

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des équations	11
Liste des abréviations	13
Introduction	15

Chapitre I.	Synthèse bibliographique	19
--------------------	---------------------------------	-----------

I. Les métalloprotéases matricielles	21
I. A. Historique	21
I. B. Architecture générale des MMP	23
I. B. a. Une structure modulaire	23
I. B. b. Eléments de structure des domaines catalytiques des MMP	25
I. C. Rôle fonctionnel et intérêt thérapeutique	28
I. C. a. Rôle physiologique	28
I. C. b. Mécanisme d'action	31
I. C. c. Intérêts et défis thérapeutiques	32
I. D. La métalloélastase du macrophage (MMP-12)	33
I. D. a. Historique	33
I. D. b. Implications pathologiques	34
II. Régulation de l'activité protéolytique des MMP	39
II. A. Activation et régulation <i>in vivo</i> des MMP	39
II. B. Inhibiteurs naturels	41
II. C. Inhibiteurs synthétiques	43
II. C. a. Historique	43
II. C. b. Une première génération puissante mais peu sélective	45
II. C. c. Une seconde génération qui s'affranchit des résidus peptidiques	46
II. C. d. Une troisième génération d'inhibiteur où l'on sort du paradigme de l'hydroxamate	47
III. Importance des effets de protonation lors de l'interaction protéine-ligand	50
III. A. Origines des effets de protonation	52
III. A. a. Perturbations électrostatiques	53
III. A. b. Changements conformationnels	53
III. B. Mise en évidence expérimentale	54
III. B. a. Méthodes atomistiques	54
III. B. b. La Calorimétrie à Titration Isotherme depuis le prisme du formalisme de Baker et Murphy	56
III. C. Calorimétrie, mesure de pKa et quantification énergétique : exemples dans la littérature	60
IV. L'interaction MMP-12/RXP470.1	65
IV. A. Vers l'identification du RXP470.1, un inhibiteur sélectif de la MMP-12	65
IV. B. Efficacité <i>in vivo</i> du RXP470.1	68
IV. C. Mise en évidence d'un phénomène de protonation ⁸⁴	70
IV. C. a. Identification du résidu protoné lors de la liaison du RXP470.1	71
IV. C. b. Protonation d'un deuxième résidu à pH basique	73

Chapitre II. Objectifs	75
<hr/>	
Chapitre III. Résultats	79
I. La lysine 241 : un résidu protonable à pH basique 81	
I. A. Identification du résidu protonable à pH basique 82	
I. A. a. Hypothèses de travail 82	
I. A. b. Validation du rôle de la Lys ²⁴¹ 83	
I. B. Discussion et conclusion 85	
II. Implications énergétiques de la liaison RXP470.1/ MMP-12h F171D K2421A 87	
II. A. Mise en évidence d'un shift de pKa significatif 87	
II. B. Détermination et dissection du profil thermodynamique de la liaison du RXP470.1 89	
II. B. a. Effet du pH sur les profils thermodynamiques de la liaison du RXP470.1 89	
II. B. b. Coût enthalpique de la protonation du Glu ²¹⁹ 90	
II. C. Détermination des paramètres intrinsèques de liaison 92	
II. D. Discussion 94	
II. E. Conclusion 106	
III. Effet du groupement chélatant du Zinc 107	
III. A. Effet sur l'affinité vis à vis de la MMP-12h 108	
III. B. Effet sur les profils thermodynamiques 108	
III. C. Etude des structures cristallines 109	
III. D. Effets sur les profils de sélectivité 115	
III. E. Discussion 117	
<hr/>	
Chapitre IV. Discussion générale	121
<hr/>	
Chapitre V. Matériel et Méthodes	131
I. Synthèse des inhibiteurs de MMP 133	
II. Production et Purification de la MMP-12 135	
II. A. Production 135	
II. A. a. Constructions utilisées – mutagenèse dirigée 135	
II. A. b. Amplification de vecteur 136	
II. A. c. Vérification de la séquence 136	
II. A. d. Expression 137	
II. B. Purification et repliement 138	
III. Caractérisation de l'activité enzymatique 139	
III. A. Principe général 139	
III. B. Test d'activité 139	
III. C. Dosage de protéine active 140	
III. D. Constante d'inhibition (Ki) 142	
IV. Calorimétrie à Titration Isotherme 144	
IV. A. Introduction 144	
IV. A. a. Champ d'utilisation 144	

IV. A. b. Principe de fonctionnement	144
IV. B. Déroulement d'une mesure d'interaction	147
IV. B. a. Détermination des concentrations	147
IV. B. b. Préparation des solutions	147
IV. B. c. Titration	148
IV. B. d. Analyse	148
IV. C. Effets environnementaux : tampon, pH et température	148
IV. C. a. Effet tampon	149
IV. C. b. Effet pH	149
V. Cristallographie aux rayons X	149
V. A. Cristallogénèse	150
V. A. a. Formation et croissance d'un cristal	150
V. A. b. Méthodes de cristallisation	154
V. A. c. Paramètres utilisés	157
V. B. Congélation des cristaux	158
V. C. Récolte des données	160
V. C. a. Principe général de la diffraction	160
V. C. b. Montage expérimental	160
V. D. Résolution des structures	162
V. D. a. Traitement des données brutes de diffraction	162
V. D. b. Construction et raffinement du modèle	163
Bibliographie	167
Annexes	179
I. Tampons utilisés : données thermodynamiques et zones tampons	i
II. Résumé des conditions de cristallisation et de récolte des données	ii
III. Synthèse des composés 2 et 3	iii

Liste des figures

Figure I.1 : Historique de publication du terme « matrix metalloproteinase » dans la base PubMED.....	22
Figure I.2 : Structure tridimensionnelle de la MMP-2, détail des différents modules.....	23
Figure I.3 : Classification structurale des MMP	25
Figure I.4 : Superposition des domaines catalytiques des MMP-1, 3, 7, 8, 9, 12 et 13	26
Figure I.5 : Détails du domaine catalytique de la MMP-1 en complexe avec un inhibiteur hydroxamate	27
Figure I.6 : Nomenclature standard d'un substrat peptidique et des poches correspondantes	28
Figure I.7: Voies d'action des MMP <i>in vivo</i>	30
Figure I.8 : Mécanisme réactionnel de l'activité protéolytique des MMP	31
Figure I.9 : Progression de la plaque d'athérome	35
Figure I.10 : Séquence KD(D/E)K antibactérienne.....	37
Figure I.11 : La MMP-12, facteur de transcription pro-inflammatoire et agent protéolytique	38
Figure I.12 : Mécanismes de régulation des MMP.....	40
Figure I.13 : Mécanisme d'activation des MMP, « cystein switch ».....	40
Figure I.14 : Structure cristallographique de la MMP-3 en interaction avec le TIMP-1.....	43
Figure I.15 : Structure générale des trois familles d'inhibiteurs de MMP	44
Figure I.16 : Mode de chélation de l'ion zinc par un groupement hydroxamate, exemple de la galardine ...	46
Figure I.17 : Inhibiteur de MMP présentant une fonction carboxylate doublée d'un groupement sulfonamide en complexe avec la MMP-12	46
Figure I.18 : Exemples de groupes chélatants utilisés dans le développement d'inhibiteurs de MMP.....	48
Figure I.19 : Différences du mode de liaison au zinc de l'acide hydroxamique seul (A) ou intégré dans un inhibiteur (B).....	48
Figure I.20 : Structures et profils de sélectivité de deux inhibiteurs de troisième génération	49
Figure I.21 : Importance des états de protonation	51
Figure I.22 : Exemple de système thérapeutique dépendant du pH.....	52
Figure I.23 : Principaux mécanismes à l'origine des variations du pKa et de l'état d'ionisation des groupements impliqué dans l'interaction protéine-ligand	52
Figure I.24 : Distribution spatiale des résidus ionisables dont le pKa est affecté par la liaison d'un ligand...	54
Figure I.25 : Thermogramme représentatif obtenu par ITC.....	57
Figure I.26 : La protonation dans l'interaction protéine-ligand	57
Figure I.27 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'élastase et OMTKY3	61
Figure I.28 : Mécanisme catalytique de la MMP-7 proposé par Takeharu, et al.	64
Figure I.29 : Structure chimique et affinité d'inhibiteurs carboxylate et phosphinate.....	65
Figure I.30 : Analogies structurales entre l'état de transition peptidique et différents peptides contenant un groupe phosphoryle	66
Figure I.31 : Schéma récapitulatif des variations des positions P ₁ ', P ₂ ' et P ₃ ' étudiées	67
Figure I.32 : Sélectivité du RXP470.1 vis à vis d'un large set de MMP	67
Figure I.33 : Effet d'un traitement continu par le RXP470.1 sur la taille des plaques d'athérome.....	69
Figure I.34 : Dépendance au pH, effets sur l'affinité et l'enthalpie de liaison observée	70
Figure I.35 : Structure cristallographique haute résolution du complexe RXP470.1/MMP-12	71
Figure I.36 : Chélation du zinc catalytique par le RXP470.1	72
Figure I.37 : Variations de l'enthalpie de liaison observée $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ lors de l'interaction du RXP470.1 avec la MMP-12 □ ou la MMP-12 E219Q •en fonction du tampon	72

Figure I.38 : Simulation du $pK_{a\text{libre}}$ du Glu ²¹⁹ à partir de l'équation 5.....	74
Figure II.1 : Structure des trois inhibiteurs étudiés.....	77
Figure III.1 : Résidus ionisables à proximité du RXP470.1 dans le site actif de la MMP-12h	82
Figure III.2 : Visualisation de la prise de proton induite par la formation du protéine-ligand en fonction du pH	84
Figure III.3 : Superposition des structures cristallographiques du RXP470.1 en complexe avec la MMP-12h F171D (bleu foncé) et la MMP-12h F171D K241A (bleu clair)	85
Figure III.4 : Affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A en fonction du pH.....	86
Figure III.5 : Prise de protons en fonction du pH.....	88
Figure III.6 : Dégénérescence des valeurs de pK_a	88
Figure III.7 : Evolution du profil thermodynamique de la liaison RXP470.1/ MMP-12h F171D K241A en fonction du pH.....	89
Figure III.8 : Détermination des valeurs indépendantes du pH : ΔH^0_{int} , ΔH_p^f and $d\Delta H_p$	91
Figure III.9 : Evolution de la dissection enthalpique de la liaison RXP470/MMP-12h F171D K241A en fonction du pH.....	92
Figure III.10 : Mode d'obtention des données intrinsèques	93
Figure III.11 : Evolution de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A.....	93
Figure III.12 : Courbes théoriques représentant l'équation 12	95
Figure III.13 : Evolution de la partie dépendante du pH de l'affinité du RXP470.1 ¹³⁶	96
Figure III.14 : Mise en perspective des paramètres de la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h	97
Figure III.15 : Contribution des différentes composantes enthalpiques.....	99
Figure III.16 : Détail des interactions entre les résidus du site actif de la MMP-12h F171D et le RXP470.1 100	
Figure III.17 : Evolution des composantes énergétiques de l'interaction RXP470.1 / mMP-12h F171D K241A en fonction du pH.....	102
Figure III.18 : Comparaison de deux approches pour simuler l'évolution des variations d'entropie de liaison $-T\Delta S$ en fonction du pH	103
Figure III.19 : Schéma de l'interaction MMP-12/ligand	105
Figure III.20 : Profils thermodynamiques caractéristiques, de la liaison des composés 1 à 3 avec la MMP-12h F171D K241A	108
Figure III.21 : Structures cristallographiques des composés 1 à 3 en complexe avec la MMP-12h F171D K241A.....	109
Figure III.22 : Détails de l'interaction des composés 1 à 3 avec la MMP-12h F171D K241A	110
Figure III.23 : Superposition des composés 1 à 3 en interaction avec la MMP-12h F171D K241A.....	111
Figure III.24 : Insertion des composés 1 à 3 dans la cavité S_1' de la MMP-12h F171D K241A.....	111
Figure III.25 : superposition de la boucle S_1' pour chacun des complexes inhibiteurs/MMP-12h F171D K241A étudiés.....	112
Figure III.26 : Superposition des composés 1 à 3 en complexe avec la MMP-12h F171D K241A.....	112
Figure III.27 : Variation de l'affinité des composés 1 à 3 en fonction du pH	113
Figure III.28 : Réseau de liaisons hydrogènes possibles impliquant une molécule d'eau interfaciale	114
Figure III.29 : Superposition deux à deux des composés 1 à 3	115
Figure III.30 : Profil de sélectivité des composés 1 à 3 vis à vis de huit MMP.....	115
Figure III.31 : Variation de l'affinité des composés 2 et 3 par rapport au RXP470.1	116
Figure III.32 : Dégradation des profils de sélectivité des composés 1 à 3	116
Figure III.33 : Comparaison des facteurs B associés à chaque complexe inhibiteur/MMP-12h F171D K241A.....	119
Figure IV.1 : Equilibre entre Glu ²¹⁹ neutre et Glu ²¹⁹ chargé en fonction du pH	126

Figure V.1 : Plasmide d'expression pET-24a.....	135
Figure V.2 : Activité de référence MMP-12 F171D mesurée en tripliquette	140
Figure V.3 : Courbe de dosage de 20 nM de MMP-12 F171D K241A par l'inhibiteur 500.1.....	141
Figure V.4 : Courbe de dosage de 5 μ M de MMP-12 F171D K241A par le RXP470	142
Figure V.5 : Exemple de répartition de l'inhibiteur pour une mesure de K_i	143
Figure V.6 : Détermination du K_i du RXP470.1vis à vis de la MMP-12 F171D K241A à pH 6,8	143
Figure V.7 : Schéma de fonctionnement d'un microcalorimètre	145
Figure V.8 : Principe de la Calorimétrie à Titration Isotherme.....	146
Figure V.9 : Appareils de microcalorimétrie utilisés.....	147
Figure V.10 : Croissance cristalline au cours du temps	151
Figure V.11 : Cristallogenèse - diagramme de phase	152
Figure V.12 : Méthode de cristallisation par diffusion de vapeur	155
Figure V.13 : Ensemencement en ligne « streak seeding ».....	156
Figure V.14 : Diffraction aux rayons-X, principe de fonctionnement.....	161
Figure V.15 : Comparaison scan classique vs Helical scan.....	161

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Classification fonctionnelle des MMP	22
Tableau I.2 : Effet du pH sur la fraction de protons échangés lors de la formation du complexe RXP470.1/MMP-12	73
Tableau III.1 : Effet du pH sur la fraction de proton échangés lors de la formation du complexe RXP470-MMP-12h F171D K241A	87
Tableau III.2 : Effet du pH sur la fraction de proton échangés et l'enthalpie de liaison lors de la formation du complexe RXP470-MMP-12h F171D K241A.....	91
Tableau III.3 : Valeurs thermodynamiques intrinsèques caractérisant l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A	94
Tableau III.4 : Paramètres thermodynamiques de la liaison des composés 1 à 3 avec le domaine catalytique de la MMP-12h F171D K241A.....	117
Tableau IV.1 : Décomposition énergétique pour le Glu ²¹⁹ en présence et en l'absence du RXP470.1	124
Tableau V.1 : Caractéristiques des inhibiteurs utilisés.....	134
Tableau V.2 : Liste des tampons de purification	138
Tableau V.3 : Paramètres pouvant affecter la croissance cristalline	153
Tableau V.4 : Résumé des conditions utilisées lors de la cristallogénèse	158
Tableau V.5 : Composition des cryo-solutions utilisées	159
Tableau V.6 : Lignes de lumières utilisées et techniques de récolte des données	162
Tableau V.7 : Paramètres de maille et groupe d'espace des structures obtenues.....	163
Tableau V.8 : Relation entre la résolution des données de diffraction et l'interprétabilité de la carte de densité électronique.....	164

Liste des équations

- Eq.1 $K_{obs} = K_{int} \frac{1+K_p^c \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^f \cdot 10^{-pH}}$ 58
- Eq.2 $K_{i_{obs}} = K_{i_{int}} \frac{1+K_p^c \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^f \cdot 10^{-pH}}$ 58
- Eq.3 $\bar{H}^f = \frac{K_p^f \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^f \cdot 10^{-pH}}$ 58
- Eq.4 $\bar{H}^c = \frac{K_p^c \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^c \cdot 10^{-pH}}$ 58
- Eq.5 $N_{H^+} = \bar{H}^c - \bar{H}^f = \frac{K_p^c \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^c \cdot 10^{-pH}} - \frac{K_p^f \cdot 10^{-pH}}{1+K_p^f \cdot 10^{-pH}}$ 58
- Eq.6 $\Delta H_{obs}^\circ = \Delta H_0^\circ + N_{H^+} \cdot \Delta H_{ion}^b$ 59
- Eq.7 $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{int}^\circ - \bar{H}^f \cdot \Delta H_p^f + \bar{H}^c \cdot (\Delta H_p^f + \delta \Delta H_p)$ 59
- Eq.8 $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{int}^\circ + N_{H^+} \cdot \Delta H_p^f + \bar{H}^c \cdot \delta \Delta H_p$ 59
- Eq.9 $N_{H^+} = \sum_i N_{H_i^+} = \sum_i \bar{H}^{c_i} - \bar{H}^{f_i} = \sum_i \frac{10^{pK_a c_i - pH}}{1+10^{pK_a c_i - pH}} - \frac{10^{pK_a f_i - pH}}{1+10^{pK_a f_i - pH}}$ 82
- Eq.10 $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{int}^\circ + \sum_i N_{H_i^+} \cdot \Delta H_p^{f_i} + \bar{H}^{c_i} \cdot \delta \Delta H_p^i$ 82
- Eq.11 $\Delta G = -RT \cdot \ln(K_{obs})$ 102
- Eq.12 $-T\Delta S_0^\circ = -T\Delta S_{int}^\circ + N_{H^+} \cdot T\Delta S_p^f - \bar{H}^c \cdot \delta T\Delta S_p$ 103
- Eq.13 $\Delta G_0^\circ = \Delta G_{int}^\circ - N_{H^+} \cdot \Delta G_p^f + \bar{H}^c \cdot \delta \Delta G_p$ 103
- Eq.14 $\Delta G_{prot} = -RT \cdot \ln(10) \cdot pK_a$ 103

Liste des abréviations

[C]	Concentration
Å	Ångström
AA	Acide aminé
ACES	Acide N-(1-acetamido)-2-aminoethanesulfonique
ADAM	"A Disintegrin And Metalloprotease"
ADAM-TS	"A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Motifs"
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AHA	Acide AcetoHydroxamic
AMPSO	N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid
ARN	Acide RiboNucléique
BES	Acide N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonique
BPCO	Broncho-Pneumonie Chronique Obstructive
Br-phényle	Bromo-phényle
BSA	Bovine Serum Albumin
cal	Calorie
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid, CAPSO Free Acid
CCD	Charge-Coupled Device
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
Cl-phényle	Chlore-phényle
DNase	DéoxyriboNuclease
DNP	Dinitrophényl
DO	Densité Optique
DPA	3-(2,4-Dinitro-phenyl)-L-2,3-diaminopropionyl
E. coli	Escherichia coli
ESI-MS	ElectroSpray Ionization – Mass
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIV	Virus de l'Immunodéficience Humaine
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IPTG	IsoPropyl-1 Thio-β-D-Galactoside
ITC	Calorimétrie à Titrage Isotherme
J	Joule
Ka	Constante d'affinité
kcal	kilocalorie
kcat	Constante de catalyse de l'enzyme pour le substrat
K _i	Constante d'inhibition
kJ	kilojoule
Km	Constante d'affinité du substrat pour l'enzyme
Ln	Logarithme népérien
log	Logarithme décimal
MCP-3	Monocyte chemotactic protein 3
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, 4-Morpholineethanesulfonic acid
Milieu LB	Milieu Luria Bertani
MMP	Metalloprotease Matricielle

MOPS	acide 3-Morpholinopropanesulfonique
ND	Non Déterminé
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyéthylèneglycol
PIPES	Acide Piperazine-1,4-Bis (2-Ethanesulfonique)
pKa	Constante d'acidité
PM	Poids Moléculaire
PMSF	PhenylMethaneSulfonylFluoride
RNase	RiboNuclease
RX	Rayon X
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TIMP	Tissue Inhibitor of MMP
TOF	Time Of Flight
Tp	Tampon
TRIS	2-Amino-2-(hydroxyméthyl) propane-1,3-diol
WT	Wild Type

Introduction

Depuis une dizaine d'années la recherche pharmaceutique, et avec elle le développement de molécules à usage thérapeutique, s'est enrichie de nouvelles techniques venues améliorer l'efficacité des procédures dites de « drug discovery ». La génomique fonctionnelle a permis l'identification de nouvelles cibles protéiques, le screening haut débit (HTS) a considérablement augmenté les possibilités de criblage et la chimie combinatoire a élargi le champ des molécules synthétisables en laboratoire. La recherche et la conception de ligands actifs, étape essentielle du développement de nouveaux médicaments, passe en outre par l'étude des modalités de liaison entre le ligand et le site de liaison de la cible protéique. Celles-ci peuvent être observées expérimentalement via les techniques structurales de cristallographie aux rayons X ou de résonnance magnétique nucléaire (RMN). D'autres techniques comme la microcalorimétrie, la spectrométrie de masse ou la résonnance plasmon de surface (SPR) viennent étoffer le spectre des données biophysiques disponibles. Cependant, et malgré la diversité des techniques mises en place, le nombre de nouvelles entités à visée thérapeutique commercialisables n'augmente pas^{1,2}.

Ce constat est particulièrement vrai dans le cas des métalloprotéases matricielles (MMP), une famille de protéines au potentiel thérapeutique reconnu mais qui souffre, malgré plus de trente ans de recherches, d'un manque flagrant de molécules utilisables en clinique. De nombreux essais cliniques ont ainsi été conduits sans succès notamment dans le cadre de la dispersion tumorale, probablement en raison des profils de sélectivité médiocres de ces inhibiteurs. Dans ce contexte, où les cibles sont clairement identifiées mais difficilement exploitables, la combinaison de méthodes biophysiques peut constituer une voie prometteuse à explorer. Ce type d'approche permet de documenter, comme on construirait un puzzle, les facteurs moléculaires contrôlant les interactions de ces protéines avec leurs inhibiteurs, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique.

Notre laboratoire a été le premier à identifier des composés puissants et sélectifs de la métalloélastase du macrophage (MMP-12), avec comme tête de série le RXP470.1. L'identification de cet inhibiteur pseudo-peptidique s'est accompagnée d'un grand nombre d'efforts pour comprendre les modalités de son interaction avec la MMP-12 : expression de MMP-12 recombinante en grandes quantités, cristallographie et production de mutants pour identifier les résidus d'intérêt, synthèse d'inhibiteurs analogues pour établir des relations structure-activité, études de thermodynamique pour préciser les contributions enthalpiques et entropiques des interactions MMP-12/inhibiteurs... Une première étude avait en particulier permis de mettre en évidence une prise de protons lors de la formation du complexe MMP-12/RXP470.1, sans pour autant pouvoir conclure quant aux contributions énergétiques mises en jeu lors de cet échange. En effet, le RXP470.1 se caractérise par son groupe

phosphoryle qui interagit avec l'ion zinc de manière monodentate et fait face à un résidu glutamate nécessaire à l'acte catalytique de la MMP-12. Cette proximité structurale entre deux charges négatives à pH physiologique (le groupement phosphinate PO_2^- du RXP470.1 et la fonction carboxylate du glutamate) a été identifiée comme la source de l'échange de protons identifié précédemment. Le premier volet de cette étude avait donc pour objectif de reprendre cette étude pour parvenir à déterminer précisément les contributions enthalpiques mises en jeu par cette prise de proton.

Trente ans de recherche sur les inhibiteurs de MMP ont naturellement permis de définir des stratégies pour mettre au point des inhibiteurs puissants de cette famille d'enzymes. L'une des principales stratégies repose sur la présence, dans la structure de l'inhibiteur, d'un groupe chimique capable de chélater l'ion zinc du site catalytique. Différentes générations de groupement chélatant ont ainsi été identifiées et décrites en fonction de leur capacité à interagir avec cet atome de zinc³. Pour autant, malgré de nombreuses études, l'impact des différents groupements chélatants sur les paramètres de puissance et de sélectivité des inhibiteurs, sur leur mode liaison et enfin sur les paramètres thermodynamiques des interactions enzyme/inhibiteur n'a jamais fait l'objet d'une étude systématique. Le deuxième objectif du travail présenté dans ces pages a donc été de mener une telle étude sur le rôle du groupe chélatant dans l'interaction enzyme/inhibiteur.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I. Les métalloprotéases matricielles

I. A. Historique

En 1962, l'équipe de Gross et Lapierre isolait l'agent protéolytique responsable de la dégradation du collagène lors de la métamorphose de la queue du têtard et décrivait ainsi le premier membre d'une nouvelle famille de protéases, les métalloprotéases matricielles (MMP)⁴. Depuis cette découverte historique, la famille s'est nettement agrandie et compte aujourd'hui 26 membres chez l'homme (Tableau I.1). Son nom provient de l'hypothèse, largement répandue, selon laquelle ces protéases sont capables de dégrader collectivement l'ensemble des composants protéiques de la matrice extracellulaire.

Les MMP sont ainsi décrites comme une large famille d'endopeptidases dépendantes du calcium et du zinc. Elles appartiennent à la sous famille des metzincines qui comprend également les astacines, les adamalysines (ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase et ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), les seralysines et les leishmanolysines^{5,6,7}. Les membres de cette famille se distinguent par une séquence signature **HEXXHXXGXX(H/D)** et la présence d'un atome de zinc catalytique. Cet atome de zinc est chélaté par les deux histidines mises en évidence dans la séquence signature. Un troisième chélatant peut se présenter sous la forme d'un aspartate ou d'une histidine selon les familles ; dans le cas des MMP, il s'agit d'une troisième histidine. Enfin, le glutamate de cette séquence signature participe à l'acte catalytique, l'hydrolyse d'une liaison peptidique, en jouant alternativement le rôle de base et d'acide général (Chapitre I.I. C. a). Les metzincines sont elles-mêmes une sous-famille de la famille des zincines⁸.

La première classification historique des MMP (Tableau I.1) tenait compte des substrats préférentiellement dégradés *in vitro* par chaque MMP, à mesure que celles-ci étaient découvertes. Dans cette classification originelle, la nomenclature reflétait alors le nombre d'années écoulées depuis l'identification du premier membre de cette famille⁹. On distinguait quatre classes principales de MMP : les collagénases, les stromélysinés, les matrylisines, et les gélatinases. Les MMP ne présentant pas de spécificité stricte pour la dégradation d'un substrat plutôt qu'un autre, cette dénomination, souvent basée sur l'identification d'un substrat principal, s'est vite retrouvée dépassée par l'élargissement du spectre des substrats dégradés. A cela s'ajoute une certaine redondance de l'activité protéolytique qui achève de rendre obsolète le modèle historique de classification des MMP. A titre d'exemple, le collagène est ainsi dégradé par les collagénases (MMP-1, 8, 13 et 18), mais aussi par les MMP-9 et 14.

MMP N°	Classe	Nom usuel
MMP-1	Collagénases	Collagénase-1
MMP-8		Collagénase-2 / Collagénase du neutrophile
MMP-13		Collagénase-3
MMP-18		Collagénase-4
MMP-2	Gélatinases	Gélatinase-A
MMP-9		Gélatinase-B
MMP-3	Stromélysines	Stromélysine-1
MMP-10		Stromélysine-2
MMP-11		Stromélysine-3
MMP-27		Pas de nom usuel, Homologue de la stromélysine-2 (51,6%)
MMP-7	Matrylysines	Matrylysine (PUMP)
MMP-26		Matrylysine-2
MMP-14	Type-Membranaire (MT-MMP)	MT1-MMP
MMP-15		MT2-MMP
MMP-16		MT3-MMP
MMP-17		MT4-MMP
MMP-24		MT5-MMP
MMP-25		MT6-MMP
MMP-12	Autres	Métalloélastase du macrophage
MMP-19		RASI 1
MMP-20		Enamelysine
MMP-21		X-MMP
MMP-22		C-MMP
MMP-23		CA-MMP
MMP-28		Epilysine
MMP-29		Pas de nom

Tableau I.1 : Classification fonctionnelle des MMP

Une recherche PubMED sur les termes « MMP » et « matrix metalloproteinase » permet de constater le formidable essor des travaux réalisés sur les MMP depuis le début des années 90. De nos jours, ce sont 3000 à 4000 articles en lien avec les MMP qui sont publiés chaque année et témoignent ainsi de l'intérêt toujours croissant de la communauté scientifique pour ces objets (Figure I.1).

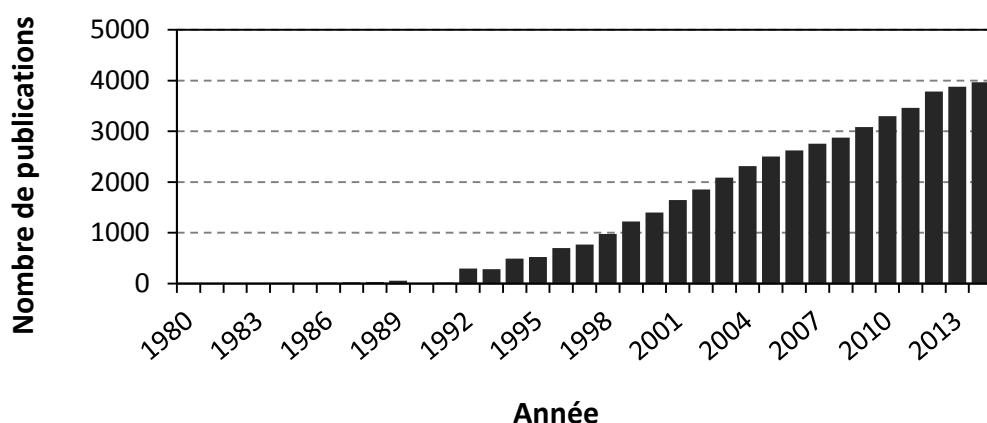


Figure I.1 : Historique de publication du terme « matrix metalloproteinase » dans la base PubMed

I. B. Architecture générale des MMP

I. B. a. Une structure modulaire

D'un point de vue structural, les métalloprotéases peuvent être vues comme la succession de différents domaines et inserts. La démocratisation de la cristallographie à haute résolution et de la résonnance magnétique nucléaire (RMN) a permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de douze des vingt-trois MMP connues chez l'homme. La structure du domaine catalytique de la MMP-1 a été résolue en premier par l'équipe de Lovejoy en 1994¹⁰. Pour les quatorze autres MMP, des structures modèles ont pu être obtenues grâce aux techniques de modélisation par homologie¹¹.

La structure minimale commune à toutes les MMP s'articule autour d'un peptide signal (~ 20 résidus) permettant la sécrétion des MMP, d'un pro-domaine (~ 80 résidus) obstruant l'accès au site actif de la protéase (et donc responsable de la forme latente inactive de la protéase) et enfin d'un domaine catalytique (~ 200 résidus) (Figure I.2).

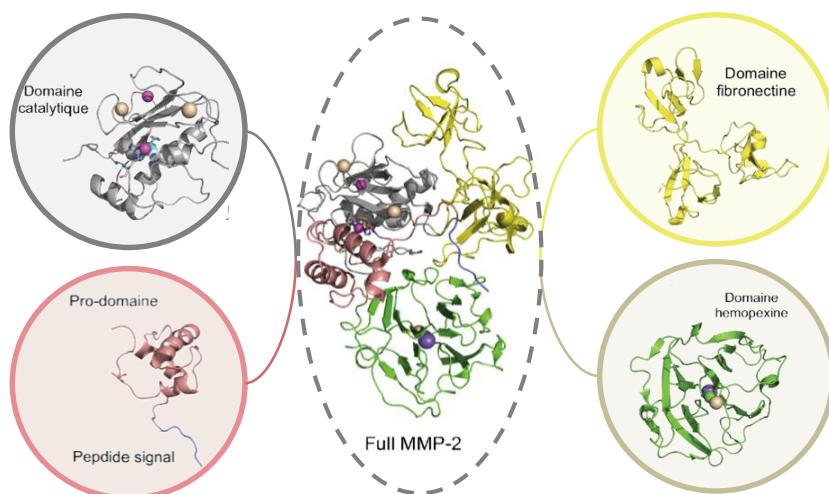


Figure I.2 : Structure tridimensionnelle de la MMP-2, détail des différents modules

Code PDB : 1CK7

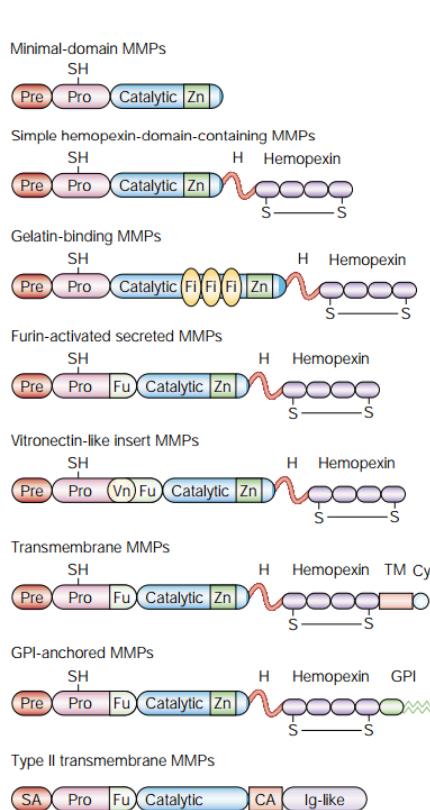
Les MMP se différencient par la présence (ou non) de domaines additionnels (Figure I.3):

- un domaine hémopexine en position C-terminale. Connecté au domaine catalytique par une région charnière (H), il permet de moduler l'interaction entre les MMP et leurs inhibiteurs naturels, les TIMPS (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), certaines molécules exprimées à la surface des cellules, mais aussi certains substrats. Le domaine hémopexine n'est rien de plus que la quadruple répétition d'un même motif protéique dont les première et dernière occurrences sont reliées par un pont disulfure,

- un domaine fibronectine (Fi) présent en triple exemplaire dans la séquence du domaine catalytique des gélatinases (MMP-2 et 9) et venant s'insérer dans le domaine catalytique,
- un motif de reconnaissance (Fu) des protéases à sérine « furin like » qui permet l'activation intracellulaire de ces MMP par les furines. Ce motif est situé entre le prodomaine et le domaine catalytique,
- un domaine transmembranaire (TM) de type I prolongé d'un très court domaine cytoplasmique (Cy),
- un domaine glycosylphosphatidylinositol (GPI) remplace chez les MMP-17 et 25 le groupement transmembranaire et leur permet de s'arrimer à la membrane (côté extracellulaire),
- un insert vitronectine,
- un domaine transmembranaire de type II (motif immunoglobulin-like, Ig-like) caractéristique de la MMP-23.

La combinaison de ces différents domaines permet de distinguer huit classes structurales de taille hétérogène :

- les MMP possédant seulement la structure minimale peptide signal / prodomaine / domaine catalytique : MMP-7 et 26,
- les MMP possédant en plus de la structure minimale, un domaine hémopexine : MMP-1, 3, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 22 et 27,
- les MMP qui présentent la structure minimale, un domaine hémopexine et un motif fibronectine : MMP-2 et 9,
- les MMP avec structure minimale, domaine hémopexine et domaine transmembranaire de type I : MMP- 14, 15, 16 et 24,
- les MMP qui en plus de la structure minimale possèdent un domaine hemopexine et un domaine de fixation à la membrane de type GPI : MMP-17 et 25,
- les MMP qui présentent un motif de reconnaissance à la furine en plus de la structure minimale et d'un domaine hémopexine : MMP-11 et 28,
- la MMP-21 qui possède un insert vitronectine,
- la MMP-23 avec son domaine transmembranaire de type II.



MMP N°	Nom commun	Classe structurale
MMP-11	Stromélysine-3	Furin-activated secreted
MMP-28	Epilysine	
MMP-2	Gélatinase-A	Gelatin-binding
MMP-9	Gélatinase-B	
MMP-17	MT4-MMP	GPI-anchored
MMP-25	MT6-MMP	
MMP-7	Matrilysine (PUMP)	Minimal domain
MMP-26	Matrilysine-2	
MMP-1	Collagénase-1	Simple hemopexin-domain-containing
MMP-3	Stromélysine-1	
MMP-8	Collagénase-2	
MMP-10	Stromélysine-2	
MMP-12	Métalloélastase du macrophage	
MMP-13	Collagénase-3	
MMP-18	Collagénase-4	
MMP-19	RASI 1	
MMP-20	Enamelysine	
MMP-22	CMMP	
MMP-27	Pas de nom usuel	Transmembrane
MMP-14	MT1-MMP	
MMP-15	MT2-MMP	
MMP-16	MT3-MMP	
MMP-24	MT5-MMP	Type II transmembrane
MMP-23	CA-MMP, fermalysine	
MMP-21	XMMP	Vitronectin-like inserts

Figure I.3 : Classification structurale des MMP

Adapté de Egeblad M. and Werb Z. 2002¹².

I. B. b. Eléments de structure des domaines catalytiques des MMP

Dans le contexte actuel de course au développement d'inhibiteurs à visée thérapeutique, il est essentiel de connaître finement la structure des sites actifs des MMP considérées. Ce n'est donc pas un hasard si la résolution de la première structure de MMP a été rapportée par une équipe du groupe pharmaceutique Merck et concernait un domaine catalytique (celui de la MMP-1)¹⁰. Désormais, ce sont plus de 160 structures de domaines catalytiques de MMP en complexe avec différents ligands qui sont disponibles dans la PDB (Octobre 2015).

Malgré une homologie de séquence parfois assez faible, la topologie globale des domaines catalytiques des différentes MMP est extrêmement bien conservée, comme en atteste la superposition de leurs structures tridimensionnelles (Figure I.4A.). La seule entorse à cette règle générale concerne une boucle délimitant la partie basse du site actif : la boucle S_{1'} (Figure I.4 B.).

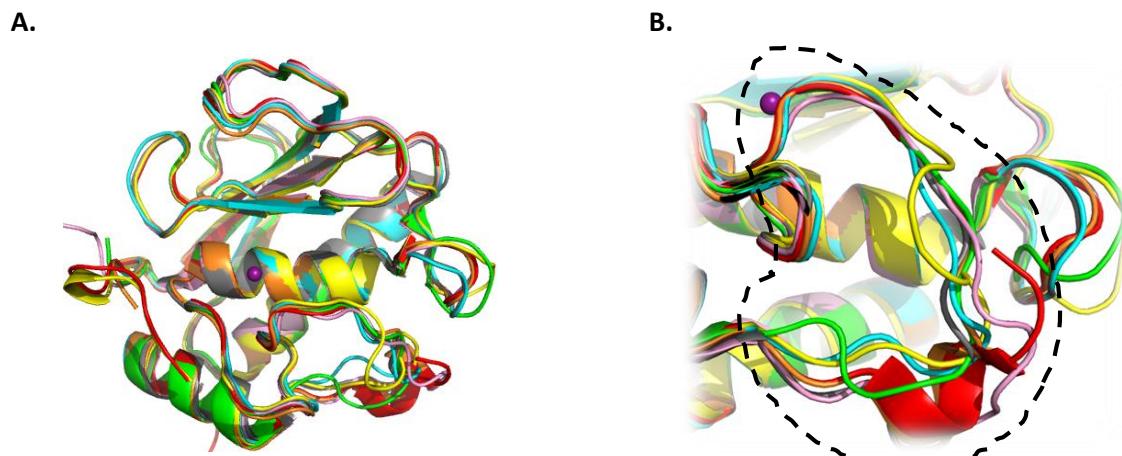


Figure I.4 : Superposition des domaines catalytiques des MMP-1, 3, 7, 8, 9, 12 et 13

Codes PDB (dans l'ordre) : 1HFC, 1HY7, 1MMQ, 2OY2, 4XCT, 4GQL, 3ZXH

A. Superposition des domaines catalytiques

B. Détail de la superposition des boucles S1'---

Du reste, le domaine catalytique se présente sous la forme d'un monomère globulaire d'environ 35 Å de diamètre et constitué de cinq feuillets β (un anti-parallèle et quatre parallèles) et trois hélices α , éléments de structure secondaire connectés par différentes boucles (Figure I.5 C.). Trois atomes de calcium et un atome de zinc stabilisent la structure et assurent son bon repliement. Un deuxième atome de zinc se situe dans le site actif et participe à l'acte catalytique. Il est chélaté par trois histidines (Figure I.5 D.), et, dans la protéine libre, par une molécule d'eau. A l'état de zymogène (pro-MMP), le zinc est également chélaté par la fonction thiol d'une cystéine du prodomaine qui prend ainsi la place de cette molécule d'eau (Chapitre I.II. A). Un résidu glutamate participe à la réaction d'hydrolyse du substrat et surplombe le zinc catalytique. Cet acide aminé est supporté par l'hélice α délimitant le fond du site actif. Les substrats peptidiques des MMP se fixent aux MMP par le biais d'une gorge peu profonde traversant le domaine catalytique d'est en ouest (en jaune, nomenclature de Bode, Figure I.5 A.)¹³. Dans le complexe MMP/substrat, le zinc catalytique est alors situé en face de la liaison scissile prête à être hydrolysée. Les chaînes latérales des résidus s'insèrent de part et d'autre dans les différents sous-sites de liaison (Figure I.6). A l'ouest du zinc catalytique, les sites sont dits « non primés » et désignés par la séquence S_1, S_2, \dots, S_n . A l'est, on parle des sous-sites « primés » S'_1, S'_2, \dots, S'_n . De la même manière, les groupements fonctionnels du substrat ou de l'inhibiteur sont répertoriés de P_1 à P_n et de P'_1 à P'_n ^{14,15}.

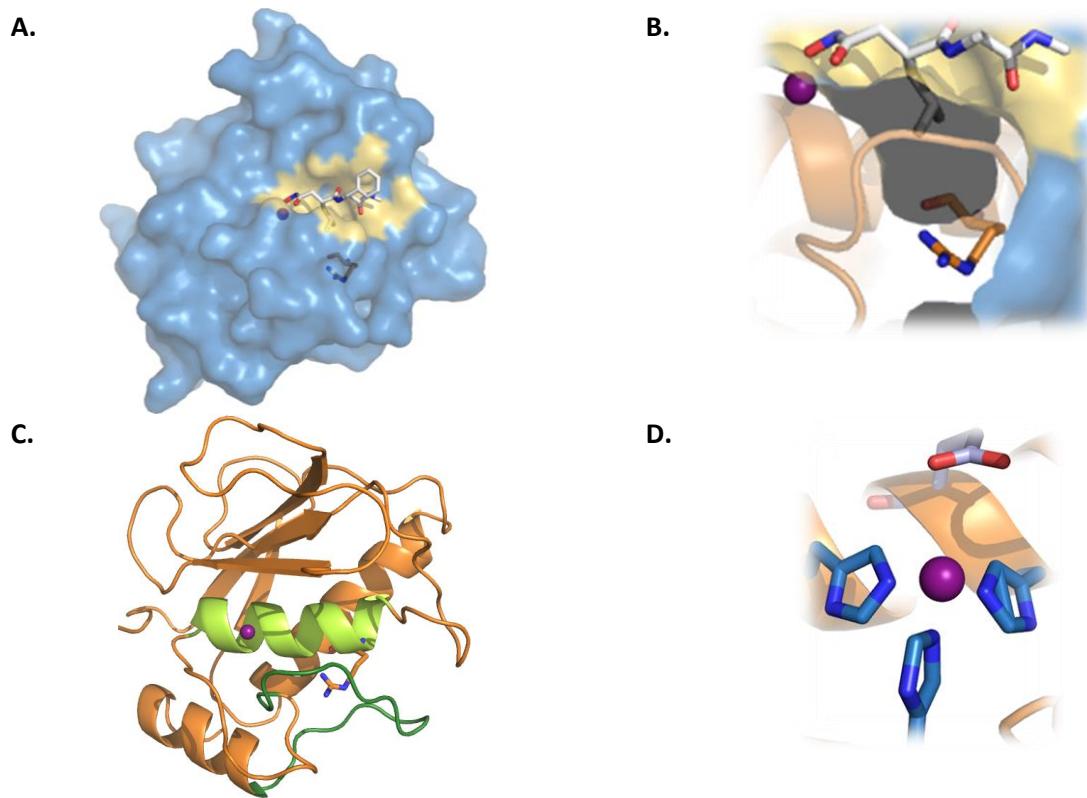


Figure I.5 : Détails du domaine catalytique de la MMP-1 en complexe avec un inhibiteur hydroxamate

Code PDB : 1HFC

A. Représentation en mode surface. En jaune, mise en avant du site actif et des sites de liaison possibles,

B. Détail, en mode surface de la poche S_1' bloquée par l'Arg²¹⁴ (représentation stick, orange)

C. Détail des éléments de structure secondaires : l'hélice α (vert clair) portant deux des trois histidines chélatant le zinc catalytique (magenta) et la boucle S_1' (vert foncé),

D. Chélation du zinc catalytique (magenta) par trois histidines (bleu foncé), glutamate catalytique (parme).

Les positions non primes sont les plus exposées au solvant : S_1 et S_3 sont les plus éloignées du cœur catalytique, tandis que S_2 est à proximité immédiate du zinc catalytique. S_2 , en particulier chez les MMP-2 et 9, est responsable d'une certaine sélectivité de substrat.^{16, 17}

La boucle S_1' , également appelée boucle de sélectivité, délimite la paroi extérieure d'un canal hydrophobe très profond et ouvert au solvant. La séquence de la boucle varie d'une MMP à l'autre, tant par sa longueur que la nature de ses acides aminés, ce qui affecte directement le volume de la cavité ainsi délimitée. Il s'agit là d'une propriété capitale des MMP permettant de rationaliser, a posteriori et dans une certaine mesure seulement, les différences d'affinité pour un même substrat ou inhibiteur d'une MMP à l'autre (Figure I.4). Le résidu 214 (numérotation établie à partir de la MMP-1), porté par l'hélice α qui délimite le fond de la poche S_1' , influence également le volume de la cavité. Chez la plupart des MMP, ce résidu est une leucine dont la chaîne latérale est courte. La poche est ainsi relativement large et profonde. Chez les MMP-1, 7 et 11, ce résidu est respectivement une arginine, une tyrosine ou une glutamine. La gêne stérique bien plus importante induite par ces groupements

réduit significativement le volume de la poche vers l'intérieur de laquelle pointent les chaînes latérales (Figure I.5 A. et B.). En 1996, Welch et al montraient ainsi que la mutation, chez MMP-1, de l'arginine 214 en leucine permettait de restaurer un profil de sélectivité proche de celui de la MMP-3 dont la poche S_1' est bien plus profonde. On définit alors grossièrement trois classes de MMP, la classe 1 décrivant les MMP avec une large cavité S_1' (MMP-3, 11, 12, 13 et 14), la classe 2 dont la cavité adopte un volume intermédiaire (MMP-2, 8 et 9), et la classe 3 où la poche est la plus restreinte (MMP-1 et 7) ^{10,18,19,20}.

Le rôle du sous-site S_2' dans les mécanismes de sélectivité est plus marginal mais il a été montré que les inhibiteurs possédant en P_2' un groupement volumineux et hydrophobe préfèrent globalement les MMP de classe 1²¹. La nature de la chaîne $P3'$, plus exposée au solvant, ne présente qu'un effet modeste dans les processus de sélectivité¹⁷.

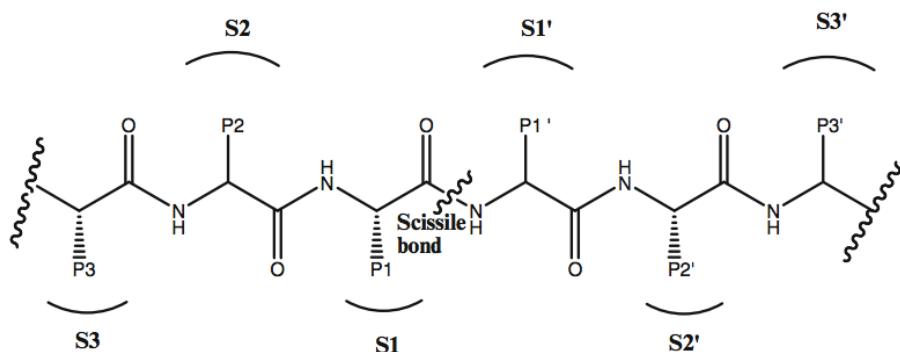


Figure 1.6 : Nomenclature standard d'un substrat peptidique et des poches correspondantes

Adapté de Babine RE. et Bender SL. 1997¹⁴.

P_n et P_n' ($n=1, 2, 3, \dots$) font référence aux chaînes latérales du substrat.

S_n et S_n' ($n=1, 2, 3, \dots$) font référence aux sous-sites de liaison correspondantes.

(cf. : répartition des sites primés et non-primes ci-dessus)

I. C. Rôle fonctionnel et intérêt thérapeutique

1. C. a. Rôle physiologique

Les MMP ont longtemps été décrites comme des protéases agissant exclusivement sur la dégradation des composants de la matrice extracellulaire, c'est d'ailleurs cette propriété qui est à l'origine de leur nom. Il est aujourd'hui reconnu qu'elles sont capables d'intervenir dans de nombreux processus physiologiques qui vont de l'implantation embryonnaire à la mort cellulaire en passant par les mécanismes de cicatrisation et de contrôle de la réponse immunitaire^{12,22,23}.

Tous ces mécanismes biologiques reposent sur l'intervention des MMP à différents niveaux. Outre leur action classique de remodelage des tissus par la modification de la matrice extracellulaire, elles sont capables de créer des espaces favorisant la migration cellulaire, de générer des fragments protéiques ayant une activité propre ou encore de réguler, dans un sens ou dans l'autre, de nombreuses voies de signalisation (Figure I.7).

La matrice extracellulaire ne se contente pas d'être un seul support mécanique pour les cellules, elle est en réalité un véritable espace d'échanges et de signalisation auquel les MMP participent pleinement. La dégradation du collagène IV conduit ainsi à l'exposition d'épitopes préalablement enfouis et qui, une fois révélés, participent à l'initiation de la migration cellulaire. Signe de mécanismes fins de régulation des processus de destruction/reconstruction des tissus, la dégradation de la matrice peut dans certains cas aboutir à la libération du VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor), un facteur de croissance impliqué entre autres dans la cicatrisation des vaisseaux sanguins. Dans un autre registre, les MMP peuvent également dégrader de nombreux substrats non matriciels comme les récepteurs à la tyrosine kinase, des molécules d'adhésion cellulaire ou encore des cytokines et des chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires.

La dégradation de la matrice extracellulaire n'est donc pas un événement trivial et facilement interprétable. Souvent impliqués dans des processus biologiques bien plus complexes, ces phénomènes purement protéolytiques participent à de grandes cascades de signalisation finement régulées mais difficiles à appréhender. Les métalloprotéases matricielles dans leur ensemble ne peuvent plus être considérées comme de simples ciseaux moléculaires mais bien comme des agents à part entière influant directement sur l'activité et le devenir des cellules situées à proximité.

La fonction exacte des MMP reste difficile à définir précisément : leur activité est susceptible de varier en fonction du contexte physiopathologique mais aussi de leur environnement. Il faut en effet ajouter la notion de « web des protéases » à cette complexité de fonction. Au fil des années et des études de protéomique, il apparaît de plus en plus évident que les métalloprotéases matricielles ne fonctionnent pas seules mais de manière parfaitement intégrée dans un réseau de protéases tant matricielles que transmembranaires ou intracellulaires. En 2012, l'équipe d'Overall montrait ainsi que le traitement de cellules humaines par un inhibiteur large spectre de MMP, le prinomastat, impliquait directement ou indirectement la dérégulation de trente-sept protéases²⁴.

Devant l'étendue des processus physiologiques régulés par les MMP, il n'est pas surprenant que toute activité aberrante et non contrôlée se traduise par un risque pathologique accru. Toutefois, l'intégration des MMP dans des réseaux complexes de protéines et leur capacité à dégrader de nombreux substrats rend extrêmement difficile l'utilisation d'inhibiteurs pour des applications

thérapeutiques. Dans ce contexte, l'identification précise des substrats des MMP, notamment lors de processus pathologiques, constitue un défi majeur des études de protéomique à venir. Il s'agit là d'un prérequis essentiel de notre compréhension de la fonction de ces protéases. A cet égard, les stratégies mises en place notamment par le groupe d'Overall dans le domaine des N-terminomics (production et détection de nouveaux fragments peptidiques engendré par coupure protéolytique et porteurs de fonctions amines libres) révèlent l'existence d'un nouveau protéome généré par protéolyse et représentent un premier pas vers une connaissance fine du rôle joué par les MMP.

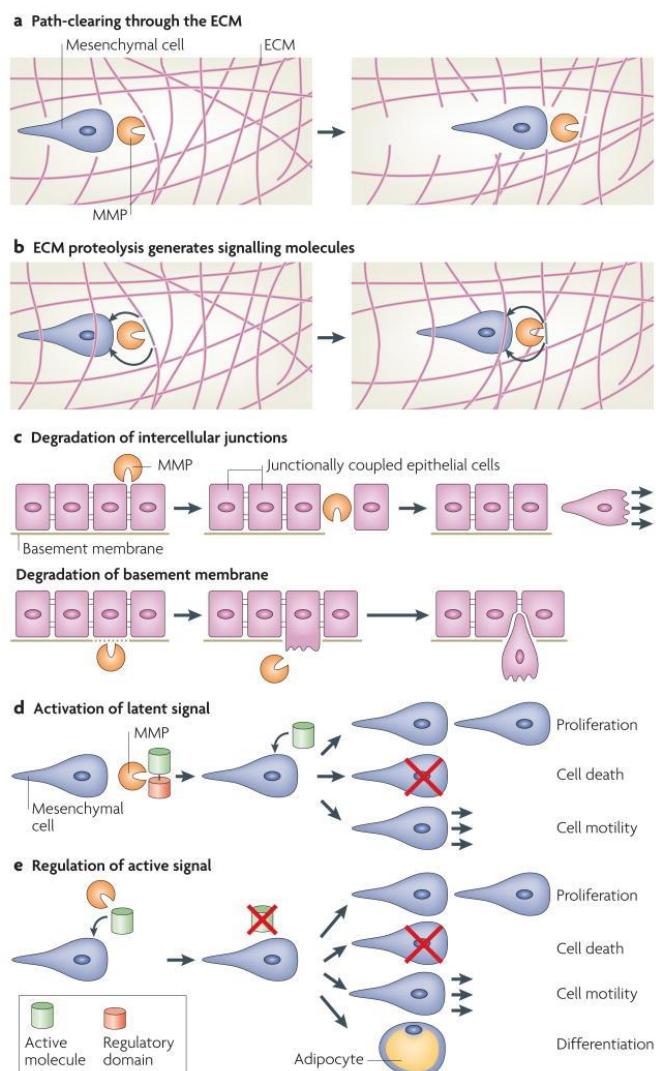


Figure I.7 : Voies d'action des MMP *in vivo*

Tiré de Page-McCaw, et al., 2007²².

I. C. b. Mécanisme d'action

Quelle que soit l'activité considérée, les MMP agissent toujours en hydrolysant l'une des liaisons peptidiques de leur cible. Un mécanisme réactionnel global décrivant l'action protéolytique des MMP a été proposé sur la base d'informations structurales^{10,25}. Ce mécanisme est communément admis pour l'ensemble des MMP décrites (Figure I.8).

Deux observations principales sous-tendent ce mécanisme: la présence d'une molécule d'eau située entre le zinc catalytique et le glutamate présent dans la séquence HEXXH, et la chélation du zinc catalytique par le carbonyle de la liaison peptidique scissile qui est ainsi polarisée. Suite au positionnement du substrat dans le site actif, la molécule d'eau activée est déplacée vers le glutamate catalytique et lui transfère l'un de ses protons. Ce proton peut alors être transmis à l'azote du groupement amide scissile qui passe donc à l'état NH_3^+ . Ce transfert de proche en proche permet l'attaque nucléophile du carbone du carbonyle de la liaison scissile par l'ion hydroxyde issu de la molécule d'eau. Cette attaque induit la formation d'un intermédiaire tétravalent au niveau du carbone anciennement porteur de la fonction carbonyle scissile du substrat. Le transfert du proton du glutamate à l'atome d'azote de la liaison amide décrit ci-dessus achève la formation d'un intermédiaire de réaction instable qui conduit à la rupture de la liaison peptidique. Dans ce mécanisme, l'ion zinc positivement chargé permet de stabiliser la charge négative de l'intermédiaire tétravalent. Une alanine conservée chez toutes les MMP stabilise par son groupe carbonyle la charge positive induite par le transfert d'un proton du glutamate à l'atome d'azote de la liaison à hydrolyser²⁵.

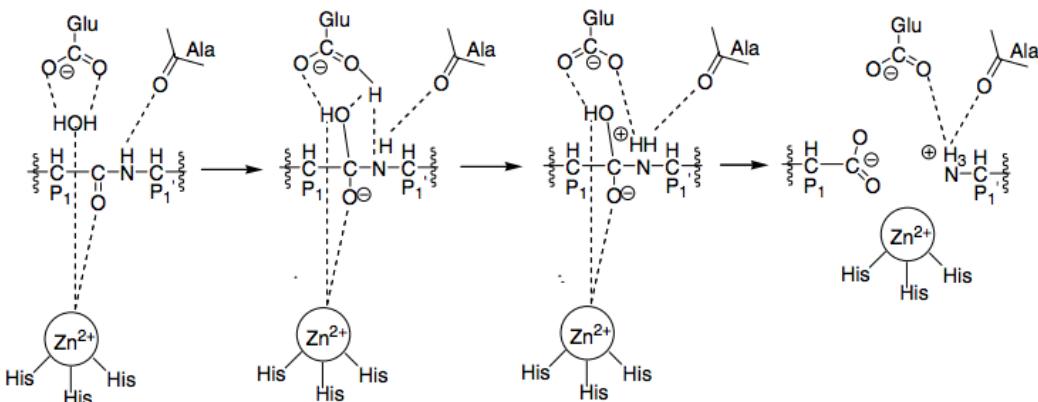


Figure I.8 : Mécanisme réactionnel de l'activité protéolytique des MMP

Tiré de Lovejoy, et al., 1994¹⁰.

I. C. c. Intérêts et défis thérapeutiques

L'implication des MMP dans un aussi grand nombre de phénomènes a mis le pied à l'étrier à de nombreuses stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition des MMP. Historiquement, cet intérêt est apparu à la fin des années 60 lorsque leur surexpression a été démontrée dans différentes pathologies humaines, dont le cancer²⁶, et alors même que les taux constitutifs de MMP sont très bas chez l'adulte^{27,28}. Cette observation, renforcée par le constat que des taux élevés de MMP sont souvent associés à un pronostic vital défavorable chez les patients atteints de cancer, a conduit à considérer ces protéases comme des acteurs privilégiés de la progression tumorale et de la dissémination métastatique. En renfort de ces hypothèses, des études conduites chez l'animal ont permis de montrer que la sécrétion des MMP n'étaient pas l'apanage des cellules tumorales : les cellules hôtes sont également capables de synthétiser certaines MMP en réponse aux modifications de leur environnement induites par la prolifération des cellules cancéreuses²⁹. Ce changement de paradigme a conduit à considérer les MMP non plus comme un ensemble de protéines pro-cancéreuses mais comme un groupe d'individualités dont l'action est à nuancer en fonction du contexte biologique. Un exemple criant est certainement celui de la MMP-8, exprimée par les neutrophiles en réponse à certains cancers. Dans ce cadre particulier, l'activité de la MMP-8, en activant certaines chimiokines, permet le recrutement de nouveaux neutrophiles. Ainsi, dans un modèle murin, son absence par invalidation du gène de la MMP-8 conduit à favoriser la progression tumorale en affaiblissant la réponse immunitaire³⁰.

Cette ambivalence de fonction se retrouve dans de nombreuses pathologies aujourd'hui largement décrites dans la littérature³¹ : des maladies inflammatoires comme l'asthme³², les emphysèmes ou la bronchique chronique obstructive³³, à certaines affections cardiovasculaire³⁴ et aux pathologies du système nerveux central³⁵ en passant par la progression tumorale³⁶.

Dans la perspective de traitements thérapeutiques ciblant les MMP, il convient donc de déterminer en amont la nature des protéases exprimées localement et de définir sans ambiguïté lesquelles supportent effectivement le développement de la pathologie. Cette tâche est rendue d'autant plus complexe que le caractère « cible » ou « anti-cible » peut lui même fluctuer en fonction du stade de la pathologie. Dans ce contexte, les traitements courts par des inhibiteurs extrêmement affins et sélectifs d'une MMP cible deviennent une nécessité thérapeutique. Malheureusement, malgré plus de trente ans de recherche dans le domaine des MMP, peu de composés réellement sélectif ont été décrits. Il apparaît donc crucial de mieux comprendre les phénomènes guidant la sélectivité des quelques composés déjà identifiés.

I. D. La métalloélastase du macrophage (MMP-12)

I. D. a. Historique

La première trace de l'activité protéolytique de la MMP-12 a été rapportée par Werb et Gordon en 1975³⁷. A cette époque, l'équipe signalait une activité élastolytique dans le milieu de culture de macrophages murins activés au thioglicolate, mais sans la rapprocher encore des métalloprotéases matricielles. L'article décrivant la dépendance de cette activité à l'EDTA et au TIMP-1, un inhibiteur spécifique des MMP (Chapitre I.II. B), est quant à lui paru six années plus tard, en 1981³⁸.

En 1992, le groupe de Shapiro parvient à isoler, à partir d'une banque murine, le cDNA correspondant vraisemblablement à la protéase identifiée par Werb³⁹. La métalloprotéase produite par cette séquence présentaient toutes les caractéristiques d'une MMP (à savoir : un prodomaine, un domaine catalytique incluant la séquence signature HEXXHXGXXH et un domaine hémopexine), et démontrait une forte activité élastolytique, lui valant alors le nom de macrophage métalloélastase murine (MME).

D'autres études ont permis de démontrer qu'en dehors de l'élastine, la MMP-12 est également capable de cliver d'autres substrats comme la fibronectine, la laminine ou le collagène de type IV. Il est intéressant de montrer la stricte sélectivité de la MMP-12 vis à vis du collagène de type IV ; en effet cette protéase s'avère incapable de dégrader *in vitro* les collagènes interstitiels (type I à III). La MMP-12 est également impliquée dans des phénomènes de rétrocontrôle de la dégradation de l'élastine en conditions inflammatoires en clivant l'α-antitrypsine qui inhibe elle même la leucocyte élastase, une protéine à sérase surexprimée dans les tissus inflammés⁴⁰.

De nombreuses études se sont penchées sur la surexpression de la MMP-12 en conditions pathologiques. Son rôle a ainsi été avancé dans des affections aussi diverses que les réactions allergiques des voies aériennes, le remodelage des tissus vasculaires, les emphysèmes pulmonaires, l'arthrite rhumatoïde ou encore l'athérosclérose^{41,42,43}. De manière tout à fait originale, une étude récente a montré l'implication de la MMP-12 dans les processus de défense face à une infection virale⁴⁴.

Avant d'aborder l'implication de la MMP-12 dans différentes pathologies, il est important de préciser une caractéristique de cette MMP. En effet, la MMP-12 est la seule dans cette famille à perdre son domaine hémopexine immédiatement après son activation (Figure I.3). En effet, après la protéolyse du prodomaine, un deuxième acte protéolytique permet de lyser la chaîne qui joint les domaines catalytique et hémopexine. Si l'on peut s'interroger dans un premier temps sur l'intérêt de cette

régulation post-transcriptionnelle, on verra ci-dessous que les recherches dans ce domaine ont amené des éclairages surprenants.

I. D. b. Implications pathologiques

L'athérosclérose, une pathologie inflammatoire

L'athérosclérose est la cause principale des accidents cardio vasculaires par rupture de la plaque d'athérome, notamment lorsque cette rupture intervient dans l'artère coronaire, engendrant l'infarctus du myocarde. Ces accidents sont responsables de la moitié des décès dits « non naturels » en Europe⁴⁵, ce qui fait de l'athérosclérose un problème de santé publique majeur.

Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique qui conduit à deux types de complications. La première est due à la croissance lente de la plaque d'athérome, obstruant de plus en plus les artères jusqu'à empêcher totalement le passage du sang. Les plaques ainsi formées, peuvent également devenir instables et se rompre. En fonction de sa taille, cet amas va pouvoir circuler plus ou moins librement dans tout le système sanguin jusqu'à bloquer un vaisseau de petite taille. Selon la localisation, on parle d'infarctus ou d'accident vasculaire. La seconde complication est la conséquence d'une évolution beaucoup plus rapide de la plaque qui aboutit à la rupture de l'endothélium vasculaire. La brèche ainsi formée est colmatée par l'agrégation de plaquettes sanguines et conduit à la formation d'un caillot. Ce caillot peut obstruer l'artère localement, ou se détacher et bloquer un autre vaisseau situé en aval. Plus rarement, la plaque peut libérer son contenu et provoquer une embolie de cholestérol.

Parmi les facteurs pouvant initier la formation d'une plaque d'athérome, l'accumulation locale de LDL (Low Density Lipoprotein) semble être la plus critique. Suivant un cercle vicieux, le dépôt de LDL perturbe le flux sanguin et entraîne le recrutement de monocytes. Ceux-ci se différencient en macrophages qui, en se chargeant de LDL, deviennent spumeux⁴⁶. Mécaniquement, la croissance progressive de la plaque lui permet d'accumuler de plus en plus de LDL circulant si aucune modification de régime n'est effectuée (Figure I.9). De manière anecdotique, il est intéressant de noter que l'athérosclérose n'est pas l'apanage de nos sociétés modernes enrichies : des liaisons coronaires ont ainsi été retrouvées sur une momie vieille de plus de 3500 ans, celle de la princesse égyptienne Ahmose-Meryet-Amon⁴⁷.

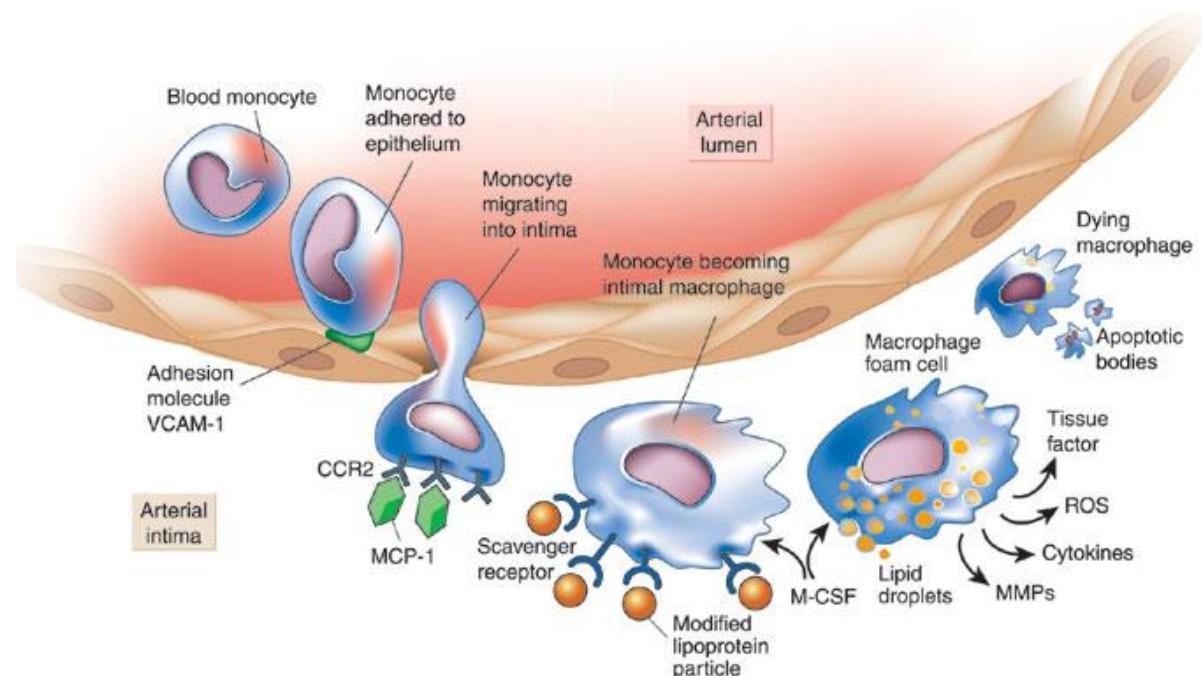


Figure I.9 : Progression de la plaque d'athérome

Adapté de Libby P., 2002⁴⁸.

L'ensemble des cellules présentes dans ou au contact de la plaque en formation – macrophages, cellules spumeuses, cellules vasculaires musculaires lisses – sont susceptibles de sécréter des MMP. Celles-ci participent collectivement au remodelage tissulaire nécessaire à la progression de la plaque, à la mobilisation de facteurs de croissance et inflammatoires, et *in fine* à la rupture de la plaque. Dans un processus ambivalent (également souvent observé dans la progression tumorale), certaines MMP semblent favoriser la croissance de la plaque, tandis que d'autres présentent une action protectrice qui limite sa progression. Ce rôle peut évoluer en fonction du temps ce qui complique mécaniquement toute action thérapeutique⁴⁹.

Pour sa part, la MMP-12 est considérée comme un agent aggravant qui favorise la rupture de la plaque d'athérome. En particulier, des souris doubles KO pour l'apolipoprotéine E et la MMP-12 (ApoE^{-/-} MMP-12^{-/-}) soumises à un régime hyperlipidique présentent des plaques plus stables et dont la croissance est significativement ralentie par rapport aux souris contrôle (ApoE^{-/-})⁴⁹. Cette observation suppose que la MMP-12 participe activement à l'élaboration de la plaque, un rôle éloigné de l'hypothèse de simple dégradation des tissus à l'origine de la rupture de la plaque. Cette même étude rapporte l'effet antagoniste des MMP-3 et 9. Les souris mutées pour chacune de ces MMP (en plus d'ApoE) développent des plaques plus rapidement que les animaux contrôle. On voit donc clairement que malgré leur proximité structurale toutes les MMP ne jouent pas un rôle équivalent dans le cadre d'une pathologie donnée. Ici, la MMP-12 se présente comme une cible thérapeutique intéressante tandis que les MMP-3 et 9 sont des anti-cibles dont l'inhibition serait préjudiciable. D'autres études, également sur des modèles murins, associent l'invalidation de la MMP-12 à une diminution de la

dégradation de l'élastine et des couches fibreuses enfouies de la plaque athéromateuse⁵⁰. Ce faisceau de présomptions est renforcé par deux autres études, chez le lapin cette fois. Dans la première, une sur-expression de la MMP-12 humaine dans les macrophages de lapins transgéniques conduit à l'augmentation de la taille des plaques d'athérome, et à l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Les auteurs suggèrent là que la MMP-12 assure le recrutement de macrophages dans la plaque⁵¹. La deuxième étude démontre l'enrichissement relatif des cellules spumeuses en MMP-12 à un stade tardif de leur maturation.⁵²

Chez l'homme, il n'existe pas encore de lien strictement établi entre la sur-expression de la MMP-12 et une aggravation du développement de l'athérosclérose. Tout un faisceau d'évidences se met en revanche en place, et corrèle la présence de MMP-12 dans des plaques au phénotype instable, à un stade avancé de la maladie^{53,54,55}.

Participation aux mécanismes de défense immunitaire

Nous avons vu dans les parties précédentes le rôle extensif joué par les MMP dans les pathologies inflammatoires. Dans ces conditions, leur implication dans les processus immunitaires n'est pas surprenante.

La réponse immunitaire innée passe en premier lieu par le recrutement des cellules de défense de l'organisme, dont font partie les macrophages. Un modèle de souris mutées pour la MMP-12 (MMP-12^{-/-}) montre que l'implantation intrapéritonéale d'éponges contenant du matrigel (une substance à même d'induire une inflammation locale) n'est pas suivie du recrutement de macrophages, contrairement à ce que l'on observe chez les animaux contrôle. L'invasion d'un tissu inflammé par les macrophages requiert donc la présence de MMP-12⁵⁶, ce qui consacre son rôle dans les processus immunitaires innés. Il faut toutefois noter que seuls les macrophages sont affectés par le *knock-out* de la MMP-12. Les monocytes, cellules précurseurs des macrophages, n'expriment pas la MMP-12 mais d'autres protéases à sérine (dont l'activité est d'ailleurs perdue lors de la différentiation en macrophage) ce qui explique qu'ils migrent normalement chez les souris MMP-12^{-/-}.

Le domaine hémopexine de la MMP-12 joue également un rôle clef dans l'action antibactérienne organisée par l'organisme en cas d'infection. Une étude conduite par le groupe de Shapiro en 2009 a permis d'attribuer une activité antibactérienne à ce domaine qui est par ailleurs clivé lors de l'activation de la MMP-12. Dans un premier temps, l'étude rapporte ainsi une clairance bactérienne et un taux de survie réduits chez les souris MMP-12^{-/-} infectées par *S. aureus*. De façon intéressante, la présence du seul domaine hémopexine suffit alors pour que les animaux traités se débarrassent du pathogène.

Cette activité antibactérienne a pu être réduite à la présence d'une courte séquence KD(D/E)K présente de manière consensuelle chez les MMP-12 de différentes espèces (lapin, rat, souris, homme), mais absente des autres MMP. La synthèse de MMP-12 murine recombinante dans laquelle la séquence KDEK est mutée en SGRQ (la séquence retrouvée chez la MMP-9 dans une position équivalente) a permis de montrer le caractère essentiel de ces quatre résidus dans la lyse bactérienne⁵⁷. Cette séquence est située sur la boucle β 2 β 3 qui connecte les deux feuillets centraux (2 et 3) du domaine hémopexine (Figure I.10).

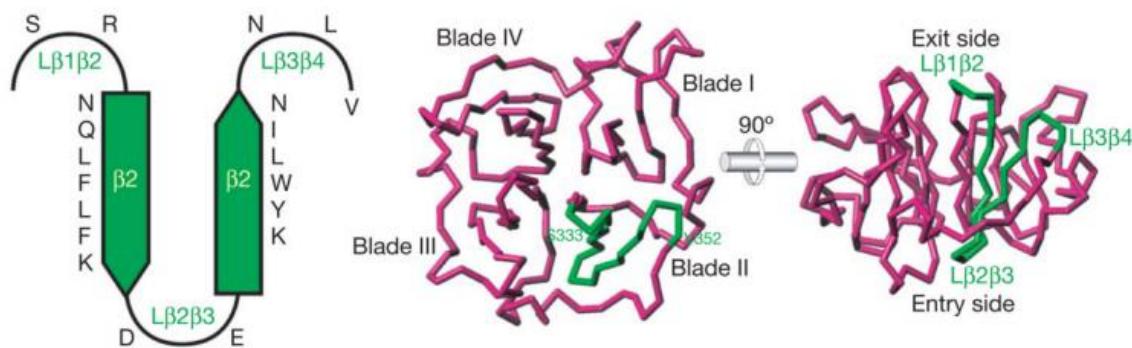


Figure I.10 : Séquence KD(D/E)K antibactérienne

Tiré de Houghton, et al., 2009⁵⁷.

La MMP-12 est ainsi capable de jouer sur deux leviers de la réponse immunitaire antibactérienne : le recrutement de macrophages *in situ* et la lyse de ces bactéries, à l'intérieur du macrophage et non dans la matrice. Dans cette fonction, la perte du domaine hémopexine après activation de l'enzyme peut se comprendre facilement : sa libération lui permettant de jouer son rôle bactéricide.

Le cas des défenses antivirales était jusqu'en Mai 2014 assez peu exploré et aucune activité MMP n'avaient alors été formellement identifiée dans ce cadre. L'équipe d'Overall a cependant mis en évidence dans un article paru dans *Nature Medicine*⁴⁴ le rôle essentiel de la MMP-12 dans la sécrétion de l'interféron- α (IFN- α) par les cellules infectées. Dans cette étude les auteurs montrent que les animaux MMP-12^{-/-} ont une charge virale systémique et une morbidité plus élevées que les contrôles. De manière originale, la MMP-12, sous sa forme zymogène ou catalytique, introduite dans le milieu de culture de fibroblastes murins ou de cellules HeLa se retrouve dans le noyau cellulaire suggérant un rôle de facteur de transcription. Dans les cellules infectées par le virus, après relocalisation dans le noyau, la liaison du domaine catalytique de la MMP-12 à la séquence promotrice du gène codant pour I κ B α permet la sécrétion de l'IFN- α , un acteur essentiel des processus immunitaires qui inhibe la réplication virale et initie la dégradation de certaines protéines virales. Dans ce cadre, la MMP-12 se comporte comme un acteur central de la réponse inflammatoire en stimulant la production d'I κ B α et donc la

sécrétion d'IFN- α . Les auteurs démontrent également un intéressant phénomène de rétrocontrôle négatif : une fois secrété dans la circulation, l'IFN- α est dégradé par la MMP-12 extracellulaire, ce qui permet de limiter la toxicité systémique de l'IFN- α (Figure I.11). Ainsi, l'infusion de l'inhibiteur RXP470.1 (sélectif de la MMP-12) à des souris infectées par un virus entraîne une élévation des taux circulant de l'IFN- α grâce à l'inhibition de la MMP-12 et permet donc ainsi aux souris de se débarrasser plus rapidement de la charge virale.

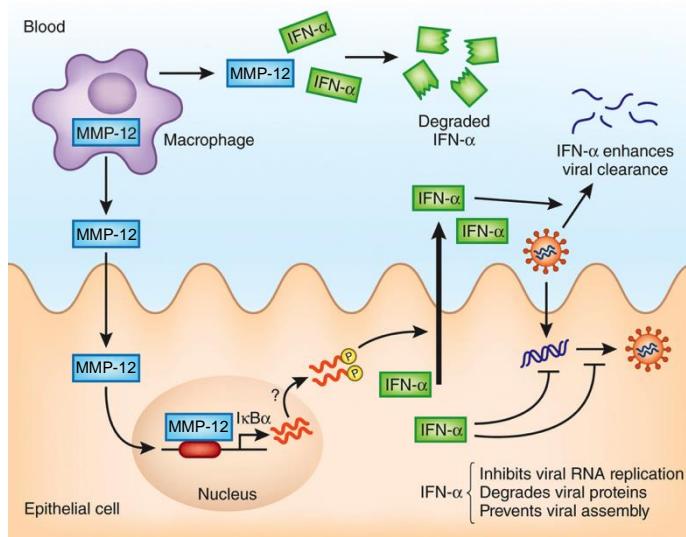


Figure I.11 : La MMP-12, facteur de transcription pro-inflammatoire et agent protéolytique

Tiré de *Dandachi and Shapiro, 2014*⁵⁸.

Tous ces exemples illustrent la variété des fonctions dans lesquelles une MMP particulière peut être impliquée, et démontrent la nécessité de continuer à examiner de façon critique le rôle de ces protéases. Cette complexité indique que l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs de MMP nécessite de disposer de composés très sélectifs et ce afin d'éviter de bloquer des MMP dont la fonction, dans la pathologie d'intérêt, serait opposée à celle de la cible. Cependant, même avec des inhibiteurs très sélectifs, leur utilisation ne pourra se concevoir que dans un contexte pour lequel les diverses activités de la MMP ciblée ont été préalablement établies. A la complexité des MPP s'ajoute la notion que les protéases (286 exprimées chez l'homme) agissent en réseau. L'effet et les impacts thérapeutiques de l'inhibition d'une protéase dans ce contexte sont donc extrêmement difficiles à rationaliser. Une meilleure compréhension de ces processus passe par le développement de nouvelles approches expérimentales cherchant à analyser de façon extensive les répercussions de l'inhibition de chaque protéase sur le protéome (variation des N-terminomics) et sur d'autres phénomènes plus intégrés comme la réponse inflammatoire au niveau moléculaire et cellulaire.

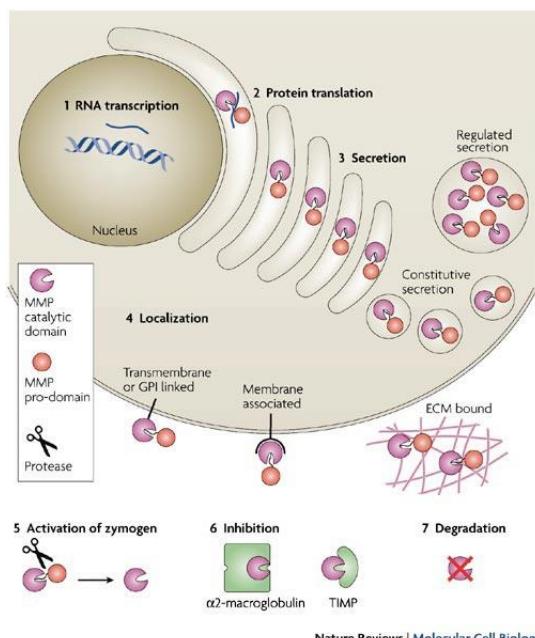
II. Régulation de l'activité protéolytique des MMP

II. A. Activation et régulation *in vivo* des MMP

La nature même de l'activité des MMP, un acte protéolytique irréversible, fait de ce groupe de protéines un ensemble finement régulé. L'alternance et la diversité des différents domaines structuraux décrits précédemment (Chapitre I.I. B. a) participent directement de cette régulation à la fois temporelle et spatiale (Figure I.12).

Une première régulation temporelle intervient dès les phases de transcription et de traduction des ARN messagers *via* des cascades de signalisation précises et elles-mêmes finement contrôlées. Par exemple, certaines MMP dépendent uniquement de promoteurs simples et sont produites de manière constitutive. D'autres MMP ont un environnement génique beaucoup plus complexe qui module leur expression en fonction du contexte biologique de la cellule.

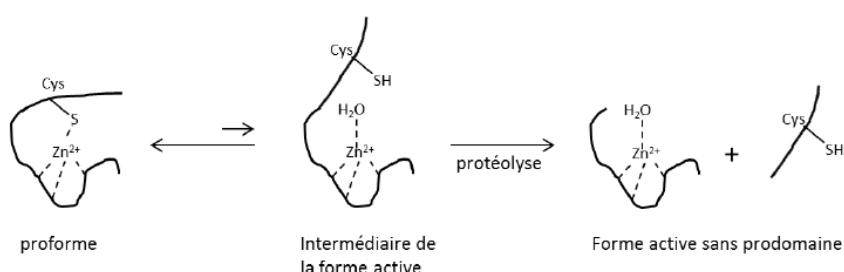
Une fois les conditions nécessaires à la synthèse de ces protéases réunies, celles-ci sont produites sous forme de zymogène communément désigné sous le terme de « pro-MMP ». A ce stade, les MMP sont inactives du point de vue de leur activité catalytique, mais certaines sont néanmoins capables de participer à quelques mécanismes biologiques⁵⁹. C'est le cas par exemple de MT1-MMP dont le rôle dans le contrôle de la morphologie et de la motilité de certains progéniteurs de la moelle osseuse ne dépend pas de son activité catalytique⁶⁰. Le peptide signal se charge alors d'adresser les pro-MMP, soit vers le cytoplasme, soit à l'extérieur de la cellule. Dans le cas d'une sécrétion extracellulaire, les zymogènes sont pris en charge par des vésicules de sécrétion et déversés dans l'espace péricellulaire. Un deuxième niveau de contrôle temporel intervient à ce moment : la sécrétion vésiculaire pouvant être constitutive ou régulée. Selon leurs caractéristiques, les pro-MMP traversent ou sont adsorbées à la membrane (respectivement les MT-MMP et MMP avec un domaine GPI), ou sont simplement libérées dans l'espace extracellulaire où elles peuvent interagir avec d'autres protéines matricielles. Cet adressage différentiel constitue une première forme de régulation spatiale (Figure I.12).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure I.12 : Mécanismes de régulation des MMPTiré de Page-McCaw, et al., 2007²².

Tant que les MMP sont sous forme de zymogène, l'atome de zinc catalytique est coordonné par les histidines du domaine catalytique (Chapitre I.I. B. b) et par la cystéine de la séquence consensus PRCG(V/N)PD du prodomaine *via* son atome de souffre. Dans cette situation, le positionnement du prodomaine empêche tout accès au site actif. La déstabilisation des interactions entre le prodomaine et le domaine catalytique peut intervenir selon deux mécanismes distincts (Figure I.13). Une première méthode consiste à cliver directement le prodomaine en plusieurs points de manière à libérer rapidement l'atome de zinc de son interaction avec la cystéine et déstabiliser ainsi l'interaction entre le prodomaine et le domaine catalytique⁶¹. La deuxième méthode passe par l'oxydation ou l'alkylation de la cystéine qui coordonne le zinc catalytique par de petites molécules endogènes. L'ensemble ainsi déstabilisé facilite l'élimination du prodomaine par différentes protéases. Dans certains cas, les pro-MMP peuvent également subir des modifications post-traductionnelles à même de déstabiliser l'interaction prodomaine-domaine catalytique.

**Figure I.13 : Mécanisme d'activation des MMP, « cystein switch »**Tiré de Springman, et al., 1990⁶².

L'acte protéolytique libérant le site actif peut-être effectué par la MMP elle-même (on parle d'autolyse), ou d'autres protéases présentes localement. Ces agents d'activation, dont l'identité varie en fonction du contexte tissulaire, sont eux-mêmes soumis à une régulation spatiale et temporelle qui participe au contrôle coordonné de l'activité des MMP.

L'activation des MMP peut également se produire dans l'espace intracellulaire^{63,64}. Les MMP possédant le motif de reconnaissance par la furine RX(K/R)R sont ainsi généralement activées par la furine, une protéase à sérine de l'appareil de Golgi.

Ce n'est qu'une fois activées que les MMP sont capables d'exercer l'étendue de leurs capacités protéolytiques. Les MT-MMP et celles possédant un domaine GPI fonctionnent évidemment à la surface de la cellule mais d'autres MMP peuvent interagir avec des récepteurs membranaires et donc également exercer leur activité dans l'espace péricellulaire proche. La MMP-2 interagit ainsi grâce à son domaine hémopexine avec un récepteur de type intégrine.

A l'exception notable des matrilysines (MMP-7 et 21) et de la MMP-23, toutes les MMP sont sécrétées avec un domaine hémopexine qui participe également à la régulation de l'activité protéolytique des MMP. Ce domaine intervient à double titre dans la spécificité de fixation du substrat et des TIMP, les inhibiteurs endogènes des MMP⁶⁵. Dans le cas spécifique des collagénases, on suppose que ce domaine permette de déstabiliser la triple hélice du collagène natif. Cette étape est un prérequis nécessaire à l'hydrolyse complète du collagène. En complément, la longueur de la région charnière qui relie les domaines catalytique et hémopexine varie d'une MMP à l'autre. Ces variations influencent directement la mobilité relative de ces deux domaines, ce qui a pour conséquence de moduler l'activité et la spécificité des MMP pour leurs substrats⁶⁶.

II. B. Inhibiteurs naturels

Plusieurs mécanismes peuvent limiter voire supprimer l'activité protéolytique des MMP *in vivo* :

- une inhibition par l'interaction de leurs inhibiteurs endogènes les TIMP,
- une inactivation *via* l'interaction d'autres inhibiteurs naturels comme l'α-macroglobuline ou la glycoprotéine RECK (REversion-inducing Cystein-rich protein with Kazal motif)⁶⁷,
- une inactivation oxydative médiée par la production d'acide hypochloreux (HOCl) des phagocytes⁶⁸,
- une inactivation spatiale induite par des mécanismes d'endocytose⁶⁹.

Les TIMP forment chez l'homme une famille restreinte à quatre membres (TIMP-1, 2, 3 et 4) capables d'interagir collectivement avec l'ensemble des MMP. Ils bloquent l'accès au site catalytique des métalloprotéases en formant avec elles un complexe stoechiométrique réversible. A titre d'exemple, le TIMP-1 présente deux ponts disulfures sur son segment N-terminal. Celui-ci interagit avec le site actif de sa cible en chélatant l'atome de zinc catalytique grâce à son atome d'azote N-terminal et le carbonyle de la Cystéine 1. La position du TIMP-1 est stabilisée grâce à un réseau de liaisons hydrogènes établies avec la métalloprotéase inhibée (Figure I.14). Il convient de souligner que les TIMP ne sont pas des inhibiteurs spécifiques des MMP et sont capables d'interagir avec d'autres metzincines structurellement proches des MMP comme les ADAM⁷⁰.

De manière assez intéressante, le TIMP-2 est capable de fixer la forme latente de la MMP-2 afin de faciliter son activation par la MMP-14. Des études ont également rapporté la formation de complexes pro-MMP-9/TIMP-1 dont la fonction est toujours inconnue⁷¹.

L'inactivation des MMP par l'α-macroglobuline est en revanche un phénomène irréversible. L' α-macroglobuline présente sur sa surface un long segment qui est la cible de nombreuses coupures par les protéases circulantes. Le clivage de ce fragment entraîne des changements conformationnels aboutissant à bloquer la protéase dans un environnement protéique favorisant la formation de liaisons covalentes entre celle-ci et l'α-macroglobuline⁷². Le complexe est ensuite interné par endocytose pour achever d'être dégradé. Les voies d'inactivation par oxydation sont elles aussi irréversibles et entraînent la lyse des MMP affectées.

On voit ici que l'activité protéolytique des MMP est extrêmement régulée *in vivo*. La chaîne complexe de réactions qui aboutit à l'activation ou la dégradation de ces protéases ne souffre aucun dérèglement sous peine de conduire à l'apparition de différentes activités protéolytiques anarchiques et potentiellement pathologiques.

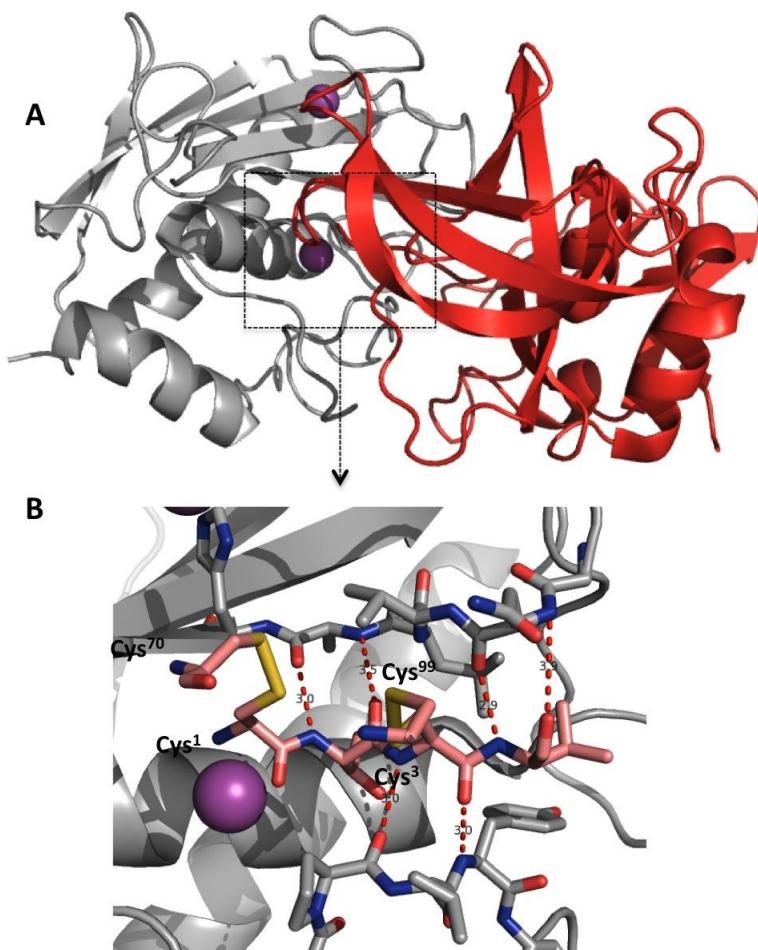


Figure I.14 : Structure cristallographique de la MMP-3 en interaction avec le TIMP-1

Code PDB : 1UEA

A. Vue générale

B. Détail du réseau de liaisons hydrogènes établies par le TIMP-1

II. C. Inhibiteurs synthétiques

II. C. a. Historique

Depuis le début des années 90, où le batimastat était le premier inhibiteur de MMP à visée thérapeutique été testé cliniquement, de nombreuses études se sont attachées à tenter de découvrir et développer de nouvelles familles d'inhibiteurs synthétiques des MMP. Plusieurs molécules aux profils pharmacologiques acceptables ont ainsi été cliniquement testées, principalement dans le cadre de pathologies inflammatoires, cancéreuses ou cardiovasculaires. L'énorme majorité d'entre elles ont révélé, à l'instar du batimastat et du marimastat, un profil d'inhibition large spectre affectant de nombreuses métalloprotéases⁷³. La conséquence directe de ces mauvais profils de sélectivité a été l'échec retentissant des essais cliniques engagés. Une hypothèse raisonnable expliquant la difficulté à cibler spécifiquement une MMP s'appuie sur les fortes similitudes topologiques entre métalloprotéases

matricielles et, plus largement, entre metzincines (Chapitre I.I. B. b). A ce jour, aucune des molécules brevetées ces dix dernières années ne s'est révélée capable, en clinique, d'inhiber sélectivement une MMP en particulier⁷⁴. En outre, seule la doxycycline, un antibiotique large spectre développé par Pfizer en 1967, a été autorisée par la FDA dans le traitement des infections parodontales⁷⁵. Le défi reste donc l'identification de composés sélectifs et leur optimisation clinique pour limiter tout effet secondaire indésirable.

D'après Whittaker, et al.,¹⁷, l'affinité des inhibiteurs de MMP peut être décomposée selon trois axes :

- la mise en place d'un réseau de liaisons hydrogènes et d'interaction de type van der Waals afin d'optimiser le positionnement de l'inhibiteur,
- la présence d'un groupement chélatant capable de coordonner efficacement l'atome de zinc catalytique,
- la présence d'un ou plusieurs groupements hydrophobiques capables de s'insérer dans la boucle de sélectivité S_1' .

Ces règles ont conduit à définir trois familles principales d'inhibiteurs selon leur mode de liaison au site actif.

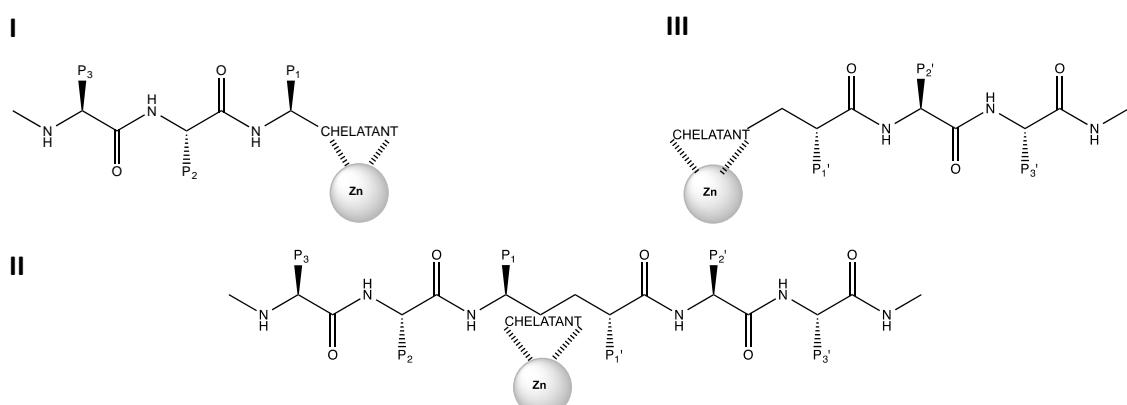


Figure I.15 : Structure générale des trois familles d'inhibiteurs de MMP

L'atome de zinc catalytique est représenté par une sphère grise.

L'exploitation des données structurales obtenues par cristallographie et RMN a conduit à séparer les MMP en trois classes selon la profondeur et la flexibilité de leur boucle S_1' . L'introduction de longues chaînes hydrophobes en position P_1' a ainsi permis, en toute logique, d'exclure des profils de sélectivité les MMP-1 et 7 (classe 3) dans la plupart des cas. La plasticité de la boucle de sélectivité vient pourtant bouleverser ce paradigme. La réorientation du résidu 214 (respectivement une arginine et une tyrosine chez les MMP-1 et 7) de manière à augmenter le volume de la cavité S_1' observée dans certains cas, remet en cause les conclusions précédentes^{14,76}. La dynamique de la boucle S_1' reste de manière

générale difficile à appréhender tant *in vitro* qu'*in silico*^{76,77,78}. Dans ces conditions, il apparaît comme tout aussi critique de disposer de données détaillant les relations structure-activité d'une large gamme d'inhibiteurs que d'explorer l'ensemble des motifs capables de chélater le zinc catalytique.

II. C. b. Une première génération puissante mais peu sélective

Les premiers inhibiteurs de MMP utilisés cliniquement ont largement surfé sur le succès des inhibiteurs de la protéase du VIH et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)¹⁴. Ces molécules reposaient sur différents groupements capables de chélater le zinc catalytique de l'ACE mais, étonnamment, le motif acide hydroxamique, pourtant très puissant, n'avait pas été exploité. Son utilisation dans la structure d'inhibiteurs de MMP a ainsi permis de contourner les brevets déposés sur les inhibiteurs de l'ACE. Cette opportunité a cependant impacté la majorité de cette première génération d'inhibiteurs de MMP qui s'est ainsi avérée certes puissante mais peu sélective. Par ailleurs, l'instabilité du groupe hydroxamate a requis d'intenses efforts afin de limiter l'hydrolyse rapide de cette fonction *in vivo*.

La famille I présentée ci-dessus n'explore que les sites dits « non-primes » du site actif et ne présente que peu de ligands et d'inhibiteurs. La famille III, qui s'intéresse aux sites primés, a en revanche été beaucoup plus exploitée. Une sous famille peut d'ailleurs être définie : celle où seul le sous-site S_{1'} est exploré (généralement par une chaîne hydrophobe en P_{1'}). Dans cette série, l'essentiel des molécules de première génération incorporaient dans leur structure une séquence peptidique reconnue par les MMP et associée à un groupement hydroxamate. L'exploitation de cette série a conduit à l'identification de nombreux inhibiteurs très puissants, à l'image de la galardine (Figure I.16), mais incapables de discriminer entre les MMP et d'autres métalloprotéases de la famille des ADAM et ADAM-TS. L'utilisation *in vivo* de ces inhibiteurs a rapidement permis de constater une forte sensibilité à l'hydrolyse de la fonction hydroxamate. En outre la présence de nombreuses liaisons peptidiques sur la chaîne d'acides aminés en position prime les rendaient particulièrement sensibles à la dégradation non spécifique par différentes protéases. Leur utilisation clinique a par ailleurs conduit au développement de troubles musculo-squelettiques chez les patients traités, un effet secondaire particulièrement handicapant et qui reste actuellement l'un des enjeux majeurs du design d'inhibiteurs de MMP.

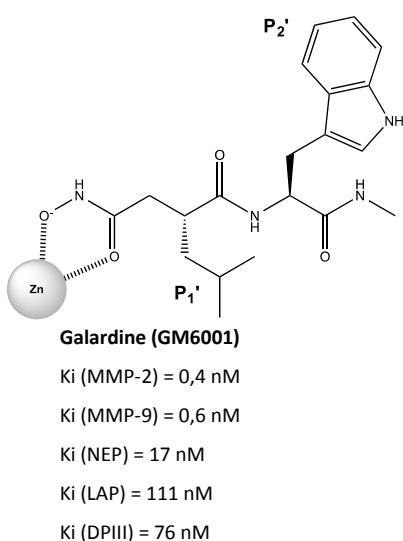


Figure I.16 : Mode de chélation de l'ion zinc par un groupement hydroxamate, exemple de la galardine

II. C. c. Une seconde génération qui s'affranchit des résidus peptidiques

Pour pallier à l'excessive dégradation *in vitro* des inhibiteurs de première génération, une deuxième génération dépourvue de résidus peptidiques est apparue dans la littérature. Cette série, comme la précédente a surtout développé des inhibiteurs de la famille III, c'est à dire explorant les sous-sites primés. Certains de ces composés ont incorporé des cycles contraints et volumineux pour stabiliser le groupement hydroxamique et favoriser l'enfoncement de leur chaîne hydrophobe en P_{1'} dans la cavité S_{1'}. En particulier, les groupements sulfone et sulfonamide (-S(=O)₂-NR₁R₂) ont été largement exploités pour leur stabilité face aux réactions de protéolyse *in vivo*. Une autre particularité de ces groupements, révélée grâce aux avancées de la cristallographie, est la capacité de l'un des oxygènes liés à l'atome de souffre d'engager une liaison hydrogène à l'entrée de la cavité S_{1'} (résidu Leu¹⁸¹ chez la MMP-12). Cette liaison permet de positionner précisément l'inhibiteur qui peut alors projeter sa chaîne P_{1'} dans la poche S_{1'} (Figure I.17).

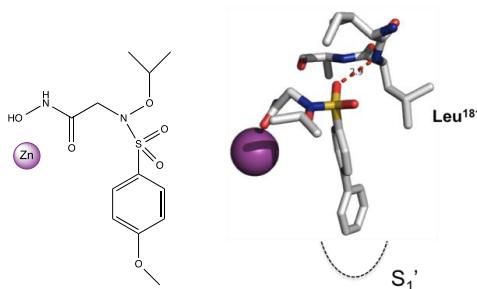


Figure I.17 : Inhibiteur de MMP présentant une fonction carboxylate doublée d'un groupement sulfonamide en complexe avec la MMP-12

Code PDB : 4H76

En rouge, liaison hydrogène à l'entrée de la cavité S_{1'} de la MMP-12, en magenta, zinc catalytique.

Cette deuxième génération, principalement portée par un groupement hydroxamate a permis une première exploration de la poche S_1' avec le développement de chaînes en P_1' plus ou moins longues, plus ou moins volumineuses, et plus ou moins hydrophobes. Malheureusement, ces recherches se sont heurtées à la plasticité de la boucle S_1' déjà évoquée précédemment.

Finalement, malgré des efforts considérables dédiés à la recherche d'une grande diversité moléculaire notamment en position P_1' , la plupart des inhibiteurs dits de deuxième génération se sont révélés, comme ceux de la première génération, être des inhibiteurs certes puissants mais peu sélectifs. Des études ultérieures ont montré que certains de ces composés étaient par ailleurs extrêmement affins pour des métalloprotéases comme la NEP (Nuclear Export Protein) dont le site actif est pourtant très différent de celui, canonique, des MMP⁷⁹.

Suite à ce nouvel échec et devant l'écueil présenté par la dynamique de la boucle S_1' , un nouveau paradigme est apparu. Les différents groupes à l'œuvre se sont ainsi attachés à utiliser de nouveaux groupements chélatants moins puissants⁸⁰. L'idée de départ repose sur le postulat que les fonctions hydroxamate sont extrêmement avides pour le zinc. Cette avidité rendrait alors négligeable l'optimisation du réseau de liaison hydrogène et électrostatique entre l'inhibiteur et sa cible. En réduisant la puissance relative du groupement chélatant, on augmente mécaniquement le poids des autres interactions susceptibles d'introduire plus de sélectivité.

II. C. d. Une troisième génération d'inhibiteur où l'on sort du paradigme de l'hydroxamate

L'apparition de nouveaux groupements chélatant s'est rapidement accompagnée de l'identification d'inhibiteurs bien plus sélectifs. De manière non exhaustive, des groupes carboxylates, phosphinates ou encore pyrimidine-trione ont ainsi été développés (Figure I.18). Certaines équipes ont également développé des inhibiteurs capables de se positionner efficacement dans le site actif des MMP sans groupement chélatant.

L'introduction de cette nouvelle diversité s'est appuyée sur des calculs quantiques réalisés sur la base des données structurales disponibles et qui avaient alors prédit des différences d'avidité pour l'ion zinc en fonction du groupement chélatant utilisé. Les fonctions carboxylates et phosphinates qui vont nous intéresser dans la suite de ce travail sont ainsi des chélatants relativement faibles de l'ion zinc. Cette vision est soutenue par des observations structurales qui suggèrent que les fonctions carboxylate et phosphinate sont des ligands monodentates de l'ion zinc alors que les hydroxamates se comportent de manière bidentate, ce qui doit théoriquement stabiliser son interaction avec le zinc catalytique.

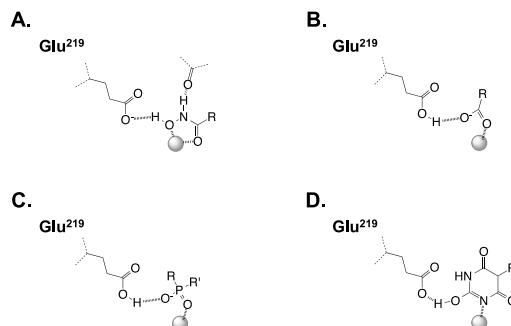


Figure I.18 : Exemples de groupes chélatants utilisés dans le développement d'inhibiteurs de MMP

L'atome de zinc catalytique est représenté sous forme de sphère grise.

A. Groupement hydroxamate **B.** Groupement carboxylate **C.** Groupement phosphinate

D. Groupement pyrimidine trione

De façon intéressante, dans le cas d'autres métalloprotéases comme l'ACE, les inhibiteurs hydroxamate ne se sont pas forcément montrés plus puissants que leurs analogues carboxylate ou phosphinate. Ces métalloprotéases ont par définition un site actif différent de celui des MMP et l'on peut concevoir que l'environnement du zinc catalytique ait son importance dans la mise en place d'un mode de chélation optimal. Il est également possible que, dans ces environnements, le poids des autres liaisons (hydrogène, van der Waals, ...) soit suffisamment élevé pour pondérer celui du groupement chélatant. Dans cet esprit, il est intéressant de comparer le mode de chélation d'un acide hydroxamique simple à celui d'un inhibiteur plus complexe intégrant un groupement hydroxamate. Par hypothèse, le positionnement de l'acide hydroxamique simple peut être considéré comme idéal car non contraint par le reste de la molécule. Lorsque le groupement hydroxamate fait partie d'une molécule plus complexe, on peut ainsi observer un basculement de la pince hydroxamate (Figure I.19).

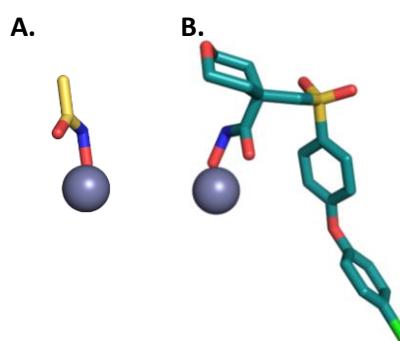


Figure I.19 : Différences du mode de liaison au zinc de l'acide hydroxamique seul (A) ou intégré dans un inhibiteur (B)

Codes PDB : 2OW9 (A) et 830C (B)

Structures obtenues en interaction avec la MMP-13.

Ce repositionnement traduit l'accommodation du reste de l'inhibiteur au site actif. Par cet exemple, on comprend que l'installation d'un inhibiteur dans le site actif de sa cible résulte d'un compromis

supposé optimal. Ce compromis permet l'accommodation relative de chaque partie de l'inhibiteur à son environnement. Dans le cas des inhibiteurs à hydroxamate, on peut supposer que le compromis se fait en faveur de la pince à zinc et donc au détriment du reste de l'inhibiteur. Dans cet esprit, l'utilisation de pinces à zinc moins avides permet théoriquement d'augmenter le poids relatif de l'ensemble de l'inhibiteur et donc de s'affranchir, dans une certaine mesure, de celui du groupement chélatant. On peut ainsi citer deux inhibiteurs de MMP possédant respectivement un motif carboxylate ou pyrimidine trione, une longue chaîne hydrophobe en P_1' , et qui présentent chacun des profils de sélectivité favorables vis à vis des MMP-12 et 13 (Figure I.20).

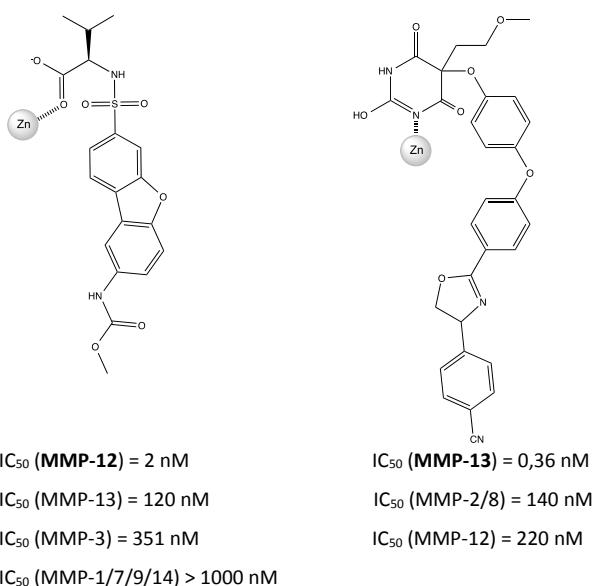


Figure I.20 : Structures et profils de sélectivité de deux inhibiteurs de troisième génération

L'atome de zinc catalytique est représenté sous forme de sphère grise.

Dans ce contexte, il est tentant de chercher à reproduire les approches utilisées dans le développement des inhibiteurs de la protéase du HIV, et qui avaient alors permis de faire émerger de nouvelles générations d'inhibiteurs aux profils résolument enthalpiques. Dans le cas des inhibiteurs de MMP, différentes équipes ont ainsi cherché à introduire une grande diversité de fonctions pour générer de l'enthalpie. Malheureusement cette relation de cause à effet n'est pas triviale, et le lien entre la structure de différents inhibiteurs et les variations d'enthalpie que leur liaison engendre n'est pas univoque. Dans une étude parue en 2007, l'équipe de Bertini analyse ainsi les profils thermodynamiques de la liaison de seize inhibiteurs issus d'une même série à la MMP-12⁸¹. Si certaines conclusions en termes de relation structure-affinité peuvent être tirées sur la base d'une comparaison stricte entre inhibiteurs structurellement proches, ce n'est absolument pas le cas concernant la répartition entre enthalpie et entropie. Ce manque de prédictibilité repose principalement sur des phénomènes de compensation entre enthalpie et entropie dont on ne peut, à l'heure actuelle, que constater les effets.

A ces considérations structurales s'ajoute une observation à ne pas négliger : l'implication probable d'un proton pour former une liaison hydrogène entre le glutamate catalytique (Glu²¹⁹ chez la MMP-12) et l'un des hétéroatomes du motif chélatant^{82,83}. A pH physiologique, ce carboxylate dont le pKa théorique se situe entre 4 et 6 est sous forme ionisée. L'insertion d'un inhibiteur dont la pince à zinc est ionisée s'accompagne ainsi nécessairement d'une prise de protons depuis l'environnement local, et ce afin de neutraliser l'affrontement de deux charges négatives, comme l'ont montré de récentes études de calorimétrie^{82,84}. A l'inverse, le motif hydroxamique, dont le pKa est élevé (autour de 9 théoriquement) est déjà protoné à pH neutre. Il apporte donc directement le proton nécessaire sans qu'il soit besoin de l'arracher au solvant (Figure I.18). Cette différence de comportements doit nécessairement avoir des répercussions énergétiques et donc se traduire en termes d'affinité. A notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude, assez ancienne, qui compare strictement une série d'inhibiteurs possédant différents groupement chélatant du zinc⁸⁵, mais celle-ci ne s'intéresse pas à ces considérations énergétiques. Les répercussions de ces phénomènes de protonation, et notamment leur importance dans le cadre de pathologies susceptibles de modifier le pH tissulaire local, seront ainsi discutées un peu plus loin. En revanche, il est plus difficile d'anticiper l'évolution du profil de sélectivité en fonction du pH car la formation du couple enzyme-inhibiteur est susceptible d'impliquer d'autres groupements ionisables.

III. Importance des effets de protonation lors de l'interaction protéine-ligand

Les mécanismes de reconnaissance entre un ligand et sa cible sont essentiels à de nombreuses fonctions biologiques telles que la traduction du signal intracellulaire, la régulation de l'expression génique, ou le bon fonctionnement du système immunitaire⁸⁶. La compréhension des phénomènes physiques et chimiques qui régulent ces interactions est un prérequis indispensable à de nombreuses applications industrielles et académiques qui vont de la conception de molécules médicamenteuses à la mise en place d'outils de diagnostic moléculaire, en passant par la formulation de produits d'hygiène ou de boissons énergisantes (Figure I.21).

De très nombreuses études se sont ainsi déjà attachées à décrire l'importance de la complémentarité structurale dans le design de ligands actifs⁸⁷. Pourtant, bien qu'il ait déjà été démontré que la modification des charges ioniques à l'interface entre protéine et ligand permet de moduler son affinité⁸⁸, relativement peu d'études s'attachent à détailler l'origine moléculaire et l'amplitude des phénomènes d'ionisation couplés à une interaction protéine-ligand.



Figure I.21 : Importance des états de protonation

Adapté de Petukh, et al., 2013⁸⁹.

Sans chercher à être exhaustif, cette dépendance au pH devient particulièrement intéressante dans le contexte biologique où chaque tissu, chaque type cellulaire, et chaque compartiment fonctionnent à un pH particulier⁹⁰. Un cas concret de l'adaptation des protéines à un pH dit non physiologique est illustré par certaines cellules immunocompétentes. Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles et les monocytes produisent en effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui acidifient le milieu⁹¹. Ce changement de pH est utilisé comme arme contre les espèces pathogènes, mais ne nuit pas à l'activité des protéines exprimées à la surface des cellules immunitaires. L'activité de phagocytose des pathogènes passe ainsi par un mécanisme de reconnaissance cellulaire qui est directement affecté par l'acidification de leur environnement. Ce phénomène, clairement dépendant du pH, est rendu possible par des modifications locales de pKa au sein de la protéine.

La modulation de l'affinité de ligands d'intérêt en fonction du pH trouve tout son intérêt dans le diagnostic et le traitement des tumeurs. Parolini, et al.,⁹² ont ainsi montré qu'un pH abaissé constituait un marqueur du caractère malin des tumeurs. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées sur la base de ces différences de pH local. Par exemple, des micelles et des nanogels sensibles au pH ont été formulés pour cibler spécifiquement l'environnement extracellulaire légèrement acidifié des tumeurs solides⁹³. Une autre étude a combiné l'utilisation de peptides capables de cibler certaines tumeurs à des micelles elles-mêmes sensibles au pH⁹⁴ (Figure I.22). Ces micelles se désassemblent à pH acide et relarguent ainsi l'agent anti-tumoral encapsulé (ici la doxorubicine, un anti-tumoral classiquement utilisé en chimio-thérapie).

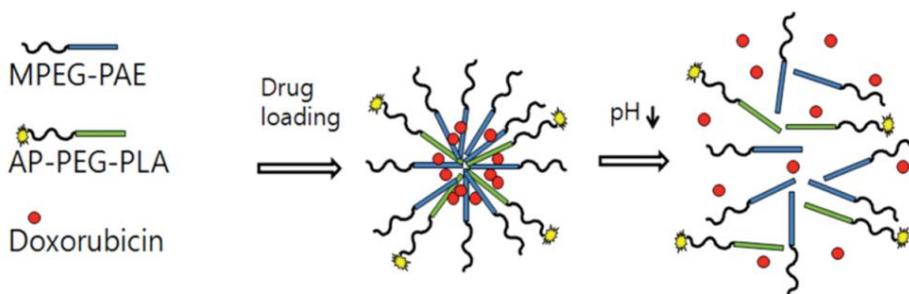


Figure I.22 : Exemple de système thérapeutique dépendant du pH

Tiré de Wu, et al., 2010⁹⁴.

MPEG-PAE : MPEG : methyl ether poly(ethylene glycol)- PAE : poly(β -amino ester)

AP : peptide capable de cibler la tumeur (CRKRLDRN) - PEG : poly(éthylène glycol) – PLA : poly(D,L-lactic acid)

D'autres stratégies basées sur ce même principe ont depuis été largement décrites dans la littérature et font notamment l'objet de preuves de concept thérapeutiques intéressantes.

III. A. Origines des effets de protonation

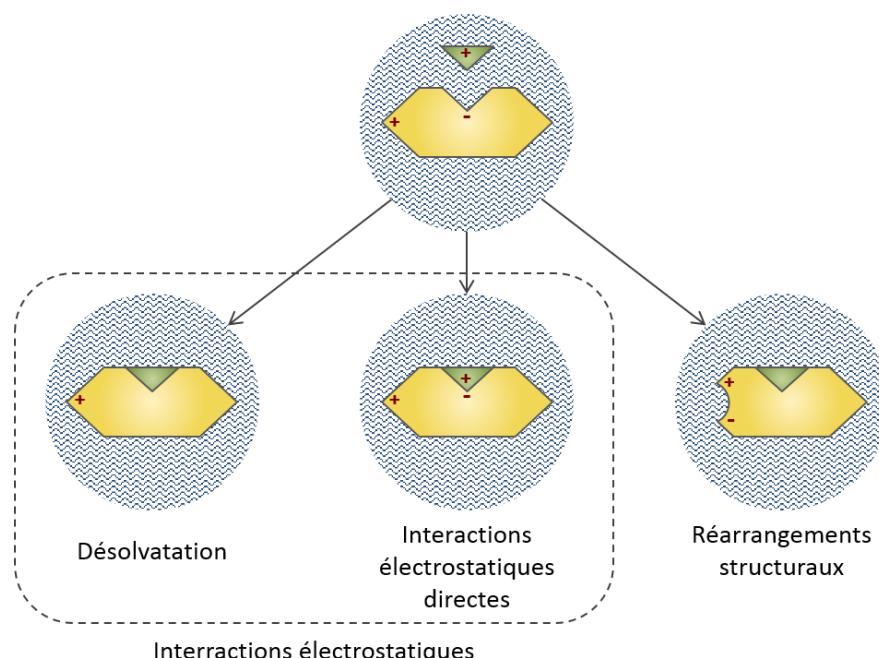


Figure I.23 : Principaux mécanismes à l'origine des variations du pKa et de l'état d'ionisation des groupements impliqués dans l'interaction protéine-ligand

Adapté d'Onufriev, et Alexov, 2013⁹⁵.

Chaque groupement ionisable, de la protéine et du ligand, est impliqué dans de nombreuses interactions intramoléculaires. La liaison du ligand sur sa cible modifie l'environnement de certains de ces groupements, ce qui affecte les liaisons mises en place en amont. Ces perturbations, qui sont responsables de variations du pKa et affectent la charge nette des groupements mis en jeu⁹⁶, peuvent

être réparties en deux catégories : les perturbations d'ordre électrostatique et les changements conformationnels de la protéine (Figure I.23).

III. A. a. Perturbations électrostatiques

Les résidus ionisables situés à l'interface sont les plus affectés par les changements électrostatiques induits par la fixation du ligand. Ces changements peuvent être initiés par un phénomène de désolvatation et/ou par l'interaction directe des groupements considérés avec le ligand.

Avant la liaison, les résidus situés à l'interface de l'interaction protéine-ligand sont principalement entourés d'eau dont la constante diélectrique est élevée. Avec la liaison du ligand, certains résidus peuvent se retrouver enfouis entre le reste de la protéine et le ligand. Ces résidus se situent alors dans un environnement dont la constante diélectrique est plus basse que celle de l'eau (Figure I.23 - Désolvatation). Ces deux phénomènes affectent directement les charges présentes à l'interface protéine/ligand.

De leur côté, certains groupements du ligand ont une charge partielle qui, lors de l'entrée du ligand dans le site actif, affecte le champ électrostatique à l'intérieur même de la protéine (Figure I.23 – Interaction électrostatique).

III. A. b. Changements conformationnels

Les réarrangements structuraux consécutifs à l'ancrage du ligand dans le site actif peuvent également affecter la solvatation de certains résidus⁹⁵. Un résidu qui serait, à l'état lié, au contact direct du solvant peut se retrouver, après liaison du ligand, enfoui dans la protéine, passant là encore d'un milieu à la constante diélectrique élevée (l'eau) à un milieu dont la constante est plus basse (l'intérieur de la protéine).

D'autre part, l'arrivée du ligand dans le site actif s'accompagne souvent d'ajustements de la conformation de la protéine (modèle dit « induced-fit » développé par Koshland D. en 1958⁹⁷). Ces ajustements modifient le micro-environnement des résidus impliqués, ce qui peut potentiellement affecter leur pKa et donc leur état d'ionisation (Figure I.23 – Réarrangement structuraux). Les résidus mis en cause ne se limitent pas seulement au site actif : Aguilar et al, rapportent des modifications du pKa (simulé *in silico*) de résidus situés à plus de 12 Å du ligand (Figure I.24). On constate alors qu'au-delà de 6 Å (une limite raisonnable pour définir l'interface de liaison), l'essentiel des variations de pKa est dû aux réarrangements structuraux induits par la liaison.

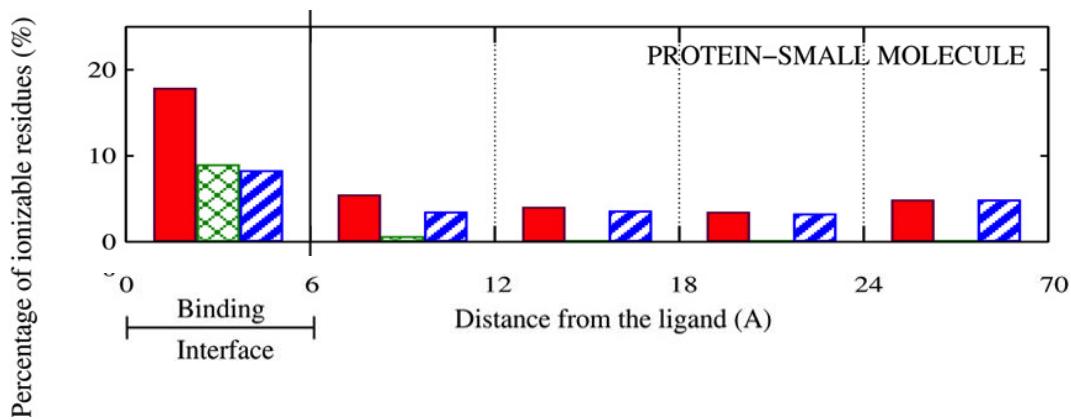


Figure I.24 : Distribution spatiale des résidus ionisables dont le pKa est affecté par la liaison d'un ligand

Adapté de Aguilar, et al., 2010⁹⁶.

pKa calculés en tenant compte des effets structuraux uniquement (bleu), des effets électrostatiques seuls (vert) ou globalement (rouge).

III. B. Mise en évidence expérimentale

On recense deux catégories de méthodes permettant de mettre en évidence les changements de l'état de protonation dus à une interaction protéine/ligand, protéine/protéine ou protéine/ADN. On parle respectivement de méthodes « atomistiques » et « macroscopiques »⁹⁵.

III. B. a. Méthodes atomistiques

L'atomistique s'attache à étudier la composition interne de l'atome ainsi que ses propriétés, il s'agit donc d'une science descriptive. Les méthodes décrites brièvement ci-dessous s'appuient toutes sur une propriété particulière des atomes et/ou des électrons et permettent, en théorie, d'identifier précisément les protons mis en jeu lors de la liaison du ligand. En pratique, chacune de ces méthodes présente de sérieuses limitations qui expliquent le peu de données encore disponibles aujourd'hui.

Cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X permet d'accéder à la conformation tridimensionnelle des molécules étudiées. L'utilisation des rayons X, dont la longueur d'onde se rapproche des distances interatomiques, permet un positionnement des atomes avec une précision inférieure à la moitié de la longueur d'onde utilisée.

La limite principale de la cristallographie résulte de la faible résolution moyenne des structures actuellement disponibles. Pour positionner de manière précise les atomes d'hydrogène, une résolution au minimum égale à l'angström doit être obtenue. Si quelques structures à ultra haute résolution sont

aujourd’hui accessibles sur la PDB, l’identification du proton incriminé dans le phénomène d’ionisation nécessite de disposer de la structure à ultra-haute résolution de la protéine seule et en complexe. Cette situation, très difficile à obtenir, restreint *de facto* l’utilisation de la cristallisation aux rayons X pour mettre en évidence un phénomène de protonation lié à la liaison d’un ligand. L’article publié par Nichols et al à l’été 2015 présente ainsi quatre structures à ultra haute résolution (entre 0,79 et 0,89 Å) de la CTX-M β -lactamase seule et en complexe avec deux inhibiteurs. L’analyse de ces structures a permis de mettre en évidence un transfert de protons entre deux résidus suite à la liaison d’un inhibiteur non covalent (de la Ser⁷⁰ au Glu¹⁶⁶)⁴⁵.

Par ailleurs, cette technique permet seulement de valider un phénomène de protonation et d’identifier les résidus qui y sont associés. Pour obtenir des données énergétiques et la valeur des pKa, l’expérimentateur peut seulement utiliser des méthodes de prédition *in silico*. Bien que de plus en plus précises, ces approches ne remplacent pas encore l’expérimentation.

Diffusion de neutrons

La diffusion de neutrons permet de visualiser directement les protons sans notion de résolution. Cette technique, lourde et difficile à mettre en place, est toutefois peu utilisée en protéomique d’autant plus qu’elle nécessite, elle aussi, d’analyser séparément la protéine seule, et en complexe. Là encore, la technique ne donne pas un accès direct aux données énergétiques associées au phénomène de protonation observé.

Peu d’études se sont jusque là attachées à décrire les phénomènes de protonation consécutifs à une interaction protéine-ligand et les variations de pKa qui en résultent par cette technique. On pourra toutefois citer deux études récentes : Michalczyk, et al.,⁹⁸ qui ont combiné leur travail avec une analyse RMN plus classique et plus récemment Yokoyama, et al.⁹⁹.

Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est, parmi toutes les techniques disponibles, la plus utilisée pour identifier spécifiquement le ou les résidus subissant un changement de pKa suite à une interaction¹⁰⁰.

Tout changement de l’état d’ionisation d’un résidu ou de l’un des groupements affecte en effet les noyaux des atomes adjacents, ce qui se traduit par une modification du déplacement chimique de ces atomes, observable directement par RMN^{101,102}. Là encore, les études doivent être réalisées sur une paire de structures : la protéine seule, et la protéine en complexe avec le ligand d’intérêt. Ces données peuvent être associées à une mesure directe de la valeur du pKa du résidu d’intérêt en suivant l’évolution du déplacement chimique des atomes voisins du site de protonation en fonction du pH¹⁰³. En conduisant ces mesures sur l’enzyme libre et l’enzyme complexée, il est alors possible d’obtenir le shift de pKa du résidu ionisable induit par la liaison de l’inhibiteur. Cette technique est principalement limitée

par la nécessité de disposer d'une plateforme RMN très technique, et d'être en mesure de répéter toutes les mesures sur la protéine seule et en complexe. En outre, le recours au marquage isotopique au ^{13}C et/ou au ^{15}N peut également s'avérer nécessaire.

III. B. b. La Calorimétrie à Titration Isotherme depuis le prisme du formalisme de Baker et Murphy

La Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC) est une méthode macroscopique qui permet d'enregistrer la chaleur de formation d'un complexe ligand-récepteur. Les deux partenaires peuvent être de natures différentes (protéique, lipidique, nucléique, organique ou non) et de différentes tailles (ligand de faible poids moléculaire, macromolécule protéique, ion métallique,...). Toutes les combinaisons peuvent être théoriquement étudiées par cette technique mais nous nous concentrerons ici sur l'interaction protéine-ligand où la protéine est monomérique et où le ligand est une petite molécule organique capable d'interagir avec la cible considérée. Les détails concernant le principe et la mise en place d'une mesure de calorimétrie ITC sont explicités dans la section *Matériel et Méthodes* de ce manuscrit (Chapitre V.IV.).

Lors de la mesure, des quantités connues de ligand sont progressivement ajoutées à une solution tamponnée contenant la macromolécule d'intérêt. L'appareil détecte la chaleur produite à chaque injection et la reporte sur un thermogramme. L'expérimentateur a alors directement accès à la stoechiométrie n , l'enthalpie de liaison ΔH , et la constante d'affinité K_a , liées à la formation du complexe. La détermination de la constante d'affinité du ligand pour sa cible permet de remonter à la variation d'énergie libre ΔG et donc de déduire l'entropie de liaison $-T\Delta S$ du complexe étudié (Figure I.25). Dans le cas de complexes très affins (nano et sub-nanomolaire), la détermination des constantes d'affinité peut-être réalisée de manière indirecte en suivant le déplacement d'un ligand de faible affinité par celui d'intérêt.

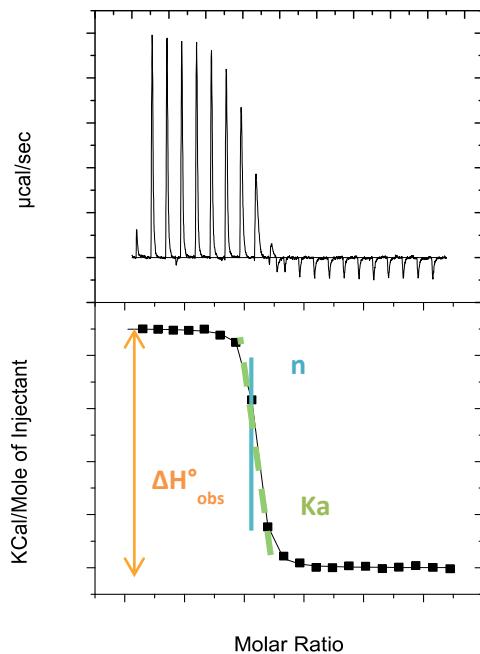


Figure I.25 : Thermogramme représentatif obtenu par ITC

Ce cas général ne s'applique toutefois pas directement dans les cas où l'interaction considérée met en jeu des groupements ionisables susceptibles d'échanger un ou plusieurs protons avec le solvant. Baker et Murphy ont développé en 1996 un formalisme pour décrire plus finement cette situation où la liaison du ligand s'accompagne d'un phénomène de (dé)protonation de l'un de ces groupes¹⁰⁴. Dans ce formalisme, un seul résidu ionisable de la protéine est protoné ou déprotoné lors de la liaison du ligand. Deux événements sont amenés à se produire séquentiellement : la protonation de l'enzyme, et la liaison du ligand. Chacun de ces phénomènes est réversible et l'ordre dans lequel ils se produisent n'a pas d'importance (Figure I.26).

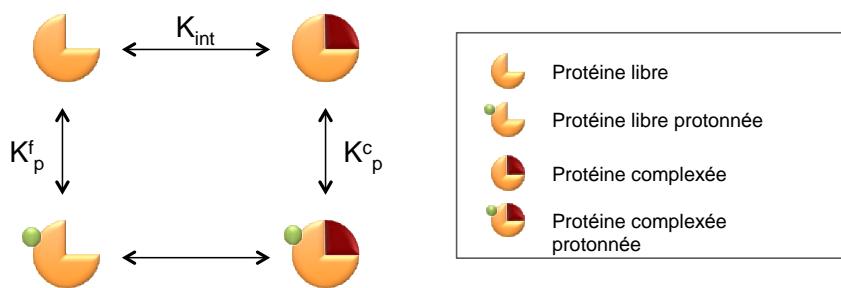


Figure I.26 : La protonation dans l'interaction protéine-ligand

Adapté de Baker B. et Murphy K., 1996¹⁰⁴.

Les réactions de liaison sont représentées horizontalement, celles de protonation verticalement.

K_{int} représente ici la constante d'affinité du ligand pour la protéine déprotonée tandis que K_p^f et K_p^c sont les constantes de protonation du résidu ionisable, respectivement dans les formes libre et liée de la protéine.

$$K_{int} = \frac{1}{K_i}, \quad \text{Constante d'association dans la protéine déprotonée,}$$

$$K_p^f = \frac{1}{K_{alibre}} = 10^{pK_{alibre}}, \quad \text{Constante de protonation du résidu ionisable dans la protéine libre,}$$

$$K_p^c = \frac{1}{K_{alié}} = 10^{pK_{alié}}, \quad \text{Constante de protonation du résidu ionisable dans la protéine complexée,}$$

La constante d'association observée (par ITC ou par mesure enzymatique de type FRET) K_{obs} est la constante d'association intrinsèque K_{int} affectée par la constante de protonation du résidu ionisable en fonction du pH : gfhfgh

$$K_{obs} = K_{int} \frac{1 + 10^{pK_{alié} - pH}}{1 + 10^{pK_{alibre} - pH}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Ou, si l'on passe à l'inverse pour raisonner sur les constantes de dissociation :

$$K_{i_{obs}} = K_{i_{int}} \frac{1 + 10^{pK_{alibre} - pH}}{1 + 10^{pK_{alié} - pH}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Le phénomène de protonation résulte ainsi de la variation de la constante d'acidité (pKa) du résidu ionisable suite à la liaison du ligand. C'est cette variation de pKa qui induit la prise ou le relargage d'un proton lors de l'interaction du ligand.

Mesure des variations de pKa

La fraction de protons échangés N_{H^+} lors de l'interaction est la différence entre $\overline{H^c}$ et $\overline{H^f}$, les fractions de protéines protonées parmi, respectivement, le pool de protéines complexées et libres (équations 3 à 5).

$$\overline{H^f} = \frac{K_p^f \cdot 10^{-pH}}{1 + K_p^f \cdot 10^{-pH}} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\overline{H^c} = \frac{K_p^c \cdot 10^{-pH}}{1 + K_p^c \cdot 10^{-pH}} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$N_{H^+} = \overline{H^c} - \overline{H^f} = \frac{10^{pK_{alié} - pH}}{1 + 10^{pK_{alié} - pH}} - \frac{10^{pK_{alibre} - pH}}{1 + 10^{pK_{alibre} - pH}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Expérimentalement, la valeur de N_{H^+} peut être obtenue par ITC en répétant les mesures de titration calorimétrique en ne faisant varier que le tampon de travail (à pH constant). En effet, puisque le tampon est impliqué dans la protonation, soit en fournissant, soit en captant les protons mis en jeu lors de la liaison du ligand, son enthalpie d'ionisation influence nécessairement l'enthalpie de liaison observée par calorimétrie (équation 6).

$$\Delta H_{obs}^\circ = \Delta H_0^\circ + N_{H^+} \cdot \Delta H_{ion}^b \quad (\text{Eq. 6})$$

Avec :

$\Delta H_{\text{obs}}^\circ$, la variation d'enthalpie observée,

ΔH_0° , la variation d'enthalpie de liaison qui serait observée si la mesure était effectuée dans un tampon dont l'enthalpie de protonation serait nulle,

$\Delta H_{\text{ion}}^\circ$, l'enthalpie d'ionisation du tampon utilisé.

Il suffit donc en théorie de déterminer la valeur de N_{H^+} à deux valeurs de pH bien choisies pour en déduire les valeurs de $pK_{\text{a libre}}$ et $pK_{\text{a lié}}$.

Dissection thermodynamique

L'échange de protons induit par la liaison du ligand a un effet enthalpique qui peut-être quantifié en décomposant l'enthalpie de liaison ΔH_0° :

$$\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ - \overline{H^f} \cdot \Delta H_p^f + \overline{H^c} \cdot (\Delta H_p^f + \delta \Delta H_p) \quad (\text{Eq. 7})$$

Avec :

$\Delta H_{\text{int}}^\circ$, l'enthalpie de liaison intrinsèque qui résulte uniquement des interactions entre la protéine et le ligand (liaisons hydrogène, liaisons de van der Waals,...),

ΔH_p^f , l'enthalpie de protonation du résidu ionisable considéré,

et $\delta \Delta H_p$, la variation de l'enthalpie de protonation du résidu ionisable ΔH_p^f suite à la liaison du ligand.

En substituant l'équation 5 dans l'équation 7, on a alors :

$$\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ + N_{H^+} \cdot \Delta H_p^f + \overline{H^c} \cdot \delta \Delta H_p \quad (\text{Eq.8})$$

Les valeurs ΔH_0° , N_{H^+} et $\overline{H^c}$ dépendent du pH et peuvent être obtenues par ITC, laissant donc trois inconnues dans l'équation 8. Il faut ainsi en théorie déterminer ΔH_0° , N_{H^+} et $\overline{H^c}$ à trois pH différents pour déterminer leurs valeurs.

Si l'ITC permet de valider et de quantifier expérimentalement les effets de la prise ou du relargage de protons lors de l'interaction protéine-ligand, cette technique, utilisée seule, ne permet pas d'identifier les résidus impliqués dans le phénomène de protonation. L'utilisation d'autres techniques comme la cristallographie aux rayons X ou la RMN permet d'émettre une hypothèse quant à la nature du résidu ionisable. Celle-ci peut ensuite être confirmée directement par ces techniques dans certaines conditions (voir Chapitre I.III. B. a.), ou en renouvelant les expériences d'ITC sur la protéine mutée pour le résidu soupçonné.

D'autre part, l'ITC est une technique extrêmement consommatrice en matériel biologique. Elle requiert au minimum, pour chaque mesure, une dizaine de nanomoles de protéine. Pour déterminer avec précision les valeurs de pKa à l'état libre et lié, il faut au minimum répéter l'expérience à deux valeurs de pH et ce dans trois tampons différents. Comme chaque mesure est dupliquée, la quantité minimale de protéine pour conduire une étude complète dépasse la centaine de nanomoles. De même, cette technique nécessite au minimum une micromole de ligand. Dans la plupart des cas, deux valeurs de pH sont insuffisantes pour une détermination précise des pKa à l'état libre et lié, ce qui multiplie d'autant les quantités de matériel requises. Cette consommation importante constitue l'écueil principal de la technique. Elle reste néanmoins la seule méthode à pouvoir quantifier simultanément les shifts de pKa, la constante d'affinité, et le coût énergétique de la protonation d'un résidu suite à la fixation du ligand.

III. C. Calorimétrie, mesure de pKa et quantification énergétique : exemples dans la littérature

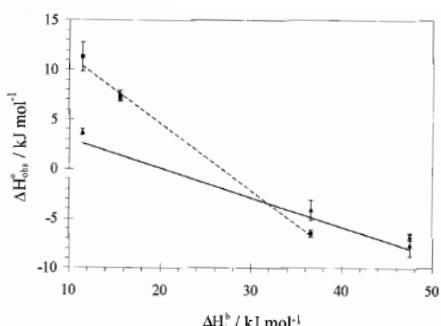
Bien que particulièrement adaptée, on a vu que l'utilisation de la calorimétrie pour déterminer précisément l'effet d'un phénomène de protonation couplé à la fixation d'un ligand reste une méthode lourde et fastidieuse, ce qui explique qu'assez peu d'études systématiques soient aujourd'hui disponibles¹⁰⁵. Dans ce contexte difficile, la plupart des études que nous avons recensées constatent et quantifient un transfert de protons entre le solvant et le complexe protéine-ligand ou protéine/protéine à une valeur de pH donnée mais ne détaillent pas ses conséquences sur les énergies et les constantes d'acidité mises en jeu^{106,107}.

L'interaction entre l'élastase et OMTKY3, l'exemple historique

Parmi les quelques études disponibles, l'une des études des plus complètes est certainement celle de Baker et Murphy, réalisée dans la foulée de la publication de leur formalisme^{104,108}. Dans cet article, les auteurs dissèquent les énergies mises en jeu lors de la liaison de deux protéines : l'élastase, et le troisième domaine ovomucoïde de dinde (OMTKY3). L'élastase est une protéase à sérine dont la triade catalytique est relativement bien connue. Dans les protéases à sérine, l'acte catalytique passe par le transfert d'un proton de la sérine catalytique (ici la Ser¹⁹⁵) à l'histidine voisine (ici l'His⁵⁷). La charge positive de l'azote de cette histidine néo-protonée qui en résulte est quant à elle stabilisée par la charge négative d'un aspartate proche (ici Asp¹⁰²). Dans ce cadre, on comprend bien que si l'histidine catalytique est déjà protonée, elle ne peut pas accepter de protons, ce qui rend l'enzyme inactive *de facto*. Dans l'élastase libre, le pKa de l'His⁵⁷ vaut 6,7, ce qui signifie qu'à pH 7, 33% des molécules en solution voient leur histidine catalytique protonée. La liaison d'un substrat (ici OMTKY3), ou d'un

inhibiteur, en faisant basculer le pH de 7 à 5,2, permet de réduire la proportion d'histidine catalytique protonée à 2%. Dans une certaine mesure, on peut ainsi dire que la diminution du pKa de l'His⁵⁷ permet l'activation de l'enzyme. D'un point de vue énergétique, les auteurs évaluent l'enthalpie de protonation de l'His⁵⁷ à $-6,6 \pm 0,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à l'état libre et $-3,7 \pm 0,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à l'état lié. Cette différence est à mettre directement en perspective du mécanisme catalytique rapporté ci-dessus. Dans le cas de l'enzyme complexée, l'interaction entre les deux protéines crée un espace localement hydrophobe où le transfert d'un proton depuis une molécule d'eau est nécessairement affecté par une pénalité de désolvatation. En revanche, le proton de la sérine catalytique est déjà désolvaté et est transféré directement d'un résidu à l'autre sans être affecté par une quelconque pénalité de désolvatation. Ce shift favorise ainsi la protonation de l'His⁵⁷ par la Ser¹⁹⁵ plutôt que par une molécule d'eau du solvant.

On note enfin que l'enthalpie de liaison intrinsèque, c'est à dire qui ne dépend pas des effets de protonation mais seulement des interactions intermoléculaires, est tout à fait négligeable. La liaison d'OMTKY3 à l'élastase est donc, du point de vue enthalpique, entièrement dirigée par la protonation de l'His⁵⁷.

A.

B.

Paramètre	Valeur
pK_{af}	6,7
pK_{ac}	5,2
$\Delta H_{\text{p}}^{\circ} (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-6,6 \pm 0,6$
$\delta \Delta H_{\text{p}} (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-3,7 \pm 0,8$
$\Delta H_{\text{int}}^{\circ} (\text{kcal.mol}^{-1})$	$0,6 \pm 0,2$
$\Delta G_{\text{int}}^{\circ} (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-14,5 \pm 0,3$
$-T\Delta S_{\text{int}}^{\circ} (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-13,9 \pm 0,1$

Figure I.27 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'élastase et OMTKY3

Tiré de *Baker and Murphy 1997*¹⁰⁸

A. Variation de l'enthalpie de liaison observée par calorimétrie en fonction de l'enthalpie d'ionisation du tampon

B. Energies mises en jeu lors de l'interaction

Les protéases à aspartate

Parmi les protéases à aspartate, la protéase du VIH est certainement la plus étudiée. Elle est en effet essentielle au cycle de vie du virus de l'immunodéficience humaine (HIV), et son inhibition permet de prévenir la réplication du virus et donc d'empêcher la contamination de nouvelles cellules. Ce contexte explique le nombre impressionnant d'études disponibles sur cette protéine, et sur les protéases à aspartate en général. Celles-ci ont ainsi fourni au marché pharmaceutique, en l'espace de dix ans seulement, les premières molécules thérapeutiques utilisables dans le traitement du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA).

Les protéases à aspartate se présentent sous la forme d'un dimère actif dont l'unité catalytique est constituée de trois résidus (Asp²⁵, Thr²⁶ et Gly²⁷). Cette structure en dimère favorise le rapprochement structural des aspartates catalytiques de chaque sous-unité qui forment ainsi une dyade catalytique. Dans le cadre du développement de nouveaux inhibiteurs, plusieurs études se sont intéressées à l'état de charge de ces deux résidus. Le pKa théorique des résidus aspartiques en solution est théoriquement de 4 environ, ce qui impliquerait que les deux membres de la dyade catalytiques soient ionisés (COO-) à pH physiologique. Des études ont permis de montrer une altération du pKa de chacun des aspartates catalytiques de manière à autoriser la présence d'un proton neutralisateur entre les deux charges^{109,110}. Le pKa de l'un de ces deux résidus est alors abaissé à 2,9-3 et l'autre augmenté jusqu'à 6. Par la suite, des études conjointes de RMN et de calorimétrie ont permis d'associer la liaison de certains inhibiteurs à une modification du pKa de ces deux résidus^{111,112,113,114}. En particulier, une étude menée par le groupe de Freire a permis de disséquer thermodynamiquement la liaison du Kni-272, un puissant inhibiteur de la protéase à HIV-1¹¹³. Dans cette analyse, les auteurs ont pu directement associer la liaison de leur inhibiteur à un shift quantifiable du pKa de l'un des aspartates de la dyade catalytique (pKa_{libre} = 6,0 et pKa_{lié} = 6,6). Dans le même esprit, Xie et al. ont également montré un shift de pKa conséquent (de 6 à 9) de l'un des aspartates de la plasmepsine lors de sa liaison à la pepstatine¹¹⁵. Ces études ont été essentielles au développement des méthodes de drug design modernes. Afin de prévoir de manière optimale les affinités des inhibiteurs testés *in silico*, ces approches nécessitent en effet de connaître précisément l'état d'ionisation des deux aspartates avant et suite à la liaison des inhibiteurs étudiés¹¹⁶.

Le cas des MMP

A notre connaissance, seules deux études se sont intéressées à la protonation des MMP suite à la liaison d'un inhibiteur ou d'un substrat. La première, réalisée par le groupe de Brouillette et publiée en 1999, s'intéresse à l'inhibition de la stromélysine-1 (MMP-3) par des inhibiteurs de type hydroxamate (galardine) et carboxylate (PD180557 et PD166793)⁸². S'appuyant sur les données structurales disponibles (RMN et cristallographie aux rayons X), les auteurs commencent par prédire la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement carboxylate du glutamate catalytique (ici Glu²⁰²) et la fonction hydroxyle de l'hydroxamate. La différence de pKa théorique entre un acide acétique (4,7) et l'acide acéto-hydroxamique (AHA, 8,7) justifie le positionnement du proton sur l'inhibiteur plutôt que l'enzyme. L'étude étant conduite à pH 6,7, la fonction hydroxamate de l'inhibiteur est déjà protonée en solution. Lors de l'interaction protéine ligand, il n'y a donc théoriquement pas d'échange de protons avec le solvant. En revanche, dans le cas des inhibiteurs dont le groupement chélatant est un acide carboxylique, les pKa des groupements ionisables du ligand et de la protéine sont très proches, ce qui suggère soit un partage du proton entre les résidus, soit sa fixation sur l'une des deux fonctions carboxylate. En théorie, aucun proton ne doit être échangé lors de la liaison de la galardine (inhibiteur avec la fonction hydroxamate) et un proton doit être capté par le complexe lors de la fixation de chacun des deux inhibiteurs à fonction carboxylate. Les auteurs montrent cependant par calorimétrie que respectivement un et deux protons sont échangés. Ce proton surnuméraire par rapport à la théorie a pu être attribué à la protonation de l'histidine 224, un résidu présent au fond de la poche S₁'. L'étude s'arrête malheureusement là concernant les effets de protonation et ne compare donc pas le coût relatif de cette prise de proton.

Une deuxième étude a été conduite par Takeharu et al. sur la MMP-7, mais en utilisant des données issues de mesure d'activité enzymatique¹¹⁷. Les auteurs vont, à l'instar de l'étude précédente, dans le sens d'une protonation du glutamate catalytique. Ils proposent par ailleurs une version actualisée du mécanisme catalytique de la MMP-7 faisant intervenir une deuxième molécule d'eau en plus de celle proposée par Lovejoy (Figure I.8, molécule responsable de l'attaque nucléophile du carbonyle de la liaison peptidique hydrolysée (Figure I.28)). Cette molécule d'eau viendrait alors stabiliser le complexe tétravalent formé transitoirement lors de l'hydrolyse catalytique (Figure I.28 C.).

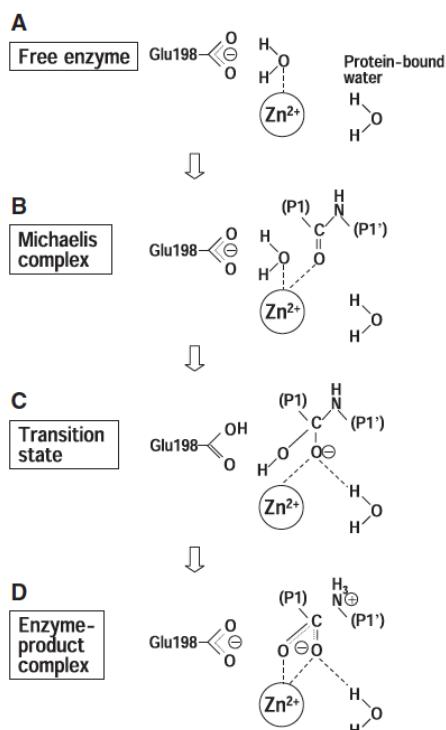


Figure I.28 : Mécanisme catalytique de la MMP-7 proposé par Takeharu, et al.

Tiré de Takeharu, et al. 2011¹¹⁷.

Le peu de littérature accessible montre bien que les considérations énergétiques associées aux transferts de charges induits par l'interaction d'un ligand avec sa cible sont encore assez peu étudiées expérimentalement. Ce manque de données s'explique plus par la lourdeur des mesures à réaliser que par un manque d'intérêt de la communauté scientifique. En contrepartie, de nombreuses équipes ont essayé de traduire ces phénomènes par l'élaboration de nouvelles méthodes *in silico*¹⁰⁵. Le raffinement de ces algorithmes se heurte toutefois au manque de données expérimentales, pourtant nécessaires à leur validation. Dans ce contexte, il convient de saluer particulièrement le travail systématique entrepris par le groupe de Klebe en Allemagne qui s'est ainsi attelé à combiner approches expérimentales et théoriques^{105,118}

Nous ne reviendrons pas dans le détail sur ces nouvelles approches car d'excellentes revues sont disponibles aujourd'hui^{96,119,120}. Il convient toutefois de noter que les prédictions de pKa apportées par ces études constitueront à l'avenir un enjeu majeur des études de criblage *in silico*¹²¹.

IV. L'interaction MMP-12/RXP470.1

IV. A. Vers l'identification du RXP470.1, un inhibiteur sélectif de la MMP-12

Comme nous l'avons vu un peu plus haut, la MMP-12 est une cible thérapeutique particulièrement intéressante. De nombreux efforts ont ainsi été consentis pour identifier des inhibiteurs particulièrement sélectifs de cette MMP. Dans cette optique, différents types de groupement chélatant ont été testés en parallèle d'une exploration systématique de la poche S_{1'}.

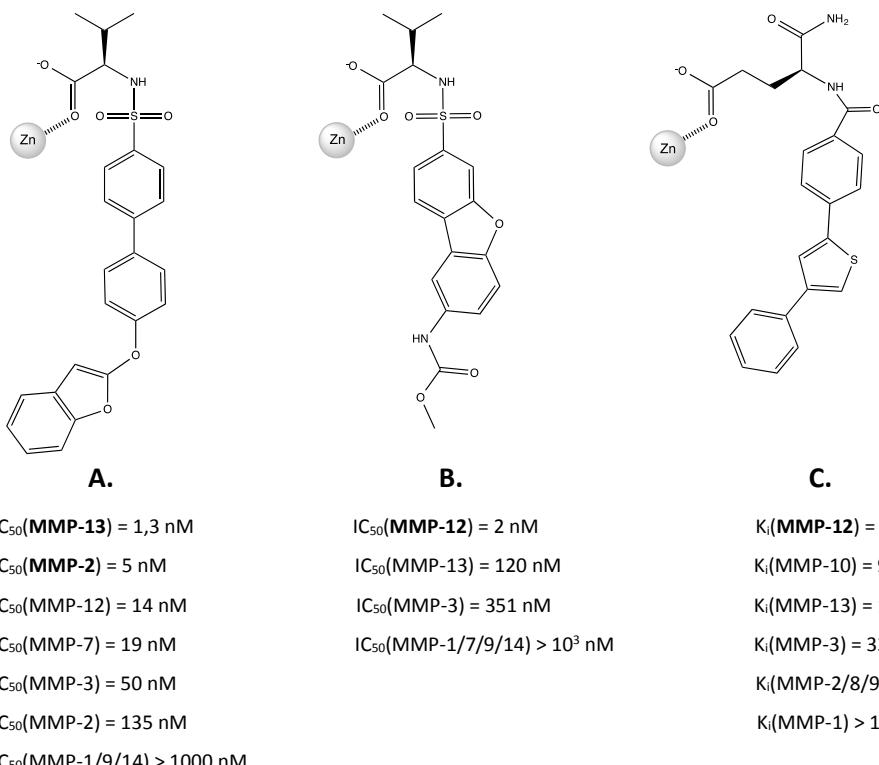


Figure I.29 : Structure chimique et affinité d'inhibiteurs carboxylate et phosphinate

La sphère griseée représente l'atome de zinc catalytique.

Un groupe s'est ainsi intéressé à une première série carboxylate modifiée en P_{1'}. Dans cette série, les composés 29.B et 29.C ont été optimisés à partir de la structure du composé 29.A, inhibiteur large spectre ciblant indéfiniment les MMP-2, 7, 12, et 13. Dans ce processus d'optimisation, la chaîne en P_{1'} a été raccourcie et rigidifiée par la fusion de trois cycles. D'une chaîne longue et relativement mobile on est donc passé à une chaîne beaucoup plus compacte et présentant un moindre degré de liberté. Cette modification a permis d'orienter totalement le profil de sélectivité en faveur de la MMP-12⁴³.

Notre laboratoire s'est quant à lui intéressé depuis le milieu des années 90 au développement d'inhibiteur possédant un groupe phosphoryle. Outre une avidité réduite pour le zinc, l'une des principales motivations justifiant l'emploi des phosphoryles repose sur leur proximité structurale avec

l'état de transition des substrats peptidiques en cours d'hydrolyse. Surfant sur ce constat, trois groupements ont été envisagés (Figure I.30). Les peptides de type phosphonamide présentent la meilleure analogie avec l'état de transition, mais la sensibilité de la liaison P-N à l'hydrolyse ne permet pas leur utilisation *in vivo*^{122,123,124}. Les inhibiteurs construits autour d'un groupement phosphonate se sont révélés particulièrement puissants vis à vis de la carboxypeptidase A (affinité femtomolaire) ¹²². Leur utilisation sur des endoprotéases n'a toutefois pas abouti à d'aussi bons résultats¹²⁴. En revanche, les inhibiteurs phosphiniques se sont montrés comme particulièrement stables et capables d'inhiber efficacement les protéases à zinc¹²⁵.

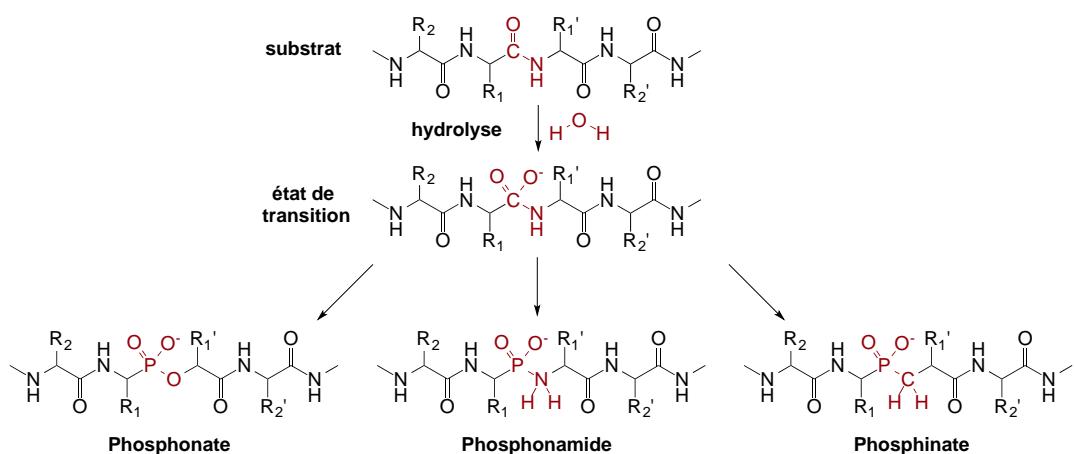
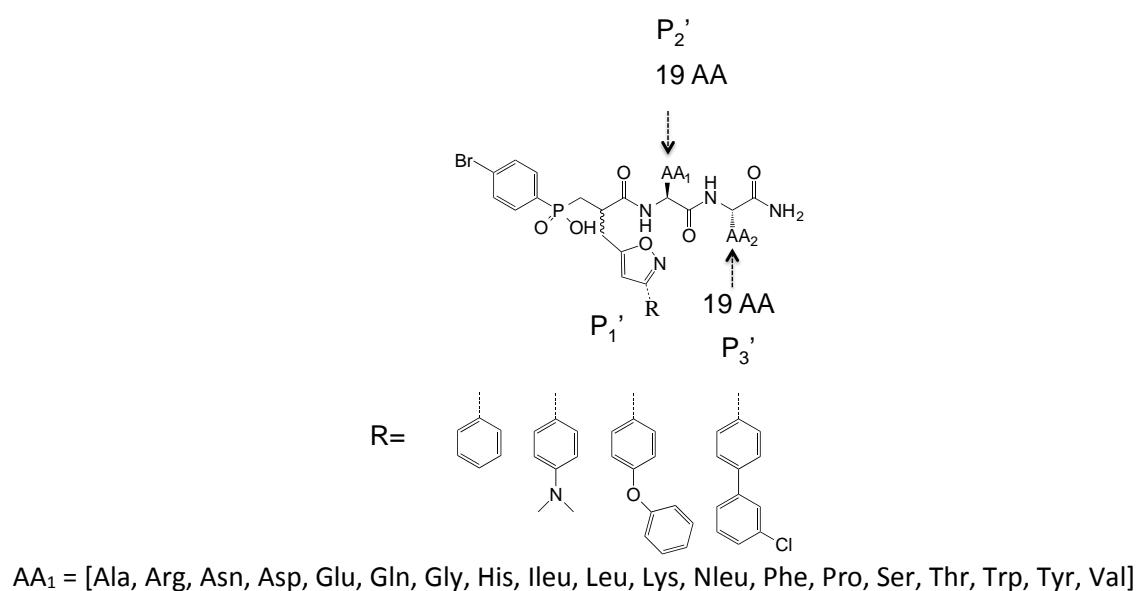


Figure I.30 : Analogies structurales entre l'état de transition peptidique et différents peptides contenant un groupe phosphoryle

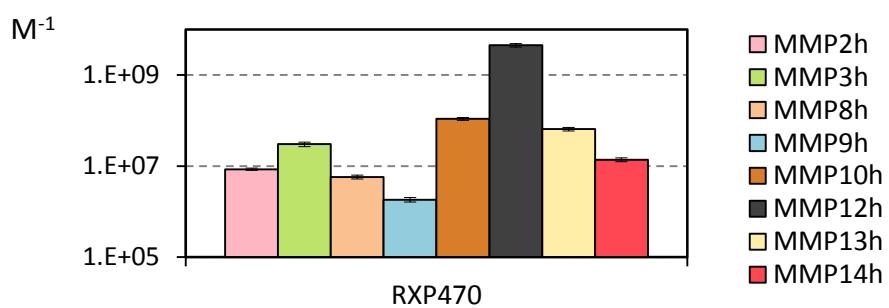
Adapté de *Dive and Georgiadis, 2014*¹²⁶.

Les inhibiteurs phosphiniques ont permis de générer toute une gamme d'inhibiteurs puissants d'autres métalloprotéases comme la néprolysin (Ki = 1,2 nM), la thermolysine (Ki = 26 nM) ou la glutamate carboxypeptidase II (GCPII, Ki = 0,7 nM)¹²⁶. Grâce à cette famille d'inhibiteurs, les premiers inhibiteurs puissants capables de discriminer les deux sites de l'ACE ont pu être produits^{127,128}, des résultats suggérant la capacité des peptides phosphiniques à générer des inhibiteurs de très grande sélectivité.

Le RXP470.1 a été identifié au laboratoire en 2006 à la suite du criblage de quatre chimiothèques de peptides phosphiniques contre dix MMP¹²⁹. Dans cette étude, tous les composés testés comportaient un groupement Br-Phe-POOH. Seules les positions P_{1'}, P_{2'} et P_{3'} étaient amenées à varier : quatre chaînes latérales de différentes longueurs en P_{1'}, et dix-neuf acides aminés en P_{2'} et P_{3'} (Figure I.31). Le groupement phosphoryle POOH permet, en chélatant l'atome de zinc catalytique, de positionner les inhibiteurs testés dans le site actif.

**Figure I.31 : Schéma récapitulatif des variations des positions P_1' , P_2' et P_3' étudiées**Tiré de Devel, et al., 2006¹²⁹.

Cet inhibiteur pseudo-peptidique se distingue par sa grande sélectivité pour la MMP-12, au détriment des autres MMP testées (Figure I.32).



	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	MMP-10	MMP-12	MMP-13	MMP-14
Ki (nM)	117 (± 6)	33 (± 4)	173 (± 17)	546 (± 58)	9,2 (± 0,7)	0,22 (± 0,02)	15 (± 1)	72 (± 7)
Ki/Ki(MMP-12)	531	150	786	2481	42	1	70	327

Figure I.32 : Sélectivité du RXP470.1 vis à vis d'un large set de MMPTampon TRIS/HCl 50 mM, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 25°C

Structuralement, le RXP470.1 (Figure I.29 C.) se caractérise par :

- sa pince phosphinique qui chélate l'atome de zinc catalytique,
- sa chaîne isoxazole en position P_1' qui plonge dans la poche S_1' et se termine par un motif Cl-Phényle,
- et son squelette peptidique constitué de deux résidus glutamate en position P_2' et P_3' qui s'insèrent latéralement dans la cavité du site actif.

La nomenclature du RXP470.1 renvoie à sa nature phosphinique (P) déjà connue en cristallographie (RX), suivie d'un identifiant (470) et de l'indication du diastéréoisomère étudié. Ici, il s'agit de la première des deux fractions qui sont séparées par purification par HPLC en phase inverse en fin de synthèse. Ces diastéréoisomères proviennent du carbone asymétrique situé en position P_1' et la structure cristallographique du complexe RXP470.1/ MMP-12 a permis de valider que la fraction 1 correspond bien à une conformation du carbone asymétrique telle qu'elle est présente dans les acides aminés naturels⁸⁴. Par la suite, nous nous référerons toujours à cette première fraction, la seconde étant à la fois moins puissante et moins sélective.

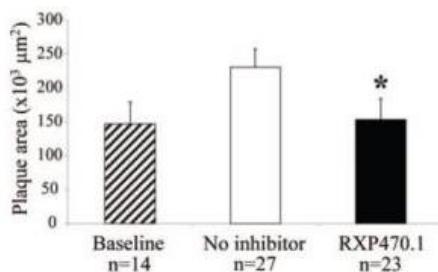
De façon intéressante, les deux chaînes latérales des glutamates en position P_2' et P_3' s'avèrent un paramètre essentiel de la sélectivité du RXP470.1. Le remplacement de ces deux résidus par un motif Trp-Ala préféré par la MMP-12 aboutit ainsi à un inhibiteur moins sélectif, très affin pour l'ensemble des MMP testées. Toutefois, la structure cristallographique haute résolution de la MMP-12 en complexe avec le RXP470.1 (code PDB : 4GQL, Résolution : 1,15 Å) obtenue récemment au laboratoire n'indique pas d'interaction directe entre les groupements carboxylates des glutamates de l'inhibiteur et les résidus du site actif. De ce point de vue, la sélectivité obtenue grâce à la séquence Glu-Glu semble plus due à une meilleure tolérance pour cette séquence de la MMP-12 comparée aux autres MMP qu'à une optimisation des interactions par les glutamates¹²⁹.

IV. B. Efficacité *in vivo* du RXP470.1

Nous avons évoqué précédemment l'importance du rôle joué par la MMP-12 dans le développement et la rupture des plaques athéromateuses. Dans ce cadre, l'efficacité du RXP470.1 a été évaluée sur des souris possédant déjà des plaques (régime hyperlipidique pendant huit semaines et invalidation du gène ApoE)¹³⁰. A l'issue de ces huit premières semaines de gavage, le RXP470.1 a été infusé pendant quatre semaines *via* un système de mini-pompes implantées dans le dos des animaux tout en maintenant le même régime riche en lipides. Les mini-pompes permettent la diffusion en continu du composé actif et donc de maintenir une concentration plasmatique constante. Pour évaluer l'effet de l'inhibiteur, deux groupes contrôle ont été aussi étudiés. Le premier groupe concernait des souris ayant

suivi le même régime hyperlipidique que le groupe traité pendant huit semaines, permettant ainsi de connaître la taille des plaques avant le début du traitement au RXP470.1. Dans le deuxième groupe témoin, les souris ont été nourries pendant douze semaines, toujours selon le même régime, afin d'estimer la taille des plaques d'athérome riche sans traitement (implantation de mini-pompes chargées de liquide salin sans inhibiteur).

A.



B.

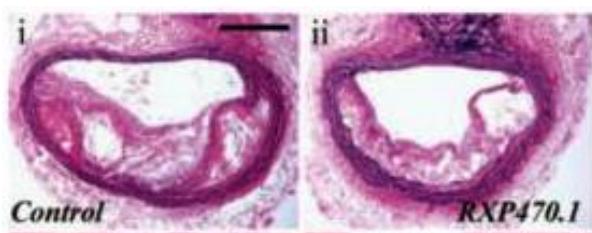


Figure I.33 : Effet d'un traitement continu par le RXP470.1 sur la taille des plaques d'athérome

Tiré de *Johnson et al., 2011*¹³⁰

A. Surfaces comparées des plaques d'athérome de l'artère brachiocéphalique avant (hachuré) et après le traitement par le RXP470. (noir) ou par une solution contrôle de PBS (blanc)

B. Coupes des artères brachiocéphaliques après 4 semaines de traitement

L'infusion de RXP470.1 pendant quatre semaines abolit la croissance des plaques, c'est à dire que les animaux traités par l'inhibiteur présentent des plaques similaires dont la taille est similaire à celles des plaques observées dans le groupe contrôle I qui reflète la taille des plaques avant le début du traitement. A l'inverse, en absence de traitement, le groupe contrôle II indique bien une croissance continue de la taille des plaques (Figure I.33). Ce traitement a également eu un effet sur la composition des plaques : les plaques des animaux traités présentent une proportion de macrophages/cellules musculaires lisses plus faible que chez les contrôles. Cet effet provient vraisemblablement d'une efficacité de recrutement des monocytes et des macrophages altérée (Chapitre I.I. C. c). De manière plus globale, en inhibant localement la MMP-12, le RXP470.1 joue directement sur de nombreux marqueurs classiquement associés à un phénotype de plaque instable. Il induit ainsi une diminution de la surface des aires de calcification des plaques, du nombre de macrophage apoptotiques et du nombre de corps nécrotiques. Parallèlement, les plaques traitées contiennent une plus grande proportion de fibres d'élastine non fragmentées, ce qui traduit globalement une moindre sensibilité des plaques à la rupture.

Cette étude était alors la première à décrire l'efficacité *in vivo* du RXP470.1. Une autre étude est depuis venue valider l'intérêt de cet inhibiteur en milieu complexe⁴⁴ et renforce l'intérêt d'une compréhension fine des mécanismes régulant l'affinité du RXP470 pour la MMP-12.

IV. C. Mise en évidence d'un phénomène de protonation⁸⁴

Des études préliminaires ont permis au laboratoire de mettre en évidence la dépendance au pH de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12 (Figure I.34 A.). La constante d'inhibition du RXP470.1 passe ainsi de 48 à 430 pM lorsque l'on fait varier le pH d'une unité seulement (de 6 à 7). Cette évolution laisse présager un phénomène de protonation couplé à la liaison du RXP470.1. Pour valider cette hypothèse, le laboratoire a réalisé quatre mesures de titration à pH 7,5 dans quatre tampons aux enthalpies d'ionisation éloignées : TRIS (11,34 kcal.mol⁻¹), ACES (7,27 kcal.mol⁻¹), BES (5,79 kcal.mol⁻¹) et MOPS (5,04 kcal.mol⁻¹).

La Figure I.34 B. montre clairement l'influence du tampon sur la variation d'enthalpie de liaison observée en calorimétrie. Cette dépendance, linéaire, suit une équation de type $y=ax+b$ parfaitement compatible avec l'équation 6 développée dans le formalisme de Baker et Murphy.

$$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ} = \Delta H_0^{\circ} + N_{\text{H}^+} \cdot \Delta H_{\text{ion}}^{\text{b}} \quad (\text{Eq.6})$$

Le signe positif de la pente (+0,93) indique qu'au moins un proton est arraché au solvant et transféré au complexe protéine-inhibiteur. Pour affirmer avec certitude qu'un unique proton est échangé lors de la liaison du RXP470.1, il faut répéter ces mesures sur une large gamme de pH et vérifier que la courbe $N_{\text{H}^+}=f(\text{pH})$ ait une allure de gaussienne, sans épaulement, dont le maximum ne dépasse pas la valeur 1.

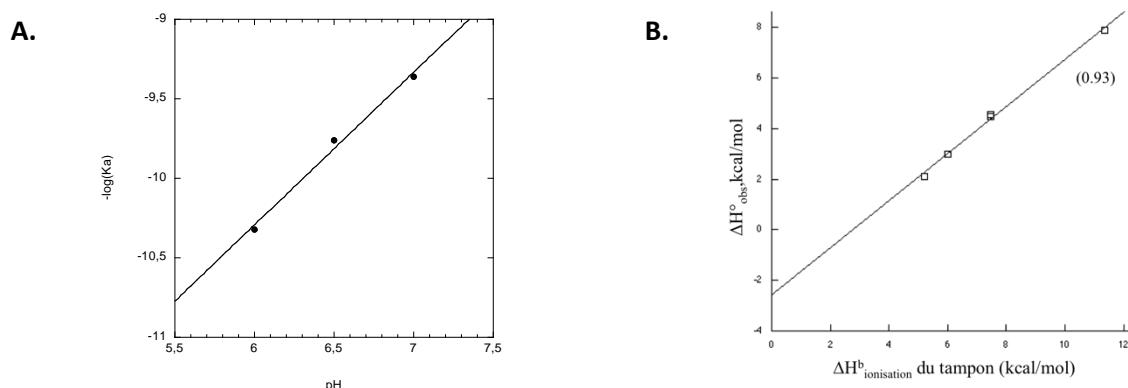


Figure I.34 : Dépendance au pH, effets sur l'affinité et l'enthalpie de liaison observée

Tirés de Czarny, et al., 2013⁸⁴

A. Dépendance au pH de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12

Tampon ACES 20 mM

B. Variation de l'enthalpie de liaison observée $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ lors de l'interaction du RXP470.1 avec la MMP-12
□ en fonction du tampon utilisé

Tampons utilisés : HEPES, MOPS, ACES et TRIS (20 mM, pH 7,5, 25°C)

Autres constituants du tampon de travail : NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM et ZnCl₂ 0,1 mM

IV. C. a. Identification du résidu protoné lors de la liaison du RXP470.1

L'analyse de la structure cristallographique à très haute résolution du complexe RXP470.1/MMP-12 (4GQL, 1,15 Å) a permis d'observer la très courte distance séparant l'un des oxygènes du groupe phosphoryle et l'un des oxygènes du groupement carbonyle du glutamate 219 (Figure I.33). Compte tenu des pKa théoriques d'un groupe phosphoryle (autour de 1,5) et d'un résidu glutamate (entre 4 et 7 dans le site actif d'une enzyme¹³¹), chacun de ces groupements doit être sous forme ionisée à pH neutre. L'évidente proximité de ces deux charges négatives suggère ainsi le recrutement d'un proton afin de neutraliser l'une d'entre elles. La différence entre ces deux valeurs de pKa suggère par ailleurs une protonation préférentielle du Glu²¹⁹.

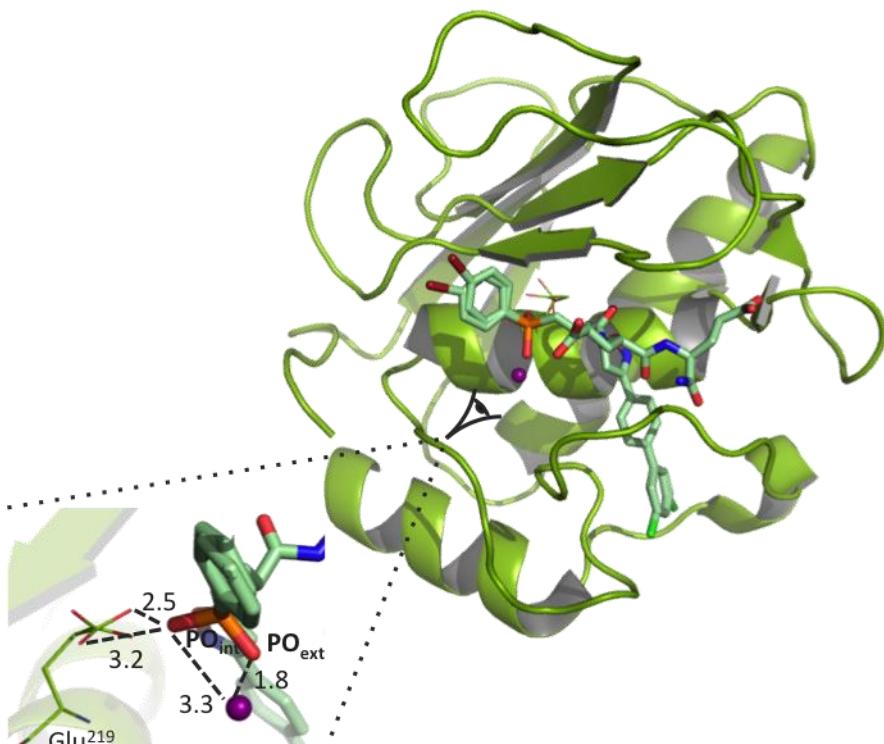


Figure I.35 : Structure cristallographique haute résolution du complexe RXP470.1/MMP-12

Code PDB : 4GQL – x,y : distances données en Å

Résolution : 1,15 Å

Pour valider cette hypothèse, un mutant Gln²¹⁹ a été obtenu par mutagenèse dirigée. Le mutant ainsi produit a pu être cristallisé pour vérifier la neutralité structurale de cette mutation : la topologie des résidus du site actif est globalement inchangée et le positionnement du RXP470 reste canonique. La chélation de l'atome de zinc catalytique reste monodentate mais le groupement phosphoryle change d'orientation de manière à ce que la chélation du zinc se fasse désormais par l'oxygène « intérieur » du

groupe phosphoryle. Cette observation va bien dans le sens d'une interaction entre le carbonyle du Glu²¹⁹ et le phosphoryle du RXP470.1 (Figure I.36).

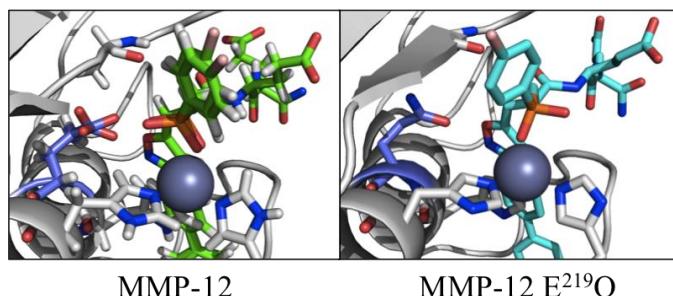


Figure I.36 : Chélation du zinc catalytique par le RXP470.1

La structure du RXP470.1 en complexe avec la MMP-12 (gauche) a été obtenue à très haute résolution d'où la représentation des atomes d'hydrogène (Code PDB : 4GQL, Résolution : 1,15 Å)

Les mesures de titration calorimétrique réalisées sur le mutant E219Q n'indiquent, contrairement à celles réalisées sur la MMP-12, aucune dépendance de l'enthalpie de liaison observée à l'enthalpie d'ionisation du tampon utilisé (Figure I.37). Ce résultat valide donc l'implication du Glu²¹⁹ dans le phénomène de protonation induit par la liaison du RXP470.1.

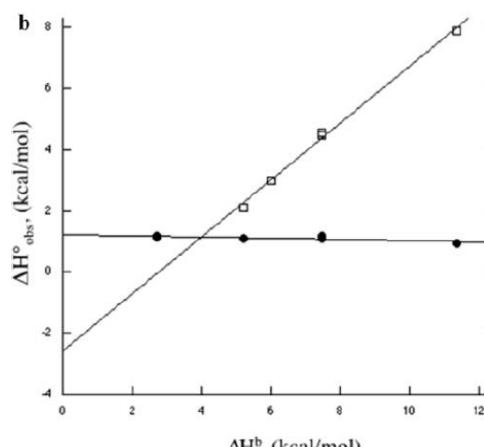


Figure I.37 : Variations de l'enthalpie de liaison observée ΔH°_{obs} lors de l'interaction du RXP470.1 avec

la MMP-12 □ ou la MMP-12 E219Q ● en fonction du tampon

Tampons utilisés : PIPES, MOPS, ACES et TRIS (20 mM, pH 6,8, 25°C)

Autres constituants du tampon de travail : NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM et ZnCl₂ 0,1 mM

Adapté de Czarny, et al, 2013⁸⁴

IV. C. b. Protonation d'un deuxième résidu à pH basique

Une fois le Glu²¹⁹ identifié, le laboratoire a cherché, dans la veine du formalisme développé par Baker et Murphy (Chapitre I.III. B. b), à caractériser complètement la dépendance du pH de l'affinité du RXP470.1. De nouvelles mesures de calorimétrie ont ainsi permis de quantifier la fraction de protons échangés N_{H+} pour différentes valeurs de pH (Tableau I.2). Ces mesures avaient pour but de déterminer d'une part les valeurs de pKa du Glu²¹⁹ dans la protéine libre et complexée, et d'autre part de disséquer le coût enthalpique de la prise de proton.

pH	5,5	6,1	6,8	7,5	8,3
N_{H+} ^a	0,37	0,74	0,93	0,97	1,21
	(±0,01)	(±0,01)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,02)

Tableau I.2 : Effet du pH sur la fraction de protons échangés lors de la formation du complexe RXP470.1/MMP-12

^a Valeurs de déviation standard entre parenthèses

A pH 8,3, la valeur de N_{H+} dépasse 1 ce qui suggère l'implication d'un deuxième résidu ionisable dans la formation du complexe. Le fait que l'on dépasse la valeur seuil d'un unique proton échangé laisse penser qu'un second résidu ionisable capte également un proton suite à la fixation du RXP470.1 mais que celle-ci intervient à des valeurs de pH plus hautes. A partir de ces seules données calorimétriques, il est assez difficile de déterminer sur quelle gamme de pH la protonation de ce second résidu affecte la fraction de protons échangés mesurée. On peut toutefois considérer en première approximation que les points obtenus à pH acides reflètent essentiellement la protonation du Glu²¹⁹. En appliquant l'équation 5 définie précédemment, il est alors possible de déterminer précisément la valeur du pKa du Glu²¹⁹ dans l'enzyme libre : $5,7 \pm 0,03$ (Figure I.38). Cette valeur, plus élevée que celle d'un glutamate en solution (pKa entre 4 et 5) n'est toutefois pas aberrante compte tenu de l'environnement hydrophobe dans lequel se trouve le Glu²¹⁹¹³¹.

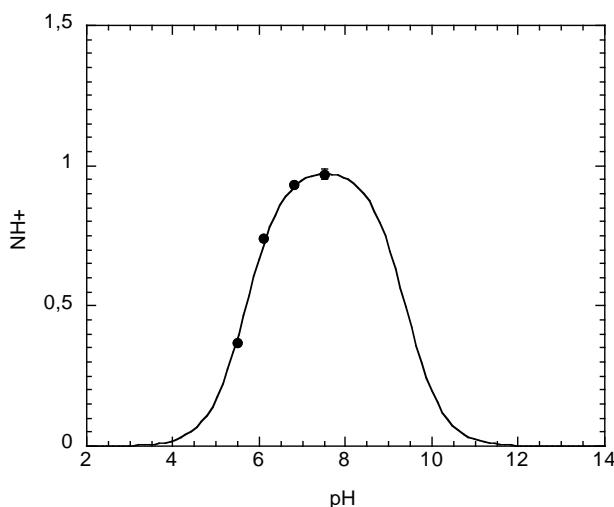


Figure I.38 : Simulation du pKa_{libre} du Glu²¹⁹ à partir de l'équation 5

Méthode des moindres carrés, KaleidaGraph[®] (Version 4.1.3).

$$N_{H^+} = \overline{H^C} - \overline{H^F} = \frac{K_p^C \cdot 10^{-pH}}{1 + K_p^C \cdot 10^{-pH}} - \frac{K_p^F \cdot 10^{-pH}}{1 + K_p^F \cdot 10^{-pH}} \quad (\text{Eq.5})$$

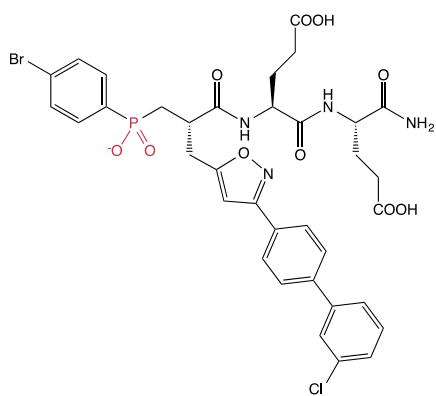
La détermination du pKa dans l'enzyme complexée, et donc la quantification du coût énergétique de la protonation du Glu²¹⁹, sont en revanche impossibles à déterminer dans ces conditions. Pour accéder à ces valeurs, il faudrait identifier le résidu protoné à pH basique et le muter de manière à pouvoir réitérer les mesures de titration, en particulier à pH basique. On s'affranchirait ainsi des effets énergétiques de cette deuxième protonation pour n'observer que ceux du Glu²¹⁹.

Chapitre II. Objectifs

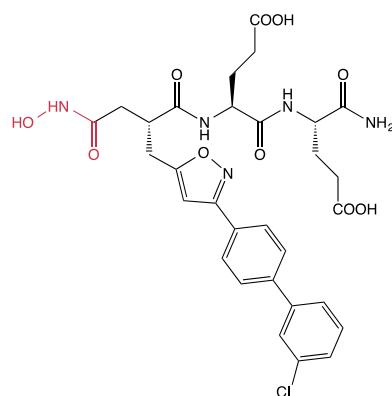
En dépit de trois décennies de recherches consacrées à la famille des MMP, il n'existe aujourd'hui que deux MMP pour lesquels des inhibiteurs hautement sélectifs et puissants ont été mis au point (MMP-12 et MMP-13). Cette frugalité nous pousse à nous interroger sur les origines de la sélectivité des composants sélectifs déjà identifiés. Dans cette optique, un premier travail sur le RXP470.1, un inhibiteur très sélectif de la MMP-12, avait permis au laboratoire d'évaluer le rôle joué par ses différentes chaînes latérales en termes de sélectivité. Cette étude avait également permis de mettre en perspective la dépendance au pH de l'affinité du RXP470.1 et la protonation du glutamate catalytique de la MMP-12 lors de sa liaison⁸⁴. Malheureusement, les énergies mises en jeu n'avaient pas pu être déterminées. Le premier objectif de ce travail a donc été de caractériser l'impact de la protonation du Glu²¹⁹ lors de l'interaction MMP-12/RXP470.1.

D'autre part, si de nombreuses études ont décrit l'utilisation de différents groupements chélatants dans le design d'inhibiteurs de MMP, peu se sont attachées à détailler leurs effets respectifs au sein d'une même série¹³². Nous avons donc synthétisé deux analogues du RXP470.1 variant essentiellement par la nature de leur pince à zinc afin de les comparer (Figure II.1). En introduisant des groupements (carboxylate et hydroxamate) qui présentent des constantes d'acidité et une avidité pour le zinc différentes de celles de la fonction phosphoryle du RXP470.1, nous nous attendons à des modifications majeures des profils d'affinité et de sélectivité. Le deuxième objectif de ce travail de thèse a donc été de caractériser ces trois analogues du point de vue biochimique, thermodynamique et structural.

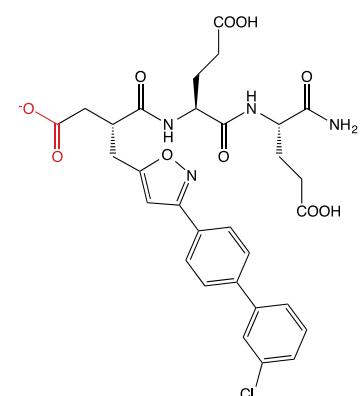
Composé 1 – RXP470.1



Composé 2



Composé 3

Figure II.1 : Structure des trois inhibiteurs étudiés

Malgré leur apparence très fondamentale, ces données s'inscrivent dans un contexte plus large que les seules MMP et devraient nous permettre de discuter plus largement l'effet rarement pris en compte des phénomènes de protonation liés à une interaction protéine-ligand. Plus particulièrement, dans le contexte de pathologies affectant le pH tissulaire local, le design de ligands puissants et sélectifs pourraient bénéficier de ce type de connaissances. En effet, la formulation opportune de nouvelles molécules thérapeutiques dont l'affinité serait fortement corrélée au pH doit permettre, en théorie, de favoriser leur accumulation *in situ*. Les retombées potentielles, tant en termes d'optimisation de profil pharmacologique que de dose efficace, sont suffisamment importantes pour que ce type d'étude retienne notre attention.

Chapitre III. Résultats

I. La lysine 241 : un résidu protonable à pH basique

Nous avons vu dans l'introduction que la liaison du RXP470.1 à la MMP-12 s'accompagne d'un transfert de protons depuis le solvant vers le complexe. Une étude menée au laboratoire en 2013 a permis de démontrer que cette liaison implique la protonation du Glu²¹⁹ à pH neutre et acide. Un deuxième résidu est cependant capable de se protoner à des valeurs plus élevées de pH. Le signal énergétique de ce second transfert de proton vient donc s'ajouter à celui à destination du Glu²¹⁹. Si le formalisme de Baker et Murphy¹⁰⁴ peut *a priori* s'accommorder de la prise de plusieurs protons, les grandeurs qui en résultent traduisent nécessairement le coût énergétique de la prise de l'ensemble de ces protons. En formulant l'hypothèse que chaque transfert de proton est indépendant des autres, on peut adapter l'équation 5 de manière à refléter cette prise multiple (équation 9).

$$N_{H^+} = \sum_i N_{H_i^+} = \sum_i \overline{H^{c_i}} - \overline{H^{f_i}} = \sum_i \frac{10^{pK_{a_{c_i}} - pH}}{1 + 10^{pK_{a_{c_i}} - pH}} - \frac{10^{pK_{a_{f_i}} - pH}}{1 + 10^{pK_{a_{f_i}} - pH}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Avec :

$N_{H_i^+}$ le nombre de protons transférés par le $i^{\text{ème}}$ groupement ionisable,

$\overline{H^{c_i}}, \overline{H^{f_i}}$ les fractions protonées de l'enzyme, respectivement libre et complexée,

$10^{pK_{a_{f_i}}}, 10^{pK_{a_{c_i}}}$ les constantes d'acidité du $i^{\text{ème}}$ groupe dans l'enzyme libre et complexée respectivement.

L'équation 8, qui détaille le poids relatif des effets de protonation sur la variation d'enthalpie de protonation, s'accommode ainsi des nouvelles valeurs de N_{H^+} et $\overline{H^c}$ selon l'équation 10.

$$\Delta\dot{H}_0 = \Delta\dot{H}_{\text{int}} + \sum_i N_{H_i^+} \cdot \Delta\dot{H}_p^{f_i} + \overline{H^{c_i}} \cdot \delta\Delta\dot{H}_p^i \quad (\text{Eq. 10})$$

Avec

$\Delta\dot{H}_p^{f_i}$ la variation d'enthalpie de protonation du $i^{\text{ème}}$ résidu protonable à l'état libre

$\delta\Delta\dot{H}_p^i$ la variation de cette grandeur lorsque l'enzyme est complexée.

Dans notre cas, nous voulons déterminer précisément les enthalpies associées à la protonation du Glu²¹⁹. Nous avons donc cherché à identifier le deuxième résidu ionisé afin de le muter et pouvoir ainsi appliquer le formalisme de Baker et Murphy à la protonation du Glu²¹⁹ uniquement.

I. A. Identification du résidu protonable à pH basique

I. A. a. Hypothèses de travail

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour identifier le résidu responsable de cette seconde protonation. L'analyse de la structure cristallographique du complexe MMP-12h F67D / RXP470.1 (code PDB : 4GQL) montre en effet la présence de trois résidus ionisables à proximité de l'inhibiteur : l'histidine 172 ainsi que les lysines 177 et 241.

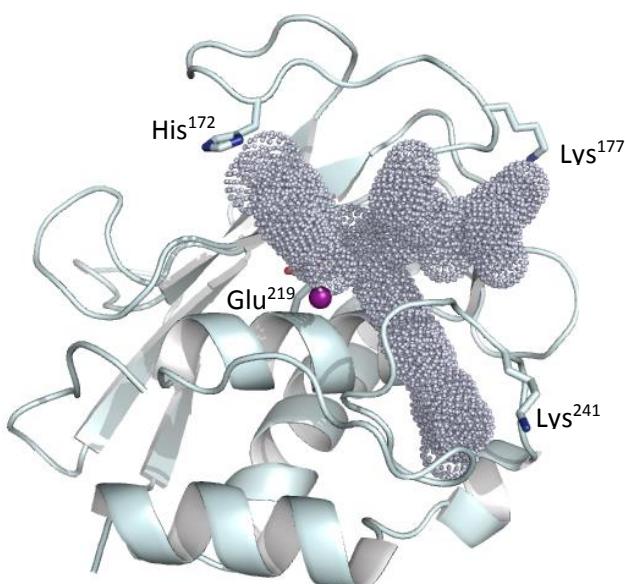


Figure III.1 : Résidus ionisables à proximité du RXP470.1 dans le site actif de la MMP-12h

Code PDB : 4GQL

Les résidus d'intérêt et le RXP470. sont mis en évidence sous forme de « stick model » et « dots » gris respectivement. La sphère violette représente l'atome de zinc catalytique.

Au contraire de la dépendance au pH de l'affinité du RXP470.1, l'histidine 172 n'est pas conservée entre toutes les MMP et a donc été écartée. Les deux lysines présentent quant à elles des pKa théoriques à l'état libre *a priori* éloignés des observations précédentes. Cependant, des travaux précédents au laboratoire ont montré qu'une sonde photoactivable à la structure proche de celle du RXP470.1 et comportant une chaîne isoxazol-phényle-N₃ en P1' pouvait modifier de façon covalente le groupe εNH₂ de la chaîne latérale de la Lysine 241. Ce groupe nitrène étant connu pour réagir avec des groupes nucléophiles, la Lys²⁴¹ se doit d'être sous forme déprotonée pour réagir, suggérant ainsi une altération de son pKa. Ces hypothèses ont par ailleurs été confortées en montrant un effet du pH sur le rendement de la réaction entre le nitrène de la sonde et le groupe εNH₂ de la Lys²⁴¹¹³³. Attendu que les groupements basiques enfouis dans un environnement hydrophobe présentent souvent un pKa abaissé, une telle hypothèse n'est d'ailleurs pas déraisonnable. Si le pKa d'une lysine en solution est

d'environ 10,4, des mesures réalisées sur la nucléase du staphylocoque doré (SNase) ont montré que le pKa de certaines lysines profondément enfouies était très altéré, descendant ainsi jusqu'à 5,3¹³⁴. D'autre part, le travail mené par l'équipe de Brouillette dont nous avons discuté en introduction avait également identifié une protonation en plus de celle du glutamate catalytique⁸². Celle-ci avait été attribuée à l'His²²⁴ dont la position en surface de la boucle S_{1'} de la MMP-3 correspond exactement à celle de la Lys²⁴¹ chez la MMP-12.

Nous avons donc décidé de produire un mutant Lys²⁴¹Ala de la MMP-12 afin de vérifier l'implication de ce résidu dans le phénomène de protonation observé à pH basique.

I. A. b. Validation du rôle de la Lys²⁴¹

La calorimétrie est une technique qui permet d'obtenir rapidement la stoechiométrie et la variation d'enthalpie de liaison associées à une réaction. Elle permet également, dans certaines conditions, de déterminer précisément la constante d'association du complexe (voir Figure I.25 en introduction). L'affinité très élevée du RXP470.1 pour la MMP-12 nous oblige à travailler dans des conditions de titration qui nous empêchent de mesurer précisément cette constante. En effet, pour observer un signal suffisamment confortable, nous devons travailler avec des concentrations enzymatiques de l'ordre du micro-molaire, soit bien au dessus des valeurs de constante de dissociation. Celles-ci ont donc été estimées en utilisant des substrats fluorogéniques.

Dans notre cas, la stoechiométrie de réaction du complexe RXP470.1/MMP-12 est bien déterminée (modèle 1 : 1) et sert de contrôle interne à la mesure. Au final, seule la détermination de la variation de l'enthalpie de liaison observée nous intéresse ici. Dans le cas classique où l'interaction des deux partenaires du complexe n'implique pas de résidus ionisables, la variation d'enthalpie de liaison est directement accessible par microcalorimétrie. Nous nous situons dans un cas plus complexe où la liaison du RXP470.1 implique la protonation d'un résidu chargé, le Glu²¹⁹. Dans ce cas, l'enthalpie de liaison observée par microcalorimétrie est pondérée par l'enthalpie d'ionisation du tampon de travail. Cet effet est directement traduit par l'équation 6 que nous avions vu en introduction (Chapitre I.III. B. b).

$$\Delta H_{\text{obs}}^\circ = \Delta H_0^\circ + N_{\text{H}^+} \cdot \Delta H_{\text{ion}}^b \quad (\text{Eq. 6})$$

Pour valider le rôle de la Lys²⁴¹ nous avons mesuré la fraction de protons échangés lors de la formation des complexes enzyme-inhibiteur à différentes valeurs de pH. Deux versions recombinantes du domaine catalytique de la MMP-12 ont été testées : MMP-12h F171D et MMP-12h F171D K241A. La mutation F171D a été décrite par l'équipe de Bertini¹³⁵ en 2003 et permet de manipuler des

concentrations élevées de MMP-12. Cette mutation se trouve à l'extrémité d'une boucle accessible au solvant et loin du site actif, elle permet donc d'augmenter la solubilité de la protéine sans perturber son activité protéolytique. Cette version de la protéine est également utilisée au laboratoire pour obtenir la structure cristallographique de nos inhibiteurs en complexe avec le domaine catalytique de la MMP-12. Le préfixe « h » fait référence à la forme humaine de la protéine.

Pour chaque valeur de pH, la variation d'enthalpie de liaison a été mesurée au moins en duplique dans quatre tampons aux enthalpies d'ionisation différentes (cf : Annexe V). En appliquant l'équation 6 on récupère alors la fraction de protons échangés (pente de la droite) et la variation d'enthalpie de liaison corrigée pour l'effet tampon (ordonnée à l'origine). La Figure III.2 nous permet ainsi de comparer les fractions de protons échangés induites par la liaison du RXP470.1 aux MMP-12 F171D et MMP-12 F171D K241A respectivement.

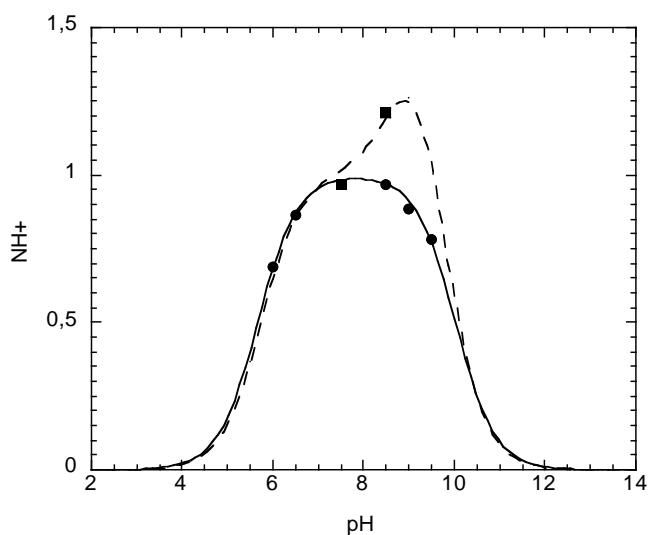


Figure III.2 : Visualisation de la prise de proton induite par la formation du protéine-ligand en fonction du pH

RXP470.1 vs MMP-12h F171D ■ et MMP-12h F171D K241A ●

Tampon 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, 25°C

VP-ITC, Malvern

Comme attendu, on reproduit bien le deuxième phénomène de protonation associé à la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h F171D déjà observé au laboratoire. En revanche, la fraction de protons échangés N_{H^+} ne dépasse pas 1 dans le cas de la MMP-12h F171D K241A. On observe une diminution de ce paramètre à partir de pH 8,5 ce qui suggère qu'au maximum un seul proton est échangé.

I. B. Discussion et conclusion

Sur la base de données structurales et biochimiques nous avons étudié un mutant du résidu Lys²⁴¹ et démontré l'implication de ce résidu dans une prise de protons dite secondaire. La protonation de ce résidu avait auparavant été observée à pH basique et gênait l'extraction de tous les paramètres décrivant la protonation du glutamate catalytique Glu²¹⁹ lors de l'interaction MMP-12/RXP470.1.

Afin de vérifier la pertinence de ce nouveau modèle, nous avons cristallisé la MMP-12h F171D K241A avec le RXP470.1. La superposition de cette structure avec celle du complexe RXP470.1/MMP-12 F171D permet de vérifier le positionnement canonique du RXP470.1 dans le site actif avec une très bonne superposition de la structure de l'inhibiteur dans ces deux versions de la MMP-12 (Figure III.3). Le positionnement du squelette peptidique est globalement conservé entre les deux structures, à l'exception de la chaîne latérale du glutamate en P_{3'}. Cette partie de l'inhibiteur est la plus exposée au solvant et donc *a priori* la plus mobile. Concernant la protéine, on note une très bonne superposition des éléments de structure secondaire ainsi qu'une bonne conservation de la topologie du site actif. En particulier, les éléments catalytiques mis en avant dans la Figure III.3 sont bien superposés (histidines, glutamate et zinc catalytiques).

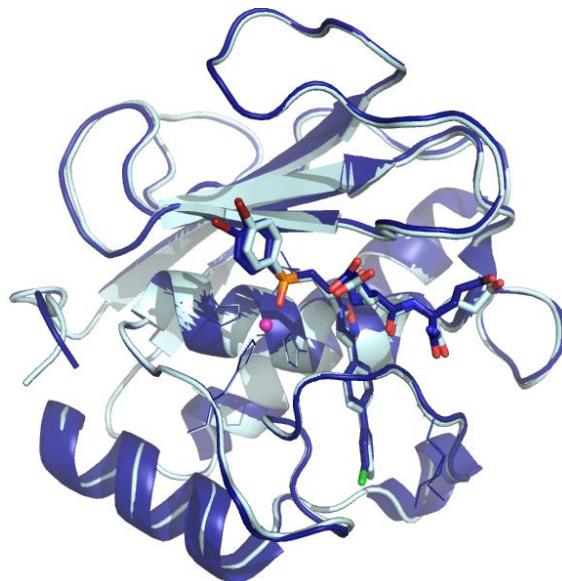


Figure III.3 : Superposition des structures cristallographiques du RXP470.1 en complexe avec la MMP-12h F171D (bleu foncé) et la MMP-12h F171D K241A (bleu clair)

Codes PDB : MMP12h F171D - 4GQL et MMP-12h F171D K241A – 5CZM

Mise en évidence du zinc (sphère - magenta), du glutamate catalytique, des histidines chélatantes et, de la lysine et de l'alanine en position 241 (représentation « stick »).

Nous avons également vérifié que l'activité de la protéine mutée était conservée en utilisant des substrats fluorogéniques. L'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A perd un facteur 3 par rapport à la MMP-12h F171D utilisée dans nos études précédentes. La dépendance au pH est en revanche bien conservée : on passe ainsi de 0,2 nM à pH 6 à 2,5 nM à pH 7,5, ce qui correspond à une perte d'affinité d'un facteur 12,5 en une unité et demi de pH (Figure III.4).

On peut enfin noter que la fraction de protons échangés lors de la liaison du RXP470.1 et l'affinité de cet inhibiteur pour la MMP-12h F171D K241A évoluent tout à fait différemment : l'affinité semble évoluer linéairement, alors que la fraction de protons échangés suit une courbe en cloche. Cette observation suggère que les phénomènes qui régissent l'affinité du RXP470.1 ne dépendent pas linéairement de la protonation qu'il induit dans le site actif de l'enzyme. C'est en ce sens que la dissection des profils thermodynamiques de la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h F171D K241A devrait nous permettre de mieux comprendre les origines énergétiques leur affinité.

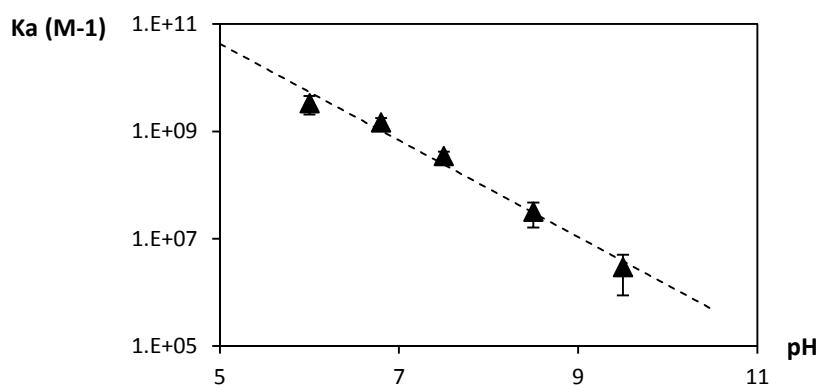


Figure III.4 : Affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

Tampon TRIS 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 25°C

En conclusion de cette première partie, nous disposons donc d'un mutant fonctionnel avec lequel nous poursuivrons toute notre étude.

II. Implications énergétiques de la liaison RXP470.1/ MMP-12h F171D K2421A

II. A. Mise en évidence d'un shift de pKa significatif

Grâce au mutant F171D K241A nous avons pu faire des mesures de calorimétrie sur une large gamme de pH (6 – 9,5). Ces mesures nous ont permis d'obtenir, pour chaque valeur de pH, la fraction de protons échangés N_H (Tableau III.1).

pH	6	6,5	7,5	8,5	9	9,5
N_{H+} ^a	0,69 (±0,02)	0,86 (±0,04)	0,97 (±0,01)	0,97 (±0,02)	0,89 (±0,03)	0,78 (±0,03)

Tableau III.1 : Effet du pH sur la fraction de proton échangés lors de la formation du complexe RXP470-MMP-12h F171D K241A

^a Erreur entre parenthèse

L'équation 5 est une équation à deux inconnues qui peuvent donc être déterminées grâce à seulement deux valeurs de N_{H+} . En injectant les données du Tableau III.1 dans l'équation 5, on obtient un système sur-déterminé, c'est à dire où le nombre d'équations (ici six) dépasse le nombre d'inconnues (deux dans notre cas). Ce type de système peut être résolu par la méthode des moindres carrés grâce à un logiciel adapté, ici le logiciel KaleidaGraph® (Version 4.1.3).

$$N_{H+} = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-pH}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-pH}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-pH}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-pH}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Avec :

$10^{pK_{a\text{libre}}}$ Constante de protonation du résidu ionisable dans la protéine libre,

$10^{pK_{a\text{lié}}}$ Constante de protonation du résidu ionisable dans la protéine complexée,

Ici, le résidu ionisable est le Glu²¹⁹.

$$\left\{ \begin{array}{l} 0,69 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-6}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-6}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-6}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-6}} \quad \text{à pH=6} \\ 0,86 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-6,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-6,5}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-6,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-6,5}} \quad \text{à pH=6,5} \\ 0,97 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-7,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-7,5}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-7,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-7,5}} \quad \text{à pH=7,5} \\ 0,97 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-8,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-8,5}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-8,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-8,5}} \quad \text{à pH=8,5} \\ 0,89 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-9}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-9}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-9}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-9}} \quad \text{à pH=9} \\ 0,78 = \frac{10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-9,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{lié}}} \cdot 10^{-9,5}} - \frac{10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-9,5}}{1 + 10^{pK_{a\text{libre}}} \cdot 10^{-9,5}} \quad \text{à pH=9,5} \end{array} \right. \quad (\text{Syst. 1})$$

Visuellement, les valeurs de pKa du Glu²¹⁹, à l'état libre et complexé, correspondent aux pH pour lesquels $N_{H^+}=0,5$, c'est à dire où 0,5 moles de protons sont échangées par mole de complexe (Figure III.7). La largeur à la base de la courbe représentative de l'équation 5 permet d'apprécier facilement l'écart important entre les valeurs de pKa à l'état libre et lié. Cette impression est validée par la résolution du système 1 : $pK_{\text{libre}} = 5,7 \pm 0,03$ et $pK_{\text{lié}} = 10 \pm 0,04$.

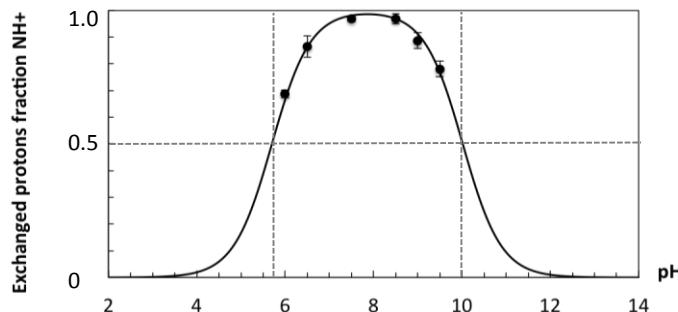


Figure III.5 : Prise de protons en fonction du pH

Tampon TRIS 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 25°C

Dans une situation idéale, il serait intéressant de valider ces valeurs calculées de pKa en répétant les mesures de N_{H^+} à pH 5,7 et 10 respectivement. Il est toutefois difficile dans un contexte biologique d'opérer à des pH si éloignés des valeurs physiologiques (perte d'activité, dénaturation de la protéine, diminution de sa solubilité...). Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas pu déterminer les valeurs de N_{H^+} pour des pH en dehors de la gamme présentée (6 – 9,5), ces données supplémentaires nous auraient pourtant permis d'affiner les valeurs de pKa. On peut en revanche grâce à l'équation 5 simuler des valeurs « extrêmes » de pKa qui passeraient par les valeurs limites de N_{H^+} ($N_{H^+} \pm \text{erreur associée}$) (Figure III.6). On constate ainsi que le pKa du Glu²¹⁹ à l'état libre est *a priori* compris entre 5,55 et 5,85 au maximum et le pKa_{lié} entre 9,8 et 10,1. Ces valeurs sont donc en bonne adéquation avec le fit obtenu par la méthode des moindres carrés.

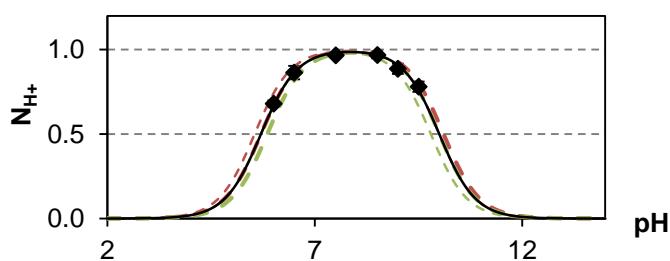


Figure III.6 : Dégénérescence des valeurs de pKa

Simulation à partir de l'équation 5. En noir, fit sur les données expérimentales : $pK_{\text{libre}} = 5,7 \pm 0,03$ et $pK_{\text{lié}} = 10 \pm 0,04$

Le pK_a du Glu^{219} apparaît donc largement affecté par la liaison du RXP470.1 qui implique un décalage vers des valeurs basiques et permet ainsi à ce résidu d'être sous forme protonée sur une plus large gamme de pH.

II. B. Détermination et dissection du profil thermodynamique de la liaison du RXP470.1

II. B. a. Effet du pH sur les profils thermodynamiques de la liaison du RXP470.1

En combinant les données issues de la calorimétrie et des mesures d'activité enzymatique, il est possible d'établir le profil thermodynamique de l'interaction RXP470.1/MMP-12h F171D K241A pour plusieurs valeurs de pH (Figure III.7). Les variations d'énergie libre ΔG° sont dérivées des mesures de K_i (constante d'inhibition) obtenues grâce à l'utilisation de substrats fluorogéniques (voir Chapitre V.III. D). Les variations d'enthalpie de liaison ΔH° ont été mesurées par ITC et corrigées pour l'effet tampon. Enfin, les variations d'entropie sont déduites des deux valeurs précédentes.

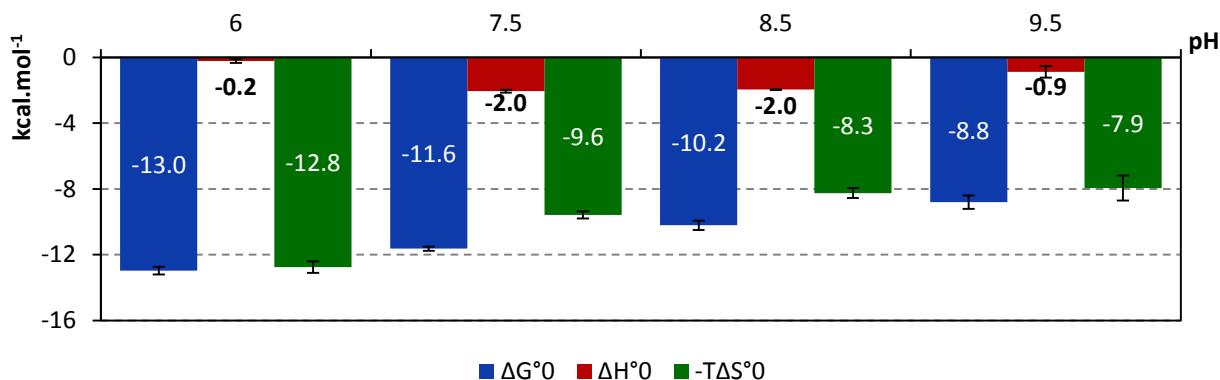


Figure III.7 : Evolution du profil thermodynamique de la liaison RXP470.1/ MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

Tris 20m, NaCl 200mM, CaCl₂ 3mM, ZnCl₂ 0,1mM, 25°C

Enthalpies corrigées pour l'effet tampon.

Pour rappel : $K_i(\text{pH}=6)= 0,2 \text{ nM}$, $K_i(\text{pH}=7,5)= 2,5 \text{ nM}$, $K_i(\text{pH}=8,5)= 28 \text{ nM}$, $K_i(\text{pH}=9,5)=340 \text{ nM}$

Dans tous les cas, les profils sont essentiellement guidés par la variation d'entropie de liaison. Les poids relatifs des variations d'enthalpie et d'entropie de liaison varient en fonction du pH mais, contrairement aux variations d'énergie libre, ne suivent pas, dans cette gamme de pH, une pente linéaire. Le poids de l'enthalpie de liaison semble suivre une courbe en cloche : maximal pour les valeurs de pH comprises entre 7,5 et 8,5. Il s'affaiblit à mesure que l'on s'éloigne de cette zone optimale. En ce sens, ces variations suivent celles des fractions de protons échangés établies dans la partie précédente (Figure III.6). On peut noter dès ce stade de nos mesures que les valeurs de pH pour

lesquelles les variations d'enthalpies de liaison sont les plus favorables correspondent parfaitement à celle où la protonation du Glu²¹⁹ est maximale ($N_{H^+} = 1$). La courbe relative aux variations d'entropie n'est pas aussi triviale mais il semble que la composante entropique diminue à mesure que le pH augmente. De façon assez contraintuitive, la meilleure affinité observée à pH acide ne vient donc pas d'un effet enthalpique exacerbé, mais de la variation d'entropie liée à l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F17D K241A.

On note en particulier que si, à pH 7,5 et 8,5, les variations d'enthalpie de liaison sont identiques, ce n'est ni le cas des variations d'énergie libre, ni des variations entropiques. Comme les variations d'énergie libre, et donc l'affinité, dépendent conjointement des variations d'enthalpie et d'entropie, on peut en déduire que, prises seules, les considérations enthalpiques ne suffisent pas à expliquer les variations d'affinité. Une composante entropique sensible au pH et d'origine inconnue pour le moment vient compléter ce phénomène.

II. B. b. Coût enthalpique de la protonation du Glu²¹⁹

La détermination du pKa du Glu²¹⁹ dans l'enzyme libre ou liée permet d'accéder à un deuxième niveau d'informations thermodynamiques : la quantification du coût énergétique induit par l'échange de protons avec le solvant.

On a déjà vu au chapitre précédent que cet échange de protons induit un premier coût enthalpique directement observable par ITC : la prise d'un proton au tampon (équation 6). Cet effet était alors représenté par ΔH_{ion}^b , l'enthalpie de déprotonation du tampon. On s'intéresse ici au coût induit par la protonation du Glu²¹⁹. Comme pour le pKa, cette grandeur enthalpique est associée à l'état de liaison de la protéine. On définit ainsi ΔH_p^f , l'enthalpie de protonation du glutamate dans l'enzyme libre, et $\delta\Delta H_p$ la variation de cette enthalpie induite par la liaison du RXP470.1. On accède à ΔH_{int}° , la variation d'enthalpie intrinsèque, en retranchant le coût énergétique de la protonation du glutamate à la variation d'enthalpie de liaison globale ΔH_0° déterminée par calorimétrie (équation 8). Ces trois grandeurs sont indépendantes du pH et il suffit en théorie de connaître les valeurs de N_{H^+} et $\overline{H^C}$ à trois valeurs de pH pour les déterminer (Tableau III.2).

$$\Delta H_{obs}^\circ = \Delta H_0^\circ + N_{H^+} \cdot \Delta H_{ion}^b \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\Delta H_0^\circ = \Delta H_{int}^\circ - N_{H^+} \cdot \Delta H_p^f + \overline{H^C} \cdot \delta\Delta H_p \quad (\text{Eq. 8})$$

pH	6	6,5	7,5	8,5	9	9,5
N_{H^+} ^a	0,69 ($\pm 0,02$)	0,86 ($\pm 0,04$)	0,97 ($\pm 0,01$)	0,97 ($\pm 0,02$)	0,89 ($\pm 0,03$)	0,78 ($\pm 0,03$)
ΔH°_0 ^{a, b} (kcal.mol ⁻¹)	-0,2 ($\pm 0,1$)	-1,1 ($\pm 0,3$)	-2 ($\pm 0,1$)	-1,9 ($\pm 0,1$)	-0,9 ($\pm 0,3$)	-0,87 ($\pm 0,3$)
\bar{H}^C ^c	0,9999	0,9997	0,997	0,9707	0,9128	0,7681

Tableau III.2 : Effet du pH sur la fraction de proton échangés et l'enthalpie de liaison lors de la formation du complexe RXP470-MMP-12h F171D K241A

^a Erreur entre parenthèse

^b Valeur corrigée pour l'effet tampon

^c calculé grâce à l'équation 4 : $\bar{H}^C = \frac{K_p^C \cdot 10^{pH}}{1 + K_p^f \cdot 10^{pH}}$

Comme précédemment, nous sommes face à un système surdéterminé (trois inconnues, ΔH°_p , $\delta\Delta H_p$, et ΔH°_{int} , pour six équations) qui peut être résolu par la méthode des moindres carrés (ici grâce au logiciel R, version 2.15.3).

On obtient alors les valeurs indépendantes du pH : $\Delta H^\circ_p = -5,8$ kcal.mol⁻¹, $\delta\Delta H_p = 0,02$ kcal.mol⁻¹ et $\Delta H^\circ_{int} = 3,8$ kcal.mol⁻¹ (Figure III.8).

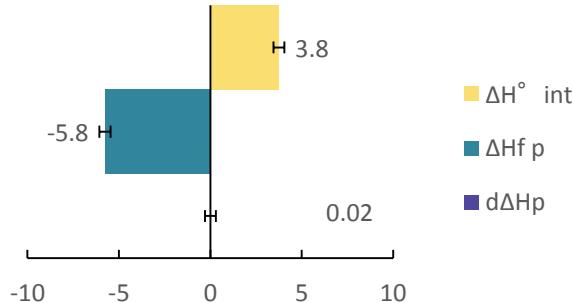


Figure III.8 : Détermination des valeurs indépendantes du pH : ΔH°_{int} , ΔH°_p and $d\Delta H_p$

Dans l'équation 8, ces valeurs enthalpiques sont pondérées par la fraction de protons échangés lors de la liaison du RXP470.1. Leur importance varie donc nécessairement en fonction du pH auquel la mesure est effectuée (Figure III.9). En particulier à pH 7,5, un proton est arraché au tampon pour chaque complexe protéine-inhibiteur formé ($N_{H^+} = 0,97$) : le poids de l'enthalpie de protonation du Glu²¹⁹ est donc maximal. Dans ce cas, elle permet de compenser totalement la variation d'enthalpie de liaison intrinsèque ($|N_{H^+} \cdot \Delta H^\circ_p| > |\Delta H^\circ_{int}|$), et conditionne la variation d'enthalpie favorable finalement observée : $\Delta H^\circ_0 = -2$ kcal.mol⁻¹. Ce phénomène s'observe de manière identique à pH 8,5 et dans une moindre mesure à pH 6 et 9,5.

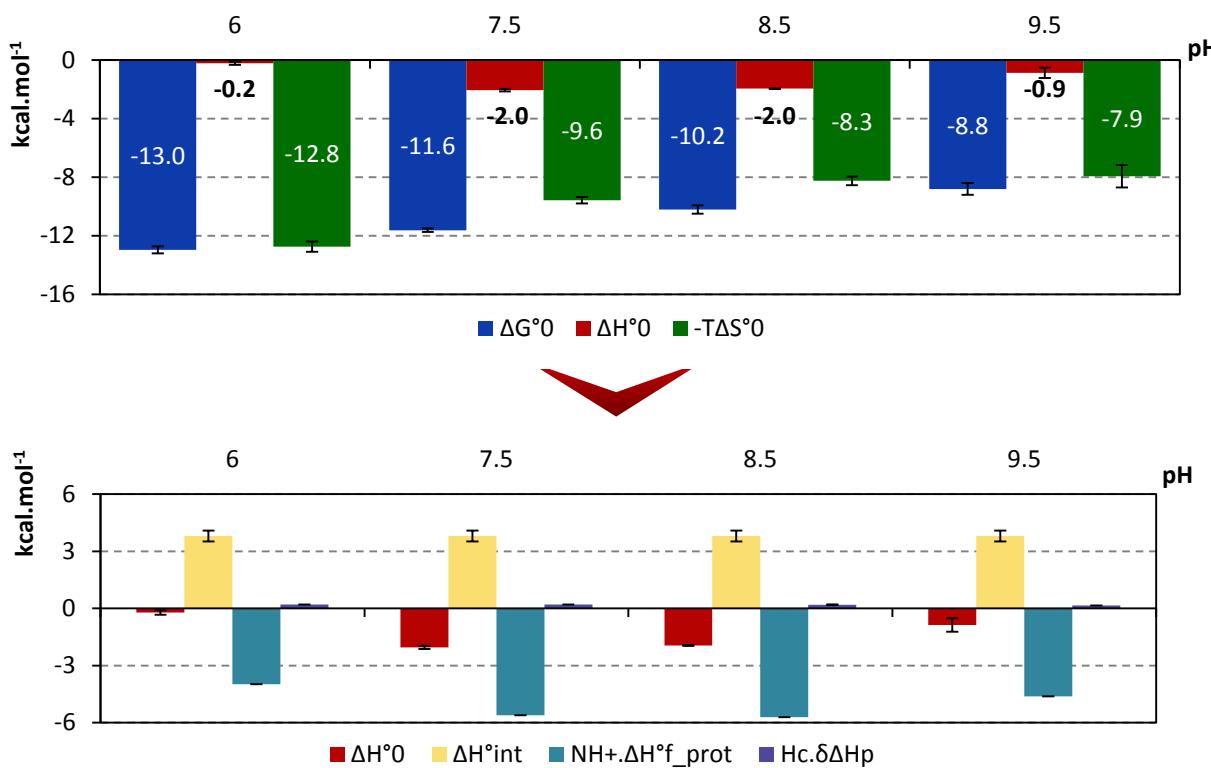


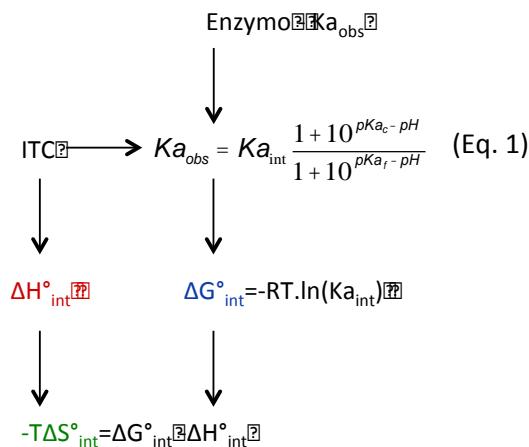
Figure III.9 : Evolution de la dissection enthalpique de la liaison RXP470/MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

TRIS 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 25°C

VP-ITC, Malvern

II. C. Détermination des paramètres intrinsèques de liaison

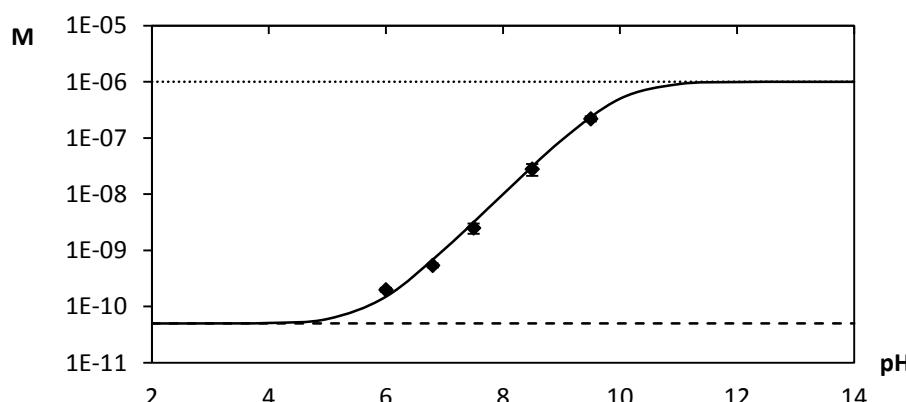
De la même façon que l'on distingue variation d'enthalpie de protonation et variation d'enthalpie intrinsèque, il est possible de définir des variations d'énergie libre et d'entropie intrinsèques, c'est à dire dépouillées des effets de protonation. Pour accéder à ces valeurs, il faut d'abord passer par la constante d'affinité intrinsèque $K_{a_{int}}$ qui donne accès aux variations d'énergie libre intrinsèques ΔG°_{int} grâce à la relation de van't Hoff. $K_{a_{int}}$ peut être obtenue en mesurant la constante d'affinité apparente $K_{a_{obs}}$ à différentes valeurs de pH (équation 1). Dans le cadre de ce travail, ces valeurs ont été déterminées en mesurant l'activité de la MMP-12h F171D K241A grâce à l'utilisation de substrats fluorogéniques (cf : Chapitre V.III. D). Finalement, les variations d'entropie de liaison intrinsèque $-\Delta S^\circ_{int}$ sont déduites de la relation $\Delta G^\circ_{int} = \Delta H^\circ_{int} - T\Delta S^\circ_{int}$ (Figure III.10).

**Figure III.10 : Mode d'obtention des données intrinsèques**

L'équation 1 permet en premier lieu d'accéder à la constante d'association Ka_{int} mais également de pouvoir simuler les valeurs de Ka_{obs} sur toute la gamme de pH une fois ce paramètre déterminé (Figure III.11). En inversant l'équation 1, on accède aux constantes d'inhibition intrinsèque et observée (équation 1').

$$Ki_{obs} = Ki_{int} \frac{1+10^{pK_{alié}-pH}}{1+10^{pK_{libre}-pH}} \quad (Eq. 1')$$

Une régression non linéaire de nos données expérimentales réalisée avec le logiciel KaleidaGraph® indique ainsi une valeur de $Ki_{int} = 1,04 \pm 0,05 \mu M$. Cette valeur, qui décrit en réalité une situation où le Glu²¹⁹ dans l'enzyme complexée ne serait pas protoné, correspond au cas particulier où le pH est supérieur au $pK_{alié}$ du Glu²¹⁹. En effet, pour ces hautes valeurs de pH $\frac{1+10^{pK_{libre}-pH}}{1+10^{pK_{alié}-pH}} \approx 1$ d'où $Ki_{obs} \approx Ki_{int}$. Aux valeurs de pH acides et donc inférieures au pK_{libre} du glutamate catalytique, la constante d'inhibition observée tend vers un autre plateau : $Ki_{int} \frac{10^{pK_{libre}}}{10^{pK_{alié}}} \approx 50 \text{ pM}$.

**Figure III.11 : Evolution de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K2421A**

Simulations réalisées en utilisant les valeurs de Ki_{obs} , pK_a_c and pK_a_f obtenues expérimentalement
 $Ki_{min} = 50 \cdot 10^{-12} M$ (---) $Ki_{int} = 10^{-6} M^{-1}$ (---) Ki_{obs} (—) Valeurs expérimentales de Ka (◆)

Tout comme la dissection des paramètres entropiques de la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h F171D K241A, ces résultats pointent clairement vers un effet favorable de la protonation du Glu²¹⁹.

A partir de la valeur de $K_{i\text{nt}}$, il est facile de déduire les valeurs de $\Delta G^\circ_{\text{int}}$ et $-T\Delta S^\circ_{\text{int}}$ (Tableau III.3). L'affinité intrinsèque du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D est ainsi principalement portée par les variations d'entropie de liaison, particulièrement favorables.

RXP470.1	
MMP-12H F171D K241A	
$\Delta G^\circ_{\text{int}}$	-8.2
kcal.mol ⁻¹	(±0,1)
$\Delta H^\circ_{\text{int}}$	3.8
kcal.mol ⁻¹	(±0,3)
$-T\Delta S^\circ_{\text{int}}$	-11.9
kcal.mol ⁻¹	(±0,1)

Tableau III.3 : Valeurs thermodynamiques intrinsèques caractérisant l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A

Pour rappel, à pH 7,5, la constante d'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A vaut $3,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, ce qui correspond à énergie libre $\Delta G^\circ = -11,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

II. D. Discussion

Toutes les analyses qui s'attachent à décrire le dépendance au pH d'une interaction entre un récepteur et son ligand reposent sur un même postulat : si le pH influe sur la qualité d'une interaction, alors certains groupements (qu'ils appartiennent au ligand ou au récepteur) doivent se trouver dans un état d'ionisation particulier pour favoriser la réaction. En amont de leur interaction, le ligand et son récepteur en solution forment, séparément, un certain nombre de liaisons avec les molécules d'eau du solvant. La formation du complexe récepteur-ligand provoque la rupture de certaines de ces liaisons qui sont alors remplacées par de nouvelles interactions au sein même du complexe. Si l'état d'ionisation de l'un ou l'autre des partenaires empêche la formation de certaines de ces nouvelles liaisons, la réaction devient défavorable et le complexe tend à se dissocier. Dès 1982, soit bien avant la généralisation des outils de calorimétrie, Waelbroeck proposait ainsi une méthode permettant d'interpréter les effets du pH dans le cadre de réactions enzymatiques. L'auteur décrit là un formalisme basé sur des mesures d'activité enzymatique qui lui permet de déterminer non seulement le nombre de protons échangés lors de l'interaction entre l'insuline et son récepteur cellulaire endogène, mais également la constante d'acidité et la chaleur d'ionisation liées à cette réaction ¹³⁶. Waelbroeck distingue en particulier la constante d'affinité observée ($K_{a\text{obs}}$) qui dépend de l'état de protonation du récepteur et du ligand de la constante d'affinité «réelle» ($K_{a\text{int}}$). $K_{a\text{int}}$ correspond ainsi à la constante d'affinité que l'on observerait

dans des conditions où tous les partenaires se trouvent sous forme déprotonée. Chacun des groupements ionisables du récepteur et du ligand se caractérise par une constante d'ionisation pK qui détermine son état d'ionisation à une valeur de pH donnée. Dans ce formalisme, la représentation graphique de la différence $\log(K_{a_{\text{obs}}}) - \log(K_{a_{\text{int}}})$ traduit directement le nombre de groupements ionisables impliqués dans l'interaction protéine ligand (Figure III.12).

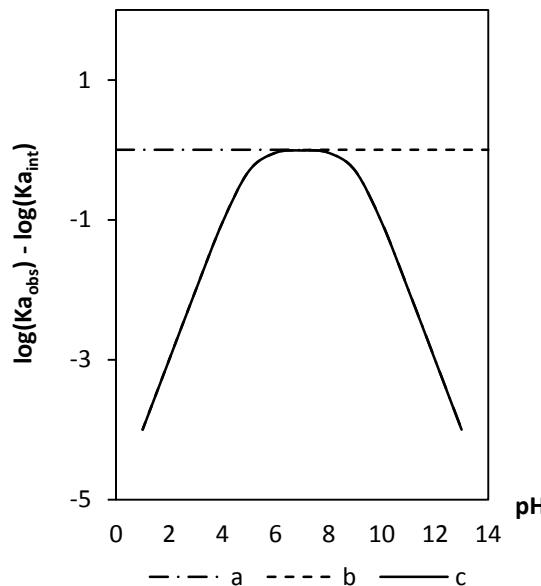


Figure III.12 : Courbes théoriques représentant l'équation 12

Adapté de Waelbroeck, 1982¹³⁶

- a** : l'interaction requiert la protonation d'un ou plusieurs résidus,
b : l'interaction requiert la déprotonation d'un ou plusieurs résidus,
c : cas mixte où certains résidus doivent être sous forme protonée, et d'autres déprotonée.
Dans chaque cas, la pente correspond au nombre de résidus à protoner ou déprotoner.

Si les techniques ont beaucoup évolué depuis 1982 et permettent aujourd’hui d’évaluer de manière différente les effets du pH sur l’interaction d’une protéine avec son ligand, les phénomènes décrits par Waelbroeck peuvent toujours être appliqués, notamment à notre interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A. Si l’on reporte sur un graphique la différence $\log K_{a_{\text{obs}}} - \log K_{a_{\text{int}}}$ en fonction du pH, la courbe obtenue présente une allure sigmoïde similaire à celle de la Figure III.12 a. Dans notre cas, la pente vaut -1 ce qui correspond bien à un proton échangé entre le solvant et le Glu²¹⁹ suite à la liaison du RXP470.1, comme prédit par nos mesures de calorimétrie.

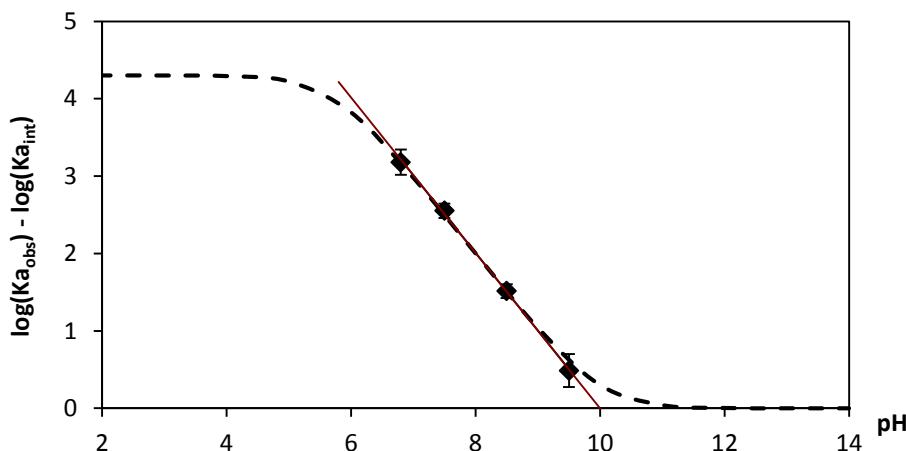


Figure III.13 : Evolution de la partie dépendante du pH de l'affinité du RXP470.1 ¹³⁶

Valeurs théoriques calculées (---) Valeurs expérimentales (◆)

La fraction de protons échangés N_{H+} lors de la liaison du RXP470.1 traduit en réalité la différence entre les proportions d'enzyme protonée à l'état complexé (\bar{H}^C) et libre (\bar{H}^f) (Figure III.14 A.). Le $pK_{\text{alié}}$ correspond ainsi au pH pour lequel 50% de l'enzyme libre est déprotonée, et, de la même manière, le $pK_{\text{alié}}$ coïncide avec le pH où 50% de l'enzyme complexée est déprotonée. C'est cette évolution de la valeur du pK_a du Glu²¹⁹ entre les états libre et complexé qui permet un échange de protons au moment de la liaison de l'inhibiteur. L'interprétation de la dissection enthalpique peut également être réalisée depuis le prisme des fractions d'enzyme, où le Glu²¹⁹ est protoné, en fonction du pH. En effet l'équation 7 du formalisme de Baker et Murphy permet de relier directement la variation d'enthalpie de liaison à l'état de protonation du glutamate catalytique ($\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ + N_{H+} \cdot \Delta H_p^f + \bar{H}^C \cdot \delta \Delta H_p$ (Eq. 8)). On peut ainsi distinguer trois cas selon le pH du solvant (Figure III.14).

Dissection enthalpique : cas où le pH est très supérieur au $pK_{\text{alié}}$

Quel que soit le statut de l'enzyme, libre ou complexée, le Glu²¹⁹ ne peut pas être protoné pour des valeurs de pH élevées, il n'y a donc pas de transfert de protons. Le Glu²¹⁹ apparaît sous forme ionisée (COO^-), que la MMP-12h soit seule ou en interaction avec le RXP470.1, on a alors $\bar{H}^f = \bar{H}^C = N_{H+} = 0$ (Figure III.14 A-B.). La variation d'enthalpie de liaison associée à cette interaction ne bénéficie donc pas de l'effet positif de l'enthalpie de protonation du Glu²¹⁹ (Figure III.14 C.) et se résume à sa seule composante intrinsèque $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ$ (simplification de l'équation 8). Celle-ci, largement positive, donc défavorable, traduit l'incapacité du RXP470.1 à établir avec la MMP-12h un réseau de liaisons suffisant pour compenser les interactions intramoléculaires déstabilisées voire détruites par son arrivée dans le site actif.

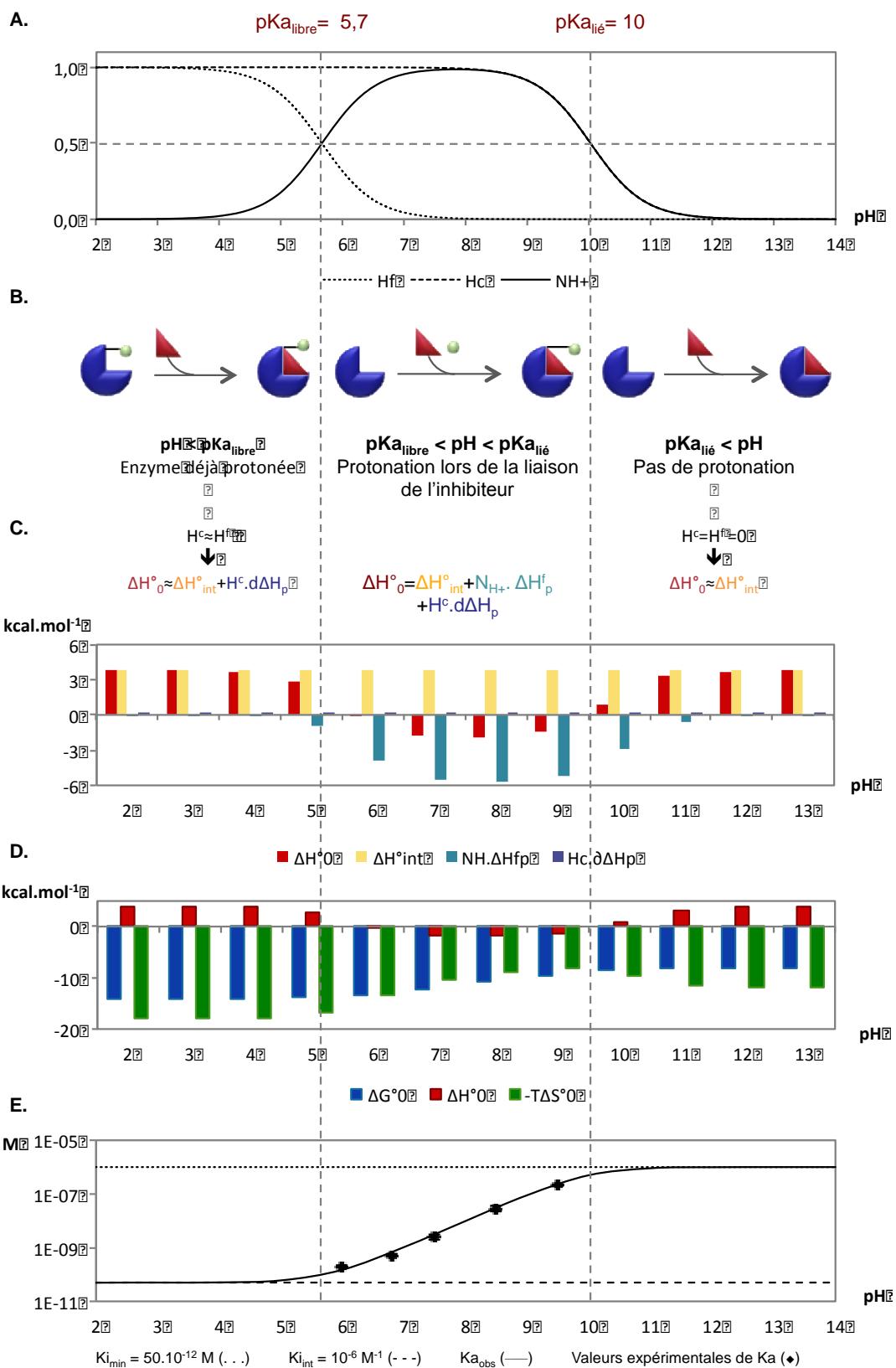


Figure III.14 : Mise en perspective des paramètres de la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h

- A. Variation de la fraction de protons échangés en fonction du pH B. Protonation de l'enzyme suite à la fixation du ligand : schéma explicatif
- C. Evolution de la dissection enthalpique (simulation)
- D. Evolution des profils thermodynamiques (simulation)
- E. Evolution de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h

Dissection enthalpique : cas où le pH est très inférieur au $pK_{a\text{libre}}$

Le glutamate catalytique est ici déjà protoné, la liaison du RXP470 ne provoque donc pas de transfert de proton entre le solvant et le complexe. L'enzyme qu'elle soit libre ou complexée est toujours protonée, on a donc $\bar{H}^f = \bar{H}^c$, c'est à dire $N_{H^+} = 0$ (Figure III.14 A-B.). L'équation 8 peut alors être simplifiée de sorte que : $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ + \bar{H}^c \cdot \delta \Delta H_p$. On a pu estimer précédemment que la variation d'enthalpie de protonation du Glu²¹⁹ entre les états libre et complexé $\delta \Delta H_p$ était presque nulle (0,02 kcal.mol⁻¹), l'expression de la variation de l'enthalpie de liaison est ainsi réduite, à nouveau, à la seule enthalpie intrinsèque de liaison $\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ$. A ce stade, on peut néanmoins se souvenir que nos simulations avaient prédict une affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h particulièrement élevée (50 pM) pour cette gamme de pH. Nous discuterons de cette divergence un peu plus bas.

Dissection enthalpique : cas où le pH se situe entre les valeurs de $pK_{a\text{libre}}$ et $pK_{a\text{lié}}$

Dans un premier temps, le Glu²¹⁹ se présente sous sa forme ionisée (COO-) car le pH du milieu est supérieur à son pKa. L'arrivée du RXP470.1, en modifiant ce pKa (qui devient alors supérieur au pH environnant) permet alors le transfert d'un proton depuis une molécule d'eau adjacente et le passage du Glu²¹⁹ à sa forme neutre (COOH) (Figure III.14 A-B.). Dans ce cas, l'expression de la variation d'enthalpie de liaison de la MMP-12h ne peut pas être simplifiée. L'effet favorable de l'enthalpie de protonation du glutamate est à son maximum pour les valeurs de pH situées à mi-distance des pKa libre et lié.

Ce raisonnement s'applique également, mais dans une moindre mesure, aux pH proches des valeurs de pKa libre et lié. En effet pour des pH proches du $pK_{a\text{libre}}$, une partie des enzymes en solution présentent donc déjà un glutamate catalytique protoné avant même la liaison du RXP470.1. N_{H^+} ne pondère donc pas l'enthalpie de protonation ΔH_p^f au maximum. Réciproquement, aux pH proches du $pK_{a\text{lié}}$, une fraction seulement des enzymes en solution se protonent suite à la fixation du RXP470.1. L'effet favorable de l'enthalpie de protonation du Glu²¹⁹ n'est donc que partiel (Figure III.14 C.).

La Figure III.15 permet de retranscrire graphiquement l'évolution des différents termes composant la variation d'enthalpie de liaison associée à l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A. On y retrouve bien l'effet prépondérant de l'enthalpie de liaison intrinsèque $\Delta H_{\text{int}}^\circ$ aux valeurs extrêmes de pH. Pour les valeurs intermédiaires de pH, la protonation de l'enzyme complexée est, de manière cohérente avec la discussion précédente, la source principale d'enthalpie. En effet c'est l'altération du pKa du glutamate catalytique lors de la liaison du RXP470.1 qui permet la protonation de ce résidu. C'est donc dans l'enzyme complexée que la protonation à lieu. Dès lors, il était attendu que l'effet enthalpique favorable de la protonation du Glu²¹⁹ soit associé au complexe protéine/inhibiteur.

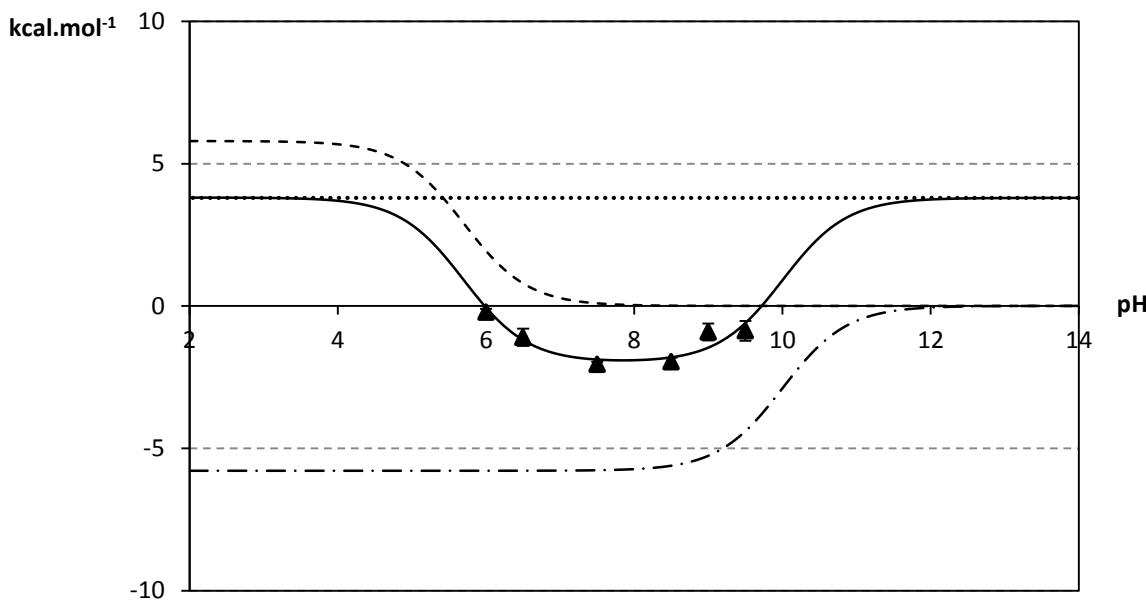


Figure III.15 : Contribution des différentes composantes enthalpiques

$$\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ - \bar{H}^f \cdot \Delta H_p^\circ + \bar{H}^c \cdot (\Delta H_p^\circ + \delta \Delta H_p) \quad (\text{---})$$

Contribution intrinsèque : $\Delta H_{\text{int}}^\circ$ (....)

Contribution de la protonation de l'enzyme libre : $-\bar{H}^f \cdot \Delta H_p^\circ$ (---)

Contribution de la protonation de l'enzyme complexée : $\bar{H}^c \cdot (\Delta H_p^\circ + \delta \Delta H_p)$ (._._)

Valeurs expérimentales (◆)

Analysés du point de vue enthalpique seulement, tous ces résultats nous indiquent que, dans un premier temps, le réseau de liaisons établies entre le RXP470.1 et la MMP-12 ne se traduit pas par une enthalpie favorable. En revanche, l'intervention d'un proton pour neutraliser l'affrontement de deux charges négatives (respectivement le carboxylate COO^- du Glu^{219} et le phosphinate POO^- de l'inhibiteur), est un événement enthalpiquement favorable qui permet, dans une gamme de pH bien définie, de compenser l'enthalpie de liaison intrinsèque. La valeur positive de l'enthalpie de liaison intrinsèque constitue par ailleurs l'une des surprises de cette étude. En effet, la structure cristallographique du RXP470.1 en complexe avec la MMP-12h, obtenue au laboratoire en 2012, suggérait de nombreuses liaisons hydrogènes, ainsi que de multiples contacts de van der Waals (Figure III.16), soit autant d'interactions enthalpiquement favorables. Deux remarques peuvent être avancées pour étayer cette enthalpie défavorable. Dans un premier temps, il faut se rappeler que l'enthalpie de liaison intrinsèque représente l'interaction entre le RXP470.1 et le Glu^{219} de la MMP-12h F171D K241A dans leurs états déprotonés. La proximité des deux charges négatives (POO^- et COO^- respectivement) induit une pénalité enthalpique immédiate qui est retranscrite dans l'enthalpie de liaison intrinsèque. Une deuxième contribution, allant dans le sens d'une enthalpie de liaison intrinsèque défavorable, vient de l'analyse des trois cycles introduits en position P_1' , dont le positionnement relève d'un compromis entre l'optimisation des interactions protéine/inhibiteur et le maintien des trois cycles dans une

conformation acceptable. En particulier, en solution, les deux cycles phényles s'agencent probablement à 90°, la semi planarité induite par la poche S_{1'} (trop étroite pour accueillir deux cycles aromatiques orientés perpendiculairement) se traduit certainement par une contribution enthalpique défavorable. Dans ce cas, l'inhibiteur serait, d'une part, incapable de former des interactions de qualité avec les résidus de la cavité et, de l'autre, dans une conformation peu optimisée compte tenu de l'orientation de ses cycles. Il en résulte un positionnement intermédiaire, peu favorisé du point de vue enthalpique.

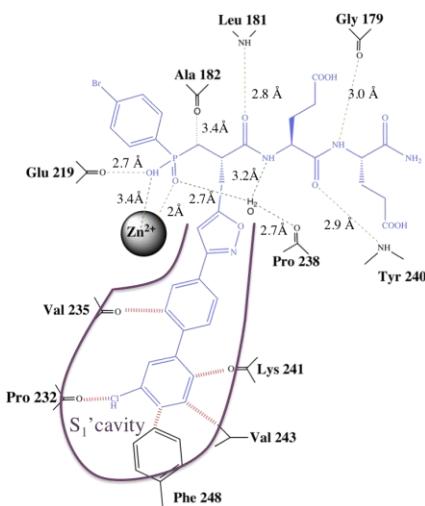


Figure III.16 : Détail des interactions entre les résidus du site actif de la MMP-12h F171D et le RXP470.1

Code PDB : 4GQL

Tiré de Czarny, et al., 2013⁸⁴.

Au fil du pH, la variation d'enthalpie de liaison associée à l'interaction RXP470.1 / MMP-12h suit une courbe en cloche qui correspond parfaitement à celle de la fraction de protons échangés. En revanche l'analyse des variations de l'entropie de liaison ainsi que de l'énergie libre (et donc d'affinité) de cette réaction montre une toute autre évolution.

Evolution de l'affinité du RXP470.1 pour la MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

La simulation de l'affinité du RXP470.1 grâce à l'équation 1' ($K_{i\text{obs}} = K_{i\text{int}} \frac{1+10^{\text{p}K_{\text{a,libre}}-\text{pH}}}{1+10^{\text{p}K_{\text{a,lié}}-\text{pH}}}$) permet de visualiser son évolution en fonction du pH. Ses variations suivent une sigmoïde dont le maximum est atteint aux valeurs les plus basiques de pH, et le minimum aux valeurs les plus acides. L'exploitation de l'équation 1 permet également de s'intéresser aux valeurs extrêmes de pH. Ces valeurs de pH ont peu de pertinence biologique puisque les MMP ne sont, *a priori*, pas amenées à se retrouver dans des compartiments dont le pH est inférieur à 4 ou supérieur à 10. Elles permettent en revanche de raisonner aux limites du système dont elles proposent une vision simplifiée.

Dans la zone où le pH dépasse 10, $\lim_{\text{pH} \rightarrow 14} \frac{1+10^{\text{pK}_{\text{libre}}-\text{pH}}}{1+10^{\text{pK}_{\text{lié}}-\text{pH}}} = 1$, ce qui permet de simplifier l'équation 1 en $K_{\text{obs}} \approx K_{\text{int}} = 10^{-6} \text{ M}$. Cette valeur va dans le même sens que $\Delta H^\circ_{\text{int}}$ et suggère là encore que le réseau de liaisons établi par le RXP470.1 lors de son interaction avec la MMP-12h ne suffit pas, à lui seul, à compenser les liaisons intramoléculaires déstabilisées par son entrée dans le site actif (Figure III.14 E.).

A l'inverse, pour des pH inférieurs à 4, un plateau correspondant à des affinités beaucoup plus élevées est atteint (la différence entre les plateaux minimum et maximum atteint quasiment cinq ordres de grandeur). Dans cette zone, l'équation 1 peut être simplifiée telle que $K_{\text{obs}} = K_{\text{int}} \frac{10^{\text{pK}_{\text{libre}}}}{10^{\text{pK}_{\text{lié}}}} \approx 50 \text{ pM}$ (Figure III.14 E.). Pourtant, on a vu précédemment qu'aux pH acides la variation d'enthalpie de liaison était réduite à sa seule composante intrinsèque, défavorable. La très haute affinité du RXP470.1 doit donc nécessairement posséder une composante entropique très favorable (Figure III.14 D.) à ces valeurs de pH.

Evolution du profil thermodynamique de l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

On a vu dans la partie résultats qu'il était possible de simuler, grâce à la constante d'affinité intrinsèque, la constante d'affinité observée du RXP470.1 pour la MMP-12H F171D K241A, sur toute la gamme de pH. La loi de van't Hoff permet alors de calculer dans un même temps les variations d'énergie libre quel que soit le pH :

$$\Delta G = -RT \ln(K_{\text{obs}}) \quad (\text{Eq. 11})$$

Comme les variations d'enthalpie de liaison peuvent elles aussi être simulées (équations 3, 5 et 8), il est facile d'en déduire les variations de l'entropie de liaison $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Ces variations sont rapportées dans la Figure III.17.

On constate ainsi que chaque grandeur suit un profil différent. Les variations d'enthalpie de liaison évoluent selon une courbe en cloche et les variations d'énergie libre selon une sigmoïde, ce qui était attendu au vu de l'évolution de la constante d'affinité observée en fonction du pH (Figure III.14 E.). L'évolution des variations d'entropie de liaison adopte un profil mixte traduisant la différence entre ΔG et ΔH .

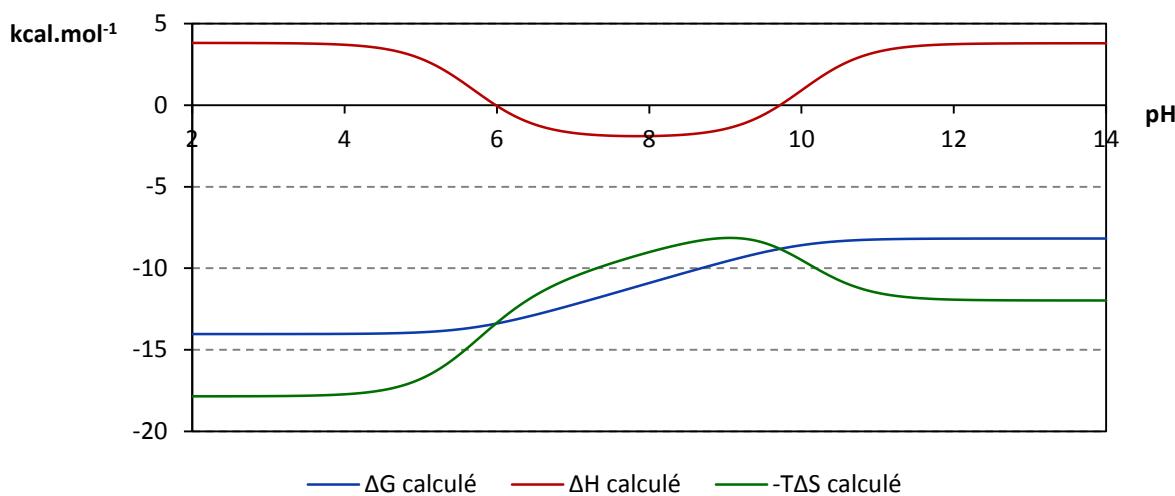


Figure III.17 : Evolution des composantes énergétiques de l'interaction RXP470.1 / mMP-12h F171D K241A en fonction du pH

Simulation de ΔG à partir de la loi de van't Hoff et de ΔH à partir de l'équation 8. $-\Delta S$ représente la différence entre ces deux grandeurs.

La variation d'entropie de liaison étant donc clairement affectée par le pH, il est tentant de chercher à la décomposer de la même manière que la variation d'enthalpie de liaison :

$$-\Delta S_0^\circ = -\Delta S_{\text{int}}^\circ - N_{\text{H}^+} \cdot \Delta S_p^f - \overline{H^C} \cdot \Delta \Delta S_p \quad (\text{Eq. 12})$$

Avec :

$\Delta S_{\text{int}}^\circ$, l'entropie de liaison intrinsèque qui traduirait les phénomènes de solvatation, désolvatation ainsi que les degrés de liberté du complexe,

ΔS_p^f , l'entropie de protonation du résidu ionisable dans l'enzyme libre,

et $\Delta \Delta S_p$, la variation de l'entropie de protonation ΔS_p^f suite à la liaison du ligand.

Et de même, on obtiendrait pour les variations d'énergie libre :

$$\Delta G_0^\circ = \Delta G_{\text{int}}^\circ + N_{\text{H}^+} \cdot \Delta G_p^f + \overline{H^C} \cdot \Delta \Delta G_p \quad (\text{Eq. 13})$$

Avec :

$\Delta G_{\text{int}}^\circ$, l'énergie libre intrinsèque,

ΔG_p^f , l'énergie libre de protonation du résidu ionisable dans l'enzyme libre,

et $\Delta \Delta G_p$, la variation de l'énergie libre de protonation ΔG_p^f suite à la liaison du ligand.

Le pK_a d'un groupement chimique correspond au pH pour lequel les formes acides et basiques sont présentes en proportions égales (loi de Henderson – Hasselbach). Cette grandeur traduit donc un équilibre auquel la relation de van't Hoff peut être appliquée¹³⁷.

$$\Delta G_{\text{prot}} = -RT \cdot \ln(10) \cdot pK_a \quad (\text{Eq. 14})$$

Soit, à l'état libre, $\Delta G_p^f = -RT \cdot \ln(10) \cdot 5,7 = -8,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, et à l'état complexé, $\Delta G_p^b = -RT \cdot \ln(10) \cdot 10 = -15,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, d'où $\delta \Delta G_p = -6,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

De même, on déduit les grandeurs entropiques correspondantes : $-T\Delta S_p^f = -3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $\delta-T\Delta S_p = -6,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

A partir de la décomposition $-T\Delta S_0^\circ = -T\Delta S_{\text{int}}^\circ - N_{\text{H}^+} \cdot T\Delta S_p^f - \overline{H^c} \cdot T\delta\Delta S_p$, il est donc en théorie possible d'obtenir l'évolution des variations d'entropie de liaison. La Figure III.18 nous montre cependant que les variations de l'entropie de liaison calculées à partir de cette décomposition ne recoupent ni les valeurs obtenues précédemment grâce au calcul de $K_{\text{a,obs}}$ et ΔH°_0 (Figure III.17), ni celles déterminées expérimentalement (Figure III.7)

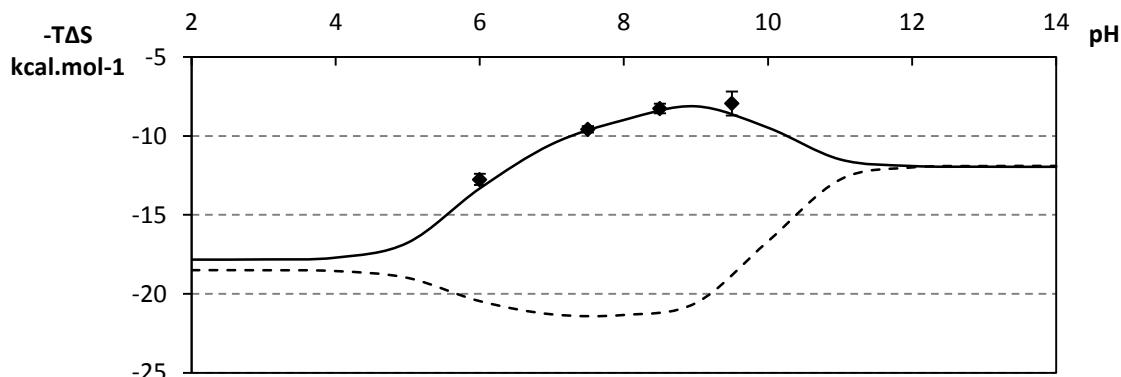


Figure III.18 : Comparaison de deux approches pour simuler l'évolution des variations d'entropie de liaison -TΔS en fonction du pH

Simulation à partir des valeurs calculées de $K_{\text{a,obs}}$ et ΔH°_0 (—)

Simulation à partir des valeurs de ΔS_{int} et ΔS_{prot} (---)

Valeurs expérimentales (◆)

T = 298,15 K

Ce résultat prouve que les variations d'entropie de liaison ne peuvent pas être trivialement réparties entre une enthalpie de liaison intrinsèque qui reflèterait le complexe dans son ensemble et une entropie de protonation qui ne concerne que le résidu ionisable (ici le Glu²¹⁹). En particulier, on peut supposer que le pH influence le réseau aqueux présent dans le site actif (positionnement des molécules d'eau, nature des liaisons engagées avec la protéine,...). Dans ces conditions, il n'est pas absurde d'envisager que les conséquences énergétiques de sa déstabilisation suite à l'interaction protéine/ligand dépendent du pH. De même, selon le pH du milieu, certains résidus se retrouvent sous leur forme chargée ou neutre, la présence, ou non, d'un proton est alors susceptible d'affecter le degré de liberté des résidus considérés et donc son entropie.

Au final, concernant la liaison du RXP470.1 à la MMP-12h F171D, si les variations d'énergie libre en fonction du pH reflètent finalement assez bien l'évolution des variations d'enthalpie de liaison à pH très basique (>10), cela n'est pas le cas pour le reste de la gamme de pH. Ces divergences sont certainement à mettre sur le compte des variations d'entropie de liaison, dont on a vu qu'elles dépendaient elles-mêmes du pH. Bien que liées, les variations d'affinité ne s'expliquent donc pas entièrement par les conséquences enthalpiques des seuls échanges de proton entre le solvant et les partenaires en complexe.

Compte tenu des données dont nous disposons actuellement, la rationalisation de ces variations entropiques semblent très compliquée, ce qui les rend difficilement prédictibles. En revanche, l'essor des méthodes de calcul *in silico* pourrait nous aider à comprendre l'origine atomique de cette dépendance au pH de l'entropie. Dans cette optique, les valeurs thermodynamiques déterminées au cours de cette étude seront précieuses pour vérifier la qualité des calculs pour traiter de l'interaction du RXP470.1 avec la MMP-12.

Implications sur le mécanisme catalytique

Grâce au formalisme développé il y a près de vingt ans par Bryan Baker et Kenneth Murphy, nous avons pu mettre en évidence que la liaison du RXP470.1 à la MMP-12 s'accompagne d'un shift de la constante d'acidité du Glu²¹⁹ lui permettant ainsi d'exister sous forme neutre à pH physiologique.

Les valeurs, *a priori* élevées, des pKa libre (5,7) et lié (10) du Glu²¹⁹, ne sont pas extravagantes dès lors que l'on considère l'environnement hydrophobe du site actif. Isom, et al. avaient ainsi montré, dans une étude parue en 2010, que des glutamates différemment enfouis dans la protéine présentent des pKa significativement altérés, de 4,5 au contact du solvant jusqu'à 9,4 dans une poche hydrophobe¹³¹. La valeur de pKa_{libre} que nous estimons est donc tout à fait en adéquation avec ces résultats. Cette valeur recoupe par ailleurs celle que le laboratoire avait estimé pour le glutamate catalytique de la MMP-12h F171D libre dans une étude précédente (5,6). Concernant le pKa du Glu²¹⁹ dans l'enzyme complexée, la valeur que nous proposons est un peu plus élevée que le maximum observé par Isom (9,4), sans pour autant paraître déraisonnable.

Dans notre étude, le ligand est un inhibiteur ionisé à pH physiologique. Le shift du pKa du Glu²¹⁹, et donc la prise de proton associée, permettent de neutraliser localement l'affrontement de deux charges autrement négatives et de stabiliser l'inhibiteur dans le site actif. Dans un contexte biologique, où le ligand n'est plus un inhibiteur mais un substrat à hydrolyser, on peut supposer que la présence du substrat peut, à l'instar du RP470.1, altérer le pKa du glutamate catalytique, et ce d'autant plus que le RXP470.1 est un analogue de l'état de transition. En effet, d'après nos mesures, le pKa du Glu²¹⁹ à l'état libre vaut 5,7, une valeur qui est, en l'état, incompatible avec le mécanisme catalytique généralement

admis pour les MMP. Ce mécanisme, qui implique l'activation d'une molécule d'eau grâce au transfert d'un de ses protons au glutamate catalytique, suggère que ce dernier présente un pKa suffisamment élevé pour permettre sa protonation à pH physiologique. La valeur de 5,7 est donc trop basse pour permettre l'initiation de l'hydrolyse catalytique et doit être rehaussée en présence du substrat. C'est à cette condition seulement qu'un ion hydroxyde peut être formé et initier l'acte protéolytique par une attaque nucléophile du C α de la liaison amide (Figure III.19). Dans ce cadre, l'altération du pKa du glutamate catalytique des MMP peut s'interpréter comme une étape à part entière du mécanisme catalytique. Ainsi, le pKa du glutamate catalytique dans l'enzyme libre, doit être suffisamment bas pour autoriser sa présence sous forme ionisée COO $^-$ à pH physiologique (dans cette optique, la valeur de 5,7 est donc parfaitement cohérente). Il est essentiel de maintenir cet état de protonation en amont de l'acte protéolytique car celui-ci est initié par l'attaque nucléophile d'un ion hydroxyde. En effet, si lors de la liaison du substrat à hydrolyser, le glutamate catalytique est déjà protoné, il n'est pas disponible pour recevoir l'un des protons de la molécule d'eau catalytique qui ne sera donc pas activée sous forme d'anion OH $^-$ et ne pourra pas engager l'acte protéolytique. En revanche, une fois le complexe formé, le pKa du glutamate doit être modifié de manière à permettre l'activation de la molécule d'eau catalytique.

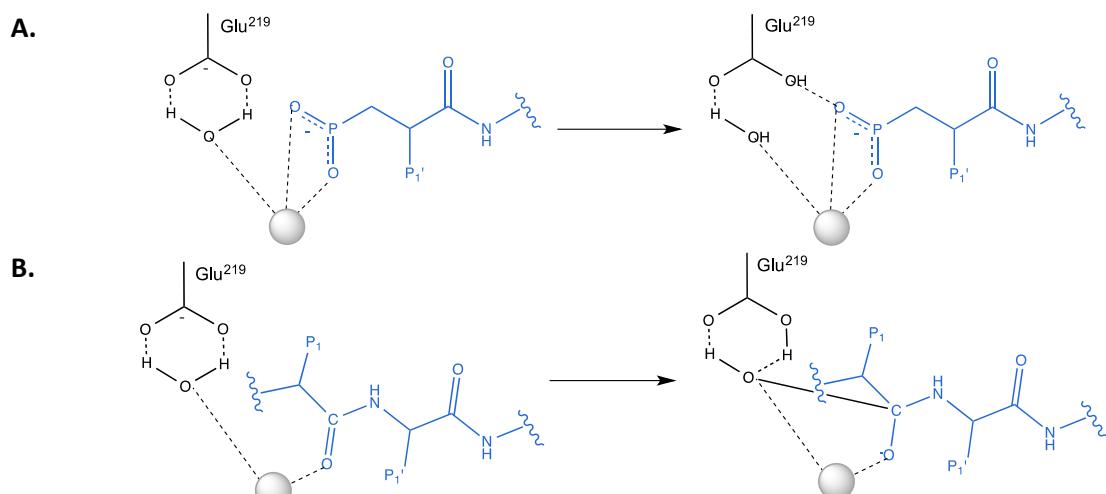


Figure III.19 : Schéma de l'interaction MMP-12/ligand

La sphère grise représente l'atome de zinc catalytique.

A. Interaction avec un inhibiteur phosphinique

B. Interaction avec un substrat peptidique

De manière intéressante, Baker et Murphy rapportaient déjà en 1997 un cas similaire où le pKa de l'His⁵⁷ de l'élastase était décalé en présence d'un ligand afin de permettre sa protonation par la Ser¹⁹⁵ catalytique. Ce résidu, ainsi activé, pouvait alors enclencher l'acte catalytique¹⁰⁸. Ces deux exemples soulignent l'importance des états de protonation dans la mise en place d'un mécanisme protéolytique et mettent en avant l'intérêt de déterminer les shifts de pKa associé à la liaison d'un inhibiteur, surtout

lorsque celui-ci est analogue de l'état de transition du substrat, pour alimenter les mécanismes moléculaires pouvant contribuer à l'acte catalytique du substrat.

II. E. Conclusion

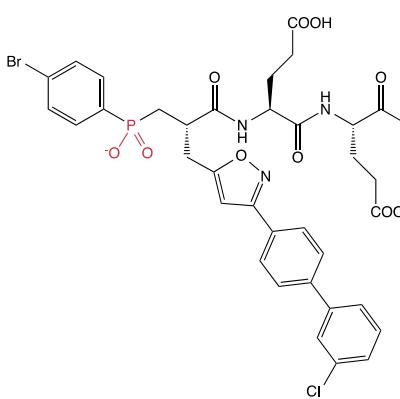
L'analyse thermodynamique poussée de la liaison du RXP470.1, nous a permis de caractériser précisément l'importance énergétique des phénomènes de protonation couplés à une interaction protéine/ligand. Nous avons ainsi montré le poids enthalpique de la protonation du Glu²¹⁹, un résidu majeur de l'acte catalytique, pour permettre de stabiliser le RXP470.1 dans le site actif. Dans le même temps, nous montrons que la liaison de l'inhibiteur s'accompagne de variations entropiques qui dépendent également du pH et dont le rôle sur l'affinité est déterminant.

Cette étude a également permis de conforter le mécanisme catalytique généralement admis pour les MMP qui repose ainsi sur l'altération du pKa du glutamate catalytique lors de la liaison d'un ligand, qu'il s'agisse d'un inhibiteur ou d'un substrat. Dans le cas de la liaison du RXP470.1, nous avons estimé à 10 la valeur du pKa_{lié} du Glu²¹⁹. Si le mécanisme catalytique décrit ci-dessus nécessite bien de modifier le pKa du glutamate catalytique, rien n'indique qu'il est systématiquement rehaussé à cette valeur de 10 quel que soit le ligand considéré. On s'attend néanmoins à ce que l'écart entre les pKa libre et lié dépende de la nature du ligand. Malheureusement, la mesure du pKa du glutamate catalytique dans le cadre d'une complexation protéine/substrat est difficilement envisageable, compte tenu de l'évolution d'un tel système. Des approches théoriques de simulation de l'acte catalytique pourraient être entreprises pour déterminer la variation, suite à l'hydrolyse du substrat, des pKa locaux. L'utilisation des mutants inactifs E219Q et E219A est quant à elle inenvisageable pour des raisons évidentes. En revanche, il pourrait être intéressant de mesurer l'altération du pKa du Glu²¹⁹ induite par la liaison d'une série d'inhibiteurs dont seul le groupement chélatant est modifié.

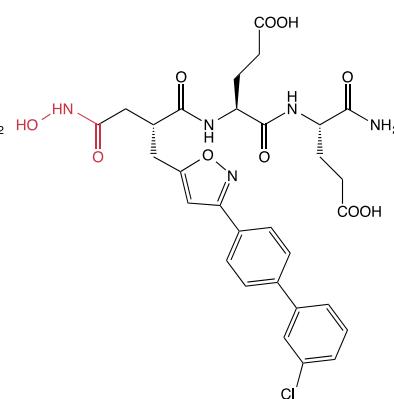
III. Effet du groupement chélatant du Zinc

Le composé RXP470.1 étant un des inhibiteurs le plus étudié dans notre laboratoire, il apparaissait logique de partir de ce composé pour concevoir une série d'analogues se distinguant par la nature du groupement chélatant. Notre choix s'est reporté sur, respectivement, un groupe acide hydroxamique (CO-NH-OH , composé **2**) et un groupe carboxylique (COOH , composé **3**), car ces deux groupes ont été largement utilisés pour développer des inhibiteurs puissants de MMP (Figure II.1).

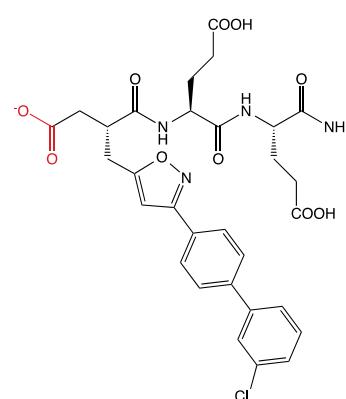
Composé 1 – RXP470.1



Composé 2



Composé 3



Reproduction de la Figure II.1: Structure des trois inhibiteurs étudiés

L'objectif central de cette étude était, en étudiant trois composés ne différant essentiellement les uns des autres que par la nature de leur groupe chélatant, de déterminer le rôle joué par le groupe chélatant de l'atome de zinc sur l'affinité et le profil de sélectivité de nos inhibiteurs vis-à-vis des MMP. Dans ce but, il aurait été potentiellement intéressant de synthétiser un analogue du RXP470.1 dans lequel le groupement bromo-phényle aurait été substitué par un simple méthyle, de façon à minimiser les différences de structure entre les trois composés. Malheureusement, pour des raisons de chimie, un tel composé est extrêmement difficile d'accès.

Partant de deux analogues du RXP470.1, notre projet consistait à compléter, par des études de thermodynamique et l'obtention de structures cristallines à haute résolution, les données sur la puissance de ces inhibiteurs vis-à-vis de la MMP-12. Un point d'intérêt particulier était de vérifier, si la meilleure affinité attendue en général pour les inhibiteurs de type hydroxamique correspondait à des enthalpies de liaison plus favorable, ou à des distances entre atomes du groupe chélatant et l'ion zinc plus courtes, et donc des interactions plus fortes. Compte tenu de l'importance des questions abordées dans ce projet, et de façon surprenante, nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude comparable sur les MMP.

Dans ce qui suit, toutes les études ont été réalisées avec le double mutant F171D K241A de la MMP-12 humaine.

III. A. Effet sur l'affinité vis à vis de la MMP-12h

L'affinité de nos trois inhibiteurs a été déterminée par un test enzymatique dans les conditions suivantes : Tampon Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3mM, ZnCl₂, 0,1 mM à 25°C. La concentration du substrat a été prise en compte dans la détermination des valeurs de Ki en utilisant une équation dans laquelle cette valeur de concentration, ainsi que le Km du substrat, interviennent. Comme attendu, le composé **2** possède l'affinité la plus élevée avec une valeur de 40 pM, suivi par le composé RXP470.1 et le composé **3** ayant des affinités comparables, respectivement, de 2,9 et 5,8 nM.

III. B. Effet sur les profils thermodynamiques

Les enthalpies de liaisons des trois composés ont été déterminées dans les mêmes conditions de tampon que celles utilisées pour déterminer l'affinité des inhibiteurs. Les constantes Ki détaillées ci-dessus ont été utilisées pour calculer la variation d'énergie libre (ΔG°) associée à la liaison des inhibiteurs. Les variations d'enthalpie de liaison ΔH° , corrigées pour l'effet tampon ont été obtenues par calorimétrie selon le protocole décrit précédemment. Le terme $-T\Delta S^\circ$ a été déduit de ces deux valeurs grâce à la relation $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ (Figure III.20).

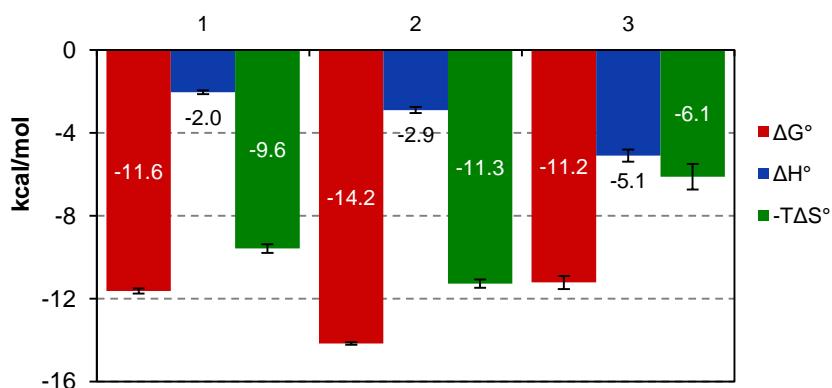


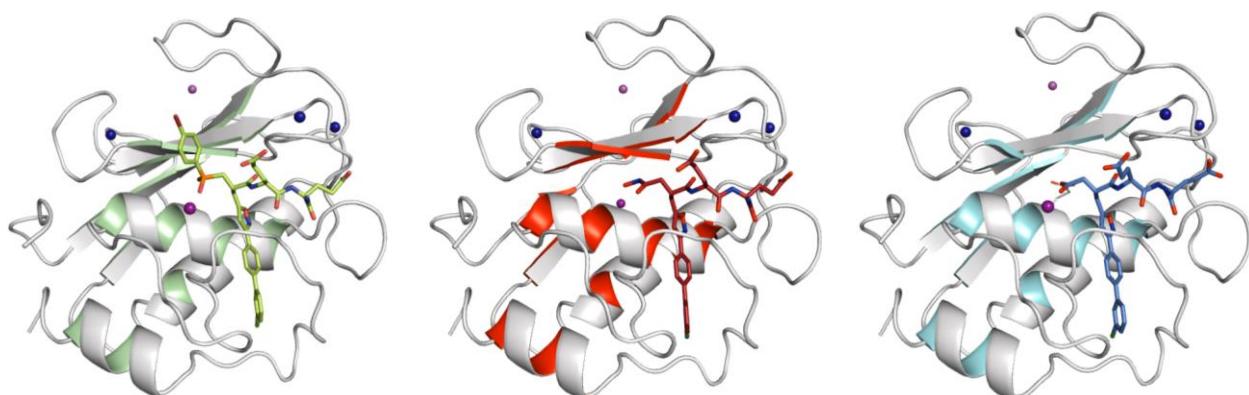
Figure III.20 : Profils thermodynamiques caractéristiques, de la liaison des composés 1 à 3 avec la MMP-12h F171D K241A

TRIS 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 25°C
Enthalpies corrigées pour l'effet tampon.

Les profils thermodynamiques reportés dans la Figure III.20 indiquent, pour les composés **1** et **2**, des signatures enthalpiques et entropiques très semblables. Pour ces deux inhibiteurs, la composante enthalpique est très réduite au regard de la forte participation entropique. De façon assez inattendue, le composé **3** se distingue par des contributions enthalpiques et entropiques du même ordre de grandeur, un résultat étonnant compte tenu de l'analogie structurale de nos trois inhibiteurs. La composante entropique des composés **1** et **2** peut être en grande partie attribuée à un effet hydrophobe, résultant de l'enfouissement, dans la cavité S_1' de la MMP-12h, de la chaîne latérale des inhibiteurs en position P_1' . En effet, dans l'étude de B. Czarny et al⁸⁴, il avait été observé, à partir d'analogues du RXP470.1, que la simple addition du groupe chloro-phényle au bout de la chaîne en P_1' , entraînait une variation de la variation d'entropie de liaison $-T\Delta\Delta S$ de $-4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. La réduction de la variation d'entropie constatée pour le composé **3** (qui contient la même chaîne latérale en P_1' que le composé **1**) est donc un résultat pour le moins intrigant.

III. C. Etude des structures cristallines

Les trois structures des inhibiteurs en interaction avec la MMP-12 ont pu être obtenues à des résolutions équivalentes de $1,3 \text{ \AA}$ et dans le même groupe d'espace ($P2_12_12$). Ces trois inhibiteurs adoptent globalement des modes de liaisons très conservés (Figure III.21). Les groupes chélatants sont observés en proximité de l'ion zinc et la chaîne latérale en P_1' s'insère sous la boucle S_1' pour les trois inhibiteurs et vient remplir la cavité S_1' .



Composé **1** – RXP470.1

Composé **2**

Composé **3**

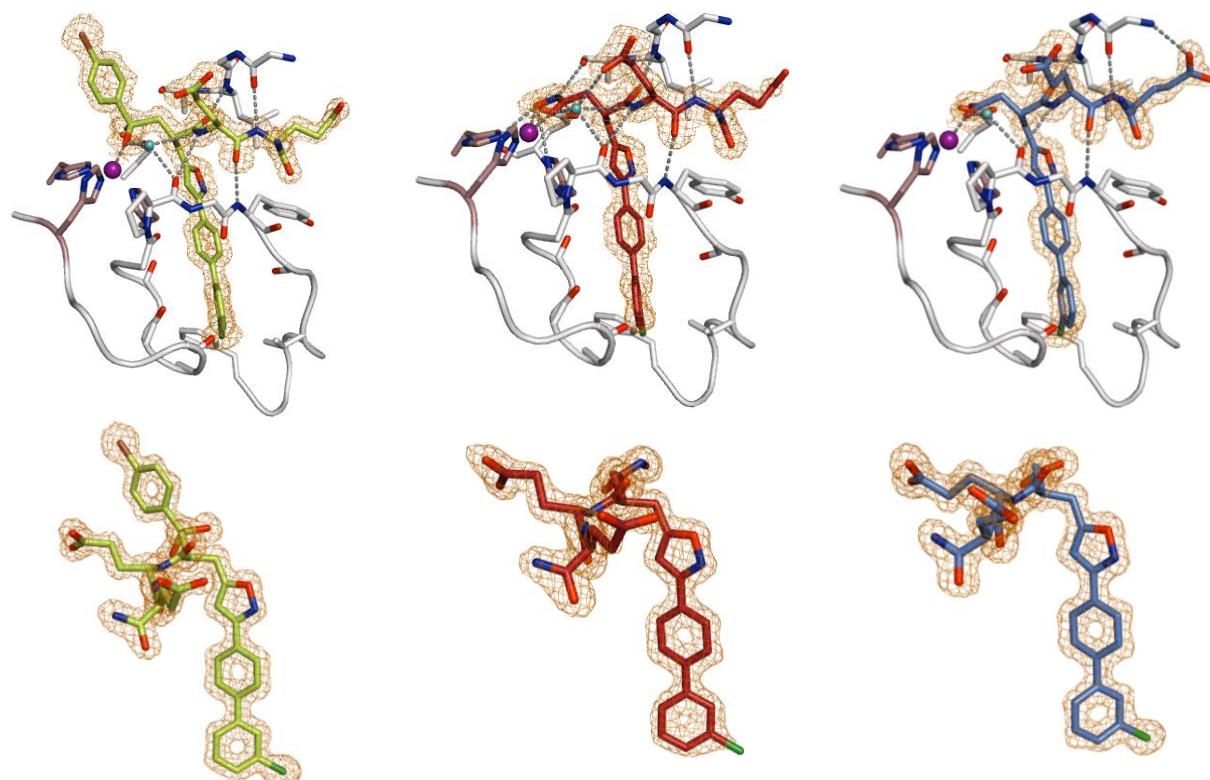
Figure III.21 : Structures cristallographiques des composés **1 à **3** en complexe avec la MMP-12h F171D K241A**

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

Les atomes de zinc et de calcium sont représentés en violet et bleu foncé respectivement.

Qualité des structures étudiées

La qualité des structures est attestée par les contours des densités électroniques, notamment au niveau des cycles aromatiques de la chaîne latérale en position P1', avec une absence de densité au centre des noyaux phényles (Figure III.22). On remarque sur cette figure que le réseau des liaisons hydrogènes entre le squelette peptidique des inhibiteurs et le site actif de l'enzyme est conservé.



Composé 1 – RXP470.1

Composé 2

Composé 3

Figure III.22 : Détails de l'interaction des composés 1 à 3 avec la MMP-12h F171D K241A

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

En orange, la densité électronique $2(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ détournée à 1σ , est superposée à la structure de l'inhibiteur.

Seule la superposition des structures révèle la présence d'un « léger shift » dans le positionnement de chacun des inhibiteurs dans le site actif de la MMP-12 (Figure III.23). Cet effet semble trouver son origine dans le mode d'interaction de chaque groupe chélatant avec l'ion zinc, avec une nette différence pour le positionnement du groupe phosphinique (voir plus loin). De façon remarquable, la superposition des structures montre que la chaîne latérale en position P1' se trouve moins enfouie dans le cas du RXP470.1. Cette observation met en lumière le fait que des modifications mineures dans le positionnement du groupe chélatant peuvent avoir un impact important sur le positionnement d'autres parties de l'inhibiteur, en particulier la chaîne latérale en position P1'.

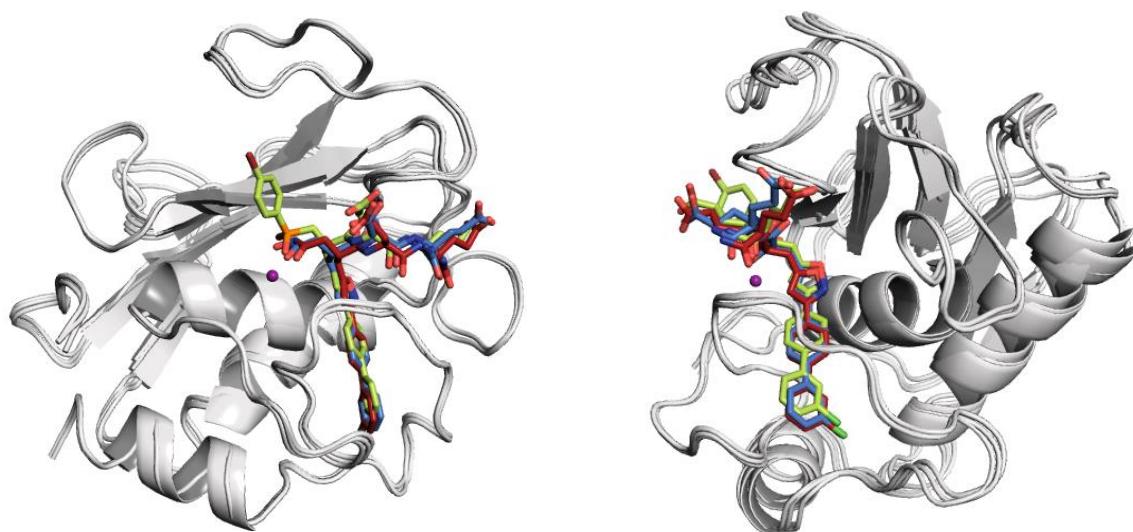


Figure III.23 : Superposition des composés 1 à 3 en interaction avec la MMP-12h F171D K241A

Codes PDB : 5CXA, 5CZM, et 5D3C

Le zinc catalytique est représenté sous forme de sphère violette, les composés 1 à 3 sont en représentation « stick », respectivement en vert, rouge et bleu.

Cet enfoncement peut également être vérifié par l'analyse en mode surface des structures inhibiteurs/enzyme. La Figure III.25 permet ainsi de visualiser que, dans tous les complexes étudiés, la poche S_1' adopte la même conformation et que malgré une bonne occupation globale de la cavité, le RXP470.1 est le plus éloigné du fond de la poche.

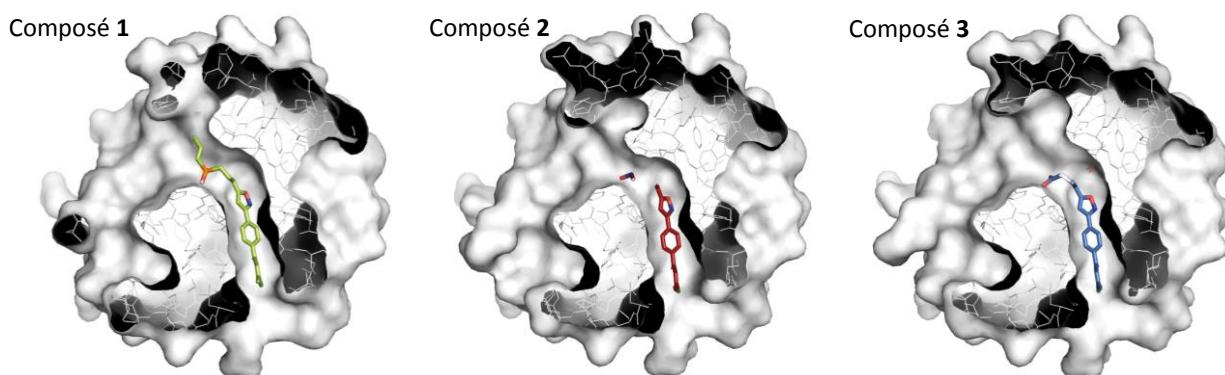


Figure III.24 : Insertion des composés 1 à 3 dans la cavité S_1' de la MMP-12h F171D K241A

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

La superposition de la boucle S_1' dans chacun des trois complexes permet d'attester du positionnement canonique des chaînes latérales de ces résidus. Seuls les résidus au contact du solvant et connus pour leur mobilité (lysine, arginine), ne sont pas parfaitement superposables d'un complexe à l'autre (Figure III.25). Dans le cas du complexe formé par le composé 2, les prolines 232 et 238 sont en très léger décalage, mais sans conséquences sur les autres résidus semble-t-il.

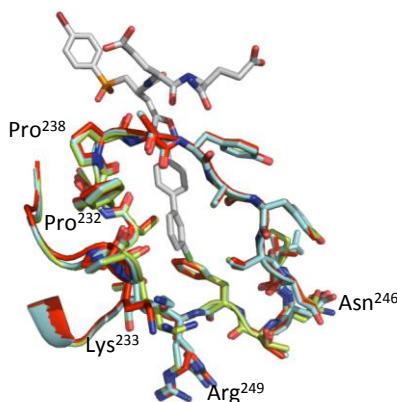


Figure III.25 : superposition de la boucle S_1' pour chacun des complexes inhibiteurs/MMP-12h F171D K241A étudiés

Codes PDB : 5CZM, 5D3C et 5CXA

Pour faciliter la visualisation, la structure du RXP470.1 est représentée en gris. Les boucles correspondant aux complexes formés par les composés **1**, **2**, et **3**, sont représentées respectivement en vert, rouge, et bleu.

Chélation de l'atome de zinc catalytique et interaction avec le Glu²¹⁹

Au niveau des groupes chélatants, l'analyse dans le détail des structures permet de mettre en évidence les différences et les similitudes du positionnement de chaque atome du groupe chélatant. Ainsi, le groupe phosphinate (PO_2^-) se positionne quasiment au-dessus de l'ion zinc, alors qu'aussi bien les groupes hydroxamique que carboxylate se trouvent décalés vers la droite, par rapport au groupe PO_2^- . Ce placement en léger décalage s'accompagne d'un raccourcissement des distances entre l'ion zinc et ces deux derniers groupes.

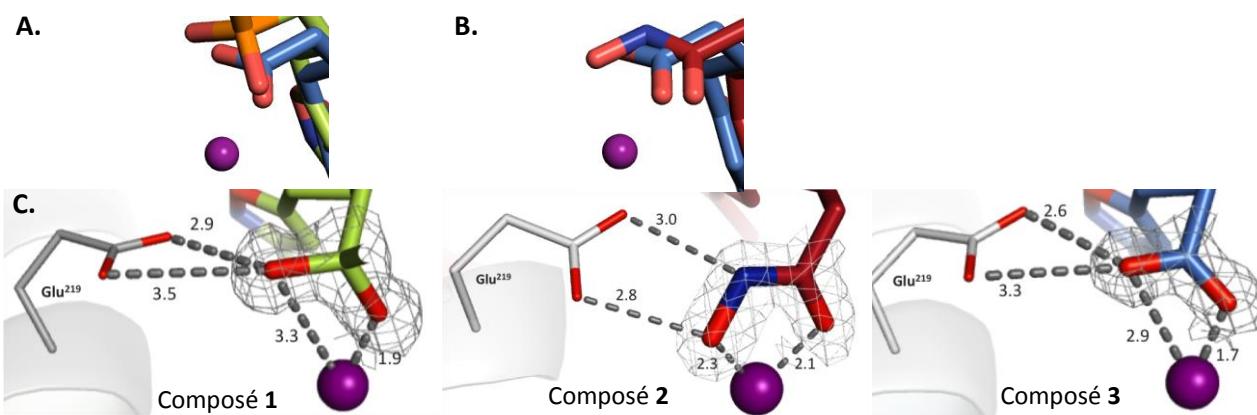


Figure III.26 : Superposition des composés 1 à 3 en complexe avec la MMP-12h F171D K241A

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

La densité électronique $2(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ détournée à 2σ du groupement chélatant, est représentée en gris. Le zinc catalytique est représenté sous forme de sphère violette. Les distances sont indiquées en Å.

A. Superposition des composés **1** et **3**

B. Superposition des composés **2** et **3**

C. Chélation du zinc catalytique par les composés **1** à **3** (dans l'ordre).

Les mesures de distances entre les atomes des groupes chélatants et l'ion zinc révèlent aussi des différences de mode de chélation, avec cette fois-ci des analogies entre le groupe PO_2^- et le COO^- . Ainsi, pour ces deux groupes, on note que l'interaction avec l'ion zinc est de type monodentate avec une distance interatomique très courte entre l'un des oxygènes du groupe chélatant et le zinc (de 1,7 Å pour le groupe COO^- à 1,9 Å pour le groupe PO_2^-). L'autre oxygène de ces groupes chélatants se situe à une distance de l'ion zinc beaucoup plus grande, 2,9 et 3,3 Å, pour les groupes COO^- et PO_2^- , respectivement. En revanche, l'acide hydroxamique adopte un mode de chélation bidentate, avec les deux oxygènes du groupe se situant à des distances de l'ion zinc assez similaires, 2,1 et 2,3 Å respectivement, donc moins courtes que les distantes observées pour le COO^- et le PO_2^- .

On observe par ailleurs pour les trois groupements chélatants des interactions avec le groupe carboxylate du Glu^{219} de la MMP-12. Là encore, les groupes COO^- et PO_2^- montrent des traits communs, avec l'un des oxygènes du groupement chélatant se situant à une distance assez courte de l'un des oxygènes du groupement carboxylate du Glu^{219} (2,6 et 2,9 Å, respectivement). Cette distance indique la formation d'une liaison hydrogène entre deux groupements chargés, comme discuté dans le chapitre précédent pour le composé RXP470.1. On peut donc conclure qu'à l'instar du composé 1, la liaison du composé 3 entraîne certainement une prise de protons. Dans le cas du groupe hydroxamique, on note aussi une distance courte entre l'oxygène de ce groupe et l'un des oxygènes du Glu^{219} (2,8 Å) indiquant, là encore, la présence d'une liaison hydrogène. Dans ce dernier cas, le proton est fourni directement par le groupe OH de l'acide hydroxamique. Pour ce type de groupement, la littérature propose un pK_a de 8,7 ce qui, au regard du pK_a du groupement carboxylate du Glu^{219} que nous avançons dans l'étude précédente (5,8), lui confèrera un rôle de donneur de protons. Pour donner corps à ces suppositions, nous avons suivi l'évolution de l'affinité des composés 2 et 3 vis à vis de la MMP-12h F171D K241A, en fonction du pH. La Figure III.27 indique ainsi que l'affinité du composé 3 suit une dépendance au pH parfaitement similaire à celle du composé 1, le RXP470.1. Cette observation conforte notre proposition précédente, à savoir que la liaison du composé 3 implique une prise de proton. En revanche, le composé 2 ne montre pas de dépendance au pH, ne suggérant donc aucun échange de protons suite à la liaison de cet inhibiteur à la MMP-12h F171D K241A.

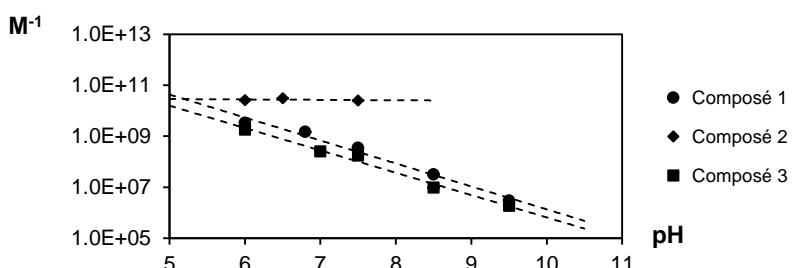


Figure III.27 : Variation de l'affinité des composés 1 à 3 en fonction du pH

TRIS 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 3 mM, ZnCl_2 0.1 mM, 25°C

Présence d'une molécule d'eau interfaciale

Dans une étude précédente, l'analyse du complexe RXP470.1/MMP-12h F171D avait révélé que la liaison du composé **1** s'accompagne du positionnement d'une molécule d'eau interfaciale, capable d'interagir avec l'inhibiteur et le groupe carbonyle d'un résidu proline (Pro²³²) de la MMP-12⁸⁴. Les interactions ainsi mises en place sont très stables, de sorte que l'étude des facteurs B indique une certaine rigidité locale et un taux d'occupation maximal de cette molécule d'eau. Ces résultats sont parfaitement transposables au complexe RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A. L'analyse des deux autres structures indique en revanche que le rôle de cette molécule semble variable d'un inhibiteur à l'autre. Pour le composé **2**, on note des distances entre l'atome d'oxygène de cette molécule d'eau, l'inhibiteur et la Pro²³² un peu plus grandes que celles observées avec le composé RXP470.1. Par ailleurs, on observe une distance de 3.5 Å entre l'atome d'oxygène de la molécule d'eau et le carboxylate du résidu glutamate présent en position P_{2'} du composé **2**, ce qui suggère une interaction potentielle supplémentaire. En revanche, dans le cas du composé **3**, seules deux interactions engagent cette molécule d'eau. Des variations très subtiles du positionnement exact des atomes de l'inhibiteur dans la cavité de l'enzyme semblent donc influencer le réseau d'interactions autour de cette molécule d'eau interfaciale (Figure III.28).

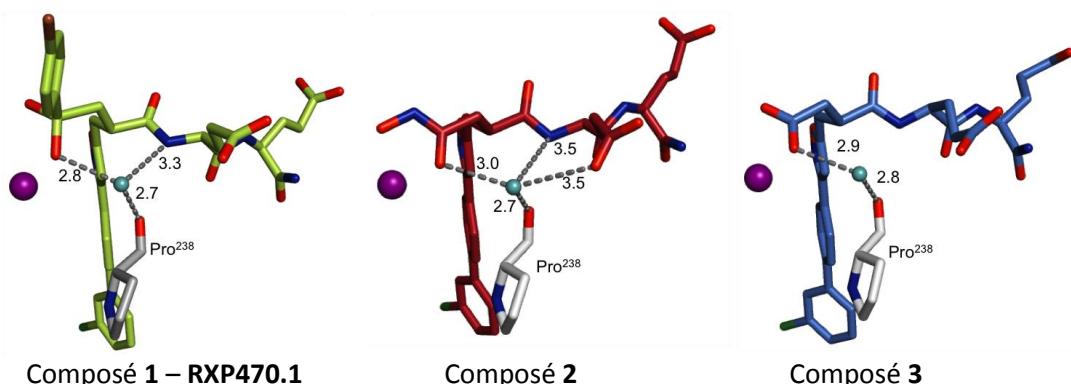


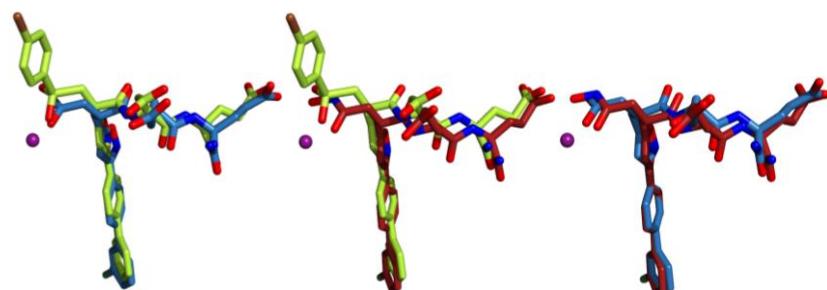
Figure III.28 : Réseau de liaisons hydrogènes possibles impliquant une molécule d'eau interfaciale

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

Le zinc catalytique est représenté sous forme de sphère violette. Les distances sont indiquées en Å.

Positionnement de l'inhibiteur

Finalement, la superposition de la structures de nos trois inhibiteurs telles qu'adoptées dans le site actif de la MMP-12h F171D K241A permet de visualiser pour chacun les légères différences de conformation dans le complexe. Les deux structures les plus proches correspondent à celles des composés **2** et **3**. Cette bonne similarité est potentiellement dictée par le mode d'interaction comparable entre l'ion zinc le groupe chélatant (hydroxamique et carboxylate respectivement). La conformation du RXP470.1 se distingue de celles des composés **2** et **3**, et là encore nous pensons que le mode de chélation du groupe phosphinate de l'ion zinc est responsable de ces différences.

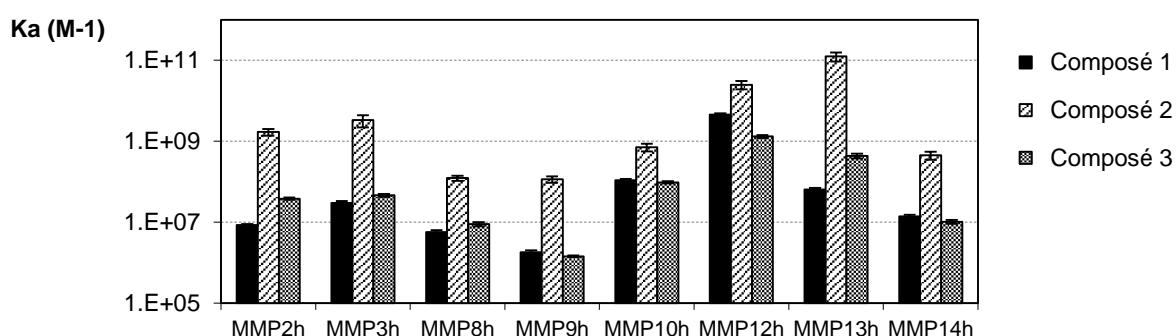
**Figure III.29 : Superposition deux à deux des composés 1 à 3**

Codes PDB (dans l'ordre) : 5CZM, 5D3C et 5CXA

Le zinc catalytique est représenté sous forme de sphère violette, les composés 1 à 3 sont sous forme « stick », respectivement en vert, rouge et bleu.

III. D. Effets sur les profils de sélectivité

Les affinités des trois composés sur huit MMP ont été déterminées par des expériences d'enzymologie, dans les mêmes conditions de pH et de tampon que précédemment. La Figure III.30 rapporte pour chaque composé les valeurs d'affinité (K_a) vis à vis de chacune des MMP testées.

**Figure III.30 : Profil de sélectivité des composés 1 à 3 vis à vis de huit MMP**

Quelle que soit la MMP considérée, le composé hydroxamate (**2**) présente toujours une meilleure affinité que les deux autres inhibiteurs testés. Pour chaque MMP, cette différence d'affinité atteint un à deux ordres de grandeur, voire trois dans le cas de la MMP-13h. Dans ce dernier cas, le composé **2** s'avère extrêmement puissant avec un K_i d'environ 10 pM. En comparaison, l'affinité du RXP470.1 pour cette MMP n'est que de l'ordre de 10 nM, soit mille fois moins. L'affinité des composés **1** et **3** évolue de manière comparable d'une MMP à l'autre (Figure III.30).

En revanche, toutes les MMP ne discriminent pas de la même manière entre le RXP470.1 et les autres composés testés. La Figure III.31 montre ainsi que les MMP-3, 8, 9, 10, et 14 ne font pas la différence entre le RXP470.1 et le composé **3**. De manière très intéressante, la MMP-12h est la seule à préférer sensiblement le RXP470.1 au composé **3**. Comme vu dans la Figure III.30, le composé **2** est privilégié par

l'ensemble des MMP testées, mais le gain d'affinité par rapport au RXP470.1 varie d'une MMP à l'autre. On peut raisonnablement penser que la valeur de ce gain reflète les différences de structure des différentes MMP ainsi que leur capacité à interagir avec le composé **2**.

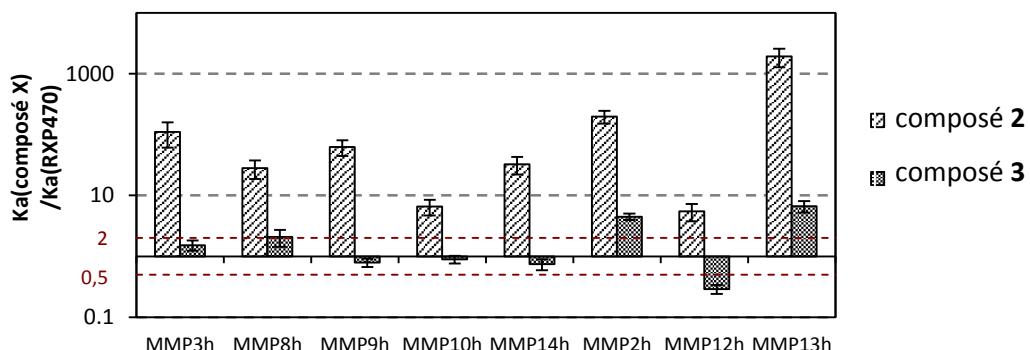


Figure III.31 : Variation de l'affinité des composés 2 et 3 par rapport au RXP470.1

En ordonnée : ratio $K_a(\text{composé } X)/K_a(\text{RXP470.1})$ pour chaque MMP

La Figure III.32 démontre quant à elle que, parmi ces trois inhibiteurs, le RXP470.1 possède, de loin, le meilleur profil de sélectivité vis-à-vis de la MMP-12. Suivent ensuite le composé **3**, un peu moins sélectif, et le composé **2**, inhibiteur le moins sélectif de cette série et pouvant être plutôt présenté comme un inhibiteur mixte des MMP-12 et 13.

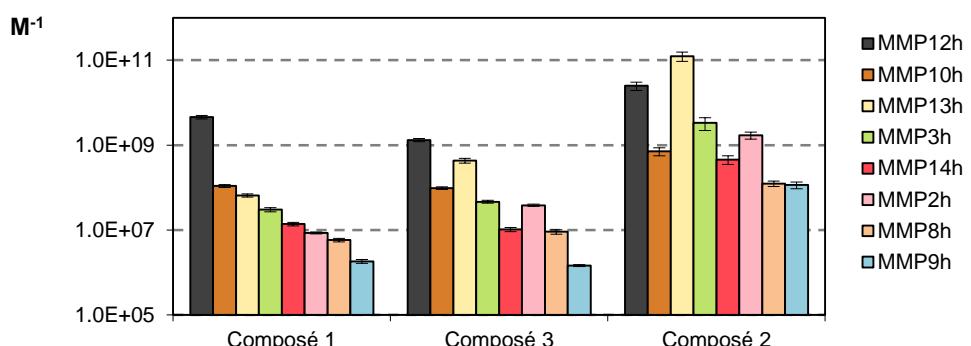


Figure III.32 : Dégradation des profils de sélectivité des composés 1 à 3

Les très bonnes affinités du composé **2** vis-à-vis de plusieurs MMP en dehors des MMP-12 et 13 (K_i de l'ordre du nanomolaire pour MMP- 10, 3, et 14), sont à considérer en tenant compte du fait que les différentes chaînes latérales de cet inhibiteur n'ont pas été optimisées pour ces MMP, mais seulement vis-à-vis de la MMP-12.

III. E. Discussion

L'objectif principal de cette étude était d'étudier le rôle du groupe chélatant sur la puissance et le profil de sélectivité de nos inhibiteurs. Cette étude, en mettant en évidence un ensemble de différences induites par le changement de groupe chélatant, a donc atteint son objectif premier. Grâce aux données issues de la calorimétrie et de la cristallographie, cette étude va par ailleurs au delà du rôle du groupe chélatant sur les paramètres de puissance et de sélectivité. Comme attendu, l'utilisation d'un groupe hydroxamate a engendré un composé extrêmement puissant vis-à-vis de la MMP-12 (40 pM contre 2,9 nM pour le RXP470.1). L'analyse des signatures thermodynamiques révèle que ce gain d'affinité est principalement dû à une contribution entropique plus favorable ($-T\Delta S = 1,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$) dans le cas du composé **2** que du RXP470.1. La différence des contributions enthalpiques est bien plus faible (Δ de 0,9 kcal/mol en faveur du composé **2**). Ces observations sont assez surprenantes, car compte tenu des interactions fortes qui sont supposées prendre place entre le groupe hydroxamique et l'ion zinc, on pouvait s'attendre à ce que l'augmentation d'affinité soit le fait d'une meilleure contribution enthalpique (Tableau III.4 - Figure III.20).

	RXP470.1 Composé 1	Composé 2	Composé 3
K_i^a (nM)	2,9 ($\pm 0,6$)	0,04 ($\pm 0,004$)	5,8 ($\pm 0,03$)
ΔG°_a (kcal.mol $^{-1}$)	-11,6 ($\pm 0,1$)	-14,2 ($\pm 0,6$)	-11,2 ($\pm 0,3$)
$\Delta H^\circ_{a,b}$ (kcal.mol $^{-1}$)	-2 ($\pm 0,01$)	-2,9 ($\pm 0,1$)	-5,1 ($\pm 0,3$)
$-T\Delta S^\circ_a$ (kcal.mol $^{-1}$)	-9,6 ($\pm 0,2$)	-11,3 ($\pm 0,2$)	-6,1 ($\pm 0,6$)

^a Erreur entre parenthèse

^b Valeur corrigée pour l'effet tampon

Tableau III.4 : Paramètres thermodynamiques de la liaison des composés 1 à 3 avec le domaine catalytique de la MMP-12h F171D K241A

Tris 20mM pH 7,5, NaCl 200mM, CaCl₂ 3mM, ZnCl₂ 0.1mM, 25°C

Nous avons évoqué, au début de cette section, que la contribution entropique observée pour la liaison du RXP470.1 puisse correspondre à un effet hydrophobe résultant de l'enfouissement dans la cavité S_{1'}, de la chaîne latérale de l'inhibiteur située en position P_{1'}. A cet égard, nous avons relevé que cette même chaîne s'enfonçait un peu plus profondément dans la cavité S_{1'} dans le cas du composé **2**, par rapport au RXP470.1. Cette première observation suggérait que l'augmentation de la contribution entropique relevée pour le composé **2** résulte de l'enfoncement plus prononcé de cette chaîne latérale, déplaçant ainsi un plus grand nombre de molécules d'eau. Néanmoins, cette position ne semble pas

tenable, dans la mesure où cette même chaîne latérale occupe exactement la même position dans le cas du composé **3**, alors que celui-ci se caractérise par une contribution entropique bien plus faible. Là encore, la signature thermodynamique du composé **3** semble très surprenante, puisque que ce composé est le seul pour lequel les contributions entropiques et enthalpiques sont du même ordre de grandeur. Sur la base de la comparaison des structures des composés **2** et **3**, qui sont extrêmement semblables, un tel résultat aurait été difficile à prédire (et de même que leur très grande différence d'affinité pour la MMP-12). Nous avons cherché dans l'analyse des structures des indices pouvant nous permettre d'expliquer la signature thermodynamique du composé **3**. Cependant, l'analyse de toutes les distances interatomiques entre les atomes des inhibiteurs et ceux de la MMP-12 n'a pas donné d'indices tranchants pointant vers l'optimisation de certaines paires d'interactions -ce qui déboucherait sur une meilleure contribution enthalpique- dans le cas du composé **3**. Devant cette impasse, nous nous sommes penchés sur les facteurs B associés à nos trois complexes enzyme-inhibiteur (Figure III.33).

Ces trois structures ont été obtenues à la même résolution, ce qui permet de comparer leurs facteurs B de façon raisonnable. Dans la Figure III.33, les différences de facteur B sont traitées dans un mode couleur qui utilise le bleu foncé pour indiquer des zones de faible mobilité thermique. Les augmentations de mobilité thermique sont représentées par un dégradé allant du bleu foncé au rouge en passant successivement par le bleu clair, le vert clair et le jaune. Ce mode de représentation permet de visualiser facilement les différences, très importantes, de mobilité entre les trois complexes. En particulier, dans le cas du complexe avec le composé **2**, l'extrémité de la chaîne latérale en position P_1' , et les résidus de la boucle S_1' qui lui font face sont très mobiles, ce qui semble cohérent. En effet, une augmentation de la mobilité de la boucle S_1' doit permettre une mobilité correspondante au niveau de la chaîne latérale en position P_1' . Les trois groupements chélatant étudiés présentent également des différences de mobilité significatives. Le composé **3** apparaît comme le plus fixe, suivi du RXP470.1 et du composé **2**. Il est tentant de proposer comme explication à la rigidité apparente du groupement carboxylate du composé **3**, la très faible distance (1,7 Å) observée entre l'un des oxygènes du groupe chélatant et l'ion zinc. Nos recherches dans la PDB sur des inhibiteurs carboxylates de MMP n'ont pas révélé de distance aussi courte, la plus proche étant mesurée à 1,8 Å dans un exemple, et 1,9 Å dans la majorité des complexes entre la MMP-12 et des inhibiteurs de type carboxylate.

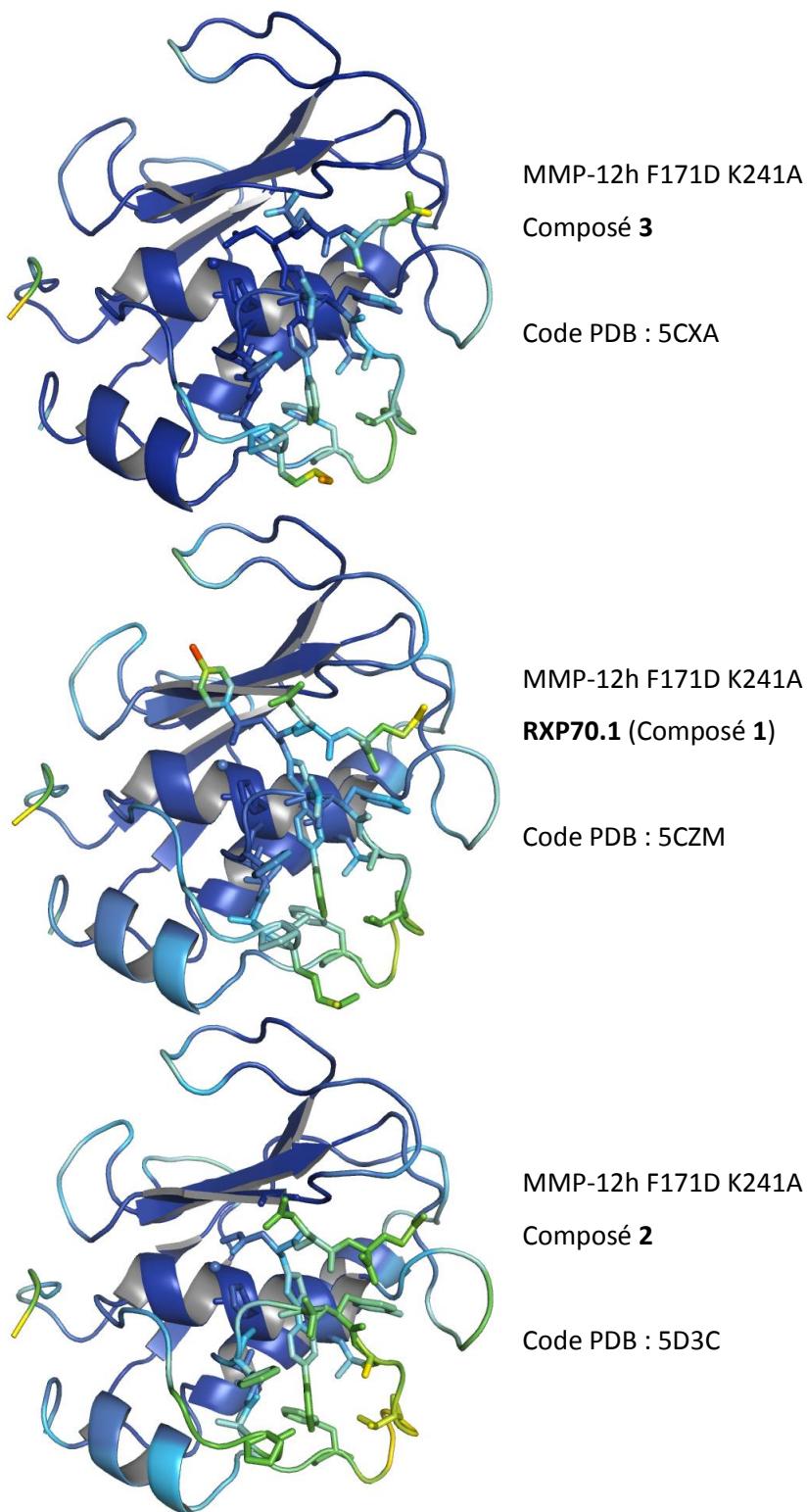


Figure III.33 : Comparaison des facteurs B associés à chaque complexe inhibiteur/MMP-12h F171D K241A

Toutes les structures ont été obtenues à une résolution de 1,3 Å. Le zinc catalytique est représenté sous forme de sphère, les composés 1 à 3 sont en représentation « stick ». Les complexes sont présentés du moins au plus mobile.

Ainsi, on pourrait proposer, pour cet inhibiteur, l'existence d'une interaction plus forte entre le groupe chélatant et l'ion zinc, entraînant de proche en proche une mobilité réduite sur la plupart de la structure de l'inhibiteur, à l'exception du groupement chloro-phényle coloré en bleu-vert. Cependant, même pour ce dernier groupe, nous avons observé une très bonne résolution (attestée par les cartes de densité électronique) suggérant donc que si des différences de mobilité existent entre le groupement chélatant et le groupe chloro-phényle, celles-ci doivent être de très faibles amplitudes. A l'inverse, la représentation des facteurs B laisse penser à une plus grande mobilité résiduelle pour le composé **2**, que le composé **3**. On note par ailleurs que cette impression d'un gradient de mobilité qui partirait du groupe chélatant et s'étendrait vers le reste de la structure est conservée pour le composé **2**.

A partir de ces observations, il n'est pas déraisonnable de postuler qu'il existe une relation entre la composante enthalpique du composé **3** et son mode de liaison dans la MMP-12. Dans ce contexte, une moindre amplitude des mouvements de l'inhibiteur peut en effet suggérer la stabilisation d'un plus grand nombre d'interactions entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme, ce qui est favorable d'un point de vue enthalpique. A l'opposé, pour le composé **2** les interactions inhibiteur/enzyme seraient moins optimisées, laissant place à un plus grand nombre de degrés de liberté, d'où une signature entropique marquée. Enfin, dans ce paradigme, le composé RXP470.1 occuperait une place intermédiaire, avec notamment un positionnement légèrement différent de la chaîne latérale en position P_{1'} qui empêche de le comparer strictement aux deux autres composés.

Chapitre IV. Discussion générale

Effet du pH sur l'affinité du RXP470.1 vis-à-vis de la MMP-12

L'étude exhaustive réalisée au cours de cette thèse pour comprendre les raisons à l'origine une augmentation d'affinité du RXP470.1 lorsque le pH est diminué vers des valeurs acides. Ce travail a permis de mettre en lumière la complexité des phénomènes mis en jeu : variation du pKa du résidu Glu²¹⁹, variation d'enthalpie en cloche en fonction du pH, et enfin effets sur les variations d'entropie de liaison. Dans ce qui suit, nous reprenons ces différents phénomènes pour les discuter et les mettre en perspective.

Shift du pKa du résidu Glu²¹⁹

Grâce au formalisme proposé par le groupe de Murphy, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une prise de proton lors de la liaison du RXP470.1 à la MMP-12, et en particulier déterminer les pKa du glutamate 219 dans le site actif de l'enzyme. Cette variation de pKa semble extrêmement importante et il serait donc intéressant de confronter ce résultat à une autre approche expérimentale permettant de déterminer des valeurs de pKa. En particulier, la MMP-12 a fait l'objet d'enrichissements en ¹³C pour faciliter l'attribution des déplacements chimiques de ses résidus par RMN du ¹³C et du proton. Ayant par ailleurs déjà établi plusieurs collaborations avec l'équipe d'Ivano Bertini, qui a travaillé sur des approches RMN pour étudier la structure et la dynamique de la MMP-12, nous avons discuté avec ce groupe afin d'étudier la possibilité de suivre, par RMN ¹³C, le carbone porté par le groupe carboxylate du résidu glutamate 219. D'après nos résultats, le shift de pKa induit par la liaison du RXP470.1 doit affecter directement le déplacement chimique de ce carbone. Ce type de suivi, en absence et en présence d'inhibiteur, constituerait ainsi une autre méthode de choix pour déterminer le de pKa du résidu glutamate. Malheureusement, les mesures réalisées par nos collègues italiens n'ont pas permis de repérer la résonnance de ce carbone.

Devant cette limitation expérimentale, nous nous sommes tournés vers des approches théoriques capables de prédire la valeur du pKa du glutamate 219 en absence et en présence d'inhibiteur. Nous avons ainsi initié une collaboration avec le groupe d'Emil Alexov, spécialisé dans la modélisation de macromolécules biologiques et notamment sur les shifts de pKa de résidus chargés présents à l'interface protéine/ligand. Ce travail s'est appuyé sur les structures haute-résolution, obtenues au laboratoire, du RXP470.1 en complexe avec la MMP-12h et sur le logiciel DelPhi, au développement duquel l'équipe d'Alexov contribue¹³⁸.

L'interaction entre le RXP470.1 et la MMP-12h, et plus particulièrement le Glu²¹⁹, a ainsi été décomposée selon trois contributions énergétiques : l'énergie de solvatation issue de l'interaction entre les groupements chargés de la chaîne latérale du résidu d'intérêt et la phase aqueuse, ΔG^{desolv} ,

l'énergie issue des interactions électrostatiques entre le résidu d'intérêt et les autres charges n de la protéine (dont l'ion zinc catalytique et l'inhibiteur considéré), ΔG^{polar} , et l'énergie issue des interactions charge à charge entre le résidu d'intérêt et les autres groupements de la protéine, $\Delta G^{\text{charge-charge}}$,

	ΔG^{desolv}	ΔG^{polar}	$\Delta G^{\text{charge-charge}}$	ΔG^{total}
Glu²¹⁹ (Etat libre) kcal.mol ⁻¹	1,18	-5,09	2,14	-1,77
Glu²¹⁹ (Etat complexé) kcal.mol ⁻¹	2,88	-2,25	3,45	4,08
$\Delta \Delta G$	1,7	2,84	1,31	5,85
ΔpK_a (unités de pH)		4,4		

Tableau IV.1 : Décomposition énergétique pour le Glu²¹⁹ en présence et en l'absence du RXP470.1

Valeurs fournies par le groupe d'Alexov, Université de Clemson

La liaison du RXP470.1 masque la chaîne latérale du Glu²¹⁹, ce qui tend à limiter son interaction avec la phase aqueuse. La forme ionisée du glutamate catalytique n'est donc pas favorisée, ce qui se traduit énergétiquement par une « pénalité de désolvatation » d'environ 1,7 kcal.mol⁻¹ ($\Delta \Delta G^{\text{desolv}}$). La présence des fonctions chargées de l'inhibiteur, et en particulier du groupement phosphinate PO₂⁻, à proximité de la fonction carboxylate COO⁻ est, elle aussi, énergétiquement défavorable au maintien de la forme chargée du Glu²¹⁹ ($\Delta \Delta G^{\text{polar}}$: 2,84 kcal.mol⁻¹). Enfin, le glutamate catalytique est entouré de résidus chargés négativement. A l'état libre, les molécules d'eau présentes dans le site catalytique limitent ces interactions charge à charge. Lorsque le RXP470.1 lie la MMP-12h, il déplace ces molécules d'eau, ce qui implique une plus grande exposition du glutamate aux résidus acides voisins. Energétiquement, cela se traduit par une pénalité de 1,3 kcal.mol⁻¹ ($\Delta \Delta G^{\text{charge-charge}}$). Au final, le coût énergétique associé au maintien de la forme chargée du Glu²¹⁹ dans l'enzyme complexée avec le RXP470.1 est extrêmement défavorable (5,85 kcal.mol⁻¹), ce qui se traduit par un shift du pKa de ce résidu de 4,4 unités de pH. La simulation proposée par le groupe d'Alexov va donc bien dans le sens de nos mesures expérimentales ($\Delta pK_a = 10 - 5,7 = 4,3$) et apporte un nouvel éclairage aux mécanismes moléculaires complexes pouvant altérer l'état de protonation du glutamate catalytique de la MMP-12h, suite à la liaison du RXP470.1 et ses effets sur les valeurs de pKa (Tableau IV.1).

Effets enthalpiques associés à la prise de proton

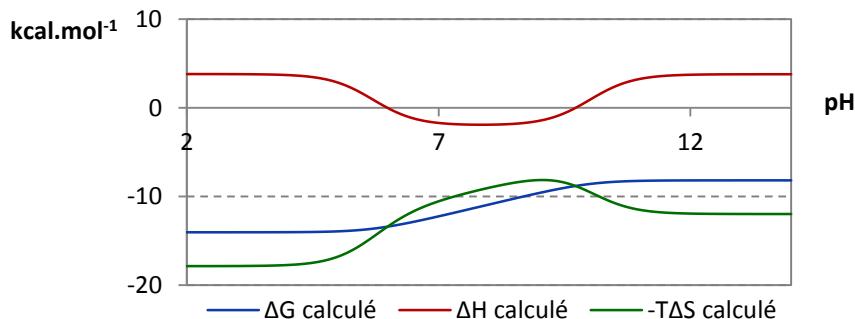
La décomposition complète du terme ΔH° déterminée par ITC, nous a permis de mettre en regard la valeur de variation de l'enthalpie intrinsèque de liaison du ligand et celle associée à la prise d'un proton par le résidu glutamate 219. Les valeurs retournées sont tout à fait surprenantes, puisque nous avons déterminé une variation importante d'enthalpie de protonation ($\Delta H_p^f = -5,8$ kcal.mol⁻¹), mais une valeur positive pour l'enthalpie intrinsèque de liaison du RXP470.1 ($\Delta H_{\text{int}}^\circ = 3,8$ kcal.mol⁻¹). Ces valeurs sont

d'autant plus étonnantes si l'on songe au nombre d'interactions qu'engage le RXP470.1 avec le site actif de la MMP-12, alors qu'en regard il s'agit de la simple interaction d'un proton avec le résidu glutamate. Aux valeurs de pH intermédiaires (entre 6 et 8,5), sans cette prise de proton, le bilan enthalpique de la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme serait très défavorable. Les raisons expliquant le bilan enthalpique défavorable de cet inhibiteur ne sont pas faciles à identifier, à ce stade nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses. La première se rapporte à la définition même de l'enthalpie de liaison intrinsèque : celle-ci reflète en effet l'interaction indépendante des échanges de protons, des deux partenaires à l'état déprotoné. L'affrontement des charges négatives du carboxylate du Glu²¹⁹ (COO⁻) et du RXP470.1 (POO⁻) doit nécessairement s'accompagner d'une pénalité enthalpique forte. Nous nous sommes également interrogés, avec le travail de Bertrand Czarny, sur le rôle de la désolvatation des deux glutamates du RXP470.1 dans le bilan enthalpique de l'inhibiteur⁸⁴. On peut ainsi supposer, dans un premier temps, que la perte des interactions établies en solution, entre ces deux groupes carboxylates et les molécules d'eau adjacentes doit être pénalisantes d'un point de vue enthalpique, d'autant plus que les deux glutamates de l'inhibiteur n'engagent pas d'interaction avec le site actif de l'enzyme. Cependant, cette hypothèse peut être rejetée par l'étude d'un analogue du RXP470.1 possédant, en place des deux résidus glutamates, deux résidus alanine et dont la signature thermodynamique est similaire à celle du RXP470.1. En revanche, l'utilisation d'une chaîne latérale très contrainte en position P₁' de l'inhibiteur peut, compte tenu de la taille de la cavité S₁', notamment dans sa partie haute, entraîner des pénalités stériques sévères. On observe ainsi, que les trois cycles de la chaîne latérale en position P₁' sont, de façon à satisfaire aux exigences de la forme de la cavité S₁', quasiment situés dans un même plan. Une telle co-planarité entre des cycles aromatiques ne correspond pas aux conformations de plus basse énergie, favorisant certainement des dispositions perpendiculaires entre les cycles. A cet égard, il serait intéressant d'insérer un groupe CH₂ entre les deux cycles phényles pour introduire, localement, une plus grande mobilité. Si notre hypothèse est juste, le positionnement d'un tel groupement permettrait de limiter les pénalités d'ordre stérique. Evidemment, une telle option aurait également une répercussion entropique, par l'augmentation du degré de liberté de la chaîne latérale en position P₁'.

Dépendance au pH des variations d'entropie

Au départ de cette étude, nous pensions que la forte dépendance de l'affinité de l'inhibiteur au pH relevait essentiellement d'un facteur enthalpique. La dissection des différentes composantes enthalpiques associées à la liaison de l'inhibiteur montre que les valeurs maximales d'enthalpie sont observées entre pH 7,5 et 8,5, et qu'à pH plus acide cette contribution diminue, alors même que l'affinité de l'inhibiteur augmente. La composante entropique, et non enthalpique, joue donc un rôle majeur dans l'augmentation de l'affinité du RXP470.1 à pH acide. En particulier, la Figure III.17 montre

que la composante entropique est plus importante à pH acide que neutre ($-17,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à pH 4, $-9,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à pH 8). La variation d'entropie atteint un minimum à pH 9 ($-8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$), avant de se stabiliser à partir de pH 12 ($-13 \text{ kcal.mol}^{-1}$).



Reproduction de la Figure III.17 : Evolution des composantes énergétiques de l'interaction RXP470.1 / MMP-12h F171D K241A en fonction du pH

Simulation de ΔG à partir de la loi de van't Hoff, et de ΔH à partir de l'équation 8. $-T\Delta S$ représente la différence entre ΔG et ΔH .

A ce titre, l'analyse de la répartition des formes protonée et neutre de la MMP-12h F171D K241A en fonction du pH est assez intéressante (Figure IV.1). A pH très acide, avant et après la liaison du RXP470.1, la forme protonée du Glu²¹⁹ prédomine ($\text{pH} < \text{pK}_{\text{libre}} < \text{pK}_{\text{complexé}}$). A pH neutre et légèrement basique, le Glu²¹⁹ est principalement chargé avant liaison du RXP470.1, et neutre après ($\text{pK}_{\text{libre}} < \text{pH} < \text{pK}_{\text{complexé}}$).

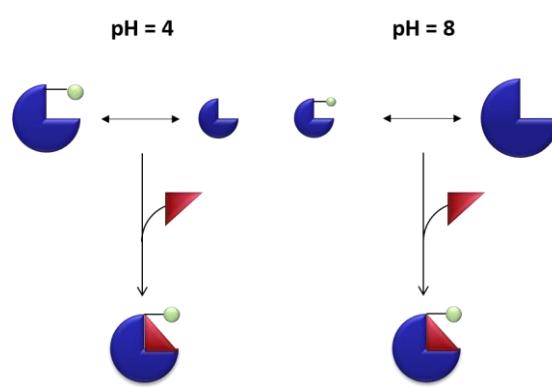
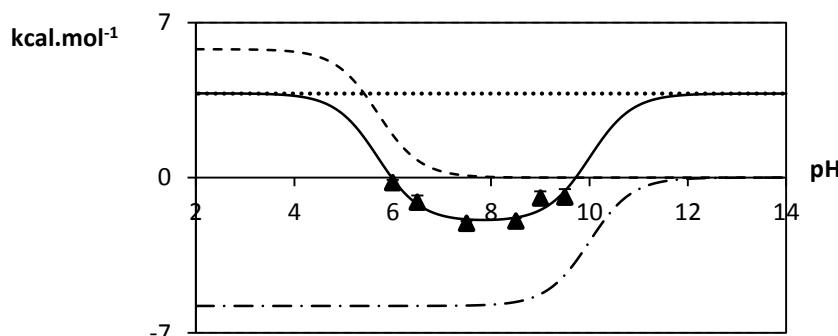


Figure IV.1 : Equilibre entre Glu²¹⁹ neutre et Glu²¹⁹ chargé en fonction du pH

L'état de protonation d'un acide glutamique est directement relié à sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec son environnement. Sous sa forme neutre, d'après la littérature, le groupement carboxylique COOH n'est ainsi capable de former, au maximum, qu'une seule liaison hydrogène. En revanche, sous sa forme chargée carboxylate COO⁻, trois liaisons hydrogènes sont possibles, que ce soit

avec d'autres résidus du site actif, un ligand, ou les molécules d'eau du solvant^{139,140}. Le pH affecte donc directement l'état de solvatation du glutamate catalytique. La liaison du RXP470.1 brise donc, potentiellement, plus de liaisons hydrogènes à pH 8 qu'à pH 4. Cependant, dans la plupart des cas, la désolvatation associée à une interaction protéine-ligand est fortement favorisée du point de vue entropique. En effet, la déstabilisation des liaisons hydrogènes s'accompagne d'une augmentation du degré de liberté des molécules d'eau retournant dans le solvant. La déstabilisation d'une plus grande quantité de liaisons hydrogènes doit donc se traduire par une variation d'entropie plus élevée à pH 8 qu'à pH 4. Nos mesures indiquent toutefois un effet inverse : c'est aux pH acides que la composante entropique est la plus favorable. Les variations d'entropie associées au pH ne se résument donc pas à la seule déstabilisation des liaisons hydrogènes engagées par le glutamate catalytique.

On note par ailleurs que, pour ces mêmes raisons, la forme neutre du Glu²¹⁹ doit être enthalpiquement moins favorable que la forme ionisée dans l'enzyme libre. En effet, la forme neutre COOH limite le nombre de liaisons hydrogènes possibles (une maximum) comparée à la forme déprotonée COO⁻ (jusqu'à trois). Ce constat est en adéquation avec nos simulations qui prévoient que l'effet bénéfique de l'échange de protons entre le solvant et le glutamate catalytique est associé à la protonation de l'enzyme complexée seulement (Figure III.15).



Reproduction de la Figure III.15 : Contribution des différentes composantes enthalpiques

$$\Delta H_0^\circ = \Delta H_{\text{int}}^\circ - \bar{H}^f \cdot \Delta H_p^\circ + \bar{H}^C \cdot (\Delta H_p^\circ + \delta \Delta H_p) \quad (\text{---})$$

Contribution intrinsèque : $\Delta H_{\text{int}}^\circ$ (....)

Contribution de la protonation de l'enzyme libre : $-\bar{H}^f \cdot \Delta H_p^\circ$ (---)

Contribution de la protonation de l'enzyme complexée : $\bar{H}^C \cdot (\Delta H_p^\circ + \delta \Delta H_p)$ (._.)

Valeurs expérimentales (◆)

Enfin, l'absence d'effets du pH dans le cas du composé 2, hydroxamique, tend à indiquer un rôle majeur pour le groupement chélatant phosphinate du RXP470.1. La désolvatation de ce groupe à l'approche du site actif pourrait-elle être un autre élément expliquant cette augmentation d'entropie en fonction du pH ? L'abaissement du pH engendrerait-il une plus grande désolvatation et un plus grand nombre de molécules d'eau relâchées dans le solvant (entropiquement favorable) ? A ce titre, il faut également prendre en considération les mouvements des résidus présents dans le site actif qui

pourraient, eux aussi, dépendre du pH. Toutefois, l'énergie libre résulte de la différence entre les variations d'enthalpie et d'entropie de liaisons. Des phénomènes de compensation entre enthalpie et entropie peuvent donc malgré tout se produire, et rester transparents du point de vue du ΔG associé à la réaction. Il serait donc tout à fait intéressant de mesurer la signature thermodynamique de la liaison du composé **2** à la MMP-12h pour différentes valeurs de pH. On pourrait ainsi comparer strictement l'évolution des profils entropiques du RXP470.1 et du composé **2** en fonction du pH.

Très clairement, la combinaison des paramètres thermodynamiques et structuraux n'est pas suffisante pour fournir une interprétation solide de la dépendance au pH de ces paramètres. Ceux-ci résultent d'une somme très importante d'effets, à la fois sur les interactions protéine/ligand, et sur les interactions avec le solvant, sans compter tous les phénomènes associés aux variations de mobilité du ligand et de la protéine. Les ressources et la puissance proposées par les approches *in silico* constituent une nouvelle piste pour tester toutes ces hypothèses de travail. Dans le cas des MMP, une seule étude a été publiée dans laquelle thermodynamique, structure et calcul d'énergie ont été combinés pour tenter de rationnaliser des variations d'enthalpie de liaison. Cette étude s'intéressait à une série d'inhibiteurs montrant une forte dépendance enthalpique. Les auteurs ont donc cherché à savoir si ces variations d'enthalpie pouvaient être expliquées par l'analyse des structures des complexes enzymes/inhibiteurs et par le calcul des énergies associées à l'interaction des atomes de l'inhibiteur et de l'enzyme dans le site actif. Dans ce cas particulier, des résultats assez cohérents ont pu être obtenus, avec des résultats issus du calcul en cohérence avec les données sur l'enthalpie et les observations faites en cristallographie. Nous n'avons pas planifié d'utiliser une telle démarche car, au départ de ce projet, nous n'étions pas sûr de pouvoir aller au bout de l'étude, et obtenir une décomposition expérimentale de la variation d'enthalpie déterminée par ITC. Aujourd'hui ce travail ayant été mené à bout, nous pourrions envisager une telle approche. Cependant, il semble que les simulations des effets entropiques soient beaucoup plus difficiles à réaliser que celles correspondant à des effets enthalpiques.

Rôle du groupement chélatant

Cette étude est la première, à notre connaissance, ayant combiné données d'affinité, thermodynamiques et structurales pour aborder le rôle du groupement chélatant. D'un point de vue biologique, nos données indiquent très clairement un effet très important du groupe chélatant. Le plus spectaculaire est certainement celui observé sur le profil de sélectivité des trois composés testés sur différentes MMP. Evidemment, il conviendrait pour commenter ce profil d'avoir des données de structure et de thermodynamique sur un plus grand set de MMP, un travail pouvant être limité par la difficulté à produire certains domaines catalytiques de MMP. On peut arguer que les profils de

sélectivité sont biaisés par le choix de la structure peptidique qui a été utilisée pour développer les composés **2** et **3**, puisque cette partie de l'inhibiteur a été optimisée pour interagir sélectivement avec la MMP-12. Dans le cas du composé **3**, on a pu observer un profil de sélectivité dont la tendance globale rappelle celle déterminée pour le RXP470.1 (Figure III.32). Cependant, par rapport au RXP470.1, les écarts d'affinité sont plus réduits, générant ainsi un composé bien moins sélectif. De manière tout à fait intéressante, seule la MMP-12h discrimine défavorablement le composé **3** par rapport au RXP470.1, les autres MMP ne différenciant pas les deux composés (MMP-3, 8, 9, 10, et 14) ou en faveur du composé **3** (MMP-2 et 13). Dans cette optique, il serait tout à fait intéressant de comparer les structures de différentes MMP (non discriminantes ou en faveur du composé **3**) en complexe avec ces deux composés. Enfin, dans le cas du composé **2**, nous avons été étonnés de la puissance de ce composé vis-à-vis de certaines MMP, avec des affinités surpassant de 2 à 3 ordres de grandeur celles observées pour le RXP470.1 et le composé **3**. Cependant, là encore, le profil de sélectivité est grandement altéré. En particulier, le composé **2** se caractérise plutôt comme un inhibiteur mixte des MMP-13 et 12.

Il serait évidemment intéressant de déterminer les signatures thermodynamiques de la liaison du composé **2** à différentes MMP pour connaître l'origine de la puissance de ce composé ($K_i(MMP-13)=10$ pM). Ce travail a été réalisé avec la MMP-12, nous amenant à constater que pour cette MMP, la meilleure affinité du composé **2** ne venait pas d'une contribution enthalpique plus favorable, mais dépendait essentiellement du facteur entropique. L'analyse des structures a mis en évidence que chaque groupement chélatant impose de façon assez subtile ses contraintes dans le mode de liaison de l'inhibiteur. A cet égard, il est essentiel d'obtenir des structures à très haute résolution. Malgré la qualité des structures obtenues (1,3 Å), on ne peut qu'avancer des hypothèses pour expliquer les signatures thermodynamiques observées pour les composés **2** et **3**. En effet, si les structures semblent très proches globalement, la signature observée pour le composé **3** s'avère très différente de celles du RXP4701 et du composé **2**. Ce résultat souligne que de très faibles variations de structures peuvent engendrer des différences très importantes dans les signatures thermodynamiques. Il a été proposé dans la littérature que de tels effets pouvaient s'expliquer par la non-additivité des interactions et la compétition entre les différentes parties de l'inhibiteur et du site actif, ce qui rend très difficile toute interprétation basée sur une structure statique, aussi bien résolue soit elle¹⁴¹. Un des résultats, peut-être le plus significatif de ceux obtenu par la résolution des structures cristallographiques, concerne les différences de facteur B qui ont été observées pour les trois inhibiteurs testés. Traduites en variation de mobilité, ces observations suggèrent comment de petites modifications du positionnement du groupe chélatant peuvent avoir des répercussions sur l'ensemble de la structure de l'inhibiteur et ses degrés de liberté dans le site actif de l'enzyme. Nous avons ainsi suggéré que la réduction de mobilité observée

spécifiquement pour le composé **3** pouvait être une explication de sa signature thermodynamique dont la contribution enthalpique est très favorable. Même si cette hypothèse est vraie, on doit néanmoins reconnaître que cette observation sera très difficile à exploiter car, comme souligné ci-dessus, la synergie ou la compétition entre les interactions rendent difficile la mise en place d'une stratégie rationnelle de conception d'inhibiteurs. Les résultats issus de l'expérimentation en laboratoire ne sont donc qu'une étape dans cette perspective, le développement d'approches de calcul et de simulations de plus en plus performantes suscitent de nombreux espoirs parmi la communauté scientifique. Dans notre cas, nous espérons qu'elles nous permettront de mieux comprendre la complexité de ces interactions, y compris à l'échelle d'un petit ligand, aidé dans son interaction par un tout petit atome, un tout petit proton.

Chapitre V. Matériel et Méthodes

I. Synthèse des inhibiteurs de MMP

L'essentiel de la chimie a été réalisée au laboratoire par le Dr. Laurent DEVEL.

Le composé RXP470.1 a été synthétisé selon le protocole décrit par Devel, et al.¹²⁹. La synthèse des composés **2** et **3** est quant à elle détaillée dans une publication en cours de révision. A titre indicatif, la partie chimie du *Matériel et Méthodes* de cette publication est donnée en annexe. Tous les inhibiteurs ont été synthétisés sur support solide.

Le composé **2** et le composé **3** ont été respectivement synthétisés à partir de blocs succinique et malonique. Les bruts de synthèse ont été purifiés par RP-HPLC sur colonne préparative (Supelco Ascentis® C18 : 150 x10 mm, 5µm) ou semi préparative (Grace® Vision HT C18 HL 5µm x10 mm, 5µm) selon le gradient suivant : 0-35%(B) – 5 min, 35-65%(B) – 20 min, 65-100%(B) -5 min (avec (A) : H₂O, 0,1% TFA et (B) : 90 % acétonitrile, 0,09% TFA, débit : 8 mL.min⁻¹). La purification a été suivie par UV, à 230 et 280 nm. Chaque composé est lyophilisé, puis resolubilisé dans de l'eau et neutralisé avec une solution d'ammoniaque 33%. Une nouvelle analyse en RP-HPLC (Supelco Ascentis® Express C18 : 100 x4,6 mm, 5µm) selon un gradient 0-100%(B) – 10 min (avec (A) : H₂O, 0,1% TFA et (B) : 90 % acétonitrile, 0,09% TFA, débit : 1,2 mL.min⁻¹) est réalisée en complément d'une analyse par spectrométrie de masse haute résolution (4800 MALDI-TOF, Applied Biosystems) en mode d'ionisation positif sur une gamme m/z 100 – 800 (1000-2000 tirs par spectre, calibration interne grâce au rapport m/z d'une matrice 4-HCCA). Enfin, la concentration de chaque solution est déterminée par mesure de son spectre d'absorbance (Spectrophotomètre UV Shimadzu, UV-1800) et par dosage en acides aminés (JLC-500/V, JEOL).

Les composés sont stockés sous forme liquide ou solide (deuxième lyophilisation) à 4°C (composés **1** et **3**) ou à -20°C (composé **2**). L'intégrité des composés est vérifiée par spectrométrie de masse (LC-MS) avant chaque utilisation.

Le composé 500.1, utilisé pour la titration des MMP a été synthétisé, purifié et analysé selon le même protocole que le RXP470.1.

Les caractéristiques des composés utilisés lors de cette étude sont regroupées dans le Tableau V.1.

Tableau V.1 : Caractéristiques des inhibiteurs utilisés

II. Production et Purification de la MMP-12

II. A. Production

II. A. a. Constructions utilisées – mutagenèse dirigée

Tout au long de cette étude, nous avons utilisé une forme de MMP-12 recombinante produite et purifiée au laboratoire. Le gène de synthèse codant pour le domaine catalytique (Met¹⁰⁵-Gly²⁶³) a été muté en position 171 (F171D) pour augmenter la solubilité de la MMP-12 (de 4 mg.mL⁻¹ à 15 mg.mL⁻¹). La mutation de cette phénylalanine, située en surface de la protéine, loin du site actif, en asparagine, est décrite par le groupe d'Ivano Bertini ⁷⁶.

MMP-12 F171D

HMGPVWRKHYITYRINNYTPDMNREDVDYAIRKAFQVWSNVTPLKFSKINTGMADILVVFARGAHGDDHAFDGKG
GILAHAFGPGSGIGGDAHFDEFWTTHSGGTNLFLTAVHEIGHSLGLGHSSDPKAVMFPTYKYVDINTFRLSADDIRG
IQSLYG

Cette construction a été sous clonée dans un vecteur pET-24a (GENEART-AG, Germany) entre les sites de restriction NdeI et BamHI. Ce vecteur, optimisé pour une production dans *E. coli*, permet d'obtenir de grandes quantités de MMP-12h F171D recombinantes (5 µmol de protéines pour 500 mL de culture).

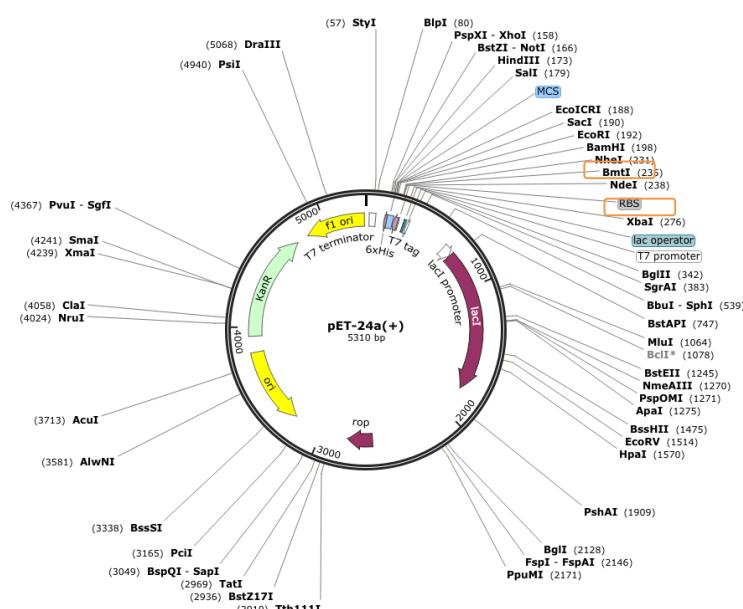


Figure V.1 : Plasmide d'expression pET-24a

Mise en évidence des sites de restriction NdeI et BamHI

Une deuxième mutation a été introduite au niveau du résidu 241 (K241A) pour ne pas parasiter le signal de protonation du Glu219 :

MMP-12 F171D K241A

HMGPVWRKHYITYRINNYTPDMNREDVDYAIRKAFQVWSNVTPLKFSKINTGMADILVVFARGAHGDDHAFDGKG
GILAHAFGPGSGIGGDAHFDEFWTTHSGGTNLFLTAVHEIGHSLGLGHSSDPKAVMFPTYAYVDINTFRLSADDIRG
IQSLYG

La mutagenèse est effectuée avec le kit QuickChange® site-Directed Mutagenesis (STRATAGENE, Heildeberg, Germany).

II. A. b. Amplification de vecteur

L'amplification d'un vecteur permet d'augmenter la quantité de matériel génétique codant pour la protéine d'intérêt. Ici, l'amplification est réalisée en transformant des bactéries *E. coli* électrocompétentes (voir ci-après).

Cette étape, préalable à la production de bactéries, permet en outre de vérifier la bonne insertion du gène dans le plasmide (deux cas possibles : le plasmide se referme vide, ou le gène de synthèse est bien inséré).

Transformation de bactéries électrocompétentes

L'électroporation, qui fragilise la membrane bactérienne par choc électrique, permet le passage du vecteur d'expression. 40 µL de bactéries électrocompétentes XL1-Blue sont mis en présence de 0,5 µL de plasmides (100 µg.mL⁻¹) dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie sur glace. La décharge électrique (2,5 mV, 5 ms) est appliquée via le GenePulser de Biorad.

Les bactéries ainsi transformées sont étalées sur boîte de Pétri (milieu LB solide supplémenté en Kanamycine).

II. A. c. Vérification de la séquence

Après avoir amplifié le vecteur, il faut vérifier son intégrité (absence de mutations indésirées, de coupures impromptues,...).

On prélève donc une ose des colonies obtenues à l'étape précédente que l'on transfère en milieu LB liquide. Cette préculture est laissée, sous agitation, à 37°C toute la nuit. Le lendemain, le plasmide est

purifié grâce au kit Plus Midipreps DNA Purification System et envoyé pour séquençage à Eurofins MWG Operon.

II. A. d. Expression

La phase d'expression est réalisée chez *E. coli* BL21 *. Les cellules sont transformées par électro- ou thermo-poration.

Transformation de bactéries thermocompétentes

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans la section I. A. c. Amplification de vecteur.

Transformation de bactéries thermocompétentes

L'alternative est d'utiliser des bactéries thermocompétentes, c'est à dire dont la membrane est fragilisée par choc thermique.

50 µL de bactéries thermocompétentes BL21* sont mis en présence de 0,5µL de plasmide pendant 30 minutes, dans la glace. L'eppendorf contenant le mélange bactérie/plasmide est ensuite plongé 30 secondes dans un bain-marie à 42°C puis immédiatement replacé en glace. Avant de lancer la préculture, le mélange est dilué au 6^{ème} dans du milieu LB et incubé pendant 1h à 37°C, sous agitation.

La préculture se fait sur la nuit : 100 mL de milieu LB sont ensemencés avec les bactéries transformées (50 µL). On ajoute 100µL de Kanamycine (50µg.L⁻¹) pour que seules les bactéries contenant le plasmide et donc le gène de résistance à la Kanamycine ne poussent.

La culture est lancée le lendemain matin : 1L de milieu LB est ensemencé au 1/100^{ème} par la préculture lancée sur la nuit. 1 mL de Kanamycine (50 µg.L⁻¹) est ajouté au milieu, toujours pour sélectionner les bactéries résistantes. La progression de la culture est suivie par lecture de densité optique (DO) à 600 nm.

L'expression est induite par ajout d'IsoPropyl-1 Thio-β-D-Galactoside (IPTG) en phase exponentielle (A(600 nm) = 0,6 – 0,8). Le mélange est laissé à incuber pendant 5 heures, sous agitation, à 37°C.

A l'issue des 5 heures d'incubation, les bactéries sont centrifugées à 2000 G pendant 30 minutes. Les protéines étant produites en corps d'inclusion, on récupère le culot cellulaire. Celui-ci est lavé par 100 mL d'un tampon TRIS pH7,5 50 mM, NaCl 30 mM, CaCl₂ 10 mM, réparti en 2 x 50 mL, puis recentrifugé à 8000 G pendant 15 minutes.

Ces derniers culots sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C en attendant d'être purifiés.

II. B. Purification et repliement

Le protocole décrit ci-après correspond à la purification d'un culot bactérien provenant de 500 mL de culture. Les tampons utilisés tout au long de la procédure de purification et de repliement sont détaillés dans le Tableau V.2.

Dénomination	Description	Filtration
TP A	Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), Benzamidinochloride 5 mM, 2-mercaptoethanol 5 mM	0,22 µm
TP B	Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), Urée 2 M, 2-mercaptoethanol 5 mM	0,22 µm
TP C	Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), Urée 8 M	0,22 µm
TP D	Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), CaCl ₂ 10 mM, NaCl 200 mM, ZnCl ₂ 0,1 mM, Urée 3M	0,45 µm
TP D1	Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), CaCl ₂ 5 mM, NaCl 200 mM, ZnCl ₂ 0,1 mM	0,45 µm
TP E	Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), CaCl ₂ 3 mM, NaCl 200 mM, ZnCl ₂ 0,1 mM	0,45 µm

Tableau V.2 : Liste des tampons de purification

Le culot est repris, en glace, dans 20 mL de TP A additionné de lysozyme (1 mg.mL⁻¹, 500 µL) et de PMSF (50 µL, 2,5 µg.mL⁻¹). Ce mélange est laissé dans la glace 30 minutes, réhomogénéisé avec l'ajout de 50 µL de PMSF, puis laissé à nouveau 30 minutes sur glace.

Les bactéries sont lysées au disrupteur (Constant Systems Ltd, Daventry Northants, England) par deux passages successifs sous une pression de 1,5 bar. L'ADN et l'ARN contenus dans le lysat sont éliminés par l'ajout de benzonase (DNase / RNase) et de MgCl₂. La solution est laissée 30 min sous agitation à 4°C (S₀) et centrifugée 30 min à 8000 G.

La MMP-12 étant produite en corps d'inclusion elle se retrouve dans la partie non soluble. Ce culot protéique est lavé en TP B (30 mL) et centrifugé (8000G) 3 fois. Ces lavages en 2M Urée permettent d'éliminer les protéines plus solubles que la MMP-12.¹⁴² Les surnageants obtenus (S₁ à S₃) sont mis de côté.

Le culot final est repris dans 10 mL de TP C dans lequel la MMP-12 est totalement soluble. Le solubilisat est laissé 1 heure à 37°C (réhomogénéisé au bout de 30 minutes) avant d'être centrifugé 40 minutes à 18 000 G. Le surnageant S₄ ainsi obtenu est dilué dans le TP C de manière à obtenir une concentration finale de 200 µg.mL⁻¹ (S_{4'}).

Le repliement est réalisé en dialysant à 4°C successivement la MMP-12 dans deux tampons contenant respectivement 3M et 0M d'Urée (TP D et TP D1). La première dialyse (TP D) est réalisée sur 3 heures et la seconde (TP D1) sur la nuit. La troisième et dernière dialyse se fait sur 3 heures à 4°C et sert essentiellement à fixer les concentrations de NaCl, CaCl₂ et ZnCl₂. On récupère des aliquots de la solution protéique à la fin de chaque dialyse (respectivement S₅, S_{5'} et S₆).

En fin de dialyse, les éventuels précipitats sont culotés en centrifugeant la solution protéique à 18 000 G pendant 40 minutes pour éliminer. Le surnageant S7 obtenu est récupéré et congelé à l'azote pour stockage à -80°C.

Les aliquots prélevés à chaque étape de la purification et du repliement sont dosés selon le protocole de Bradford et chargés sur un gel SDS-PAGE 15%. La solution protéique finale (S7) est également analysée en LC-MS pour vérifier la masse et la pureté de la protéine obtenue.

III. Caractérisation de l'activité enzymatique

III. A. Principe général

Les MMP sont des endopeptidases capables à ce titre de dégrader certains pseudo-peptides fluorogéniques. Les molécules que nous utilisons sont des substrats dits à transfert d'énergie par résonnance de fluorescence (FRET). Sous leur forme entière, la fluorescence de ces substrats, induite par un groupement methyl cumaryl amide (MCA), est quenchée par un groupement DNP (dinitrophénol) ou DPA (3-(2,4-Dinitro-phenyl)-L-2,3-diaminopropionyl). Le clivage de la molécule sépare le quencheur du groupe fluorescent MCA, l'augmentation de fluorescence suit donc l'activité protéolytique des MMP considérées. Les tests sont réalisés en plaques noires 96 puits (NBS 3650, Corning Costar, France) avec un fluorimètre sous agitation et à température constante (Fluoroskan Ascent, Thermolab Systems). Dans tous les types de mesures décrits ci-dessous, la longueur d'onde d'excitation est toujours fixée à 320 nm. Le détecteur de fluorescence est quant à lui réglé à 400 nm.

III. B. Test d'activité

Ce type de test est réalisé pour vérifier que la protéine est toujours active, à l'issue d'une purification, d'un changement de tampon, ou d'une concentration.

Le substrat fluorogénique utilisé ici est le MCA-Mat (MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH2, Enzo life science), un substrat général des MMP.

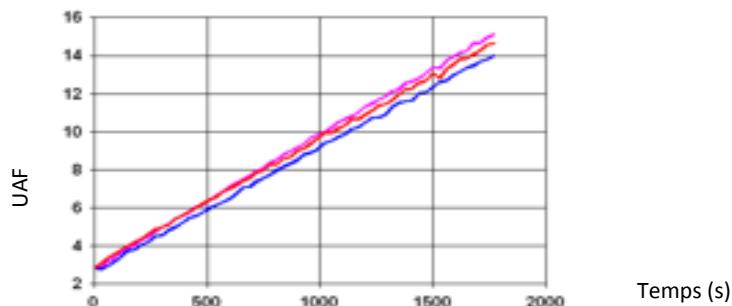
Milieu réactionnel (V_{tot}=200 µL)

190 µL de Tampon Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 10 mM, pH 6,8

10 µL de MMP-12 20 nM en Tampon Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 10 mM, 0,05% Brij35, pH 6,8 (estimation de la concentration par DO à 280 nm)

0,5 µL MCA-Mat 1,8 mM (stockage DMSO 100%)

La lecture est programmée sur 30 minutes, la fluorescence de chaque puits étant mesuré toutes les 30 secondes. Le traitement des données générées permet d'obtenir la courbe de dégradation du substrat en fonction du temps. L'activité de référence ainsi obtenue permet de suivre les effets de différents traitements sur l'activité de la protéine (Figure V.2).



III. C. Dosage de protéine active

Dans de nombreux cas, la concentration de MMP sous forme active est plus pertinente que la concentration en MMP totale obtenue par DO à 280 nm ou par la méthode de Bradford. Ce dosage est typiquement réalisé en fin de purification ou en parallèle de mesures calorimétriques. On se place dans des conditions telles que la concentration d'enzyme utilisée soit très supérieure à la constante d'inhibition de l'inhibiteur utilisé (condition de titration). Du fait de la stoechiométrie 1:1 de la réaction, la concentration d'enzyme dans l'échantillon est égale à la concentration d'inhibiteur pour laquelle on observe 100% d'inhibition.

Concentration enzymatique totale subnanomolaire ou de l'ordre de la dizaine de nanomolaires :

Classiquement, ce dosage est réalisé pour une concentration finale de MMP-12 ajustée à 20 nM. A cette concentration, le substrat utilisé précédemment (MCA-Mat) est trop rapidement dégradé par la MMP-12, on utilise donc le MCA-MMP3 (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-(Dnp)-NH₂, R&D Systems).

Milieu réactionnel ($V_{tot}=100 \mu\text{L}$)80-x μL de Tampon Tris-HCl 50mM, CaCl_2 10 mM, pH 6,8x μL d'inhibiteur de référence LD 500.1 à 1 ou 10 μM (respectivement : 0/0,5/1/1,5/2 μL et 0,5 μL)10 μL de MMP-12 200 nM en Tampon Tris-HCl 50mM, CaCl_2 10 mM, 0,05% Brij35, pH 6,8 (estimation de la concentration par DO à 280 nm)10 μL MCA-MMP3 180 μM (stockage DMSO 100%)

Les plaques sont incubées 45 minutes à température ambiante sous agitation avant d'ajouter le substrat et de lire pendant 30 minutes (une mesure par puits toutes les 30 secondes). A chaque puits correspond une courbe de dégradation que l'on met en regard des pentes obtenues en absence d'inhibiteur : on obtient ainsi les pourcentages d'inhibition de l'enzyme à différentes concentrations d'inhibiteur. Comme l'on s'intéresse aux vitesses initiales, les pentes sont calculées sur une portion de dégradation linéaire correspondant à moins de 10% de substrat dégradé.

Grâce au logiciel KaleidaGraph (Version 4.1.3, Synergy Software), on applique une régression non-linéaire aux points obtenus expérimentalement. On en tire alors la concentration d'enzyme active (Figure V.3).

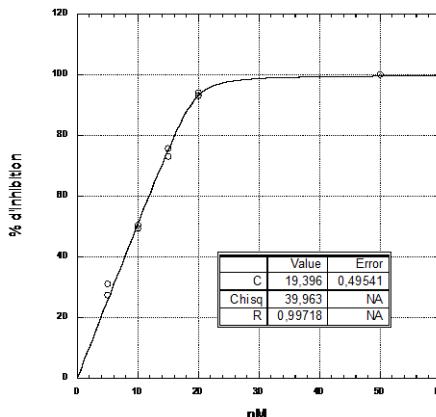


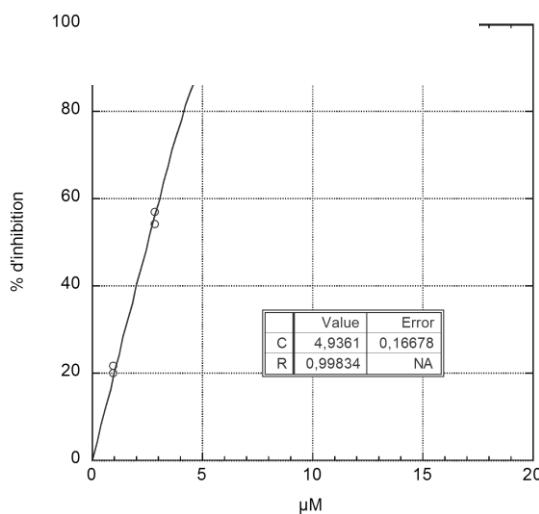
Figure V.3 : Courbe de dosage de 20 nM de MMP-12 F171D K241A par l'inhibiteur 500.1

Concentration enzymatique totale de l'ordre du micromolaire :

Dans le cas de mesures calorimétriques, le turn-over du MCA-MMP3 est bien trop élevé pour mesurer confortablement une vitesse initiale au vu des concentrations enzymatiques utilisées (3-100 μM). On utilise donc le MCA-ECE (Mca-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys-(Dnp)-NH2, R&D Systems) qui est encore moins bien dégradé par la MMP-12 que le MCA-MMP3.

Milieu réactionnel ($V_{tot}=100 \mu\text{L}$)90 μL de MMP-12 non diluée $x \mu\text{L}$ de l'inhibiteur non dilué utilisé en ITC (typiquement 0 à 5 μL)qsp 95 μL final du tampon utilisé en ITC5 μL MCA-MMP3 180 μM (stockage DMSO 100%)

Avant d'ajouter le substrat MCA-ECE, la plaque est incubée 45 minutes à la température définie en ITC. La lecture est réalisée à la même température pendant 30 minutes. La courbe de titration est obtenue comme précédemment via KaleidaGraph (Figure V.4).

**Figure V.4 : Courbe de dosage de 5 μM de MMP-12 F171D K241A par le RXP470****III. D. Constante d'inhibition (Ki)**

Les tests de sélectivité vis à vis de huit MMP ont été réalisés par Fabrice BEAU.

Le Ki, ou constante d'inhibition, reflète l'affinité d'un inhibiteur pour sa cible. Il faut se placer dans des conditions où la quantité de protéine est inférieure à la valeur de la constante d'inhibition de l'inhibiteur (par opposition aux conditions de titration).

On utilise le substrat MCA-Mat (cf III. B. Test d'Activité).

Milieu réactionnel ($V_{tot}=200 \mu\text{L}$)190 - $x \mu\text{L}$ de Tampon TRIS 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM $x \mu\text{L}$ d'inhibiteur (Figure V.5)

0,5 μL d'enzyme diluée en Tampon TRIS 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, Brij 0,01%

10 μL MCA-Mat 180 μM (stockage DMSO 100%)

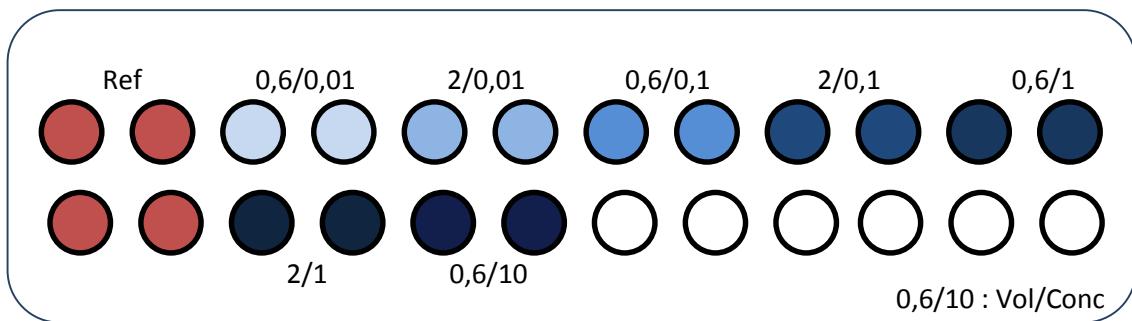


Figure V.5 : Exemple de répartition de l'inhibiteur pour une mesure de Ki

Avant d'ajouter le substrat MCA-Mat, la plaque est incubée 45 minutes à la température souhaitée. La lecture est réalisée à la même température pendant 30 minutes.

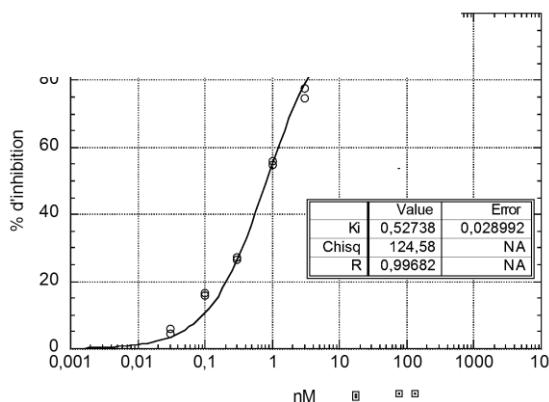


Figure V.6 : Détermination du Ki du RXP470.1 vis à vis de la MMP-12 F171D K241A à pH 6,8

Tampon Tris 20 mM pH 6,8, NaCl 200 mM, CaCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 0,1 mM

La courbe de titration est obtenue via KaleidaGraph en rapportant les pentes obtenues à différentes concentrations d'inhibiteur aux pentes de références (sans inhibiteur). La sigmoïde obtenue par régression non linéaire (méthode des moindres carrés) permet de lire directement le Ki. Sa valeur correspond à la concentration d'inhibiteur pour laquelle 50% de l'enzyme est inhibée (Figure V.6).

IV. Calorimétrie à Titration Isotherme

IV. A. Introduction

La Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC) est aujourd’hui la seule technique expérimentale capable de mesurer tous les paramètres thermodynamiques liés à une interaction. Les partenaires de l’interaction peuvent être, indifféremment, de nature protéique, lipidique ou nucléique. Il n’est pas nécessaire que les réactifs soient de même nature.

IV. A. a. Champ d’utilisation

Les récents progrès de la physique des matériaux ont permis une augmentation telle de la sensibilité des appareillages qu’il est désormais possible de mesurer des puissances thermiques extrêmement faibles (de l’ordre de $0,1\mu\text{W}$). Ces améliorations sensibles font de l’ITC un outil classiquement utilisé par les laboratoires de recherche publics et privés lors des phases de drug design et/ou drug discovery.

En effet, l’ITC est particulièrement utile dans la mesure où elle est la seule technique permettant d’obtenir directement et simultanément la stoechiométrie, la constante d’affinité et l’enthalpie de liaison caractérisant la formation d’un complexe réversible. La connaissance des contributions enthalpique et entropique à l’énergie libre de liaison constitue un degré supérieur d’information par rapport aux techniques biochimiques classiques et permet à l’expérimentateur de mieux appréhender les facteurs sous-jacents de la stabilisation d’un complexe.

Plus récemment, de nouvelles interprétations cinétiques ont émergé. Il est ainsi possible d’analyser les courbes de titration pour obtenir les constantes de vitesse et d’association.

IV. A. b. Principe de fonctionnement

Un microcalorimètre comporte deux cellules (Figure V.7). La première est appelée cellule de référence et ne contient que de l’eau. La seconde, la cellule de mesure, contient l’échantillon à titrer et est surmontée d’une seringue contenant la molécule titrante (ligand). Le microcalorimètre s’assure à tout instant que la température est la même dans les deux cuves.

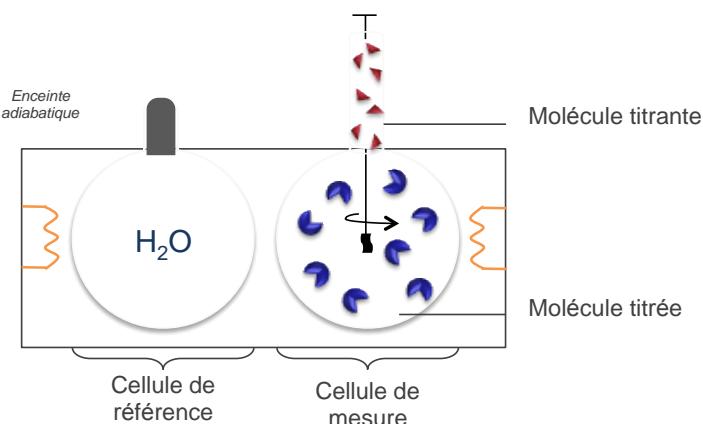


Figure V.7 : Schéma de fonctionnement d'un microcalorimètre

Lors de la mesure, chaque injection entraîne la libération d'une quantité connue de ligand qui peut alors interagir avec la molécule à titrer. Chaque interaction se traduit par une variation minime de chaleur. La température de la cuve de mesure varie alors sensiblement par rapport à la cuve de référence dans laquelle rien ne se passe. L'appareil détecte cette différence et la compense en appliquant une certaine quantité d'énergie ($\mu\text{cal.sec}^{-1}$) à la cuve de mesure, de manière à revenir à la température de référence. C'est cette énergie, libérée ou absorbée, qui est mesurée et reportée sous forme de thermogramme (Figure V.8 A). Les deux cellules sont entourées d'un revêtement adiabatique pour s'affranchir de l'influence de l'environnement.

Dans l'exemple présenté dans la Figure V.8 la réaction est endothermique : pour se produire, la réaction consomme de l'énergie sous forme de chaleur. La cellule de mesure devient alors plus froide que la cellule de référence. Pour rétablir la température de consigne, l'appareil applique alors le strict pendant de l'énergie consommée par la réaction. Puisqu'il y a eu consommation de chaleur, l'appareil doit fournir de l'énergie au système ($E>0$) et les pics sont orientés vers le haut. Lorsque la température des deux cellules redevient égale, il n'y a plus de compensation par l'appareil, le signal revient à sa valeur basale. Pour chaque pic, l'aire sous la courbe est proportionnelle au nombre de complexes formés. Dans le cas d'une réaction exothermique, la cuve de mesure devient plus chaude (libération de chaleur) et les pics sont donc orientés vers le bas.

Au fur et à mesure que la titration avance, la quantité de molécule titrée disponible pour interagir avec le ligand diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale. On parle alors de saturation du système.

En début de titration (Figure V.8 A.1), tout le ligand injecté peut se lier à la molécule, le signal recueilli est alors maximum. Si le rapport entre molécule titrée et ligand a été correctement ajusté (cf : Chapitre V.IV. B. a), tout le ligand apporté lors des premières injections interagit avec la cible et l'on observe un plateau dit de début de titration.

A mesure que la quantité de molécule titrée disponible diminue, la puissance du signal se réduit (Figure V.8 A.2). En fin de titration, le système est saturé et les pics enregistrés correspondent seulement à la chaleur de dilution (Figure V.8 A.3). Cette chaleur de dilution est en réalité présente à chaque injection mais est masquée par la chaleur de réaction bien plus importante. Cet effet est non spécifique et constant, on parle de plateau de fin de titration.

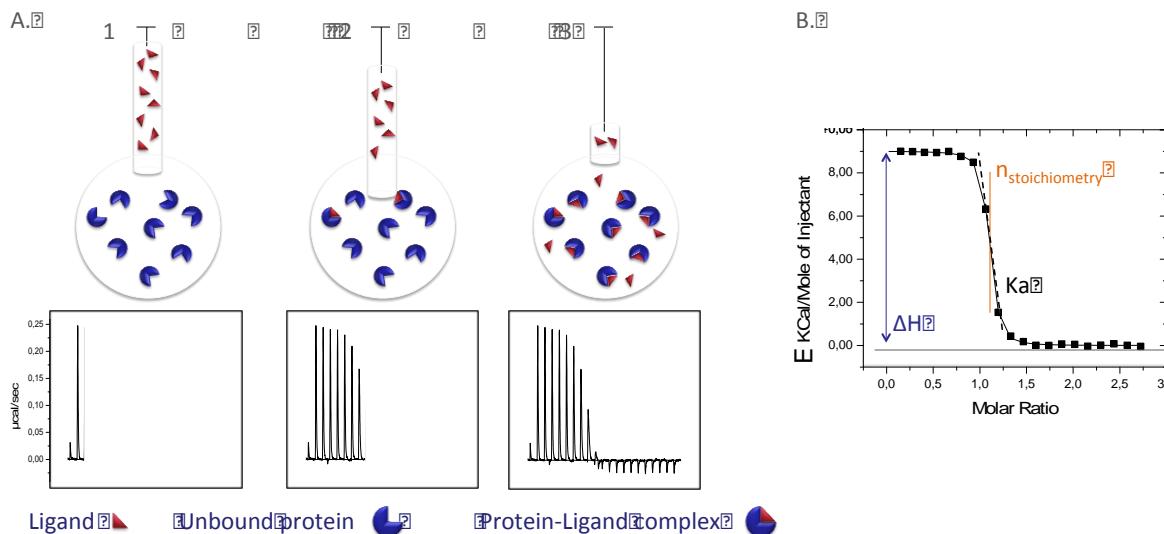


Figure V.8 : Principe de la Calorimétrie à Titration Isotherme

- A. Mise en correspondance des évènements moléculaires résultant de la titration (cellule de mesure) avec le signal récolté
- B. Interprétation des données issues de la titration : traitement du thermogramme

En fin de titration, le logiciel Origin 7.0 permet d'intégrer l'aire sous la courbe de chaque pic. On obtient alors une courbe de titration qui met en relation, pour chaque injection, le ratio ligand/protéine (abscisse) et la quantité de chaleur dégagée ou consommée par mole de ligand. De cette courbe, quatre informations sont immédiatement accessibles (Figure V.8 B.):

- L'affinité K_a du ligand pour sa cible (dans la gamme $nM-\mu M$),
- La variation d'énergie libre ΔG qui s'obtient directement à partir de la valeur de K_a :

$$\Delta G = -RT \ln(K_a)$$

Avec R , la constante des gaz parfaits $1,98 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, et T , la température en Kelvin

- La variation d'enthalpie observée $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ qui résulte de la différence entre les plateaux de début et fin de titration,
- La stoichiométrie de la réaction qui se lit au point équivalent, c'est à dire lorsque $E = \Delta H^\circ_{\text{obs}} / 2$.

Dans le cas particulier des réactions enzymatiques très affines ($K_a > 10^9 \text{ M}^{-1}$), la courbe de titration prend une allure de courbe en escalier ce qui rend imprécise la mesure de K_a . On peut alors récupérer

cette information en utilisant un deuxième ligand, de moindre affinité (connue). Le ligand de forte affinité est alors titré contre le complexe protéine/ligand peu affin. Dans notre cas, nous avons choisi de mesurer la constante de dissociation K_d de nos inhibiteurs par FRET (cf : Chapitre V.III. D).

IV. B. Déroulement d'une mesure d'interaction

Toutes les expériences d'ITC ont été réalisées sur les systèmes Microcal VP-ITC et ITC200 de Malvern (anciennement commercialisés par Microcal puis General Electrics HealthCare) (Figure V.9).

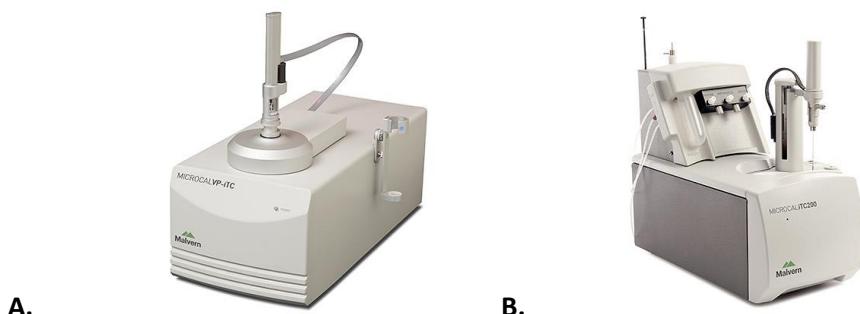


Figure V.9 : Appareils de microcalorimétrie utilisés

A. VP-ITC, Malvern ; B. ITC200, Malvern

IV. B. a. Détermination des concentrations

Les concentrations utilisées dépendent du complexe étudié, de l'affinité du ligand pour sa cible et de la variation d'enthalpie libre associée à la réaction.

Un bon point de départ est d'utiliser les formules suivantes :

$$[\text{Cuve}] = [10 ; 100] \times K_d, \text{ (avec } K_d = 1 / K_a\text{)}$$

$$[\text{Seringue}] = [7 ; 25] \times n \times [\text{Cuve}], \text{ (avec } n \text{ le nombre de site de liaisons)}$$

Dans le cas où la valeur de K_d est inconnue, l'utilisateur devra ajuster les concentrations à partir d'une valeur prédictive.

IV. B. b. Préparation des solutions

La solution protéique est amenée à la concentration souhaitée par dilution ou concentration (sous agitation en cellule Amicon® ou par centrifugation en tube Centricon®). La solution résultante est dialysée sur la nuit à 4°C (rapport de volume : 1/100). Le jour J, la solution dialysée est dégazée sous agitation et sous vide pendant 10 minutes puis filtrée à 0,22μM (Millex® GV low protein binding,

Millipore). Cette étape vise à limiter la formation de bulles dont l'éclatement perturbe le signal de mesure.

Les solutions de ligand et de protéine doivent se trouver dans des tampons strictement identiques afin d'éviter toute chaleur de dilution excessive lors de la titration. La solution titrante de ligand est donc préparée fraîchement en diluant une solution mère concentrée dans le tampon de dialyse de la protéine. Celle-ci est ensuite dégazée sous agitation et sous vide pendant 10 minutes.

La cellule de référence est quant à elle remplie d'eau milli-Q, dégazée et filtrée.

IV. B. c. Titration

Les injections sont effectuées sous agitation (310 rotations par minute, rpm) avec un intervalle de 240 secondes minimum. Le volume d'injection varie de 2 à 10 μ L selon le système étudié.

En parallèle de la mesure, la protéine dégazée et filtrée est dosée par fluorimétrie (voir III. C Dosage de protéine active). La concentration du ligand est elle vérifiée par densité optique (Spectrophotomètre, Shimazu).

IV. B. d. Analyse

Les thermogrammes obtenus sont ensuite traités et analysés en utilisant le modèle à une classe de sites indépendants du logiciel Origin 7.0 (Microcal ®). La stoechiométrie, la constante d'affinité et les variations d'enthalpie et d'énergie libre liées à l'interaction sont ainsi directement accessibles.

IV. C. Effets environnementaux : tampon, pH et température

La mesure de variation d'enthalpie libre réalisée lors d'une unique expérience ITC est en réalité une valeur « observée » ΔH°_{obs} qui peut varier sensiblement de la valeur « réelle » ΔH°_0 . Celle-ci dépend directement du nombre de protons échangés N_{H^+} lors de la liaison et de l'enthalpie de protonation du tampon ΔH^b_{ion} (Eq.1). On parle respectivement d'effet pH et d'effet tampon.

$$\Delta H^\circ_{obs} = \Delta H^\circ_0 + N_{H^+} \cdot \Delta H^b_{ion} \quad (\text{Eq. 6})$$

Avec :

ΔH°_{obs} , la variation d'enthalpie observée,

ΔH°_0 , la variation d'enthalpie de liaison qui serait observée si la mesure était effectuée dans un tampon dont l'enthalpie de protonation serait nulle,

ΔH^b_{ion} , l'enthalpie d'ionisation du tampon utilisé.

IV. C. a. Effet tampon

Chaque tampon se caractérise par son enthalpie de protonation. En cas d'ionisation de l'un ou l'autre des partenaires lors de la liaison, cette enthalpie vient directement affecter l'enthalpie de liaison $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$.

Il est dès lors très simple de vérifier si l'interaction des deux réactifs libère ou consomme un proton : à un pH donné, il suffit de répéter une même titration en changeant de tampon.

Une table des tampons utilisés détaillant leurs enthalpies de protonation respectives est fournie en annexe (Chapitre I.I).

IV. C. b. Effet pH

Les groupements protonés ou déprotonés lors d'une interaction inter-moléculaire présentent deux valeurs de pK_a : à l'état libre ($pK_{a\text{libre}}$) et à l'état complexé ($pK_{a\text{lié}}$). Cette variation s'explique par le changement d'environnement autour du groupement ionisable et peut-être modélisée par ordinateur. La fraction de protons échangés lors de la mesure dépend directement de la distance entre le pH choisi pour la mesure et ces deux valeurs de pK_a .

V. Cristallographie aux rayons X

Tout le travail de cristallographie réalisé dans le cadre de cette thèse, de la cristallogénèse à la résolution de structures, a été réalisé avec l'aide du Dr. Enrico STURA. Quatre structures à haute résolution (5CXA, 5CZM, 5D2B, 5D3C) ont été déposées sur la PDB, une cinquième est en cours de traitement.

La cristallographie aux rayons X est une technique physique qui permet d'accéder à la conformation tridimensionnelle des molécules étudiées. L'intérêt des rayons X dans la diffraction de cristaux s'explique par leur longueur d'onde de l'ordre de l'angström (\AA) qui se rapproche donc des distances interatomiques et peut permettre un positionnement des atomes jusqu'à une précision inférieure à la moitié de la longueur d'onde utilisée.

Un cristal se définit comme un état solide ordonné où les molécules sont empilées de façon régulière dans toutes les directions de l'espace. On appelle *maille cristalline* le plus petit motif répété par translation à travers tout le cristal. La *maille cristalline* est composée de plusieurs unités asymétriques. L'unité asymétrique est la plus petite région de l'espace qui permet de reconstruire la maille. La cohésion des différentes molécules du cristal (protéine, ligand, solvant, sels...) est assurée par des

interactions non covalentes (liaisons hydrogènes, de Van der Waals, interactions hydrophobes, ...). Les protéines étant solvatées, elles s'empilent en laissant des espaces intermoléculaires généralement comblés par de l'eau. L'utilisation de cristaux plutôt que d'une molécule isolée pour résoudre la structure 3D d'une protéine se justifie de plusieurs façons :

- Les ondes diffusées par la diffraction d'une protéine unique seraient de faible intensité. L'utilisation de cristaux, constitués d'une grande quantité de molécules orientées dans la même direction, permet de multiplier le signal de diffraction.
- Sous l'effet des rayons X, une molécule seule se dégraderait avant d'avoir permis d'obtenir un signal suffisant pour résoudre sa structure. Dans un cristal, le rayonnement est partagé entre toutes les molécules, ce qui permet de ralentir le phénomène de radiolyse. L'utilisation de lasers à rayons X est encore à l'étude mais devrait permettre, dans un futur proche, l'utilisation de molécules seules.

Plusieurs étapes sont nécessaires pour obtenir la structure 3D d'une protéine (seule ou en complexe) :

- La production et la purification de la protéine d'intérêt : des solutions homogènes, d'une grande pureté, et à haute concentration (de l'ordre du $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) sont requises. (voir Chapitre V.II Production et Purification de la MMP-12). Ces paramètres affectent directement la régularité de l'empilement cristallin et donc la précision finale de la structure.
- L'obtention de cristaux : on parle de cristallogénèse,
- La collecte des données de diffraction,
- La résolution de la structure à partir des données de diffraction.

V. A. Cristallogénèse

V. A. a. Formation et croissance d'un cristal

La cristallogénèse recoupe deux phénomènes successifs : la nucléation et la croissance cristalline (Figure V.10). Le passage de l'état liquide, désordonné, à l'état solide, ordonné, nécessite de franchir une barrière énergétique au moment de la nucléation. Tout l'enjeu est alors d'optimiser les conditions de pH, température, concentration de précipitants, etc... afin d'enclencher le processus de nucléation. La cristallisation des protéines suit les mêmes règles thermodynamiques que celle des petites molécules.

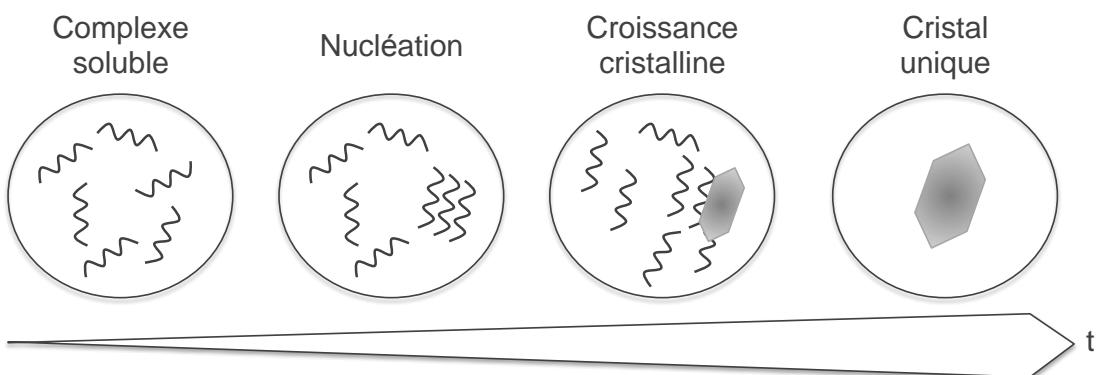


Figure V.10 : Croissance cristalline au cours du temps

Le comportement du complexe protéique à cristalliser peut-être décrit sous la forme d'un diagramme de phase (Figure V.11). La courbe de solubilité définit la limite entre les zones sous-saturées, où la protéine est à l'état liquide, et sursaturées où elle est à l'état solide. Un état solide n'implique toutefois pas un état cristallin: la protéine peut dans cette zone être sous forme précipitée ou cristalline.

La nucléation, point de départ de la cristallisation, ne peut être initiée que dans des conditions super-saturantes. Elle correspond à la formation de micro-amas de protéine qui, lorsqu'ils atteignent une taille critique, donnent naissance au cristal. La zone de nucléation se trouve à l'extérieur d'une courbe dite de super-solubilité qui correspond à un état métastable dans lequel le soluté est en sursaturation et précipité à la moindre perturbation. Le passage des zones sous-saturées à sur-saturées se fait en variant un ou plusieurs paramètres physico chimiques. Parmi ces paramètres, on notera : la concentration protéique, la nature et la concentration des agents précipitants, le pH et la température.¹⁴³

Pour poursuivre leur croissance, les micro-cristaux ainsi formés doivent rester dans la zone métastable où la sursaturation est plus faible mais suffisante pour que les cristaux grossissent. Le transport des molécules en solution vers le cristal dépend là encore de la concentration de la protéine et des agents précipitants, du pH, de la force ionique, de la température et de la pureté des molécules mises en jeu (protéine, ligands et agents chimiques). La cinétique de croissance est déterminante : il faut éviter la formation de cristaux désordonnés ou poly-cristallins dont la diffraction est plus difficile à interpréter. On considère généralement qu'une croissance ralentie permet de limiter les phénomènes de maclage et de poly-cristaux. La croissance d'un cristal traduit l'empilement des protéines selon un agencement préférentiel. Différentes conditions peuvent conduire à différents empilements, on parle alors de polymorphes. Si aucun arrangement n'est favorisé par rapport aux autres, il n'y a pas de croissance cristalline. La morphologie cristalline est déterminée par la dynamique de croissance des différentes faces du cristal, qui ne grandissent pas forcément à la même vitesse.

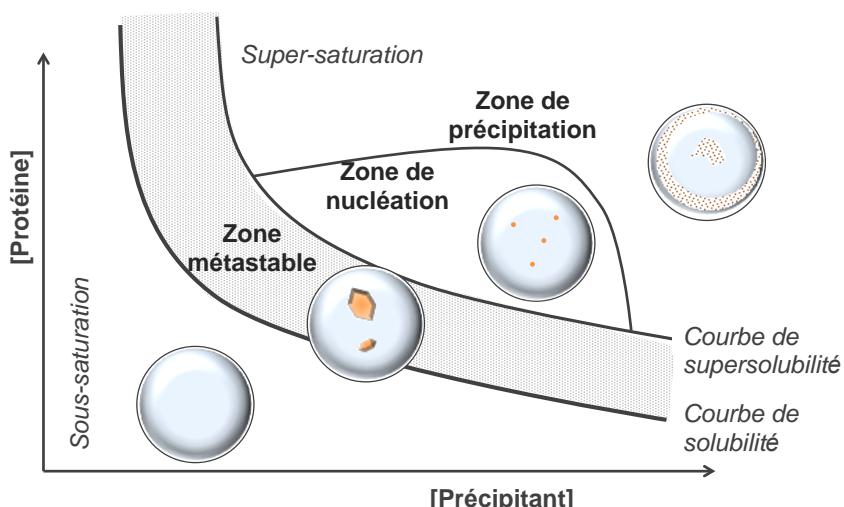


Figure V.11 : Cristallogénèse - diagramme de phase

La facilité de cristallisation dépend de nombreux phénomènes dont l'intensité des forces intramoléculaires mises en jeu. D'autres paramètres viennent moduler les capacités de cristallisation des macromolécules (Tableau V.3) et permettent d'optimiser les phases de nucléation et de croissance.

- La **température d'incubation** affecte la stabilité de la protéine ainsi que les mouvements du solvant et de la protéine qui régissent la croissance cristalline, on utilise donc des armoires tempérées.
- Le **pH** module la charge nette des protéines et donc les interactions intermoléculaires aux interfaces de la maille cristalline. Même de petites variations de pH (± 0.5) peuvent influencer le taux de nucléation et la vitesse de croissance des cristaux. Le pH et le tampon de travail sont choisis, en première intention, en fonction du point isoélectrique (pi) de la protéine.
- Les **phénomènes d'osmose** sont particulièrement importants dans le cas de la cristallisation par vapeur de diffusion (voir Chapitre V.V. A. b) car ils affectent directement la concentration protéique de l'échantillon à cristalliser. Les sels peuvent également jouer le rôle de contrions et neutraliser la charge globale du cristal.
- Les **agents précipitants et déshydratants** permettent de diminuer la solubilité de la protéine et ainsi de franchir les courbes de solubilité et entrer dans les zones de sursaturation. On retrouve trois grandes catégories d'agents précipitants : les sels ($MgCl_2$, $NaCl$, Li_2SO_4) qui vont jouer sur la force ionique du milieu ; les polymères à longue chaîne et les polymères de bas poids moléculaire (PEG) qui affectent la couche de solvatation autour de la protéine à cristalliser ; et enfin les solvants organiques et les composés organiques non volatils (éthanol, 2,3-butanediol, 2,5-propanediol...) qui modulent la constante diélectrique du milieu.
- La **présence de contaminants** : macromolécules ou petites molécules étrangères qui n'ont pas été éliminées au cours de la purification. Les impuretés affectent le processus de cristallisation et sont la cause de nombreux échecs de cristallisation.

- De même les **hétérogénéités conformationnelles ou de séquence** (autolyse par exemple) sont un écueil récurrent. Dans le cas de protéases, certaines molécules partiellement lysées peuvent ainsi se lier au cristal, ce qui perturbe la régularité de sa croissance.
- La **séquence protéique** peut demander à être optimisée. Que ce soit pour augmenter/diminuer la solubilité ou minimiser la flexibilité de certaines zones, l'ingénierie moléculaire peut aider à la cristallisation. Pour certaines enzymes on peut également muter certains résidus du site actif pour limiter l'autolyse au cours du temps. La mutation de zones accessibles au solvant peut également permettre d'obtenir différents polymorphes.
- La **concentration** du complexe à cristalliser est un paramètre facilement modulable. Un point de départ classique est d'utiliser des solutions dont la concentration est de l'ordre de 2 à 30 mg.mL⁻¹.

Il faut noter que deux lots de la même protéine, pourtant apparemment produits et purifiés dans les mêmes conditions, peuvent avoir des comportements sensiblement différents. La recette d'une cristallisation réussie pour un lot donné peut donc nécessiter d'être ajustée lors d'un changement de lot. Ce phénomène est d'autant plus remarquable si les conditions de production et/ou de purification ont évoluées d'un lot à l'autre (changement d'organisme de production, changement de colonnes de purification...).

Propriétés physico-chimiques intrinsèques Température, pH, Force ionique, Pureté des composants, Pression, Vibrations	Paramètres biochimiques et biophysiques Liaison des ligands (affinité, mode de liaison), Agents précipitants et autres additifs, Flexibilité de la protéine, Age des échantillons,
Paramètres biologiques Contaminants, Origine biologique des échantillons.	Pureté des macromolécules Contaminants macromoléculaires (protéine tronquée, autres protéines...), Hétérogénéité de séquence, Hétérogénéité de conformation, Effets de lots.

Tableau V.3 : Paramètres pouvant affecter la croissance cristalline

Adapté de Bergfors T., 2009¹⁴⁴

A terme, la croissance cristalline s'interrompt lorsque la concentration résiduelle de protéine en solution atteint la limite de solubilité. Le cristal, qui reste un objet dynamique, perd alors autant de molécules qu'il n'en lie : on parle de point d'équilibre. La croissance peut être interrompue avant

d'avoir atteint ce point d'équilibre si des impuretés viennent s'accorder aux abords du cristal ou si l'énergie nécessaire pour lier de nouvelles molécules est trop élevée.

V. A. b. Méthodes de cristallisation

La cristallisation de macromolécules biologiques suit principalement trois techniques :

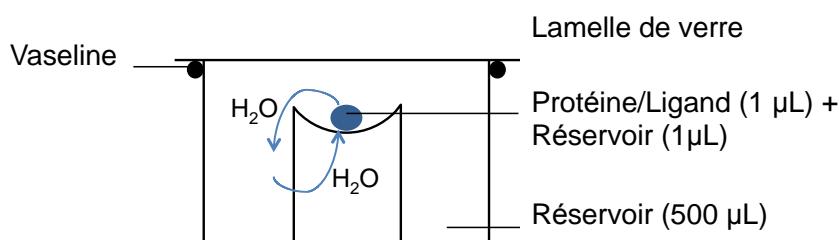
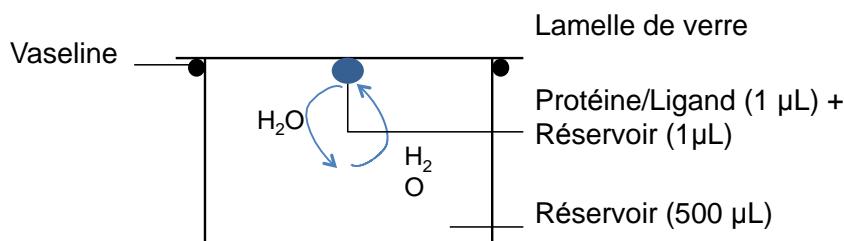
- La **diffusion de vapeur** : elle consiste en l'évaporation ou l'échange de solvant entre la goutte à cristalliser et un réservoir de solvant plus concentré.
- La **microdialyse** : la protéine à cristalliser et le précipitant sont séparées par une membrane de dialyse qui ne permet que le passage de petites molécules (eau, sels, ...),
- La technique dite de **microbatch** : une goutte contenant la molécule à cristalliser et les agents cristallisants est placée sous une fine couche d'huile.

Seule la diffusion de vapeur, technique majoritairement utilisée en cristallographie moderne, sera décrite ici.

Dans une enceinte fermée, on place sans les mettre en contact deux solutions (Figure V.12) :

- La solution dite « réservoir » contenant *a minima* le ou les agents précipitant et déshydratant ainsi qu'un tampon. Un volume de 500 µL est typiquement utilisé.
- La solution à cristalliser : on mélange 1 µL du complexe protéine/ligand d'intérêt à 1 µL de la solution réservoir. Ces proportions peuvent éventuellement être ajustées pour ralentir ou accélérer la croissance cristalline (classiquement des volumes de 0,6 à 5 µL sont utilisés).

Dans le cas de complexes protéine/ligand, on prépare, en amont du montage, une solution contenant les deux partenaires à la stoechiométrie voulue. C'est de ce mélange que sera prélevé le microlitre à déposer. Si l'étude ne concerne que la protéine seule, on déposera directement un microlitre de cette solution dans la cuve. Le mélange de la macromolécule à cristalliser et de la solution réservoir est déposé en goutte « assise » (Figure V.12 A.) ou « suspendue » (Figure V.12 B.). L'enceinte est close par un morceau de scotch ou par une lamelle de verre maintenue hermétiquement par un boudin de graisse. Toutes ces étapes peuvent être réalisées manuellement ou grâce à des robots. Le développement de la robotique est à l'origine de l'automatisation des processus de criblage, ce qui permet de tester en parallèle un très grand nombre de solutions, mais également de travailler avec des nanovolumes, certains robots n'ont besoin que de 13 µL de protéine pour tester 96 conditions distinctes (à concentration protéique constante).

A.**B.****Figure V.12 : Méthode de cristallisation par diffusion de vapeur****A. Technique de la goutte assise****B. Technique de la goutte suspendue**

Les agents précipitant permettent de diminuer la solubilité de la protéine dans la goutte. La protéine est ainsi amenée en condition de sursaturation où la cristallisation est possible. On peut également augmenter la concentration de la protéine et/ou des agents précipitants en déshydratant la goutte grâce à des agents spécifiques qui vont réduire la pression de vapeur d'eau dans l'enceinte. Les deux solutions présentes dans le puits, protéine/ligand/réservoir et réservoir seul, ont des pressions partielles différentes du fait de leurs compositions respectives. Les espèces volatiles (eau, alcool, acide acétique, ammoniac,...) vont ainsi diffuser jusqu'à atteindre un équilibre thermodynamique. Dans la plupart des cas, les rôles d'agent précipitant et déshydratant sont tenus par la même espèce chimique. L'effet précipitant intervient lors du mélange de la molécule à cristalliser et de la solution réservoir, c'est ensuite l'effet déshydratant qui prévaut pour amener le système au point d'équilibre thermodynamique.

Si la pression de vapeur d'eau au-dessus du réservoir est inférieure à celle au-dessus de la goutte, de l'eau est transférée de la goutte vers le réservoir jusqu'à ce que les deux pressions de vapeur soient égales. Dans ce cas, les composants de la goutte se concentrent. A l'inverse, si la pression de vapeur d'eau est plus élevée au-dessus du réservoir que de la goutte, le transfert d'eau se fera du réservoir vers la goutte, diluant ainsi tous ses constituants.

La sursaturation et la formation de cristaux dépendent ainsi de la cinétique de transfert des échanges de vapeurs. Il est possible de jouer sur ces vitesses en modulant les concentrations en sel et en agents précipitant/déshydratant.

Pour atteindre la sursaturation requise pour initier la nucléation, il est possible d'utiliser les transferts d'eau dans un sens ou dans l'autre. On peut ainsi partir d'une solution où la concentration protéique est inférieure à la limite de solubilité : il faut alors que l'eau soit transférée vers le réservoir pour augmenter graduellement la concentration de protéine (par ajout de sels dans le réservoir par exemple). Inversement, dans le cas où la concentration en protéine est initialement trop élevée et conduit à la formation de précipité, on pourra utiliser l'effet d'agents hygroscopiques comme le glycérol pour abaisser la concentration protéique et permettre la nucléation. Le glycérol va permettre le transfert d'eau depuis le réservoir vers la goutte et ainsi diluer l'échantillon à cristalliser.

Pour obtenir rapidement des cristaux, une deuxième technique peut être utilisée en parallèle : l'ensemencement en ligne ou « streak seeding ». Cette technique, développée par Enrico STURA¹⁴⁵, est applicable aussi bien aux gouttes assises que suspendues. Il s'agit d'ensemencer une goutte nouvellement produite par des microcristaux issus d'une goutte ayant déjà cristallisé. En parallèle, si les conditions le permettent, de nouveaux centres de nucléation sont susceptibles d'apparaître. Les protéines en solution peuvent alors contribuer à la croissance des cristaux ensemencés ou « auto-nucléés ».

Une moustache de chat ou une micropipette est utilisée pour prélever quelques cristaux dans une goutte et les transférer, en ligne, dans une autre en effleurant légèrement leurs surfaces respectives. Les cristaux vont alors se développer le long de cette ligne (Figure V.13) dans la goutte nouvellement ensemencée. Les cristaux dont la nucléation s'est réalisée spontanément dans la goutte poursuivent leur croissance à l'écart de cette ligne.

Il convient d'avoir « la main légère » car les microcristaux néo-ensemencés représentent autant de nouveaux centres nucléés où la croissance cristalline peut s'effectuer. Pour obtenir de gros cristaux, il est ainsi préférable de limiter le nombre de germes et de se placer dans des conditions où peu de nucléation spontanée est possible.

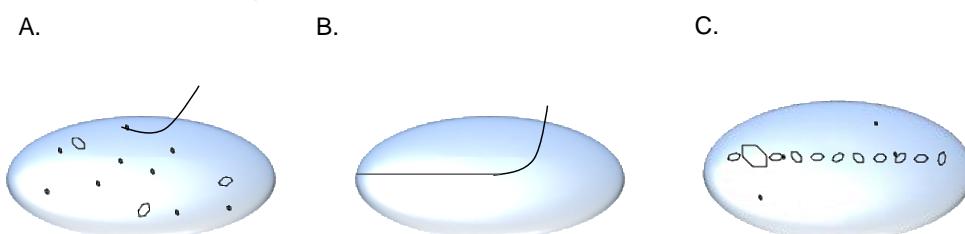


Figure V.13 : Ensemencement en ligne « streak seeding »

- A. Prélèvement de microcristaux
- B. Ensemencement en ligne des microcristaux prélevés en A.
- C. Croissance en ligne des cristaux transférés

L'ensemencement peut être réalisé à partir de micro-cristaux (on parle de micro-ensemencement) ou de cristaux visibles à l'œil nu (on parle de macro-ensemencement). Une technique plus chronophage que celle décrite précédemment consiste à prélever quelques cristaux d'intérêt, les broyer pour obtenir de microcristaux, et ensemencer les gouttes à partir de cette solution. Cette solution mère de micro-cristaux pourra être diluée pour limiter le nombre de centres de nucléation.

L'ensemencement en ligne tel qu'utilisé au laboratoire (transfert direct de germes depuis la goutte donneuse vers la goutte receveuse) est donc une technique particulièrement rapide. Elle permet en outre de distinguer les centres de nucléations spontanés de ceux induits par l'ensemencement. Les centres induits suivent la ligne définie lors du transfert de cristaux, tandis que les centres spontanés se répartissent dans toute la goutte.

V. A. c. Paramètres utilisés

Toutes nos structures ont été obtenues selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise. Nous avons utilisé des plaques 24 trous Cryschem Plate proposées par Hampton Research que nous avons scellées par un cordon de vaseline et une lamelle de verre.

La MMP-12h étant connue pour s'auto-lyser, l'ajout d'AHA 10 mM permet de limiter ce phénomène lors de son stockage à 4°C avant d'être mise en présence de l'inhibiteur d'intérêt. Ligand et protéine ont toujours été utilisés dans un rapport de stoechiométrie 1 :1.

Une fois le montage réalisé, les plaques ont été incubées dans une armoire thermorégulée à 20°C tout le temps de la cristallisation et en attendant la congélation des cristaux.

Les conditions ayant permis d'obtenir des structures de qualité pour les différents complexes cristallisés ont été ciblées manuellement et sont résumées dans le (Tableau V.4).

Protéine	Ligand	Conditions de cristallisation
MMP-12h F171D	Composé 2	Protéine : MMP-12 F171D 820 μ M, AHA 10 mM Ligand : stockage 5 mM, DMSO Précipitant : 20% PEG4K, 200 mM Tris pH 9,5 Streak-seeding : petits cristaux précédemment obtenus de MMP-12 F171D en complexe avec le composé 2
	Composé 3	Protéine : MMP-12 F171D 820 μ M, AHA 10 mM Ligand : stockage 2 mM, DMSO Précipitant : 20% PEG4K, 4% 1,4-Dioxane, 200 mM Tris pH 9,5 Streak-seeding : petits cristaux précédemment obtenus de MMP-12 F171D K241A en complexe avec le composé 3
MMP-12h F171D K241A	RXP470.1	Protéine : MMP-12 F171D K241A 850 μ M, AHA 10 mM Ligand : stockage 1,5 mM, DMSO Précipitant : 20% PEG4K, 200 mM Tris pH 9,5 Streak-seeding : petits cristaux précédemment obtenus de MMP-12 F171D K241A en complexe avec le RXP470.1
	Composé 2	Protéine : MMP-12 F171D K241A 1 mM, AHA 10 mM Ligand : stockage 5 mM, DMSO Précipitant : 20% PEG4K, 200 mM Tris pH 9,5 Streak-seeding : petits cristaux précédemment obtenus de MMP-12 F171D K241A en complexe avec le composé 2
	Composé 3	Protéine : MMP-12 F171D K241A 608 μ M, AHA 10 mM Ligand : stockage 2 mM, DMSO Précipitant : 26% PEG10K, 3% 1,4-Dioxane, 85 mM imidazole piperidine pH 8,5 Streak-seeding : Ø

Tableau V.4 : Résumé des conditions utilisées lors de la cristallogénèse

V. B. Congélation des cristaux

L'irradiation des cristaux lors de la collecte des données induit des phénomènes de radiolyse qui détériorent le cristal. Pour ralentir ce processus, le cristal est maintenu tout au long de la récolte à 100 K par un flux de diazote gazeux. Les cristaux, qui contiennent entre 30 et 75% d'eau, sont en outre très sensibles à la déshydratation. Ils peuvent ainsi être rapidement détruits au contact de l'air.

Afin de garantir au maximum l'intégrité des cristaux, ceux-ci sont congelés au laboratoire et conservés dans un bain d'azote liquide jusqu'à leur irradiation. Le refroidissement brutal des cristaux n'est toutefois pas un événement neutre et doit s'accompagner de différentes précautions. Le principal danger provient de la formation de cristaux de glace au moment de la congélation. Cette glace risque d'une part de fragiliser, voire de casser, le cristal mais peut également masquer le signal de diffraction lors de la collecte des données par l'apparition « d'anneaux de glace » sur les clichés de diffraction. Il

est donc nécessaire de protéger les cristaux à l'aide de solutions cryoprotectantes. Le trempage des cristaux dans ce type de solution permet de remplacer une partie des molécules d'eau par un ou plusieurs types de cryoprotectants qui empêchent la formation de glace cristalline au profit d'un état vitreux amorphe et plus transparent aux rayons X.

Ces solutions sont à ajuster au cas par cas et diffèrent selon la nature du complexe cristallisé. Plusieurs composés sont utilisés, seuls ou en combinaison, dont le glycérol, l'éthylène et le propylène glycol qui agissent comme des solubilisants, ou le méthylpentanediol (MPD), le DMSO ou le 1,4-dioxane dont l'effet est plutôt précipitant. A titre d'exemple, des concentrations élevées de glycérol permettent de bouleverser les réseaux de liaisons hydrogène entre molécules d'eau, 40% de glycérol suffisent ainsi à empêcher l'eau de cristalliser. Des kits développés en interne par Enrico STURA et Laura VERA ont permis, en amont de ce travail, de déterminer les compositions optimales de ces cryo-solutions¹⁴⁶ (Tableau V.5).

Protéine	Ligand	Conditions de cryo-protection
MMP-12h F171D	Composé 2	10% Diethylene glycol, 5 % Glycerol, 10% 1,2-Propanediol, 5% 1,4-Dioxane, 25% PEG 6K, 100mM TRIS pH 8,0
	Composé 3	10% Diethylene glycol, 10 % Glycerol, 10% 2,3-Butanediol, 25% PEG-6K, 100mM TRIS pH 7,0
MMP-12h F171D K241A	RXP470.1	5% Diethylene glycol, 5% Glycerol, 5% 2,3-Butanediol, 10% Ethylene Glycol, 5% MPD, 12,5 mM NDSB 201 25% PEG 6K, 100mM TRIS pH 8,0
	Composé 2	10% Diethylene glycol, 5 % Glycerol, 10% 2,3-Butanediol, 5% 1,4-Dioxane, 25% PEG 6K, 100mM TRIS pH 8,0
	Composé 3	10% Diethylene glycol, 5 % Glycerol, 10% 2,3-Butanediol, 5% 1,4-Dioxane, 25% PEG 6K, 100mM TRIS pH 8,0

Tableau V.5 : Composition des cryo-solutions utilisées

Les cristaux sont ainsi montés sur des boucles, plongés rapidement dans la solution cryoprotectante, puis refroidis rapidement à l'azote liquide. Ils resteront congelés tout au long du processus.

On peut également utiliser la technique de « flash annealing » pour s'affranchir d'éventuels cristaux de glace. L'expérimentateur coupe pendant quelques secondes le flux d'azote, ce qui permet à la glace de fondre tandis que le cristal reste intact. Cette méthode doit être réalisée rapidement pour éviter que l'eau ne recristallise et que le cristal ne s'abîme.

V. C. Récolte des données

Les cristaux ont été irradiés sur la ligne de lumière Proxima 2 au synchrotron Soleil à Gif-sur-Yvette.

V. C. a. Principe général de la diffraction

L'idée d'irradier des cristaux remonte au début du XX^{eme} siècle avec les travaux précurseurs de Max von Laue qui lui valurent le prix Nobel de physique en 1914. L'idée primaire était que le réseau cristallin ferait dévier le rayonnement auquel il est soumis. Ses travaux sur un cristal de sulfate de cuivre permirent de démontrer la structure régulière et périodique des cristaux et la nature ondulatoire des rayons X.

Cette nature ondulatoire est à la base des techniques modernes de diffraction (aux rayons X, aux neutrons,...) dont la cristallographie. Lorsque le cristal à étudier est bombardé par un faisceau de rayons X, chaque électron diffuse une onde de faible amplitude. Ces ondes qui se propagent dans toutes les directions, interfèrent entre elles, ce qui donne lieu à la diffraction. Chaque onde diffractée est donc la résultante de toutes les ondes diffusées par tous les électrons du cristal. Le détecteur capte les taches de diffraction issues de la superposition des ondes diffusées en phase ou en décalage de phase, on parle d'interférences constructives. Les ondes diffusées en opposition de phase s'annulent et sont invisibles au capteur.

Chaque tache de diffraction correspond à une réflexion qui définit une intensité, proportionnelle au carré de la norme du facteur de structure. Les facteurs de structures correspondent à des nombres complexes contenant l'information de phase. L'intensité des taches contient donc une donnée essentielle (l'intensité), mais sans la connaissance des phases, la répartition des électrons dans le cristal ne peut être déterminée. C'est seulement grâce à l'utilisation conjointe des informations d'intensité et de phase de chaque onde diffractée que l'on peut remonter, par le calcul, à la structure tridimensionnelle de la protéine étudiée.

V. C. b. Montage expérimental

Du point de vue du montage, l'échantillon monté sur une boucle est placé sur un goniomètre entre la source de rayonnement et le capteur CCD (Figure V.14). Le rayonnement synchrotron est focalisé et mono-chromatisé grâce à un monochromateur à cristal courbé ou des doubles miroirs focalisant. Le faisceau concentré ainsi obtenu irradie le cristal et le faisceau diffracté est récupéré sur un capteur CCD

(Charge Coupled Device) qui numérise le signal. Le montage et la récupération des échantillons sont assurés par le système robotisé CATS (Cryogenic Automated Transfer System).

L'automatisation permet d'optimiser le temps d'occupation de la ligne de lumière et de limiter les accès à la cabine expérimentale.

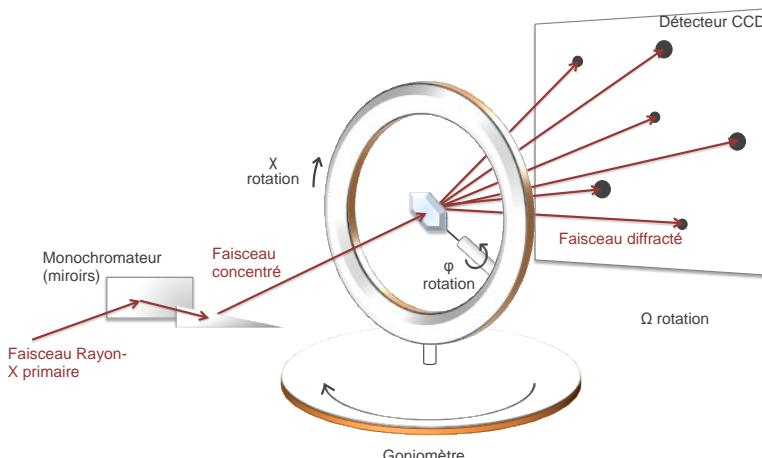


Figure V.14 : Diffraction aux rayons-X, principe de fonctionnement

Pour obtenir un jeu de données complet, deux méthodes ont été utilisées (Figure V.15) :

- La méthode de scan classique où le cristal subit une rotation d'un degré entre chaque cliché. En règle générale, environ 200 clichés sont réalisés
- L'*helical scan* où le cristal subit une rotation et une translation entre chaque cliché. Cette méthode est particulièrement adaptée aux longs cristaux et permet d'augmenter la durée de vie du cristal : le faisceau de rayons X ne bombarde jamais deux fois le même endroit du cristal ce qui limite les phénomènes de radiolyse au point d'impact. Le nombre de clichés dépend de la longueur du cristal (1 cliché. μm^{-1}).

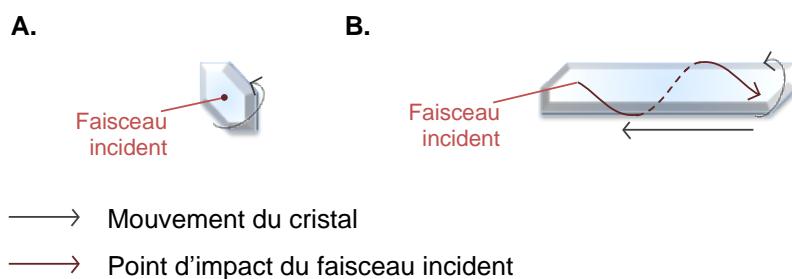


Figure V.15 : Comparaison scan classique vs Helical scan

A. Scan classique

B. Helical scan

Le faisceau incident est toujours immobile, c'est le cristal qui se déplace entre chaque cliché.

De manière générale, la technique d'helical scan permet une utilisation optimisée du cristal. C'est en effet le cristal entier qui est irradié, et non pas une petite partie, ce qui permet d'obtenir une multiplicité élevée pour des dommages réduits. En contrepartie, cette méthode nécessite de longs cristaux homogènes là où des cristaux de plus petite taille sont suffisants pour un scan classique. Le synchrotron Soleil a par ailleurs développé l'algorithme « gridscan » qui permet de balayer le cristal à vitesse constante le long d'une ligne stable.

Protéine	Ligand	Ligne de lumière	Type de scan
MMP-12h F171D	Composé 2	Proxima 2 - SOLEIL	Helical
	Composé 3	Proxima 2 - SOLEIL	Helical
MMP-12h F171D K241A	RXP470.1	Proxima 2 - SOLEIL	Classique
	Composé 2	Proxima 2 - SOLEIL	Classique
	Composé 3	ID14-eh2 - ESRF	Helical

Tableau V.6 : Lignes de lumières utilisées et techniques de récolte des données

La technique d'helical scan que nous avons brièvement décrit fait l'objet d'une publication plus détaillée en cours d'écriture, en collaboration avec William Shepard du synchrotron Soleil.

V. D. Résolution des structures

Le traitement des données brutes par XDS a été réalisé par Enrico STURA exclusivement.

V. D. a. Traitement des données brutes de diffraction

A partir des données de diffractions, il est possible de déterminer l'arrangement spatial des atomes d'une structure cristalline. Le modélisateur s'appuie pour cela sur l'intensité des tâches de diffraction (réflexion) et sur la relation inverse réseau réciproque – réseau réel. Le réseau réel représente le cristal étudié où chaque nœud représente un atome. Le réseau réciproque est lui issu des tâches de diffraction obtenues à l'étape précédente. Les deux sont donc intimement liés et il est possible à partir du réseau réciproque (obtenu expérimentalement) de remonter au réseau réel théorique.

Les données brutes sont analysées par le logiciel XDS pour définir les caractéristiques du cristal étudié : axes et centres de symétrie, groupe d'espace, et intensité absolue des réflexions. D'autres informations peuvent être obtenues dès ce stade et permettent de juger l'exploitabilité du jeu de données considéré :

- la **limite de résolution** : elle détermine la finesse des détails de la carte de densité électronique. La limite haute de résolution peut être imposée par la qualité de diffraction du

cristal ou la configuration de l'expérience (distance cristal-détecteur, taille du détecteur, longueur d'onde utilisée...),

- la **mosaïcité** : un cristal n'est jamais absolument parfait, il existe toujours des défauts ponctuels (dislocation, macles, défaut d'empilement, ...) qui font qu'un cristal peut être vu comme un empilement de petits cristaux ou grains. Les dislocations de ces grains caractérisent la mosaïcité du cristal. Plus la mosaïcité est élevée, plus les tâches de diffraction sont étalées.

- la **complétude** : c'est le rapport entre le nombre de réflexions mesurées expérimentalement et leur nombre théorique. La complétude des données (toutes résolutions confondues) doit être supérieure à 90%.

- la **multiplicité** ou redondance des données : nombre de fois où une même réflexion a été mesurée. Une multiplicité élevée permet de mieux estimer l'intensité moyenne d'une réflexion en diminuant l'erreur de mesure.

Protéine	Ligand	Groupe d'espace	Dimensions de la maille
MMP-12h F171D	Composé 2	P ₂ 12 ₁ 2	68,9 x 63,1 x 36,8
	Composé 3	P ₂ 12 ₁ 2	68,1 x 63,2 x 37,5
MMP-12h F171D K241A	RXP470.1	P ₂ 12 ₁ 2	69 x 63,3 x 35,9
	Composé 2	P ₂ 12 ₁ 2	68,6 x 63,1 x 36,5
	Composé 3	P ₂ 12 ₁ 2	69,2 x 63,7 x 36,6

Tableau V.7 : Paramètres de maille et groupe d'espace des structures obtenues

V. D. b. Construction et raffinement du modèle

Le problème des phases

Les détecteurs utilisés lors de la collecte des données de diffraction ne captent que l'intensité des réflexions, l'information relative à la phase des ondes de diffraction est donc perdue. La reconstruction directe de la structure de la protéine, qui nécessiterait normalement les données d'intensité et de phase, passe alors par des méthodes détournées. Elles peuvent être classées en deux catégories selon qu'elles utilisent le signal apporté par des atomes lourds ou si elles se basent sur une structure homologue déjà résolue (remplacement moléculaire).

Le laboratoire disposant déjà de nombreuses structures à haute résolution de la MMP-12h, nous avons exclusivement utilisé la méthode de remplacement moléculaire. Cette méthode permet d'obtenir un premier jeu de phases en positionnant la molécule modèle dans la maille du cristal étudié par une succession de rotations et de translations. Cette première approximation permet de construire une première carte de densité électronique dans laquelle l'expérimentateur cherche à positionner sa

molécule. L'amélioration des phases et donc de la carte de densité se poursuit ensuite à mesure que le modèle est affiné.

Construction du modèle dans la densité

La structure finale est avant tout un modèle dont les coordonnées reflètent l'interprétation par le cristallographe de la carte de densité électronique. L'interprétabilité de la carte dépend de la résolution des données : une haute résolution facilite le placement des atomes dans la densité électronique (Tableau V.8).

Résolution	Conséquence en terme d'interprétabilité
5 - 6 Å	Informations sur la forme de la molécule – très basse résolution
2,7 - 4 Å	Résolution moyenne
2,7 Å	Les molécules d'eau commencent à pouvoir être observées 2,7 Å = longueur d'une liaison hydrogène
1,5 - 2,4 Å	Haute résolution 1,5 Å = longueur d'une liaison C-C
1,0 - 1,2 Å	Résolution atomique
<1,0 Å	Les hydrogènes commencent à être observés

Tableau V.8 : Relation entre la résolution des données de diffraction et l'interprétabilité de la carte de densité électronique

Le logiciel COOT est un logiciel de visualisation 3D qui permet de faire correspondre le squelette de la protéine à la carte de densité électronique. COOT permet de visualiser rapidement les zones où le modèle diverge sensiblement de la carte de densité :

- En vert : apparaissent les zones où des atomes devraient être présents. En particulier, à haute résolution, les molécules d'eau apparaissent comme une sphère verte dans la carte de différence de Fourier. Cette fonctionnalité permet de visualiser les zones où les chaînes latérales sont mal positionnées.
- En rouge : les zones où le placement d'atomes doit être évité.

COOT prend également en compte les contraintes physiques (angles de torsions, contraintes de Ramachandran, plans, distances inter-atomiques, ...) et chimiques des molécules manipulées.

Affinement du modèle

Le raffinement du modèle est en réalité un processus cyclique où les phases d'optimisations automatiques (logiciels CCP4 et/ou Phenix) et de corrections manuelles se succèdent (COOT).

Les logiciels CCP4 et Phenix recalculent les phases et donc la carte de densité électronique à partir du modèle modifié manuellement via COOT. Ils fournissent un nouveau set de coordonnées et de densité électronique qu'il appartient à l'utilisateur de corriger si besoin.

Il faut en particulier s'attacher à vérifier le positionnement des molécules d'eau et la distance qui les sépare des autres molécules en jeu (protéine, ligand, solvant, ...). Les contraintes physiques qui pèsent sur les résidus doivent être également contrôlées.

Les résidus C- ou N-terminaux sont particulièrement sensibles aux phénomènes d'autolyse. Ils peuvent donc être absents de certaines protéines du cristal et donc présenter une densité électronique de mauvaise qualité. Il peut alors être utile de leur affecter un degré d'occupation inférieur à un.

Qualité du modèle

L'alternance des cycles de raffinement permet d'améliorer progressivement le modèle, qui se rapproche ainsi des données expérimentales.

Deux facteurs, R_{work} et R_{free} , permettent de suivre l'amélioration du modèle. Au début du processus de résolution de la structure, les données de diffraction sont réparties en deux groupes :

- Un groupe de test, contenant environ 5% des données totales sélectionnées aléatoirement. Ces données sont exclusivement dédiées à l'évaluation du modèle via le facteur de qualité R_{free} et donc exclues des processus de raffinement.
- Un groupe de travail qui contient toutes les autres données et est utilisé lors des cycles de raffinement. Le R_{work} est calculé à partir de ces données.

Au fur et à mesure des cycles de raffinement, les valeurs de R_{work} et R_{free} doivent converger vers une valeur minimale. L'écart entre ces deux facteurs doit également se minimiser même si de manière générale le facteur R_{work} a toujours une valeur plus faible que celle de R_{free} . Il n'existe pas de valeur générale que l'expérimentateur cherche à atteindre, toutefois au plus la résolution est élevée, au plus on attend des valeurs de R_{work} et R_{free} basses. A titre d'exemple, pour des résolutions de l'ordre de 1,2 Å, on s'attend à des valeurs au moins inférieures à 0,2.

Avant de publier un article, les données doivent être soumises à la PDB qui vérifie un certain nombre d'autres critères attestant de la qualité du modèle proposé :

- La **qualité stéréochimique** du modèle est estimée par la mesure des déviations moyennes des longueurs et des angles de liaison entre atomes. Les déviations ne doivent pas excéder celles mesurée expérimentalement pour les petites molécules (autour de 0,02 Å pour les longueurs, et 2° pour les angles).
- Le **diagramme de Ramachandran** traduit la bonne conformation des liaisons peptidiques du modèle. Pour chaque résidu, les angles Φ et Ψ de la liaison peptidique sont rapportées sur un

graphique. Ce diagramme éponyme, présente les régions énergétiquement favorables, permises, et non autorisées.

- Les **clashes stériques** entre molécules doivent bien sûr être évités à tout prix. Les rayons de van der Waals de chaque atome ne doivent pas se recouper.

Bibliographie

1. Mitchell, T. & Cherry, M. Fragment-based drug design. *Innov. Pharm. Technol.* 34–36 (2005).
2. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 959–968 (2009).
3. Georgiadis, D. & Dive, V. in 1–38 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/128_2014_571>
4. Gross, J. & Lapierre, C. M. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1014–1022 (1962).
5. Bode, W., Gomis-Rüth, F. X. & Stöckler, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134–140 (1993).
6. Stöcker, W. *et al.* The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **4**, 823–840 (1995).
7. Gomis-Ruth, F. X. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **284**, 15353–15357 (2009).
8. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1–6 (1994).
9. Nagase, H., Barrett, A. J. & Woessner, J. F. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Stuttg. Ger. Suppl.* **1**, 421–424 (1992).
10. Lovejoy, B. *et al.* Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* **263**, 375–377 (1994).
11. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C. & Rosato, A. Bioinformatic comparison of structures and homology-models of matrix metalloproteinases. *J. Proteome Res.* **3**, 21–31 (2004).
12. Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174 (2002).
13. Bode, W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 639–652 (1999).
14. Babine, R. E. & Bender, S. L. Molecular Recognition of Proteinminus signLigand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* **97**, 1359–1472 (1997).
15. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162 (1967).
16. Lia, N.-G., Shib, Z.-H., Tang, Y.-P. & Duan, J.-A. Selective matrix metalloproteinase inhibitors for cancer. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3805–3827 (2009).
17. Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P. & Gearing, A. J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* **99**, 2735–2776 (1999).

18. Gooley, P. R. *et al.* The NMR structure of the inhibited catalytic domain of human stromelysin-1. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 111–118 (1994).
19. Johnson, A. R. *et al.* Discovery and characterization of a novel inhibitor of matrix metalloprotease-13 that reduces cartilage damage in vivo without joint fibroplasia side effects. *J. Biol. Chem.* **282**, 27781–27791 (2007).
20. Gall, A. L. *et al.* Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state. *J. Mol. Biol.* **307**, 577–586 (2001).
21. Pikul, S. *et al.* Heterocycle-based MMP inhibitors with P2' substituents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1009–1013 (2001).
22. Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221–233 (2007).
23. Bown, D. P. & Gatehouse, J. A. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues. *Eur. J. Biochem. FEBS* **271**, 2000–2011 (2004).
24. Butler, G. S. & Overall, C. M. Proteomic validation of protease drug targets: pharmacoproteomics of matrix metalloproteinase inhibitor drugs using isotope-coded affinity tag labelling and tandem mass spectrometry. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 263–270 (2007).
25. Harrison, R. K., Chang, B., Niedzwiecki, L. & Stein, R. L. Mechanistic studies on the human matrix metalloproteinase stromelysin. *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 10757–10762 (1992).
26. Brinckerhoff, C. E. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 207–214 (2002).
27. Yong, V. W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 931–944 (2005).
28. Parks, W. C., Wilson, C. L. & López-Boado, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 617–629 (2004).
29. Basset, P. *et al.* A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* **348**, 699–704 (1990).
30. Balbín, M. *et al.* Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat. Genet.* **35**, 252–257 (2003).
31. Vandenbroucke, R. E. & Libert, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 904–927 (2014).
32. Lagente, V. & Boichot, E. Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory process of respiratory diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 440–444 (2010).
33. Churg, A., Zhou, S. & Wright, J. L. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur. Respir. J.* **39**, 197–209 (2012).

34. Newby, A. C. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul. Pharmacol.* **56**, 232–244 (2012).
35. Huntley, G. W. Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 743–757 (2012).
36. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
37. Werb, Z. & Gordon, S. Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J. Exp. Med.* **142**, 361–377 (1975).
38. Banda, M. J. & Werb, Z. Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem. J.* **193**, 589–605 (1981).
39. Shapiro, S. D. *et al.* Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4664–4671 (1992).
40. Gronski, T. J. *et al.* Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **272**, 12189–12194 (1997).
41. Nuti, E. *et al.* Design, synthesis, biological evaluation, and NMR studies of a new series of arylsulfones as selective and potent matrix metalloproteinase-12 inhibitors. *J. Med. Chem.* **52**, 6347–6361 (2009).
42. Lagente, V., Le Quement, C. & Boichot, E. Macrophage metalloelastase (MMP-12) as a target for inflammatory respiratory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 287–295 (2009).
43. Li, W. *et al.* A selective matrix metalloprotease 12 inhibitor for potential treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): discovery of (S)-2-(8-(methoxycarbonylamino)dibenzo[b,d]furan-3-sulfonamido)-3-methylbutanoic acid (MMP408). *J. Med. Chem.* **52**, 1799–1802 (2009).
44. Marchant, D. J. *et al.* A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat. Med.* **20**, 493–502 (2014).
45. Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P. & Rayner, M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur. Heart J.* **35**, 2950–2959 (2014).
46. Libby, P. & Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat. Med.* **8**, 1257–1262 (2002).
47. Allam, A. H. *et al.* Atherosclerosis in Ancient Egyptian Mummies: The Horus Study. *JACC Cardiovasc. Imaging* **4**, 315–327 (2011).
48. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868–874 (2002).
49. Johnson, J. L., George, S. J., Newby, A. C. & Jackson, C. L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15575–15580 (2005).

50. Luttun, A. *et al.* Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* **109**, 1408–1414 (2004).
51. Liang, J. *et al.* Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* **113**, 1993–2001 (2006).
52. Thomas, A. C. *et al.* Genomics of foam cells and nonfoamy macrophages from rabbits identifies arginase-I as a differential regulator of nitric oxide production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 571–577 (2007).
53. Morgan, A. R. *et al.* Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. *Stroke J. Cereb. Circ.* **35**, 1310–1315 (2004).
54. Halpert, I. *et al.* Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9748–9753 (1996).
55. Scholtes, V. P. W. *et al.* Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J. Am. Heart Assoc.* **1**, e001040 (2012).
56. Shipley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J. & Shapiro, S. D. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3942–3946 (1996).
57. Houghton, A. M., Hartzell, W. O., Robbins, C. S., Gomis-Rüth, F. X. & Shapiro, S. D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* **460**, 637–641 (2009).
58. Dandachi, N. G. & Shapiro, S. D. A protean protease: MMP-12 fights viruses as a protease and a transcription factor. *Nat. Med.* **20**, 470–472 (2014).
59. Strongin, A. Y. Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 133–141 (2010).
60. Gonzalo, P. *et al.* MT1-MMP is required for myeloid cell fusion via regulation of Rac1 signaling. *Dev. Cell* **18**, 77–89 (2010).
61. Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5578–5582 (1990).
62. Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. & Van Wart, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a ‘cysteine switch’ mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 364–368 (1990).

63. Murphy, G. *et al.* Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **107**, 38–44 (1999).
64. Pei, D. & Weiss, S. J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**, 244–247 (1995).
65. Piccard, H., Van den Steen, P. E. & Opdenakker, G. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 870–892 (2007).
66. Knäuper, V., Docherty, A. J., Smith, B., Tschesche, H. & Murphy, G. Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett.* **405**, 60–64 (1997).
67. Oh, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* **107**, 789–800 (2001).
68. Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C. & Heinecke, J. W. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J. Biol. Chem.* **278**, 28403–28409 (2003).
69. Jiang, A. *et al.* Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13693–13698 (2001).
70. Visse, R. & Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
71. Brew, K., Dinakarpandian, D. & Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 267–283 (2000).
72. Marrero, A. *et al.* The crystal structure of human α 2-macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **51**, 3340–3344 (2012).
73. Rao, B. G. Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 295–322 (2005).
74. Shi, Z., Li, J., Shi, L. & Li, X. An Updated Patent Therapeutic Agents Targeting MMPs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **7**, 74–101 (2012).
75. Vihinen, P., Ala-aho, R. & Kähäri, V.-M. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **5**, 203–220 (2005).
76. Bertini, I. *et al.* Conformational variability of matrix metalloproteinases: Beyond a single 3D structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5334–5339 (2005).
77. Moy, F. J. *et al.* Impact of mobility on structure-based drug design for the MMPs. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12658–12659 (2002).
78. Shieh, H.-S. *et al.* Structure analysis reveals the flexibility of the ADAMTS-5 active site. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **20**, 735–744 (2011).

79. Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M. & Cravatt, B. F. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10000–10005 (2004).
80. Devel, L. *et al.* Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S'(1) cavity. *Biochimie* **92**, 1501–1508 (2010).
81. Bertini, I. *et al.* Exploring the Subtleties of Drug–Receptor Interactions: The Case of Matrix Metalloproteinases. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2466–2475 (2007).
82. Parker, M. H. *et al.* Analysis of the Binding of Hydroxamic Acid and Carboxylic Acid Inhibitors to the Stromelysin-1 (Matrix Metalloproteinase-3) Catalytic Domain by Isothermal Titration Calorimetry. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 13592–13601 (1999).
83. Hu, J., Van den Steen, P. E., Sang, Q.-X. A. & Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 480–498 (2007).
84. Czarny, B. *et al.* Molecular determinants of a selective matrix metalloprotease-12 inhibitor: insights from crystallography and thermodynamic studies. *J. Med. Chem.* **56**, 1149–1159 (2013).
85. Castelhano, A. L. *et al.* Novel indolactam-based inhibitors of matrix metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1415–1420 (1995).
86. Voet, D. & Voet, J. *Biochemistry*. (Wiley).
87. Singh, S. *et al.* A Quantitative Measure of Conformational Changes in Apo, Holo and Ligand-Bound Forms of Enzymes. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* (2015). doi:10.1007/s12539-015-0284-7
88. Green, D. F. & Tidor, B. Design of improved protein inhibitors of HIV-1 cell entry: Optimization of electrostatic interactions at the binding interface. *Proteins* **60**, 644–657 (2005).
89. Petukh, M., Stefl, S. & Alexov, E. The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 4182–4190 (2013).
90. Mather, J. P. & Roberts, P. E. *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique*. (Springer Science & Business Media, 2007).
91. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **91**, 14S–22S (1991).
92. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 34211–34222 (2009).
93. Lee, E. S., Gao, Z. & Bae, Y. H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **132**, 164–170 (2008).
94. Wu, X. L. *et al.* Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy. *Bioconjug. Chem.* **21**, 208–213 (2010).
95. Onufriev, A. V. & Alexov, E. Protonation and pK changes in protein-ligand binding. *Q. Rev. Biophys.* **46**, 181–209 (2013).
96. Aguilar, B., Anandakrishnan, R., Ruscio, J. Z. & Onufriev, A. V. Statistics and Physical Origins of

- pK and Ionization State Changes upon Protein-Ligand Binding. *Biophys. J.* **98**, 872–880 (2010).
97. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 98–104 (1958).
98. Michalczyk, R. *et al.* Joint neutron crystallographic and NMR solution studies of Tyr residue ionization and hydrogen bonding: Implications for enzyme-mediated proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5673–5678 (2015).
99. Yokoyama, T. *et al.* Protonation State and Hydration of Bisphosphonate Bound to Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *J. Med. Chem.* **58**, 7549–7556 (2015).
100. Grimsley, G. R., Scholtz, J. M. & Pace, C. N. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci.* **18**, 247–251 (2009).
101. Markley, J. L. Observation of histidine residues in proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **8**, 70–80 (1975).
102. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. (Wiley, 1986).
103. Bartik, K., Redfield, C. & Dobson, C. M. Measurement of the individual pKa values of acidic residues of hen and turkey lysozymes by two-dimensional ¹H NMR. *Biophys. J.* **66**, 1180–1184 (1994).
104. Baker, B. M. & Murphy, K. P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* **71**, 2049–2055 (1996).
105. Czodrowski, P., Sotriffer, C. A. & Klebe, G. Protonation Changes upon Ligand Binding to Trypsin and Thrombin: Structural Interpretation Based on pKa Calculations and ITC Experiments. *J. Mol. Biol.* **367**, 1347–1356 (2007).
106. Bruylants, G., Wintjens, R., Looze, Y., Redfield, C. & Bartik, K. Protonation linked equilibria and apparent affinity constants: the thermodynamic profile of the α -chymotrypsin–proflavin interaction. *Eur. Biophys. J.* **37**, 11–18 (2007).
107. Murphy, K. P., Xie, D., Garcia, K. C., Amzel, L. M. & Freire, E. Structural energetics of peptide recognition: Angiotensin II/antibody binding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **15**, 113–120 (1993).
108. Baker, B. M. & Murphy, K. P. Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *J. Mol. Biol.* **268**, 557–569 (1997).
109. Hyland, L. J., Tomaszek, T. A. & Meek, T. D. Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **30**, 8454–8463 (1991).
110. Ido, E., Han, H. P., Kezdy, F. J. & Tang, J. Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S. *J. Biol. Chem.* **266**, 24359–24366 (1991).
111. Trylska, J. *et al.* Thermodynamic linkage between the binding of protons and inhibitors to HIV-1 protease. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **8**, 180–195 (1999).
112. Wang, Y. X. *et al.* Solution NMR evidence that the HIV-1 protease catalytic aspartyl groups have

- different ionization states in the complex formed with the asymmetric drug KNI-272. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 9945–9950 (1996).
113. Velazquez-Campoy, A. *et al.* Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor. *Protein Sci.* **9**, 1801–1809 (2000).
114. Torbeev, V. Y. & Kent, S. B. H. Ionization state of the catalytic dyad Asp25/25' in the HIV-1 protease: NMR studies of site-specifically ¹³C labelled HIV-1 protease prepared by total chemical synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5887–5891 (2012).
115. Xie, D. *et al.* Dissection of the pH Dependence of Inhibitor Binding Energetics for an Aspartic Protease: Direct Measurement of the Protonation States of the Catalytic Aspartic Acid Residues^{†,‡}. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 16166–16172 (1997).
116. McGee, T. D., Edwards, J. & Roitberg, A. E. pH-REMD simulations indicate that the catalytic aspartates of HIV-1 protease exist primarily in a monoprotonated state. *J. Phys. Chem. B* **118**, 12577–12585 (2014).
117. Takeharu, H., Yasukawa, K. & Inouye, K. Thermodynamic analysis of ionizable groups involved in the catalytic mechanism of human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 1940–1946 (2011).
118. Baum, B. *et al.* Think Twice: Understanding the High Potency of Bis(phenyl)methane Inhibitors of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **391**, 552–564 (2009).
119. Bombarda, E. & Ullmann, G. M. pH-Dependent pKa Values in Proteins—A Theoretical Analysis of Protonation Energies with Practical Consequences for Enzymatic Reactions. *J. Phys. Chem. B* **114**, 1994–2003 (2010).
120. Alexov, E. *et al.* Progress in the prediction of pKa values in proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 3260–3275 (2011).
121. Zhong, H. *et al.* The Impact of Ionization States of Matrix Metalloproteinase Inhibitors on Docking-Based Inhibitor Design. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 455–460 (2011).
122. Hanson, J. E., Kaplan, A. P. & Bartlett, P. A. Phosphonate analogues of carboxypeptidase A substrates are potent transition-state analogue inhibitors. *Biochemistry (Mosc.)* **28**, 6294–6305 (1989).
123. Mookhtiar, K. A., Marlowe, C. K., Bartlett, P. A. & Van Wart, H. E. Phosphonamidate inhibitors of human neutrophil collagenase. *Biochemistry (Mosc.)* **26**, 1962–1965 (1987).
124. Dive, V., Yiotakis, A., Nicolaou, A. & Toma, F. Inhibition of *Clostridium histolyticum* collagenases by phosphonamide peptide inhibitors. *Eur. J. Biochem. FEBS* **191**, 685–693 (1990).
125. Yiotakis, A., Lecoq, A., Nicolaou, A., Labadie, J. & Dive, V. Phosphinic peptide analogues as potent inhibitors of *Corynebacterium rathayii* bacterial collagenase. *Biochem. J.* **303 (Pt 1)**, 323–327 (1994).
126. Dive, V. *et al.* Phosphinic peptides as zinc metalloproteinase inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*

61, 2010–2019 (2004).

127. Dive, V. *et al.* RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4330–4335 (1999).
128. Georgiadis, D. *et al.* Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ. Res.* **93**, 148–154 (2003).
129. Devel, L. *et al.* Development of selective inhibitors and substrate of matrix metalloproteinase-12. *J. Biol. Chem.* **281**, 11152–11160 (2006).
130. Johnson, J. L. *et al.* A Selective Matrix Metalloproteinase-12 Inhibitor Retards Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 528–U127 (2011).
131. Isom, D. G., Castañeda, C. A., Cannon, B. R., Velu, P. D. & E, B. G.-M. Charges in the hydrophobic interior of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16096–16100 (2010).
132. Agrawal, A., Romero-Perez, D., Jacobsen, J. A., Villarreal, F. J. & Cohen, S. M. Zinc-Binding Groups Modulate Selective Inhibition of MMPs. *ChemMedChem* **3**, 812–820 (2008).
133. Dabert-Gay, A.-S. *et al.* Molecular determinants of matrix metalloproteinase-12 covalent modification by a photoaffinity probe: insights into activity-based probe development and conformational variability of matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **283**, 31058–31067 (2008).
134. Isom, D. G., Castañeda, C. A., Cannon, B. R. & E, B. G.-M. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5260–5265 (2011).
135. Banci, L. *et al.* Expression and high yield production of the catalytic domain of matrix metalloproteinase 12 and of an active mutant with increased solubility. *J. Mol. Catal. Chem.* **204–205**, 401–408 (2003).
136. Waelbroeck, M. The pH dependence of insulin binding. A quantitative study. *J. Biol. Chem.* **257**, 8284–8291 (1982).
137. Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry: Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*. (W. H. Freeman, 1980).
138. Wang, L., Li, L. & Alexov, E. pKa predictions for proteins, RNAs, and DNAs with the Gaussian dielectric function using DelPhi pKa. *Proteins* (2015). doi:10.1002/prot.24935
139. Kamiya, M., Saito, S. & Ohmine, I. Proton Transfer and Associated Molecular Rearrangements in the Photocycle of Photoactive Yellow Protein: Role of Water Molecular Migration on the Proton Transfer Reaction. *J. Phys. Chem. B* **111**, 2948–2956 (2007).
140. McLain, S. E., Soper, A. K. & Watts, A. Structural Studies on the Hydration of L-Glutamic Acid in Solution. *J. Phys. Chem. B* **110**, 21251–21258 (2006).

141. Baum, B. *et al.* Non-additivity of functional group contributions in protein-ligand binding: a comprehensive study by crystallography and isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Biol.* **397**, 1042–1054 (2010).
142. Lang, R. *et al.* Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure1. *J. Mol. Biol.* **312**, 731–742 (2001).
143. Giegé, R., Sauter, C., Zhu, D. W., Lorber, B. & Ng, J. D. in *Images de la Recherche en Biologie Structurale* 145–151 (2000).
144. Bergfors, T. *Protein Crystallization: Second Edition*. (2009).
145. Stura, E. A. & Wilson, I. A. Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **110**, 270–282 (1991).
146. Stura, E. A. & Vera, L. Strategies for Protein Cryocrystallography. *Cryst. Growth Des.* **14**, 427–435 (2013).
147. Goldberg, R. N., Kishore, N. & Lennen, R. M. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **31**, 231–370 (2002).

Annexes

I. Tampons utilisés : données thermodynamiques et zones tampons

Tampon	Zone tampon	pKa			Enthalpie d'ionisation (kcal.mol ⁻¹)	Enthalpie d'ionisation (kJ.mol ⁻¹)
		20°C	25°C	37°C		
ACES	6,1–7,5	6,88	6,78	6,54	7,270	30,43
AMPSO	8,3–9,7	ND	9,00	9,10	10,318	43,19
BES	6,4–7,8	7,17	7,09	6,90	5,793	24,25
CAPS	9,7–11,1	10,56	10,4	10,02	11,491	48,1
CAPSO	8,9–10,3	ND	9,60	9,43	11,149	46,67
CHES	8,6–10,0	9,55	9,49	9,36	9,448	39,55
HEPES	6,8–8,2	7,55	7,48	7,31	4,874	20,4
MES	5,5–6,7	6,16	6,10	5,97	3,536	14,8
MOPS	6,5–7,9	7,28	7,20	7,02	5,041	21,1
PIPES	6,1–7,5	6,80	6,76	6,66	2,676	11,2
TRIS	7,0–9,0	8,20	8,06	7,72	11,336	47,45

Tableau VI.I : Caractéristiques des tampons utilisés

From Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers - Goldberg, et al¹⁴⁷

II. Résumé des conditions de cristallisation et de récolte des données

PDB Code	5D2B	5CZM	5CXA	5D3C
MMP mutant	MMP-12h F171D	MMP-12h F171D K241A	MMP-12h F171D K241A	MMP-12h F171D K241A
Inhibitor	Compound 2 RXP470-NHOH	RXP470	Compound 3 RXP470-COOH	Compound 2 RXP470-NHOH
Data collection	Helical scan	Standard collection	Standard collection	Helical scan
Crystallisation conditions	MMP-12 F171D at 0,82 mM with AHA 10 mM and cocrystallized with RXP470-NHOH against a reservoir solution of 20% PEG4K, 200 mM Tris pH 9,5	MMP-12 F171D K241A at 0,85 mM with AHA 10 mM and cocrystallized with RXP470.1 against a reservoir solution of 20% PEG4K, 200 mM Tris pH 9,5	MMP-12h F67D K241A 0,85 mM with AHA 10mM and cocrystallized with RXP470-COOH against a reservoir solution of 20% PEG4K, 0,2 M TRIS pH9,5	MMP-12h F67D K241A 1 mM with AHA 10mM and cocrystallized with RXP470-NHOH against a reservoir solution of 0% PEG4000, 0,2 M TRIS pH 9,5
Cryoprotectant	10 % diethylene glycol + 5 % glycerol + 10 % 1,2-propanediol + 5 % 1,4-dioxane + 25% PEG6000 + 0,1 M TRIS HCl pH 8,0	5% diethylene glycol, 5% Glycerol, 5% 2,3-Butanediol, 10% Ethylene Glycol, 5% MPD, 12,5 mM NDSB 201, 25% PEG 6K, 100mM TRIS HCl, pH 8,0	10% diethylene glycol, 5% glycerol, 10% 2,3-butanediol, 5% 1,4-dioxane, 25% PEG 6K, 100mM TRIS HCl, pH 8,0	10 % diethylene glycol + 5 % glycerol + 10 % 2,3-butanediol + 5 % 1,4-dioxane +25% PEG6000,+ 100 mili-M TRIS HCl, pH 8
Synchrotron	SOLEIL PROXIMA-2A	SOLEIL PROXIMA-2A	ESRF Beamline ID23-1	SOLEIL PROXIMA-2A
Space Group Cell parameters (Å)	P2 ₁ 2 ₁ 2 68,9 63,1 36,8	P2 ₁ 2 ₁ 2 69 63,3 35,9	P2 ₁ 2 ₁ 2 69,2 63,7 36,6	P2 ₁ 2 ₁ 2 68,6 63,1 36,5
Resolution (Å)	1,2	1,3	1,3	1,31
Unique reflections	96966	60472	40627	72969
R _{sym} (%) ^a	8,9	7,0	16,5	12,1
<I>/σ(I)>	8,78	10,90	9,23	9,47
Completeness	99,6	97,0	99,9	97,6
R _{work} (%) ^b R _{free} (%) ^c	15,4 17,5	14,5 17,4	14,8 18,6	15,3 19,5
RMSD				
Bond length (Å)	0,005	0,006	0,024	0,006
Bond angle (°)	1,067	1,057	1,948	1,068
Ramachandran				
Favoured (%)	98	98	96	97
Allowed (%)	2	2	4	3
Outliers (%)	0	0	0	0

Tableau VI.II : Conditions de cristallisation et de récolte des données

^a R_{sym} = $\sum_i [1/(N_i - 1)] 1/2 \sum_j |I_{j-} - |I_j| / \sum_i (\sum_j |I_j|);$

^b R_{work} = $\sum_{hkl} ||F_{obs} - k|F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|;$

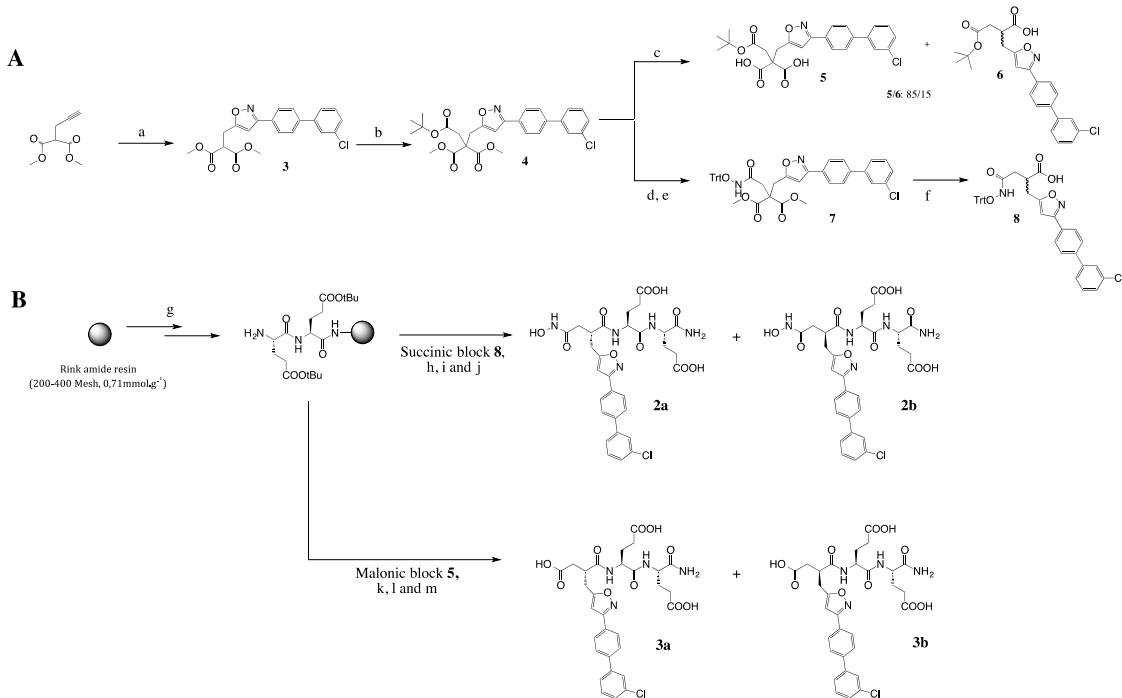
^c R_{free} was calculated using 5% of data excluded from refinement.

III. Synthèse des composés 2 et 3

General information

All Commercially available reagents and solvents were used as received without further purification. Dimethyl propargylmalonate (Ref: 81840), tert-Butyl bromoacetate (Ref: 124230), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU, Ref: 12806), O-tritylhydroxylamine (Ref: 358894), N,N-Diisopropylethylamine (DIEA, Ref: D125806), Diisopropylcarbodiimide (DIC, Ref: D125407) and Trifluoroacetic acid (TFA, Ref: T6508) were from Aldrich. Rink amide resin® (200-400 Mesh, 0,71mmol.g⁻¹) and Fmoc-Glu(OtBu)-OH were purchased from Merck. COMU (Ref: RL-1175) was purchased from IRIS. 6-Chloro-1-Hydroxybenzotriazole (CIHOBt, Ref: 23283170) was from Molekula. Pseudo peptides synthesis was performed manually in polypropylene syringe (Ref: 57026, Supelco) equipped with a polyethylene frit and a stopper. Microwave experiments were performed on a Discover apparatus (CEM [®]Wave) using open vessel mode with SPS kit. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (Merck TLC aluminium sheets coated with silica gel 60F₂₅₄). Compounds were purified by Flash chromatography (Silica gel Si 60, 40-43mm). ¹H NMR spectra were recorded on 250 MHz Bruker instrument. Chemical shifts are reported in ppm relative to the residual solvent peak (CDCl₃: 7.26 ppm, Acetone d₆=2,05 ppm, DMSO d₆=2,50). Data are reported as followed: chemical shift, multiplicity (s= singlet, d= doublet, t= triplet, q= quartet, br= broad, m= multiplet), coupling constants (Hz) and integration. ¹³C NMR spectra were recorded on 62MHz NMR instruments with complete proton decoupling. Chemical shifts are reported in ppm relative to the residual solvent peak (CDCl₃: 77.16 ppm, Acetone d₆=29,84 ppm, DMSO d₆=39.52). DO measurements were performed on a Shimadzu UV spectrophotometer (UV-1800). HRMS (High resolution mass spectrometry) data were registered using a 4800 MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA) in positive mode of ionisation with a m/z range between 100 and 800. Each spectrum was the result of 1000 to 2000 shots (20 different positions into each spot and 50 shots per sub-spectrum) and internal calibration was applied by using 4-HCCA matrix m/z. Analytical RP-HPLC separations were performed on a Shimadzu apparatus using analytical Supelco Ascentis® Express C18 column (100 x 4.6 mm, 2.7 μ m, flow rate=1.2 mL.min⁻¹) or Grace Vision HT C18 column (150 x 4,6 mm, 3 μ m, flow rate=1,2 mL.min⁻¹). Preparative RP-HPLC separations were performed on Supelco Ascentis® C18 column (150 x10 mm, 5 μ m, flow rate= 3 mL.min⁻¹) or semi preparative column Grace® Vision HT C18 HL 5 μ m (250 x10 mm, 5 μ m, flow rate= 4 mL.min⁻¹). UV detection was performed at 230 nm and 280 nm. A solvent system consisting of (A) 0,1% TFA in water and (B) 0,09% TFA in acetonitrile was used. Retention times (R_t) are reported in minutes. Amino acids compositions were made under standard conditions: samples were dried under vacuum, sealed in glass tubes using the PicoTag system (Waters Associates, Milford, MA) and hydrolysed under 6N HCl vapour phase in presence of a phenol crystal for 17h at 110°C. The hydrolysed sample was then diluted in MilliQ water and the quantification was performed on an aminoTac JLC-500/V amino acids analyser (JEOL, Japan) after amino functions derivatization by ninhydrin. A calibration with an amino acids standard solution was performed at the beginning of each analysis series.

(a) 3'-chloro-N-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carbimidoyl chloride (1.6 eq), DIEA (10 eq), DCM, reflux, 4 days. **(b)** NaH (1.2 eq), dry THF, 0°C, 5 min followed by tert-Butyl bromoacetate (1.2 eq), dry THF, r.t., 12 h. **(c)** KOH (200 eq), EtOH_{Abs}, r.t., 48 h. **(d)** DCM/TFA: 3/1, r.t., 12 h. **(e)** O-tritylhydroxylamine (1.3 eq), TBTU (1.7 eq), DIEA (1.7 eq), DCM, r.t., 12 h. **(f)** KOH (200 eq), EtOH_{Abs}, r.t., 24 h. Followed by DMSO, microwave irradiation, 80°C, 1h. **(g)** SPS Fmoc strategy. Fmoc-Glu(OtBu)-COOH (5 eq), COMU (5 eq) DIEA (5 eq), DMF, microwave irradiation 60°C, 10 min. **(h)** block 8 (1 eq), HATU (1.5 eq), DIEA (3 eq), DMF, microwave irradiation, 60°C, 1 h. **(i)** TFA/H₂O: 95/5, r.t., 45 min followed by TFA/DCM:1/1, r.t., 2x30 min and TFA/H₂O: 95/5, r.t., 30 min. **(j)** RP-HPLC purification. **(k)** Block 5 (1,1 eq), DIC (3 eq), CIHOBt (3 eq), DMF, microwave irradiation, 60°C, 1 h. **(l)** TFA/H₂O: 95/5, r.t., 45 min followed by TFA/DCM:1/1, r.t., 2x30 min. **(m)** RP-HPLC purification.



RXP470CONHOH (2a) and RXP470COOH (3a) were synthesized on solid support from succinic block **8** and malonic building block **5** respectively. These building blocks were first obtained in solution from commercially available dimethyl propargylmalonate in **3** and **5** steps respectively (Scheme XA). Briefly, this malonate derivative was engaged in a 1,3 dipolar cyclo addition with an imidoyl chloride precursor derived from 3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde oxime as previously described (Devel, et al., 2006) to afford compound **3** (56% yield). This precursor was then alkylated with *tert*-Butyl bromoacetate to lead derivative **4** (90% yield). This precursor allowed accessing to malonic block **5** after saponification step in presence of a large excess of potassium hydroxide (200 eq). In such conditions, malonic block **5** was obtained in mixture with succinic derivative **6** (5/6: 85/15, ratio determined by NMR and RP-HPLC). After RP-HPLC purification, malonic block was isolated with 39% yield. This building block was stored at -20°C and appeared to be stable over a period of 6 months. From the same common precursor **4**, *tert*-Butyl protecting group was removed in DCM/TFA: 3/1 and the resulting intermediate was directly engaged in the following step. O-tritylhydroxylamine was then incorporated in presence of TBTU to yield compound **7** (76% yield). Finally this compound was saponified as described above to lead to a mixture of succinic block **8** and its malonic precursor. After treatment and isolation of both compounds in mixture, malonic precursor was fully converted into succinic block **8** in DMSO after 1 hour at 80°C under microwave irradiation. Succinic block **8** was finally purified by RP-HPLC and isolated with 48% yield. This building block was stored at -20°C and was stable over a period of 6 months Pseudo peptides **2** and **3** were then synthesized using solid phase strategy (scheme XB). Standard Fmoc methodology was used to build amino acids sequences. Functionalized resin was then split in two batches for the parallel synthesis of pseudo peptides. After Fmoc removal, malonic building block **5** was incorporated under microwave irradiation (60°C, 1 h) using a premixing protocol in presence of DIC and Cl-HOBt. After cleavage, the resulting diasteromers in mixture were separated by RP-HPLC to afford pseudopeptides **3a** and **3b** with 57% and 54 % yield respectively. By contrast, from succinic block **8** in the same conditions, very low amount of the expected compound **2a** and **2b** was obtained. Several attempts for improving the reaction yield were tested. In this respect, different coupling agents were evaluated and *in situ* Boc protection of the hydroxamate amino reactive function was also performed (Leeuwenburgh, et al., 2006). None of these modifications significantly improved the yield of block **8** incorporation. Beyond this major shortcoming, compounds **2a** and **2b** appeared also very unstable during cleavage steps. Thus a prolonged contact between compounds **2a** and **2b** and TFA resulted in a complex mixture of compounds. Among those, compounds derived from cyclic adducts whose formation was previously described by Wang *et al* (Wang, et al., 2006) were identified by mass spectrometry analysis (see supplemental). Finally, carboxylic acid function of **8** (1 eq) was activated in

presence of HATU (1.5 eq) and DIEA (3 eq) and incorporated on peptide sequence under microwave irradiation (60°C, 1h). Furthermore limited time of cleavage was implemented. In such conditions, pseudo peptides **2a** and **2b** were isolated after RP-HPLC purification with 9,8% and 7,8% respectively.

Dimethyl 2-((3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl) methyl) malonate (3). 3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde oxime (Devel, et al., 2006) (2 g, 8.63 mmol, 1.6 eq) was dissolved in DCM (100 mL) and 5 drops of pyridine were added. The solution was then warmed up to reflux and NCS (1.15 g, 8.63 mmol) was added portion wise. The reaction was monitored by TLC (CHX/AcOEt 9:1) and after 2 hours the solution was cooled to room temperature. To this solution dimethyl propargylmalonate (0.907 g, 5.33 mmol, 1 eq) was added, followed by slow addition of DIEA (9.3 mL, 53.3 mmol, 10 eq). The reaction mixture was then stirred for 4 days at reflux. The solution was then concentrated under vacuum and the resulting crude was dissolved in AcOEt (50 mL). The solution was filtrated and concentrated. The crude solid was purified by silica gel column chromatography using CHX/AcOEt 9:1 followed by CHX/AcOEt 8:2 as eluent solvent system to afford compound **3** (1.19 g, 56%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.45 (d, *J* = 7.5 Hz 2H, CH₂-Isoxazol), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 3.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH-(CO)₂), 6.43 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49 (m, 1H, H_{Ar}), 7.61 (s, 1H, H_{Ar}), 7.65 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.86 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 26.23, 49.93, 53.22, 100.65, 125.38, 127.36, 127.45, 127.71, 127.92, 128.52, 130.28, 134.95, 141.48, 142.21, 162.21, 168.47, 169.74; HRMS *m/z* for C₂₁H₁₉CINO₅⁺ (M+H⁺), calcd 400.0946, found 400.0936.

1-(*tert*-butyl) 2,2-dimethyl 3-(3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl)propane-1,2,2-tricarboxylate (4). Compound **3** (0.5 g, 1.25 mmol, 1 eq) was dissolved in dry THF (Freshly distilled, 3 mL) under argon. The resulting solution was then cooled to 0°C (ice bath) and sodium hydride in oil dispersion (0.06 g, 1.5 mmol, 1.2 eq) was added in three equivalent portions. After 5 minutes, the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and *tert*-Butyl bromoacetate (0.293 g, 1.5 mmol, 1.2 eq) in anhydrous THF (3mL) was added. The reaction mixture was then stirred for 12 hours at room temperature. The solution was concentrated under vacuum and the resulting crude was dissolved in AcOEt (15 mL). The organic layer was washed with water (15 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified by silica gel column chromatography using CHX/AcOEt 9:1 as eluent solvent system to afford compound **4** (0.58 g, 90%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.47 (s, 9H, (CH₃)C), 2.94 (s, 2H, CH₂-COOtBu), 3.65 (s, 2H, CH₂-Isoxazole), 3.80 (s, 6H, OCH₃), 6.43 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.33-7.42 (m, 2H, H_{Ar}), 7.50 (m, 1H, H_{Ar}), 7.61 (s, 1H, H_{Ar}), 7.64 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.85 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 28.13, 30.47, 38.42, 53.38, 55.15, 81.91, 102.17, 125.37, 127.34, 127.43, 127.69, 127.90, 128.52, 130.27, 134.93, 141.44, 142.20, 162.09, 168.86, 169.39, 169.64; HRMS *m/z* for C₂₇H₂₈CINaO₇⁺ (M+Na⁺), calcd 536.1452, found 536.1427.

2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2-((3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl)methyl)malonic acid (5) and 4-(*tert*-butoxy)-2-((3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl)methyl)-4-oxobutanoic acid (6). Compound **4** (0.12 g, 0.25 mmol, 1 eq) was dissolved in absolute ethanol (15 mL) and potassium hydroxide (2.8 g, 50 mmol, 200 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature and reaction completion was monitored by RP-HPLC (Analytical column Grace Vision HT C18, 15 cm x 4,6 mm, 3 μ m, Gradient: 0 to 10 min / 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹). After 48h, the solvent was evaporated under vacuum and the crude solid was dissolved in water (5 mL). The resulting solution was acidified to pH=5-6 with NaH₂PO₄ di hydrate and EtOAc (5 mL) was added. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc (5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford a pale yellow solid (85 mg) as a mixture of malonic derivative **5** (85%) and succinic derivative **6** (15%). Relative percentage between **5** and **6** was determined both by ¹H NMR and analytical RP-HPLC at 280 nm. Compounds **5** and **6** were separated by RP-HPLC (Semi preparative column Supelco Ascentis® C18, 15 cm x 10mm, 5 μ m, Gradient: 0 to 30 min / 0 to 100% (B), flow rate= 3 mL·min⁻¹) and collected fractions were lyophilised to lead to **5** (47 mg, 0.097 mmol, 39%) and **6** (7.5 mg, 0,017 mmol, 6.8 %) as white powders.

(5), R_t= 9.18 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 10 min / 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹), ¹H NMR (Acetone d₆) δ 1.47 (s, 9H, (CH₃)C), 2.93 (s, 2H, CH₂-COOtBu), 3.71 (s, 2H, CH₂-Isoxazole), 6.79 (s, 1H, CH=

isoxazole), 7.43 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (dd, J = 8 Hz and J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.70 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.76 (s, 1H, H_{Ar}), 7.83 (d, J = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.98 (d, J = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); ^{13}C NMR (Acetone d₆) δ 28.14, 30.83, 38.79, 55.34, 81.73, 102.69, 126.30, 127.62, 128.12, 128.43, 128.56, 129.71, 131.52, 135.29, 141.71, 143.00, 162.58, 170.15, 170.46, 170.81; HRMS m/z for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{CINaO}_7^+$ (M+Na⁺), calcd 508.1139, found 508.1096. (6) R_t = 9.73 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 10 min: 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹), ^1H NMR (Acetone d₆) δ 1.43 (s, 9H, (CH₃)C), 2.61 (m 2H, CH₂-COOtBu), 3.23 (m, 3H, CH₂-Isoxazole and CHCOOH), 6.81 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.44 (dd, J = 1.5 Hz and J = 6.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (dd, J = 7.75 Hz and J = 7.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.70 (d, J = 7.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.75 (d, J = 1.5 Hz 1H, H_{Ar}), 7.83 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.99 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 11.09 (bs, 0,5H, COOH); ^{13}C NMR (Acetone d₆) δ 28.17, 30.40, 37.02, 40.54, 81.02, 101.30, 126.31, 127.63, 128.12, 128.42, 128.56, 129.92, 131.52, 135.31, 141.65, 143.06, 162.58, 171.10, 172.25, 174.42; MS m/z for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{CINO}_5^+$ (M+H⁺), calcd 442.1, found 442.2

Dimethyl-2-((3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl)methyl)-2-(2-oxo-2-((trityloxy)amino)ethyl)malonate (7). Compound **4** (0.44 g, 0.856 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM/TFA: 3/1 (13 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature and reaction completion was monitored by TLC (CHX/AcOEt 9:1). After 12h, the solvent was evaporated under vacuum, the crude compound was re dissolved in toluene (5 mL) and the solution was evaporated again. This operation was repeated three times. The resulting acid was not isolated and was directly engaged in the following step. The crude solid was dissolved in anhydrous DCM (6 mL) under argon and DIEA (0.252 mL, 1,45 mmol, 1,7 eq) was added. TBTU (0.466 g, 1,45 mmol, 1,7 eq) was added at room temperature followed after 5 minutes by the addition of O-tritylhydroxylamine (0.306 g, 1.11 mmol, 1.3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 hours at room temperature. The solution was then evaporated and the resulting crude was directly purified by silica gel column chromatography using CHX/AcOEt 8:2 as eluent solvent system to afford 0.468 g (76%) of compound **7** as a white solid. ^1H NMR (CDCl₃) δ 2.21 (s, 1H, CH₂-CONHOTrt), 2.61 (s, 1H, CH₂-CONHOTrt), 3.44 and 3.47 (s, 2H, CH₂-Isoxazole), 3.70 and 3.76 (s, 6H, OCH₃), 5.88 (s, 0,6H, CH= isoxazole), 6.34 (s, 0,4H, CH= isoxazole), 7.29-7.90 (m, 24H, H_{Ar} and NHOTrt); ^{13}C NMR (CDCl₃) δ 29.86, 30.66, 34.87, 35.80, 53.27, 53.52, 54.36, 54.63, 93.11, 93.84, 101.88, 102.33, 125.37, 127.34, 127.42, 127.67, 127.95, 128.06, 128.27, 128.88, 129.11, 130.29, 140.92, 141.51, 141.71, 142.15, 161.82, 166.56, 168.72, 169.17, 169.37, 169.69; HRMS m/z for $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{ClN}_2\text{NaO}_7^+$ (M+Na⁺), calcd 737.2030, found 737.1969.

2-((3-(3'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)isoxazol-5-yl)methyl)-4-oxo-4-((trityloxy)amino)butanoic acid (8). Compound **7** (0.413 g, 0.58 mmol, 1 eq) was dissolved in absolute ethanol (30 mL) and potassium hydroxide (6.5g, 116 mmol, 200 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature and reaction completion was monitored by RP-HPLC (Analytical column Grace Vision HT C18, 15 cm x 4,6 mm, 3 μm , Gradient: 0 to 10 min / 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹). After 24h, the solvent was evaporated under vacuum and the crude solid was dissolved in water (50 mL). The resulting solution was acidified to pH=5-6 with NaH₂PO₄ di hydrate and EtOAc (25 mL) was added. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc (25 mL). The organic layers were combined, washed with a NH₄Cl_{sat} aqueous solution (25 mL) followed by a brine solution (25 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford a yellow solid (0.380 g) corresponding to a mixture of **8** and its malonic precursor. The crude solid was then dissolved in DMSO (20 mL) and warmed for 1h at 80°C under microwave irradiation (25 W). In these conditions the malonic precursor was fully converted into derivative **7**. The reaction mixture was then diluted in a A/B: 2/1 solution (20 mL) and finally purified by RP-HPLC (Semi preparative column Supelco Ascentis® C18, 15 cm x 10mm, 5 μm , Gradient: 0 to 30 min/0 to 100% (B), flow rate= 3mL·min⁻¹) to lead after lyophilisation to succinic derivative **8** (183 mg, 0.28 mmol, 48%) as a white powder. R_t = 9.98 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 10 min: 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹), ^1H NMR (DMSO d₆) δ 2.06 (m, 1H, CH₂-CONHOTrt), 2.18 (m, 1H, CH₂-CONHOTrt), 2.62 (m, 1H, CH₂-Isoxazole), 2.81 (m, 1H, CH₂-Isoxazole), 3.04 (s, 1H, CH-COOH), 6.61 and 6.68 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.27 (m, 15H, OTrt), 7.49 (m, 4H, H_{Ar}), 7.73 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.87 (m, 5H, H_{Ar}); ^{13}C NMR (DMSO d₆) δ 30.23, 33.22, 40.83, 91.90, 125.49, 126.50, 126.67, 127.14, 127.56, 127.61, 127.79, 128.10, 128.30, 128.96, 130.91, 133.90, 140.04, 141.37, 142.32, 147.79, 161.22, 168.09, 171.16, 171.46; MS m/z for $\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_5^+$ (M+H⁺), calcd 643,2, found 643,3.

Standard Fmoc methodology: Rink amide resin (180 mg, 0.128 mmol, 1 eq) was first swelled in DCM (5 mL) for 15 min at room temperature. Fmoc removal was performed with piperidine 20% in DMF under microwave irradiation (5 mL, 3 x 2min, 60°C, 25 W). Resin was then washed with DMF (x 2) and DCM (x 2). Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0.27 g, 0.64 mmol, 5 eq) was first pre activated in presence of COMU (0.27 g, 0.64 mmol, 5 eq) and DIEA (0.22 mL, 1.28 mmol, 10 eq) in DMF (1 mL) and added to resin. The coupling reaction was performed under microwave irradiation (10 min, 60°C, 25 W). This cycle of Fmoc removal/ amino acid coupling step was repeated for the incorporation of the second Fmoc-Glu(OtBu)-OH.

RXP470COOH derivative (3a/3b). Fmoc removal was performed as described and the resin was then washed (2 x DMF, 2 x DCM). Malonic building block **5** (8.3 mg, 0.017 mmol, 1.1 eq) was first activated in presence of DIC (0.008 mL, 0.051 mmol, 3 eq) and Cl-HOBt (0.009 g, 0.051 mmol, 3 eq) in anhydrous DMF (0.3 mL) for 5 min at room temperature. The solution was then added to the resin and the coupling reaction was performed under microwave irradiation (1 h, 60°C, 25W). The resin was then washed as described and suspended in TFA/ H₂O: 95/5 (1 mL) for 45 min at room temperature under gentle stirring. The resin was removed by filtration and washed with TFA/DCM: 1/1 (1 mL, 2 x 30 min r.t.). Combined filtrates were evaporated under light flow of argon. The crude product was dissolved in a A/B: 1/1 solution (2 mL). RP-HPLC separations and purification of diastereomers **3a** and **3b** were performed on semi preparative column Supelco Ascentis® C18 (flow rate=3 mL·min⁻¹, UV detection at 230 nm and 280 nm) using a gradient as followed: 0 to 5 min: 0 to 30% (B), 5 to 25 min: 30% to 60% (B), 25 to 30 min: 60% to 100% (B)). After freeze-drying, diastereomers **3a** (2.9 mg, 0.0045 mmol, 57%) and **3b** (2.7 mg, 0.0042 mmol, 54%) were isolated as foamy white solids and stored at -20°C. **(3a).** R_t= 7.14 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 10 min: 0 to 100% (B), flow rate=1,2 mL·min⁻¹), $\lambda_{272\text{nm}}=35485\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; ¹H NMR (DMSO d₆) δ 1.87 (m, 4H, CH₂CH₂COOH), 2.25 (m, 4H, CH₂CH₂COOH), 2.36 (m, 1H, CHCH₂COOH), 2.59 (m, 1H, CHCH₂COOH), 2.97 (m, 3H, CHCH₂COOH and CH₂-Isoxazole), 4.22 (m, 2H, CH-NH), 6.92 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.11 (s, 1H, CONH₂), 7.36 (s, 1H, CONH₂), 7.47 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53 (dd, J = 7.75 Hz and J = 7.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.72 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.81 (s, 1H, H_{Ar}), 7.84 (d, J = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.92 (s, 1H, NH), 7.96 (d, J = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.40 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH); HRMS m/z for C₃₀H₃₀CIN₄O₁₀⁻ (M-H)⁻, calcd 641,1650, calcd 641,1619. **(3b).** R_t= 7.37 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 10 min: 0 to 100% (B), flow rate= 1,2mL·min⁻¹), $\lambda_{272\text{nm}}=35485\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; MS m/z for C₃₀H₃₀CIN₄O₁₀⁻ (M-H)⁻, calcd 641,1, found 641,1.

RXP470CONHOH derivatives (2a/2b). Fmoc removal was performed as described and the resin was then washed (2xDMF, 2xDCM). Succinic building block **8** (20 mg, 0.031 mmol, 1 eq) was activated in presence of the resin with HATU (17.5 mg, 0.046 mmol, 1.5 eq) and DIEA (0.016 mL, 3 eq) in anhydrous DMF (0.4 mL) and the reaction was performed under microwave irradiation (1 h, 60°C, 25W). The resin was then washed as described and then suspended in TFA/ H₂O: 95/5 (2 mL) for 30 min at room temperature under gentle stirring. The resin was removed by filtration and washed with TFA/DCM: 5/95 (2 mL, 2x30 min r.t.). This cycle was repeated twice. Combined filtrates were evaporated under light flow of argon and the crude product was dissolved in a A/B: 1/1 solution (2 mL). RP-HPLC separations and purification of diastereomers **2a** and **2b** were performed on semi preparative column Grace® Vision HT C18 HL 5 μ (flow rate=4mL·min⁻¹, UV detection at 230 nm and 280 nm) using a gradient as followed: 0 to 5 min: 0 to 30% (B), 5 to 35 min: 35% to 60% (B), 35 to 40 min: 60% to 100% (B). After freeze-drying diastereomers **2a** (1 mg, 9.8 %) and **2b** (0.8 mg, 7.8 %) were isolated as foamy white solids and stored at -20°C. **(2a).** R_t= 8.76 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 2 min: 0 to 30% (B), 2 to 28 min: 30 to 60%, 28 to 30 min: 60 to 100% (B), flow rate=1,2mL·min⁻¹), $\lambda_{272\text{nm}}=32360\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; ¹H NMR (DMSO d₆) δ 1.89 (m, 4H, CH₂CH₂COOH), 2.22 (m, 6H, CH₂CH₂COOH and CHCH₂COOH), 2.91 (m, 3H, CHCH₂COOH and CH₂-Isoxazole), 4.18 (m, 2H, CH-NH), 6.32 and 6.81 (s, 1H, CH= isoxazole), 7.11 (s, 1H, CONH₂), 7.34 (s, 1H, CONH₂), 7.48 (m, 1H, H_{Ar}), 7.53 (m, 1H, H_{Ar}), 7.72 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.82 (m, 3H, H_{Ar}), 7.95 (m, 3H, H_{Ar}), 8.40 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, CONHOH), 10.50 (s, 1H, CONHOH); HRMS m/z for C₃₀H₃₃CIN₅O₁₀⁺ (M+H)⁺, calcd 658,1910, found 658,1879. **(2b).** R_t= 10.32 min (Analytical Grace Vision HT C18, Gradient: 0 to 2 min: 0 to 30% (B), 2 to 28 min: 30 to 60%, 28 to 30 min: 60 to 100% (B), flow rate=1,2mL·min⁻¹), $\lambda_{272\text{nm}}=32360\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; MS m/z for for C₃₀H₃₃CIN₅O₁₀⁺ (M+H)⁺, calcd 658,2, found 658,2.

Titre : Conception de ligands à vocation thérapeutique : combinaison d'approches multidisciplinaires pour comprendre les interactions intermoléculaires**Mots clefs :** MMP-12, inhibitor, protonation, ITC, crystallography, zinc binding group

Les mécanismes de reconnaissance moléculaire sont à la base de nombreuses fonction biologiques essentielles (transduction du signal, régulation de l'expression génique, stimulation du système immunitaire,...). La compréhension des phénomènes physiques et chimiques à la base de ces phénomènes est fondamentale pour de nombreuses applications telles que la conception de médicaments, le développement d'outils diagnostiques ou tout autre procédé biotechnologique. Dans cette étude, nous avons étudié de manière extensive l'interaction entre la métalloélastase du macrophage (MMP-12) et le RXP470.1, un inhibiteur puissant et sélectif. En combinant des approches de cristallographie, de microcalorimétrie (ITC) et des tests enzymatiques, nous avons pu quantifier l'importance énergétique du transfert d'un seul proton suite à la liaison du RXP470.1, et mettre en lumière l'importance des contributions entropiques. Ainsi, la protonation du Glu²¹⁹, un résidu catalytique, permet de compenser une enthalpie de liaison intrinsèque défavorable. Cette protonation est rendue possible par le large shift de pKa que subit le Glu²¹⁹ en réponse à la liaison du RXP470.1 (pKa_{libre} = 5.7 ± 0.1 / pKa_{lié} = 10 ± 0.04).

Enfin, cette étude est la première, à notre connaissance, ayant combiné données d'affinité, thermodynamiques et structurales pour aborder le rôle du groupe chélatant. Nous avons ainsi étudié deux analogues du RXP470.1 variant seulement par la nature de leur pince à zinc. Ces modifications se traduisent par un effet marqué sur les profils d'affinité et de sélectivité ainsi que sur la signature énergétique des composés étudiés. L'étude des facteurs B, associés à l'analyse des structures cristallographiques, de ces inhibiteurs en complexe avec la MMP-12, suggère que des différences mineures de structures peuvent engendrer des variations de mobilité importantes au niveau des résidus impliqués dans l'interaction inhibiteur - enzyme. Ces différences trouvent leur origine dans un positionnement très légèrement différent du groupe chélatant par rapport au zinc.

Pris dans leur ensemble, ces résultats pointent la nécessité de combiner un ensemble d'approches expérimentales pour décrire la complexité des interactions protéine/ligand. Ces associations doivent permettre d'évaluer le potentiel de méthodes théoriques capables de décrire des systèmes complexes.

Title : Design of therapeutic compounds: Combination of multidisciplinary approaches to get deeper insight into intermolecular interactions**Keywords :** MMP-12, inhibitor, protonation, ITC, crystallography, zinc binding group

Protein-ligand recognition mechanisms are essential to many fundamental biological functions such as signal transduction, gene regulation or stimulation of the immune system. Understanding the physical and chemical phenomenon upon protein-ligand binding is essential for many practical applications such as drug design, ligand based diagnostic tools and any other study based on biotechnology. In this study, we extensively explored the interaction between human macrophage metallo elastase MMP-12 and RXP470.1, a potent and selective inhibitor. By combining high resolution X-ray crystallography, FRET based enzyme assays and Isothermal Titration Calorimetry, we were able to highlight the importance of entropic contributions and to quantify the importance of a single proton transfer upon RXP470.1 binding. We show, here, how the protonation of Glu²¹⁹ upon RXP470.1 binding rescues an otherwise unfavourable binding enthalpy. This protonation is made possible by the large pKa shift Glu²¹⁹ undergoes as RXP470 enters MMP12h (pKa_{libre} = 5.7 ± 0.1 / pKa_{lié} = 10 ± 0.04).

To our knowledge, this study is also the first to address the zinc binding group effect from affinity, thermodynamic and structural data. We tested two RXP470 analogues, which only differ by their zinc-binding group. We show that this, apparently minor, change has great consequences regarding their affinity profiles and thermodynamic signatures. In addition, the analysis of the b factors, associated to the X-ray structures of these compounds in complex with MMP-12, suggests that small modifications of the zinc binding group might imply important mobility variations of the residues involved in the protein-ligand interaction. These modifications are initiated by a small shift of the zinc binding groups positioning in the active site.

Taken together, these results point toward the necessity to combine several experimental approaches to describe the complexity of protein-ligand interactions. These associations should allow the evaluation of new theoretical methods able to describe complex systems.

