée à une structuration plus forte du site actif de PKM2. Cela

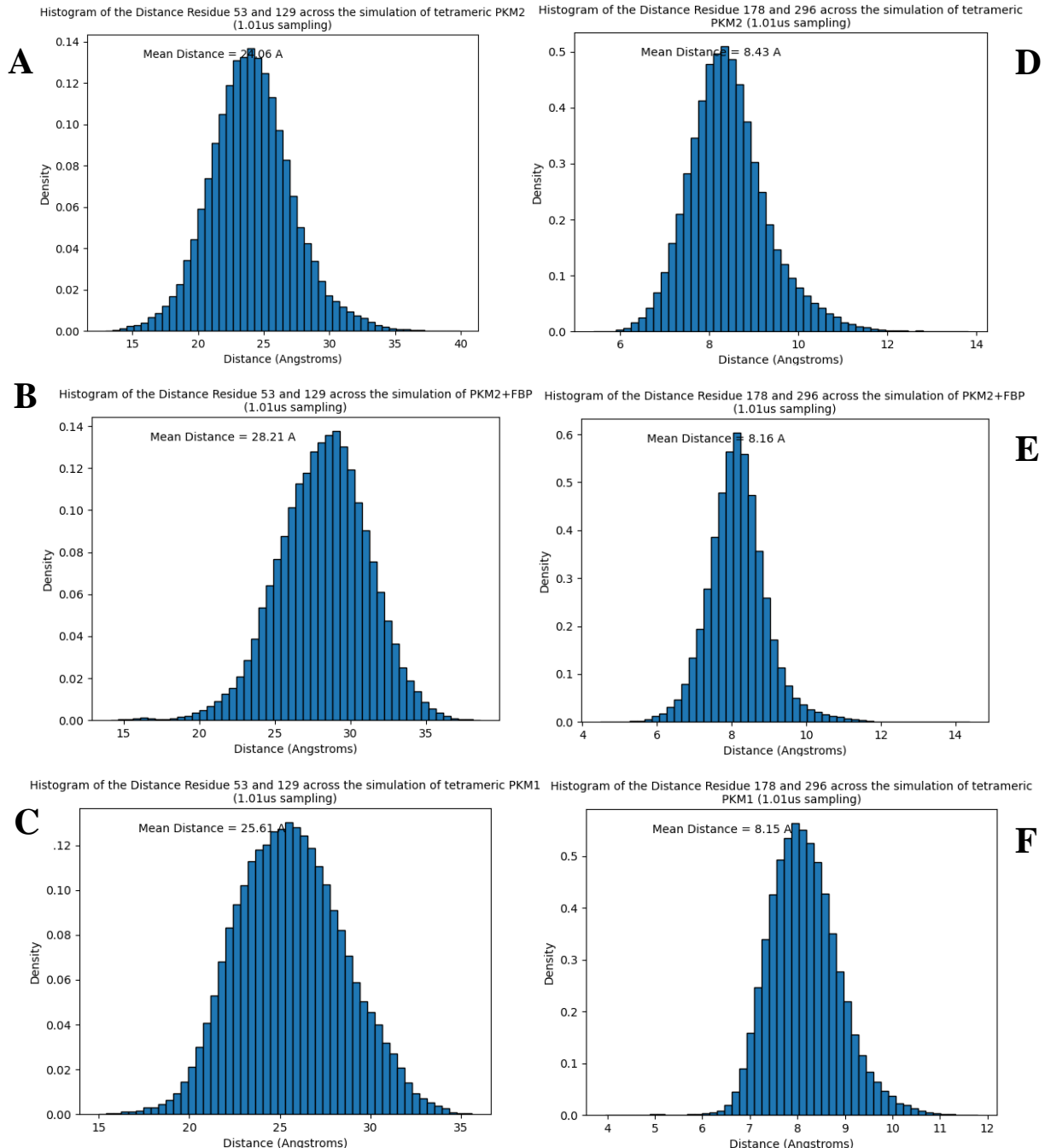


Figure 32 : La structuration du site actif est associée à la conformation oligomérique de PKM2. (A-C) Représentation graphique de la distance entre les résidus 53 et 128 (dans le site actif) pour chaque état de la dynamique moléculaire de PKM2 avec le tétramère PKM2 apo (A) ou lié au FBP (B) et le tétramère PKM1 (C), (D-F) Même représentation pour la distance entre les résidus 178 et 296 avec le tétramère PKM2 apo (D) ou lié au FBP (E) et le tétramère PKM1 (F).

apparaît tout à fait compatible avec les activités connues des différents oligomères¹². Dans un

contexte où PKM2 est associée au FBP, c'est-à-dire à l'état holo (**Figures 32B et 32E**), nous avons observé une distance plus grande entre les résidus 53 et 129 par rapport à l'état apo (valeur moyenne de 28.2 Å par rapport à 24.1 Å pour apo-PKM2). En ce qui concerne la distance entre les résidus 178 et 296, son profil est similaire à celui du tétramère apo, mais avec une distribution légèrement plus étroite et centrée à 8.25 Å. Ceci est en accord avec la stabilité connue de la PKM2 lorsque celle-ci est associée à son ligand FBP pour une meilleure activité enzymatique³⁰. Enfin, nous avons caractérisé le site actif dans l'état tétramérique de la protéine PKM1 afin de pouvoir le comparer à son homologue PKM2 (**Figures 32C et 32F**). Les profils de distance observés se sont avérés intermédiaires entre les valeurs observées des états apo et holo-FBP du tétramère PKM2. Concernant la partie externe du site actif, la distance entre les résidus 53 et 129 est inférieure à celle observée dans l'état holo-PKM2 tout en restant supérieure à la distance mesurée pour apo-PKM2, signe d'une structuration plus importante du site actif de PKM1 par rapport au tétramère libre de PKM2. Dans le même ordre d'idées, la jonction des domaines A-B (distance entre les résidus 178 et 296) nous présente un profil très similaire à celui de la structure holo-PKM2 (c'est-à-dire une moyenne de 8.15 Å contre 8.16 Å pour l'état libre du tétramère-PKM2). Dans l'ensemble, nos données ont montré un effet net de l'allostérie de fixation du FBP sur la structuration du site actif du tétramère PKM2 qui semble relativement similaire à celui de l'isoforme PKM1.

2.3.b. Dynamique structurale de la poche de fixation FBP : allostérie et modulations oligomériques

Dans la continuité de notre analyse de sites clés de PKM2, nous avons ciblé la région qui contient la poche de fixation du FBP afin de comparer sa structuration entre PKM2 et la région correspondante de PKM1. Pour cela, la distance entre les résidus 433 et 518 a été étudiée pour évaluer la flexibilité globale du site de fixation du FBP puisque ces résidus sont situés à l'extrémité de la poche (**Figure 33**).

Nous avons commencé par comparer les différents états oligomériques possibles de PKM2 choisis pour nos simulations. Les résultats obtenus sur le monomère (**Figure 34A**) ont montré un profil de distance très variable avec une grande densité de structures centrées à 7.5 Å qui est également couplée à une très grande proportion de distances plus élevées à 8.5-13 Å. Cette distance est une bonne indication de l'absence très probable de structuration de la poche dans

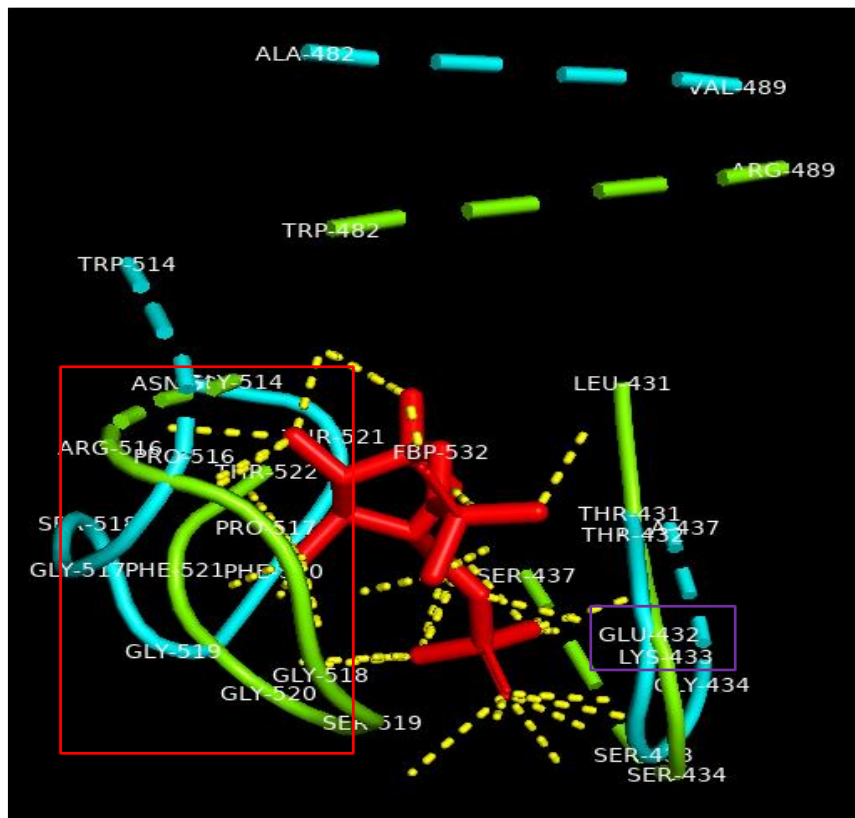


Figure 33 : Représentation structurale du site allostérique des isoformes PKM. Modèle cartoon des acides aminés composant le site de fixation du FBP et comparaison entre PKM1 (en bleu) et PKM2 (en vert) en présence de FBP (en rouge). Les sites d'intérêts sont colorés pour marquer leur importance dans la fixation du FBP : le carré rouge représente une boucle de régulation et le carré violet le résidu 433 (Lys pour PKM2 et Glu pour PKM1).

l'état monomérique. En passant à la forme dimérique de PKM2 (**Figure 34B**), nous avons observé des distances plus élevées par rapport à l'état monomérique. Plus précisément, une distribution unique et large est trouvée avec des distances allant de 13 à 21 Å, ce qui n'est pas en faveur d'une bonne structuration globale de la poche de fixation du FBP comme ces distances calculées sont importantes. Enfin, pour l'état tétramérique apo de PKM2 (**Figure 34C**, cadres rouge et vert), nous avons obtenu une distribution bimodale pour la distance entre les résidus 433 et 518 avec une population plus prépondérante de structures centrées à 12.5 Å (à 0.2 de densité) et une seconde à 9.5 Å (à 0.115 de densité). Cette distribution particulière est une signature de la coexistence de deux états distincts pour l'état tétramérique de PKM2. Pour la forme tétramérique de PKM2 liée au FBP, nous avons remarqué une inversion complète de la distribution à deux états observée dans l'état apo-PKM2 (**Figure 34D**). Dans ce cas, une population majeure de structures est centrée autour d'une distance moyenne de 8.5 Å (densité de 0.18) tandis qu'une seconde population est centrée à 7 Å (densité de 0.36). En conséquence et comme attendu, la présence du FBP joue un rôle majeur dans la structuration

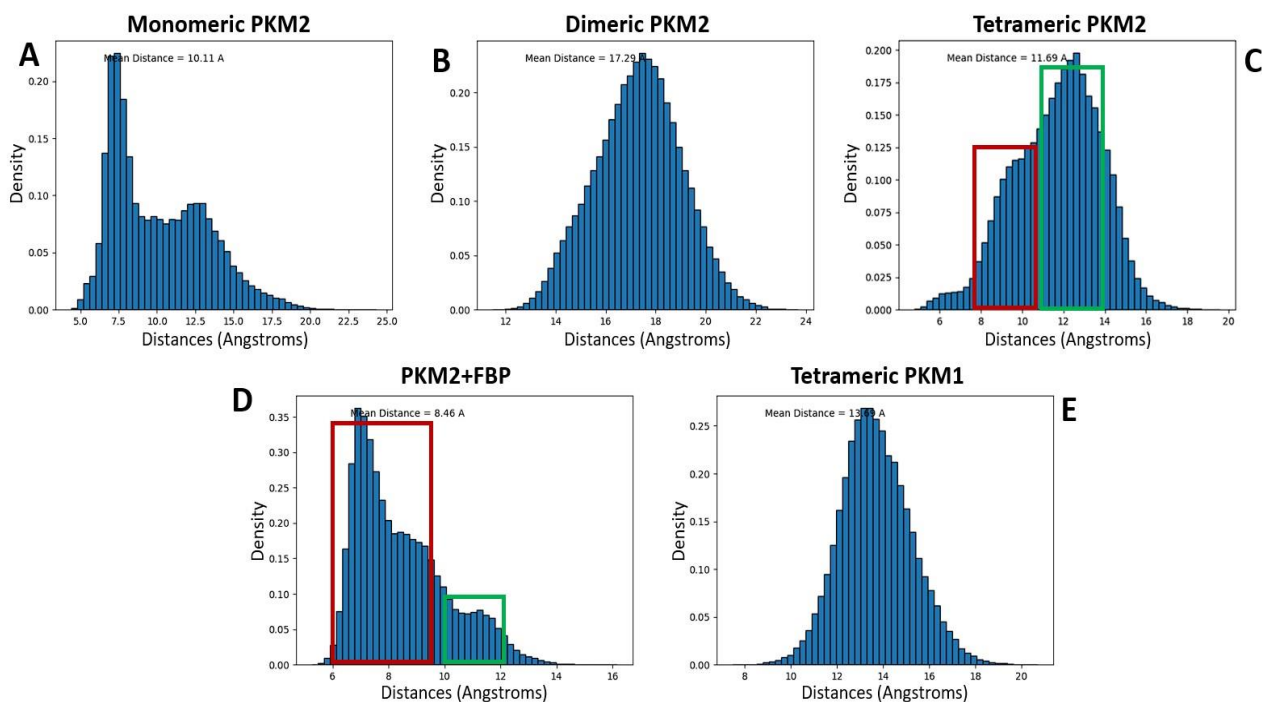


Figure 34 : Structuration globale de la poche de fixation FBP pendant le processus d'oligomérisation et de docking du FBP et comparaison avec le site de fixation possible de PKM1. (A-D) Représentation graphique de la distance entre les résidus 433 et 518 (localisés dans la poche allostérique FBP) pour chaque condition de la dynamique moléculaire de PKM2 avec le monomère (A), le dimère (B) et le tétramère libre (C) ou associé à la molécule allostérique FBP (D), (E) Même représentation pour la forme tétramérique de PKM1.

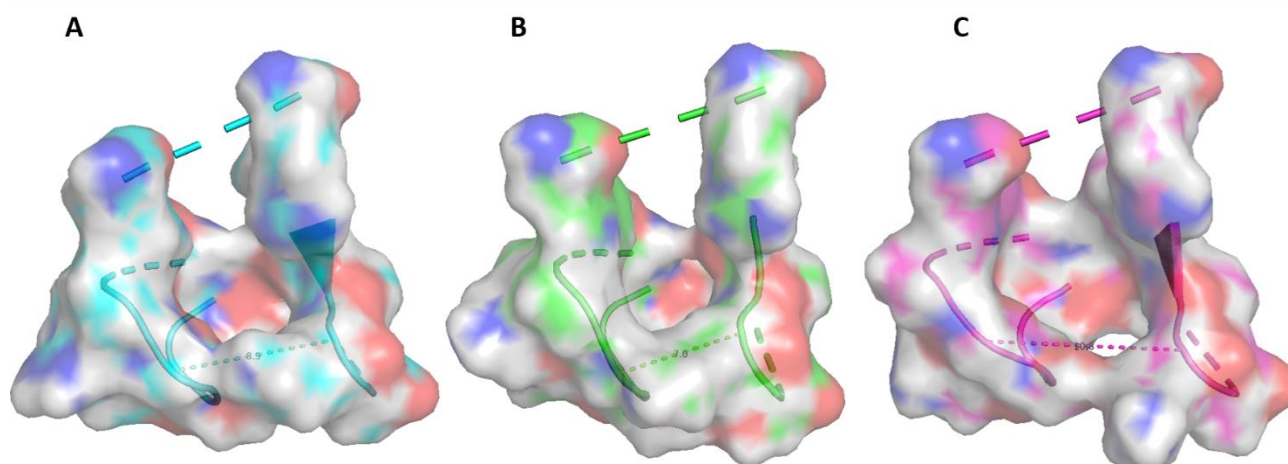


Figure 35 : Dynamique de la poche de fixation du FBP pour le tétramère PKM2 lié au FBP. Modèle de surface de trois frames alignés pendant la simulation de PKM2 lié au FBP avec les distances les plus faibles ($\approx 7 \text{ \AA}$) (A), moyennes ($\approx 9 \text{ \AA}$) (B) et les plus élevées ($\approx 11 \text{ \AA}$) (C) entre les résidus 433 et 518.

de sa propre poche de fixation et sur l'équilibre des formes tétramériques de PKM2. Un tel effet est visible en modèle structural sur la **Figure 35**. Enfin, la caractérisation de la région putative de fixation du FBP pour la protéine PKM1 a été réalisée pour la comparer à son

homologue PKM2. Les données obtenues à partir de cet état tétramérique (**Figure 34E**) ont montré une distribution de la distance entre les résidus 433 et 518 centrée à 13.7 Å, une distance bien plus élevée que celle observée pour l'état apo-PKM2 (ici à 11.7 Å) et holo-FBP PKM2 (à 8.46 Å). Ces données ont donc confirmé que la région putative de fixation du FBP ne semble pas être suffisamment structurée pour avoir une poche de fixation viable capable de lier le FBP comme PKM2.

2.4. Impact structural de l'activateur pharmacologique TEPP-46 par comparaison avec le ligand naturel FBP

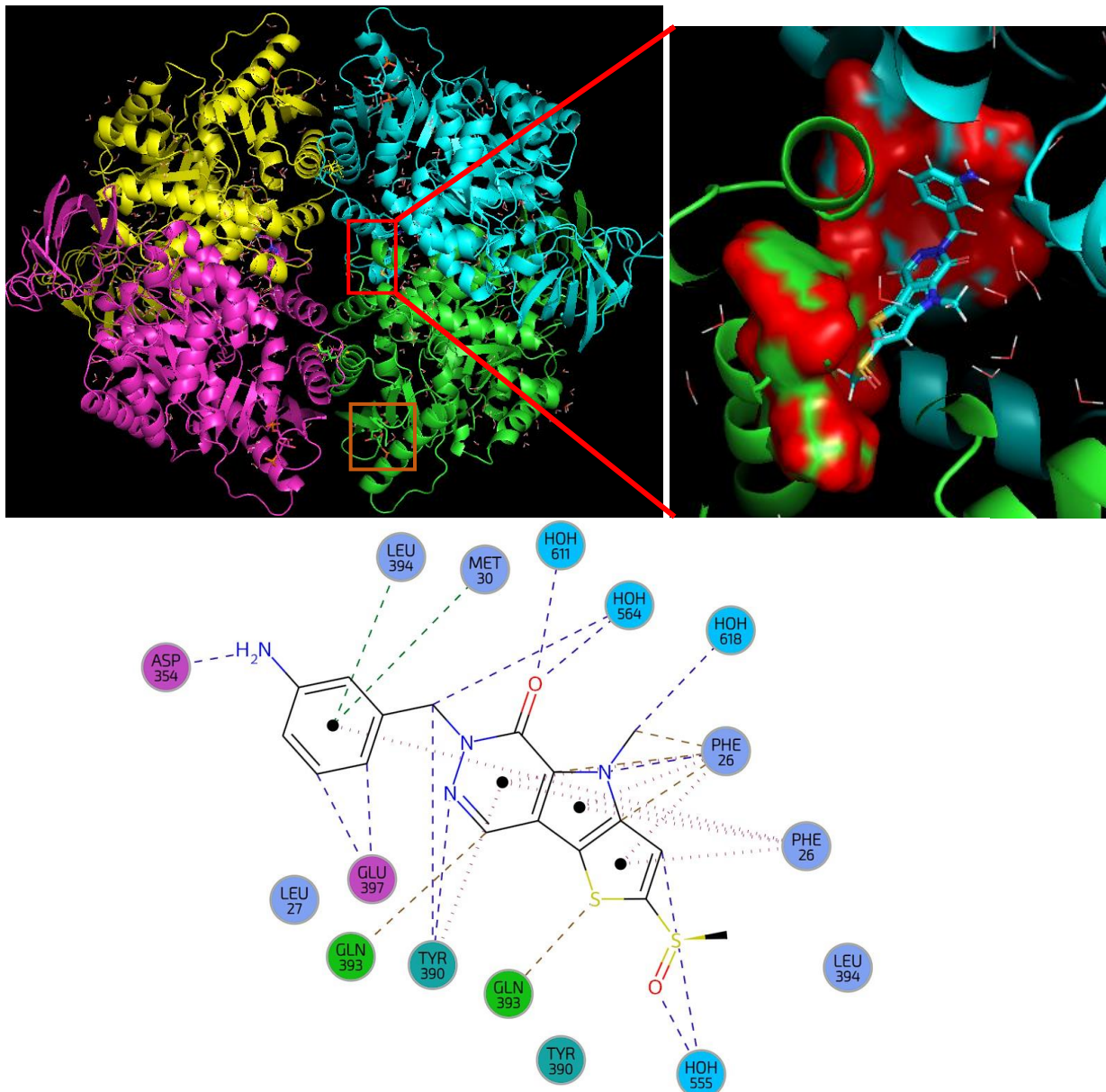


Figure 36 : Représentation structurale du site de fixation du TEPP-46 sur PKM2. Modèle cartoon de PKM2 avec indication des régions de fixation du TEPP-46 (cadre rouge) mais aussi du FBP pour comparaison (cadre orange). Les résidus d'intérêt qui interagissent avec TEPP-46 sont montrés en format de surface et sont colorés en rouge. L'environnement d'interaction du TEPP-46 avec PKM2 est visualisé en dessous de ces modèles structuraux.

Pour conclure notre analyse structurale, nous avons aussi étudié par dynamique structurale la fixation de l'effecteur pharmacologique TEPP-46 qui est connu pour être un activateur de PKM2. Celui-ci est présent à l'interface de deux monomères par interaction de leurs domaines A (**Figure 36, zone orange**), au niveau d'une poche d'interaction différente de celle du FBP (**Figure 36, cadre rouge**).

Dans un premier temps, l'observation des caractéristiques globales de la simulation est réalisée par analyse des deux premières PCA (**Figure 37A**) et du lien entre RMSD et RG (**Figure 37B**) comme pour les précédents états de PKM1/2. Comme pour les simulations des protéines PKM1/PKM2, l'analyse comparative des deux premières PCA montre la large exploration structurale et énergétique de la protéine PKM2 sous forme holo liée au TEPP-46. On peut d'ailleurs noter que la structure cristalline servant de condition initiale de la

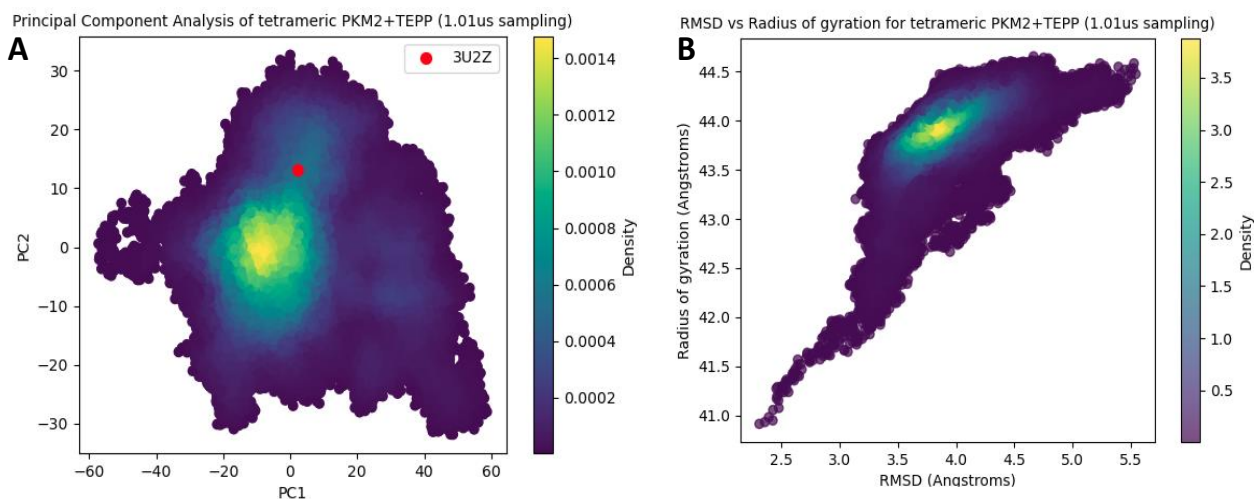


Figure 37 : Représentation graphique du profil d'exploration des simulations DM. (A) Représentation graphique du profil PC1 en fonction de PC2 pour la structure tétramérique de PKM2 lié au ligand pharmacologique TEPP-46, (B) Représentation similaire mais du RMSD en fonction du RG.

simulation de dynamique (PDB : 3U2Z) est assez proche d'une région dense très souvent explorer pendant la DM montrant ainsi l'intérêt de notre modèle de simulation avec échantillonnage adaptatif. Concernant le résultat du profil RMSD en fonction du RG, celui-ci est très proche de celui issu de la DM de PKM1 avec une variation quasi linéaire pour un RMSD croissant de 2.5 à 5.5 Å lié à la croissance du RG de 41 à ~44.5 Å (équivalent au profil PKM1). Un tel profil relève un premier effet structurant du TEPP-46 sur PKM2 sachant la structuration par comparaison à la DM issue de la structure de PKM2 libre ayant une plus forte flexibilité de son RMSD comme discuté précédemment. A la suite de ces premières observations, nos données RMSF (**Figure 38A**) ont donné un profil similaire à celui observé

pour PKM2-FBP avec des petites différences locales (résidus 390-405 et 470-490), qui sont situées dans les zones d'interaction avec TEPP-46 et pour les résidus structurant la poche de fixation de FBP respectivement. Comme pour les données obtenues sur les tétramères de PKM2, le domaine B (résidus 116-217) a conservé le même profil de flexibilité que celui observé lorsque la FBP est présente. Pour obtenir plus d'informations structurales, nous avons

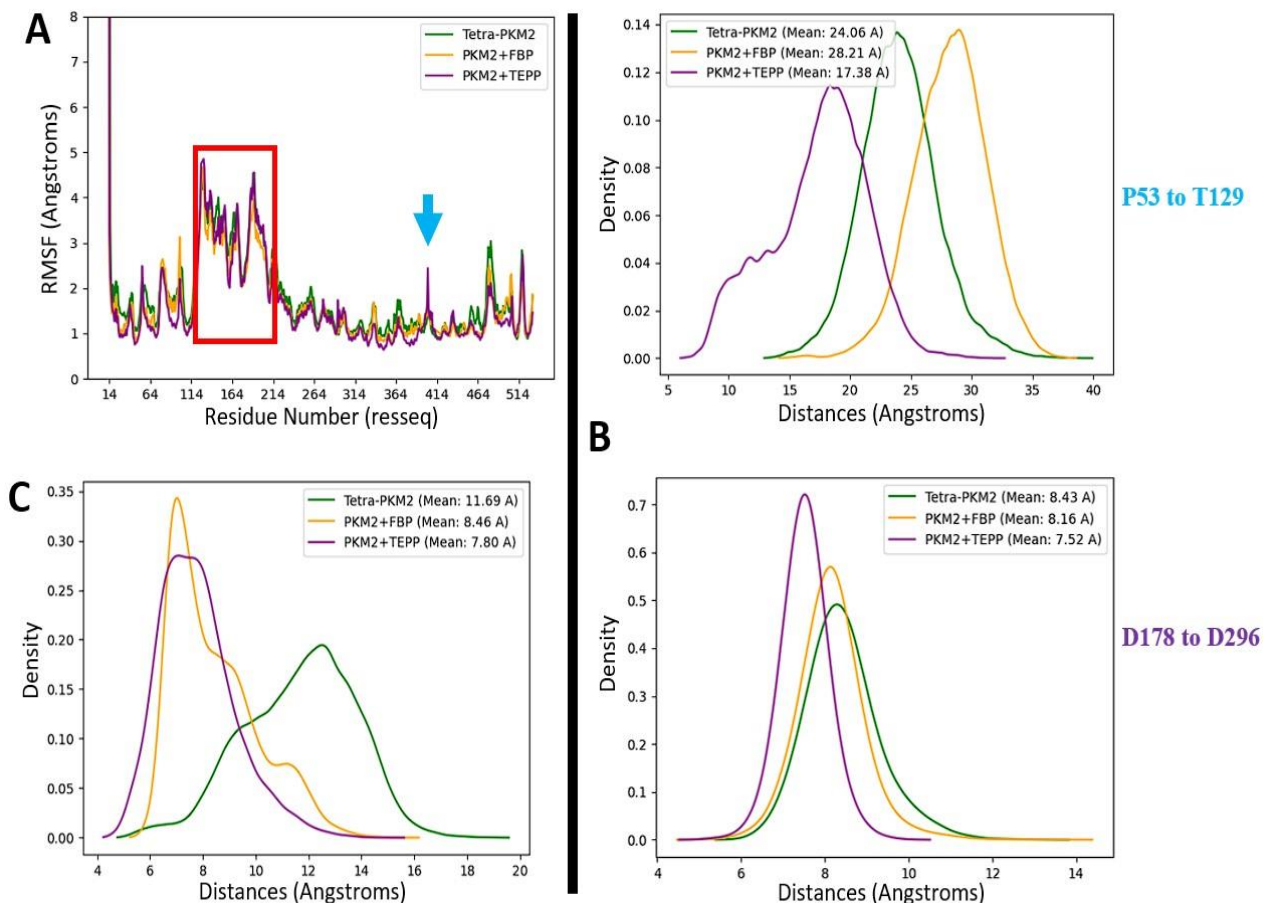


Figure 38 : Résultats structuraux issus de la fixation du TEPP sur un PKM2 tétramérique. (A) Représentation graphique de l'analyse RMSF, (B) la distance entre les résidus 53 et 128 (dans le site actif) et (C) la distance entre les résidus 433 et 518 (localisés dans la poche allostérique du FBP) pour différents états tétramériques de PKM2 avec ou sans effecteurs naturels ou pharmacologiques.

étudié ensuite plus en détail le site actif de PKM2 (**Figure 38B**). Pour la distance entre les résidus 53 et 129, des similitudes sont notées entre PKM2 liée au FBP et liée au TEPP-46. Les données ont montré une distance de jonction A-B (résidus 178 et 296) très similaire à celle observée quand PKM2 est liée au FBP. A l'inverse, la fixation du TEPP-46 a un effet opposé sur le mouvement du domaine B. En effet, nos résultats ont montré que la distance entre les résidus 53 et 129 est réduite et présente un profil bimodal à 12 et 19 Å indiquant une proximité plus rapprochée entre les domaines B et A. Pris ensemble, ces données sont cohérentes avec meilleure activité enzymatique de PKM2 liée au TEPP-46 que celle de l'état

tétramérique libre de PKM2. Enfin, l'analyse structurale de la poche de fixation du FBP (**Figure 38C**) a montré un profil de distance entre les résidus 433 et 518 qui est extrêmement proche (c'est-à-dire centré à 7.5 Å) comparé à la structure PKM2 liée au FBP. Néanmoins, dans le cas de PKM2 lié au TEPP-46, aucun ligand localisé dans cette poche ne devrait être présent puisque la poche de fixation de TEPP-46 se trouve dans une autre région de la structure de PKM2.

2.5. Analyse comparative de la druggabilité : recherche de poches cryptiques spécifiques à PKM2

Nous avons utilisé les modèles dynamiques construits précédemment afin d'identifier de nouvelles poches cryptiques, c'est à dire des structures tridimensionnelles généralement cachées ou partiellement accessibles susceptibles d'être ciblées par de nouveaux modulateurs pharmacologiques. Compte-tenu de son importance dans les pathologies tumorales, nous avons souhaité identifier des poches spécifiques à la forme tétramérique de PKM2. Nous avons d'abord recherché ces poches en utilisant les structures cristallographiques du tétramère de PKM1 (3SRF) et du tétramère de PKM2 lié au FBP (3SRD). La recherche a été conduite à l'aide du logiciel DoGSite Scorer, un outil automatisé de détection de poches et de calcul de descripteurs. Soixante-trois et 50 poches ont été détectées respectivement pour PKM1 et PKM2. Plusieurs poches déjà connues ont été retrouvées : le site actif, la poche de fixation des acides aminés régulateurs (Ser, Phe), la poche de fixation de FBP et le site de fixation de TEPP-46 (voir **Figure 39**).

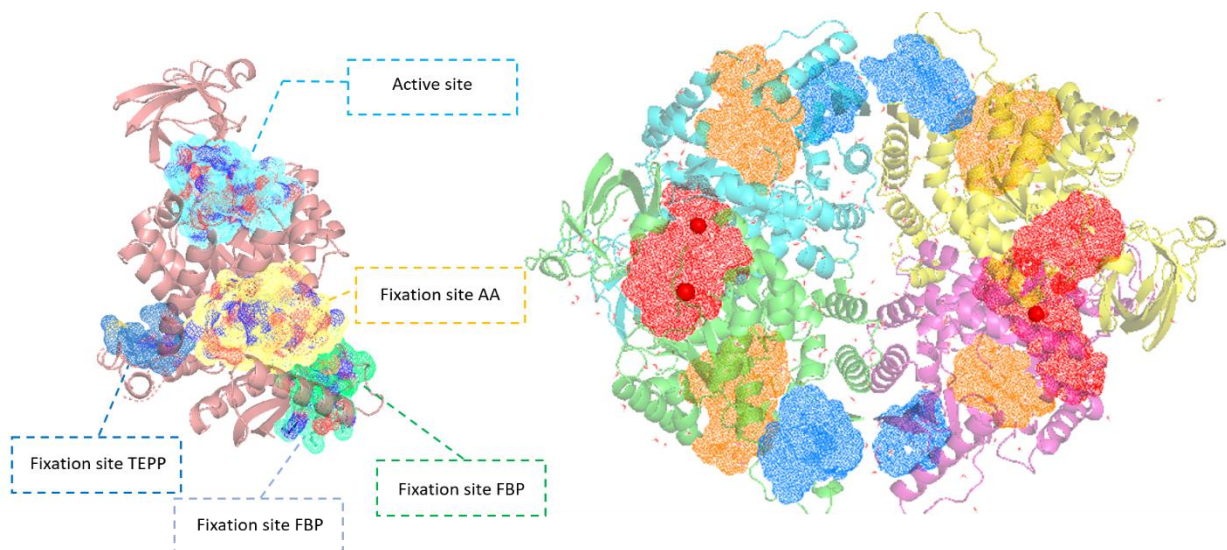


Figure 39 : Représentation de l'emplacement des principales poches de la PKM1 du 3SRF. Le monomère (à gauche) et tétramère (à droite) sont représentés avec leurs poches similaires, à l'exception de la poche TEPP-46, contenue dans une poche plus grande. Le site actif, la poche de fixation du FBP et des acides aminés sont représentés en rouge, bleu et orange respectivement dans le cas de la représentation tétramérique.

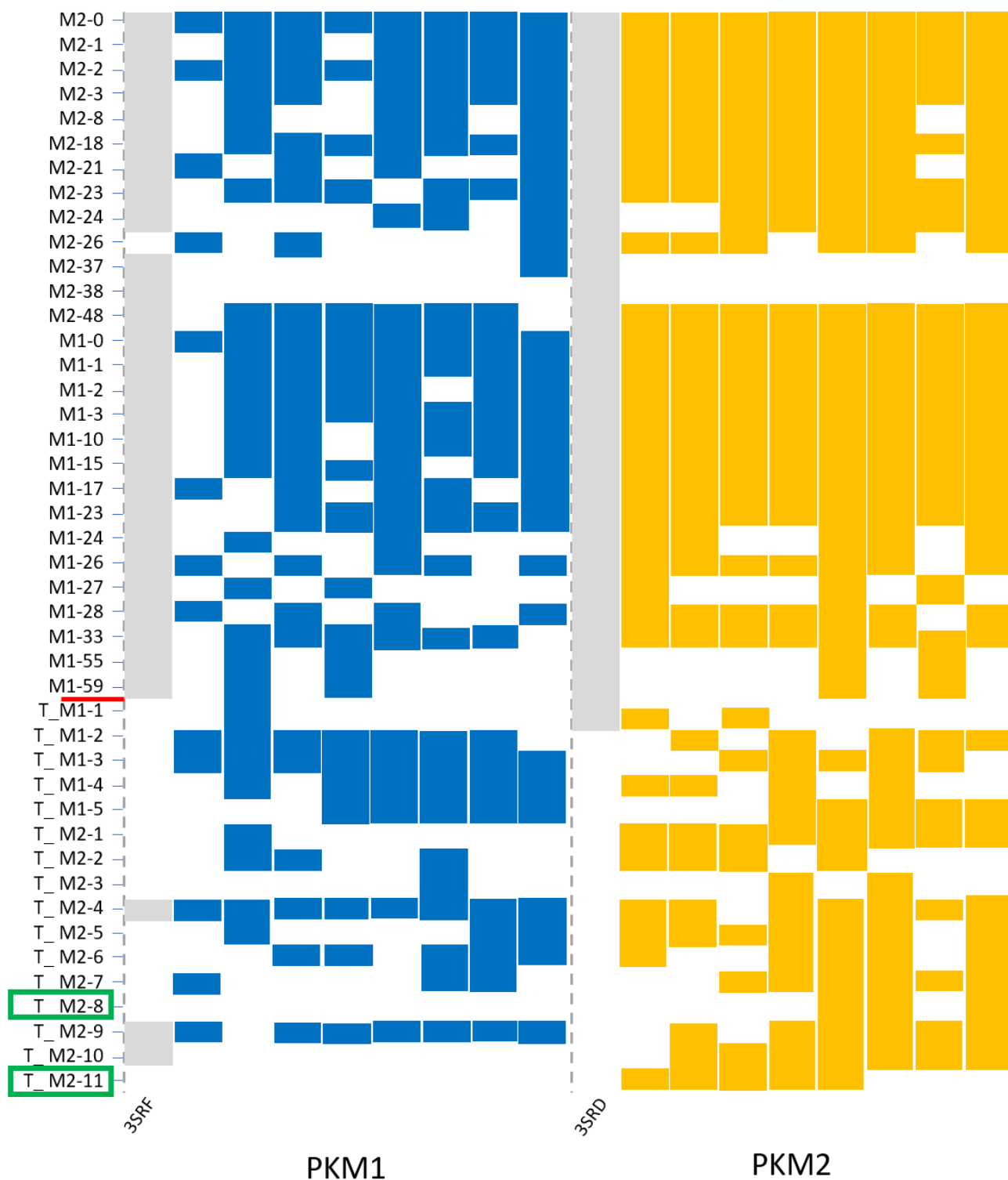


Figure 40 : Représentation schématique d'un échantillon de poches détectées avec DoGSite. Les poches ont été détectées à partir des structures 3SRF (PKM1) et 3SRD (PKM2) (en gris) associées à 8 structures extraites des simulations Tinker-HP des deux conditions (bleu/orange pour PKM1/PKM2 respectivement). Le rectangle vert met en évidence les poches détectées uniquement avec PKM2.

Après avoir éliminé les poches communes à PKM1 et PKM2, 15 et 13 poches ont été retenues pour PKM1 (appelées M1-X, X représentant le numéro de la poche dans le logiciel DoGSite Scorer) et PKM2 (M2-X) respectivement. Ces poches, identifiées dans les structures

cristallographiques sont utilisées comme référence pour la suite de cette analyse. Pour chaque tétramère, PKM1 et PKM2-FBP, 8 structures issues des simulations moléculaires (Tinker-HP) ont été choisies aléatoirement et analysées par DoGSite Scorer. Les poches identifiées ont ensuite été comparées aux poches de référence. La comparaison se fait en analysant les résidus de toutes les poches et en les assignant à la poche de référence avec le nombre le plus commun de résidus se chevauchant. Ce critère de chevauchement des poches est basé sur un nombre maximal de résidus communs, fixé à 5, mais aussi sur l'ajout d'une valeur de ratio du chevauchement correspondant au rapport entre ce nombre maximal de résidus et le nombre total de résidus correspondant à la poche prédite, fixé à 0,25 (c'est-à-dire moins de 25 % d'identité de séquence totale). Ces poches ont été nommées de la même manière que les poches de référence T_M1-X ou T_M2-X, (T correspondant aux structures issues des simulations moléculaires Tinker-HP). Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **Figure 40**. Les poches déjà connues - site actif et sites de fixation des acides aminés, du FBP et du TEPP-46 - ont été détectées dans toutes les structures échantillonnées. Il faut noter que la poche présumée de fixation du FBP sur PKM1 est retrouvée dans toutes les structures échantillonnées, même si les résultats précédents suggèrent qu'elle n'est pas fonctionnelle.

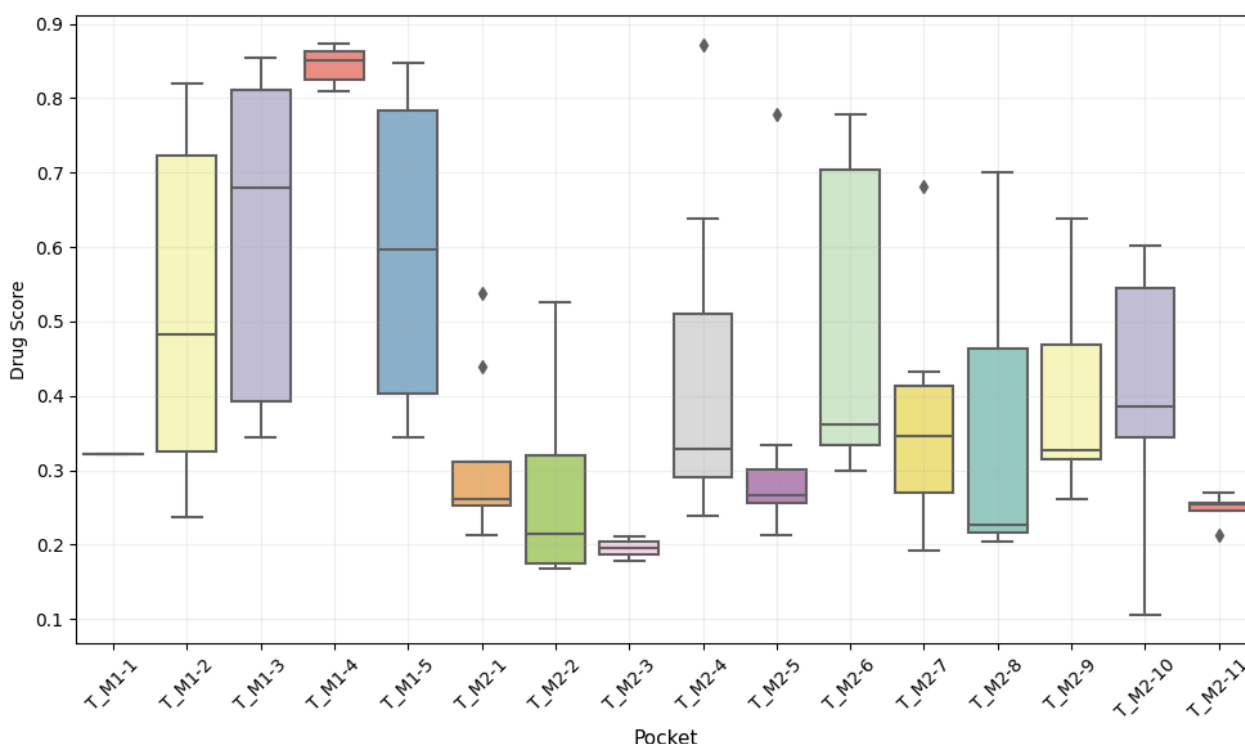


Figure 41 : Boxplot de la distribution du DrugScore pour chaque nouvelle poche obtenue par notre échantillonnage structural. Les nouvelles poches ont été trouvées à partir de la sélection de certaines structures de la dynamique moléculaire de PKM1 (M1-X) ou PKM2 (M2-X) qui n'avaient pas été trouvées sur les structures initiales 3SRF et 3SRD.

Les différentes poches détectées à partir des deux structures cristallines initiales, sont détectées soit (1) dans un grand nombre des structures échantillonnées (i.e. 'M2-0', 'M2-2', 'M1-0' ou 'M1-33'), soit (2) dans quelques-unes d'entre elles, comme 'M2-37' ou 'M1-55'. Cette diversité permet de valider l'utilisation de simulations moléculaires avec échantillonnage adaptatif, mais il est à préciser qu'aucune de ces poches initiales contenant des résidus spécifiques des exons de PKM1 et PKM2 n'est spécifique d'une isoforme. Cette stratégie a permis d'identifier 11 nouvelles poches cryptiques sur PKM2. Deux poches sont particulièrement intéressantes ('T_M2-8' et 'T_M2-11') car elles sont spécifiques du tétramère de PKM2 lié au FBP. La poche 'T_M2-8' occupe un volume moyen de 174 A³ associé à un score de druggabilité moyen de 0,37 à 0,45, déterminé d'après le volume, l'hydrophobicité et l'accessibilité de la poche d'après les analyses réalisées avec DogSite (voir la **Figure 41**). La

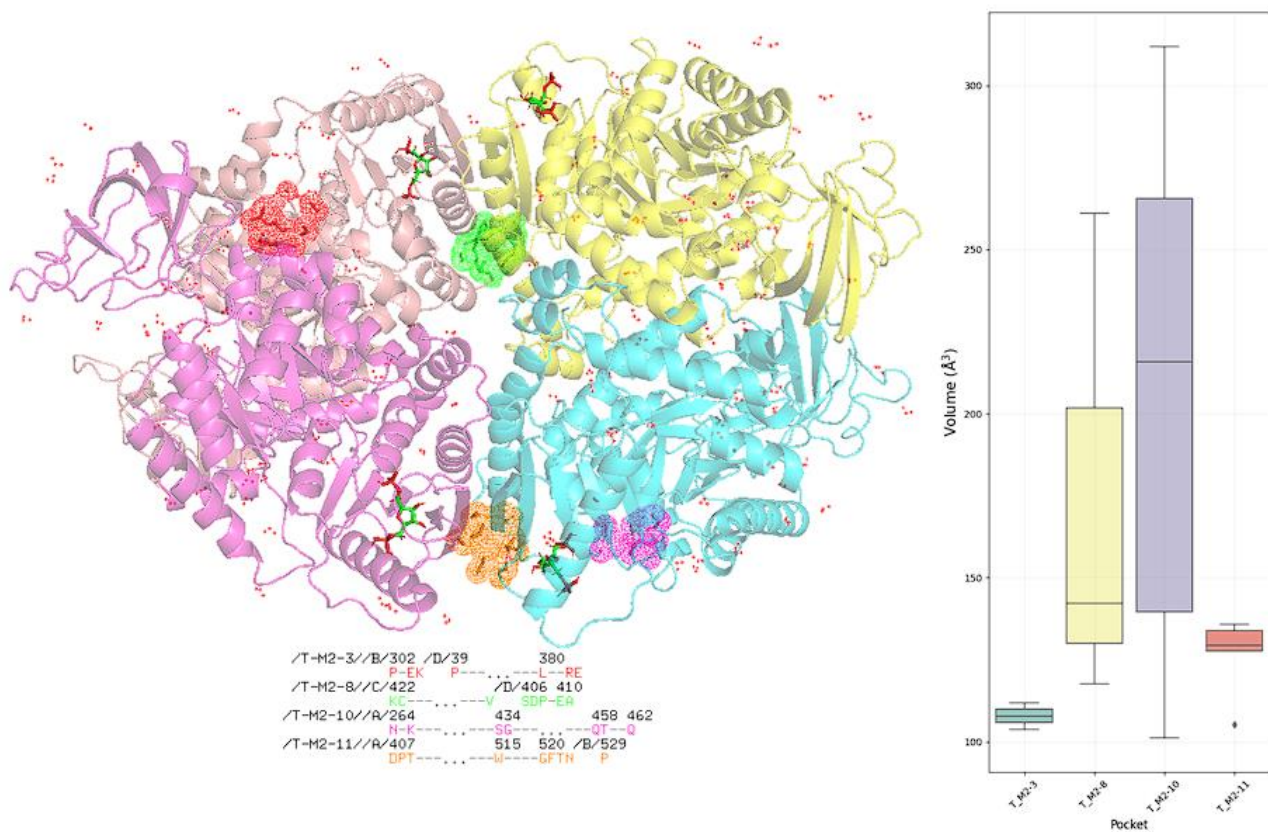


Figure 42 : Structures et propriétés de nouvelles poches potentielles spécifiques de PKM2 déterminées par un petit échantillon des simulations Tinker-HP. Les résidus impliqués dans les structures des poches sont représentés à gauche avec les couleurs correspondantes à la visualisation structurale de la structure cristalline initiale. Les volumes de chaque cavité sont montrés à droite avec une représentation en box-plot.

T_M2-11' occupe un volume de 126 A³ avec un score de druggabilité de 0,25. Deux autres poches, 'T_M2-3' et 'T_M2-10' sont également plus fréquemment détectées pour PKM2-FBP (2 et 7 détections respectivement). Mais elles semblent moins spécifiques par la détection de chacune

d'entre elles sur une seule structure de PKM1 (à un ratio de chevauchement de 0,38 et 0,41 respectivement). Néanmoins leur volume moyen et leur score de druggabilité sont indiqués notamment pour 'T_M2-10' (voir **Figure 42**). Trois de ces poches (sauf 'T_M2-10') sont localisées à un croisement entre deux chaînes de la structure tétramérique de PKM2-FBP. Par ailleurs, les poches 'T_M2-3' et 'T_M2-11' contiennent certains résidus qui semblent impliqués dans des interactions étroites entre les chaînes à l'intérieur du tétramère, ce qui pourrait suggérer qu'elles interviennent dans la structuration du tétramère PKM2.

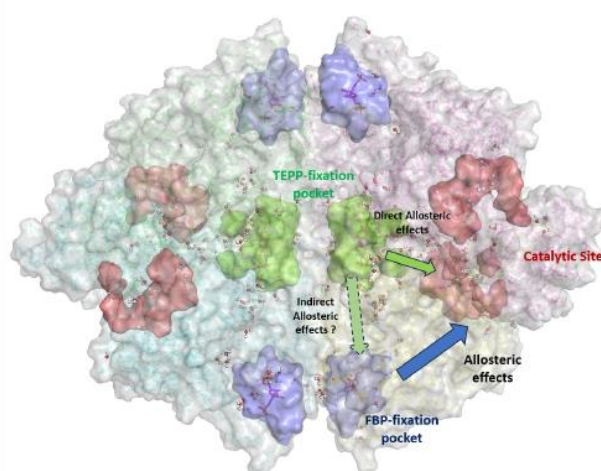
2.6. Publication

High-resolution Molecular Dynamics Simulations of the Pyruvate Kinase Muscle Isoform 1 and 2 (PKM1/2)

Quentin DELOBELLE^{[1][2]}, Théo JAFFRELOT INIZAN^[2], Olivier ADJOUA^[2], Louis LAGARDERE^{[2][3]}, Frédéric CELERSE^{[2][4]}, Vincent MARECHAL^{[1]†} Jean-Philip PIQUEMAL^{[2][5]†}

Glucose metabolism plays a pivotal role in physiological processes and cancer growth. The final stage of glycolysis, converting phosphoenolpyruvate (PEP) into pyruvate, is catalysed by the pyruvate kinase (PK) enzyme. Whereas PKM1 is mainly expressed in cells with high energy requirements, PKM2 is preferentially expressed in proliferating cells, including tumor cells. Structural analysis of PKM1 and PKM2 is essential to design new molecules with anti-tumoral activity. To understand their structural dynamics, we performed extensive high-resolution molecular dynamics (MD) simulations using adaptive sampling techniques coupled to the polarizable AMOEBA force field. Performing more than 6 μ s of simulation, we considered all oligomerization states of PKM2 and propose structural insights for PKM1 to further study the PKM2-specific allostery. We focused on key sites including the active site and the natural substrate Fructose Bi-Phosphate (FBP) fixation pocket. Additionally, we present the first MD simulation of biologically active PKM1 and uncover important similarities with its PKM2 counterpart bounded to FBP. We also analysed TEPP-46's fixation, a pharmacological activator binding a different pocket, on PKM2 and highlighted the structural differences and similarities compared to PKM2 bound to FBP. Finally, we determined potential new cryptic pockets specific to PKM2 for drug targeting.

Highlights



- Comparative analysis of model from native forms of PKM1 and PKM2.
- More than 6 μ s simulation-time in AMOEBA force field, close to biological properties.
- Structural comparison showing specific allosteric effect of FBP on PKM2.
- Structural effect of TEPP-46 on similar pockets as FBP, but from a different fixation site.
- First structural model of tetrameric PKM1 and all states of PKM2.
- Identification of new pockets specific to PKM2.

Introduction

In normal mammalian cells, ATP is produced by both glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). However, in most tumor cells ATP is produced mainly by glycolysis, even in the presence of oxygen^[1]. One of the advantages of preferential activation of glycolysis is the accumulation of metabolic intermediates useful for tumor cell proliferation, such as molecules required for the biosynthesis of nucleic acids, proteins, lipids, and lactate required to balance the NAD⁺/NADH redox balance^[2]. Glycolysis is a metabolic process encompassing 10 different steps^[3]. It produces two molecules of ATP (adenosine triphosphate), two molecules of pyruvate and two molecules of NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) per molecule of glucose. The final stage of glycolysis is a rate-limiting

[1] Centre de Recherche Saint-Antoine - Team "Biologie et Thérapeutique du Cancer", Paris, UMRS_938 INSERM

[2] Laboratoire de Chimie Théorique - Sorbonne Université, Paris, UMR 7616 CNRS

[3] Sorbonne Université, IP2CT, FR2622 CNRS, F-75005, Paris, France

[4] Sorbonne Université, CNRS, IPCM, Paris, France.

[5] Department of Biomedical Engineering, The University of Texas at Austin, USA

[†] These authors contributed equally. vincent.marechal@sorbonne-universite.fr, jean-philip.piquemal@sorbonne-universite.fr

and irreversible phase that converts phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate. This reaction is catalyzed by pyruvate kinase (PK). There are 4 tissue-specific isoforms in mammals: PKL (Pyruvate Kinase Liver-type) is expressed in the liver, kidney, and intestine tissues, and PKR (Pyruvate Kinase in Red-blood cells) in erythrocytes^[4]. Whereas PKM1 (Pyruvate Kinase Muscle isoform 1) is expressed in tissues with high energy requirements such as brain, heart, and muscle tissues^[5], PKM2 (Pyruvate Kinase Muscle isoform 2) is preferentially expressed in proliferating cells such as embryonic cells and tumor cells^[6]. These two isoforms are encoded from the same gene, PKM, which contains 12 exons by alternative splicing generating PKM1 (exon 9) or PKM2 (exon 10)^[7,8]. PKM1 and PKM2 encompass a total of 531 amino acids while differing by 22 of them^[9].

PKM1 is a constitutive tetrameric active enzyme with a high affinity for PEP. Conversely, PKM2 exists in three different forms depending on the cellular compartments: an inactive monomer, a nuclear dimer associated with a low enzymatic activity and a cytoplasmic active tetrameric form. Following the binding of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), the allosteric activation of PKM2 promotes its tetrameric form.^[10] Additionally, the dissociation of the tetramer favors the accumulation of the PKM2 dimer, which exhibits pro-tumor activity^[11]. The PKM2 tetramer itself is also known to oscillate between two structural organizations: a less active tight (T) form and a fully activated relaxed (R) form. The relative prevalence of these forms is directly associated to the PK immediate environment and the presence of regulating metabolites. PKM1 and PKM2 structural differences may explain why PKM1 is not regulated by allosteric activator^[12]. On the opposite, PKM2 enzymatic activity is highly regulated by many endogenous metabolites. It is important to point out that such metabolites can either have the role of an activator (for example: serine^[13], SAICAR (Succinylaminoimidazole-carboxamide riboside^[14]) and FBP^[15]) or the role of an inhibitor (for example tryptophan, the T3 thyroid hormone^[16] or HMGB1^[17] for example but as another protein). Each monomer of PKM2 contains 3 domains (A/B/C), a short N-terminal region, and an active site. The A domain constitutes the main part of the protein (from residues 44-116 to 219-389). This region is important since the dimeric form of PKM2 is formed through the weak bonding of two of its monomers interacting with this region. The B domain is characterized by an external region formed by residues 117-218. It constitutes a part of the active site of PKM2 (PEP fixation) which is structured by an interface between A and B domains. Finally, 44 of the 56 amino acids encoded by PKM2-specific exon 10 are located in the C domain, which encompasses the allosteric binding site and stabilizes the quaternary structure of the tetrameric form of PKM2. The N-terminal region is localized on residues 1-43 of PKM2^[18]. PKM2's central role in tumor processes makes it a prime target for the design of new anti-tumor molecules and several drugs have been proposed to modulate PKM2 activity and oligomeric state. They act as an activator promoting the active R-form (TEPP-46, DASA-58^[19]). Consequently, it is essential to have a better understanding of the structural dynamics of PKM1 and PKM2 and to identify the conserved sites that could lead to the design of new anti-tumor molecules. Notably, it is especially relevant to investigate the structure of the PKM1 isoform to understand its main structural differences compared to PKM2 to propose

molecules capable of promoting the conversion of PKM2 from the pro-tumor dimer into an active tetramer.

In this study, we provide all-atom high-resolution molecular dynamics simulations of both PKM1 and PKM2 enzymes and propose a comparative analysis of their key residues and functional sites. In particular, our study focuses on the characterization of the FBP-binding pocket and on the PEP active site which are both closely related to the specificity of activity of both proteins. To provide simulations approaching realistic biological timescales, we use adaptive sampling molecular dynamics coupled to a high-resolution polarizable force field. Thanks to such methodology^[20-23] coupled with the use of the GPU-accelerated Tinker-HP molecular dynamics package^[24,25] (GPU=Graphics Processing Unit), it is possible to analyze more broadly the structural dynamics and weak interaction profiles^[26-28] within these proteins. We therefore evaluate the structural dynamics of PKM1 and PKM2 in their different oligomeric state, notably in the presence or absence of their known effectors.

Results

In this section, we analyzed the large-scale structural dynamics studies of PKM1/2.

Understanding PKM1/2 structuring during the oligomerization process

PKM2

First, we compared the structural variations between PKM1 and the different oligomerization states of PKM2 by analyzing the Root-Mean Square Deviation (RMSD) and the Radius of Gyration (RG). The results revealed an increasing correlation of RMSD and RG as PKM2 oligomerization complexified. Figure 1A displays the variations of RG as a function of RMSD in the case of the PKM2 monomer. We observed a specific region of large variations of RMSD and RG (2-7Å and 24.75-26.50Å respectively) during the simulation. High densities of structures were found at RMSD 3.6Å and RG 25.5Å. Overall, the monomeric state was characterized by an important variability as suggested by the absence of global correlation between RMSD and RG. Since the simulations enabled us to explore vast conformational spaces, this indicated that the monomer was poorly structured. In contrast, the dimer displayed a narrower distribution of RMSD around 2.5-5.5Å (see Figure 1B) was observed with some larger variations of RG at 31-40Å. Overall, a single high density of structures is observed with a significant correlation between RMSD and RG, a sign of the superior structuring of the PKM2 dimer compared to its monomer. In the case of the apo PKM2 tetramer (see Figure 1C), we observed a larger RMSD range compared to the dimer (2.2-7.4Å) which correlated with higher RG values (40.7-45.5Å). Again, a concentration of high densities was found but an almost linear RMSD/RG correlation was observed. This observation was even more striking when the PKM2 tetramer was bound to FBP (see Figure 1D). Indeed, FBP appeared to have a stabilizing effect on the enzyme structural variability as indicated by the more restricted distribution of RMSD values (from 1.7 to 5.2Å). Again, an extremely dense region of structures (3.5 density at 3.75Å RMSD and 43.75Å RG) was found that demonstrated the full structuring of the enzyme.

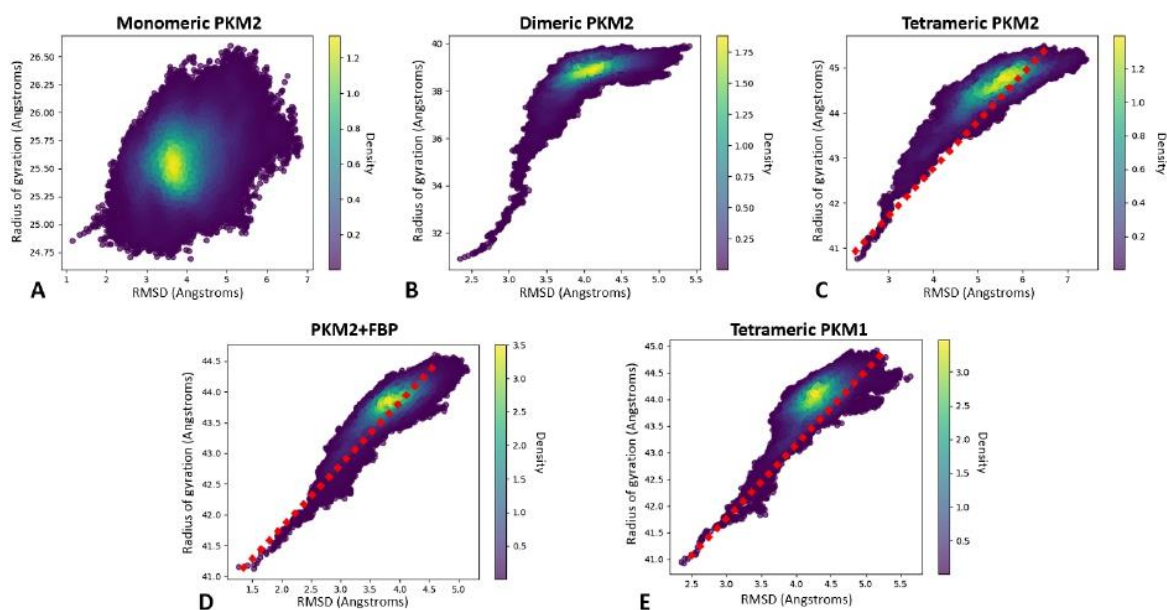


Figure 1. Global analysis of the RMSD vs RG shows structural changes and of the PKM2 volume during the oligomerization process. We also analyze PKM1/2 profile similarities. (A-D) Graphical representation of the RMSD/RG analysis for each states of PKM2 molecular dynamics simulation : monomer (A), dimer (B) and free-tetramer (C) or associated to FBP (D), (E) Same representation for the tetrameric form of PKM1.

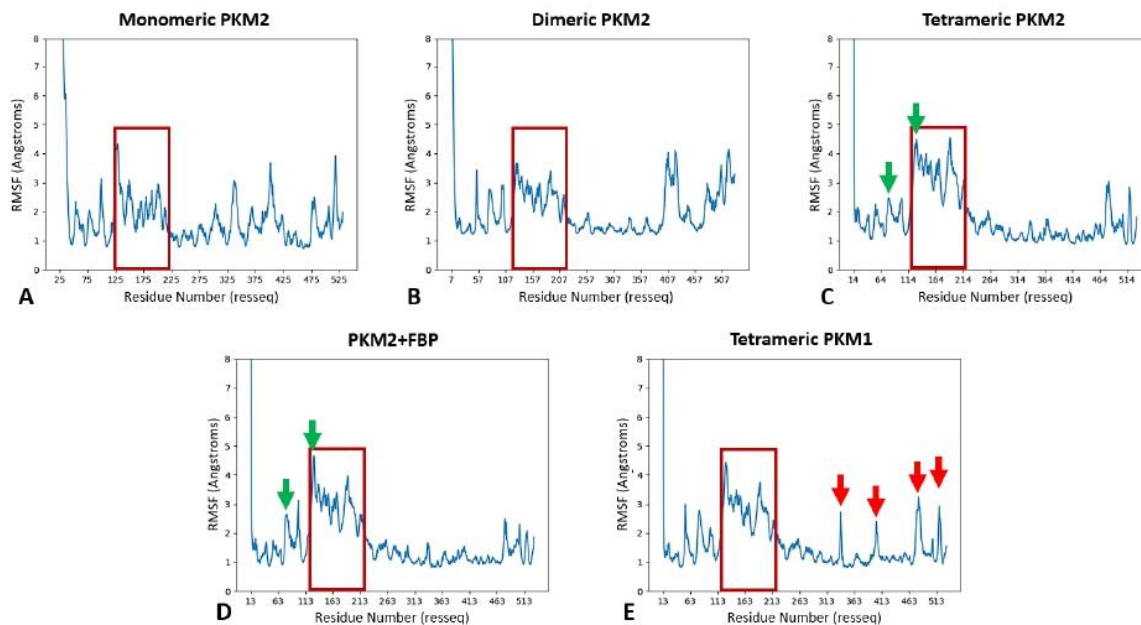


Figure 2. The RMSF analysis shows PKM2's structuring during the oligomerization and FBP-fixation processes and confirms tetrameric PKM1/2 analogies on key domains. (A-D) Graphical representation of the RMSF analysis for each state of PKM2 molecular dynamics: monomer (A), dimer (B) and free-tetramer (C) or associated to FBP (D), (E) Same representation for the tetrameric form of PKM1. Here the PKM2 domains contain the following residues : 44-115 for A1, 116-217 for B (red square), 218-388 for A2 and 389-531 for C-domain. Local differences between apo and holo PKM2 forms bound to FBP (green arrows), and between holo form of PKM2 bound to FBP and PKM1 respectively (red arrows) are indicated.

PKM1

We compared the different PKM2 structures with PKM1 tetramer. As shown in Figure 1E, the PKM1 profile appeared to be close to the tetrameric PKM2 when associated to FBP. Indeed, RMSD values were restricted between 2.5 and 5.6 Å as RG ranged from 41 to 45 Å. Accordingly, an almost identical dense region of structures has been observed compared to PKM2-FBP (3.4 density at 4.25 Å RMSD and 44 Å RG) as the RMSD/RG correlation was almost linear. Altogether, these results confirmed a progressive structuring and correlation between the structural modulation of PKM2 as the oligomerization process increased. Importantly, we observed a close structural proximity between the tetrameric PKM1 and the tetrameric PKM2-FBP.

PKM1/2: Analysis of residues and domains stability during the MD simulations

PKM2

The next step investigated the stability between key amino acids of both PKM isoforms as a marker of the flexibility of specific domains. To do so, we studied the Root-Mean Square Fluctuation (RMSF) to quantify the mean deviation for each residue throughout the simulations by comparison with their position in the PDB reference. The first immediate conclusion linked the enzymes' stability to the oligomerization process. Indeed, in the case of the PKM2 monomer (see Figure 2A), our results showed an important flexibility affecting the entirety of the structure. The greatest flexibility was observed in the B-domain (residues 116-217), where RMSF values reached higher than 4 Å, indicating significant variability. We also observed a large flexibility for three large regions on the A1-domain (residues 45-115) and on additional residues (residues 290-425 and 475-525) that composed a large part of the A2- and C- domains. A structural stabilization was observed for the dimeric state of PKM2 (see Figure 2B). The A2-domain (residues 290-400) has lost most of its flexibility with RMSF values centered at 1.5-2 Å compared to the monomer values that range beyond 3 Å. However, the dimer retains some variability in the A1 (residues 50-107) and C-domains (residues 400-457 and 470-531), which limits full enzyme structuring, achieved only in the apo PKM2 tetramer (see Figure 2C). Here, the A1- and C-domains residues lost most of their structural variability compared to the dimeric state. A few conserved pockets exhibiting some flexibilities were found around residues 30-110 and 470-531 that participate in the structure of the active site and FBP-fixation pocket of PKM2.

Considering its central role in the making of the active site, it is also important to note that each oligomeric state conserved an important variability in the B-domain. We then evaluated the allosteric effect of the fixation of FBP on the tetrameric PKM2 (see Figure 2D). If our results showed global RMSF profiles that are extremely close between the holo and apo systems, local differences were observed. Indeed, a further stabilization of the FBP fixation pocket was found at residues 470-531 while a relative flexibility for the A1 (residues 70-110) and B-domains and more precisely for certain residues located at 75-80 and 115-120 was observed. These residues correspond to key amino acids involved in the active site (see green arrows, Figure 2C).

PKM1

Our results showed a close structural homology between the PKM1 tetramer (see Figure 2E) and the PKM2 holo form bound to FBP, notably in the B-domain. However, some specific regions remain different. Some couples of residues (residues 325-335, 390-405, 470-490, 515-525) present a relatively high flexibility (see red arrows, Figure 2E). Altogether, these results gave a full picture of the local structural effects of the progressive structuring of PKM2 during the oligomerization process. It confirmed the strong structural homologies between PKM2-FBP and PKM1.

Structuring of the active site and oligomerization state of PKM2

PKM2

We next focused on the PKM2 major key reactivity sites and started by analyzing the active site of the enzyme. To do so, the distances between key couples of residues defining structural markers were studied to evaluate the flexibility of the B-domain (by targeting alpha-carbon). Notably, we measured the distance between residue 53, belonging to the A-domain, and residue 129 belonging to the B-domain. These two residues are located at the external part of the active site. They were chosen to characterize the global motion of the B-domain. To measure the active site structuring, we monitored the distance between residues 178 and 296 (see Figure S1 in Supplementary informations) that are localized at the junction between the A- and B- domains. Simulations showed that the active site was progressively structured during the PKM2 oligomerization process. While the monomeric state (see Figure 3A and 3F) presented a restricted distance between residues 53 and 129 (around 20.5 Å), a bimodal distribution of distances was observed between residues 178 and 296 at 8 and 11 Å. Such a bimodal distribution, presented in Figure 4 for the monomeric state of PKM2 was present in the other PKM2 oligomers. Looking at the dimer (see Figure 3B and 3G), we observed a profile similar to the monomer for the distance between residues 53 and 129. A different bimodal distribution was observed for the distance between residues 178 and 296 (i.e. at the junction of A- and B- domains) with values centered at 5 and 7.5 Å, which indicates a more constrained spatial extension of the active site (see Figure S2 in Supplementary informations). Then we finally considered the PKM2 tetramer in its apo state (i.e. without its natural ligand, see Figure 3C and 3H). Here, we noticed a higher distance between residues 53 and 129 coupled to a distance between residues 178 and 296 of 8-8.5 Å. Such a result indicated a higher flexibility of the B-domain that was linked to a stronger structuring of the active site of PKM2. This observation aligns with the documented activities of the various oligomers^[10]. When PKM2 was associated with FBP, i.e. forming the holo state (see Figure 3D and 3I), we observed a higher distance between residues 53 and 129 compared to the apo state (mean value of 28.2 Å compared to 24.1 Å for the apo-PKM2). The distance between residues 178 and 296 was similar to the apo tetramer but with a slightly narrower distribution centered at 8.25 Å. This was in line with the known stability of the PKM2 tetramer when bound to FBP^[15].

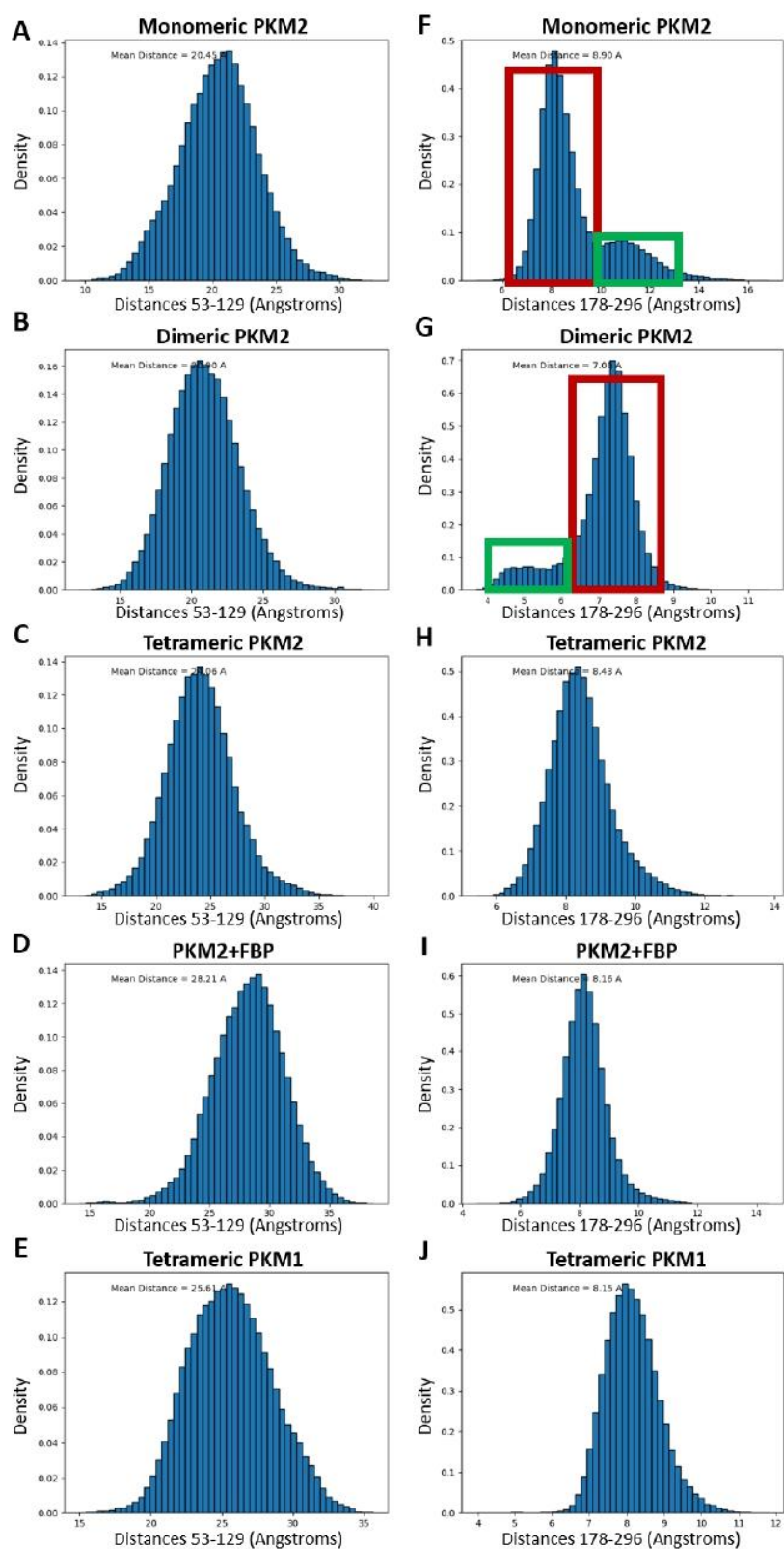


Figure 3. The structuring of the active site is linked to the oligomeric conformation of PKM1/2. (A-E) Graphical representation of the distance between residues 53 and 128 (in the active site) for each state of PKM2 within the simulations of the monomer (A), dimer (B) and tetramer-*apo* (C) or holo PKM2 with FBP (D), but also for the tetrameric state of PKM1 (E). (F-I) Same representation for residues 178 and 296 with the monomer (F), dimer (G) and *apo* (H) or holo-FBP (I) but also for the tetramer of PKM1 (J).

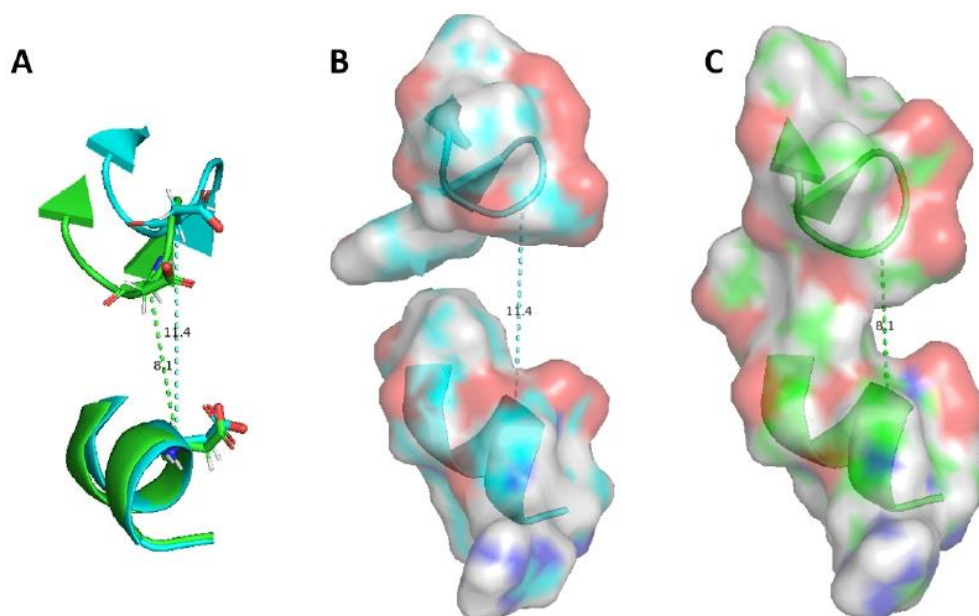


Figure 4. Dynamic of the internal part inside the active side of monomeric PKM2. (A) Graphical representation of the distance between residues 178 and 296 for two different frames of the bimodal distribution, (B) Surface model showing the high-distance state ($\approx 11.5\text{\AA}$) (C) or the more enclosed one ($\approx 8\text{\AA}$). Three amino acids before and after residues 178 and 296 are represented to obtain a better surface model.

PKM1

Finally, we characterized the active site in the tetrameric state of the PKM1 protein to establish a comparison with its PKM2 counterpart (see Figure 3E and 3J). The observed distance profiles were found to be intermediate between the values observed from the apo and holo-FBP state of the PKM2 tetramer. Concerning the external part of the active site, the distance between residues 53 and 129 was lower compared to holo-PKM2 while remaining higher than the distance measured for apo-PKM2, which indicated a higher structuring of the PKM1 active site compared to free-PKM2. In the same line, the junction at the A-B domains (distance between residues 178 and 296) exhibited a very similar profile compared to the holo-PKM2 structure (i.e. mean of 8.15\AA vs 8.16\AA for the free-tetrameric-PKM2 state). Overall, our data showed a net effect of the FBP allosteric effector on tetramer active site structuring that appeared relatively similar to the PKM1 isoform.

Structural Dynamics of the FBP-fixation pocket : Allosteric and Oligomeric modulations

PKM2

Here, we compared the structuring of the region containing the FBP-fixation site of PKM2 with the homologous region in PKM1. The distance between residue 433 and 518 has been studied to evaluate the global flexibility of the FBP-fixation site since these residues are located at the extrema of the pocket (see Figure S3 in Supplementary informations). We first compared each possible PKM2 oligomeric states used for our simulations. The results obtained for the monomer (see Figure 5A) showed a highly

variable profile of distances with a large density of structures centered at 7.5\AA that were also coupled with a very large proportion of higher distance at $8.5\text{-}13\text{\AA}$. This variability suggests that the FBP-fixation pocket is not well-formed or stable in the monomeric state of PKM2. Considering the PKM2 dimeric form (see Figure 5B), we observed higher distances compared to the monomeric state. More precisely, a unique and wide distribution was found with distances ranging from 13 to 21\AA which was not in favor of an overall well-structured FBP-fixation pocket. A bimodal distribution for the distance between amino acids 433 and 518 distance was observed in the apo PKM2 (see Figure 5C, red and green boxes), with a more preponderant population of structures centered at 12.5\AA (at ≈ 0.2 density) and a second one at 9.5\AA (at ≈ 0.115 density). This particular distribution is a signature for the co-existence of two distinct states for the tetrameric PKM2. For PKM2 bound to FBP, we noticed a complete inversion of the observed 2-states distribution compared to the apo-PKM2 state (see Figure 5D). In this case, a major population of structures was centered around a mean distance at $\approx 8.5\text{\AA}$ (0.18 density) whereas a second population was center at $\approx 7\text{\AA}$ (≈ 0.36 density). These results confirmed that FBP played a major role in the structuring of the FBP fixation pocket.

PKM1

Here we compared the FBP-binding region of PKM2 to its PKM1 counterpart. The data obtained from the tetrameric state of PKM1 (see Figure 5E) showed a distribution of the distance between residues 433 and 518, that was centered at 13.7\AA , a much higher distance than the one observed in apo-PKM2 (i.e. at 11.7\AA) and in holo-FBP PKM2 (i.e. at 8.46\AA). These data confirmed that the putative allosteric site in PKM1 did not appear to be structured enough to have a viable fixation pocket to bound FBP. Examples of the

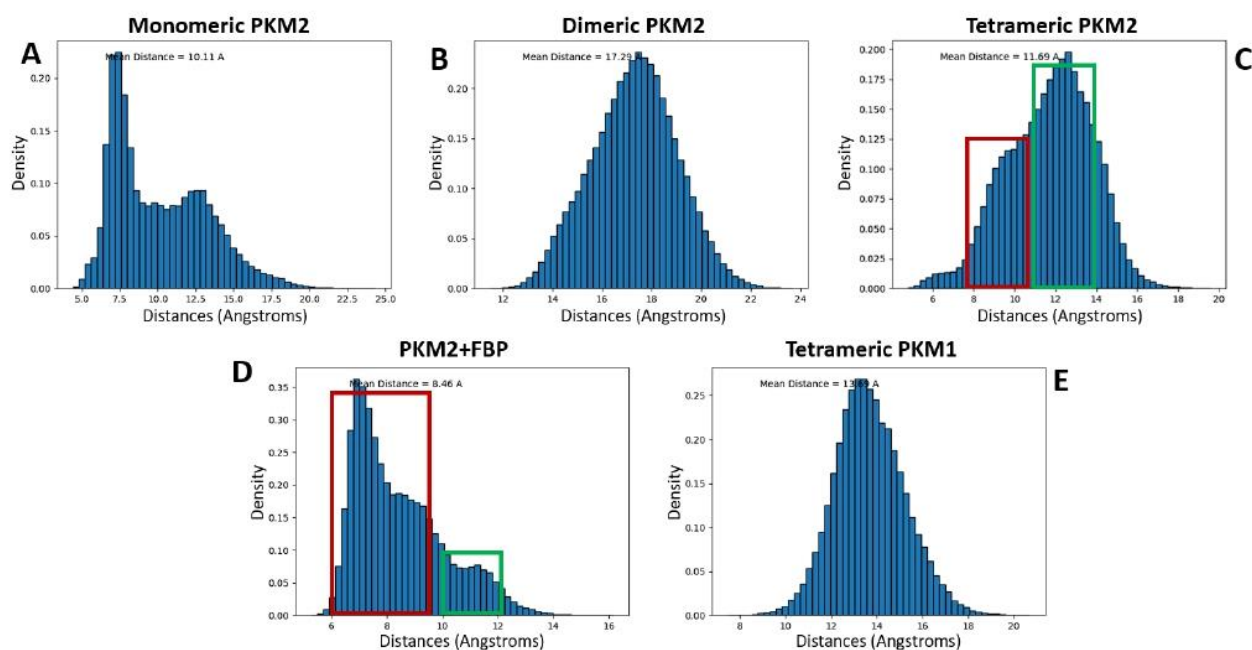


Figure 5. Global structuring of the FBP-fixation pocket during PKM2 oligomerization and FBP-docking process and comparison with PKM1 possible fixation site. (A-D) Graphical representation of the distance between residues 433 and 518 (localized at the FBP-allosteric pocket) for each oligomeric state or condition of PKM2 molecular dynamics with the monomer (A), dimer (B) and tetramer-free (C) or associated with the allosteric molecule FBP (D). (E) Same representation for the tetrameric form of PKM1.

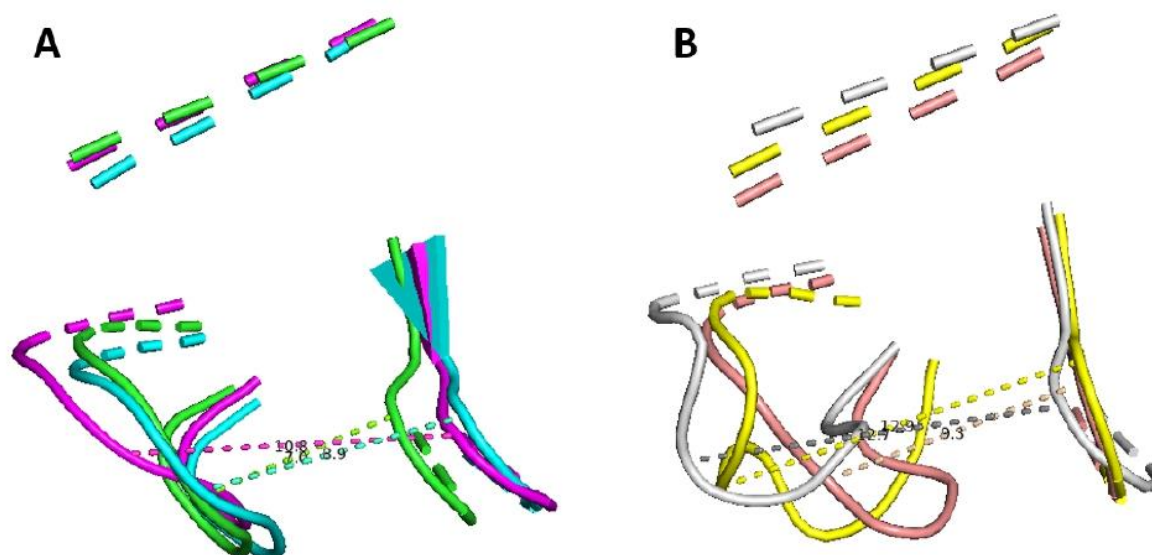


Figure 6. Dynamic of the FBP-fixation pocket for PKM1 and PKM2. (A) Cartoon model of three frames aligned during simulation of PKM2 bound to FBP highlighting the three major states at $\approx 7/9/11\text{\AA}$ in comparison to (B) two frames obtained from the simulation of free-tetramer of PKM2 (in light pink and grey, highlighting the two states at $\approx 9/13\text{\AA}$) and a single state of PKM1 in yellow at $\approx 13\text{\AA}$.

structural comparison between free and FBP-bound PKM2 and PKM1 can be seen in Figure 6 and **Figures S4 and S5 of Supplementary informations** for surface model. Those models showed on one hand the open pocket in the case of the tetrameric state of PKM1 (with a loop orientated in the external side) but also the importance of FBP to structure such region in PKM2 since its absence let loose the regulatory loop necessary for the stability of this pocket.

PKM2 associated with the TEPP-46 pharmacological activator

For our next structural analysis, we studied the structure dynamics of PKM2 associated with TEPP-46, a pharmacological activator of PKM2 tetramerization. TEPP-46 binds at the interface of two monomers through their A-domains (see **Figure S6 in Supplementary informations**, red zone), an interaction pocket different from that of the FBP (see **Figure S6 in Supplementary informations**, orange frame). Such differences also impact the stoichiometry of TEPP-46 compared to FBP since 4 molecules of FBP can bind the tetramer of PKM2, and only two molecules of TEPP-46 can bind it at the same time. First, the RMSF data (see Figure 7A) gave a similar profile to the one observed for PKM2-FBP with minor local differences (residues 390-405 and 470-490), that were located in the areas of interaction with TEPP-46 and in some residues for FBP-fixation pocket respectively. As for the studies of PKM2 tetramers, the B-domain (residues 116-217) retained the same flexibility profile as the one observed in the presence of FBP. To gain additional structural information, we studied in more detail the active site of PKM2 (see Figure 7B). For the distance between residues 53 and 129, similarities were noted between PKM2 bound to FBP and PKM2 linked to TEPP-46. The data showed that the distance at the A-B junction (residues 178 and 296) was very similar to the one observed when PKM2 was linked to FBP. Conversely, the fixation of TEPP-46 had an opposite effect on the movement of the B-domain. Indeed, the distance between amino acids 53 and 129 was reduced and exhibited a bimodal profile at 12 and 19 Å indicative of a closed proximity between the B- and the A- domain. Altogether, this was consistent with an improved enzymatic activity for TEPP-46 bound to PKM2 compared to PKM2 tetrameric-free state. Finally, the structural analysis of the FBP-pocket for the PKM2 tetrameric state bound to TEPP-46 (see Figure 7C) showed that the distance between residues 433 and 518 was extremely close (i.e. centered at ≈ 7.5 Å) compared to the one present in the FBP-PKM2 structure. However, in the case of PKM2 bounded to TEPP-46, no ligand was localized in this space since the TEPP-46 fixation pocket is located in a different region of PKM2.

All the important site for PKM2 are presented in **Figure S9 at Supplementary informations**, with further structural view on TEPP-46 fixation site with a small difference between PKM1 and PKM2 even with common residues.

Comparative analysis of druggability: searching for PKM2-specific cryptic pockets

We used the dynamic models built previously to identify new cryptic pockets, i.e. three-dimensional structures that are generally hidden or partially accessible and could be targeted by new pharmacological modulators. Given its importance in tumor pathologies, we wanted to identify pockets specific to the tetrameric form of PKM2. We first searched for these pockets using the crystallographic structures of the PKM1 tetramer (3SRF) and the FBP-bound PKM2 tetramer (3SRD). The search was conducted using DoGSite Scorer software, an automated pocket detection and descriptor calculation tool^[29]. 63 and 50 pockets were detected for PKM1 and PKM2 respectively. Several known pockets were found: the active site, the binding pocket for regulatory amino acids (Ser, Phe), the FBP binding pocket and the TEPP-46 binding site (Figure 8). After eliminating the pockets common to PKM1 and PKM2, 15 and 13 pockets were retained for PKM1 (called M1-X, with X representing the pocket number in the DoGSite Scorer software) and PKM2 (M2-X) respectively. These pockets, identified in the crystallographic structures, are used as a reference for the remainder of this analysis. For each tetramer, PKM1 and PKM2-FBP, 8 structures derived from molecular simulations (Tinker-HP) were randomly selected and analyzed by DoGSite Scorer. The identified pockets were then compared with the reference pockets. The comparison is made by analyzing the residues of all pockets and assigning them to the reference pocket with the most common number of overlapping residues. This pocket overlap criterion is based on a maximum number of common residues, set at 5, but also on the addition of an overlap ratio value corresponding to the ratio between this maximum number of residues and the total number of residues corresponding to the predicted pocket, set at 0.25 (i.e. less than 25% total sequence identity). These pockets were named in the same way as the reference pockets T_M1-X or T_M2-X, (T corresponding to the structures derived from Tinker-HP molecular simulations). The results of this analysis are shown in figure 9. The known pockets - active site and amino acid binding sites, FBP and TEPP-46 - were detected in all sampled structures. It should be noted that the presumed FBP binding pocket on PKM1 was found in all the structures sampled, even though previous results suggest that it is not functional. The different pockets detected from the two initial crystal structures, are detected either (1) in a large number of the sampled structures (i.e. 'M2-0', 'M2-2', 'M1-0' or 'M1-33'), or (2) in a few of them, such as 'M2-37' or 'M1-55'. This diversity validates the use of molecular simulations with adaptive sampling, but it should be pointed out that none of these initial pockets containing residues specific to PKM1 and PKM2 exons is isoform-specific. This strategy identified 11 new cryptic relatives on PKM2. Two pockets are of particular interest ('T_M2-8' and 'T_M2-11') as they are specific to the PKM2 tetramer bound to FBP. The 'T_M2-8' pocket occupies an average volume of 174 Å³ associated with an average druggability score of 0.37 to 0.45 (based on pocket volume, hydrophobicity and accessibility) according to analyses performed with DogSite (see **Figure S7 in Supplementary informations**). Pocket 'T_M2-11' occupies a volume of 126 Å³ with a druggability score of 0.25. Two other pockets, 'T_M2-3' and 'T_M2-

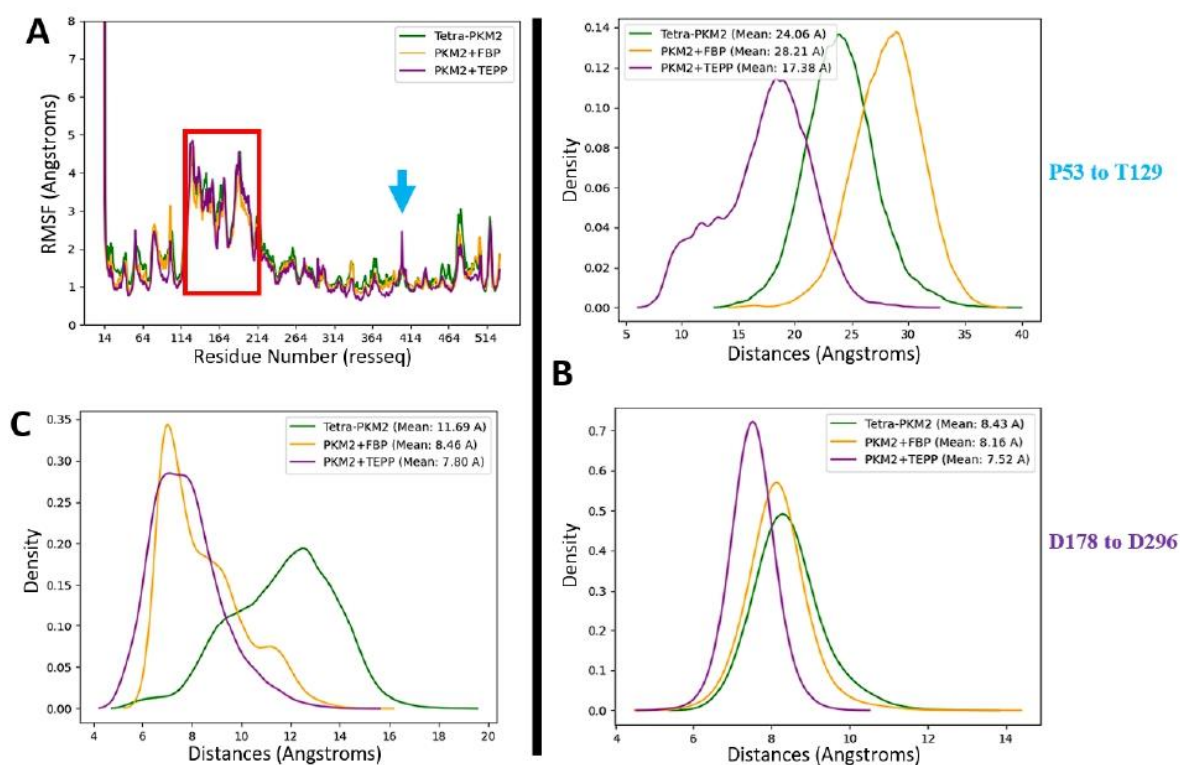


Figure 7. Structural data associated to the TEPP-46 fixation on a tetrameric PKM2. (A) Graphical representation of the RMSF analysis, (B) kernel density of the distance between residues 53 and 128 (in the active site) and (C) distance between residues 433 and 518 (localized at the FBP-allosteric pocket) for different tetrameric state of PKM2 with or without natural or pharmacological effectors.

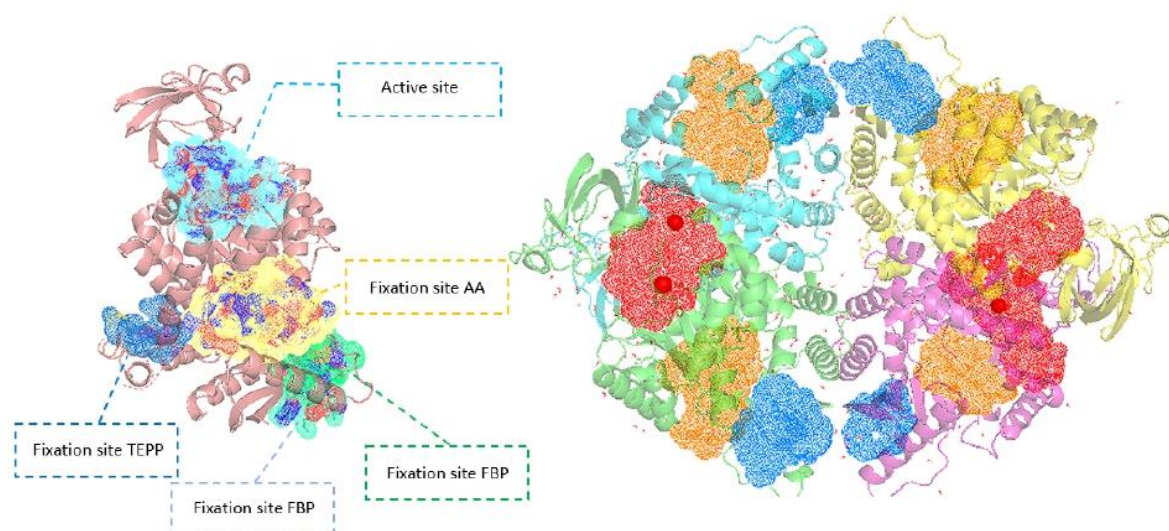


Figure 8. Representation of the major pocket locations on the 3SRF PKM1. One chain (in the left) and the tetrameric state (in the right) are both represented with their similar pockets except the TEPP-46 pocket in the case of the tetramer which is contained in a bigger pocket. Active site, FBP and amino acid fixation pocket are represented in red, blue and orange respectively in the case of the tetrameric representation.

10' were also more frequently detected for PKM2-FBP at 2 and 7 detections respectively. But they appear to be less specific, each detected on a single PKM1 structure (at an overlap ratio of 0.38 and 0.41 respectively). Nevertheless, their average volume and druggability score are indicated by their interest, particularly for 'T_M2-10' (see **Figure S8 in Supplementary informations**). Three of these pockets (not 'T_M2-10') are located at a crossroads between two chains of the PKM2 tetrameric structure. Furthermore, pockets 'T_M2-3' and 'T_M2-11' contain certain residues that appear to be involved in close interactions between chains within the tetramer, which could suggest that they are involved in the structuring of the PKM2 tetramer.

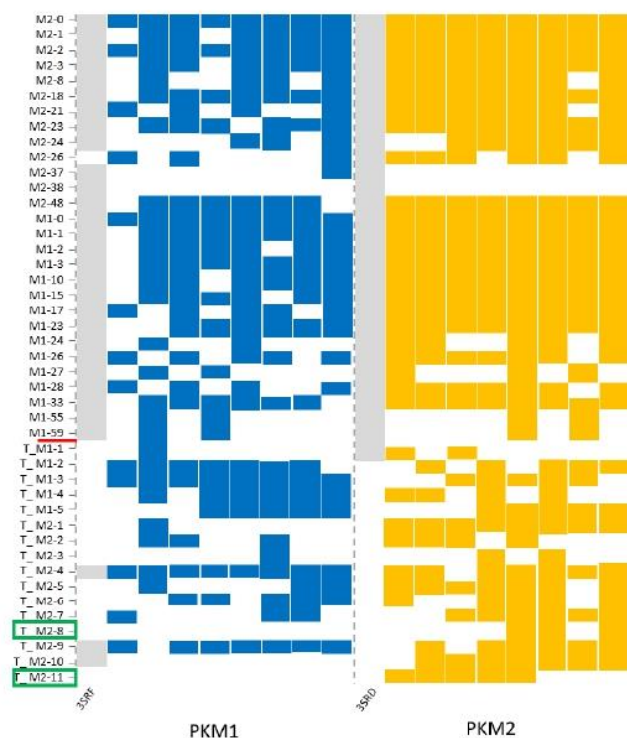


Figure 9. Schematic representation of a sampling of pockets detected with DoGSite. The pockets were detected from the 3SRF (PKM1) and 3SRD structures (PKM2) (in grey) associated with 8 structures extracted from Tinker-HP simulations of both conditions (blue/orange for PKM1/PKM2 respectively). The green rectangle highlights the pockets only detected with PKM2.

Discussion

We first compared the different oligomerization states of PKM2, ranging from monomer to tetramer and revealed an increasing stabilization of the protein in relation with higher oligomerization. We observed an increase in the linear correlation between RMSD and RG, culminating in the tetrameric holo form. Such a correlation is therefore a good marker of a conformational transition that allows to maximize the structuring of PKM2. These results are partially validated by the experimental data of Ponnusamy^[30] that provided RG and RMSD results on a PDB structure of PKM2 that is similar to our simulations monomer data. Overall, our results clearly correlate with the experimentally observed differences in enzymatic activity^[31]. The dimeric form is less active whereas the tetrameric form of PKM2

exhibits a higher affinity for its PEP substrate and a better enzymatic activity. This enhanced activity across states strongly correlates with the progressive structuring of the active site. Additional information can be found directly by studying the evolution of the RMSF profiles: starting from an extremely variable monomeric state, the dimer stabilized itself while the tetrameric form of PKM2 bound to FBP exhibits the highest level of structuring. Nevertheless, the B-domain (residues 116-217) still shows a high flexibility for each oligomeric state. This flexibility is reduced in the tetramer compared to the dimer, potentially explaining the higher substrate affinity observed in the tetramer^[32]. Further analysis of distances at key residues of the active site (53-129 and 178-296) supports this hypothesis. Indeed, the bimodal and more narrow value at the inside part of the active site of the dimeric form is extremely different from its tetramer counterpart. In the same line, the dynamically unstable internal junction at the active site of the monomer, which confirms the experimental data from Guo et al^[33] who showed reduced enzymatic activity of the monomeric state. To conclude this discussion on the oligomeric forms of PKM2, it is important to look at the amino acids localized at the FBP-fixation pocket. While the monomer and dimer exhibit large structural pocket variations preventing it from any activity, the tetramer exhibits a bimodal distribution of the structures of the FBP-fixation pocket. This is observed for the free-tetramer where the reference Gly518 residue, which is chosen for the distance measurement, is localized in a well-known regulation-loop which has been experimentally shown to be highly flexible^[34]. Such flexibility is related to interactions of close amino acids including Trp515 and Arg516 that are implicated in the regulation of PKM2 being able to generate a less active tetramer known as the T-state and an alternative and more active form, the R-state. For the T-state, this loop is externalized from the FBP-fixation pocket and can form hydrogen bonds with the other chain nearby. This is also illustrated by our simulations where we showed higher distances between residues 433 and 518. On the opposite, for the R-state, the hydrogen bonds are lost since the loop that includes Gly518 is getting closer to the FBP fixation pocket exhibiting closer distances within the simulation. This is in agreement with previous structural data that compared different isoforms of PK where the rabbit structure of PKM1 do not possess a regulatory loop correctly orientated, thus blocking the fixation of FBP^[18]. The two states observed for the tetramer in the simulations are consistent with the experimentally observed equilibrium between the two states of the tetramer PKM2, namely the R and T states^[34]. Taking into account every aspect of this comparison, our study provides good insight into the progressive structuring of PKM2 during the oligomerization process. In line with biological data^[35], our results confirm its link with the overall enzyme activity as the PKM2 oligomerization and this structuring, having a particularly important function in the case of dimer/tetramer balance, could have implications in physiological cellular metabolism but also in the context of cancer. Indeed, It is important to remember that the predominance of the dimeric state of PKM2 in tumor cells is correlated with reduced enzymatic activity compared to tetramer but also the gain of nuclear functions by its possible transport in the nucleus, which promotes the accumulation of glycolysis metabolites, the use of alternate biosynthetic pathways but also the control of different genes for tumor development^[36].

The second insight from our study is linked to the role of the natural FBP ligand in the structural regulation of PKM2 key pockets. First, the RMSD/RG profiles between the PKM2 apo and holo states exhibit a strong linear correlation in the holo-PKM2 condition. This is linked to the significant structuring effect of FBP on the tetramer which is confirmed by RMSF data. If they show very similar global profiles between both states, the holo state of PKM2 is nevertheless further stabilized in the C-terminal part of the protein that contains key residues for the fixation of FBP. It is important to note that even if FBP is docked into the PKM2 tetramer, the B-domain conserves its flexibility, especially in some small regions (Asn75, His78, Asp113, Thr114 and Arg120) implicated in the structuring of the active site. Such differences could explain the improved substrate accessibility for the active site through the allosteric effect of FBP. This is consistent with some previous theoretical results obtained on shorter molecular dynamics simulations on only one chain of two tetrameric crystal structures^[37]. The distance analysis of residues 53-129/178-296 localized at the active site validates this assumption. Overall, our results confirm that the fixation of FBP is important to maximize the structuring of the PKM2 active site thus allowing better enzymatic activity. Concerning the analysis of the FBP-fixation pocket itself, our results show the bimodal state of the tetramer PKM2 which reflects the existence of two different states, the T- and R- states. In the case of the holo-FBP form of PKM2, the residues that are constitutive of this pocket are less distant than in the apo state, an indication of structuring. Our results confirm previous works of Morgan and al.^[10] concerning the effect of FBP on the R/T equilibrium of tetrameric PKM2 in human and parasites^[38]. This is further validated thanks to our modeling of a tetrameric state bound to the TEPP-46 pharmacological activator that is reminiscent of the one obtained with FBP. This is in line with biological data^[19]. Nevertheless, it is important to point out that the fixation region of TEPP-46 is localized in a different pocket than FBP inside the PKM2 structure and this could be a reason why the B-domain is more rigid in this case. However, TEPP-46 binding is still able to induce a good structuring of the active site thanks to a stable binding after adding it to the structure. Interestingly, having a profile of the FBP-fixation pocket close to the PKM2+FBP condition even in the absence of FBP could explain the "FBP-like effect" of TEPP46 observed in the biological data^[19]. It is even more interesting since the stoichiometry of both compounds diverges by a factor of 2 with only two maximum pockets that can exist for TEPP-46 and 4 in the case of the natural allosteric ligand FBP, a plausible indication of a higher binding affinity of TEPP-46 compared to FBP.

Lastly, we also performed an initial characterization of the tetrameric state of PKM1, which is less well-described in the structural literature compared to PKM2. Our RMSD/RG analysis reveals the proximity of PKM1 to its PKM2 tetrameric counterpart, with or without FBP. PKM1 exhibits a profile that is intermediate between the holo and apo forms of PKM2. This is consistent with the fact that PKM1 is known to be a constitutively tetrameric protein that possesses enzymatic activity similar to that of FBP-PKM2^[39]. Our RMSF data reveal the relative similarity of PKM1 to holo-PKM2, particularly in the B-domain and small key

amino acids related to the active site. Nevertheless, some regions of PKM1 show higher RMSF flexibility compared to holo-PKM2. The first small region, more flexible in PKM1 compared to PKM2, is located at key residues 325-335 and includes the amino acid Thr328, which is implicated in the structuring of the PKM1/2 active site. Secondly, regions located at residues 470-490 and 515-525 both contain key amino acids involved in structuring the PKM2 FBP-fixation pocket, where their flexibility is reduced. One hypothesis is that these unstable regions present in our PKM1 simulations could obstruct the formation of an effective FBP-pocket. Currently, no structural or experimental data support the effect of FBP on PKM1, except for some fixed data of the regulatory loop on an initial crystal structure comparing the FBP-fixation pockets of PKM1 and PKM2 obtained by Dombrackas et al.^[18]. The last small region, located at residues 390-405, is specific to PKM1 since it is encoded by two different exons in PKM1 and PKM2. This result is surprising yet coherent since this region contains less flexible residues in the PKM2-specific exon (i.e., Tyr390, Gln393, and Leu394) that participate in the binding of known activators of PKM2 such as TEPP-46 and DASA-58^[40]. One hypothesis could be that the relative instability of this key region is one of the reasons it is targeted in PKM2 but not in PKM1. To investigate the PKM1 active site, we studied the distance between amino acids present in both PKM isoforms. Our study aligns with biological data indicating that PKM1 is an active enzyme with a structured active site and where its B-domain maintains relative flexibility. This is consistent with results obtained for PKM2, as no exon-specific residues are implicated in the structuring of the active sites of both proteins^[18]. Moreover, there is the question of the existence (or absence) of the FBP-fixation pocket in PKM1, since no experimental data have shown any direct allosteric effects of FBP on PKM1. Our results lend further support to this hypothesis, as distances for the PKM1 tetrameric state are much greater than those in the PKM2 state bound to FBP. Unlike PKM2, which can exist in apo and holo-FBP states with two possible conformations, this is not the case for PKM1. The distribution of distances indicates a lack of stable structuring of a putative FBP-binding pocket in this region of PKM1. This data allows us to correlate the absence of an allosteric effect in PKM1 with the absence of an "allosteric pocket," linked to exon-specific residues that are absent in the PKM1 isoform^[6]. The production of such precise models for both isoforms was crucial in helping us identify new cryptic pockets specific to PKM2 with potential for further drug design. Here, we discovered two new pockets that could impact the equilibrium between the T and R states of PKM2, one of which contains Cys423, close to its neighbor Cys424, implicated in the tetramerization of PKM2^[41]. The other pocket, 'T_M2-11', contains Trp515, located in the regulatory loop previously shown in this study to be implicated in the FBP-fixation pocket. The identification of these pockets a promising indication of the need for a molecular dynamics approach. This approach encompasses a wide array of possible structures and is consequently not limited to crystallographic data, which only provide structural information at a specific time and may not represent the prevalent structural state of such a system *in vitro*.

Conclusion

High-resolution μ s-scale molecular dynamics simulations were performed on both PKM1 and PKM2 enzymes using atomistic models. Whereas PKM1 is only expressed as an active tetramer, PKM2 models range from a monomer to a tetramer isoform. Such models allowed for an extensive study of the regulation of key domains such as the active site and the FBP allosteric pocket. First, at a global level, the PKM2 oligomerization process, which ranges from the monomer to the tetramer, shows progressive structuring while maintaining some flexibility in its B-domain, which is intimately linked to the structuring of the active site. Our results clearly highlight the superior structuring of the PKM2 tetramer state compared to its monomer and dimer counterparts. In addition, the PKM1 global structural profile presents strong homology with the PKM2 tetramer bound to FBP, despite the observation of small regions exhibiting higher flexibility. This is confirmed by strong structural similarities in the active site region. Moving then to the FBP-fixation pocket, and as one might expect, the latter is strongly influenced by the structuring presence of the FBP ligand. Indeed, the binding of FBP tends to select the most active R-state, which exhibits the most structured active site among the two states equilibrium of this pocket when FBP is not present inside the tetramer. In parallel, the putative PKM1 FBP-fixation pocket tends to possess a larger volume compared to the FBP-pocket of PKM2, thus indicating an absence of FBP fixation while still conserving a structured active site in agreement with biological data.

These new findings on the specificity and structure of each known oligomeric form of the PKM1/2 isoforms add further knowledge in the perspective of finding new molecules to modulate the enzymatic activity of the PKM enzyme. Indeed, such findings would be innovative in cancer therapy and also in the case of viral infections since PKM2 has been shown to participate positively in viral replication in Human Immunodeficiency Virus (HIV)^[42] and the pro-tumoral Epstein-Barr virus (EBV)^[43]. Only a small portion of ligands targeting PKM2, like the synthetic activator TEPP-46, has been tested in mouse models. Nevertheless, according to an initial study by Jiang et al.^[44], no advanced clinical trials are ongoing to our knowledge. However, some information is available concerning its low clearance, good oral bioavailability, and effects on tumor growth in preclinical phases^[19]. Thus, further structural characterization and the discovery of new druggable pockets targeting PKM2 are of interest. In this context, different strategies to target PKM2 are possible from the models we obtained in our study. These could be divided into three paths: targeting the FBP allosteric pocket, the TEPP interaction site, and other regions implicated in the tetramerization of PKM2. All these strategies converge towards a single goal: stabilizing the tetrameric state of PKM2, since the dimer has a positive effect on viral/tumor progression. To determine compounds that could target these key sites, different predictive software can be used, either by defining every possible site with their druggability score as used in our study with DogSite^[29], or by manually defining the position of the pocket to target with scripts like POVME^[45]. It would also be interesting to compare the validity of such pockets with new types of predictive software like AlphaFold, as well as with known experimental data. Using a database of interest, virtual screening with software like AutoDock^[46]

would allow the selection of the best candidates that interact specifically with PKM2 and not PKM1. This first batch of molecules can then be used in an experimental trial in the perspective of finding antiviral and antitumoral drugs. Such a process goes through an in vitro model carefully chosen for tumoral progression (HeLa cell line, U87MG glioblastoma cell line) or viral infection (Akata for EBV, Huh-7 for Hepatitis B) to characterize the impact of each candidate issued from the virtual screening. Molecular optimization can be used before the transition to an in vivo model to further enhance the protein-ligand interaction and validate it in the cellular model. Further validation in vivo, for example, in a mouse model of xenografts like glioblastoma that expresses high levels of PKM2, is necessary to continue this validation process. The results obtained in such models could contribute to the design of clinical trials for the selection of new PKM2-specific ligands.

Parallel to this screening, several perspectives of MD are possible to further improve the fidelity of biological systems. Recent work by Jaffrelot Inizan et al.^[47] resulted in a new module of Tinker-HP, named Deep-HP, that allows a better capture of intramolecular interactions with the solvent and also within the solute itself, compared to using the AMOEBA model alone. Another key element is the pH used in our study, defined by biological and enzymatic data in the context of cancer. Since bonds are intrinsically linked to this parameter, other structural research at significantly divergent pH levels would need to reiterate the MD process to consider the possible structural divergence caused by this difference in residue protonation. Thus, future research focusing on the structural dynamics of PKM isoforms will need to concentrate on these aspects but also on selecting other possible simulation conditions, such as one involving PKM1 with FBP, to validate the absence of an allosteric effect while characterizing key residues involved in bonds for the transition between dimer and tetramer of PKM2.

Experimental

PDB Entries

The PKM1 system was constructed based on its apo tetrameric conformation obtained from the PDB entry 3SRF. We only considered this specific structure since it represents the only known active form of this enzyme. In contrast, PKM2 exhibits a broader range of oligomeric states. Consequently, we considered three initial systems for PKM2: the monomeric (PDB: 1ZJH), dimeric (PDB: 6B6U^[48]), and tetrameric (PDB: 3SRH) conformations, all in their apo states. To further investigate the impact of non-covalent interactions of the tetrameric PKM2 with various ligands, we also considered two holo forms of PKM2, associated with 1,6-di-O-phosphono-beta-D-fructofuranose (referred to as FBP, PDB: 3SRD) and TEPP-46 (PDB: 3U2Z^[40]), respectively.

Preparation of the Systems

We selected six distinct systems, five corresponding to PKM2 and one to PKM1. For each of them, we removed all non-amino acid elements, retaining only ions, crystal waters, and for the two holo forms, their respective ligands. Subsequently, we prepared these six systems for molecular

dynamics (MD) simulations using the polarizable force field AMOEBA18^[49,50]. While parameters for amino acids as well as water and ions were readily available, standard parameters for accurately describing the dynamics of FBP and TEPP-46 ligands were not present in the literature. Thus, we generated them following the pipeline developed by Ren and al.^[51] and employed the Poltype software^[52]. We ensured that the generated parameters provided stable MD simulations of each ligand by conducting short MD simulations in a water box. Once we assigned AMOEBA parameters to each molecule, we solvated each system in various cubic water boxes (100Å x 100Å x 100Å for the monomer, 130Å x 130Å x 130Å for the dimer, and 160Å x 160Å x 160Å for the tetramers). Subsequently, we added K⁺ and Cl⁻ ions until reaching physiological pH, known to be optimal for PKM2 in the context of cancer cells^[53].

Conventional Molecular Dynamics

All MD simulations were performed using the Tinker-HP GPU software^[25,54]. Initially, each system underwent energy minimization using the L-BFGS algorithm with a Root Mean Square (RMS) threshold of 1 kcal/mol. Subsequently, the systems were gradually heated until equilibration was achieved. This was followed by 5 ns of NVT (canonical ensemble) simulations at 300K, using the BAOAB-RESPA1 integrator^[55] with a timestep of 10 fs, and coupled with Hydrogen-Mass Repartitioning (HMR)^[56]. The Ewald cutoff parameter was set to 7Å for Particle Mesh Ewald^[57], and the van der Waals cutoff was set to a value of 9Å. A convergence criterion of 10⁻⁵ was used for the self-consistent computations of the multipoles. These parameters remained consistent across all subsequent simulations. To further equilibrate the density, we conducted 5 ns of simulations in NPT (isothermal-isobaric ensemble), employing the same thermostat and temperature settings as before. Additionally, we used the Monte-Carlo barostat^[58] to regulate the pressure at 1 Atmosphere. The last frame of each dynamic was taken as the starting point of the production stage, presented in the next section.

Adaptive Sampling Simulations

The primary goal of this study was to capture the largest number of accessible conformations for each active conformation of PKM systems. To achieve this, we employed an enhanced sampling technique known as Adaptive Sampling (AS)^[59], which maximizes the exploration of rarely visited regions on the free energy surface associated to representative collective variables obtained through an unsupervised procedure. A notable advantage of this method lies in its unsupervised aspects, making it particularly versatile for studying diverse systems without a strong prior knowledge. AS studies were conducted for each of our six systems using the following pipeline.

An initial pool of structures was generated by running a 20 ns NPT simulation. Dimensionality reduction was then performed on all generated structures by computing the Principal Component Analysis (PCA) components using the sklearn library from Python^[60]. Subsequently, the structures were projected into a four-dimensional space using the first four PCA components, as they were found to capture over 90% of the structural diversity.

Following this initial phase, a series of 11 iterations was conducted. In each iteration, 10 structures were selected

based on the same density law criterion used by Jaffrelot and al.^[26], who demonstrated robustness in sampling for poorly visited regions. Subsequently, 9 ns of NPT simulations were performed on these 10 selected structures, resulting in a cumulative simulation time of 90 ns per AS iteration. The resulting structures were then added to the pool of conformations, and the process of structure selection was repeated until convergence in the conformational search was achieved.

By conducting 11 iterations, in addition to the initial 20 ns NPT simulation, the study ultimately provided a total simulation time of 1.01 μs per system, amounting to a cumulative simulation time of 6.06 μs for the entire study. The entire post-processing analysis were done using Python script with MDTraj^[61], Numpy^[62], Scikit-Learn^[60], Scipy^[63] packages. Further graphical representations were done with Matplotlib^[64].

Acknowledgements

This work was made possible thanks to funding from both MESRI financing of the Programme Doctorale Interdisciplinaire en Cancérologie (PDIC) and the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement Number 810367), project EMC2. Computations have been performed at GENCI (IDRIS, Orsay, France and TGCC, Bruyères le Chatel) on grant Number A0130712052. I would also like to give my thanks to M. Brandon Walker at the University of Texas at Austin for his help in the utilization of the Poltype software.

Code availability

TinkerHP is freely accessible to Academics via GitHub : <https://github.com/TinkerTools/tinker-hp>

Poltype is also freely accessible via Github : <https://github.com/TinkerTools/poltype2/tree/master>

Conflict of Interest

All authors declare no competing interests.

Keywords: Molecular Dynamics • Pyruvate Kinase • Cancer • Chemistry • AMOEBA

References

- [1] B. Morten, al., *International Journal of Cancer* **2008**, *122*, 2726.
- [2] L. S. Y, V. H. M. G., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 441.
- [3] B. Emy, R. Claudio, *Cells* **2020**, *9*, 2073.
- [4] I. Kiichi, T. Takehiko, *The Journal of Biochemistry* **1972**, *6*, 1043.
- [5] N. T., al., *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 13807.
- [6] W. J. Israelsen, M. G. V. Heiden, *Seminars in cell & developmental biology* **43** **2015**, pages 43–51.

- [7] C. Barbara, al., *Cancer biology & therapy* **2011**, *12*, 1101.
- [8] C. V. Clover, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *5*, 1894.
- [9] M. Takenaka, al., *European Journal of Biochemistry* **1991**, *1*, 101.
- [10] H. P. Morgan, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *15*, 5881.
- [11] Y. Weiwei, Z. Lu., *Cell cycle* **2013**, *12,19*, 3154.
- [12] T. T. Yoshitaka Ikeda, T. Noguchi, *Journal of Biological Chemistry* **272** **1997**, *33*, 20495.
- [13] M. Yuan, al., *Biochemical Journal* **475** **2018**, *10*, 1821.
- [14] I. S. T. Kirstie E. Keller, Y.-S. Lee, *Science (New York, N.Y.)* **338** **2012**, *6110*, 1069.
- [15] M. S. Jurica, al., *Structure* **6** **1998**, *2*, 195.
- [16] H. Kato, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** **1989**, *20*, 7861.
- [17] G. Gdynia, al., *Nature Communications* **2016**, *7*, 10761.
- [18] B. D. S. Jill D. Dombrackas, A. D. Mesecar, *Biochemistry* **44** **2005**, *27*, 9417.
- [19] D. Anastasiou, al., *Nature chemical biology* **8** **2012**, *10*, 839.
- [20] N. Gresh, G. A. Cisneros, T. A. Darden, J.-P. Piquemal, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2007**, *3*, 1960, pMID: 18978934.
- [21] Y. Shi, P. Ren, M. Schnieders, J.-P. Piquemal, *Polarizable Force Fields for Biomolecular Modeling*, chapter 2, pages 51–86, John Wiley & Sons, Ltd **2015**.
- [22] J. Melcr, J.-P. Piquemal, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2019**, *6*, 143.
- [23] Z. Jing, C. Liu, S. Y. Cheng, R. Qi, B. D. Walker, J.-P. Piquemal, P. Ren, *Annual Review of Biophysics* **2019**, *48*, 371, pMID: 30916997.
- [24] O. Adjoua, al., *Journal of Chemical Theory and Computation* **17** **2021**, *4*, 2034.
- [25] L. Lagardère, al., *Chemical Science* **9** **2018**, *4*, 956.
- [26] T. J. Inizan, al., *Chemical Science* **12** **2021**, *13*, 4889.
- [27] E. A. Dina, al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 6218.
- [28] L. El Khoury, Z. Jing, A. Cuzzolin, A. Deplano, D. Loco, B. Sattarov, F. Hédin, S. Wendeborn, C. Ho, D. El Ahdab, T. Jaffrelot Inizan, M. Sturlese, A. Sosic, M. Volpiana, A. Lugato, M. Barone, B. Gatto, M. L. Macchia, M. Bellanda, R. Battistutta, C. Salata, I. Kondratov, R. Iminov, A. Khairulin, Y. Mykhalonok, A. Pochevko, V. Chashka-Ratushnyi, I. Kos, S. Moro, M. Montes, P. Ren, J. W. Ponder, L. Lagardère, J.-P. Piquemal, D. Sabbadin, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3674.
- [29] V. Andrea, al., *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2074.
- [30] N. S. Ponnusamy, Kalaiarasan, R. Bamezai., *Journal of molecular modeling* **20** **2014**, page 2447.
- [31] Z. Zhang, al., *Cell & Bioscience* **9** **2019**, *1*, 52.
- [32] C. D. Xie, Jiansheng, X. Hu., *The Journal of Biological Chemistry* **291** **2016**, *17*, 8987.
- [33] G. Jianshuand, al., *Frontiers in Oncology* **2019**, *9*, 993.
- [34] T. Z. Wang Ping, Chang Sun, Y. Xu., *Protein & cell* **6** **2015**.
- [35] G. Xueliang, al., *Molecular Cell* **45** **2012**, *5*, 598.
- [36] K. Zahra, al., *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, 2234.
- [37] Y. Jingxu, al., *Journal of chemical information and modeling* **56** **2016**, *6*, 1184.
- [38] M. H. P., al., *Journal of Biological Chemistry* **285** **2010**, *17*, 12892.
- [39] C. Heather, al., *Nature* **452** **2008**, pages 181–86.
- [40] A. Dimitrios, al., *Nature chemical biology* **8** **2012**, *10*, 839.
- [41] M. So, al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, *526*, 973.
- [42] Z. Hong-Sheng, al., *Biochemistry and Biophysics* **2017**, *625-626*, 17-23.
- [43] L. A. Kwok-Fung, al., *The Journal of Pathology* **2015**, *237*, 238.
- [44] J. Jian-kang, al., *Bioorganic medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 3387.
- [45] W. J. R., al., *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 4584.
- [46] M. G. M., al., *Current Protocols in Bioinformatics* **2008**, *24*, 1934.
- [47] J. I. Théo, al., *Chemical Science* **2023**, *14*, 5438.
- [48] D. Srivastava, al., *Biochemistry* **2017**, *2017*, 6517.
- [49] P. Ren, J. W. Ponder, *The Journal of Physical Chemistry B* **107** **2003**, *24*, 5933.
- [50] Y. Shi, al., *Journal of chemical theory and computation* **9**, **2013**, *9*, 4046.
- [51] J. C. Wu, al., *Theor Chem Acc* **2012**, *131*, 1138.
- [52] B. Walker, al., *Journal of Computational Chemistry* **2022**, *43*, 1530.
- [53] S. Nandi, al., *Journal of Biological Chemistry* **295** **2020**, *51*, 17425.
- [54] R. Joshua, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14*, 5273.
- [55] A. F. Louis Lagardère, P. Jean-Philip, *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 2593.
- [56] H. C. W, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 1864.
- [57] L. Lagardère, F. Lipparini, Polack, B. Stamm, Cancès, M. Schnieders, P. Ren, Y. Maday, J.-P. Piquemal, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11*, 2589, pMID: 26575557.
- [58] J. Åqvist, al., *Chemical Physics Letters* **2004**, *384*, 288.
- [59] G. R. Bowman, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 787.
- [60] F. Pedregosa, al., *arXiv* **2018**.
- [61] R. T. McGibbon, al., *Biophysical Journal* **2015**, *8*, 1528.
- [62] C. R. Harris, al., *Nature* **2020**, *7825*, 357.
- [63] P. Virtanen, al., *Nature Methods* **2020**, *3*, 261.
- [64] J. D. Hunter, *Computing in Science & Engineering* **2007**, *3*, 90.

- [7] C. Barbara, al., *Cancer biology & therapy* **2011**, *12*, 1101.
- [8] C. V. Clover, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *5*, 1894.
- [9] M. Takenaka, al., *European Journal of Biochemistry* **1991**, *1*, 101.
- [10] H. P. Morgan, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *15*, 5881.
- [11] Y. Weiwei, Z. Lu., *Cell cycle* **2013**, *12,19*, 3154.
- [12] T. T. Yoshitaka Ikeda, T. Noguchi, *Journal of Biological Chemistry* **272** **1997**, *33*, 20495.
- [13] M. Yuan, al., *Biochemical Journal* **475** **2018**, *10*, 1821.
- [14] I. S. T. Kirstie E. Keller, Y.-S. Lee, *Science (New York, N.Y.)* **338** **2012**, *6110*, 1069.
- [15] M. S. Jurica, al., *Structure* **6** **1998**, *2*, 195.
- [16] H. Kato, al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** **1989**, *20*, 7861.
- [17] G. Gdynia, al., *Nature Communications* **2016**, *7*, 10761.
- [18] B. D. S. Jill D. Dombrackas, A. D. Mesecar, *Biochemistry* **44** **2005**, *27*, 9417.
- [19] D. Anastasiou, al., *Nature chemical biology* **8** **2012**, *10*, 839.
- [20] N. Gresh, G. A. Cisneros, T. A. Darden, J.-P. Piquemal, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2007**, *3*, 1960, pMID: 18978934.
- [21] Y. Shi, P. Ren, M. Schnieders, J.-P. Piquemal, *Polarizable Force Fields for Biomolecular Modeling*, chapter 2, pages 51–86, John Wiley & Sons, Ltd **2015**.
- [22] J. Melcr, J.-P. Piquemal, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2019**, *6*, 143.
- [23] Z. Jing, C. Liu, S. Y. Cheng, R. Qi, B. D. Walker, J.-P. Piquemal, P. Ren, *Annual Review of Biophysics* **2019**, *48*, 371, pMID: 30916997.
- [24] O. Adjoua, al., *Journal of Chemical Theory and Computation* **17** **2021**, *4*, 2034.
- [25] L. Lagardère, al., *Chemical Science* **9** **2018**, *4*, 956.
- [26] T. J. Inizan, al., *Chemical Science* **12** **2021**, *13*, 4889.
- [27] E. A. Dina, al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 6218.
- [28] L. El Khoury, Z. Jing, A. Cuzzolin, A. Deplano, D. Loco, B. Sattarov, F. Hédin, S. Wendeborn, C. Ho, D. El Ahdab, T. Jaffrelot Inizan, M. Sturlese, A. Sosic, M. Volpiana, A. Lugato, M. Barone, B. Gatto, M. L. Macchia, M. Bellanda, R. Battistutta, C. Salata, I. Kondratov, R. Iminov, A. Khairulin, Y. Mykhalonok, A. Pochevko, V. Chashka-Ratushnyi, I. Kos, S. Moro, M. Montes, P. Ren, J. W. Ponder, L. Lagardère, J.-P. Piquemal, D. Sabbadin, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3674.
- [29] V. Andrea, al., *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2074.
- [30] N. S. Ponnusamy, Kalaiarasan, R. Bamezai., *Journal of molecular modeling* **20** **2014**, page 2447.
- [31] Z. Zhang, al., *Cell & Bioscience* **9** **2019**, *1*, 52.
- [32] C. D. Xie, Jiansheng, X. Hu., *The Journal of Biological Chemistry* **291** **2016**, *17*, 8987.
- [33] G. Jianshuand, al., *Frontiers in Oncology* **2019**, *9*, 993.
- [34] T. Z. Wang Ping, Chang Sun, Y. Xu., *Protein & cell* **6** **2015**.
- [35] G. Xueliang, al., *Molecular Cell* **45** **2012**, *5*, 598.
- [36] K. Zahra, al., *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, 2234.
- [37] Y. Jingxu, al., *Journal of chemical information and modeling* **56** **2016**, *6*, 1184.
- [38] M. H. P., al., *Journal of Biological Chemistry* **285** **2010**, *17*, 12892.
- [39] C. Heather, al., *Nature* **452** **2008**, pages 181–86.
- [40] A. Dimitrios, al., *Nature chemical biology* **8** **2012**, *10*, 839.
- [41] M. So, al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, *526*, 973.
- [42] Z. Hong-Sheng, al., *Biochemistry and Biophysics* **2017**, *625-626*, 17-23.
- [43] L. A. Kwok-Fung, al., *The Journal of Pathology* **2015**, *237*, 238.
- [44] J. Jian-kang, al., *Bioorganic medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 3387.
- [45] W. J. R., al., *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 4584.
- [46] M. G. M., al., *Current Protocols in Bioinformatics* **2008**, *24*, 1934.
- [47] J. I. Théo, al., *Chemical Science* **2023**, *14*, 5438.
- [48] D. Srivastava, al., *Biochemistry* **2017**, *2017*, 6517.
- [49] P. Ren, J. W. Ponder, *The Journal of Physical Chemistry B* **107** **2003**, *24*, 5933.
- [50] Y. Shi, al., *Journal of chemical theory and computation* **9**, **2013**, *9*, 4046.
- [51] J. C. Wu, al., *Theor Chem Acc* **2012**, *131*, 1138.
- [52] B. Walker, al., *Journal of Computational Chemistry* **2022**, *43*, 1530.
- [53] S. Nandi, al., *Journal of Biological Chemistry* **295** **2020**, *51*, 17425.
- [54] R. Joshua, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14*, 5273.
- [55] A. F. Louis Lagardère, P. Jean-Philip, *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 2593.
- [56] H. C. W, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 1864.
- [57] L. Lagardère, F. Lipparini, Polack, B. Stamm, Cancès, M. Schnieders, P. Ren, Y. Maday, J.-P. Piquemal, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11*, 2589, pMID: 26575557.
- [58] J. Åqvist, al., *Chemical Physics Letters* **2004**, *384*, 288.
- [59] G. R. Bowman, al., *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 787.
- [60] F. Pedregosa, al., *arXiv* **2018**.
- [61] R. T. McGibbon, al., *Biophysical Journal* **2015**, *8*, 1528.
- [62] C. R. Harris, al., *Nature* **2020**, *7825*, 357.
- [63] P. Virtanen, al., *Nature Methods* **2020**, *3*, 261.
- [64] J. D. Hunter, *Computing in Science & Engineering* **2007**, *3*, 90.

Supplementary Figures

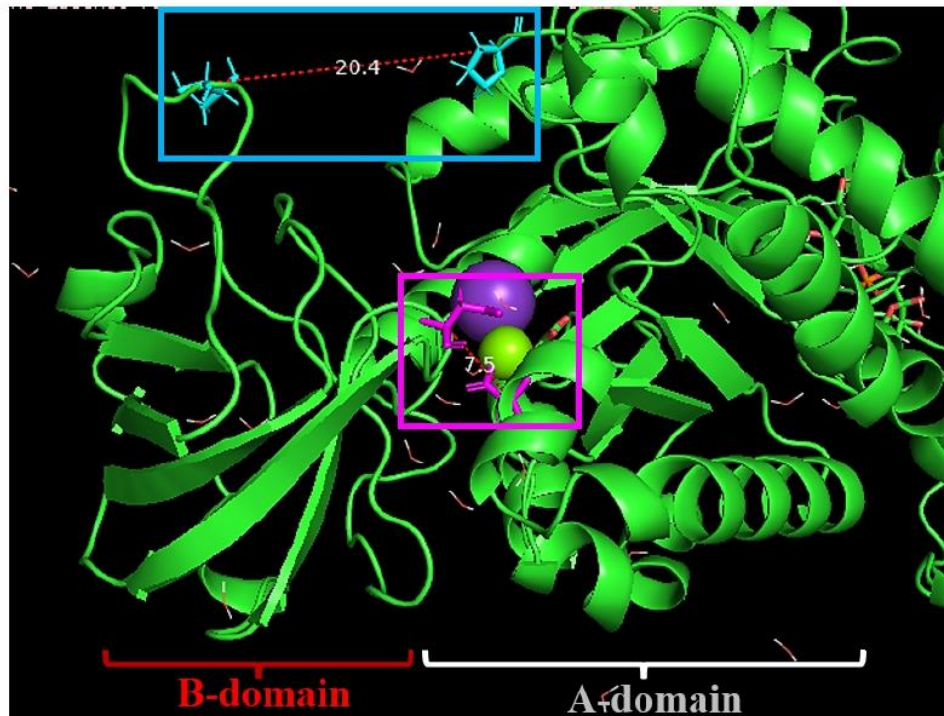


Figure S1: **Structural representation of the active site of PKM2.** Cartoon model representing a single monomer of the PKM2 tetramer (green) associated with FBP. Here, the two couple of residues **P53 to T129** (between regions A and B) and **D178 to D296** (close to the A-B junction at the base of region B) are **highlighted respectively in blue and pink squares** to characterize their importance in the overall structural dynamics occurring at the active site of the protein, which is localized between the A1 (right side) and B-domains (left-side).

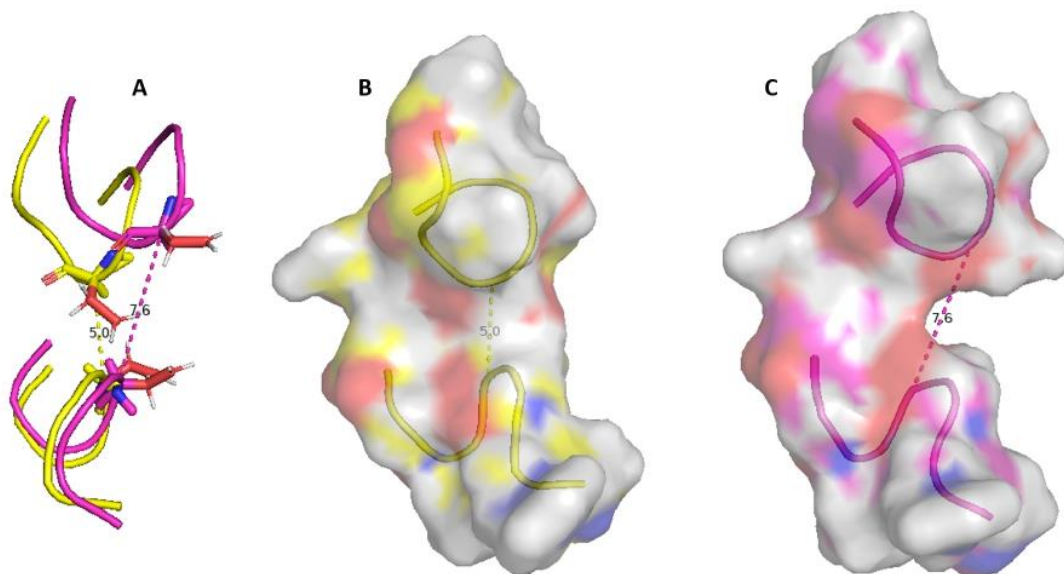


Figure S2: **Dynamic of the internal part of the active side of dimeric PKM2.** (A) Graphical representation of the distance between residues 178 and 296 for two different frames of the bimodal distribution, (B) Surface model showing the low-distance state ($\approx 5\text{\AA}$) (C) or the largest one ($\approx 7.5\text{\AA}$). Three amino acids before and after residues 178 and 296 are represented.

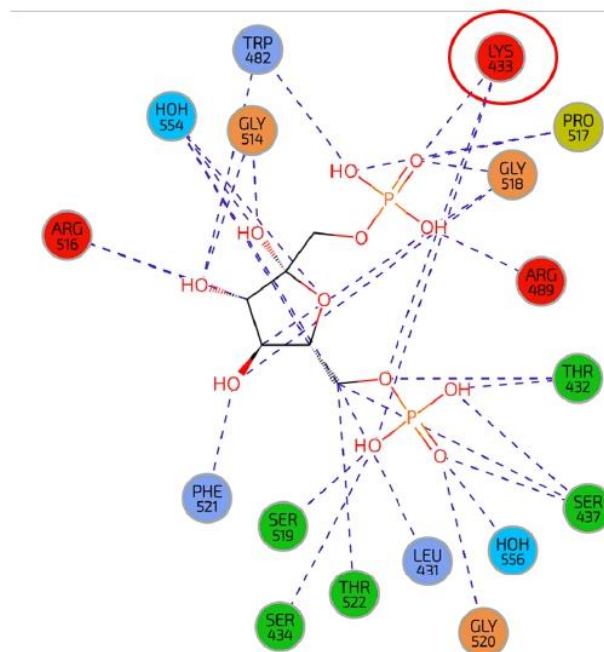
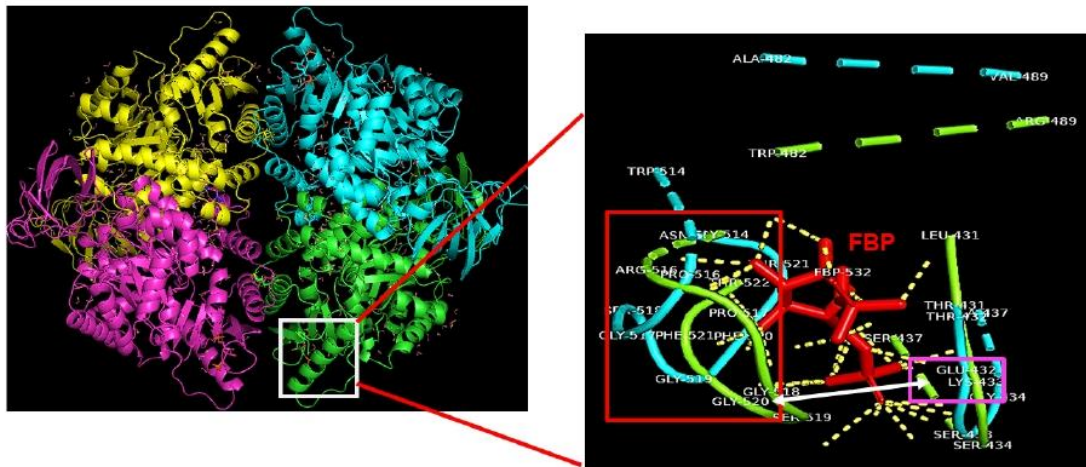


Figure S3: **Structural representation of the FBP-binding site of PKM isoforms.** Cartoon model of the FBP-binding site and comparison between PKM1 (in blue) and PKM2 (in green) in presence of FBP (in red). Important sites are colored to highlight their importance in the binding of FBP: the red square represents a regulatory loop and the violet square the residue 433 (Lys for PKM2 and Glu for PKM1). Further below are represented the binding environment of FBP with the corresponding PKM2 residues from the PDB crystal structure.

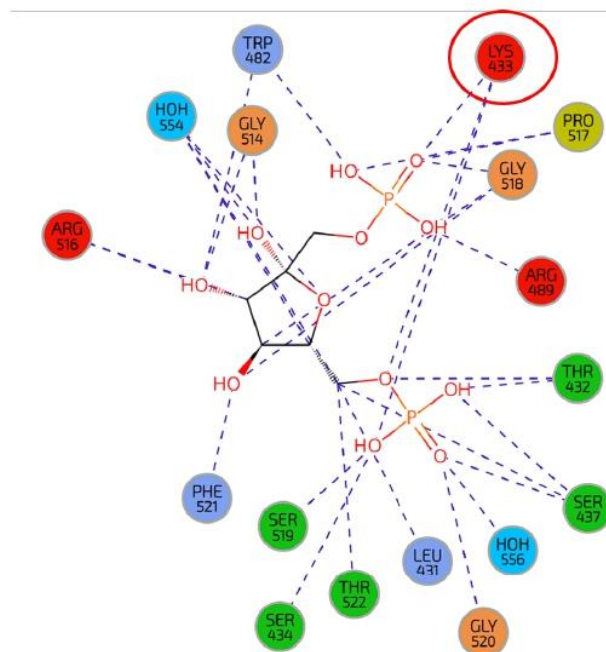
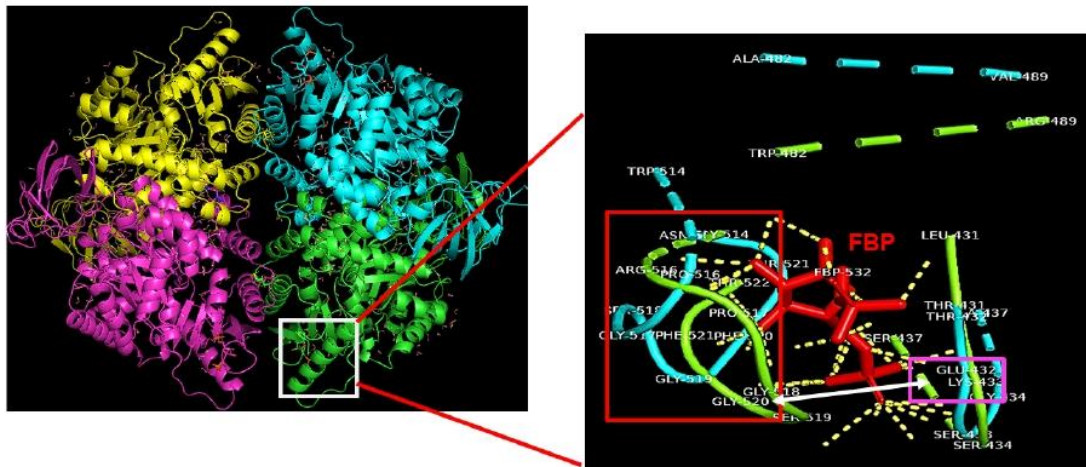


Figure S3: **Structural representation of the FBP-binding site of PKM isoforms.** Cartoon model of the FBP-binding site and comparison between PKM1 (in blue) and PKM2 (in green) in presence of FBP (in red). Important sites are colored to highlight their importance in the binding of FBP: the red square represents a regulatory loop and the violet square the residue 433 (Lys for PKM2 and Glu for PKM1). Further below are represented the binding environment of FBP with the corresponding PKM2 residues from the PDB crystal structure.

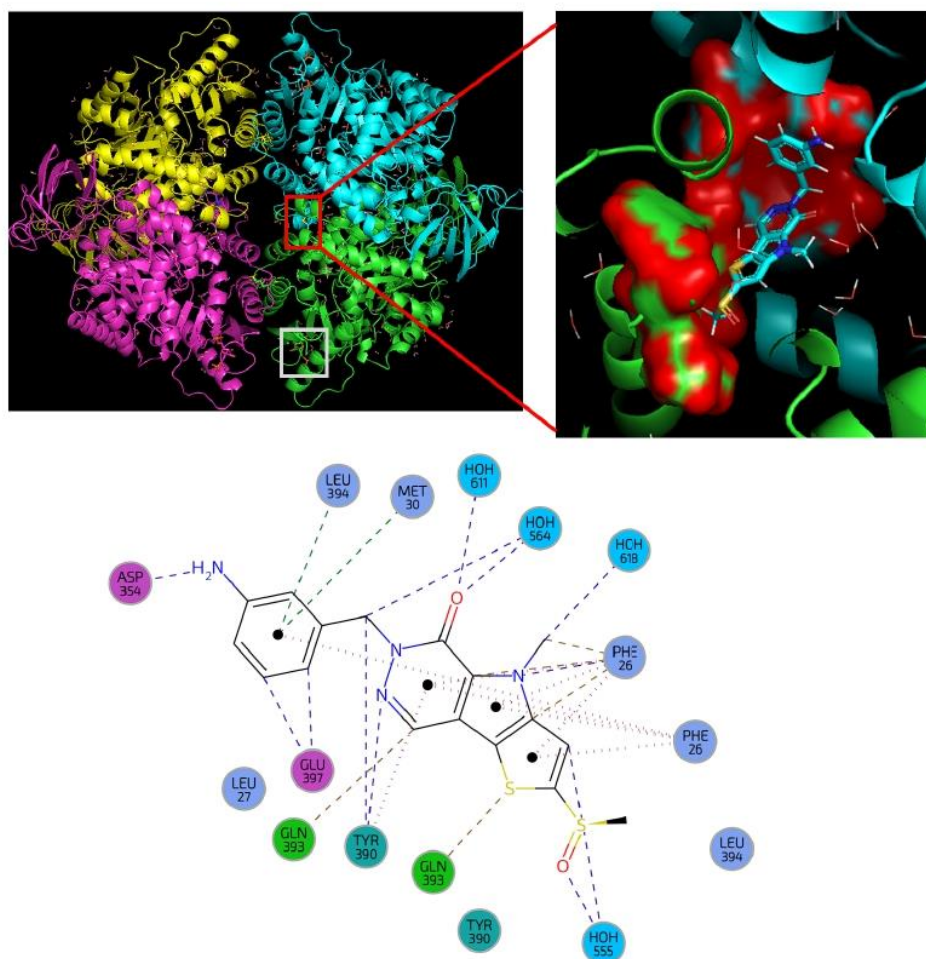


Figure S6: **Structural representation of the TEPP-46 fixation site on PKM2.** Cartoon model of PKM2. The red frame indicates the TEPP-46 binding regions. The white frame indicates the FBP binding regions. Several residues that interact with TEPP-46 are shown in surface format and are colored in red. Further below are represented the binding environment of TEPP-46 with the corresponding PKM2 residues in the PDB crystal structure.

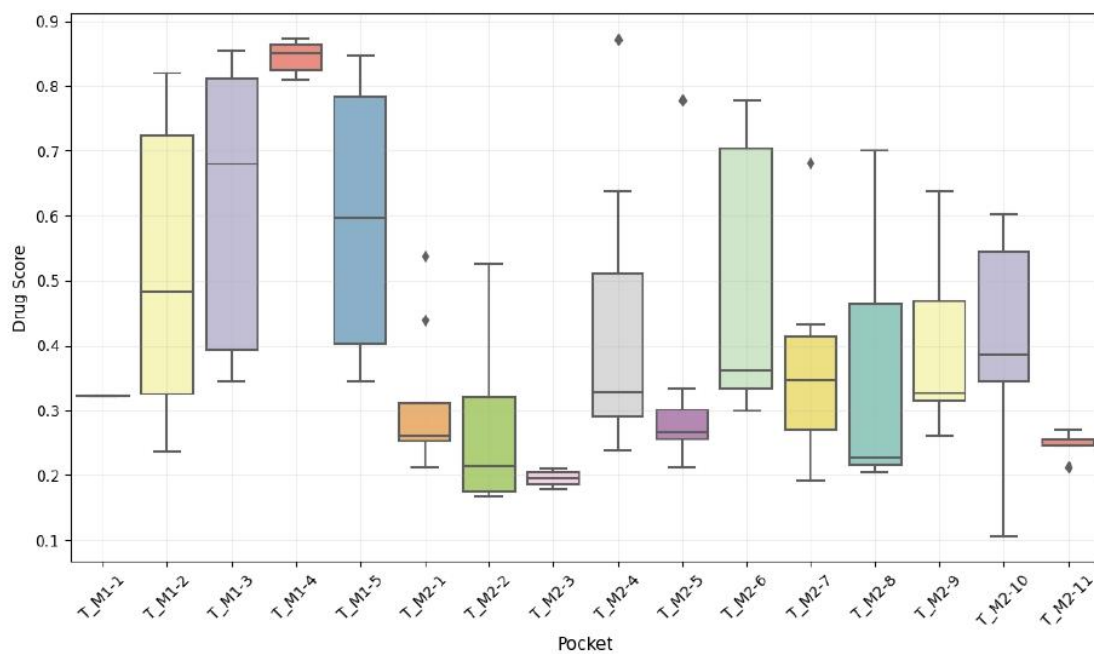


Figure S7: **Boxplot of DrugScore distribution for each new pockets obtained by structural sampling.** The new pockets were found from the selection of some structures from the molecular dynamics of PKM1 (M1-X) or PKM2 (M2-X) that weren't found on the initial structures 3SRF (tetrameric cristal of PKM1) and 3SRD (tetrameric state of PKM2 bound to FBP).

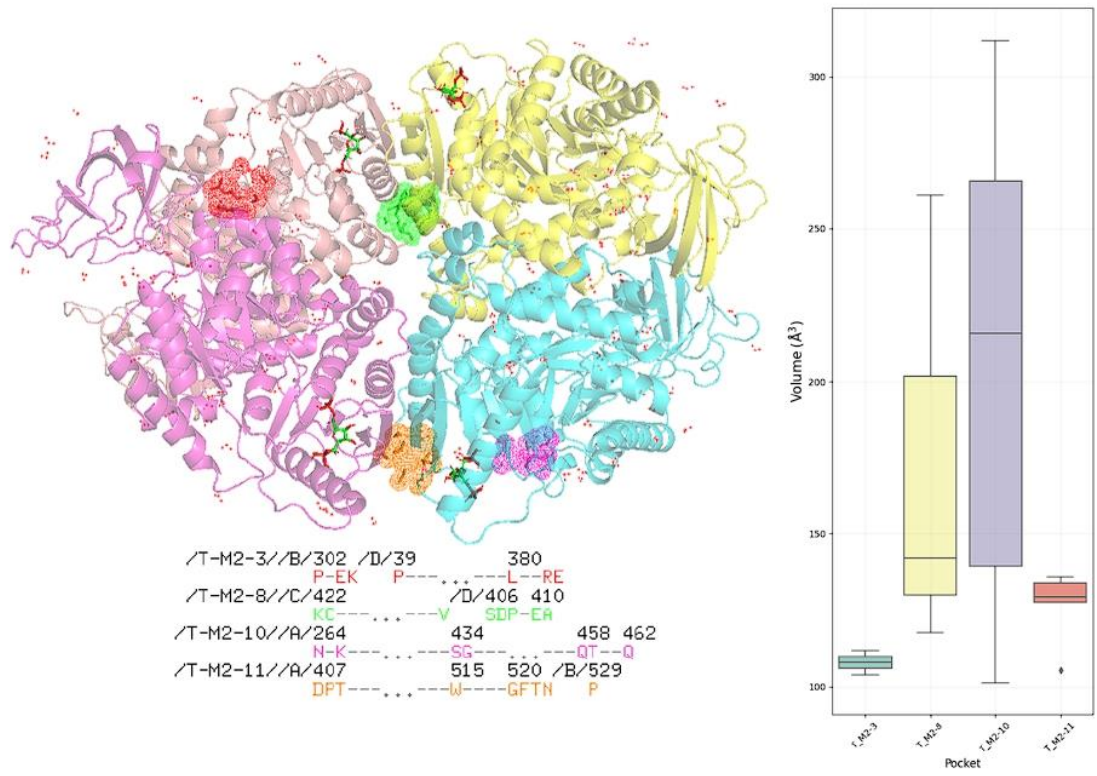


Figure S8: **Structures and volumes of potential new pockets specific for PKM2 determined by a small sampling of the Tinker-HP simulations.** The residues implicated in pockets structures are shown on the left panel in red, green, orange and pink with structural visualization on the initial crystal structure. The volumes of each cavity is shown on the right panel with a box-plot representation.

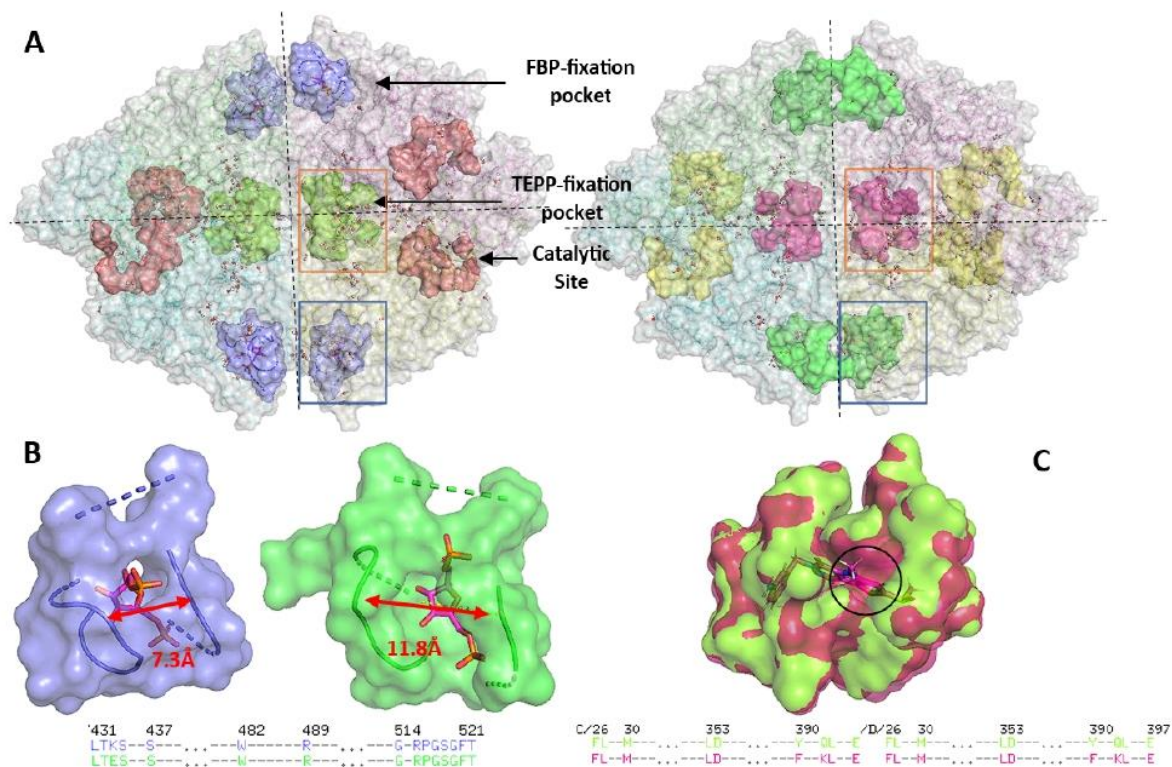


Figure S9: **Global view of each PKM enzymes with their major site.** (A) Surface model of PKM2 (left side) and PKM1 (right side) associated with key residues corresponding to region structuring the FBP site (light blue (PKM2) and green (PKM1)), TEPP site (light green (PKM2) and red (PKM1)) and the catalytic site (light red (PKM2) and yellow (PKM1)). Water molecules localized at 9Å or less are represented in CPK model. (B) Detailed surface model of the residues implicated in FBP fixation for PKM2 (left) and same view for PKM1. The red arrow corresponds to the distance between residues 433 and 518. (C) Surface model of the residues interacting with TEPP-46 for the comparison between PKM2 (light green) and PKM1 (red). One major difference is localized at residue 26 for PKM1 with a more closed pocket compared to PKM2 (black circle).

Conclusion et perspectives

Rappel de la problématique initiale

Ce projet de thèse vise à caractériser sur le plan structural les isoformes M1/M2 de la protéine Pyruvate Kinase (PKM1/PKM2). Cet objectif se base en effet sur des recherches biologiques sur PKM2 et sur le rôle que pourrait jouer cette enzyme à la fois dans le cancer et la réplication des virus. Il s'agit notamment de générer des informations structurales qui pourraient orienter des nouvelles stratégies afin d'identifier des modulateurs pharmacologiques ciblant PKM2. Nous avons pu décrire la dynamique structurale de chacun des états oligomériques de PKM2 et les comparer à la forme stable, tétramérique, de PKM1. De plus, une analyse plus ciblée de poches importantes dans la fonction et la dynamique de ces protéines a été réalisée notamment le site actif et la région de fixation du FBP, ligand naturel de PKM2. L'ensemble de nos données a permis de proposer des modèles innovants à haute résolution de ces deux protéines PKM1/PKM2 par utilisation du champ de forces polarisable AMOEBA.

Méthodologie et spécificité de notre démarche

Notre choix s'est porté sur l'utilisation du champ de forces polarisable AMOEBA avec l'addition d'un outil d'échantillonnage adaptatif pour préparer puis simuler les différents états de PKM1/PKM2. Ce processus permet de générer une représentation la plus fidèle possible des différentes interactions au sein du système (électrostatiques, liaisons...) combiné à une méthodologie d'échantillonnage permettant d'amplifier l'exploration de son espace énergétique et conformationnel. De plus, l'impact de la prise en compte de l'énergie de polarisation dans les simulations à travers l'utilisation du champs de forces polarisable AMOEBA permet d'affiner la précision des simulations moléculaires, en accord avec les résultats précédents obtenus sur la caractérisation de la protéase du COVID-19 où les simulations s'étaient montrés prédictives comparées aux données biologiques collectées sur cette protéine²⁴⁰. Les paramétrisations AMOEBA de plusieurs ligands spécifiques à PKM2 tels que le FBP et le TEPP-46 ont été effectuées à l'aide du programme Poltype. En effet, la paramétrisation des ligands est une étape majeure pour s'assurer de la bonne structure et de l'équilibre de ces petits composés pendant la simulation. La stratégie d'échantillonnage adaptatif utilisée afin d'étendre l'exploration conformationnelle de nos simulations se base

sur l'exploitation d'un certain nombre de structures issues des précédentes dynamiques réalisées en privilégiant les régions les moins. Cette approche permet de générer de nouvelles structures servant de points initiaux pour de nouvelles itérations de simulations de dynamique moléculaire AMOEBA. Un tel protocole à l'avantage de se rapprocher en matière de temps de simulation de la réalité biologique des protéines notamment en termes d'interaction ligand-protéine mais aussi de variations conformationnelles et énergétiques au cours de la dynamique.

Discussion et comparaison aux recherches structurales et biologiques analogues

En premier lieu, une comparaison des différents conformères possibles de PKM2, allant du monomère au tétramère, a révélé une stabilisation croissante de la protéine en lien avec l'augmentation de son oligomérisation. Une augmentation de la corrélation linéaire entre RMSD et RG est observée et culmine avec la forme tétramérique holo. Une telle corrélation est ainsi un bon marqueur d'une transition conformationnelle qui permet de maximiser la structuration de la protéine PKM2. Ces résultats sont partiellement confirmés par les données expérimentales de Ponnusamy *et al.*³⁴² qui ont fourni des résultats RG et RMSD sur une structure PDB de PKM2 proche de nos simulations. Dans l'ensemble, nos résultats sont en adéquation avec les différences observées expérimentalement dans l'activité enzymatique. L'état dimérique est moins actif alors que la forme tétramérique de PKM2 présente une plus grande affinité pour son substrat PEP ainsi qu'une meilleure activité enzymatique. Cette augmentation d'activité entre chaque état est fortement liée à la structuration conformationnelle du site actif de PKM2. Des informations supplémentaires peuvent être trouvées directement en étudiant les évolutions des données RMSF : partant d'un état monomérique extrêmement flexible, le dimère se voit stabiliser tandis que la forme tétramérique de PKM2 sous sa forme holo-FBP présente le plus haut degré de structuration. Néanmoins, le domaine B (résidus 116-217), qui participe à la structuration du site catalytique de PKM2, montre encore une grande flexibilité pour chaque état oligomérique. Cette flexibilité est néanmoins plus faible pour le tétramère que pour le dimère et pourrait expliquer la différence d'affinité avec son substrat, en faveur de la forme tétramérique selon des études d'activités enzymatiques précédentes de Xie *et al.* montrant une capacité glycolytique plus forte du tétramère pour métaboliser rapidement le PEP et réduire l'accumulation en métabolites³⁴³. Une analyse approfondie des distances entre les résidus clés du site actif

(résidus 53 et 129 puis 178 et 296) valide cette hypothèse. En effet, la distribution bimodale et plus étroite de la distance entre les résidus à l'intérieur du site actif de la forme dimérique est significativement différente de son homologue tétramérique. Dans le même ordre d'idée la jonction interne extrêmement instable, située au niveau du site actif, du monomère confirme les données expérimentales de l'étude de Guo *et al.*³⁴⁴ qui ont montré une activité enzymatique réduite de l'état monomérique contrairement au tétramère. Pour conclure cette discussion sur les formes oligomériques de PKM2, il est crucial d'examiner les résidus situés dans la poche de fixation du FBP. Alors que le monomère et le dimère montrent de grandes variations structurelles de la poche gênant une possible activité de fixation, le tétramère présente une distribution bimodale des structures de la poche de fixation FBP. Ceci est observé pour le tétramère libre où le résidu de référence Gly518, qui est choisi pour la mesure de la distance avec la Lys433, est localisé dans une boucle de régulation bien connue, aussi appelée motif d'activation du FBP, qui s'est avérée structurellement très flexible³⁴⁵. Cette flexibilité est liée aux interactions des acides aminés proches, y compris Trp515 et Arg516, qui sont impliqués dans la régulation de la PKM2, pouvant générer un tétramère moins actif (l'état T) et une forme alternative plus active (l'état R). Pour l'état T, cette boucle est externalisée de la poche de fixation du FBP et est capable de former des liaisons hydrogènes avec l'autre chaîne à proximité. Ceci est illustré dans nos simulations, où l'on note une distance plus élevée entre les résidus 433 et 518. À l'inverse, pour l'état R, les liaisons hydrogènes sont perdues car la boucle qui inclut Gly518 se rapproche de la poche de fixation du FBP, ce qui entraîne des distances plus faibles dans la simulation. Ceci est en accord avec les analyses structurales précédentes comparant différentes isoformes de PK et indiquant que la structure PKM1 du lapin étudiée possède une boucle qui n'est pas orientée vers la poche de fixation, bloquant ainsi la fixation du FBP³⁴. Les deux états observés pour le tétramère dans les simulations sont donc cohérents avec les données de l'équilibre observé expérimentalement entre les deux états du tétramère PKM2, à savoir les états R et T³⁴⁵. En regroupant chaque aspect de cette comparaison, nos résultats confirment que l'oligomérisation de PKM2 a un rôle dans la structuration du site actif. Cette structuration ayant une fonction particulièrement importante dans le cas de l'équilibre dimère/tétramère, il pourrait y avoir des implications dans le métabolisme cellulaire physiologique mais aussi dans le contexte du cancer⁷⁵. En effet, il est important de rappeler que la prédominance de l'état dimérique de la PKM2 dans les cellules tumorales est corrélée à une activité enzymatique réduite par rapport

au tétramère mais aussi au gain de fonctions nucléaires par son transport possible dans le noyau, ce qui favorise l'accumulation des métabolites de la glycolyse, l'utilisation de voies de biosynthèses alternes mais aussi le contrôle de différents gènes au profit du développement tumoral¹⁷⁷.

Un second point apporté par notre analyse est lié au rôle du ligand naturel FBP dans la régulation de la structuration de poches clés de PKM2. Pour commencer, le profil RMSD/RG entre les états apo et holo de PKM2 présente une forte corrélation linéaire dans la condition holo-PKM2. Cela est en lien par la forte capacité de structuration du FBP sur le tétramère PKM2 qui est confirmé par les données RMSF. Si elles montrent des profils globaux très similaires entre les deux états, l'état holo de PKM2 est néanmoins davantage stabilisé dans la partie C-terminale de la protéine qui contient la poche de fixation du FBP. Il est important de noter que même si le FBP est fixé dans le tétramère PKM2, le domaine B conserve sa flexibilité, en particulier sur quelques acides aminés précis (Asn75, His78, Asp113, Thr114 et Arg120) impliqués dans la structuration du site actif. Ces différences pourraient expliquer la meilleure accessibilité du substrat au site actif par l'effet allostérique de la FBP. Ces résultats sont cohérents avec des résultats théoriques antérieurs obtenus à partir de simulations de dynamique moléculaire avec un temps réduit sur une seule chaîne de deux structures cristallines tétramériques³⁴⁶. L'analyse de la distance entre les résidus 53 et 129 puis 178 et 296 localisés dans le site actif valide cette hypothèse. Pris ensemble, nos résultats confirment que la fixation du FBP est importante pour maximiser la structuration du site actif conduisant ainsi à une meilleure activité enzymatique de la PKM2. En ce qui concerne l'analyse de la poche de fixation du FBP, nos résultats ont précédemment montré un profil bimodal du tétramère PKM2 reflétant l'existence de deux états à l'équilibre, les formes T et R. Dans le contexte de la forme holo-FBP de PKM2, les résidus constitutifs de cette poche sont plus proches que dans l'état apo, ce qui indique une structuration de la région suivant la fixation du ligand FBP. Nos résultats confirment plusieurs travaux antérieurs de Morgan *et al.*¹² indiquant l'effet du FBP sur la modification structurale provoquée chez PKM2 au niveau de sa poche de fixation et notamment sur la boucle motif (résidus 514-523) dans l'équilibre des formes R/T du tétramère. Ces résultats sont confirmés à nouveau par la modélisation d'un état tétramérique lié au TEPP-46, un activateur pharmacologique, qui présente un profil de PKM2 très proche de celui obtenu avec la FBP. Néanmoins, il est important de souligner que la

région de fixation du TEPP-46 est localisée dans une poche différente de celle du FBP au sein de la protéine PKM2, située à l'interface A-A' de deux monomères de PKM2 (soit deux sites de fixation possible dans un tétramère), et cela pourrait être une raison pour laquelle le domaine B est plus rigide par rapport au domaine A dans ce cas précis. Mais l'interaction de TEPP-46 avec PKM2, au niveau de sa poche de fixation spécifique, est toujours capable de produire une bonne structuration du site actif en cohérence avec les résultats structuraux en condition PKM2 liée au FBP. Il est intéressant de noter que le profil de la poche de fixation du FBP en condition de fixation du TEPP sur PKM2 est proche de celle retrouvée en condition PKM2 uniquement liée au ligand FBP, et pourrait expliquer cet "effet FBP-like" du TEPP-46 observé dans la bibliographie expérimentale avec des analyses en gradient de sucrose pour l'effet sur l'oligomérisation ainsi que des analyses d'activité enzymatique³¹, notamment car une observation structurale de la poche de fixation du TEPP-46 montre une proximité assez significative avec des résidus PKM2-spécifique impliqués dans l'équilibre des formes R/T de PKM2 par des interactions à l'interface C-C'. En effet le résidu Lys421 a été proposé comme l'un des acteurs d'interaction de l'équilibre des états R/T par des interactions avec des résidus formant une cavité allant de la position 390 à 420¹². C'est justement au niveau de quelques résidus de cette cavité que TEPP-46 se fixe comprenant les acides aminés Tyr390/Gln393/Leu394/Glu397, d'où une autre plausible indication à approfondir de l'action structurante du TEPP-46 sur PKM2 pouvant ressembler aux effets de la fixation du FBP, malgré une interaction sur une région différente de ce dernier.

Enfin, nous avons également réalisé une caractérisation de l'état tétramérique de PKM1 qui est peu décrit dans la littérature en comparaison de son homologue PKM2. L'analyse RMSD/RG révèle la proximité de son profil avec celui du tétramère PKM2, avec ou sans FBP. La structure de PKM1 aurait un profil intermédiaire entre les formes holo et apo de PKM2. Ceci est cohérent avec le fait que, en condition physiologique, PKM1 est présente sous la forme d'un tétramère constitutivement actif dont l'activité est proche de celle de FBP-PKM2²⁸. Nos données RMSF révèlent la similitude des profils entre PKM1 et holo-PKM2 au niveau du domaine B et dans plusieurs régions contenant des acides aminés clés liés à la structuration du site actif. Néanmoins, plusieurs régions de PKM1 ont été observées avec une plus grande flexibilité des valeurs RMSF par rapport aux données obtenues pour holo-PKM2. La première région plus flexible dans le cas de PKM1 est localisée aux résidus 325-335 dont

fait partie Thr328 qui est impliqué dans la structuration du site actif de PKM1/2, résidu plus structuré dans sa position dans le cas de PKM2. Deuxièmement, les régions situées aux résidus 470-490/515-525 contiennent toutes deux des acides aminés clés impliqués dans la structuration de la poche de fixation du FBP de PKM2, où leur flexibilité est réduite. Une hypothèse pourrait être que ces petites régions de plus haute flexibilité présentes dans nos simulations de PKM1 pourraient bloquer la formation d'une poche FBP fonctionnelle. Actuellement, aucunes données structurelles ou expérimentales ne viennent confirmer un effet du FBP sur la PKM1, à l'exception de quelques données de l'étude de la boucle de régulation sur une structure cristalline fixe comparant la poche de fixation du FBP entre PKM1 et PKM2 obtenues par Dombrauckas *et al.*³⁴. La dernière région située aux résidus 390-405 est spécifique de PKM1 puisqu'elle est codée à partir de l'exon qui diffère entre les deux isoformes PKM1 et PKM2. Il s'agit d'un résultat cohérent mais surprenant car cette région contient des résidus avec une plus forte flexibilité structurale que ceux codés par l'exon spécifique de la PKM2 (à savoir Tyr390, Gln393 et Leu394) et qui participent à la liaison d'activateurs connus de PKM2 tels que TEPP-46 et DASA-58³¹. Une hypothèse pourrait être que l'instabilité relative de cette région clé chez PKM1 est l'une des raisons qui font de cette poche spécifique une cible pour PKM2 et non pour PKM1. Pour analyser le site actif de PKM1, nous avons choisi d'étudier la distance entre des acides aminés conservés chez les deux isoformes de PKM. Notre étude est en accord avec les données biologiques indiquant que PKM1 est une enzyme active (site actif structuré) dans laquelle le domaine B conserve une relative flexibilité. Cela est cohérent avec les résultats obtenus pour PKM2 puisqu'aucun résidu spécifique de l'exon correspondant à chaque isoforme n'est impliqué dans la structuration du site actif de ces protéines³⁴. Enfin, il y a la question de l'existence (ou de l'absence) de la poche de fixation FBP pour PKM1 puisqu'aucunes données expérimentales n'ont montré d'effet allostérique direct du FBP sur PKM1. Nos résultats apportent une validation supplémentaire à cette hypothèse puisque les distances entre les résidus 433 et 518 pour le tétramère PKM1 sont beaucoup plus élevées que l'état PKM2 lié à FBP. En effet, alors que PKM2 (apo et holo-FBP) présente deux états possibles, rien de comparable n'est observé pour PKM1. La distribution des distances montre une absence de structuration stable de la poche de fixation du FBP dans cette région de PKM1. Ces données permettent donc de corréler l'absence d'effet allostérique sur PKM1 avec l'absence de "poche allostérique" en lien avec des résidus spécifiques de l'exon qui sont absents sur l'isoforme PKM1¹¹. La production

de modèles aussi précis pour les deux isoformes a été précieuse pour nous aider à déterminer de nouvelles poches cryptiques spécifiques à la PKM2 avec un potentiel pour la conception de nouveaux médicaments. Ici, nous avons trouvé deux nouvelles poches qui pourraient avoir un impact sur l'équilibre entre les états T et R de la PKM2, l'une d'entre elles contenant la Cys423, proche de sa voisine la Cys424, impliquée dans la tétramérisation de la PKM2³⁴⁷. L'autre poche 'T_M2-11' contient le Trp515 localisé dans la boucle régulatrice dont l'implication dans la poche de fixation du FBP a été démontrée précédemment dans cette étude. L'identification de ces poches pourrait être un résultat prometteur sur la nécessité de sélectionner soigneusement les structures pour les études *in silico* afin de poursuivre le développement de petits ligands ciblant spécifiquement la PKM2. De manière plus générale, cela souligne également l'importance de la dynamique moléculaire pour les systèmes biologiques sans les contraintes liées à la structure cristalline initiale qui pourrait ou non être représentative de l'état global d'une enzyme biologique.

Limites des simulations

Nous avons donc pu obtenir des informations structurales nouvelles par l'utilisation de cette méthodologie de simulation de DM AMOEBA. Néanmoins, plusieurs limites doivent être soulignées, dont un coût élevé en calcul computationnel en lien avec la complexité du champ de forces et la taille des systèmes considérés. Une des problématiques majeures qui a été rencontrée concerne la paramétrisation de petits composés (dans notre cas le FBP et le TEPP-46) car ceux-ci ne sont pas naturellement connus dans la base de données de notre champ de forces. Il est donc nécessaire de bien paramétrer les ligands, dans notre cas avec le logiciel Poltype, avant de les intégrer dans les modèles PKM2. La simulation d'événements rares et la surestimation des effets de polarisation peuvent survenir dans AMOEBA. Ces événements sont liés à la manière dont AMOEBA génère les moments dipolaires des atomes, car ceux-ci peuvent être plus larges et donc manifester des effets de polarisation plus forts que dans la réalité. Néanmoins, notre utilisation d'AMOEBA se fait en couplage avec un protocole d'échantillonnage permettant d'explorer plus aisément les événements rares mais aussi de réduire l'impact de ce problème de polarisation afin de se rapprocher au mieux d'une dynamique réaliste des systèmes protéiques PKM1/PKM2.

D'autres limites sont liées à la méthodologie d'étude à l'aide d'une simulation de dynamique moléculaire, comme l'impact des conditions initiales choisies pour la simulation (choix des

structures PDB, influence du solvant). Dans le cas des conformations PDB, il est important de sélectionner des structures avec le moins d'éléments indésirables (mutations, résolution, entières de la protéine...) et pouvant regrouper l'ensemble des conditions possibles connues dans des études biologiques analogues. Pour cela les structures provenant de données expérimentales (ex : cristallographie Rayons X) sont les plus adéquates pour servir de point de départ. Néanmoins, il faut prêter attention à divers paramètres comme le pH ou même la nécessité (ou non) de conserver certaines molécules qui sont co-cristallisées avec les protéines d'intérêt.

Perspectives expérimentales et théoriques des modèles obtenus

Les résultats obtenus sur des analyses structurales globales de PKM1/PKM2 s'insèrent dans un domaine de recherche plus large nécessitant une confrontation avec les hypothèses et données biologiques déjà connues. Ceux-ci constituent un prérequis pour la recherche de nouvelles poches cryptiques spécifiques à PKM2, notamment afin de synthétiser de nouvelles molécules à action antitumorale mais aussi antivirale. En effet comme présentés succinctement en introduction, les virus détournent les voies cellulaires pour assurer leur multiplication, et notamment certaines voies métaboliques. Ce phénomène présente de nombreuses similitudes avec la réorientation des voies métaboliques observées lors d'un processus de transformation cancéreuse, notamment pour assurer la production de précurseurs nucléotidiques au profit de la synthèse de génomes viraux. On retrouve donc de nombreux exemples de l'implication de PKM2 dans le cycle de prolifération viral :

PKM2 : une cible pour traiter les infections virales ?

Le virus de la Dengue (DENV), appartenant à la famille des *Flaviridae*, un groupe de virus à ARN positif enveloppé. L'infection est associée à des signes légers (maux de tête, courbatures, fièvre...) mais peut entraîner des complications (douleurs abdominales, sang dans les selles, faiblesse musculaire, choc de Dengue...) allant jusqu'à la mort³⁴⁸. Une analyse chromatographique couplée à de la spectroscopie de masse a montré que la protéine PKM2 possède un plus haut degré de phosphorylation dans les cellules infectées, notamment sur les Tyr105 et Ser37. Par ailleurs, l'inhibition de PKM2 par blocage de l'effet activateur du FBP induit une baisse de la production de particule virale sans affecter la synthèse des protéines virales de façon significative. La forme dimérique de PKM2 favoriserait la multiplication du

DENV et est notamment connu après des modifications post-traductionnelles en réduisant le flux glycolytique et en permettant l'accumulation de métabolites requis pour les voies de synthèse alternes³⁴⁹. Les mécanismes d'action de l'inhibiteur choisie restent à explorer mais sa présence conduit à la formation d'un tétramère peu actif (forme T) en bloquant l'effet d'activateur du FBP sur PKM2³⁵⁰.

Le virus Influenza A, de la famille *Orthomyxoviridae*, comprend 8 segments d'ARN simple-brin(-). Il est impliqué dans des épidémies saisonnières pouvant conduire à une hospitalisation pour les individus fragiles (pneumonies...)³⁵¹. C'est au niveau de l'ARN polymérase ARN-dépendante de ce virus, hétérotrimère des protéines virales PB1/2 et PA³⁵², que PKM2 joue un rôle majeur. En effet, une interaction directe s'établit entre l'extrémité C-terminale de PA (résidus 639-716) et celle de PKM2 (résidus 414-531). Dans un modèle *ex-vivo* d'infection pulmonaire, l'expression de PKM2 est fortement augmentée durant la phase précoce de l'infection (4h). L'inhibition de PKM2 par silencing conduit à une baisse de l'expression de PB1, ce qui impacte négativement la réplication du virus Influenza. L'un des mécanismes moléculaires proposé suppose que PA pourrait être phosphorylée par la forme dimérique, phosphorylée de PKM2³⁵³. Ce processus pourrait ainsi contribuer à l'activité de la polymérase virale (activité transcriptase vers activité réplicase), une phase essentielle de la multiplication virale³⁵⁴.

Le Virus SARS-COV-2 est un virus enveloppé à ARN simple-brin(+) de la famille des *Coronaviridae*. La maladie qui lui est associée est la COVID-19 dont les principaux symptômes sont les troubles respiratoires, la fièvre et les fatigues musculaires. Une aggravation est possible pour les personnes plus fragiles menant à de graves difficultés respiratoires pouvant conduire au décès³⁵⁵. La transfection de cellules pulmonaires par un plasmide d'expression du SARS-COV-2, mimant l'infection, induit un changement du métabolisme glycolytique par diminution de la consommation en oxygène - représentatif d'une baisse de la voie OXPHOS/ETC - mais aussi d'un apport en métabolites insuffisant pour la voie TCA, c'est-à-dire d'une production réduite de pyruvate³⁵⁶. Ce mécanisme est associé à l'expression préférentielle de PKM2. En effet, une induction de la transcription et de la traduction de la protéine PTBP1 favorisent l'épissage alternatif préférentiel de PKM2 au détriment de PKM1, contrôlant ainsi le flux glycolytique au profit de l'accumulation de métabolites intermédiaires³⁵⁷. Des expériences conduites en présence de l'activateur pharmacologique TEPP-46 suggèrent une prévalence de l'état dimérique de PKM2. Cette

altération conduit l'accumulation d'AGEs (Advanced Glycation end-products), se formant spontanément par réaction entre les protéines et les métabolites glycolytiques, ce qui permet d'activer le récepteur RAGE (receptor of AGEs), une qui aboutit à la production de nombreuses cytokines inflammatoires³⁵⁸. L'ARNm de RAGE est également induit lors de l'infection par SARS-COV-2, ce qui permet de mettre en place une boucle de régulation positive de l'accumulation en AGEs sur les récepteurs RAGE. Cet effet est perdu lorsque le tétramère de PKM2 est activé par TEPP-46. La production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'activation de RAGE par les AGEs est dépendante de l'activation de la voie NF- κ B³⁵⁹. Stabiliser la forme tétramérique de PKM2 par TEPP-46 inverse bien les processus d'inflammation et de mort cellulaire qui en résultent³⁶⁰.

Implication de PKM2 dans les cancers viro-induits

Ainsi que nous l'avons indiqué en introduction, la PKM2 pourrait intervenir dans le processus de transformation induit par les papillomavirus oncogènes humains (HPV) et notamment HPV16. Les papillomavirus sont des virus nus à ADN double-brin de la famille des *Papillomaviridae*. HPV16 exprime une protéine oncogène, E7, qui stimule la transformation tumorale en inhibant la protéine cellulaire pRb, un anti-oncogène cellulaire³⁶¹. PKM2 interagit directement avec E7. L'inhibition de PKM2 par shRNA réduit la prolifération sans affecter l'expression de E7. Ce processus impliquerait le dimère PKM2 car l'utilisation d'une molécule activatrice (ML265) favorisant la formation du tétramère conduit à une réduction de la capacité proliférative des cellules cancéreuses. Ce résultat est cohérent avec le rôle pro-tumoral du dimère PKM2⁴⁴. L'utilisation de ML265 conduit à une réduction de la phosphorylation en Tyr105, lié à la forme dimérique de PKM2 et à ses fonctions nucléaires, sans modifier le niveau total en PKM2. En présence de la protéine E7, la phosphorylation de PKM2 est augmentée, permettant de favoriser son activité pro-tumorale³⁶².

L'Herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8) est un virus à ADN double-brin enveloppé appartenant aux *Orthoherpesviridae*. Dans un modèle de cellules endothéliales infectées par KSHV, on observe un métabolisme énergétique du type glycolyse aérobie marqué par une forte production en lactate et corrélé à une baisse de la respiration mitochondriale. Ce phénotype est la résultante de la promotion de l'expression du facteur HIF-1 α , connu comme un régulateur de l'effet Warburg dans un contexte tumoral⁴⁰, notamment grâce à une protéine virale de KSHV, le viral G protein-coupled receptor

(vGPCR). En effet, l'inhibition de HIF-1 α par la digoxine régule négativement le métabolisme glycolytique. La surexpression de HIF-1 α stimule la transcription de PKM2¹⁷⁴. Néanmoins, il reste à préciser l'état oligomérique de PKM2 dans cette situation, même si le maintien de ce phénotype de glycolyse aérobie pose l'hypothèse d'une prépondérance de la forme dimérique. En effet, la présence dans le noyau de cette protéine lors de l'infection par KSHV est associée à l'expression de VEGF, qui interagirait avec HIF-1 α et favoriserait par retour son activité transcriptionnelle. La surexpression de VEGF est un marqueur important de l'angiogenèse et de la migration cellulaire l'inhibition de l'expression de PKM2 par siRNA réduit ce processus. La voie mTOR, qui promeut l'expression de PKM2 grâce à HIF-1 α , est aussi impliquée dans ce processus car l'inhibition de PKM2 par la rapamycine bloque l'action de PKM2 sur l'angiogenèse et la migration cellulaire³⁶³.

Dans le cas de l'infection HBV, virus à ADN double-brin circulaire de la famille des *Hepadnaviridae*, PKM2 joue un rôle majeur à la fois dans la prolifération virale mais aussi dans le devenir transformant de l'infection par HBV³⁶⁴. En effet, une protéine virale de surface, nommée LHBS (hepatitis B virus large surface protein) joue un rôle primordial par sa capacité à interagir directement avec PKM2. Dans un modèle d'hépatocyte épithélial immortalisé exprimant cette protéine virale, l'interaction de LHBS avec PKM2 conduit à la mise en place d'un métabolisme de type glycolyse aérobie. Cela résulte d'une déstabilisation du tétramère de PKM2 qui privilégie la forme dimérique, entraînant une baisse de son activité enzymatique au profit de l'accumulation des métabolites intermédiaires de la glycolyse. La restauration de l'état tétramérique de PKM2 par TEPP-46 provoque une baisse dans la sécrétion d'antigènes de surface de HBV mais aussi dans l'expression de LHBS. Cette activité se traduit également par une baisse de 20 % de la production en particule virale HBV, ce qui souligne l'importance de PKM2 dans la synthèse protéique et la multiplication du virus. En induisant une baisse de la concentration en glucose et en utilisant un analogue du glucose, le 2-Deoxyglucose, la production en LHBS est réduite. De plus, LHBS intervient dans la transformation néoplasique en endommageant l'ADN et en dérégulant le cycle cellulaire³⁶⁵. L'activation de la forme tétramérique de PKM2 impacte négativement la prolifération cellulaire des cellules hépatocytaires-LHBS positive. PKM2 joue donc un rôle primordial dans la pathogénicité et le caractère transformant de HBV³⁶⁶.

Le virus de l'hépatite C (HCV) est un virus enveloppé à ARN simple-brin(+) de la famille des Flaviridae. L'infection du foie peut devenir chronique et induire, après plusieurs années,

un hépatocarcinome³⁶⁷. La protéine virale NS5B est une ARN polymérase ARN dépendante. Elle interagit avec PKM2. Cette interaction se produit au niveau périnucléaire dans le cytoplasme, même si l'état oligomérique de PKM2 reste à préciser. L'interaction de PKM2 avec NS5B réprime la réplication virale. Il faut également noter que le processus de transformation en hépatocarcinome est associé à une transition de l'enzyme PKL (PK du foie) vers la forme PKM2¹⁴⁻³⁶⁸.

PKM2 pourrait intervenir dans la transformation tumorale liée au virus Epstein-Barr

Des travaux conduits dans l'équipe de V. Maréchal suggèrent que PKM2 pourrait être impliquée dans les tumeurs associées au virus Epstein-Barr, un virus enveloppé à ADN double brin de la famille des *Herpesviridae*. Deux séries d'expériences suggèrent en effet que l'inactivation de PKM2 pourrait altérer le devenir des cellules tumorales et inhiber la réplication du virus.

HMGB1, une alarmine qui réprime la prolifération des cellules tumorales :

Des travaux du laboratoire ont établi que la protéine cellulaire HMGB1, une alarmine qui exerce aussi des fonctions extracellulaires, manifeste une activité antitumorale. Par ailleurs, l'activité de la forme tétramérique de PKM2 est être la cible d'une inhibition par la protéine HMGB1, menant à un blocage rapide de la glycolyse aérobie et en finalité à la mort cellulaire en condition tumorale²⁰⁴. HMGB1 comporte deux domaines de fixation à l'ADN appelés HMG-box A and B (résidus {1-79} et {89-162} respectivement). Les études récemment publiées par notre équipe ont permis de générer une forme minimale d'HMGB1 (HMGB1- Δ C) présentant un fort pouvoir antiprolifératif sur des cellules cancéreuses dérivées de carcinome à papillomavirus (HeLa) et sur différentes lignées de cancer colorectal. HMGB1- Δ C garderait sa capacité de fixation à PKM2 dans un modèle de docking in silico. Une analyse métabolique par Seahorse³⁶⁹ a été réalisée sur ces différents modèles cellulaires. Ces travaux démontrent que HMGB1- Δ C affecte le métabolisme de la glycolyse, de façon variable selon les lignées. D'autres études, en cours, démontrent également que la protéine HMGB1 inhibe la réplication du virus Epstein-Barr. Le rôle de PKM2 dans ce processus est en cours d'étude. Cette double activité, antitumorale et antivirale, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le traitement des cancers à EBV, situation dans laquelle il n'existe à ce jour aucune thérapeutique viro-spécifique³²².

Des travaux récemment publiés par notre équipe ont également souligné le potentiel thérapeutique de la shikonine, une molécule connue pour son action inhibitrice de PKM2 suite à une interaction directe. A l'aide de modèles cellulaires infectés par le virus Epstein Barr (EBV), il est démontré que l'utilisation de la shikonine après réactivation virale réduit la proportion en ADN viral EBV mais aussi la proportion en protéines virales précoces Zta et EA-D, essentielles à la réplication du virus Epstein-Barr. Les mécanismes identifiés indiquent que la shikonine agit en inhibant l'activation de l'inflammasome, une étape qui semble indispensable à la réplication du virus³⁷⁰. Dans nos modèles, l'utilisation de la shikonine entraîne un abaissement du niveau transcriptionnel en ARNm NLRP3, un constituant clef de l'inflammasome. De plus, l'utilisation d'inhibiteur spécifique des inflammasomes comme apigénine et OLT-1177 confirme leur importance dans la réactivation EBV même si leurs cibles diffèrent³⁷¹. Cet effet pourrait également être lié à la capacité, connue, d'interaction de la shikonine avec PKM2, dont l'expression est également liée à l'induction de l'inflammasome NLRP3³⁷². Des résultats préliminaires montrent notamment que EBV pourrait manipuler la voie glycolytique dépendante de PKM2 même s'il reste à confirmer ces hypothèses³⁷³.

Perspectives pour la synthèse de ligands de PKM2 à visée antivirale/antitumorale

Dans ce contexte d'une stratégie de ciblage de la protéine PKM2, différentes stratégies sont possibles :

1. Molécule ciblant la **poche de fixation allostérique du FBP**,
2. Cibler la **poche de fixation des ligands pharmacologiques de type TEPP-46/DASA-58**,
3. Molécule ciblant **des régions d'interface clés de tétramérisation** pour la stabiliser et éviter une transition vers le dimère au rôle positif dans la progression virale/tumorale,

Ces trois stratégies adoptent une même vision sur la perspective de synthèse de ligands en privilégiant la découverte de nouveaux activateurs pharmacologiques. Plus précisément en privilégiant une stabilisation de la forme tétramérique de PKM2, si possible dans son état R d'activité maximale. Induire cet état oligomérique permettrait ainsi de rétablir un métabolisme physiologique proche de celle de PKM1 par réduction des métabolites intermédiaires en amont de la glycolyse impactant négativement la prolifération cancéreuse

mais aussi virale.

Ainsi, à partir des modèles de PKM2 et PKM1 générés dans notre projet, il pourra être possible de rechercher et évaluer la robustesse de molécules candidates ayant une portée thérapeutique selon l'une des trois stratégies de ciblage préalablement définie. D'autres cibles peuvent aussi être envisagées selon la base de l'analyse des données structurales en provenance des dynamiques effectuées sur chacune des conditions PKM1/PKM2. Celle-ci reste perfectible sur de possibles corrélations longues distances entre résidus pour comprendre l'effet allostérique précis du FBP mais aussi et surtout du TEPP-46, sachant son site de liaison éloigné de la poche de fixation du FBP, sur la structure de PKM2.

1ère Phase : Détermination des molécules candidates

Dans un premier temps, il est nécessaire d'identifier et de définir la poche de fixation spécifique à PKM2. Cela se réalise soit par le choix d'un logiciel prédictif permettant de définir l'ensemble des poches de fixation d'un système avec une indication précise des volumes, surfaces et scores de druggabilité pour chacune d'elles (**DogSite**Erreur ! Signet non défini. ou **FPocket**³⁷⁴), soit en définissant manuellement les positions englobant le volume d'une poche déjà choisie et connue à l'aide d'un script du type **POVME**³⁷⁵. Ce choix peut aussi être lié à l'existence de données expérimentales validant la poche de fixation définie comme c'est notamment le cas pour la poche du FBP ou de celle où se fixent les activateurs pharmacologiques type TEPP-46 sachant leurs importances dans la structuration de PKM2 vers sa forme R. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer de tels sites avec de nouveaux logiciels prédictifs comme Alphafold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) en prenant garde à la validation en cohérence avec les données expérimentales comme dans notre cas de DM. Néanmoins, il reste pour l'instant difficile de construire des modèles prédictifs de structures multi-chaînes comme notre cas pour la PK mais reste un atout.

Une fois le choix des cibles défini, une phase de criblage virtuel doit être réalisée par docking des molécules obtenues à l'aide de bases de données judicieusement choisies (DrugBank, InterBioScreen...). La réalisation de ce criblage peut se faire avec un logiciel du type **Autodock**³⁷⁶ pour permettre un processus de docking à large échelle de l'ensemble des composés défini et ainsi identifier les meilleurs candidats pour approfondir l'étude. Les critères importants dans le choix de ces candidats sont des scores d'interaction élevés mais aussi d'autres facteurs comme la stabilité de l'interaction notamment en évaluant celle-ci au

fil du temps à l'aide des structures dynamiques définies en champ de forces AMOEBA dans cette thèse. Bien entendu, la même méthodologie se doit d'être réalisée sur une région structurale analogue de la protéine PKM1 pour s'assurer d'une spécificité d'interaction des candidats choisis avec PKM2 uniquement.

Enfin, pour terminer cette première phase de sélection des molécules candidates ciblant spécifiquement PKM2, une évaluation de l'énergie libre d'interaction des meilleurs composés issus du criblage virtuel permettrait de confirmer la spécificité d'interaction pour PKM2 par rapport à PKM1. Ceci reste réalisable dans Autodock à l'aide d'une grille de calcul pour définir une région autour de la poche de liaison incluant toutes les poses possibles où le ligand pourrait se lier.

2ème Phase : Sélection des ligands potentiels en vue de la conception d'un médicament

A l'issue de l'identification d'un premier ensemble de molécules candidates provenant du criblage virtuel en Autodock, ce projet d'études prospectives de nouveaux ligands doit s'articuler sur une validation expérimentale.

Cette évaluation nécessite l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* judicieusement choisis selon une étude prospective en modèle tumoral ou en modèle d'infection virale. Pour le choix de conditions cellulaires d'origine tumorale, la lignée **HeLa** provenant du cancer du col de l'utérus mais aussi une lignée de type glioblastome **U87MG**³⁷⁷ sont des modèles de choix notamment de par une expression préférentielle de PKM2 dans ces lignées. Afin de confirmer une implication spécifique de PKM2 dans l'effet de la molécule candidate, des modèles contrôles sont nécessaires exprimant préférentiellement PKM1 comme dans le cas d'une lignée de carcinome **HCT-116** ou une lignée cellulaire comme **BC1**³⁷⁸. A l'inverse si l'on cherche à évaluer l'impact des molécules candidates sur PKM2 en contexte d'infection virale, différentes lignées peuvent être choisies comme des lignées **Huh-7/HepG2.2.15** pour un modèle d'infection HBV, la lignée **A549** pour étudier l'infection Influenza ou encore une lignée **Akata** pour un modèle en infection EBV. Dans ces différents modèles, l'impact des molécules candidates sur PKM2 pourra être évalué soit en utilisant une méthode de co-culture avec des particules virales ou par transfection de plasmides exprimant uniquement des protéines virales clés connues comme partenaires de PKM2. Pour ce dernier, on peut citer les protéines LHBS et NS5B pour les virus HBV et HCV respectivement ou bien la protéine PA du complexe de polymérase virale du virus Influenza. Pour valider l'effet sur l'infection virale

des différentes molécules candidates, l'utilisation de modèle cellulaire analogue non infecté permettra aussi d'évaluer l'impact sur les voies métaboliques cellulaires et pas uniquement sur la réplication virale.

Une fois les modèles cellulaires *in vitro* définis, un ensemble de tests expérimentaux devra être réalisé pour quantifier l'impact des composés sur l'activité de PKM2. D'abord par l'utilisation de tests de viabilité cellulaire comme pour un test au MTT évaluant la cytotoxicité des composés candidats (mesure DL50). D'autres analyses comparatives sont possibles comme l'étude de l'apoptose, par cytométrie de flux avec test à l'annexine V et iodure de propidium, ou la prolifération cellulaire par un marquage au bromure de thymidine. De telles études sont importantes notamment dans le cas de modèles tumoraux et viraux afin d'évaluer un possible effet antitumoral attendu pour les ligands issus de notre stratégie de synthèse de molécules activatrices de PKM2 inhibant la tumorigenèse et la réplication virale.

La nécessité de vérifier l'interaction directe entre le ligand d'intérêt et PKM2 à l'aide d'un protocole d'immunoprécipitation, avec les contrôles nécessaires garantissant la spécificité d'interaction. Une validation complémentaire et plus avancée par chromatographie d'affinité est possible.

Etudier la localisation cellulaire de PKM2 en condition avec et sans les molécules d'intérêts pour avoir un premier retour sur l'état oligomérique possible de PKM2 et donc de sa fonction. Sachant notre stratégie visant à activer PKM2 vers son état tétramérique de plus haute activité enzymatique (forme R), une présence uniquement cytoplasmique de PKM2 serait attendue en condition avec le ligand. Des techniques d'imagerie à fluorescence sont ainsi envisageables, avec des anticorps adéquats, pour une visualisation détaillée. De plus, des protocoles de fractionnement cellulaire sont aussi possibles pour avoir des validations complémentaires sur la distribution intracellulaire de PKM2.

Se concentrer ensuite sur l'activité enzymatique et la voie métabolique de la glycolyse en analysant par Seahorse l'influence du ligand sur la production en lactate et sur la consommation en oxygène de la cellule. L'utilisation de protéines recombinantes déjà produites en laboratoire (collaboration Sorbonne J. HENRI,) peut aussi être majeure dans des études conformationnelles et cristallographiques de PKM2 avec son ligand. Pour cela, des analyses en chromatographie d'exclusion pourraient être envisagées pour quantifier le ratio des formes oligomériques prises par PKM2, notamment en présence du ligand d'intérêt pour valider son effet activateur privilégiant un état tétramérique. Des analyses supplémentaires

restent possibles pour mesurer l'activité enzymatique de notre modèle de protéines recombinantes en présence ou non de ce ligand avec un dosage en kit de la concentration en pyruvate dans le milieu selon une base colorimétrique. Pour finir, une étude cristallographique peut aussi être réalisée pour obtenir un modèle d'étude structurale. Il est à noter que la sélection des ligands candidats, ayant déjà été réalisée à l'aide d'une dynamique moléculaire issue d'une structure cristallographique de PKM2, pourrait présenter des informations redondantes (poche de fixation...) mais il n'est pas à exclure l'obtention de nouvelles informations structurales en cas d'étude de dynamique plus poussée sur une telle structure cristallographique.

Une autre information à vérifier concerne l'influence des molécules candidates sur d'autres voies ou partenaires protéiques non voulus pouvant altérer indirectement l'expression génique et/ou protéique mais aussi l'activité enzymatique de PKM2. Cela peut se décider selon deux échelles. La première qu'on pourrait qualifier de locale concernerait l'étude des profils d'expression de protéines bien connues comme des acteurs régulant l'expression de PKM2 comme la voie HIF-1 α /c-Myc, la signalisation PI3K/AKT/mTOR ou bien encore sur les ribonucléoprotéines hnRNPA1/2 et PTB. Une seconde serait plutôt axée sur une analyse plus globale des voies métaboliques en utilisant une technique de spectroscopie de masse afin d'avoir une vision plus large sur des changements métaboliques induits dans un contexte de présence de la molécule candidate.

Naturellement, ces travaux biologiques devront être conduits en parallèle soit sur des lignées exprimant préférentiellement PKM1 ou directement à l'aide d'une protéine recombinante PKM1 pour valider le caractère spécifique de l'interaction sur PKM2 et des effets métaboliques qui en découlent.

Une fois cette phase expérimentale importante réalisée et les données biologiques analysées pour chaque ligand candidat issu de la sélection par Autodock, une étape d'optimisation moléculaire reste envisageable avant une transition vers un modèle *in vivo*. Sur la base des molécules candidates ayant des résultats prometteurs à l'issue des tests biologiques, une meilleure compréhension de l'interaction ligand-protéine est nécessaire pour identifier des régions à modifier pour augmenter l'affinité et/ou la sélectivité d'une molécule pour PKM2. Quelques logiciels comme Autodock, discuté précédemment, ou encore AutoGrow³⁷⁹ permettent une telle visualisation pour ensuite faire le choix entre différentes stratégies

d'optimisation : modification de groupes fonctionnels, modulation de la conformation du ligand ou encore ajout de groupes substituants. Pour finir, la synthèse de tels composés provenant de la modélisation moléculaire devra être réalisée (collaboration possible à définir) en tenant compte de critères critiques en lien avec notre stratégie (affinité, absorption, toxicité, stabilité...). S'ensuit naturellement un nouveau cheminement de tests biologiques *in vitro* précédemment discuté pour valider le nouveau composant, le cas échéant pouvant nécessiter une nouvelle itération selon la même méthodologie.

Passé cette étape d'analyse *in vitro*, le passage à un modèle *in vivo* devra être fait pour évaluer l'efficacité des molécules dans un contexte animal pertinent lié à la pathologie cancéreuse ou virale ciblée. Dans un contexte d'étude de la pathologie cancéreuse, des souris en modèle de xénogreffes tumorales ou de modèles transgéniques induisant une pathologie tumorale sont appropriés. Les modèles de tumeurs de type glioblastome, qui expriment PKM2 à haut niveau, pourront être utilisés en priorité. A l'inverse, en vue d'étudier un modèle animal d'infection virale, des souris infectées naturellement ou par un modèle murin humanisé pourront être envisagés.

Analogue aux modèles *in vitro*, un ensemble d'évaluation devra être opéré sur ces modèles *in vivo* pour évaluer l'efficacité du ligand notamment au regard de la prolifération cancéreuse (taille de tumeur...) ou bien de la charge virale selon le contexte choisi. Une particularité du modèle *in vivo* à prendre en compte sera d'optimiser la méthode et la temporalité d'administration des molécules candidates pour assurer une bonne pharmacocinétique (= devenir du composé de son entrée jusqu'à son élimination de l'organisme) à l'aide d'une mesure de la concentration dans le sang. En plus des analyses biologiques déjà présentées pour quantifier l'action du ligand candidat sur PKM2 (activité enzymatique, interaction directe...), des analyses complémentaires au niveau de la réponse immunitaire de l'organisme animal peuvent aussi être mises en place. (dosage des cytokines en ELISA, lien discuté en introduction de PKM2 avec le phénotype des populations de macrophages et lymphocytes T...). Tout cela pour une meilleure compréhension de la mécanistique d'action du ligand sur la progression tumorale et virale.

Les résultats ainsi obtenus pour chacune des molécules candidates dans des exemples de modèles murins pourront, s'ils sont prometteurs et cohérents, contribuer à la conception d'études cliniques dans l'optique de nouveaux ligands PKM2-spécifique à visée thérapeutique antivirale et antitumorale.

En parallèle à cette stratégie de ciblage de poches, quelques perspectives en DM avec le champ de forces AMOEBA se posent pour améliorer les simulations de DM sur nos systèmes biologiques. Des travaux récents du laboratoire provenant de Jaffrelot Inizan *et al*³⁸⁰ ont mis au point un nouveau module de Tinker-HP, appelé Deep-HP, désigné notamment pour l'étude de modèle de fixation à plusieurs million d'atomes avec un ligand grâce à un couplage entre le code GPU de Tinker-HP avec des modèles en réseaux de neurones. Celui-ci permettrait ainsi de mieux capturer les interactions intramoléculaires complexes à la fois avec le solvant mais dans le soluté en lui-même que dans le cas d'un modèle AMOEBA seul en Tinker-HP. Il en va de même pour les méthodologies d'échantillonnage pour augmenter la cartographie de structures parcourues lors d'une simulation DM. En effet, notre méthode choisie poserait un biais à prendre en compte dans le cas d'analyse des profils énergétiques des structures obtenues pour compenser le protocole de sélection des régions moins explorées provenant des précédentes itérations. Corriger cette problématique à l'aide de modèle sans biais comme un modèle Markov³⁸¹ permettrait de recouvrir un ensemble non-biaisé à partir d'un jeu de dynamiques provenant d'un échantillonnage avec biais. Cette méthodologie permettrait ainsi une exploration plus précise des processus cinétiques et thermodynamiques au cours de la simulation DM. Bien entendu, un autre élément clé de nos simulations se base sur le pH défini en lien avec celui choisi dans notre étude qui se base sur des cohérences biologiques et enzymatiques en contexte cancéreux. Néanmoins, les mécanismes de liaisons des différents ligands et des interactions intra-/intermoléculaires sont impactés par cette propriété notamment par différents niveaux de protonations de résidus clés. Il faudra ainsi réitérer le processus de simulation DM effectué dans un contexte où le pH voulu diffère de façon importante avec celui défini dans notre projet. Il ne s'agit ici que de quelques piste d'études permettant d'améliorer avec intérêt le développement de longues simulations de système biologiques cruciaux, notamment de modèle tout-atome, tout en restituant avec un réalisme le plus fidèle possible les interactions à courtes et longues distances mais aussi des mouvements structuraux de tels systèmes.

En conclusion, les données apportées dans cette thèse avec la modélisation de modèles à haute résolution de PKM1 et PKM2 par utilisation du champ de forces AMOEBA permettent de poser de nombreuses bases pour de vastes perspectives en vue de caractériser

et moduler de façon spécifique le métabolisme PKM2 qui reste un des éléments majeurs dans la mise en place d'un phénotype nécessaire au métabolisme du cancer et de l'infection virale.

Bibliographie

-
- 1 William G. Kaelin et Craig B. Thompson, « Clues from Cell Metabolism », *Nature* 465, n° 7298 (juin 2010): 562-64, <https://doi.org/10.1038/465562a>.
 - 2 Zhang, Ze, Xinyue Deng, Yuanda Liu, Yahui Liu, Liankun Sun, et Fangfang Chen. « PKM2, function and expression and regulation ». *Cell & Bioscience* 9, n° 1 (26 juin 2019): 52. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0317-8>.
 - 3 Bonora, Massimo, Simone Patergnani, Alessandro Rimessi, Elena De Marchi, Jan M. Suski, Angela Bononi, Carlotta Giorgi, et al. « ATP Synthesis and Storage ». *Purinergic Signalling* 8, n° 3 (1 septembre 2012): 343-57. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.
 - 4 Buchner, Eduard. « Alkoholische Gahrung Ohne Hefezellen ». *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 30, n° 1 (1897): 117-24. <https://doi.org/10.1002/cber.18970300121>.
 - 5 Kloske, Marcin. *Novichoks - knowledge and research directions on the « A » group of organophosphorus chemical warfare agents*, 2019. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16350.28489>.
 - 6 Maratou, E., G. Dimitriadis, A. Kollias, E. Boutati, V. Lambadiari, P. Mitrou, et S. A. Raptis. « Glucose Transporter Expression on the Plasma Membrane of Resting and Activated White Blood Cells ». *European Journal of Clinical Investigation* 37, n° 4 (2007): 282-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>.
 - 7 Warburg, Otto, Franz Wind, et Erwin Negelein. « THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY ». *The Journal of General Physiology* 8, n° 6 (7 mars 1927): 519-30.
 - 8 Kenzaburo, Tani, Michihiro C. Yoshida, Satoh Hitoshi, Mitamura Keiji, Noguchi Tamio, Tanaka Takehiko, Fujii Hisaichi, et Miwa Shiro. « Human M2-Type Pyruvate Kinase: cDNA Cloning, Chromosomal Assignment and Expression in Hepatoma ». *Gene* 73, n° 2 (20 decembre 1988): 509-16. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90515-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90515-X).
 - 9 IMAMURA, Kiichi, et Takehiko TANAKA. « Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase from Rat and Other Mammalian Tissues*: I. Electrophoretic Studies** ». *The Journal of Biochemistry* 71, n° 6 (1 juin 1972): 1043-51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129852>.
 - 10 Tani, Kenzaburo, Hisaichi Fujii, Hisashi Tsutsumi, Jun Sukegawa, Kumao Toyoshima, Michihiro C. Yoshida, Tamio Noguchi, Takehiko Tanaka, et Shiro Miwa. « Human Liver Type Pyruvate Kinase: cDNA Cloning and Chromosomal Assignment ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143, n° 2 (13 mars 1987): 431-38. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91372-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91372-6).
 - 11 Israelsen, William J., et Matthew G. Vander Heiden. « Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer ». *Seminars in cell & developmental biology* 43 (juillet 2015): 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.08.004>.
 - 12 Morgan, Hugh P., Francis J. O'Reilly, Martin A. Wear, J. Robert O'Neill, Linda A.

-
- Fothergill-Gilmore, Ted Hupp, et Malcolm D. Walkinshaw. « M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, n° 15 (9 avril 2013): 5881-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217157110>.
- 13 Mazurek, Sybille, C. Bruce Boschek, Ferdinand Hugo, et Erich Eigenbrodt. « Pyruvate Kinase Type M2 and Its Role in Tumor Growth and Spreading ». *Seminars in Cancer Biology*, Tumor Metabolome, 15, n° 4 (1 août 2005): 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.009>.
- 14 Hacker, H J, P Steinberg, et P Bannasch. « Pyruvate kinase isoenzyme shift from L-type to M2-type is a late event in hepatocarcinogenesis induced in rats by a choline-deficient/DL-ethionine-supplemented diet. » *Carcinogenesis* 19, n° 1 (1 janvier 1998): 99-107. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.99>.
- 15 Christofk, Heather R., Matthew G. Vander Heiden, Marian H. Harris, Arvind Ramanathan, Robert E. Gerszten, Ru Wei, Mark D. Fleming, Stuart L. Schreiber, et Lewis C. Cantley. « The M2 Splice Isoform of Pyruvate Kinase Is Important for Cancer Metabolism and Tumour Growth ». *Nature* 452, n° 7184 (mars 2008): 230-33. <https://doi.org/10.1038/nature06734>.
- 16 Desai, Shruti, Minming Ding, Bin Wang, Zhimin Lu, Qi Zhao, Kenna Shaw, W.K. Alfred Yung, John N. Weinstein, Ming Tan, et Jun Yao. « Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers ». *Oncotarget* 5, n° 18 (7 août 2013): 8202-10.
- 17 Takenaka, Masaru, Tamio Noguchi, Shigeki Sadahiro, Haruhiko Hirai, Kazuya Yamada, Tamiko Matsuda, Enyu Imai, et Takehiko Tanaka. « Isolation and Characterization of the Human Pyruvate Kinase M Gene ». *European Journal of Biochemistry* 198, n° 1 (1991): 101-6. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15991.x>.
- 18 Clower, Cynthia V., Deblina Chatterjee, Zhenxun Wang, Lewis C. Cantley, Matthew G. Vander Heiden, et Adrian R. Krainer. « The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 5 (2 février 2010): 1894-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914845107>.
- 19 Wang, Zhenxun, Deblina Chatterjee, Hyun Yong Jeon, Martin Akerman, Matthew G. Vander Heiden, Lewis C. Cantley, et Adrian R. Krainer. « Exon-centric regulation of pyruvate kinase M alternative splicing via mutually exclusive exons ». *Journal of Molecular Cell Biology* 4, n° 2 (avril 2012): 79-87. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr030>.
- 20 David, Charles J., Mo Chen, Marcela Assanah, Peter Canoll, et James L. Manley. « HnRNP Proteins Controlled by C-Myc Deregulate Pyruvate Kinase mRNA Splicing in Cancer ». *Nature* 463, n° 7279 (janvier 2010): 364-68. <https://doi.org/10.1038/nature08697>.
- 21 Sun, Qian, Xinxin Chen, Jianhui Ma, Haiyong Peng, Fang Wang, Xiaojun Zha, Yanan Wang, et al. « Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase

-
- isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 10 (8 mars 2011): 4129-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014769108>.
- 22 Schäfer, Doris, Brigitte Hamm-Künzelmann, et Karl Brand. « Glucose Regulates the Promoter Activity of Aldolase A and Pyruvate Kinase M2 via Dephosphorylation of Sp1 ». *FEBS Letters* 417, n° 3 (17 novembre 1997): 325-28. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01314-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01314-8).
- 23 Kress, Stefan, Annette Stein, Patrick Maurer, Bernd Weber, Jeannette Reichert, Albrecht Buchmann, Peter Huppert, et Michael Schwarz. « Expression of Hypoxia-Inducible Genes in Tumor Cells ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 124, n° 6 (1 juillet 1998): 315-20. <https://doi.org/10.1007/s004320050175>.
- 24 Ikeda, Yoshitaka, Takehiko Tanaka, et Tamio Noguchi. « Conversion of Non-Allosteric Pyruvate Kinase Isozyme into an Allosteric Enzyme by a Single Amino Acid Substitution* ». *Journal of Biological Chemistry* 272, n° 33 (15 août 1997): 20495-501. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20495>.
- 25 Gupta, Vibhor, et Rameshwar NK Bamezai. « Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 19, n° 11 (novembre 2010): 2031-44. <https://doi.org/10.1002/pro.505>.
- 26 Yuan, Meng, Iain W. McNae, Yiyuan Chen, Elizabeth A. Blackburn, Martin A. Wear, Paul A.M. Michels, Linda A. Fothergill-Gilmore, Ted Hupp, et Malcolm D. Walkinshaw. « An allostatic mechanism for M2 pyruvate kinase as an amino-acid sensor ». *Biochemical Journal* 475, n° 10 (31 mai 2018): 1821-37. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180171>.
- 27 Keller, Kirstie E., Irene S. Tan, et Young-Sam Lee. « SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose -Limited Conditions ». *Science (New York, N.Y.)* 338, n° 6110 (23 novembre 2012): 1069-72. <https://doi.org/10.1126/science.1224409>.
- 28 Christofk, Heather, Matthew Heiden, Ning Wu, John Asara, et Lewis Cantley. « Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein ». *Nature* 452 (1 avril 2008): 181-86. <https://doi.org/10.1038/nature06667>.
- 29 Kato, Hirokazu, Takaaki Fukuda, Clifford Parkison, Peter McPhie, et Sheue-Yann Cheng. « Cytosolic Thyroid Hormone-Binding Protein is a Monomer of Pyruvate Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, n° 20 (1989): 7861-65.
- 30 Jurica, Melissa S., Andrew Mesecar, Patrick J. Heath, Wuxian Shi, Thomas Nowak, et Barry L. Stoddard. « The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase by Fructose-1,6-Bisphosphate ». *Structure* 6, n° 2 (15 février 1998): 195-210. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00021-5).
- 31 Anastasiou, Dimitrios, Yimin Yu, William J. Israelsen, Jian-kang Jiang, Matthew B. Boxer, Bum Soo Hong, Wolfram Tempel, et al. « Pyruvate kinase M2 activators promote

-
- tetramer formation and suppress tumorigenesis ». *Nature chemical biology* 8, n° 10 (octobre 2012): 839-47. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1060>.
- 32 Dong, Gaochao, Qixing Mao, Wenjie Xia, Youtao Xu, Jie Wang, Lin Xu, et Feng Jiang. « PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review) ». *Oncology Letters* 11, n° 3 (1 mars 2016): 1980-86. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4168>.
- 33 Iqbal, Mohd Askandar, Farid Ahmad Siddiqui, Noor Chaman, Vibhor Gupta, Bhupender Kumar, Prakasam Gopinath, et Rameshwar N. K. Bamezai. « Missense Mutations in Pyruvate Kinase M2 Promote Cancer Metabolism, Oxidative Endurance, Anchorage Independence, and Tumor Growth in a Dominant Negative Manner ». *The Journal of Biological Chemistry* 289, n° 12 (21 mars 2014): 8098-8105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515742>.
- 34 Dombrauckas, Jill D., Bernard D. Santarsiero, et Andrew D. Mesecar. « Structural Basis for Tumor Pyruvate Kinase M2 Allosteric Regulation and Catalysis », *Biochemistry* 44, n° 27 (1 juillet 2005): 9417-29. <https://doi.org/10.1021/bi0474923>.
- 35 Mazurek, Sybille. « Pyruvate Kinase Type M2: A Key Regulator of the Metabolic Budget System in Tumor Cells ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Metabolic Pathways in Cancer*, 43, n° 7 (1 juillet 2011): 969-80. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.005>.
- 36 Eigenbrodt, E., M. Reinacher, U. Scheefers-Borchel, H. Scheefers, et R. Friis. « Double Role for Pyruvate Kinase Type M2 in the Expansion of Phosphometabolite Pools Found in Tumor Cells ». *Critical Reviews in Oncogenesis* 3, n° 1-2 (1992): 91-115.
- 37 Lu, Zhimin, et Tony Hunter. « Prolyl Isomerase Pin1 in Cancer ». *Cell Research* 24, n° 9 (septembre 2014): 1033-49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.109>.
- 38 Brinck, U., G. Fischer, E. Eigenbrodt, M. Oehmke, et S. Mazurek. « L- and M2- Pyruvate Kinase Expression in Renal Cell Carcinomas and Their Metastases ». *Virchows Archiv* 424, n° 2 (1 mars 1994): 177-85. <https://doi.org/10.1007/BF00193498>.
- 39 Yang, Weiwei, Yanhua Zheng, Yan Xia, Haitao Ji, Xiaomin Chen, Fang Guo, Costas A. Lyssiotis, Kenneth Aldape, Lewis C. Cantley, et Zhimin Lu. « ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect ». *Nature cell biology* 14, n° 12 (décembre 2012): 1295-1304. <https://doi.org/10.1038/ncb2629>.
- 40 Luo, Weibo, et Gregg L. Semenza. « Emerging Roles of PKM2 in Cell Metabolism and Cancer Progression ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23, n° 11 (1 novembre 2012): 560-66. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.010>.
- 41 Park, Young Soo, Dong Joon Kim, Han Koo, Se Hwan Jang, Yeon-Mi You, Jung Hee Cho, Suk-Jin Yang, et al. « AKT-Induced PKM2 Phosphorylation Signals for IGF-1-Stimulated Cancer Cell Growth ». *Oncotarget* 7, n° 30 (7 juillet 2016): 48155. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10179>.
- 42 Yu, Zhenhai, Xiaoping Zhao, Liangqian Huang, Teng Zhang, Fajun Yang, Lei Xie,

-
- Shaoli Song, et al. « Proviral Insertion in Murine Lymphomas 2 (PIM2) Oncogene Phosphorylates Pyruvate Kinase M2 (PKM2) and Promotes Glycolysis in Cancer Cells * ». *Journal of Biological Chemistry* 288, n° 49 (6 décembre 2013): 35406-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508226>.
- 43 Lv, Lei, Dong Li, Di Zhao, Ruiting Lin, Yajing Chu, Heng Zhang, Zhengyu Zha, et al. « Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth ». *Molecular Cell* 42, n° 6 (24 juin 2011): 719-30. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.025>.
- 44 Lv, Lei, Yan-Ping Xu, Di Zhao, Fu-Long Li, Wei Wang, Naoya Sasaki, Ying Jiang, et al. « Mitogenic and Oncogenic Stimulation of K433 Acetylation Promotes PKM2 Protein Kinase Activity and Nuclear Localization ». *Molecular Cell* 52, n° 3 (7 novembre 2013): 340-52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.004>.
- 45 Bhardwaj, Abhishek, et Sanjeev Das. « SIRT6 deacetylates PKM2 to suppress its nuclear localization and oncogenic functions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, n° 5 (2 février 2016): E538-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520045113>.
- 46 Park, Seong-Hoon, Ozkan Ozden, Guoxiang Liu, Ha Yong Song, Yueming Zhu, Yufan Yan, Xianghui Zou, et al. « SIRT2-Mediated Deacetylation and Tetramerization of Pyruvate Kinase Directs Glycolysis and Tumor Growth ». *Cancer Research* 76, n° 13 (30 juin 2016): 3802-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2498>.
- 47 Luo, Weibo, Hongxia Hu, Ryan Chang, Jun Zhong, Matthew Knabel, Robert O'Meally, Robert N. Cole, Akhilesh Pandey, et Gregg L. Semenza. « Pyruvate Kinase M2 is a PHD3-stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1 ». *Cell* 145, n° 5 (27 mai 2011): 732-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.054>.
- 48 Irokawa, Hayato, Satoshi Numasaki, Shin Kato, Kenta Iwai, Atsushi Inose-Maruyama, Takumi Ohdate, Gi-Wook Hwang, Takashi Toyama, Toshihiko Watanabe, et Shusuke Kuge. « Comprehensive analyses of the cysteine thiol oxidation of PKM2 reveal the effects of multiple oxidation on cellular oxidative stress response ». *Biochemical Journal* 478, n° 7 (16 avril 2021): 1453-70. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200897>.
- 49 Iqbal, Mohd Askandar, Farid Ahmad Siddiqui, Vibhor Gupta, Shilpi Chattopadhyay, Prakasam Gopinath, Bhupender Kumar, Siddharth Manvati, Noor Chaman, et Rameshwar NK Bamezai. « Insulin Enhances Metabolic Capacities of Cancer Cells by Dual Regulation of Glycolytic Enzyme Pyruvate Kinase M2 ». *Molecular Cancer* 12, n° 1 (9 juillet 2013): 72. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-72>.
- 50 Groux-Degroote, Sophie, François Foulquier, Sumeyye Cavdarli, et Philippe Delannoy. « Les mécanismes de régulation de la glycosylation - Exemples d'altérations des chaînes glycaniques dans les cancers ». *médecine/sciences* 37, n° 6-7 (1 juin 2021): 609-17. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021082>.
- 51 Singh, Jay Prakash, Kevin Qian, Jeong-Sang Lee, Jinfeng Zhou, Xuemei Han, Bichen Zhang, Qunxiang Ong, et al. « O-GlcNAcase targets pyruvate kinase M2 to regulate tumor growth ». *Oncogene* 39, n° 3 (janvier 2020): 560-73.

<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0975-3>.

- 52 Wang, Yang, Jia Liu, Xin Jin, Dapeng Zhang, Dongxue Li, Fengqi Hao, Yunpeng Feng, et al. « O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, n° 52 (26 décembre 2017): 13732-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704145115>.
- 53 Liu, Fabao, Fengfei Ma, Yuyuan Wang, Ling Hao, Hao Zeng, Chenxi Jia, Yidan Wang, et al. « PKM2 Methylation by CARM1 Activates Aerobic Glycolysis to Promote Tumorigenesis ». *Nature Cell Biology* 19, n° 11 (novembre 2017): 1358-70. <https://doi.org/10.1038/ncb3630>.
- 54 Garcia-Gonzalo, Francesc R, Cristina Cruz, Purificación Muñoz, Sybille Mazurek, Erich Eigenbrodt, Francesc Ventura, Ramon Bartrons, et Jose Luis Rosa. « Interaction between HERC1 and M2-Type Pyruvate Kinase ». *FEBS Letters* 539, n° 1 (27 mars 2003): 78-84. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00205-9).
- 55 Liu, Kun, Fanzhou Li, Haichao Han, Yue Chen, Zebin Mao, Jianyuan Luo, Yingming Zhao, Bin Zheng, Wei Gu, et Wenhui Zhao. « Parkin Regulates the Activity of Pyruvate Kinase M2 * ». *Journal of Biological Chemistry* 291, n° 19 (6 mai 2016): 10307-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.703066>.
- 56 Gentry, Matthew S., Carolyn A. Worby, et Jack E. Dixon. « Insights into Lafora disease: Malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, n° 24 (14 juin 2005): 8501-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503285102>.
- 57 Viana, Rosa, Pablo Lujan, et Pascual Sanz. « The Laforin/Malin E3-Ubiquitin Ligase Complex Ubiquitinates Pyruvate Kinase M1/M2 ». *BMC Biochemistry* 16, n° 1 (23 octobre 2015): 24. <https://doi.org/10.1186/s12858-015-0053-6>.
- 58 Kim, So-Ra, Jin-Ock Kim, Key-Hwan Lim, Ji-Hyun Yun, Inbo Han, et Kwang-Hyun Baek. « Regulation of pyruvate kinase isozyme M2 is mediated by the ubiquitin-specific protease 20 ». *International Journal of Oncology* 46, n° 5 (1 mai 2015): 2116-24. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2901>.
- 59 Spoden, Gilles A., Dieter Morandell, Daniela Ehehalt, Marc Fiedler, Pidder Jansen-Dürr, Martin Hermann, et Werner Zwerschke. « The SUMO-E3 Ligase PIAS3 Targets Pyruvate Kinase M2 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 107, n° 2 (2009): 293-302. <https://doi.org/10.1002/jcb.22125>.
- 60 Zwerschke, Werner, et Pidder Jansen-Dürr. « Cell Transformation by the E7 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16: Interactions with Nuclear and Cytoplasmic Target Proteins ». In *Advances in Cancer Research*, édité par George F. Vande Woude et George Klein, 78:1-29. Academic Press, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)61022-2](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)61022-2).
- 61 Presek, Peter, Manfred Reinacher, et Erich Eigenbrodt. « Pyruvate Kinase Type M2 Is Phosphorylated at Tyrosine Residues in Cells Transformed by Rous Sarcoma Virus ». *FEBS Letters* 242, n° 1 (19 décembre 1988): 194-98. <https://doi.org/10.1016/0014->

- 62 Viegas, Filipe O., et Stephan C. F. Neuhaus. « A Metabolic Landscape for Maintaining Retina Integrity and Function ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.656000>.
- 63 Mazurek, S., H. Grimm, C. B. Boschek, P. Vaupel, et E. Eigenbrodt. « Pyruvate Kinase Type M2: A Crossroad in the Tumor Metabolome ». *British Journal of Nutrition* 87, n° S1 (janvier 2002): S23-29. <https://doi.org/10.1079/BJN2001454>.
- 64 Mazurek, Sybille, Hannes C A Drexler, Jakob Troppmair, Erich Eigenbrodt, et Ulf R Rapp. « Regulation of Pyruvate Kinase Type M2 by A-Raf: A Possible Glycolytic Stop or Go Mechanism ». *ANTICANCER RESEARCH*, 2007.
- 65 Onodera, Yasuhito, Jin-Min Nam, et Mina J. Bissell. « Increased Sugar Uptake Promotes Oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc Pathways ». *The Journal of Clinical Investigation* 124, n° 1 (1 janvier 2014): 367. <https://doi.org/10.1172/JCI63146>.
- 66 Luo, Weibo, et Gregg L. Semenza. « Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells ». *Oncotarget* 2, n° 7 (25 juin 2011): 551-56.
- 67 Tamada, Mayumi, Makoto Suematsu, et Hideyuki Saya. « Pyruvate Kinase M2: Multiple Faces for Conferring Benefits on Cancer Cells ». *Clinical Cancer Research* 18, n° 20 (14 octobre 2012): 5554-61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0859>.
- 68 Wang, Hung-Jung, Ya-Ju Hsieh, Wen-Chi Cheng, Chun-Pu Lin, Yu-shan Lin, So-Fang Yang, Chung-Ching Chen, et al. « JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1 α -mediated glucose metabolism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, n° 1 (7 janvier 2014): 279-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311249111>.
- 69 Saleme, Bruno, Vikram Gurtu, Yongneng Zhang, Adam Kinnaird, Aristeidis E. Boukouris, Keshav Gopal, John R. Ussher, et Gopinath Sutendra. « Tissue-specific regulation of p53 by PKM2 is redox dependent and provides a therapeutic target for anthracycline-induced cardiotoxicity ». *Science Translational Medicine* 11, n° 478 (6 février 2019): eaau8866. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau8866>.
- 70 Anastasiou, Dimitrios, George Pouligiannis, John M. Asara, Matthew B. Boxer, Jiankang Jiang, Min Shen, Gary Bellinger, et al. « Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses ». *Science* 334, n° 6060 (2 décembre 2011): 1278-83. <https://doi.org/10.1126/science.1211485>.
- 71 Yang, Weiwei, Yan Xia, Haitao Ji, Yanhua Zheng, Ji Liang, Wenhua Huang, Xiang Gao, Kenneth Aldape, et Zhimin Lu. « Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation ». *Nature* 480, n° 7375 (1 décembre 2011): 118-22. <https://doi.org/10.1038/nature10598>.
- 72 Yang, Weiwei, et Zhimin Lu. « Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect ». *Cell Cycle* 12, n° 19 (1 octobre 2013): 3154-58. <https://doi.org/10.4161/cc.26182>.

-
- 73 Li, Zhengkun, Xu Li, Shouzhen Wu, Mei Xue, et Wei Chen. « Long non-coding RNA UCA1 promotes glycolysis by upregulating hexokinase 2 through the mTOR–STAT3/microRNA143 pathway ». *Cancer Science* 105, n° 8 (août 2014): 951-55. <https://doi.org/10.1111/cas.12461>.
- 74 Méndez-Lucas, Andrés, Xiaolei Li, Junjie Hu, Li Che, Xinhua Song, Jiaoyuan Jia, Jingxiao Wang, et al. « Glucose Catabolism in Liver Tumors Induced by c-MYC Can Be Sustained by Various PKM1/PKM2 Ratios and Pyruvate Kinase Activities ». *Cancer Research* 77, n° 16 (14 août 2017): 4355-64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0498>.
- 75 Gao, Xueliang, Haizhen Wang, J. Yang Jenny, Xiaowei Liu, et Zhi-Ren Liu. « Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as A Protein Kinase ». *Molecular Cell* 45, n° 5 (9 mars 2012): 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.001>.
- 76 Demaria, Marco, et Valeria Poli. « PKM2, STAT3 and HIF-1 α ». *JAK-STAT* 1, n° 3 (1 juillet 2012): 194-96. <https://doi.org/10.4161/jkst.20662>.
- 77 Yang, Peng, Zongwei Li, Rong Fu, Haili Wu, et Zhuoyu Li. « Pyruvate Kinase M2 Facilitates Colon Cancer Cell Migration via the Modulation of STAT3 Signalling ». *Cellular Signalling* 26, n° 9 (1 septembre 2014): 1853-62. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.03.020>.
- 78 Yang, Weiwei, Yan Xia, David Hawke, Xinjian Li, Ji Liang, Dongming Xing, Kenneth Aldape, Tony Hunter, W K Alfred Yung, et Zhimin Lu. « PKM2 Phosphorylates Histone H3 and Promotes Gene Transcription and Tumorigenesis ». *Cell* 150, n° 4 (17 août 2012): 685-96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.018>.
- 79 Jiang, Yuhui, Xinjian Li, Weiwei Yang, David H. Hawke, Yanhua Zheng, Yan Xia, Kenneth Aldape, et al. « PKM2 Regulates Chromosome Segregation and Mitosis Progression of Tumor Cells ». *Molecular Cell* 53, n° 1 (9 janvier 2014): 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.001>.
- 80 Morfouace, M, L Lalier, L Oliver, M Cheray, C Pecqueur, P-F Cartron, et F M Vallette. « Control of glioma cell death and differentiation by PKM2–Oct4 interaction ». *Cell Death & Disease* 5, n° 1 (janvier 2014): e1036. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.561>.
- 81 Bonnet, Sébastien, Stephen L. Archer, Joan Allalunis-Turner, Alois Haromy, Christian Beaulieu, Richard Thompson, Christopher T. Lee, et al. « A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth ». *Cancer Cell* 11, n° 1 (1 janvier 2007): 37-51. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020>.
- 82 Weinberger, R., B. Appel, A. Stein, Y. Metz, A. Neheman, et M. Barak. « The Pyruvate Kinase Isoenzyme M2 (Tu M2-PK) as a Tumour Marker for Renal Cell Carcinoma ». *European Journal of Cancer Care* 16, n° 4 (2007): 333-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2006.00753.x>.
- 83 Ahmed, A. S., T. Dew, F. G. Lawton, A. J. Papadopoulos, O. Devaja, K. S. Raju, et R. A. Sherwood. « M2-PK as a Novel Marker in Ovarian Cancer. A Prospective Cohort

Study ». *European Journal of Gynaecological Oncology* 28, n° 2 (2007): 83-88.

- 84 Li, Liangwei, Yinwei Zhang, Jingjuan Qiao, Jenny J. Yang, et Zhi-Ren Liu. « Pyruvate Kinase M2 in Blood Circulation Facilitates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 289, n° 37 (12 septembre 2014): 25812-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576934>.
- 85 Elmore, Susan. « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death ». *Toxicologic Pathology* 35, n° 4 (juin 2007): 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- 86 Liang, Ji, Ruixiu Cao, Xiongjun Wang, Yajuan Zhang, Pan Wang, Hong Gao, Chen Li, et al. « Mitochondrial PKM2 Regulates Oxidative Stress-Induced Apoptosis by Stabilizing Bcl2 ». *Cell Research* 27, n° 3 (mars 2017): 329-51. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.159>.
- 87 Yang, Jing, Zujiang Yu, Jingjing Li, Ailing Zhang, Xiaojian Zhang, et Quancheng Kan. « Impact of PKM2 Gene Silencing on Biological Behavior of HepG2 Cells », s. d.
- 88 Dong, Delu, Yuan Dong, Jiaying Fu, Shengyao Lu, Chunli Yuan, Meihui Xia, et Liankun Sun. « Bcl2 Inhibitor ABT737 Reverses the Warburg Effect via the Sirt3-HIF1 α Axis to Promote Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Ovarian Cancer Cells ». *Life Sciences* 255 (15 août 2020): 117846. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117846>.
- 89 Hu, Wen, Shi-Xun Lu, Min Li, Chao Zhang, Li-Li Liu, Jia Fu, Jie-Tian Jin, Rong-Zhen Luo, Chris Zhiyi Zhang, et Jing-Ping Yun. « Pyruvate kinase M2 prevents apoptosis via modulating Bim stability and associates with poor outcome in hepatocellular carcinoma ». *Oncotarget* 6, n° 9 (2 mars 2015): 6570-83.
- 90 Lomonosova, Elena, et G. Chinnadurai. « BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview ». *Oncogene* 27, n° Suppl 1 (décembre 2008): S2-19. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.39>.
- 91 Ozaki, Toshinori, et Akira Nakagawara. « Role of P53 in Cell Death and Human Cancers ». *Cancers* 3, n° 1 (mars 2011): 994-1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>.
- 92 Wu, Haili, Peng Yang, Wanglai Hu, Yingying Wang, Yangxu Lu, Lichao Zhang, Yongsheng Fan, Hong Xiao, et Zhuoyu Li. « Overexpression of PKM2 promotes mitochondrial fusion through attenuated p53 stability ». *Oncotarget* 7, n° 47 (27 octobre 2016): 78069-82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12942>.
- 93 Nandi, Suparno, Mortezaali Razzaghi, Dhiraj Srivastava, et Mishtu Dey. « Structural Basis for Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase M2 by Phosphorylation and Acetylation ». *Journal of Biological Chemistry* 295, n° 51 (18 décembre 2020): 17425-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015800>.
- 94 Arora, Sahil, Gaurav Joshi, Anuhar Chaturvedi, Michael Heuser, Santoshkumar Patil, et Raj Kumar. « A Perspective on Medicinal Chemistry Approaches for Targeting Pyruvate Kinase M2 ». *Journal of Medicinal Chemistry* 65, n° 2 (27 janvier 2022): 1171-1205. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00981>.

-
- 95 Stöger, J. Laurant, Marion J. J. Gijbels, Saskia van der Velden, Marco Manca, Chris M. van der Loos, Erik A. L. Biessen, Mat J. A. P. Daemen, Esther Lutgens, et Menno P. J. de Winther. « Distribution of Macrophage Polarization Markers in Human Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 225, n° 2 (1 décembre 2012): 461-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013>.
- 96 Fearon, Ian M., et Stephen P. Faux. « Oxidative Stress and Cardiovascular Disease: Novel Tools Give (Free) Radical Insight ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47, n° 3 (1 septembre 2009): 372-81. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.05.013>.
- 97 Colegio, Oscar R., Ngoc-Quynh Chu, Alison L. Szabo, Thach Chu, Anne Marie Rhebergen, Vikram Jairam, Nika Cyrus, et al. « Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid ». *Nature* 513, n° 7519 (septembre 2014): 559-63. <https://doi.org/10.1038/nature13490>.
- 98 Tannahill, G. M., A. M. Curtis, J. Adamik, E. M. Palsson-McDermott, A. F. McGettrick, G. Goel, C. Frezza, et al. « Succinate Is an Inflammatory Signal That Induces IL-1 β through HIF-1 α ». *Nature* 496, n° 7444 (avril 2013): 238-42. <https://doi.org/10.1038/nature11986>.
- 99 Palsson-McDermott, Eva M., Anne M. Curtis, Gautam Goel, Mario A. R. Lauterbach, Frederick J. Sheedy, Laura E. Gleeson, Mirjam W. M. van den Bosch, et al. « Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 α Activity and IL-1 β Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages ». *Cell Metabolism* 21, n° 1 (6 janvier 2015): 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>.
- 100 Shirai, Tsuyoshi, Rafal R. Nazarewicz, Barbara B. Wallis, Rolando E. Yanes, Ryu Watanabe, Marc Hilhorst, Lu Tian, et al. « The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease ». *Journal of Experimental Medicine* 213, n° 3 (29 février 2016): 337-54. <https://doi.org/10.1084/jem.20150900>.
- 101 Kolwicz, Stephen C., Suneet Purohit, et Rong Tian. « Cardiac Metabolism and Its Interactions with Contraction, Growth, and Survival of the Cardiomyocyte ». *Circulation research* 113, n° 5 (16 août 2013): 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302095>.
- 102 Li, Qinfeng, Chao Li, Abdallah Elnwasany, Gaurav Sharma, Yu A. An, Guangyu Zhang, Waleed M. Elhelaly, et al. « PKM1 Exerts Critical Roles in Cardiac Remodeling Under Pressure Overload in the Heart ». *Circulation* 144, n° 9 (31 août 2021): 712-27. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054885>.
- 103 Ziaeian, Boback, et Gregg C. Fonarow. « Epidemiology and aetiology of heart failure ». *Nature reviews. Cardiology* 13, n° 6 (juin 2016): 368-78. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>.
- 104 Nagase, Miki, et Toshiro Fujita. « Role of Rac1–Mineralocorticoid-Receptor Signalling in Renal and Cardiac Disease ». *Nature Reviews Nephrology* 9, n° 2 (février 2013):

86-98. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.282>.

- 105 Ni, Le, Bowen Lin, Lingjie Hu, Ruoyu Zhang, Fengmei Fu, Meiting Shen, Jian Yang, et Dan Shi. « Pyruvate Kinase M2 Protects Heart from Pressure Overload-Induced Heart Failure by Phosphorylating RAC1 ». *Journal of the American Heart Association* 11, n° 11 (7 juin 2022): e024854. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.024854>.
- 106 Hammans, S. R. « MYOTONIC DYSTROPHY, 3rd edition ». *Brain* 125, n° 8 (1 août 2002): 1225-26. <https://doi.org/10.1093/brain/awf172>.
- 107 Brook, J. David, Mila E. McCurrach, Helen G. Harley, Alan J. Buckler, Deanna Church, Hiroyuki Aburatani, Kent Hunter, et al. « Molecular Basis of Myotonic Dystrophy: Expansion of a Trinucleotide (CTG) Repeat at the 3' End of a Transcript Encoding a Protein Kinase Family Member ». *Cell* 68, n° 4 (21 février 1992): 799-808. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5).
- 108 Halliday, David, G. C. Ford, Richard H. T. Edwards, Michael J. Rennie, et Robert C. Griggs. « In Vivo Estimation of Muscle Protein Synthesis in Myotonic Dystrophy ». *Annals of Neurology* 17, n° 1 (1985): 65-69. <https://doi.org/10.1002/ana.410170115>.
- 109 Kino, Yoshihiro, Chika Washizu, Yoko Oma, Hayato Onishi, Yuriko Nezu, Noboru Sasagawa, Nobuyuki Nukina, et Shoichi Ishiura. « MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1 ». *Nucleic Acids Research* 37, n° 19 (octobre 2009): 6477-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp681>.
- 110 Gao, Zhihua, et Thomas A. Cooper. « Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, n° 33 (13 août 2013): 13570-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308806110>.
- 111 Schiaffino, Stefano, et Carlo Reggiani. « Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles ». *Physiological Reviews* 91, n° 4 (octobre 2011): 1447-1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.
- 112 Kim, Paul L, Robert S Staron, et Stuart M Phillips. « Fasted-state skeletal muscle protein synthesis after resistance exercise is altered with training ». *The Journal of Physiology* 568, n° Pt 1 (1 octobre 2005): 283-90. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.093708>.
- 113 Stadhouders, Lian E. M., Sander A. J. Verbrugge, Jonathon A. B. Smith, Brendan M. Gabriel, Tim D. Hammersen, Detmar Kolijn, Ilse S. P. Vogel, et al. « Myotube Hypertrophy Is Associated with Cancer-like Metabolic Reprogramming and Limited by PHGDH ». *bioRxiv*, 1 décembre 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.403949>.
- 114 Verbrugge, Sander A. J., Sebastian Gehlert, Lian E. M. Stadhouders, Daniel Jacko, Thorben Aussieker, Gerard M. J. de Wit, Ilse S. P. Vogel, et al. « PKM2 Determines Myofiber Hypertrophy In Vitro and Increases in Response to Resistance Exercise in Human Skeletal Muscle ». *International Journal of Molecular Sciences* 21, n° 19 (25 septembre 2020): 7062. <https://doi.org/10.3390/ijms21197062>.
- 115 Potashkin, Judy, Xuemei Huang, Claudia Becker, Honglei Chen, Thomas Foltynie, et

-
- Connie Marras. « Understanding the Links Between Cardiovascular Disease and Parkinson's Disease ». *Movement Disorders* 35, n° 1 (2020): 55-74. <https://doi.org/10.1002/mds.27836>.
- 116 Tamtaji, Omid Reza, Mohsen Taghizadeh, Reza Daneshvar Kakhaki, Ebrahim Kouchaki, Fereshteh Bahmani, Shokoofeh Borzabadi, Shahrbanoo Oryan, Alireza Mafi, et Zatollah Asemi. « Clinical and Metabolic Response to Probiotic Administration in People with Parkinson's Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Clinical Nutrition* 38, n° 3 (juin 2019): 1031-35. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.05.018>.
- 117 Luo, Shan, Brendan C. Angelo, Ting Chow, John R. Monterosso, Paul M. Thompson, Anny H. Xiang, et Kathleen A. Page. « Associations Between Exposure to Gestational Diabetes Mellitus In Utero and Daily Energy Intake, Brain Responses to Food Cues, and Adiposity in Children ». *Diabetes Care* 44, n° 5 (10 mai 2020): 1185-93. <https://doi.org/10.2337/dc20-3006>.
- 118 Burbulla, Lena F., Pingping Song, Joseph R. Mazzulli, Enrico Zampese, Yvette C. Wong, Sohee Jeon, David P. Santos, et al. « Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease ». *Science* 357, n° 6357 (22 septembre 2017): 1255-61. <https://doi.org/10.1126/science.aam9080>.
- 119 Zhao, Ya, Yanwei Wang, Yuying Wu, Cimin Tao, Rui Xu, Yong Chen, Linghui Qian, Tengfei Xu, et Xiaoyuan Lian. « PKM2-mediated neuronal hyperglycolysis enhances the risk of Parkinson's disease in diabetic rats ». *Journal of Pharmaceutical Analysis* 13, n° 2 (février 2023): 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.11.006>.
- 120 Roberson, Erik D., et Lennart Mucke. « 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 314, n° 5800 (3 novembre 2006): 781-84. <https://doi.org/10.1126/science.1132813>.
- 121 Li, Liang, Xiaojie Zhang, Dehua Yang, Guangrui Luo, Shen Chen, et Weidong Le. « Hypoxia Increases Aβ Generation by Altering Beta- and Gamma-Cleavage of APP ». *Neurobiology of Aging* 30, n° 7 (juillet 2009): 1091-98. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.10.011>.
- 122 Shen, Chengyong, Yongfeng Chen, Huaqing Liu, Kejing Zhang, Ting Zhang, Anning Lin, et Naihe Jing. « Hydrogen Peroxide Promotes Aβ Production through JNK-Dependent Activation of γ-Secretase ». *Journal of Biological Chemistry* 283, n° 25 (juin 2008): 17721-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800013200>.
- 123 Zhang, Jinlong, Guijuan Feng, Guofeng Bao, Guanhua Xu, Yuyu Sun, Weidong Li, Lingling Wang, Jiajia Chen, Huricha Jin, et Zhiming Cui. « Nuclear translocation of PKM2 modulates astrocyte proliferation via p27 and β-catenin pathway after spinal cord injury ». *Cell Cycle* 14, n° 16 (7 juillet 2015): 2609-18. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1064203>.
- 124 Johnson, Erik C.B., Eric B. Dammer, Duc M. Duong, Lingyan Ping, Maotian Zhou, Luming Yin, Lenora A. Higginbotham, et al. « Large-scale Proteomic Analysis of

-
- Alzheimer's Disease Brain and Cerebrospinal Fluid Reveals Early Changes in Energy Metabolism Associated with Microglia and Astrocyte Activation ». *Nature medicine* 26, n° 5 (mai 2020): 769-80. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0815-6>.
- 125 Han, Jonghee, Junho Hyun, Jaesang Park, Sunmin Jung, Yoonseo Oh, Youbin Kim, Shin-Hyeon Ryu, et al. « Aberrant Role of Pyruvate Kinase M2 in the Regulation of Gamma-Secretase and Memory Deficits in Alzheimer's Disease ». *Cell Reports* 37, n° 10 (décembre 2021): 110102. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110102>.
- 126 Traxler, Larissa, Joseph R. Herdy, Davide Stefanoni, Sophie Eichhorner, Silvia Pelucchi, Attila Szücs, Alice Santagostino, et al. « Warburg-like Metabolic Transformation Underlies Neuronal Degeneration in Sporadic Alzheimer's Disease ». *Cell Metabolism* 34, n° 9 (6 septembre 2022): 1248-1263.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.014>.
- 127 Kong, Qiuyue, Nan Li, Hao Cheng, Xiaojin Zhang, Xiaofei Cao, Tao Qi, Leyang Dai, et al. « HSPA12A Is a Novel Player in Nonalcoholic Steatohepatitis via Promoting Nuclear PKM2-Mediated M1 Macrophage Polarization ». *Diabetes* 68, n° 2 (19 novembre 2018): 361-76. <https://doi.org/10.2337/db18-0035>.
- 128 Yang, Peng, Zongwei Li, Hanqing Li, Yangxu Lu, Haili Wu, et Zhuoyu Li. « Pyruvate Kinase M2 Accelerates Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Cell Proliferation Induced by Lipopolysaccharide in Colorectal Cancer ». *Cellular Signalling* 27, n° 7 (1 juillet 2015): 1525-32. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.032>.
- 129 Qi, Weier, Qian Li, Daniel Gordin, et George L. King. « Preservation of renal function in chronic diabetes by enhancing glomerular glucose metabolism ». *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 96, n° 5 (mai 2018): 373-81. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1630-0>.
- 130 Wang, Suijun, Zhen Yang, Ying Gao, Quanzhong Li, Yong Su, Yanfang Wang, Yun Zhang, Hua Man, et Hongxia Liu. « Pyruvate Kinase, Muscle Isoform 2 Promotes Proliferation and Insulin Secretion of Pancreatic β -Cells via Activating Wnt/CTNNB1 Signaling ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, n° 11 (2015): 14441-48.
- 131 Li, Qinxue, Kunkun Leng, Yayun Liu, Haichen Sun, Jinhuan Gao, Quanxin Ren, Tian Zhou, Jing Dong, et Jinggang Xia. « The Impact of Hyperglycaemia on PKM2-Mediated NLRP3 Inflammasome/Stress Granule Signalling in Macrophages and Its Correlation with Plaque Vulnerability: An in Vivo and in Vitro Study ». *Metabolism* 107 (1 juin 2020): 154231. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154231>.
- 132 Barrett, Eugene J., Zhenqi Liu, Mogher Khamaisi, George L. King, Ronald Klein, Barbara E. K. Klein, Timothy M. Hughes, et al. « Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102, n° 12 (1 décembre 2017): 4343-4410. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01922>.
- 133 Tu, Chao, Liangzhi Wang, et Lan Wei. « The Role of PKM2 in Diabetic Microangiopathy ». *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*

15 (4 mai 2022): 1405-12. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S366403>.

- 134 He, Yantao, Dongmei Chen, Lingling Yang, Qiaoni Hou, Huiming Ma, et Xian Xu. « The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure ». *Stem Cell Research & Therapy* 9 (4 octobre 2018): 263. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1008-9>.
- 135 Huang, Ting-ben, Yong-zheng Li, Ke Yu, Zhou Yu, Ying Wang, Zhi-wei Jiang, Huiming Wang, et Guo-li Yang. « Effect of the Wnt Signal-RANKL/OPG Axis on the Enhanced Osteogenic Integration of a Lithium Incorporated Surface ». *Biomaterials Science* 7, n° 3 (2019): 1101-16. <https://doi.org/10.1039/C8BM01411F>.
- 136 Takada, Ichiro, Alexander P Kouzmenko, et Shigeaki Kato. « Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13, n° 5 (1 mai 2009): 593-603. <https://doi.org/10.1517/14728220902915310>.
- 137 Lin, Weiping, Liangliang Xu, Qi Pan, Sien Lin, Lu Feng, Bin Wang, Shuxun Chen, et al. « Lgr5-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Augment Fracture Healing through Regulation of Wnt/ERK Signaling Pathways and Mitochondrial Dynamics ». *The FASEB Journal* 33, n° 7 (2019): 8565-77. <https://doi.org/10.1096/fj.201900082RR>.
- 138 Li, Qianqian, Zewen Gao, Ye Chen, et Min-Xin Guan. « The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells ». *Protein & Cell* 8, n° 6 (juin 2017): 439-45. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0385-7>.
- 139 Shen, Yulai, Lu Wu, Dongdong Qin, Yankai Xia, Zhu Zhou, Xuemei Zhang, et Xin Wu. « Carbon black suppresses the osteogenesis of mesenchymal stem cells: the role of mitochondria ». *Particle and Fibre Toxicology* 15, n° 1 (12 avril 2018): 16. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0253-5>.
- 140 Shum, Laura C., Noelle S. White, Bradley N. Mills, Karen L. de Mesy Bentley, et Roman A. Eliseev. « Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation ». *Stem Cells and Development* 25, n° 2 (15 janvier 2016): 114-22. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0193>.
- 141 Guo, Jiachao, Ranyue Ren, Xudong Yao, Yaping Ye, Kai Sun, Jiamin Lin, Genchun Wang, Fengjing Guo, Jun Xiao, et Tao Xu. « PKM2 suppresses osteogenesis and facilitates adipogenesis by regulating β -catenin signaling and mitochondrial fusion and fission ». *Aging (Albany NY)* 12, n° 4 (25 février 2020): 3976-92. <https://doi.org/10.18632/aging.102866>.
- 142 Fajgenbaum, David C., et Carl H. June. « Cytokine Storm ». *The New England Journal of Medicine* 383, n° 23 (3 décembre 2020): 2255-73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>.
- 143 Palsson-McDermott, Eva M., et Luke A. J. O'Neill. « The Warburg Effect Then and Now: From Cancer to Inflammatory Diseases ». *BioEssays* 35, n° 11 (2013): 965-73. <https://doi.org/10.1002/bies.201300084>.

-
- 144 Das Gupta, Kaustav, Melanie R. Shakespear, James E. B. Curson, Ambika M. V. Murthy, Abishek Iyer, Mark P. Hodson, Divya Ramnath, et al. « Class IIa Histone Deacetylases Drive Toll-like Receptor-Inducible Glycolysis and Macrophage Inflammatory Responses via Pyruvate Kinase M2 ». *Cell Reports* 30, n° 8 (25 février 2020): 2712-2728.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.007>.
- 145 Zhu, Jinfang, et William E. Paul. « CD4 T cells: fates, functions, and faults ». *Blood* 112, n° 5 (1 septembre 2008): 1557-69. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>.
- 146 Klein Geltink, Ramon I., Ryan L. Kyle, et Erika L. Pearce. « Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function ». *Annual review of immunology* 36 (26 avril 2018): 461-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019>.
- 147 Angiari, Stefano, Marah C. Runtsch, Caroline E. Sutton, Eva M. Palsson-McDermott, Beth Kelly, Nisha Rana, Harry Kane, et al. « Pharmacological Activation of Pyruvate Kinase M2 Inhibits CD4+ T Cell Pathogenicity and Suppresses Autoimmunity ». *Cell Metabolism* 31, n° 2 (février 2020): 391-405.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.015>.
- 148 Korn, Thomas, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, et Vijay K. Kuchroo. « IL-17 and Th17 Cells ». *Annual Review of Immunology* 27, n° 1 (1 avril 2009): 485-517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>.
- 149 Damasceno, Luis Eduardo Alves, Douglas Silva Prado, Flavio Protasio Veras, Miriam M. Fonseca, Juliana E. Toller-Kawahisa, Marcos Henrique Rosa, Gabriel Azevedo Públio, et al. « PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 217, n° 10 (22 juillet 2020): e20190613. <https://doi.org/10.1084/jem.20190613>.
- 150 Liu, Zhijun, Yifei Le, Hang Chen, Ji Zhu, et Dezhaio Lu. « Role of PKM2-Mediated Immunometabolic Reprogramming on Development of Cytokine Storm ». *Frontiers in Immunology* 12 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.748573>.
- 151 You, Sungyong, Jung Hee Koh, Lin Leng, Wan-Uk Kim, et Richard Bucala. « The Tumor-like Phenotype of Rheumatoid Synovium: Molecular Profiling and Prospects for Precision Medicine ». *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 70, n° 5 (mai 2018): 637-52. <https://doi.org/10.1002/art.40406>.
- 152 Falconer, Jane, Anne N Murphy, Stephen Young, Andrew R Clark, Stefano Tiziani, Monica Guma, et Christopher D Buckley. « Synovial cell metabolism and chronic inflammation in rheumatoid arthritis ». *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 70, n° 7 (juillet 2018): 984-99. <https://doi.org/10.1002/art.40504>.
- 153 Ng, C T, M Biniecka, A Kennedy, J McCormick, O FitzGerald, B Bresnihan, D Buggy, et al. « Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, n° 7 (1 juillet 2010): 1389-95. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.119776>.
- 154 McGarry, Trudy, Monika Biniecka, Wei Gao, Deborah Cluxton, Mary Canavan, Siobhan Wade, Sarah Wade, et al. « Resolution of TLR2-induced inflammation through

-
- manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis ». *Scientific Reports* 7 (22 février 2017): 43165. <https://doi.org/10.1038/srep43165>.
- 155 Garcia-Carbonell, Ricard, Ajit S. Divakaruni, Alessia Lodi, Ildefonso Vicente-Suarez, Arindam Saha, Hilde Cheroutre, Gerry R. Boss, Stefano Tiziani, Anne N. Murphy, et Monica Guma. « Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes ». *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68, n° 7 (juillet 2016): 1614-26. <https://doi.org/10.1002/art.39608>.
- 156 Xu, Danyi, Junyu Liang, Jin Lin, et Chaohui Yu. « PKM2: A Potential Regulator of Rheumatoid Arthritis via Glycolytic and Non-Glycolytic Pathways ». *Frontiers in Immunology* 10 (18 décembre 2019): 2919. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02919>.
- 157 Schwartz, Noa, Ariel D. Stock, et Chaim Putterman. « Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions ». *Nature reviews. Rheumatology* 15, n° 3 (mars 2019): 137-52. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0156-8>.
- 158 Li, Xue, Xiaohong Xiang, Jingjing Sun, Shanshan Liu, Ying Liu, Lianghua Feng, Chun Li, et Zhanguo Li. « Prevalence, outcome and prognostic factors of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: A real world single center study ». *Modern Rheumatology* 30, n° 2 (3 mars 2020): 321-26. <https://doi.org/10.1080/14397595.2019.1589912>.
- 159 Lee, S-W, M-C Park, S-K Lee, et Y-B Park. « The Efficacy of Brain F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Neuropsychiatric Lupus Patients with Normal Brain Magnetic Resonance Imaging Findings ». *Lupus* 21, n° 14 (1 décembre 2012): 1531-37. <https://doi.org/10.1177/0961203312459104>.
- 160 Lu, Li, Hailin Wang, Xuan Liu, Liping Tan, Xiaoyue Qiao, Jiali Ni, Yang Sun, Jun Liang, Yayi Hou, et Huan Dou. « Pyruvate kinase isoform M2 impairs cognition in systemic lupus erythematosus by promoting microglial synaptic pruning via the β -catenin signaling pathway ». *Journal of Neuroinflammation* 18 (13 octobre 2021): 229. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02279-9>.
- 161 Anand, Preetha, Ajaikumar B. Kunnumakara, Chitra Sundaram, Kuzhuvilil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Oiki S. Lai, Bokyung Sung, et Bharat B. Aggarwal. « Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes ». *Pharmaceutical Research* 25, n° 9 (septembre 2008): 2097-2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>.
- 162 Gu, Zhimin, Jiliang Xia, Hongwei Xu, Ivana Frech, Guido Tricot, et Fenghuang Zhan. « NEK2 Promotes Aerobic Glycolysis in Multiple Myeloma Through Regulating Splicing of Pyruvate Kinase ». *Journal of Hematology & Oncology* 10, n° 1 (13 janvier 2017): 17. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0392-4>.
- 163 Mazurek, S. « Pyruvate Kinase Type M2: A Key Regulator Within the Tumour Metabolome and a Tool for Metabolic Profiling of Tumours ». In *Oncogenes Meet Metabolism*, édité par G. Kroemer, D. Mumberg, H. Keun, B. Riefke, T. Steger-Hartmann, et K. Petersen, 99-124. Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. https://doi.org/10.1007/2789_2008_091.

-
- 164 Yang, Y.-C., T.-Y. Cheng, S.-M. Huang, C.-Y. Su, P.-W. Yang, J.-M. Lee, C.-K. Chen, M. Hsiao, K.-T. Hua, et M.-L. Kuo. « Cytosolic PKM2 Stabilizes Mutant EGFR Protein Expression through Regulating HSP90–EGFR Association ». *Oncogene* 35, n° 26 (juin 2016): 3387-98. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.397>.
- 165 Han, Dongfeng, Wenjin Wei, Xincheng Chen, Yaxuan Zhang, Yingyi Wang, Junxia Zhang, Xiefeng Wang, et al. « NF- κ B/RelA-PKM2 mediates inhibition of glycolysis by fenofibrate in glioblastoma cells ». *Oncotarget* 6, n° 28 (30 juin 2015): 26119-28.
- 166 Panasyuk, Ganna, Catherine Espeillac, Céline Chauvin, Ludivine A. Pradelli, Yasuo Horie, Akira Suzuki, Jean-Sebastien Annicotte, et al. « PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver ». *Nature Communications* 3 (14 février 2012): 672. <https://doi.org/10.1038/ncomms1667>.
- 167 Lunt, Sophia Y., et Matthew G. Vander Heiden. « Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27, n° 1 (2011): 441-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>.
- 168 Johnstone, R M, M Adam, J R Hammond, L Orr, et C Turbide. « Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. Association of Plasma Membrane Activities with Released Vesicles (Exosomes). » *Journal of Biological Chemistry* 262, n° 19 (5 juillet 1987): 9412-20. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7).
- 169 Simpson, Richard J, Justin WE Lim, Robert L Moritz, et Suresh Mathivanan. « Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential ». *Expert Review of Proteomics* 6, n° 3 (1 juin 2009): 267-83. <https://doi.org/10.1586/epr.09.17>.
- 170 De Rosa, Viviana, Francesca Iommelli, Marcello Monti, Rosa Fonti, Giuseppina Votta, Maria Patrizia Stoppelli, et Silvana Del Vecchio. « Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non–Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research* 21, n° 22 (12 novembre 2015): 5110-20. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0375>.
- 171 McAllister, Sandra S., et Robert A. Weinberg. « The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis ». *Nature cell biology* 16, n° 8 (août 2014): 717-27. <https://doi.org/10.1038/ncb3015>.
- 172 Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang, et M. Angela Nieto. « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease ». *Cell* 139, n° 5 (25 novembre 2009): 871-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- 173 Hamabe, Atsushi, Masamitsu Konno, Nobuhiro Tanuma, Hiroshi Shima, Kenta Tsunekuni, Koichi Kawamoto, Naohiro Nishida, et al. « Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial–mesenchymal transition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 43 (28 octobre 2014): 15526-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407717111>.
- 174 Li, Zongwei, Peng Yang, et Zhuoyu Li. « The Multifaceted Regulation and Functions of PKM2 in Tumor Progression ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on*

-
- Cancer* 1846, n° 2 (décembre 2014): 285-96.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.008>.
- 175 Xu, Q., L.-Z. Liu, Y. Yin, J. He, Q. Li, X. Qian, Y. You, et al. « Regulatory Circuit of PKM2/NF- κ B/miR-148a/152-Modulated Tumor Angiogenesis and Cancer Progression ». *Oncogene* 34, n° 43 (octobre 2015): 5482-93.
<https://doi.org/10.1038/onc.2015.6>.
- 176 Azoitei, Ninel, Alexander Becher, Konrad Steinestel, Arefeh Rouhi, Kristina Diepold, Felicitas Genze, Thomas Simmet, et Thomas Seufferlein. « PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation ». *Molecular Cancer* 15, n° 1 (6 janvier 2016): 3. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0490-2>.
- 177 Zahra, Kulsoom, Tulika Dey, Ashish, Surendra Pratap Mishra, et Uma Pandey. « Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis ». *Frontiers in Oncology* 10 (2020).
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00159>.
- 178 Thai, Minh, Nicholas A. Graham, Daniel Braas, Michael Nehil, Evangelia Komisopoulou, Siavash K. Kurdistani, Frank McCormick, Thomas G. Graeber, et Heather R. Christofk. « Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication ». *Cell Metabolism* 19, n° 4 (1 avril 2014): 694-701. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.009>.
- 179 Heaton, Nicholas S., et Glenn Randall. « Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism ». *Cell host & microbe* 8, n° 5 (18 novembre 2010): 422-32.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>.
- 180 Musinova, Yana R., Eugene V. Sheval, Carla Dib, Diego Germini, et Yegor S. Vassetzky. « Functional Roles of HIV-1 Tat Protein in the Nucleus ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, n° 3 (1 février 2016): 589-601.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2077-x>.
- 181 Jarboui, Mohamed Ali, Carlo Bidoia, Elena Woods, Barbara Roe, Kieran Wynne, Giuliano Elia, William W. Hall, et Virginie W. Gautier. « Nucleolar Protein Trafficking in Response to HIV-1 Tat: Rewiring the Nucleolus ». *PLOS ONE* 7, n° 11 (15 novembre 2012): e48702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048702>.
- 182 Russell, Ryan C., Hai-Xin Yuan, et Kun-Liang Guan. « Autophagy Regulation by Nutrient Signaling ». *Cell Research* 24, n° 1 (janvier 2014): 42-57.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.166>.
- 183 Zhang, Hong-Sheng, Zhong-Guo Zhang, Zhen Zhou, Guang-Yuan Du, Hu Li, Xiao-Ying Yu, et Ying-Hui Huang. « PKM2-mediated inhibition of autophagy facilitates Tat's inducing HIV-1 transactivation ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 625-626 (1 juillet 2017): 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.05.018>.
- 184 Krump, Nathan A., et Jianxin You. « Molecular Mechanisms of Viral Oncogenesis in Humans ». *Nature Reviews Microbiology* 16, n° 11 (novembre 2018): 684-98.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0064-6>.

-
- 185 Dang, Chi V., Anne Le, et Ping Gao. « MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15, n° 21 (1 novembre 2009): 6479-83. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0889>.
- 186 Kim, Jung-whan, Ping Gao, Yen-Chun Liu, Gregg L. Semenza, et Chi V. Dang. « Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 ». *Molecular and Cellular Biology* 27, n° 21 (novembre 2007) : 7381-93. <https://doi.org/10.1128/MCB.00440-07>.
- 187 Shim, H., C. Dolde, B. C. Lewis, C. S. Wu, G. Dang, R. A. Jungmann, R. Dalla-Favera, et C. V. Dang. « C-Myc Transactivation of LDH-A: Implications for Tumor Metabolism and Growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n° 13 (24 juin 1997) : 6658-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>.
- 188 Chakravorty, Srishti, Behdad Afzali, et Majid Kazemian. « EBV-associated diseases: Current therapeutics and emerging technologies ». *Frontiers in Immunology* 13 (27 octobre 2022): 1059133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059133>.
- 189 Jiang, Yiqun, Bin Yan, Weiwei Lai, Ying Shi, Desheng Xiao, Jiantao Jia, Shuang Liu, et al. « Repression of Hox genes by LMP1 in nasopharyngeal carcinoma and modulation of glycolytic pathway genes by HoxC8 ». *Oncogene* 34, n° 50 (10 décembre 2015): 6079-91. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.53>.
- 190 Luo, Xiangjian, Liping Hong, Can Cheng, Namei Li, Xu Zhao, Feng Shi, Jikai Liu, et al. « DNMT1 mediates metabolic reprogramming induced by Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 and reversed by grifolin in nasopharyngeal carcinoma ». *Cell Death & Disease* 9, n° 6 (23 mai 2018): 619. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0662-2>.
- 191 Lo, Angela Kwok-Fung, Christopher W. Dawson, Lawrence S. Young, Chuen-Wai Ko, Pok-Man Hau, et Kwok-Wai Lo. « Activation of the FGFR1 Signalling Pathway by the Epstein-Barr Virus-Encoded LMP1 Promotes Aerobic Glycolysis and Transformation of Human Nasopharyngeal Epithelial Cells ». *The Journal of Pathology* 237, n° 2 (octobre 2015): 238-48. <https://doi.org/10.1002/path.4575>.
- 192 Hirschhaeuser, Franziska, Ulrike G. A. Sattler, et Wolfgang Mueller-Klieser. « Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer ». *Cancer Research* 71, n° 22 (15 novembre 2011): 6921-25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1457>.
- 193 Medina, Miguel Ángel, Javier Márquez, et Ignacio Núñez^de Castro. « Interchange of Amino Acids between Tumor and Host ». *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 48, n° 1 (août 1992): 1-7. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(92\)90041-V](https://doi.org/10.1016/0885-4505(92)90041-V).
- 194 Chaneton, Barbara, Petra Hillmann, Liang Zheng, Agnès C.L. Martin, Oliver D.K. Maddocks, Achuthanunni Chokkathukalam, Joseph E Coyle, et al. « Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2 ». *Nature* 491, n° 7424 (15 novembre 2012): 458-62. <https://doi.org/10.1038/nature11540>.
- 195 Rathod, Bhagyashri, Shivam Chak, Sagarkumar Patel, et Amit Shard. « Tumor pyruvate

-
- kinase M2 modulators: a comprehensive account of activators and inhibitors as anticancer agents ». *RSC Medicinal Chemistry* 12, n° 7 (14 juin 2023): 1121-41. <https://doi.org/10.1039/d1md00045d>.
- 196 Keller, Kirstie E., Zainab M. Doctor, Zachary W. Dwyer, et Young-Sam Lee. « SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells ». *Molecular cell* 53, n° 5 (6 mars 2014): 700-709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.015>.
- 197 Patel, Rushikesh, Ajay Kumar Raj, Kiran Bharat Lokhande, Mazen A. Almasri, Khalid J. Alzahrani, Asma Saleh Almeslet, K. Venkateswara Swamy, et al. « Detection of Nail Oncometabolite SAICAR in Oral Cancer Patients and Its Molecular Interactions with PKM2 Enzyme ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, n° 21 (janvier 2021): 11225. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111225>.
- 198 Yan, Ming, Srinivas Chakravarthy, Joshua M. Tokuda, Lois Pollack, Gregory D. Bowman, et Young-Sam Lee. « Succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-ribose 5'-Phosphate (SAICAR) Activates Pyruvate Kinase Isoform M2 (PKM2) in Its Dimeric Form ». *Biochemistry* 55, n° 33 (23 août 2016): 4731-36. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00658>.
- 199 Suhane, Sonal, et V Krishnan Ramanujan. « Thyroid Hormone Differentially Modulates Warburg Phenotype in Breast Cancer Cells ». *Biochemical and biophysical research communications* 414, n° 1 (14 octobre 2011): 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.024>.
- 200 Li, Qi, Xin Qi, et Wenjun Jia. « 3,3',5-Triiodothyroxine Inhibits Apoptosis and Oxidative Stress by the PKM2/PKM1 Ratio during Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion AC16 and HCM-a Cells: T3 Inhibits Apoptosis and Oxidative Stress by PKM2/PKM1 Ratio ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 475, n° 1 (17 juin 2016): 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.030>.
- 201 Bertheloot, Damien, et Eicke Latz. « HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 Proteins: Dual-Function Alarmins ». *Cellular & Molecular Immunology* 14, n° 1 (janvier 2017): 43-64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.34>.
- 202 Yang, Huan, Daniel J. Antoine, Ulf Andersson, et Kevin J. Tracey. « The Many Faces of HMGB1: Molecular Structure-Functional Activity in Inflammation, Apoptosis, and Chemotaxis ». *Journal of Leukocyte Biology* 93, n° 6 (juin 2013): 865-73. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212662>.
- 203 Magna, Melinda, et David S Pisetsky. « The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases ». *Molecular Medicine* 20, n° 1 (24 mars 2014): 138-46. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00164>.
- 204 Gdynia, Georg, Sven W. Sauer, Jürgen Kopitz, Dominik Fuchs, Katarina Duglova, Thorsten Ruppert, Matthias Miller, et al. « The HMGB1 Protein Induces a Metabolic Type of Tumour Cell Death by Blocking Aerobic Respiration ». *Nature Communications* 7, n° 1 (7 mars 2016): 10764. <https://doi.org/10.1038/ncomms10764>.

-
- 205 Waring, Paul, Tahira Khan, et Allan Sjaarda. « Apoptosis Induced by Gliotoxin Is Preceded by Phosphorylation of Histone H3 and Enhanced Sensitivity of Chromatin to Nuclease Digestion* ». *Journal of Biological Chemistry* 272, n° 29 (18 juillet 1997): 17929-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17929>.
- 206 Semenova, Galina, et Jonathan Chernoff. « PKM2 Enters the Morpheus Academy ». *Molecular Cell* 45, n° 5 (9 mars 2012): 583-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.014>.
- 207 Tang, Wei, Zai-liang Liu, Xiao-yuan Mai, Xin Qi, De-hai Li, Qian-qun Gu, et Jing Li. « Identification of Gliotoxin Isolated from Marine Fungus as a New Pyruvate Kinase M2 Inhibitor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 528, n° 3 (30 juillet 2020): 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.139>.
- 208 Chen, Xin, Lu Yang, Joost J. Oppenheim, et O. M. Zack Howard. « Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives ». *Phytotherapy Research* 16, n° 3 (2002): 199-209. <https://doi.org/10.1002/ptr.1100>.
- 209 Chen, J., J. Xie, Z. Jiang, B. Wang, Y. Wang, et X. Hu. « Shikonin and Its Analogs Inhibit Cancer Cell Glycolysis by Targeting Tumor Pyruvate Kinase-M2 ». *Oncogene* 30, n° 42 (octobre 2011): 4297-4306. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.137>.
- 210 Zhao, Xiaoyue, Yanan Zhu, Jianhua Hu, Longwei Jiang, Limin Li, Shaochang Jia, et Ke Zen. « Shikonin Inhibits Tumor Growth in Mice by Suppressing Pyruvate Kinase M2-mediated Aerobic Glycolysis ». *Scientific Reports* 8 (28 septembre 2018): 14517. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31615-y>.
- 211 Zhang, Qiqi, Qing Liu, Shutao Zheng, Tao Liu, Lifei Yang, Xiujuan Han, et Xiaomei Lu. « Shikonin Inhibits Tumor Growth of ESCC by suppressing PKM2 mediated Aerobic Glycolysis and STAT3 Phosphorylation ». *Journal of Cancer* 12, n° 16 (11 juin 2021): 4830-40. <https://doi.org/10.7150/jca.58494>.
- 212 Yuan, Lijia, Yong Wang, Youlian Chen, Xiaoyin Chen, Shun Li, et Xueyan Liu. « Shikonin Inhibits Immune Checkpoint PD-L1 Expression on Macrophage in Sepsis by Modulating PKM2 ». *International Immunopharmacology* 121 (1 août 2023): 110401. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110401>.
- 213 Jiang, Jian-kang, Matthew B. Boxer, Matthew G. Vander Heiden, Min Shen, Amanda P. Skoumbourdis, Noel Southall, Henrike Veith, et al. « Evaluation of Thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinones as Activators of the Tumor Cell Specific M2 Isoform of Pyruvate Kinase ». *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, n° 11 (1 juin 2010): 3387-93. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.015>.
- 214 Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, et Craig B. Thompson. « Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation ». *Science (New York, N.Y.)* 324, n° 5930 (22 mai 2009): 1029-33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- 215 Bartel, David P. « MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions ». *Cell* 136, n° 2 (23 janvier 2009): 215-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.

-
- 216 Lu, Thomas X., et Marc E. Rothenberg. « MicroRNA ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 141, n° 4 (avril 2018): 1202-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.
- 217 Wong, Vincent Wai-Sun, Leon A. Adams, Victor de Lédinghen, Grace Lai-Hung Wong, et Silvia Sookoian. « Noninvasive Biomarkers in NAFLD and NASH — Current Progress and Future Promise ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15, n° 8 (août 2018): 461-78. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0014-9>.
- 218 Longo, Miriam, Erika Paolini, Marica Meroni, et Paola Dongiovanni. « Remodeling of Mitochondrial Plasticity: The Key Switch from NAFLD/NASH to HCC ». *International Journal of Molecular Sciences* 22, n° 8 (17 avril 2021): 4173. <https://doi.org/10.3390/ijms22084173>.
- 219 Chang, Jinhong, Emmanuelle Nicolas, Debora Marks, Chris Sander, Anthony Lerro, Marie Annick Buendia, Chunxiao Xu, et al. « miR-122, a Mammalian Liver-Specific microRNA, is Processed from hcr mRNA and May Downregulate the High Affinity Cationic Amino Acid Transporter CAT-1 ». *RNA Biology* 1, n° 2 (1 juillet 2004): 106-13. <https://doi.org/10.4161/rna.1.2.1066>.
- 220 Cheung, Onpan, Puneet Puri, Christoph Eicken, Melissa J Contos, Faridoddin Mirshahi, James W. Maher, John M. Kellum, Haeki Min, Velimir A. Luketic, et Arun J. Sanyal. « NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IS ASSOCIATED WITH ALTERED HEPATIC MICRO RNA EXPRESSION ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48, n° 6 (décembre 2008): 1810-20. <https://doi.org/10.1002/hep.22569>.
- 221 Inomata, Yosuke, Jae-Won Oh, Kohei Taniguchi, Nobuhiko Sugito, Nao Kawaguchi, Fumitoshi Hirokawa, Sang-Woong Lee, et al. « Downregulation of miR-122-5p Activates Glycolysis via PKM2 in Kupffer Cells of Rat and Mouse Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *International Journal of Molecular Sciences* 23, n° 9 (janvier 2022): 5230. <https://doi.org/10.3390/ijms23095230>.
- 222 Liu, Angela M., Zhi Xu, Felix H. Shek, Kwong-Fai Wong, Nikki P. Lee, Ronnie T. Poon, Jinfei Chen, et John M. Luk. « miR-122 Targets Pyruvate Kinase M2 and Affects Metabolism of Hepatocellular Carcinoma ». *PLoS ONE* 9, n° 1 (23 janvier 2014): e86872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086872>.
- 223 Hwang, Steven R., Carlos Murga-Zamalloa, Noah Brown, Johnvesly Basappa, Scott RP McDonnell, Veronica Mendoza-Reinoso, Venkatesha Basrur, Ryan Wilcox, Kojo Elenitoba-Johnson, et Megan S. Lim. « Pyrimidine Tract-Binding Protein 1 Mediates Pyruvate Kinase M2-Dependent Phosphorylation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Oncogenesis in Anaplastic Large Cell Lymphoma ». *Laboratory Investigation* 97, n° 8 (août 2017): 962-70. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.39>.
- 224 Taniguchi, Kohei, Kazuhisa Uchiyama, et Yukihiro Akao. « PTBP1-targeting microRNAs regulate cancer-specific energy metabolism through the modulation of PKM1/M2 splicing ». *Cancer Science* 112, n° 1 (janvier 2021): 41-50. <https://doi.org/10.1111/cas.14694>.

-
- 225 Sun, Yan, Xiaoping Zhao, Yuhong Zhou, et Yu Hu. « miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect ». *Oncology Reports* 28, n° 4 (1 octobre 2012): 1346-52. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1958>.
- 226 Statello, Luisa, Chun-Jie Guo, Ling-Ling Chen, et Maite Huarte. « Gene Regulation by Long Non-Coding RNAs and Its Biological Functions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, n° 2 (février 2021): 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>.
- 227 Chan, Jia Jia, et Yvonne Tay. « Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 19, n° 5 (27 avril 2018): 1310. <https://doi.org/10.3390/ijms19051310>.
- 228 Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, et Ahmedin Jemal. « Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, n° 6 (2018): 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- 229 Wei, Cheng, Liangjuan Zhao, Hao Liang, Yingwei Zhen, et Lei Han. « Recent advances in unraveling the molecular mechanisms and functions of HOXA11-AS in human cancers and other diseases ». *Oncology Reports* 43, n° 6 (juin 2020): 1737-54. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7552>.
- 230 Zhang, Yu, Wen-jie Chen, Ting-qing Gan, Xiu-ling Zhang, Zu-cheng Xie, Zhi-hua Ye, Yun Deng, et al. « Clinical Significance and Effect of lncRNA HOXA11-AS in NSCLC: A Study Based on Bioinformatics, In Vitro and in Vivo Verification ». *Scientific Reports* 7 (17 juillet 2017): 5567. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05856-2>.
- 231 Balihodzic, Amar, Dominik A. Barth, Felix Prinz, et Martin Pichler. « Involvement of Long Non-Coding RNAs in Glucose Metabolism in Cancer ». *Cancers* 13, n° 5 (26 février 2021): 977. <https://doi.org/10.3390/cancers13050977>.
- 232 Chen, Wenkun, Xuena Li, Bulin Du, Yan Cui, Yu Ma, et Yaming Li. « The Long Noncoding RNA HOXA11-AS Promotes Lung Adenocarcinoma Proliferation and Glycolysis via the microRNA-148b-3p/PKM2 Axis ». *Cancer Medicine* n/a, n° n/a (12 septembre 2022). <https://doi.org/10.1002/cam4.5103>.
- 233 Dai, Ting, Xin Zhang, Xiang Zhou, Xiaoxia Hu, Xiaodi Huang, Feiyue Xing, Han Tian, et Yun Li. « Long non-coding RNA VAL facilitates PKM2 enzymatic activity to promote glycolysis and malignancy of gastric cancer ». *Clinical and Translational Medicine* 12, n° 10 (13 octobre 2022): e1088. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1088>.
- 234 Cimermancic, Peter, Patrick Weinkam, T. Justin Rettenmaier, Leon Bichmann, Daniel A. Keedy, Rahel A. Woldeyes, Dina Schneidman-Duhovny, et al. « CryptoSite: Expanding the Druggable Proteome by Characterization and Prediction of Cryptic Binding Sites ». *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology*, 428, n° 4 (22 février 2016): 709-19. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.029>.
- 235 Alder, B. J., et T. E. Wainwright. « Phase Transition for a Hard Sphere System ». *The Journal of Chemical Physics* 27, n° 5 (13 août 2004): 1208-9. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>.

-
- 236 Woodcock, L.V. « Isothermal Molecular Dynamics Calculations for Liquid Salts ». *Chemical Physics Letters* 10, n° 3 (août 1971): 257-61. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(71\)80281-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(71)80281-6).
- 237 Tinoco, Ignacio, et Jin-Der Wen. « Simulation and Analysis of Single-Ribosome Translation ». *Physical Biology* 6, n° 2 (1 juillet 2009): 025006. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/6/2/025006>.
- 238 Maginn, E. J., et J. R. Elliott. « Historical Perspective and Current Outlook for Molecular Dynamics As a Chemical Engineering Tool ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49, n° 7 (7 avril 2010): 3059-78. <https://doi.org/10.1021/ie901898k>.
- 239 Shaw, David E., Paul Maragakis, Kresten Lindorff-Larsen, Stefano Piana, Ron O. Dror, Michael P. Eastwood, Joseph A. Bank, et al. « Atomic-Level Characterization of the Structural Dynamics of Proteins ». *Science* 330, n° 6002 (15 octobre 2010): 341-46. <https://doi.org/10.1126/science.1187409>.
- 240 Inizan, Théo Jaffrelot, Frédéric Célerse, Olivier Adjoua, Dina El Ahdab, Luc-Henri Jolly, Chengwen Liu, Pengyu Ren, et al. « High-Resolution Mining of the SARS-CoV-2 Main Protease Conformational Space: Supercomputer-Driven Unsupervised Adaptive Sampling ». *Chemical Science* 12, n° 13 (8 avril 2021): 4889-4907. <https://doi.org/10.1039/D1SC00145K>.
- 241 Smith, W. « Elements of Molecular Dynamics », s. d., 465.
- 242 Becker, Oren M., éd. *Computational Biochemistry and Biophysics*. New York: M. Dekker, 2001.
- 243 Monticelli, Luca, et D Tieleman. « Force Fields for Classical Molecular Dynamics ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 924 (1 janvier 2013): 197-213. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_8.
- 244 González, M.A. « Force Fields and Molecular Dynamics Simulations ». *École Thématique de La Société Française de La Neutronique* 12 (2011): 169-200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>.
- 245 Loukhovitski, Boris I., et Alexander S. Sharipov. « Molecular Collision Diameters and Electronic Polarizabilities: Inherent Relationship and Fast Evaluation ». *The Journal of Physical Chemistry A* 125, n° 23 (17 juin 2021): 5117-23. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c02201>.
- 246 Singh, Ashok. « Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles », 19-76, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00002-9>.
- 247 Buckingham, R. A., et John Edward Lennard-Jones. « The classical equation of state of gaseous helium, neon and argon ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 168, n° 933 (janvier 1997): 264-83. <https://doi.org/10.1098/rspa.1938.0173>.
- 248 Williams, Donald E. « Improved Intermolecular Force Field for Molecules Containing H, C, N, and O Atoms, with Application to Nucleoside and Peptide Crystals ». *Journal*

-
- of Computational Chemistry* 22, n° 11 (2001): 1154-66. <https://doi.org/10.1002/jcc.1074>.
- 249 Gavezzotti, Angelo. « Molecular Aggregation: Structure analysis and molecular simulation of crystals and liquids ». *Molecular Aggregation: Structure Analysis and Molecular Simulation of Crystals and Liquids*, 30 novembre 2006, 1-448. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570806.001.0001>.
- 250 Allinger, Norman L., Kuohsiang Chen, et Jenn-Huei Lii. « An Improved Force Field (MM4) for Saturated Hydrocarbons ». *Journal of Computational Chemistry* 17, n° 5-6 (1996): 642-68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<642::AID-JCC6>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<642::AID-JCC6>3.0.CO;2-U).
- 251 Cornell, Wendy D., Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, Kenneth M. Merz, David M. Ferguson, David C. Spellmeyer, Thomas Fox, James W. Caldwell, et Peter A. Kollman. « A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules ». *Journal of the American Chemical Society* 117, n° 19 (1 mai 1995): 5179-97. <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>.
- 252 Oostenbrink, Chris, Alessandra Villa, Alan E. Mark, et Wilfred F. Van Gunsteren. « A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6 ». *Journal of Computational Chemistry* 25, n° 13 (2004): 1656-76. <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>.
- 253 Sun, H. « COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds ». *The Journal of Physical Chemistry B* 102, n° 38 (1 septembre 1998): 7338-64. <https://doi.org/10.1021/jp980939v>.
- 254 MacKerell, A. D., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, et al. « All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins ». *The Journal of Physical Chemistry B* 102, n° 18 (1 avril 1998): 3586-3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>.
- 255 Gresh, Nohad, Pierre Claverie, et Alberte Pullman. « Theoretical Studies of Molecular Conformation. Derivation of an Additive Procedure for the Computation of Intramolecular Interaction Energies. Comparison With ab Initio SCF Computations ». *Theoretica Chimica Acta* 66, n° 1 (1 janvier 1984): 1-20. <https://doi.org/10.1007/BF00577135>.
- 256 Gao, Jiali, Dariush Habibollahzadeh, et Lei Shao. « A Polarizable Intermolecular Potential Function for Simulation of Liquid Alcohols ». *The Journal of Physical Chemistry* 99, n° 44 (1 novembre 1995): 16460-67. <https://doi.org/10.1021/j100044a039>.
- 257 Swart, M., et P.Th. van Duijnen. « DRF90: A Polarizable Force Field ». *Molecular Simulation* 32, n° 6 (mai 2006): 471-84. <https://doi.org/10.1080/08927020600631270>.
- 258 Shi, Yue, Zhen Xia, Jiajing Zhang, Robert Best, Chuanjie Wu, Jay W. Ponder, et Pengyu Ren. « The Polarizable Atomic Multipole-based AMOEBA Force Field for Proteins ». *Journal of chemical theory and computation* 9, n° 9 (2013): 4046-63. <https://doi.org/10.1021/ct4003702>.

-
- 259 Zhang, Changsheng, Chao Lu, Zhifeng Jing, Chuanjie Wu, Jean-Philip Piquemal, Jay W. Ponder, et Pengyu Ren. « AMOEBA Polarizable Atomic Multipole Force Field for Nucleic Acids ». *Journal of chemical theory and computation* 14, n° 4 (10 avril 2018): 2084-2108. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b01169>.
- 260 Patel, Sandeep, et Charles L. Brooks III. « CHARMM Fluctuating Charge Force Field for Proteins: I Parameterization and Application to Bulk Organic Liquid Simulations ». *Journal of Computational Chemistry* 25, n° 1 (2004): 1-16. <https://doi.org/10.1002/jcc.10355>.
- 261 Wang, Zhi-Xiang, Wei Zhang, Chun Wu, Hongxing Lei, Piotr Cieplak, et Yong Duan. « Strike a Balance: Optimization of Backbone Torsion Parameters of AMBER Polarizable Force Field for Simulations of Proteins and Peptides ». *Journal of Computational Chemistry* 27, n° 6 (2006): 781-90. <https://doi.org/10.1002/jcc.20386>.
- 262 Geerke, Daan P., et Wilfred F. van Gunsteren. « On the Calculation of Atomic Forces in Classical Simulation Using the Charge-on-Spring Method To Explicitly Treat Electronic Polarization ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 3, n° 6 (1 novembre 2007): 2128-37. <https://doi.org/10.1021/ct700164k>.
- 263 Cieplak, Piotr, François-Yves Dupradeau, Yong Duan, et Junmei Wang. « Polarization effects in molecular mechanical force fields ». *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* 21, n° 33 (19 août 2009): 333102. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/21/33/333102>.
- 264 Melcr, Josef, et Jean-Philip Piquemal. « Accurate Biomolecular Simulations Account for Electronic Polarization ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 6 (2019). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2019.00143>.
- 265 Jing, Zhifeng, Chengwen Liu, Sara Y. Cheng, Rui Qi, Brandon D. Walker, Jean-Philip Piquemal, et Pengyu Ren. « Polarizable Force Fields for Biomolecular Simulations: Recent Advances and Applications ». *Annual Review of Biophysics* 48, n° 1 (6 mai 2019): 371-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033349>.
- 266 Khoury, Léa, Francis Jing, Alberto Cuzzolin, Alessandro Deplano, Daniele Loco, Boris Sattarov, Florent Hédin, et al. « Computationally driven discovery of SARS-CoV-2 Mpro inhibitors: from design to experimental validation ». *Chemical Science* 13 (7 avril 2022): 3674-87. <https://doi.org/10.1039/D1SC05892D>.
- 267 Kaminský, Jakub, et Frank Jensen. « Force Field Modeling of Amino Acid Conformational Energies ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 3, n° 5 (1 septembre 2007): 1774-88. <https://doi.org/10.1021/ct700082f>.
- 268 Rasmussen, Thomas D., Pengyu Ren, Jay W. Ponder, et Frank Jensen. « Force Field Modeling of Conformational Energies: Importance of Multipole Moments and Intramolecular Polarization ». *International Journal of Quantum Chemistry* 107, n° 6 (2007): 1390-95. <https://doi.org/10.1002/qua.21278>.
- 269 Qi, Rui, Zhifeng Jing, Chengwen Liu, Jean-Philip Piquemal, Kevin N. Dalby, et Pengyu Ren. « Elucidating the Phosphate Binding Mode of Phosphate-Binding Protein: The

-
- Critical Effect of Buffer Solution ». *The Journal of Physical Chemistry B* 122, n° 24 (21 juin 2018): 6371-76. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b03194>.
- 270 Jing, Zhifeng, Chengwen Liu, Rui Qi, et Pengyu Ren. « Many-body effect determines the selectivity for Ca²⁺ and Mg²⁺ in proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, n° 32 (7 août 2018): E7495-7501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805049115>.
- 271 Ren, Pengyu, et Jay W. Ponder. « Polarizable Atomic Multipole Water Model for Molecular Mechanics Simulation ». *The Journal of Physical Chemistry B* 107, n° 24 (1 juin 2003): 5933-47. <https://doi.org/10.1021/jp027815+>.
- 272 Walker, Brandon, Chengwen Liu, Elizabeth Wait, et Pengyu Ren. « Automation of AMOEBA Polarizable Force Field for Small Molecules: Poltype 2 ». *Journal of Computational Chemistry* n/a, n° n/a (5 juillet 2022). <https://doi.org/10.1002/jcc.26954>.
- 273 Ponder, Jay W., Chuanjie Wu, Pengyu Ren, Vijay S. Pande, John D. Chodera, Michael J. Schnieders, Imran Haque, et al. « Current Status of the AMOEBA Polarizable Force Field ». *The journal of physical chemistry. B* 114, n° 8 (4 mars 2010): 2549-64. <https://doi.org/10.1021/jp910674d>.
- 274 Allinger, Norman L., Young H. Yuh, et Jenn Huei Lii. « Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1 ». *Journal of the American Chemical Society* 111, n° 23 (1 novembre 1989): 8551-66. <https://doi.org/10.1021/ja00205a001>.
- 275 Bell, R. P. « Bond Torsion in the Vibrations of the Benzene Molecule ». *Transactions of the Faraday Society* 41 (1945): 293b. <https://doi.org/10.1039/tf945410293b>.
- 276 Halgren, Thomas A. « The representation of van der Waals (vdW) interactions in molecular mechanics force fields: potential form, combination rules, and vdW parameters ». *Journal of the American Chemical Society* 114, n° 20 (1 septembre 1992): 7827-43. <https://doi.org/10.1021/ja00046a032>.
- 277 Stewart, Robert F., Ernest R. Davidson, et William T. Simpson. « Coherent X-Ray Scattering for the Hydrogen Atom in the Hydrogen Molecule ». *The Journal of Chemical Physics* 42, n° 9 (mai 1965): 3175-87. <https://doi.org/10.1063/1.1696397>.
- 278 Thole, B. T. « Molecular Polarizabilities Calculated with a Modified Dipole Interaction ». *Chemical Physics* 59, n° 3 (1 août 1981): 341-50. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(81\)85176-2](https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85176-2).
- 279 Bedrov, Dmitry, Jean-Philip Piquemal, Oleg Borodin, Alexander D. Jr. MacKerell, Benoît Roux, et Christian Schröder. « Molecular Dynamics Simulations of Ionic Liquids and Electrolytes Using Polarizable Force Fields ». *Chemical Reviews* 119, n° 13 (10 juillet 2019): 7940-95. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00763>.
- 280 Chowdhary, Janamejaya, Edward Harder, Pedro E. M. Lopes, Lei Huang, Alexander D. Jr. MacKerell, et Benoît Roux. « A Polarizable Force Field of Dipalmitoylphosphatidylcholine Based on the Classical Drude Model for Molecular Dynamics Simulations of Lipids ». *The Journal of Physical Chemistry B* 117, n° 31 (8

-
- août 2013): 9142-60. <https://doi.org/10.1021/jp402860e>.
- 281 Lamoureux, Guillaume, et Benoît Roux. « Modeling induced polarization with classical Drude oscillators: Theory and molecular dynamics simulation algorithm ». *The Journal of Chemical Physics* 119, n° 6 (8 août 2003): 3025-39. <https://doi.org/10.1063/1.1589749>.
- 282 Lin, Fang-Yu, et Alexander MacKerell. « Force Fields for Small Molecules ». In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2022:21-54, 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9608-7_2.
- 283 Wang, Junmei, Piotr Cieplak, Jie Li, Jun Wang, Qin Cai, MengJuei Hsieh, Hongxing Lei, Ray Luo, et Yong Duan. « Development of Polarizable Models for Molecular Mechanical Calculations II: Induced Dipole Models Significantly Improve Accuracy of Intermolecular Interaction Energies ». *The journal of physical chemistry. B* 115, n° 12 (31 mars 2011): 3100-3111. <https://doi.org/10.1021/jp1121382>.
- 284 Olano, L. Renee, et Steven W. Rick. « Fluctuating Charge Normal Modes: An Algorithm for Implementing Molecular Dynamics Simulations with Polarizable Potentials ». *Journal of Computational Chemistry* 26, n° 7 (2005): 699-707. <https://doi.org/10.1002/jcc.20212>.
- 285 Wells, Brad A., et Alan L. Chaffee. « Ewald Summation for Molecular Simulations ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 11, n° 8 (11 août 2015): 3684-95. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00093>.
- 286 Leeuw, S. W. de, J. W. Perram, E. R. Smith, et John Shipley Rowlinson. « Simulation of electrostatic systems in periodic boundary conditions. I. Lattice sums and dielectric constants ». *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* 373, n° 1752 (janvier 1997): 27-56. <https://doi.org/10.1098/rspa.1980.0135>.
- 287 Darden, Tom, Darrin York, et Lee Pedersen. « Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems ». *The Journal of Chemical Physics* 98, n° 12 (15 juin 1993): 10089-92. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- 288 Essmann, Ulrich, Lalith Perera, Max L. Berkowitz, Tom Darden, Hsing Lee, et Lee G. Pedersen. « A Smooth Particle Mesh Ewald Method ». *The Journal of Chemical Physics* 103, n° 19 (15 novembre 1995): 8577-93. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- 289 Cerdà, Juan J., V. Ballenegger, O. Lenz, et C. Holm. « P3M Algorithm for Dipolar Interactions ». *The Journal of Chemical Physics* 129, n° 23 (21 décembre 2008): 234104. <https://doi.org/10.1063/1.3000389>.
- 290 York, Darrin, et Weitao Yang. « The Fast Fourier Poisson Method for Calculating Ewald Sums », s. d., 4.
- 291 Adcock, Stewart A., et J. Andrew McCammon. « Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins ». *Chemical Reviews* 106, n° 5 (1 mai 2006): 1589-1615. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>.
- 292 Verlet, Loup. « Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical

-
- Properties of Lennard-Jones Molecules ». *Physical Review* 159, n° 1 (5 juillet 1967): 98-103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>.
- 293 Birdsall, Charles K., et A. Bruce Langdon. *Plasma Physics via Computer Simulation*. The Adam Hilger Series on Plasma Physics. Bristol: Hilger, 1991.
- 294 Swope, William C., Hans C. Andersen, Peter H. Berens, et Kent R. Wilson. « A Computer Simulation Method for the Calculation of Equilibrium Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules: Application to Small Water Clusters ». *The Journal of Chemical Physics* 76, n° 1 (janvier 1982): 637-49. <https://doi.org/10.1063/1.442716>.
- 295 Berendsen, H J C, et W F van Gunsteren. « Practical Algorithms for Dynamic Simulation, In », s. d., 25.
- 296 Miyamoto, Shuichi, et Peter A. Kollman. « Settle: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models ». *Journal of Computational Chemistry* 13, n° 8 (1992): 952-62. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>.
- 297 Ryckaert, Jean-Paul, Giovanni Ciccotti, et Herman J. C Berendsen. « Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes ». *Journal of Computational Physics* 23, n° 3 (1 mars 1977): 327-41. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- 298 Watanabe, Masakatsu, et Martin Karplus. « Dynamics of Molecules with Internal Degrees of Freedom by Multiple Time-step Methods ». *The Journal of Chemical Physics* 99, n° 10 (15 novembre 1993): 8063-74. <https://doi.org/10.1063/1.465633>.
- 299 Frenkel, Daan, et Berend Smit. *Understanding molecular simulation : from algorithms to applications*. 2nd ed. *Physics Today*. Vol. 50, 1996. <https://doi.org/10.1063/1.881812>.
- 300 Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, et J. R. Haak. « Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath ». *The Journal of Chemical Physics* 81, n° 8 (15 octobre 1984): 3684-90. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- 301 Andersen, Hans C. « Molecular Dynamics Simulations at Constant Pressure and/or Temperature ». *The Journal of Chemical Physics* 72, n° 4 (15 février 1980): 2384-93. <https://doi.org/10.1063/1.439486>.
- 302 Nose, Ichi. « A Molecular Dynamics Method for Simulations in the Canonical Ensemble », s. d.
- 303 Nosé, Shuichi. « A Unified Formulation of the Constant Temperature Molecular Dynamics Methods ». *The Journal of Chemical Physics* 81, n° 1 (juillet 1984): 511-19. <https://doi.org/10.1063/1.447334>.
- 304 Hoover, William G. « Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions ». *Physical Review A* 31, n° 3 (1 mars 1985): 1695-97. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>.
- 305 Bussi, Giovanni, Davide Donadio, et Michele Parrinello. « Canonical sampling through

-
- velocity rescaling ». *The Journal of Chemical Physics* 126, n° 1 (7 janvier 2007): 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
- 306 Allen, Michael P., et Dominic J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, 2017. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198803195.001.0001>.
- 307 Lin, Yuqing, Dingyi Pan, Jiaming Li, Lingxin Zhang, et Xueming Shao. « Application of Berendsen barostat in dissipative particle dynamics for nonequilibrium dynamic simulation ». *The Journal of Chemical Physics* 146, n° 12 (28 mars 2017): 124108. <https://doi.org/10.1063/1.4978807>.
- 308 Parrinello, M., et A. Rahman. « Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method ». *Journal of Applied Physics* 52, n° 12 (décembre 1981): 7182-90. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- 309 Martyna, Glenn J., Mark E. Tuckerman, Douglas J. Tobias, et Michael L. Klein. « Explicit reversible integrators for extended systems dynamics ». *Molecular Physics* 87, n° 5 (10 avril 1996): 1117-57. <https://doi.org/10.1080/00268979600100761>.
- 310 Feller, Scott E., Yuhong Zhang, Richard W. Pastor, et Bernard R. Brooks. « Constant Pressure Molecular Dynamics Simulation: The Langevin Piston Method ». *The Journal of Chemical Physics* 103, n° 11 (15 septembre 1995): 4613-21. <https://doi.org/10.1063/1.470648>.
- 311 Pearlman, David A., David A. Case, James W. Caldwell, Wilson S. Ross, Thomas E. Cheatham, Steve DeBolt, David Ferguson, George Seibel, et Peter Kollman. « AMBER, a Package of Computer Programs for Applying Molecular Mechanics, Normal Mode Analysis, Molecular Dynamics and Free Energy Calculations to Simulate the Structural and Energetic Properties of Molecules ». *Computer Physics Communications* 91, n° 1 (2 septembre 1995): 1-41. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00041-D](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00041-D).
- 312 Brooks, Bernard R., Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, et Martin Karplus. « CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations ». *Journal of Computational Chemistry* 4, n° 2 (1983): 187-217. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>.
- 313 Van Der Spoel, David, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E. Mark, et Herman J. C. Berendsen. « GROMACS: Fast, Flexible, and Free ». *Journal of Computational Chemistry* 26, n° 16 (2005): 1701-18. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- 314 Phillips, James C., Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, et Klaus Schulten. « Scalable Molecular Dynamics with NAMD ». *Journal of computational chemistry* 26, n° 16 (décembre 2005): 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- 315 Eastman, Peter, Jason Swails, John D. Chodera, Robert T. McGibbon, Yutong Zhao, Kyle A. Beauchamp, Lee-Ping Wang, et al. « OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics ». *PLoS Computational Biology* 13, n° 7 (26 juillet 2017): e1005659. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>.

-
- 316 Adjoua, Olivier, Louis Lagardère, Luc-Henri Jolly, Arnaud Durocher, Thibaut Very, Isabelle Dupays, Zhi Wang, et al. « Tinker-HP: Accelerating Molecular Dynamics Simulations of Large Complex Systems with Advanced Point Dipole Polarizable Force Fields Using GPUs and Multi-GPU Systems ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 17, n° 4 (13 avril 2021): 2034-53. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01164>.
- 317 Rackers, Joshua A., Zhi Wang, Chao Lu, Marie L. Laury, Louis Lagardère, Michael J. Schnieders, Jean-Philip Piquemal, Pengyu Ren, et Jay W. Ponder. « Tinker 8: Software Tools for Molecular Design ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 14, n° 10 (9 octobre 2018): 5273-89. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00529>.
- 318 Lagardère, Louis, Luc-Henri Jolly, Filippo Lipparini, Félix Aviat, Benjamin Stamm, Zhifeng F. Jing, Matthew Harger, et al. « Tinker-HP: A Massively Parallel Molecular Dynamics Package for Multiscale Simulations of Large Complex Systems with Advanced Point Dipole Polarizable Force Fields ». *Chemical Science* 9, n° 4 (24 janvier 2018): 956-72. <https://doi.org/10.1039/C7SC04531J>.
- 319 Ewald, P. P. « Die Berechnung Optischer Und Elektrostatischer Gitterpotentiale ». *Annalen Der Physik* 369, n° 3 (1921): 253-87. <https://doi.org/10.1002/andp.19213690304>.
- 320 Aviat, Félix, Antoine Levitt, Benjamin Stamm, Yvon Maday, Pengyu Ren, Jay W. Ponder, Louis Lagardère, et Jean-Philip Piquemal. « Truncated Conjugate Gradient: An Optimal Strategy for the Analytical Evaluation of the Many-Body Polarization Energy and Forces in Molecular Simulations ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 13, n° 1 (10 janvier 2017): 180-90. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00981>.
- 321 Wu, Johnny, Gaurav Chattree, et Pengyu Ren. « Automation of AMOEBA Polarizable Force Field Parameterization for Small Molecules ». *Theoretical chemistry accounts* 131 (26 février 2012): 1138. <https://doi.org/10.1007/s00214-012-1138-6>.
- 322 Smith, Daniel G. A., Lori A. Burns, Andrew C. Simmonett, Robert M. Parrish, Matthew C. Schieber, Raimondas Galvelis, Peter Kraus, et al. « Psi4 1.4: Open-source software for high-throughput quantum chemistry ». *The Journal of Chemical Physics* 152, n° 18 (14 mai 2020): 184108. <https://doi.org/10.1063/5.0006002>.
- 323 Stone, Anthony J. « Distributed Multipole Analysis: Stability for Large Basis Sets ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 1, n° 6 (1 novembre 2005): 1128-32. <https://doi.org/10.1021/ct050190+>.
- 324 Christenholz, Cori L., Daniel A. Obenchain, Rebecca A. Peebles, et Sean A. Peebles. « Rotational Spectroscopic Studies of C–H···F Interactions in the Vinyl Fluoride···Difluoromethane Complex ». *The Journal of Physical Chemistry A* 118, n° 9 (6 mars 2014): 1610-16. <https://doi.org/10.1021/jp500312r>.
- 325 « Daylight Theory: SMARTS - A Language for Describing Molecular Patterns », 24 janvier 2023. <https://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smarts.html>.
- 326 Kleiman, Diego E., et Diwakar Shukla. « Multiagent Reinforcement Learning-Based Adaptive Sampling for Conformational Dynamics of Proteins ». *Journal of Chemical*

-
- Theory and Computation* 18, n° 9 (13 septembre 2022): 5422-34.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00683>.
- 327 Hruska, Eugen, Jayvee R. Abella, Feliks Nüske, Lydia E. Kaviraki, et Cecilia Clementi. « Quantitative comparison of adaptive sampling methods for protein dynamics ». *The Journal of Chemical Physics* 149, n° 24 (28 décembre 2018): 244119.
<https://doi.org/10.1063/1.5053582>.
- 328 Betz, Robin M., et Ron O. Dror. « How Effectively Can Adaptive Sampling Methods Capture Spontaneous Ligand Binding? » *Journal of Chemical Theory and Computation* 15, n° 3 (12 mars 2019): 2053-63. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00913>.
- 329 Zimmerman, Maxwell I., Justin R. Porter, Xianqiang Sun, Roseane R. Silva, et Gregory R. Bowman. « Choice of Adaptive Sampling Strategy Impacts State Discovery, Transition Probabilities, and the Apparent Mechanism of Conformational Changes ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 14, n° 11 (13 novembre 2018): 5459-75.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00500>.
- 330 Sittel, Florian, Abhinav Jain, et Gerhard Stock. « Principal component analysis of molecular dynamics: On the use of Cartesian vs. internal coordinates ». *The Journal of Chemical Physics* 141, n° 1 (7 juillet 2014): 014111. <https://doi.org/10.1063/1.4885338>.
- 331 David, Charles C., et Donald J. Jacobs. « Principal Component Analysis: A Method for Determining the Essential Dynamics of Proteins ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1084 (2014): 193-226. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11.
- 332 Borde, Chloé, Clémentine Dillard, Aurore L'Honoré, Frédérique Quignon, Marion Hamon, Christophe H. Marchand, Roberta Soares Faccion, et al. « The C-Terminal Acidic Tail Modulates the Anticancer Properties of HMGB1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 23, n° 14 (janvier 2022): 7865.
<https://doi.org/10.3390/ijms23147865>.
- 333 Lagardère, Louis, Félix Aviat, et Jean-Philip Piquemal. « Pushing the Limits of Multiple-Time-Step Strategies for Polarizable Point Dipole Molecular Dynamics ». *The Journal of Physical Chemistry Letters* 10, n° 10 (16 mai 2019): 2593-99.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b00901>.
- 334 Hopkins, Chad W., Scott Le Grand, Ross C. Walker, et Adrian E. Roitberg. « Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 11, n° 4 (14 avril 2015): 1864-74.
<https://doi.org/10.1021/ct5010406>.
- 335 Åqvist, Johan, Petra Wennerström, Martin Nervall, Sinisa Bjelic, et Bjørn O. Brandsdal. « Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm ». *Chemical Physics Letters* 384, n° 4 (26 janvier 2004): 288-94. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.039>.
- 336 Bowman, Gregory R., Daniel L. Ensign, et Vijay S. Pande. « Enhanced Modeling via Network Theory: Adaptive Sampling of Markov State Models ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 6, n° 3 (9 mars 2010): 787-94.

- 337 McGibbon, Robert T., Kyle A. Beauchamp, Matthew P. Harrigan, Christoph Klein, Jason M. Swails, Carlos X. Hernández, Christian R. Schwantes, Lee-Ping Wang, Thomas J. Lane, et Vijay S. Pande. « MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories ». *Biophysical Journal* 109, n° 8 (20 octobre 2015): 1528-32. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.08.015>.
- 338 Harris, Charles R., K. Jarrod Millman, Stéfan J. van der Walt, Ralf Gommers, Pauli Virtanen, David Cournapeau, Eric Wieser, et al. « Array programming with NumPy ». *Nature* 585, n° 7825 (2020): 357-62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- 339 Pedregosa, Fabian, Gaël Varoquaux, Alexandre Gramfort, Vincent Michel, Bertrand Thirion, Olivier Grisel, Mathieu Blondel, et al. « Scikit-Learn: Machine Learning in Python ». arXiv, 5 juin 2018. <http://arxiv.org/abs/1201.0490>.
- 340 Virtanen, Pauli, Ralf Gommers, Travis E. Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, Evgeni Burovski, et al. « SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python ». *Nature Methods* 17, n° 3 (mars 2020): 261-72. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>.
- 341 Hunter, John D. « Matplotlib: A 2D Graphics Environment ». *Computing in Science & Engineering* 9, n° 3 (mai 2007): 90-95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>.
- 342 Ponnusamy, Kalaiarasan, Naidu Subbarao, et Rameshwar Bamezai. « Molecular simulation of Tyr105 phosphorylated pyruvate kinase M2 to understand its structure and dynamics ». *Journal of molecular modeling* 20 (1 septembre 2014): 2447. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2447-6>.
- 343 Xie, Jiansheng, Chunyan Dai, et Xun Hu. « Evidence That Does Not Support Pyruvate Kinase M2 (PKM2)-catalyzed Reaction as a Rate-limiting Step in Cancer Cell Glycolysis ». *The Journal of Biological Chemistry* 291, n° 17 (22 avril 2016): 8987-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704825>.
- 344 Guo, Jianshuang, Qingqing Xue, Kaihui Liu, Weizhi Ge, Wenjie Liu, Jiyan Wang, Mengyi Zhang, et al. « Dimethylaminomicheliolide (DMAMCL) Suppresses the Proliferation of Glioblastoma Cells via Targeting Pyruvate Kinase 2 (PKM2) and Rewiring Aerobic Glycolysis ». *Frontiers in Oncology* 9 (1 octobre 2019): 993. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00993>.
- 345 Wang, Ping, Chang Sun, Tingting Zhu, et Yanhui Xu. « Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2 ». *Protein & Cell* 6, n° 4 (avril 2015): 275-87. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0132-x>.
- 346 Yang, Jingxu, Hao Liu, Xiaorui Liu, Chengbo Gu, Ray Luo, et Hai-Feng Chen. « Synergistic Allosteric Mechanism of FBP and Serine for Pyruvate Kinase M2 via Dynamics Fluctuation Network Analysis ». *Journal of chemical information and modeling* 56, n° 6 (27 juin 2016): 1184-92. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00115>.
- 347 Masaki, So, Kozue Hashimoto, Daiki Kihara, Chizuru Tsuzuki, Naoyuki Kataoka, et

-
- Kenji Suzuki. « The Cysteine Residue at 424th of Pyruvate Kinase M2 Is Crucial for Tetramerization and Responsiveness to Oxidative Stress ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 526, n° 4 (11 juin 2020): 973-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.182>.
- 348 Kosasih, Herman, Bacht Alisjahbana, null Nurhayati, Quirijn de Mast, Irani F. Rudiman, Susana Widjaja, Ungke Antonjaya, et al. « The Epidemiology, Virology and Clinical Findings of Dengue Virus Infections in a Cohort of Indonesian Adults in Western Java ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, n° 2 (février 2016): e0004390. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004390>.
- 349 Gopinath, Prakasam, Mohammad Iqbal, Rameshwar Bamezai, et Sybille Mazurek. « Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer ». *Frontiers in Oncology* 8 (7 février 2018): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00022>.
- 350 Wongtrakul, Jeerang, Thananya Thongtan, Supitcha Pannengetch, Nitwara Wikan, Doungnapa Kantamala, Benjawan Kumrapich, Warissara Suwan, et Duncan R. Smith. « Phosphoproteomic Analysis of Dengue Virus Infected U937 Cells and Identification of Pyruvate Kinase M2 as a Differentially Phosphorylated Phosphoprotein ». *Scientific Reports* 10, n° 1 (2 septembre 2020): 14493. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71407-x>.
- 351 Boktor, Sameh W., et John W. Hafner. « Influenza ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459363/>.
- 352 Krug, Robert M., Firelli V. Alonso-Caplen, Ilkka Julkunen, et Michael G. Katze. « Expression and Replication of the Influenza Virus Genome ». In *The Influenza Viruses*, édité par Robert M. Krug, 89-152. The Viruses. Boston, MA: Springer US, 1989. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0811-9_2.
- 353 Hsu, Ming-Chuan, Wen-Chun Hung, Hirohito Yamaguchi, Seung-Oe Lim, Hsin-Wei Liao, Chia-Hua Tsai, et Mien-Chie Hung. « Extracellular PKM2 induces cancer proliferation by activating the EGFR signaling pathway ». *American Journal of Cancer Research* 6, n° 3 (15 février 2016): 628-38.
- 354 Miyake, Yukari, Kosuke Ishii, et Aya Honda. « Influenza Virus Infection Induces Host Pyruvate Kinase M Which Interacts with Viral RNA-Dependent RNA Polymerase ». *Frontiers in Microbiology* 8 (2017). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00162>.
- 355 Shanmugam, Chandrakumar, Abdul Rafi Mohammed, Swarupa Ravuri, Vishwas Luthra, Narasimhamurthy Rajagopal, et Saritha Karre. « COVID-2019 – A comprehensive pathology insight ». *Pathology, Research and Practice* 216, n° 10 (octobre 2020): 153222. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153222>.
- 356 Gu, Xia, Yuan Ma, Yi Liu, et Qiang Wan. « Measurement of Mitochondrial Respiration in Adherent Cells by Seahorse XF96 Cell Mito Stress Test ». *STAR Protocols* 2, n° 1 (19 mars 2021): 100245. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100245>.
- 357 Allen, Charles N. S., Sterling P. Arjona, Maryline Santerre, Claudio De Lucia, Walter J.

-
- Koch, et Bassel E. Sawaya. « Metabolic Reprogramming in HIV-Associated Neurocognitive Disorders ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16 (2022): 812887. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.812887>.
- 358 Wu, Qian, Yingna Feng, Yu Ouyang, Yinggang Liang, Kuoquan Zhao, Ying Wang, Qing Luo, Juan Xiao, Nianjie Feng, et Mengzhou Zhou. « Inhibition of advanced glycation endproducts formation by lotus seedpod oligomeric procyanidins through RAGE-MAPK signaling and NF- κ B activation in high-AGEs-diet mice ». *Food and Chemical Toxicology* 156 (1 octobre 2021): 112481. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112481>.
- 359 Cho, Joon-Ho, Deepak Kumar Saini, W.K. Ajith Karunarathne, Vani Kalyanaraman, et N. Gautam. « Alteration of Golgi Structure in Senescent Cells and its Regulation by a G protein γ subunit ». *Cellular signalling* 23, n^o 5 (mai 2011): 785-93. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.001>.
- 360 Allen, Charles N. S., Maryline Santerre, Sterling P. Arjona, Lea J. Ghaleb, Muna Herzi, Megan D. Llewellyn, Natalia Shcherbik, et Bassel E. Sawaya. « SARS-CoV-2 Causes Lung Inflammation through Metabolic Reprogramming and RAGE ». *Viruses* 14, n^o 5 (6 mai 2022): 983. <https://doi.org/10.3390/v14050983>.
- 361 Helt, Anna-Marija, et Denise A. Galloway. « Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins ». *Carcinogenesis* 24, n^o 2 (1 février 2003): 159-69. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.2.159>.
- 362 Zhou, Zhifen, Min Li, Lin Zhang, Hong Zhao, Özgür Şahin, Jing Chen, Jean J. Zhao, Zhou Songyang, et Dihua Yu. « Oncogenic kinase-induced PKM2 tyrosine 105 phosphorylation converts non-oncogenic PKM2 to a tumor promoter and induces cancer stem-like cells ». *Cancer research* 78, n^o 9 (1 mai 2018): 2248-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2726>.
- 363 Ma, Tao, Harsh Patel, Savalan Babapoor-Farrokhran, Renty Franklin, Gregg L. Semenza, Akrit Sodhi, et Silvia Montaner. « KSHV induces aerobic glycolysis and angiogenesis through HIF-1-dependent upregulation of pyruvate kinase 2 in Kaposi's sarcoma ». *Angiogenesis* 18, n^o 4 (octobre 2015): 477-88. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9475-4>.
- 364 Razavi-Shearer, Devin, Ivane Gamkrelidze, Mindie H. Nguyen, Ding-Shinn Chen, Pierre Van Damme, Zaigham Abbas, Maheeba Abdulla, et al. « Global Prevalence, Treatment, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection in 2016: A Modelling Study ». *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 3, n^o 6 (1 juin 2018): 383-403. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30056-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30056-6).
- 365 Musa, Julian, Jing Li, et Thomas GP Grunewald. « Hepatitis B Virus Large Surface Protein Is Priming for Hepatocellular Carcinoma Development via Induction of Cytokinesis Failure ». *The Journal of Pathology* 247, n^o 1 (2019): 6-8. <https://doi.org/10.1002/path.5169>.
- 366 Wu, Yi-Hsuan, Yi Yang, Ching-Hung Chen, Chia-Jen Hsiao, Tian-Neng Li, Kuan-Ju Liao, Koichi Watashi, Bor-Sen Chen, et Lily Hui-Ching Wang. « Aerobic Glycolysis

-
- Supports Hepatitis B Virus Protein Synthesis through Interaction between Viral Surface Antigen and Pyruvate Kinase Isoform M2 ». *PLOS Pathogens* 17, n° 3 (15 mars 2021): e1008866. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008866>.
- 367 Perz, Joseph F., Gregory L. Armstrong, Leigh A. Farrington, Yvan J. F. Hutin, et Beth P. Bell. « The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide ». *Journal of Hepatology* 45, n° 4 (1 octobre 2006): 529-38. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.013>.
- 368 Wu, Xiaoyun, You Zhou, Ke Zhang, Qingzhen Liu, et Deyin Guo. « Isoform-Specific Interaction of Pyruvate Kinase with Hepatitis C Virus NS5B ». *FEBS Letters* 582, n° 15 (2008): 2155-60. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.033>.
- 369 Leung, Dilys T. H., et Simon Chu. « Measurement of Oxidative Stress: Mitochondrial Function Using the Seahorse System ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1710 (2018): 285-93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_22.
- 370 Lv, Dong-Wen, Kun Zhang, et Renfeng Li. « Interferon Regulatory Factor 8 Regulates Caspase-1 Expression to Facilitate Epstein-Barr Virus Reactivation in Response to B Cell Receptor Stimulation and Chemical Induction ». *PLOS Pathogens* 14, n° 1 (22 janvier 2018): e1006868. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006868>.
- 371 Blevins, Hallie M., Yiming Xu, Savannah Biby, et Shijun Zhang. « The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 14 (2022): 879021. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021>.
- 372 Xie, Min, Yan Yu, Rui Kang, Shan Zhu, Liangchun Yang, Ling Zeng, Xiaofang Sun, et al. « PKM2-Dependent Glycolysis Promotes NLRP3 and AIM2 Inflammasome Activation ». *Nature Communications* 7 (25 octobre 2016): 13280. <https://doi.org/10.1038/ncomms13280>.
- 373 Borde, Chloé, Alexandre E. Escargueil, et Vincent Maréchal. « Shikonin, an Inhibitor of Inflammasomes, Inhibits Epstein-Barr Virus Reactivation ». *Antiviral Research* 217 (septembre 2023): 105699. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105699>.
- 374 Kochnev, Yuri, et Jacob D. Durrant. « FPocketWeb: protein pocket hunting in a web browser ». *Journal of Cheminformatics* 14 (26 août 2022): 58. <https://doi.org/10.1186/s13321-022-00637-0>.
- 375 Wagner, Jeffrey R., Jesper Sørensen, Nathan Hensley, Celia Wong, Clare Zhu, Taylor Perison, et Rommie E. Amaro. « POVME 3.0: Software for Mapping Binding Pocket Flexibility ». *Journal of chemical theory and computation* 13, n° 9 (12 septembre 2017): 4584-92. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00500>.
- 376 Morris, Garrett M., Ruth Huey, et Arthur J. Olson. « Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking ». *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 8 (décembre 2008): Unit 8.14. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24>.
- 377 PARK, JAE HYEON, JIN-SOL LEE, YUNMOON OH, JI SUN LEE, HAE EUN PARK,

-
- HAEUN LEE, YEON SU PARK, SO YOUNG KYUNG, HYUNG SIK KIM, et SUNGPIL YOON. « PKM2 Is Overexpressed in Glioma Tissues, and Its Inhibition Highly Increases Late Apoptosis in U87MG Cells With Low-density Specificity ». *In Vivo* 36, n° 2 (3 mars 2022): 694-703. <https://doi.org/10.21873/invivo.12755>.
- 378 Bluemlein, Katharina, Nana-Maria Grüning, René G. Feichtinger, Hans Lehrach, Barbara Kofler, et Markus Ralser. « No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis ». *Oncotarget* 2, n° 5 (22 mai 2011): 393-400.
- 379 Spiegel, Jacob O., et Jacob D. Durrant. « AutoGrow4: an open-source genetic algorithm for de novo drug design and lead optimization ». *Journal of Cheminformatics* 12, n° 1 (17 avril 2020): 25. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00429-4>.
- 380 Jaffrelot-Inizan, Théo, Thomas Plé, Olivier Adjoua, Pengyu Ren, Hatice Gökcan, Olexandr Isayev, Louis Lagardère, et Jean-Philip Piquemal. « Scalable Hybrid Deep Neural Networks/Polarizable Potentials Biomolecular Simulations including Long-range Effects ». *Chemical Science* 14, n° 5438-5452 (avril 2023). <https://doi.org/10.1039/D2SC04815A>.
- 381 Wan, Hongbin, et Vincent A. Voelz. « Adaptive Markov state model estimation using short reseeded trajectories ». *The Journal of Chemical Physics* 152, n° 2 (8 janvier 2020): 024103. <https://doi.org/10.1063/1.5142457>.



Résumé

Le métabolisme glycolytique joue un rôle essentiel dans les processus physiologiques normaux et dans la croissance des cellules cancéreuses. Les isoformes 1 et 2 de la pyruvate kinase musculaire, appelées PKM1/2, sont des protéines cruciales qui régulent ce métabolisme. La caractérisation de la dynamique structurale de ces biomolécules est donc importante pour développer de nouveaux médicaments dirigés contre les formes exprimées dans les cellules tumorales. Pour ce faire, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire (DM) de ces deux protéines à haute résolution, en nous appuyant sur des techniques d'échantillonnage adaptatif couplées au champ de forces polarisable AMOEBA afin de comprendre la flexibilité conformationnelle de l'enzyme dans ses différents états d'oligomérisation. Nous proposons une analyse structurale à haute résolution pour PKM2 et apportons de nouvelles données structurales pour PKM1. En effet, nous étudions le processus d'oligomérisation de l'enzyme PKM2 (du monomère au tétramère) et nous sommes notamment attachés à analyser la structuration de sites structuraux clés, notamment le site actif et la poche de fixation du Fructose Biphosphate (FBP), un inducteur conformationnel physiologique. Nous montrons également que la fixation du TEPP-46, un activateur pharmacologique de PKM2, induit des modifications structurales très proches de celles induites par la fixation du FBP, bien que les domaines d'interaction soient distincts. Enfin, nous décrivons la première simulation DM à haute résolution de la forme active de PKM1, qui présente de fortes similitudes structurales avec la forme tétramérique de PKM2 liée au FBP. Ces résultats fournissent de nouvelles informations sur la dynamique structurale et la structuration des sites clés pendant l'oligomérisation de PKM2, qui pourraient s'avérer cruciales pour la découverte de nouvelles molécules actives.

Mots-clés : PKM1/PKM2, cancer, TEPP-46, métabolisme, dynamique moléculaire, AMOEBA