



COLLEGE DOCTORAL

École Doctorale
BIOLOGIE SANTÉ



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – LILLE 2 DROIT ET SANTE

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Modélisation moléculaire

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2014
par

Xavier LAURENT

Etude *in silico* du complexe CD1d/Ag : bases moléculaires de l'orientation de la réponse immunitaire des cellules iNKT

JURY

Directeur de thèse :

Philippe CHAVATTE

Professeur des Universités – Université Lille 2

Co-directeur de thèse :

Gérard VERGOTEN

Professeur des Universités – Université Lille 1

Rapporteurs :

Manuel DAUCHEZ

Professeur des Universités – Université de Reims Champagne-Ardenne

Serge VAN CALENBERGH

Professeur des Universités – Universiteit Gent

Examineurs :

Pierre DESREUMAUX

Professeur des Universités – Université Lille 2

Eric HENON

Professeur des Universités – Université de Reims Champagne-Ardenne

Patrick SENET

Professeur des Universités – Université de Bourgogne

L'imagination est plus importante que la connaissance. La connaissance est limitée alors que l'imagination englobe le monde entier, stimule le progrès, suscite l'évolution.

Albert Einstein

Le possible est déjà fait, l'impossible est en cours, pour les miracles prévoir un délai.

Auteur inconnu

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Philippe Chavatte qui, en plus de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son équipe, s'est démené pour me permettre de réaliser ces trois années de doctorat. Je lui suis très reconnaissant de la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce projet, et j'espère m'être montré à la hauteur. Son enthousiasme et ses conseils avisés distillés pendant ces longues réunions de travail m'ont apporté beaucoup. Pour tout cela, merci encore.

Je remercie grandement le Professeur Gérard Vergoten d'avoir co-encadré cette thèse. Son expérience et ses conseils m'ont été d'une aide précieuse et je ne peux que regretter de ne pas avoir eu le temps d'en profiter plus longuement.

Je souhaiterais exprimer ma plus vive reconnaissance au Professeur Serge Van Calenbergh qui, après avoir participé à mon dernier comité de suivi de thèse, me fait l'honneur de juger ce travail.

Le Professeur Manuel Dauchez a également toute ma gratitude, à la fois pour avoir accepté d'évaluer ces travaux, mais aussi pour son accueil chaleureux lors de mes passages à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Je voudrais témoigner toute ma reconnaissance envers le Professeur Eric Hénon, tout d'abord pour avoir accepté de siéger dans ce jury, mais surtout pour avoir dépensé tant de temps et d'énergie afin d'initier un bétotien aux arcanes de la dynamique moléculaire. Ces déplacements à Reims, autant que ces longues audioconférences, ont été un réel plaisir et m'ont apporté énormément sur le plan professionnel.

Je remercie aussi vivement les Professeurs Pierre Desreumaux et Patrick Senet de me faire l'honneur de participer à ce jury en dépit de la charge de travail qui leur incombe.

Un grand merci bien sûr à la société Intestinal Biotech Development pour avoir supporté financièrement ces travaux et tout particulièrement au Docteur Nghiep Truong Tan, toujours disponible, de bon conseil et avec une impressionnante connaissance de l'Ovalie.

Je tenais à adresser un énorme merci à Benjamin Bertin, Silvia Specca, Régis Millet, Frédérique Klupsch et Ophélie Milhomme qui se sont vraiment investis dans ce projet naissant et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je ne saurais probablement jamais venu à faire cette thèse sans Nicolas Renault et Amaury Farce, forces vives de l'équipe de modélisation. En six ans ils m'ont fait découvrir et aimer la modélisation moléculaire et la recherche. Grâce à eux j'ai réussi à m'épanouir professionnellement et humainement, et pour ca je ne les remercierais jamais assez.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'évoluer pendant ces trois années dans une ambiance des plus agréables, qu'elles soient dans les locaux de la fondation Digestscience, à l'ICPAL ou aux 1^{er} et 2^e étage de la faculté de Pharmacie. Merci tout particulièrement aux adeptes de l'atelier macramé, aux modélisateurs sans crayons de couleurs, au chimiste avec une pinte (et des couettes ?!), à l'éleveuse de poules en devenir adepte de la chocolatine, à Laurence, organisatrice honoraire des séminaires Jeune

Chercheur, aux anciens du Mastère Drug Design, au Docteur Tourteau et à son disciple, à la chimiste à l'accent chantant qui ne peut pas se passer de pain, aux doctorants et stagiaires de tout poil et toutes époques. Il faut avouer que ça fait du monde et la liste est encore longue, aussi j'espère que tous les autres se reconnaîtront. Sans vous cette thèse n'aurait tout simplement pas été la même.

Je sais qu'ils m'en voudraient de les oublier (et ils auraient raison !), aussi mes amitiés à la dream team du master Chimie et Biologie, le gang du Tyr Na Nog, j'ai nommé JC, Quentin, Romain et Adeline, nouvelle venue dans notre petite communauté. Merci pour votre soutien et ces centaines d'heure de discussions scientifiques/rugbistiques/philosophiques/déjantées. Merci également à Luc, fin stratège et vaillant camarade, qui à eu le courage de relire une partie de ce pavé.

Pour finir je tenais à remercier ma sœur, Marine, mes parents, Anne-Marie et Marc, et mes grands-parents. Tout cela, même si je vous le dis trop peu souvent, c'est à vous que je le dois.

Table des matières

Introduction générale	3
I - Les lymphocytes Natural Killer T invariants et leurs modulateurs	4
1 Les Lymphocytes iNKT	4
1.1 Classification	4
1.2 Mécanismes d'activation.....	6
1.3 Réponse immunitaire.....	8
1.4 Observations cliniques et ciblage thérapeutique	8
2 Structure du complexe CD1d/ligand/TCR	10
2.1 Le récepteur CD1d	11
2.2 Spécificités de l'isoforme CD1d	13
2.3 Le récepteur des cellules T	14
2.4 L'interface CD1d/ligand/TCR	15
3 Relations structure-activité des modulateurs connus des iNKT	17
3.1 Analogues du galactose.....	18
3.2 Modification du lien osidique.....	22
3.3 Impact de la partie polaire.....	24
3.4 Modulation des chaînes lipidiques	29
3.5 Eléments structuraux clés et pharmacomodulations envisageables.....	33
II - Identification des mouvements spécifiques aux profils Th1 et Th2 dans les complexes CD1d/ligand	35
1 Approche par <i>docking – scoring</i>	35
1.1 Algorithme et logiciel employés.....	35
1.2 Paramétrage pour le complexe CD1d/ α -GalCer/TCR humain.....	37
1.3 Limites de la méthode.....	40
2 Approche dynamique.....	40
2.1 Dynamique moléculaire	41
2.2 Protocole d'analyse	67
2.3 Comparaison des systèmes CD1d seul, CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH	73
III - Analyse de 8 complexes de référence CD1d/ligand/TCR par dynamique moléculaire .	101
1 Systèmes d'étude	101
2 Méthodes et outils d'analyse employés.....	103
2.1 RMSD-2D et RMSF	103
2.2 Empreinte diédrale et distance inter-hélices.....	103

2.3	3D-FEL et similarité 1DFEL	104
3	Comparaison détaillée des systèmes CD1d/ α -GalCer et CD1d seul	105
4	Effet différentiel de la présentation par des CD1d humains ou murins	110
5	Comparaison des systèmes induisant des réponses immunitaires Th1 ou Th2.....	114
6	Influence du lipide complémentaire.....	118
7	Apport pour la conception de nouveaux modulateurs.....	121
	Conclusion générale	123
	Abréviations	125
	Index des figures	127
	Index des tables	131
	Bibliographie	132
	Annexe A – Relations structure-activité	149
	Annexe B – RMSD-2D	160
	Annexe C - RMSF	186
	Annexe D – Empreintes diédrales	195
	Annexe E – Distance inter-hélices	221
	Annexe F – FEL-3D	272
	Annexe G – FEL-1D	316
	Annexe H – Similarité des FEL-1D	990

Introduction générale

Le système immunitaire est un système biologique crucial pour la défense de l'organisme contre les éléments du « non-soi » tel les virus, les bactéries, les parasites, les cellules tumorales ou certains poisons. Il est aussi impliqué, *via* des cascades d'effecteurs complexes, dans divers mécanismes pro- ou anti-inflammatoires et peut avoir un effet protecteur ou néfaste. Il est notamment impliqué dans les maladies auto-immunes. La modulation de la réponse immunitaire est donc un enjeu thérapeutique de taille, cependant la complexité et la versatilité du processus rendent la recherche de cibles thérapeutiques très difficile. Les lymphocytes Natural Killer T invariants (iNKT) sont des cellules du système immunitaires capables de l'orienter vers des profils de réponse très contrastés. Même si le mécanisme exact par lequel les lymphocytes iNKT influencent la réponse immune reste en partie incompris, la nature de l'antigène reconnu par ces cellules conditionne la modulation de la réponse. C'est pourquoi la conception d'antigènes synthétiques capables de polariser la réponse de ces lymphocytes vers un profil donné ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Ces travaux de thèse ont donc pour objectif principal de démystifier les interactions protéine-antigène et protéine-protéine qui sont au cœur de l'activité biologique. Les relations entre la structure de l'antigène, ses interactions intermoléculaires avec son récepteur et la fonctionnalité médiée par les iNKT sont autant de données moléculaires exploitables par la modélisation moléculaire afin de prédire les propriétés thérapeutiques de nouveaux antigènes synthétiques. Cette discipline utilise l'outil informatique pour représenter et décrire les propriétés structurales d'une molécule et ainsi prédire leur impact sur une activité biologique donnée. Elle englobe des activités aussi variées que la gestion de bases de données d'informations chimiques et biologiques, la représentation tridimensionnelle de molécules ou la prédiction de propriétés biologiques. Parmi ces outils, plusieurs méthodes peuvent être mises à profit. Le *docking*, ou arrimage moléculaire, concerne la simulation des interactions récepteur-ligand, très largement répandu dans le domaine du *drug design*. D'autres méthodes sont plus focalisées sur les macromolécules. Ainsi, la dynamique moléculaire est un domaine d'expertise à part entière de la modélisation moléculaire et concerne la recherche d'états énergétiquement stables d'un système moléculaire. De toute évidence, l'intervention de plusieurs partenaires protéiques capables d'interagir avec les antigènes étudiés nécessite une telle approche dynamique afin de mesurer les mouvements spécifiques induits par un antigène donné.

Toutes ces approches, dites *in silico*, ont ainsi été entreprises afin de rationaliser la conception de nouveaux modulateurs des cellules iNKT, mais également de corroborer les mécanismes structuraux observés *in silico* avec les deux profils de réponse immunitaire majeurs induits *in vitro*. La modélisation moléculaire est également devenue une approche privilégiée pour mesurer l'impact des mutations sur la fonctionnalité des protéines. C'est pourquoi d'autres études comparatives ont été entreprises afin de mesurer les variations orthologues entre les récepteurs humain et murin sur la réponse médiée par les lymphocytes iNKT.

I - Les lymphocytes Natural Killer T invariants et leurs modulateurs

1 Les Lymphocytes iNKT

1.1 Classification

Deux catégories de cellules du système immunitaire sont classiquement distinguées : les cellules du système de défense inné et celles du système de défense acquis (ou adaptatif). Les cellules du système de défense inné sont celles capables de reconnaître, *via* leurs récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors), des motifs moléculaires conservés présents chez les pathogènes. Les cellules du système adaptatif, exclusivement présentes chez les vertébrés, expriment quant à elles une grande variété de récepteurs. Ceux-ci vont spécifiquement reconnaître un groupe de molécules nommées antigènes et c'est cette reconnaissance qui va déclencher la réponse immune. Ces cellules ont une « mémoire immunologique », c'est-à-dire qu'elles vont réagir de plus en plus rapidement et de façon de plus en plus agressive à la présentation répétée d'un antigène.

Les cellules Natural Killer T (NKT) sont des lymphocytes qui ont la particularité d'appartenir à la fois aux systèmes immuns inné et acquis.^[1] Certaines d'entre elles expriment à la fois des marqueurs des cellules Natural Killer (NK) (récepteurs NK1.1 chez la souris et CD161 chez l'homme) et des cellules T (duo de récepteurs TCR et CD3).^[2] Bien que ne représentant qu'une très petite fraction des lymphocytes T, elles jouent un rôle majeur dans de nombreuses réponses immunitaires et pathologies. Le TCR (T Cell Receptor) exprimé par les NKT diffère du TCR des cellules T classiques. La composition des chaînes α et β de ce dernier étant obtenue par réarrangement somatique de l'ADN, il existe de très nombreux TCR possible. Cependant, les NKT n'en expriment qu'un répertoire réduit (cf I-2.3). De même, les NKT ne reconnaissent pas les peptides liés à des molécules hautement polymorphiques du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I et II, mais des antigènes glycolipidiques présentés par CD1d, une molécule atypique du CMH de classe I non polymorphique. Le premier antigène synthétique découvert est l' α -galactosylcéramide (α -GalCer, KRN7000, **1**)^[3] (Figure 3), un analogue d'un glycosphingolipide provenant de l'éponge marine *Agelas mauritanus*. Cette molécule est également utilisée pour identifier les cellules NKT grâce à un tétramère de CD1d chargé avec de l' α -GalCer.^[4] Cette technique a permis de redéfinir plus précisément la classification de ces cellules et d'en apprendre davantage sur leur développement.

Cette classification distingue 3 types de cellules NKT : les NKT type I ou NKT invariants (iNKT), les NKT type II ou NKT variants (vNKT) et les NKT type III ou « NKT-like ». (Table 1)

	Type I ou iNKT	Type II ou vNKT	Cellules NKT-like
Activation par le CD1d	Oui	Oui	Non
Reconnaissance de l' α -GalCer	Oui	Non	Non
Chaîne α du TCR	V α 14-J α 18 (murin) V α 24-J α 18 (humain)	Diverse dont V α 3.2-J α 9, V α 8 (murin)	Diverse
Chaîne β du TCR	V β 8.2, V β 7 et V β 2 (murin) V β 11 (humain)	Diverse dont V β 8.2 (murin)	Diverse
Production IL-4	Oui	Oui	Non
Production IFN- γ	Oui	Oui	Oui

Table 1 : Classification des cellules NKT

1.1.1 NKT type 1 : Les cellules Natural Killer T invariantes

Les cellules NKT invariantes sont définies comme la population de NKT réactive au tétramère CD1d/ α -GalCer et exprimant un TCR de composition quasi invariante pour une espèce donnée (chaîne α type V α 14-J α 18 chez la souris et V α 24-J α 18 chez l'homme ; chaînes β type V β 8.2, V β 7, V β 2 chez la souris et V β 11 chez l'homme).^[2]

Chez l'homme, deux sous-populations d'iNKT sont différenciables par l'expression du récepteur CD4. Les cellules CD4+ vont pouvoir produire à la fois des cytokines pro-inflammatoires (profil de réponse Th1) et anti-inflammatoires (profil de réponse Th2). Les cellules CD4- produisent majoritairement des cytokines Th1. Ces populations CD4+ et CD4- expriment également des récepteurs aux chimiokines différents, ce qui pourrait traduire l'existence d'autres sous-populations distinctes. Chez la souris, deux populations sont également différenciées par l'expression de NK1.1. Les cellules NK1.1+ auront préférentiellement une réponse Th1 et les NK1.1- une réponse Th2.^[5,6] Ces deux populations sont aussi présentes chez l'homme mais les cellules NK1.1- ne sont présentes que dans le thymus. Les NKT de type I représentent la très large majorité de la population des NKT (\approx 90%).

C'est à la famille des iNKT dans son ensemble que nous nous intéresserons dans la suite du manuscrit.

1.1.2 NKT type 2 : Les cellules Natural Killer T variantes

Les lymphocytes NKT de type II sont décrits comme des NKT dépendants de CD1d mais au TCR non-invariant et non réactifs à l' α -GalCer. Cette population est moins bien caractérisée car elle ne peut pas être identifiée en utilisant le tétramère CD1d/ α -GalCer. La prévalence de ces cellules et les récepteurs qu'ils expriment restent encore mal connus.

Même si de nombreuses cellules vNKT expriment un TCR constitué d'une chaîne α de type Va3-Ja9 ou Va8 combinée avec V β 8.2, la composition du TCR de cette population reste plus diversifiée que chez les NKT de type I.

1.1.3 NKT type 3 : Les cellules « NKT-like »

Les NKT type III regroupent l'ensemble des cellules non dépendantes de CD1d, non réactives à l' α -GalCer mais qui présentent un répertoire de TCR restreint et expriment le récepteur NK1.1. Cette population de cellules, bien que classée parfois parmi les NKT, est assez hétérogène. Elle comprend par exemple les MAIT (Mucosal Associated Invariant T)^[7] qui expriment un TCR hautement conservé Va19-Ja33 (Va7.2-Ja33 chez l'Homme) et qui sont sélectionnées par MR1 (récepteur CMH-I like exprimée par les lymphocytes B). Elle comprend aussi des cellules T conventionnelles, qui expriment NK1.1 suite à une activation.

1.2 Mécanismes d'activation

Le mécanisme d'activation des iNKT est complexe et de multiples voies ont été identifiées. Deux modes d'activation principaux sont cependant identifiés (Figure 1) : un mécanisme d'activation directe, qui requiert absolument la présentation d'un antigène, et un mécanisme d'activation indirecte médiée par des cytokines où la présentation d'un antigène n'est pas nécessaire.^[1] De plus, de nombreux facteurs intrinsèques ou extrinsèques aux iNKT vont conditionner et moduler la réponse de ces cellules.

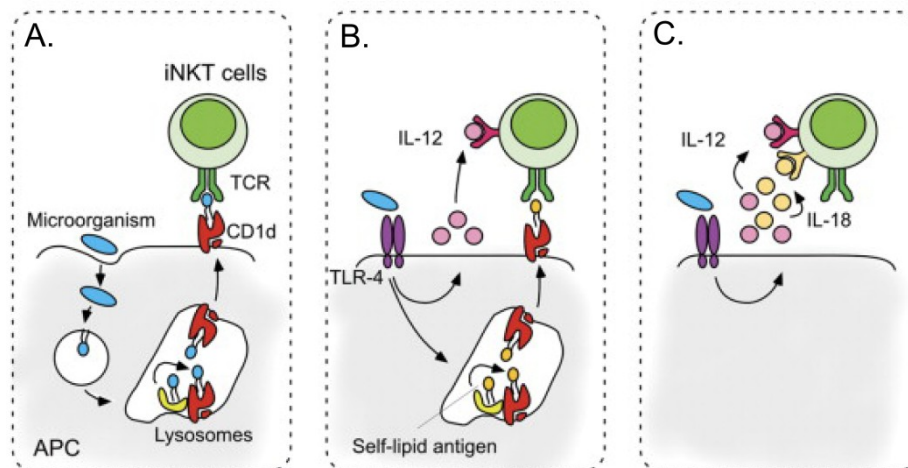


Figure 1 : Les différents mécanismes d'activation des cellules iNKT.^[8]

A. Voie d'activation directe par des micro-organismes pathogènes contenant des glycolipides reconnus par CD1d. **B.** Voie d'activation indirecte des NKT via la présentation de lipides endogènes par CD1d en co-stimulation avec l'IL-12 suite à l'activation du TLR-4 par certaines bactéries. **C.** Voie d'activation indirecte via l'IL-12 et l'IL-18 sécrétés par la CPA suite à une stimulation bactérienne de la voie des TLR (sans présentation de CD1d-dépendante).

1.2.1 Mécanisme d'activation directe

Lors de l'activation directe, l'antigène, généralement d'origine exogène, est présenté par le récepteur CD1d d'une Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA). Les glycolipides chargés dans

le CD1d (ou ligands) peuvent être endogènes, c'est-à-dire produits en réponse à une activation préalable des CPA, ou exogènes. Dans ce cas, les ligands proviennent le plus souvent de la dégradation de pathogènes par le système lysosomal après leur internalisation. Dans les deux cas les ligands sont présentés aux TCR des cellules iNKT, ce qui va provoquer leur activation. De nombreuses études ont ainsi montrés que des structures glycolipidiques issues de différents micro-organismes pouvaient activer les cellules iNKT de manière CD1d dépendante^[9,10] (Figure 1 A et B).

Il existe aussi des ligands du CD1d d'origine synthétique qui sont capables d'activer les iNKT (cf I-3).

1.2.2 Mécanisme d'activation indirecte

Les iNKT sont aussi capables de s'activer en absence d'antigène lipidique. Il a été démontré que des bactéries mises en culture avec des cellules dendritiques peuvent stimuler les cellules iNKT en absence de glycolipides.^[11,12] Il existe deux cas de figure : le premier implique l'activation indirecte des iNKT via des lipides endogènes produits par la CPA préalablement stimulée. Il y a alors également production de cytokines comme l'IL-12 ou de certaines formes d'interférons qui vont agir en synergie avec la présentation du lipide endogène.^[13] Cette voie d'activation est dépendante des TLR (Toll Like Receptor) qui modulent la biosynthèse de lipides endogènes et induisent l'augmentation de l'expression de CD1d chargés en surface des CPA.^[11] Le second cas de figure passe par la stimulation du TLR-4 qui peut induire une activation des iNKT indépendante du CD1d. C'est alors l'exposition à une bactérie qui active le TLR-4 et induit la production d'IL-12 et d'IL-18 par la CPA. La combinaison de ces facteurs suffirait alors à activer les iNKT.^[14] (Figure 1 C)

1.2.3 Facteurs pouvant moduler l'activation

Même si tous les facteurs pouvant influencer le profil de réponse des iNKT sont loin d'être connus, Deux grands types peuvent être différenciés : ceux intrinsèques aux cellules et à leur localisation et ceux qui en sont indépendants (nature du ligand, cytokines présentes dans le milieu ...). L'ensemble des hypothèses suggère que les cellules iNKT sont toujours prêtes à déclencher immédiatement différents profils de réponse et que, sous certaines conditions, la production de cytokines se polarise vers un profil donné.^[15,16] Ainsi, au niveau des facteurs intrinsèques, l'importance du tissu de résidence des cellules et de leur phénotype de surface est à noter. Par exemple, le rejet de tumeur provoqué par les cellules iNKT est plus rapide avec des iNKT prélevés dans le foie qu'avec ceux provenant de la rate ou du thymus.^[17] Les facteurs extrinsèques (ou indépendants) comprennent notamment la présence et la nature des cytokines extracellulaires^[18], le type de CPA^[1,8] et bien sûr la nature du ligand (cf I-3).

Au vu du très grand nombre de facteurs à prendre en compte, il apparait donc très difficile de prédire le profil de réponse des iNKT.

1.3 Réponse immunitaire

Comme évoqué précédemment, les iNKT sont des cellules très versatiles qui ont un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire.^[8] Elles sont capables de sécréter en quelques heures des quantités importantes de cytokines diverses (par exemple IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 et IL-21) ainsi que quelques chimiokines appartenant aux profils de réponse immunitaire Th1, Th2 et Th17.^[8,19]

Le profil de réponse Th1 consiste en la production de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF qui vont exacerber la réponse inflammatoire et activer la réponse immunitaire cellulaire.^[20] La réponse Th2, caractérisée par la production d'IL-4, IL-5, IL10 et IL-13, favorise la réponse immunitaire humorale qui repose principalement sur les lymphocytes B et la production d'anticorps.^[20] Le profil Th17 est quant à lui caractérisé par la sécrétion d'IL-17, IL-21 et IL-22. Il a été démontré récemment qu'il est impliqué dans la défense contre les pathogènes extracellulaires.^[21,22] Cependant, en plus de ces actions protectrices chacun de ces profils peut aussi être associé à des manifestations pathologiques. Des réponses Th1 et Th17 excessives peuvent entraîner des dommages tissulaires et des maladies auto-immunes. De même, le profil de réponse Th2 est impliqué dans les processus allergiques.^[23,24] Puisqu'une cellule iNKT a la capacité de produire constitutivement des cytokines antagonistes, il est possible que deux profils de réponse comme le Th1 et le Th2 se régulent ou se neutralisent, engendrant ainsi une réponse cellulaire parfois nommée Th0.

En dehors de leur activité cytokinique, les iNKT activés ont aussi une fonction cytotoxique directe liée aux perforines, aux granzymes B et à la Fas.^[25]

Le large panel de cytokines produit par les iNKT leur permet d'orchestrer la réponse immunitaire en activant ou diminuant la fonction d'autres cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques, les cellules B et T ou les neutrophiles. Cette influence sur l'immunité innée et acquise fait des iNKT une interface entre ces deux branches du système immunitaire.

1.4 Observations cliniques et ciblage thérapeutique

De part leur grande plasticité de réponse, les iNKT sont associés à de nombreuses pathologies au sein desquelles ils peuvent aussi bien jouer un rôle bénéfique que néfaste. Il a notamment été prouvé que le déficit en cellules iNKT ou leur défaillance fonctionnelle entraîne un défaut dans l'immunité et prédispose le sujet à des maladies auto-immunes (diabète de type 1, lupus...), à certaines infections (tuberculose, maladie de Lyme...) ainsi qu'à des cancers.^[26-28] Cependant, même avec une fonctionnalité normale et en nombre suffisant, les iNKT peuvent induire une réponse immune pathogénique^[27]

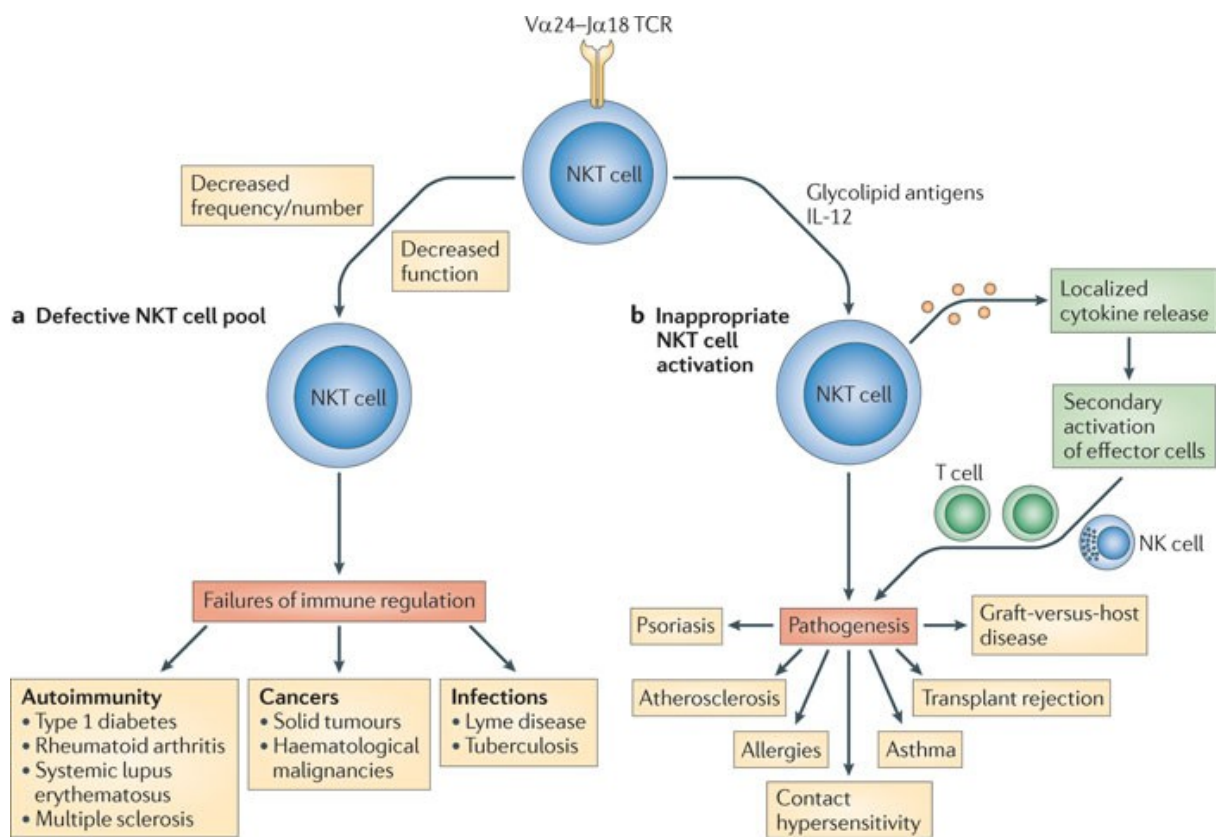


Figure 2 : Implication pathologique des iNKT^[28]

Malgré le très faible taux de iNKT circulant chez l'homme (0.01 à 0.5% des lymphocytes circulants)^[28] et quelques problèmes d'anergie, le développement de ligands capables de moduler la réponse des iNKT pour favoriser un profil de réponse immunitaire Th1 ou Th2 reste très intéressant et ouvrirait de nombreuses opportunités thérapeutiques.

1.4.1 Effet de l'activation vers un profil Th1

Même si plusieurs composés peuvent induire une réponse Th1 plus marquée que l' α -GalCer, ce sont les effets de ce dernier qui ont été les plus étudiés. Il a notamment été montré sur des modèles animaux que s'il était administré suffisamment tôt, il pouvait prévenir la croissance de plusieurs types de tumeurs (hépatique, pulmonaire ...).^[3,29-37] De plus, des essais cliniques menés chez l'homme ont montré qu'une immunothérapie basée sur le KRN7000 semblait être bien tolérée par des patients atteints de cancer ; d'autres essais basés sur l'administration de CPA activées par l' α -GalCer ont été menés, mais en aucun cas le traitement n'a démontré une réelle activité anti-tumorale.^[38-41] La piste la plus intéressante semble être celle de la transfusion autologue des iNKT activés *ex vivo* et dont l'efficacité a été montrée dans une étude récente.^[42] Le KRN7000 a également montré un effet bénéfique dans des pathologies comme la malaria^[43-45], la tuberculose^[46,47], les infections fongiques^[48] et bactériennes^[10,49]. L' α -GalCer et certains de ses dérivés ont également été testés avec

succès comme adjuvant dans différents vaccins contre la malaria^[45,50-52], le HIV-1^[53] ou la grippe.^[54-58]

A contrario, une réponse Th1 excessive va exacerber certaines pathologies comme l'athérosclérose^[59], la drépanocytose^[60] ou des maladies auto-immunes comme le lupus.^[61-63]

1.4.2 Effets de l'activation vers un profil Th2

L'intérêt du profil Th2 réside surtout dans son effet bénéfique sur les maladies auto-immunes.^[64] Il a notamment été montré que la stimulation des iNKT par l'OCH (un analogue à chaîne courte de l' α -GalCer induisant une réponse majoritairement Th2, **2**)^[65-67] induit une protection dans certains modèles d'arthrite induite au collagène.^[68] L'induction d'un profil Th2 a aussi des effets positifs dans le diabète de type 1^[23], le lupus^[61-63] ou certains modèles murins de sclérose multiple type encéphalomyélite auto-immune expérimentale.^[69] Il a aussi été mis en évidence que les cellules iNKT du poumon, ne produisant uniquement qu'un profil de réponse Th2, jouaient un rôle dans le développement de l'asthme allergique. Plusieurs études récentes ont aussi montré que le nombre d'iNKT était augmenté chez les patients souffrant d'asthme.^[70-73]

De façon assez inattendue, des données cliniques chez l'homme ont mis en lumière une nette diminution de l'activité inflammatoire colique chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) compliquée d'une cholangite sclérosante primitive (CSP)^[74-77]. Inversement, le traitement de la CSP par greffe du foie ou immunosuppresseurs est associé à une reprise évolutive de la RCH^[78-81]. Ces constatations suggèrent qu'il existe un effet régulateur et protecteur de l'inflammation hépatique sur l'inflammation intestinale et cet effet serait médié par une réponse Th2 des iNKT déclenchée par l'inflammation hépatique.

2 Structure du complexe CD1d/ligand/TCR

La stimulation des lymphocytes iNKT par des ligands de structure chimique proche peut donc engendrer des réponses biologiques totalement différentes. L' α -GalCer et l'OCH en sont une parfaite illustration. Ils ne se différencient que par la longueur de leur chaîne sphingosine, réduite de 13 (α -GalCer) à 5 carbones (OCH) et induisent pourtant des profils de réponse respectivement Th1 et Th2.

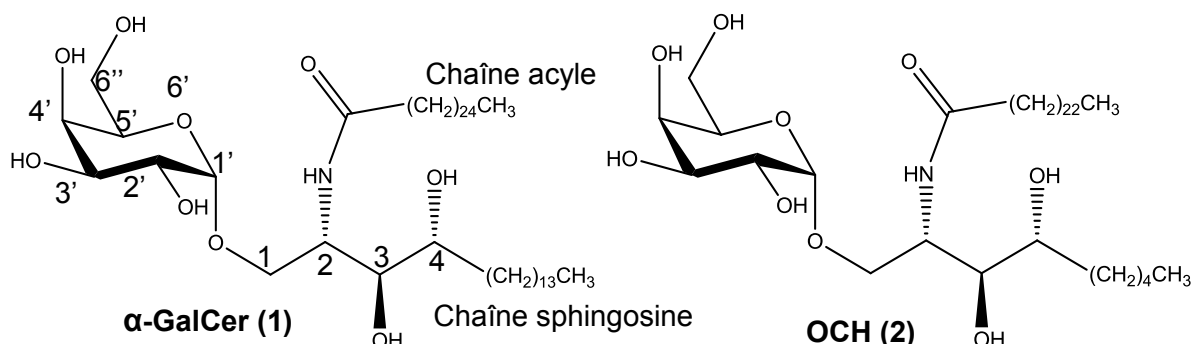


Figure 3 : Structure et numérotation de l' α -GalCer (gauche) et de l'OCH (droite)

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence d'activité, comme la différence de solubilité, la facilité de l'internalisation des ligands. La différence de stabilité globale entre les complexes CD1d/ligand/TCR avec des composés Th1 et Th2 reste l'hypothèse la plus évoquée. Les complexes les moins stables, c'est-à-dire à temps de vie court, sont supposés favoriser une réponse Th2 alors que les complexes plus stables, donc à dissociation plus lente, orienteraient vers une réponse Th1. Bien que toujours soumise à controverse^[82], des études récentes^[83,84] soutiennent cette hypothèse. Bien connaître la nature et la structure des différents éléments de ce complexe ternaire et leurs interactions semble donc être inéluctable pour comprendre la sélectivité Th1/Th2. Nous nous intéresserons donc dans un premier temps aux récepteurs CD1d et TCR dans leur globalité avant de nous concentrer sur l'interface protéine-protéine du complexe CD1d/ligand/TCR.

2.1 Le récepteur CD1d

2.1.1 La famille de récepteurs CD1

Les glycoprotéines de la famille CD1 ont toutes pour rôle de présenter des antigènes exogènes ou endogènes afin de permettre leur reconnaissance par les TCR. Les récepteurs CD1 sont tous apparentés au CMH de classe I et composés d'une chaîne α à trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) associée de façon non covalente à la $\beta 2$ -microglobuline. Celle-ci est indispensable à leur cohérence structurale.^[85] Chez l'homme, il existe cinq isoformes du CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e) alors que chez la souris seule l'isoforme CD1d est exprimée.^[86] Ces cinq récepteurs diffèrent par leur localisation cellulaire et les ligands qu'ils présentent. Les protéines CD1a à CD1d sont transmembranaires et exprimées au niveau de la membrane cellulaire. Elles présentent des ligands de type lipidique. CD1e semble exister sous forme soluble et est supposée agir comme une protéine chaperonne, en intracellulaire, pour faciliter la circulation des lipides.^[87-92]

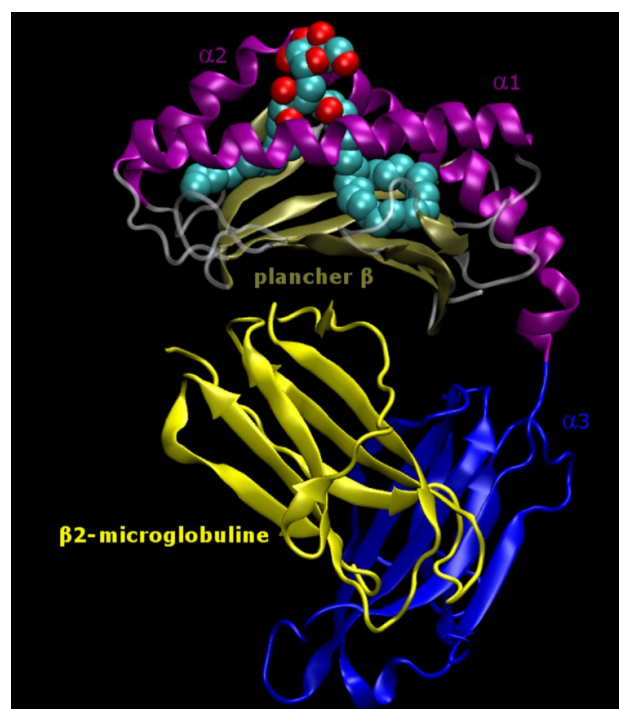


Figure 4 : Le CD1d (référence PDB 2PO6)^[93], exemple de la structure d'un récepteur CD1

La structure globale du site de liaison du lipide est toujours la même : deux hélices α , nommées $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont situées à l'entrée de la poche. Elles accommodent la tête polaire de l'antigène pour faciliter sa reconnaissance par le TCR. La partie hydrophobe du ligand repose sur un plancher de huit feuillets β , lui-même en contact direct avec la $\beta 2$ -microglobuline.^[93-99] (Figure 4) Le domaine $\alpha 3$ n'est pas en contact avec le lipide et interagit exclusivement avec la $\beta 2$ -microglobuline. Bien que toutes ces cavités soient assez volumineuses pour accueillir des lipides, la spécificité de chaque isoforme pour des ligands donnés (Figure 6) semble être due à la localisation des récepteurs, mais aussi à l'anatomie du domaine de liaison au lipide et de ses sous cavités A' et F'.^[100] (Figure 5)

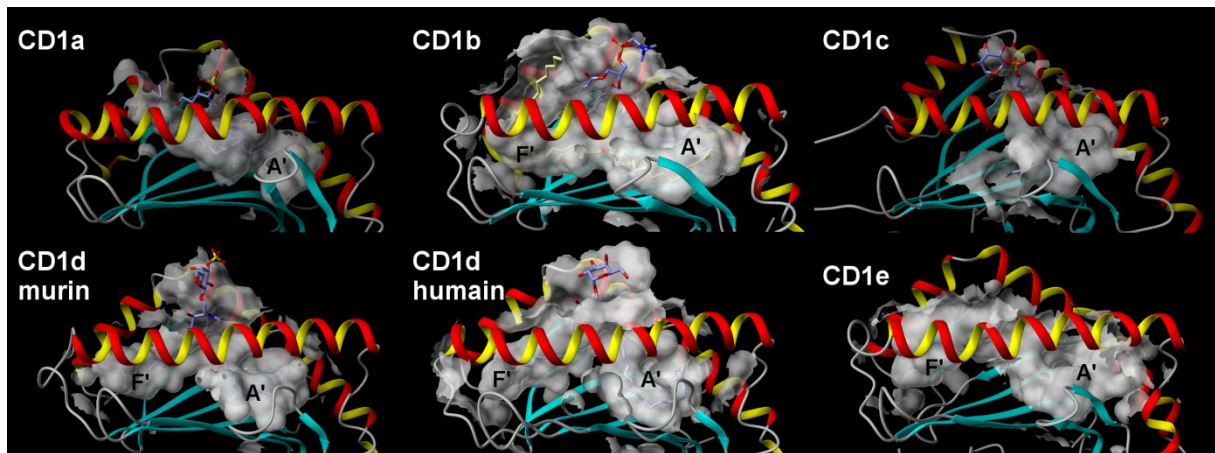


Figure 5 : Forme et volume des sites de liaison des différents récepteurs CD1 (références PDB 1ONQ, 2H26, 3OV6, 2AKR, 2PO6 et 3S6C)

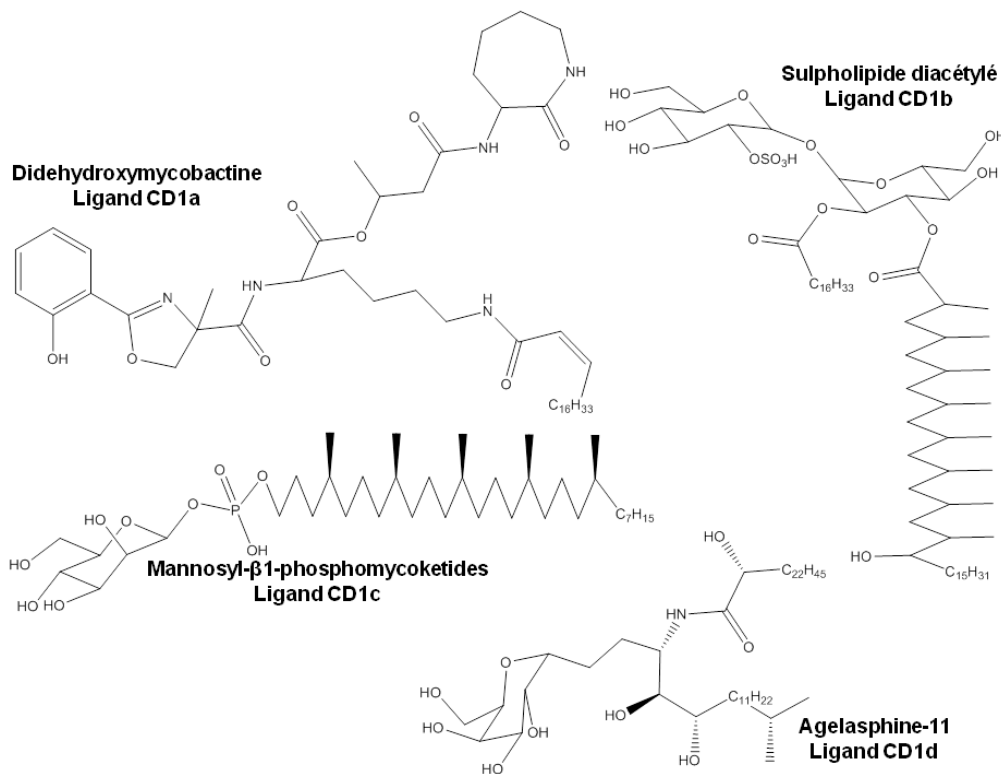


Figure 6 : Exemple d'antigènes présentés par les récepteurs CD1^[101-104]

En tant que glycoprotéines, les récepteurs CD1 sont soumis à une glycosylation post-traductionnelle. Elle consiste en l'addition d'oligosaccharides (ou chaînes glycanes) sur les asparagines incluses dans un motif Asn-X-Thr/Ser. De façon générale, la glycosylation peut être impliquée dans différents processus comme le repliement protéique, le transport vers la surface cellulaire, l'orientation membranaire, la liaison de ligands. Les différentes cristallographies des récepteurs CD1 montrent la présence d'une (CD1c et CD1e) à 3 chaînes glycanes (CD1a, CD1d murin) à des emplacements relativement similaires. (Figure 7)^[93,95-99]

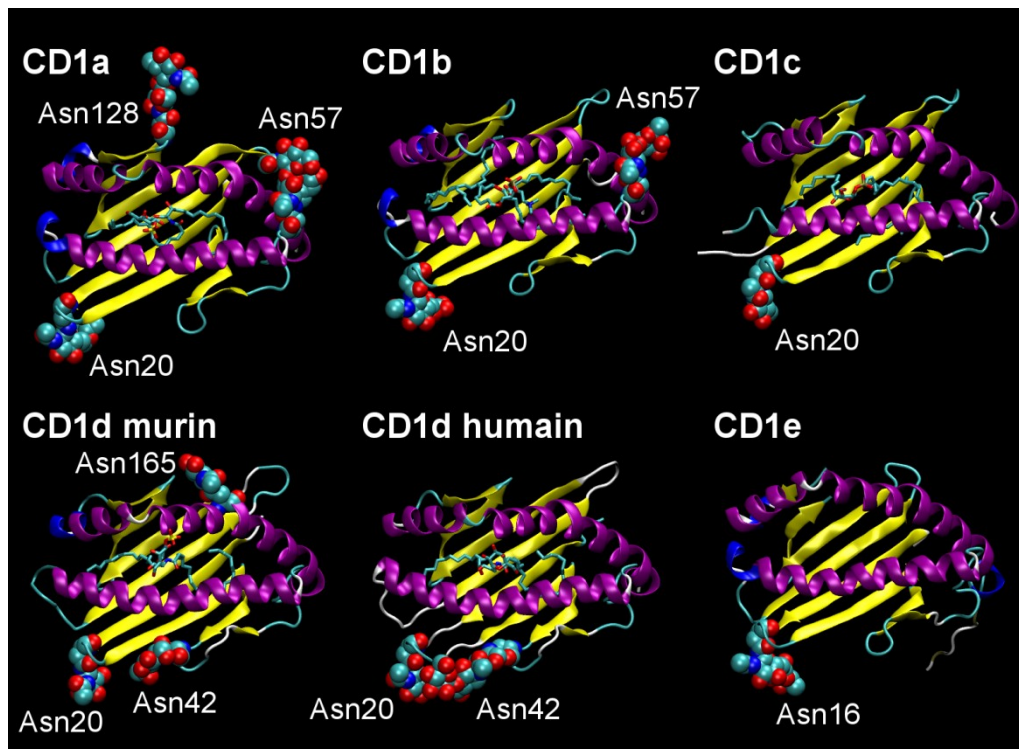


Figure 7 : Sites de glycosylation confirmés par cristallographie pour les différents récepteurs CD1

2.2 Spécificités de l'isoforme CD1d

Le récepteur CD1d est exprimé par la majorité des cellules hématopoïétiques des organes lymphoïdes primaires et secondaires ainsi que dans un nombre restreint de types cellulaires parmi lesquels les thymocytes, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles et les kératinocytes. De plus, dans l'intestin, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B expriment CD1d.^[105] Le niveau d'expression varie en fonction du type cellulaire et peut être modulé au cours d'infections ou en réponse à des cytokines. La molécule CD1d est indispensable à la fois à la sélection et la maturation des cellules iNKT, mais également, comme décrit précédemment, dans les différents processus immuns (réponse aux pathogènes, régulation inflammatoire...). Le chargement de l'antigène dans le CD1d se fait très peu à la surface cellulaire mais est plutôt réalisé en milieu intracellulaire via un mécanisme de recyclage complexe.

Les isoformes CD1d murines et humaines possèdent respectivement 5 et 4 sites de glycosylation potentiels dont 4 sont communs.(Figure 8) Seul 3 de ces sites ont pu être

clairement identifiés par cristallographie sur le CD1d murin (Asn20, Asn42 et Asn165) et 2 sur le CD1d humain (Asn20 et Asn42). Sriram *et al.* ont étudié en détail l'impact de ces chaînes glycanes sur l'expression et la fonctionnalité du CD1d murin. Il semble que ces dernières jouent un rôle majeur dans la biosynthèse et l'expression du récepteur puisque la modulation du nombre de sites de glycosylation influe sur le taux d'expression du récepteur. La version non glycosylée n'est pas du tout exprimée. Les auteurs relèvent aussi un impact sur la capacité du CD1d à activer les cellules iNKT. Cependant, il est possible que ce phénomène soit une conséquence de la variation du taux d'expression. De plus, une autre étude a montré qu'un récepteur CD1d recombinant produit *in vitro* par *Escherichia coli*, et donc non glycosylé, pouvait être reconnu par des iNKT humains et murins.^[106] Les protéines CD1 sont très conservées au cours de l'évolution, d'où une forte réactivité croisée inter-espèce.^[86] Les récepteurs CD1d humain et murin ont par exemple une homologie de séquence de 78,1% et une identité de 61,1%. (Figure 8)

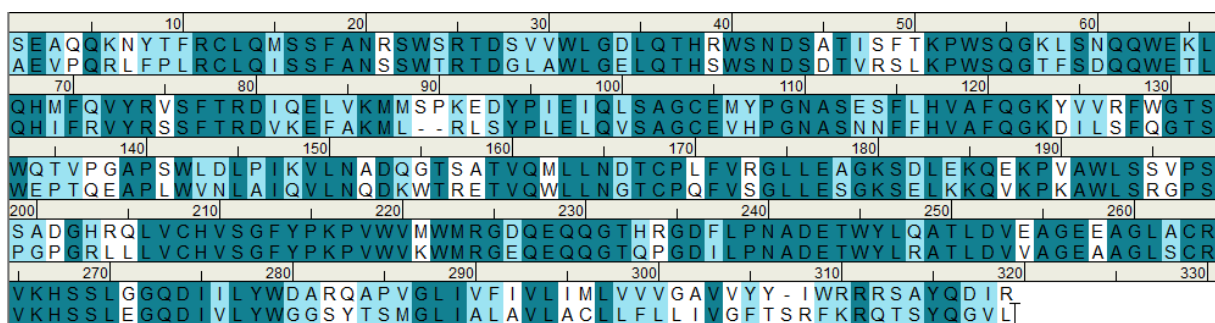


Figure 8 : Alignement des séquences des CD1d murins (au dessus) et humains (en dessous).

Le degré de conservation des acides aminés alignés est croissant selon un dégradé de couleur, du plus clair au plus foncé.

2.3 Le récepteur des cellules T

Comme évoqué dans la partie I-1.1, un TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β obtenues par recombinaison somatique de plusieurs *loci* génétiques. La chaîne β est divisée en plusieurs segments : V (variable), D (diversité), J (jonction) et C (constant) alors que la chaîne α ne comporte que les segments V, J et C. Les *loci* correspondants aux segments V, D et J sont très nombreux et c'est leur recombinaison qui va donner sa variabilité au TCR.^[107] (Figure 9)

Dans le cas particulier des iNKT, le répertoire de TCR présenté est restreint. La chaîne α est toujours composée des sous domaines Va24 (Va14 chez la souris) et Ja18 chez l'homme, alors que la chaîne β a une composition variable mais présente une diversité limitée (V β 8.2, V β 7, et V β 2 chez la souris et V β 11 chez l'homme).^[2]

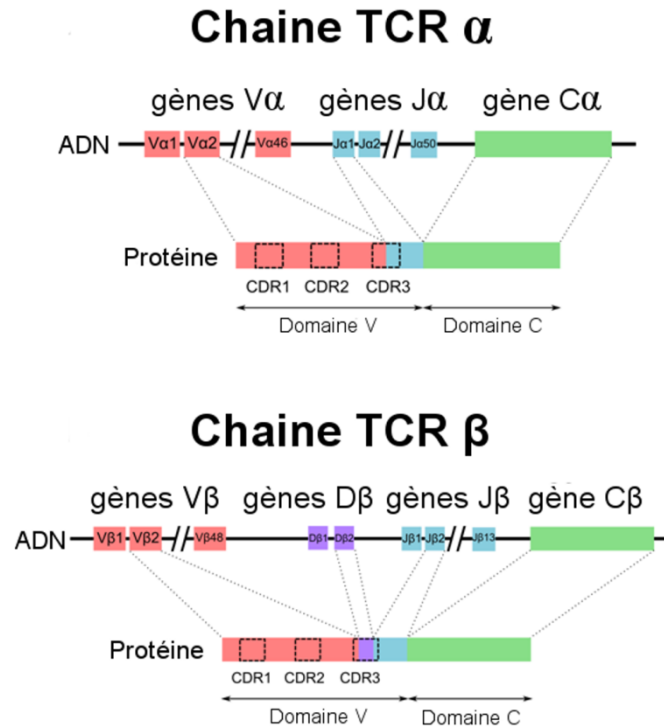


Figure 9 : Recombinaison génétique des domaines variables des TCR

Le TCR interagit avec la surface du récepteur CD1d et le ligand via l'extrémité de son domaine variable, ou paratope, et plus particulièrement via trois zones appelées CDR (Complementarity Determining Region). Ces CDR correspondent à des portions de séquence hypervariables des chaînes V. Dans le cas des iNKT, les segments CDR1 et CDR2 sont de composition connue car la chaîne V est de nature constante. Cependant, la CDR3 se situe à la jonction des chaînes V α -J α (CDR α) ou V β -D β -J β (CDR β) et est donc sujette à une certaine diversité.

2.4 L'interface CD1d/ligand/TCR

Comme mentionné précédemment, l'antigène doit être présenté au TCR par le récepteur CD1d pour obtenir une réponse biologique. Cette présentation implique la formation consécutive de deux complexes. D'abord, un complexe binaire CD1d/ligand puis un complexe ternaire avec leur présentation au TCR. Plusieurs structures des complexes binaire ou ternaire, humain ou murin, ont été résolues par cristallographie aux rayons X et permettent l'étude détaillée des interactions entre les différents protagonistes.^[93,108–123] Nous utiliserons par la suite la numérotation des acides aminés du récepteur humain et celle de la souris sera précisée entre parenthèse si elle diffère.

En ce qui concerne le complexe binaire CD1d/ α -GalCer (Figure 10), la majorité des interactions entre le CD1d et le ligand sont de nature hydrophobe, les chaînes acyles et sphingosines venant se placer respectivement dans les poches A' et F'. Il n'y a que 3 acides aminés du CD1d engagés dans une liaison hydrogène avec l' α -GalCer (Asp151 (Asp153), Asp80 et Thr154 (Thr156)), mais comme il le sera discuté dans la partie I-3, ces derniers

semblent avoir une grande importance sur l'activité et la sélectivité de la réponse biologique. Il y a peu de différences entre les CD1d humains et murins au niveau du site de liaison du ligand, mais la présence du Trp153 (Gly155) en contact direct avec la partie galactose de l' α -GalCer est à noter. (Figure 10) Ce tryptophane est suspecté de jouer un rôle dans le processus de chargement des lipides extracellulaire.

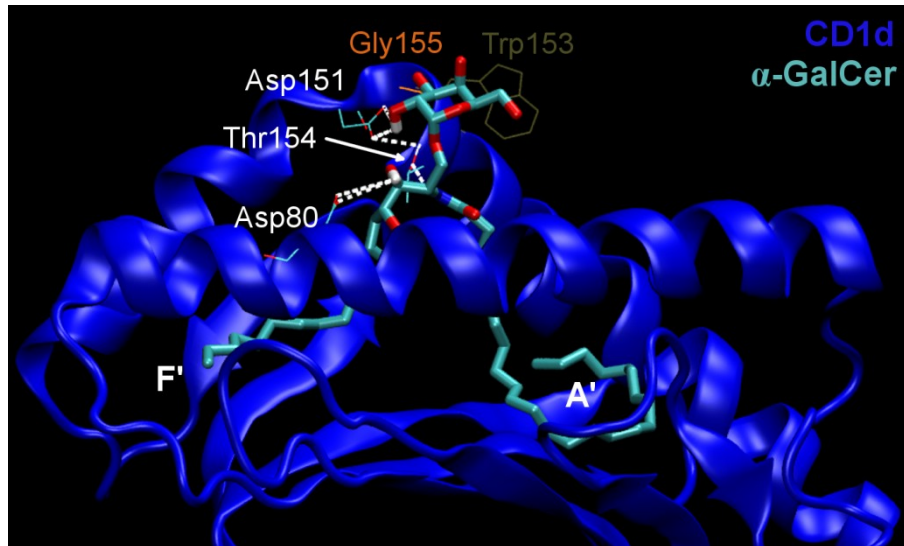


Figure 10 : Complexe binaire CD1d/ α -GalCer humain

Dans la structure du complexe ternaire (CD1d/ α -GalCer/TCR), les interactions directes CD1d/TCR sont majoritaires ; elles impliquent 3 des 6 CDR du TCR alors que les interactions α -GalCer/TCR sont plus rares. (Figure 11) La boucle CDR1 α interagit uniquement avec les hydroxyles 3' et 4' du ligand tandis que la CDR3 α , qui est l'élément d'interaction majeur, est en contact avec l' α -GalCer et les hélices α 1 et α 2 du CD1d. CDR2 β et CDR 3 β n'interagissent que faiblement avec les hélices α 1 et α 2 respectivement. En se basant sur les résultats d'une étude de mutagenèse dirigée^[124], Nadas *et al*^[125] ont réalisé une étude de Relation Structure-Activité (RSA) sur le complexe ternaire CD1d/ α -GalCer/TCR. Ils ont montré que l'absence de l'Asp80 (CD1d), de l'Arg95 (TCR), du Glu83 (TCR) ou du 3-OH de la chaîne sphingosine est délétère pour l'affinité du TCR. Il semble donc que l'orientation relative du récepteur CD1d et du TCR soit un élément crucial. Un positionnement strict doit être respecté pour que les interactions nécessaires à la reconnaissance de l'antigène, et donc à l'activation des iNKT, puissent se former.^[93,126]

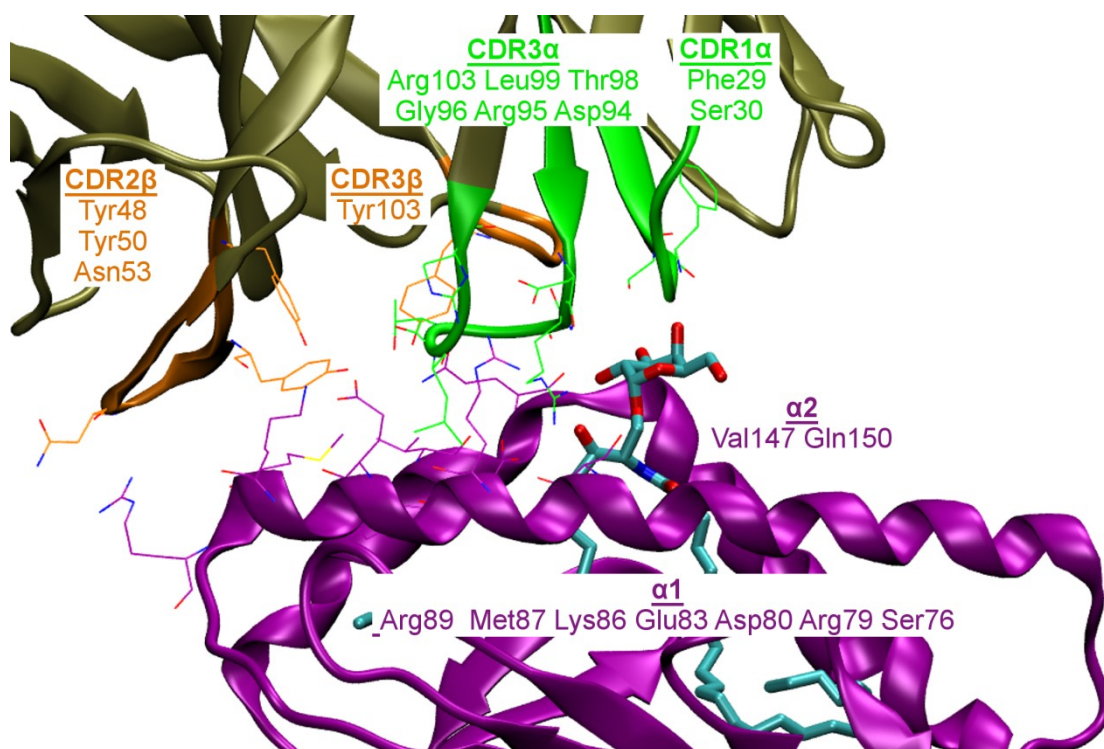


Figure 11 : Interface CD1d-TCR du complexe ternaire humain chargé avec l' α -GalCer (Référence PDB 2PO6)

3 Relations structure-activité des modulateurs connus des iNKT

Moduler la structure du ligand présenté aux iNKT est un moyen simple et efficace d'influencer la réponse immunitaire. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier les RSA des différents modulateurs des iNKT, afin de connaître les facteurs structuraux sous-jacents de cette régulation et de trouver des éléments clés pouvant aider à la conception d'activateurs sélectifs Th1 ou Th2.

L' α -GalCer est le premier ligand synthétique des iNKT et induit une forte réponse Th1.^[127] La quasi-totalité des activateurs des iNKT décrits par la suite, qu'ils induisent un profil de réponse Th1 ou Th2, sont des dérivés de ce composé.^[128-130] Toutes ces molécules ont été obtenues en modulant au moins l'un des 4 grands fragments utilisés pour décrire l' α -GalCer : la partie sucre (ou « tête polaire »), le lien osidique, la partie polaire et les chaînes lipidiques. (Figure 12) Dans cette partie nous allons récapituler les différentes modulations qui ont été réalisées sur ces fragments en prêtant une attention particulière à leur impact sur la sélectivité Th1/Th2.

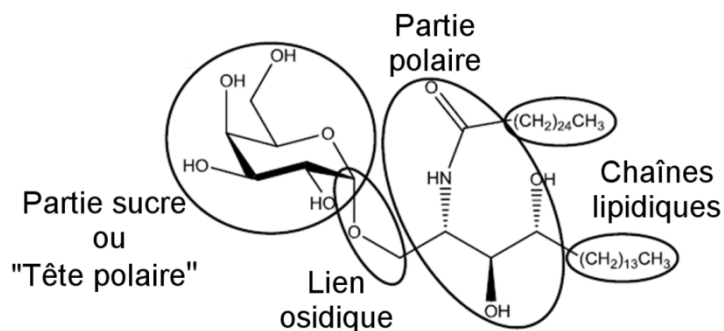


Figure 12 : Fragments communément modifiés dans les dérivés de l' α -GalCer

3.1 Analogues du galactose

Une des premières modulations réalisées sur le KRN7000 a été le remplacement l' α -D-galactopyranose par des mono et disaccharides. Il apparaît que parmi les α -D-glycosides seul l' α -D-glucose et l' α -D-fucose (Figure 13) sont des modulateurs des cellules iNKT.^[131–133] Dans tous les cas, il semble que les séries pyranoses donnent de meilleurs résultats que les séries furanoses. L'orientation des hydroxyles en position 2' et 4' est le seul point commun entre l' α -D-glucose et l' α -D-galactose, indiquant que ces configurations sont importantes pour l'activation des iNKT et optimales dans l' α -GalCer.

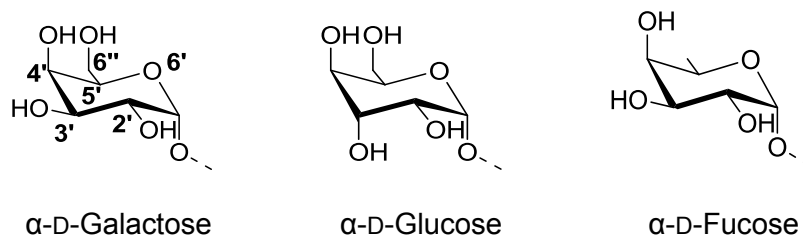


Figure 13 : Saccharides capables de remplacer efficacement le galactose

Même s'il a été récemment prouvé qu'un des ligands endogènes humains des iNKT est le β -D-glucopyranosylcéramide (**3**, Figure 15), tous les ligands synthétiques précédant cette découverte montrent que les composés présentant une anomérie α induisent une réponse cellulaire beaucoup plus forte.^[134,135]

Le remplacement des groupements hydroxyle du galactose par divers groupes fonctionnels, ont permis quelques observations intéressantes^[69,136–140] La suppression ou la modification de la position 2' (cf annexe A Table S1) induit une perte totale d'activité.^[69,137,138] Ceci est cohérent avec les observations tirées de la structure cristallographique du complexe humain CD1d/ α -GalCer/TCR, le groupe OH sur cette position étant en contact direct avec le TCR. Il interagit en temps que donneur et accepteur de liaisons hydrogène respectivement avec l'Asp151 (Asp153) du CD1d et la Gly96 du TCR. Les modulations effectuées sur la position 3' sont un peu moins critiques (cf annexe A Table S1), elles réduisent significativement la réponse immune sans la supprimer.^[136,141] Seul le composé **4** (sulfatide)^[10,140,142] qui possède un groupement sulfone en position 3' induit une réponse cytokinique du même ordre de grandeur que celle du KRN7000. Ce composé **4** se lie fortement au CD1d, à tel point qu'il

inhibe de façon compétitive la présentation de l' α -GalCer.^[143] La position 4' quant à elle semble la moins sensible, acceptant une large gamme de substituants et ce, avec un faible impact sur l'activité (cf annexe A Table S1).^[136,141] Les composés Ar2-GSL (**5**) et Ar3-GSL (**6**), développés par Zhang *et al.*, présentent des groupements benzyle sur cette position et s'avèrent particulièrement intéressants.^[144] Ces deux molécules induisent un relargage massif d'IFN- γ , l'Ar3-GSL montre cependant une sécrétion d'IL-4 plus forte que pour le KRN7000. En se basant sur une dynamique moléculaire de 200ps, les auteurs ont suggéré une explication à ce phénomène. Le *linker* de 2 carbones du composé **5** permet d'engager une liaison π - π avec la Phe51 du TCR, ce qui est impossible avec le *linker* de 3 carbones du composé **6**. Ils ont aussi relevé une légère déviation du TCR qui va modifier son interaction avec le CD1d, ce qui pourrait également expliquer l'activité opposée de ces deux molécules.

Plusieurs disaccharides ont été testés en remplacement du galactose. (cf annexe A Table S1) Mis à part les quelques composés où une dégradation de ces groupements mène *in fine* à un monosaccharide, seul l' α -Gal(1 \rightarrow 6) α -GalCer (**7**), substitué en 6'', est aussi efficace que l' α -GalCer.^[131,145-148] Ceci suggère que la position 6'' peut être modulée sans détériorer l'activité. Il existe un très grand nombre d'analogues du KRN7000 présentant divers substituants sur cette position. (cf annexe A Table S1) Ces derniers vont du méthoxy (RCAI61, **8**)^[149] jusqu'à des groupements beaucoup plus volumineux comme les groupements urée ou amide des composés **9** (Nu- α -GalCer) et **10**.^[150,151] Ces deux dernières molécules montrent un biais Th1 plus prononcé encore que l' α -GalCer. Pour le composé **9**, les données cristallographiques indiquent que le *linker* de type urée facilite l'interaction du groupe naphthyle avec les résidus Met69 (Ile69 chez l'homme) et Thr159 (Thr157 chez l'homme) qui forment une petite poche entre les hélices α 1 et α 2 du CD1d murin.^[115]

La position 6'' est exposée au solvant, l'ajout de groupements très volumineux ou de très longues chaînes peut donc être envisagé. Cette particularité a été exploitée par Jervis *et al.* qui ont synthétisé des composés avec des chaînes polyéthylène glycol ainsi que des homodimères de KRN7000.^[152] Des labels fluorophores ont également été introduits sur cette position.^[153,154] Les dimères de KRN7000 ont une activité équivalente aux monomères pour les chaînes les plus longues. Pour chaque dimère, le monomère lié à une chaîne de polyéthylène glycol de longueur équivalente a été synthétisé et montre systématiquement une activité identique. La bivalence de ces ligands n'apporte donc aucune synergie *in vitro*. *A contrario*, les composés substitués en 6'' par des triazoles (cf annexe A Table S1) induisent une réponse Th2 légèrement plus marquée que celle de l' α -GalCer. Ces résultats inattendus ont été obtenus dans des modèles murins *in vivo*.^[155,156] Cette conclusion pourrait être remise en question dans un modèle humain en raison de la présence du Trp153 (Gly155) à côté de la tête polaire et qui pourrait induire une interaction π - π supplémentaire. (Figure 10) Tashiro *et al.* ont également envisagé plusieurs analogues présentant des carbasucres ou des dérivés du cyclitol.^[157] La plupart des carbasucres, et surtout les composés **11** (RCAI56, α -Carba-GalCer)^[158,159] et **12** (RCAI92), produisent un profil de réponse Th1 significativement renforcé. Les analogues type inositol (**13**) sont quant à eux mal reconnus et biologiquement inactifs, sauf s'ils sont substitués en 6'' avec un groupement sulfone (**14**). Ils ont alors une faible activité immunostimulante. Les dérivés type 6' déoxy-inositol (cf annexe A Table S1), comme le RCAI59 (**15**)^[157], restent de puissants activateurs des iNKT, ce qui montre que la substitution de la position 6' réduit drastiquement l'activité. Des composés avec des têtes polaires non cycliques, comme le thréitolcéramide (ThCer, **16**)^[160] ou son dérivé (**17**)^[161], peuvent eux aussi activer les cellules iNKT. Tous ces composés induisent une réponse type

Th1, certes plus faible que celle du KRN7000, mais aussi une moins grande anergie des cellules dendritiques. L'arabinitolcéramide est moins actif que le thréitolcéramide tandis que le glycérolcéramide est complètement inactif sur cellule murine et quasi-inactif sur cellule humaine (Figure 14). De ce fait, on peut supposer que 3 des 4 liaisons hydrogène formées par le fragment galactose de l' α -GalCer, et observées dans la structure cristallographique du complexe ternaire humain (PDB 2PO6), sont essentielles à l'activité biologique. Ces liaisons hydrogènes sont établies par la Gly96 (TCR), la Ser30 (TCR) et l'Asp151 (Asp153) avec les hydroxyles en position 2' et 3'. En cohérence avec les variations d'activités obtenues lorsque ces positions sont substituées.

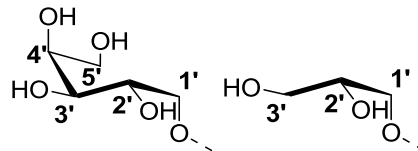


Figure 14 : Fragments arabinitol (gauche) et glycérol (droite)

Parmi toutes les variations décrites (Figure 15 et 16 et annexe A Table S1), peu d'entre elles permettent d'obtenir une réponse Th2, même modeste. Il est donc probable que la tête polaire du ligand soit principalement impliquée dans la reconnaissance du TCR et très peu dans la sélectivité de la réponse immune.

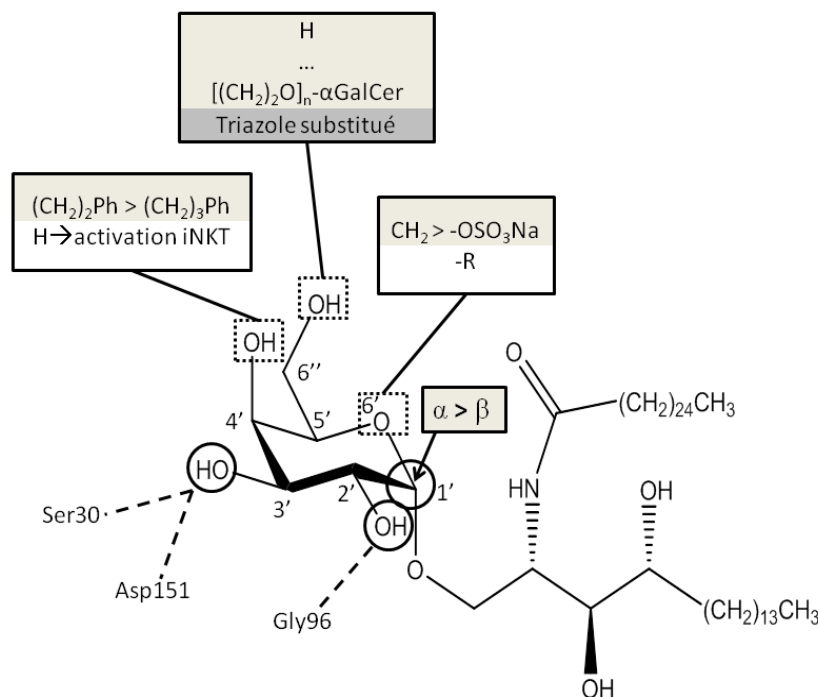


Figure 15 : Points de modulation clés de la partie sucre et leur impact

La couleur de fond indique le profil induit par la modulation : le gris clair pour le Th2, le gris foncé pour le Th1 et le blanc pour la perte ou la chute drastique d'activité.

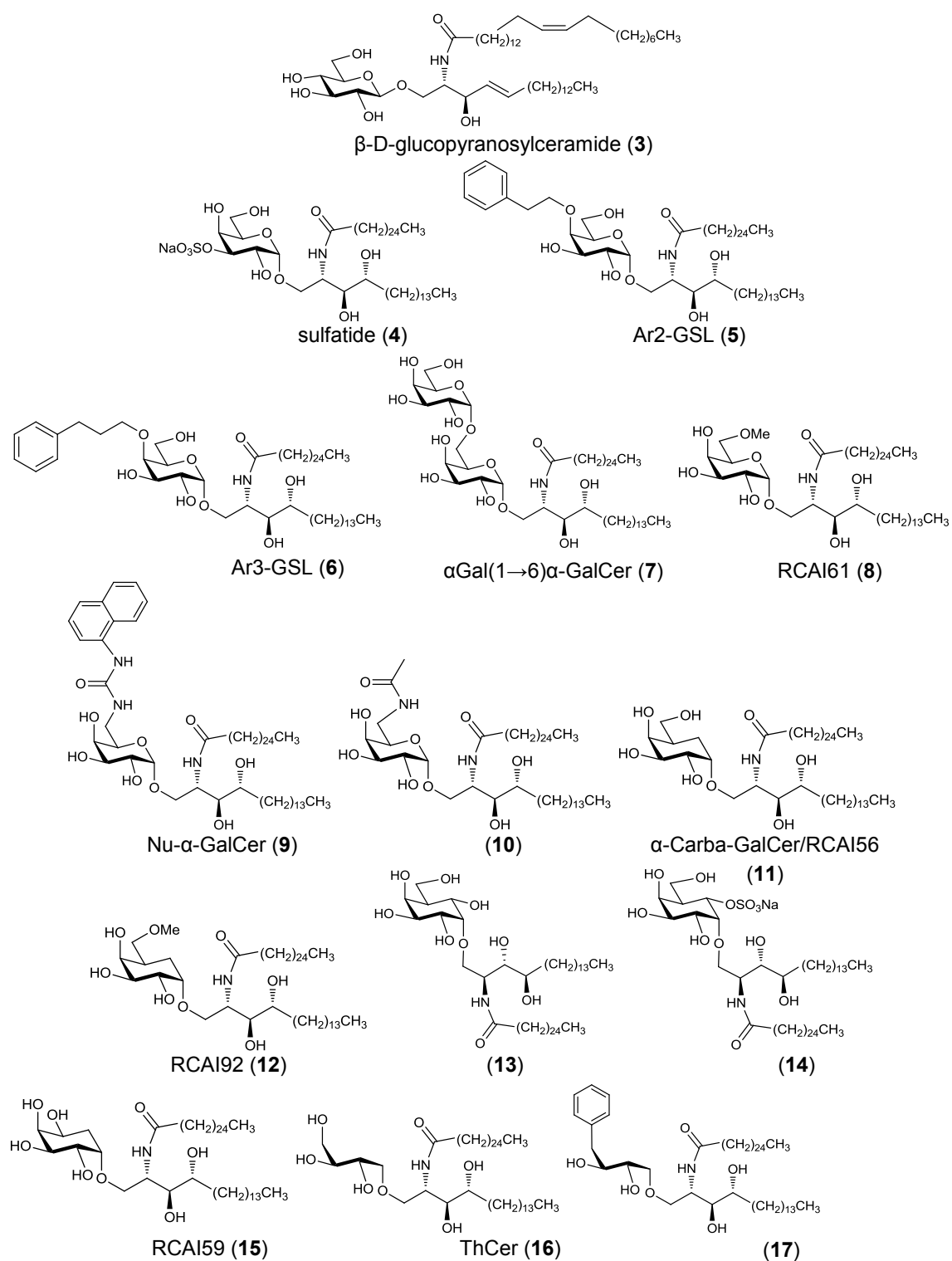
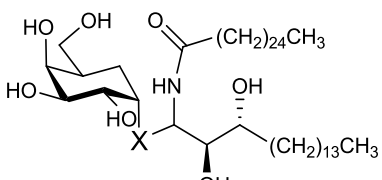


Figure 16 : Composés de référence présentant des modulations de la tête polaire

3.2 Modification du lien osidique

Le composé **18** (α -C-GalCer) est l'analogue C-glycoside de l' α -GalCer. L'objectif de cette modulation était de remplacer la liaison acétal de l' α -GalCer par une liaison éther plus stable, afin de réduire la dégradation enzymatique par les glucosidases *in vivo*.^[50,162] Le résultat est assez inattendu. Chez la souris, ce composé induit une production d'IFN- γ plus durable et plus importante que l' α -GalCer alors qu'il est inactif vis-à-vis des iNKT humains.^[163-165] Deux hypothèses ont été proposées par les auteurs pour expliquer cette sélectivité. La première suggère que le remplacement de l'oxygène par le groupe méthylène induit une légère torsion de la tête polaire, qui faciliterait la reconnaissance par le TCR murin et serait défavorable à celle du TCR humain. La seconde est que la perturbation stérique induite par la substitution pourrait être assez forte pour modifier la structure du CD1d, remodelant la surface d'interaction CD1d-TCR en faveur de la reconnaissance du TCR murin. *A contrario*, l' α -S-GalCer (**19**) proposé par Dere *et al.*^[166] est totalement inactif sur les iNKT murins et a été rapporté comme induisant chez l'homme, soit une faible réponse Th2^[167], soit une réponse Th1 équivalente à celle du KRN7000.^[168] Banchet-Cadeddu *et al.* avancent que le remplacement d'une liaison C-O (142 pm) par une liaison C-S (182 pm) pourrait induire un déplacement de la tête polaire qui favoriserait cette fois la reconnaissance du TCR humain. Harrak *et al.* ont décrit les composés HS161 (**20**)^[169] et HS44 (**21**)^[170] qui sont respectivement des analogues de l' α -Carba-GalCer et du 6'-déoxy-inositol avec une amine au niveau du lien osidique. Le composé **20** semble produire une quantité d'IFN- γ comparable à celle du KRN7000 alors que le **21** induit une réponse plus faible mais Th2.^[111]

Dans une autre approche, Chen *et al.* ont rigidifié la liaison osidique en introduisant une double liaison.^[171] Il apparaît que la configuration E (**22**) induit une réponse Th1 plus intense qu'avec l' α -GalCer mais moins qu'avec le composé **18**. L'analogue Z associé (**23**) est, quant à lui, totalement inactif. Les structures cristallographiques permettent de constater que la configuration naturelle du lien osidique est proche de la configuration E. Le composé **23** serait donc incapable de s'insérer dans le CD1d à cause des contraintes stériques.



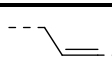
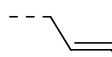
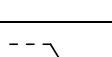
N°	X	Activité	Réf.
25		Inactif ^m	[171]
26			
27			

Table 2 : Modifications du lien osidique

^m testé sur cellules murines

La même équipe a synthétisé un analogue type oxime du KRN7000 (**24**)^[172] qui, comme les autres analogues présentant un lien osidique rallongé (**25-27**, Table 2)^[171], est complètement inactif. Il apparaît donc qu'un lien glycosidique de 2 carbones est le maximum pour conserver une activité. A l'inverse, le composé **28**, qui est un analogue présentant un lien glycosidique tronqué à 1 seul carbone, induit une faible réponse Th1.^[173,174] Ainsi, le lien osidique a un effet sur la force de la réponse mais est aussi un des points clés de la spécificité Th1/Th2. (Figure 17 et 18)

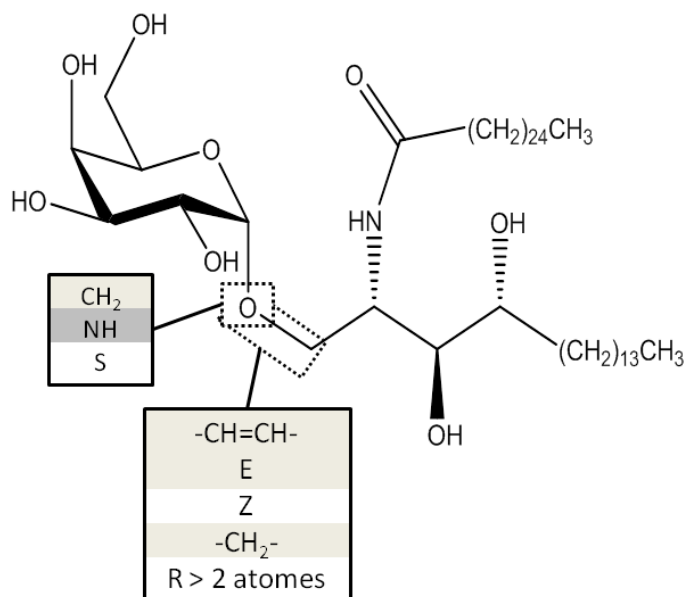


Figure 17: Points de modulation clés du lien osidique et leur impact

La couleur de fond indique le profil induit par la modulation : le gris clair pour le Th2, le gris foncé pour le Th1 et le blanc pour la perte ou la chute drastique d'activité.

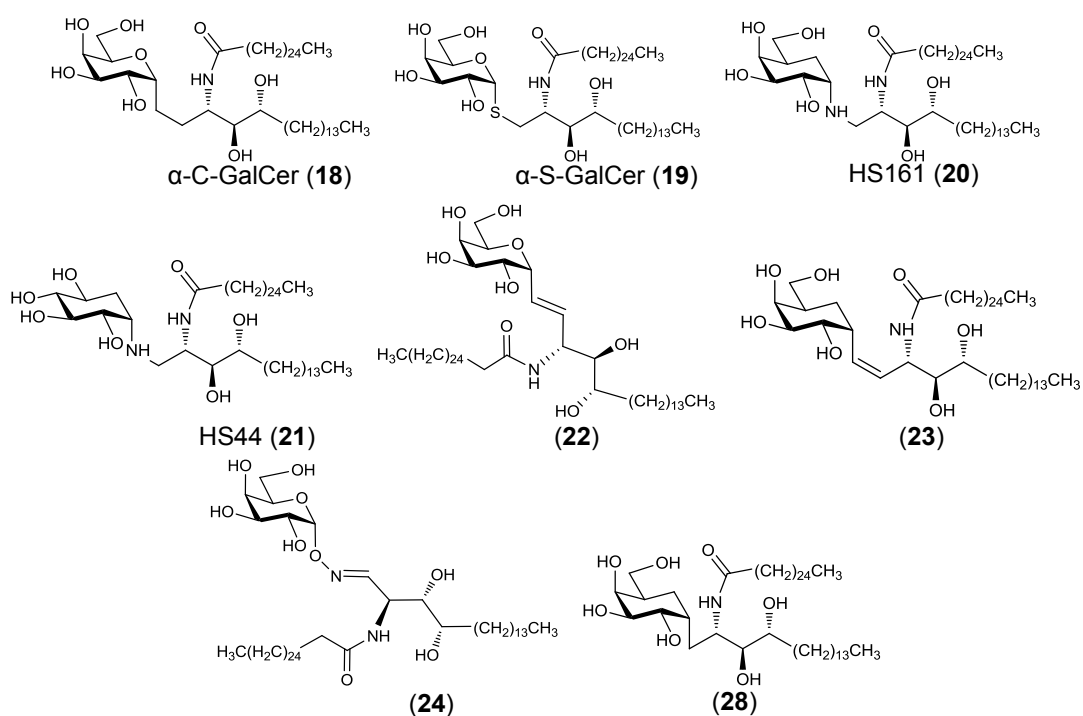


Figure 18 : Composés de référence présentant une modulation du lien osidique

3.3 Impact de la partie polaire

3.3.1 Variations autour de la partie sphingosine

Les pharmacomodulations effectuées sur le diol de la sphingosine ont mis en avant son importance dans l'activation des cellules iNKT. L'activité chute drastiquement si les hydroxyles en position 3 et 4 sont supprimés (**29**).^[69,127] Cependant le même composé avec seulement l'hydroxyle en position 3 (**30**) montre une activité équivalente à celle de l' α -GalCer.^[66,127,175] Les analogues type 3-déoxy (**31**) sont eux aussi actifs mais induisent une réponse Th1 moins importante.^[176] Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'hydroxyle en position 3 est engagé dans une liaison hydrogène avec l'Arg95 du TCR dans le complexe CD1d/ α -GalCer/TCR humain. De plus, le modèle de *docking* de Baek *et al.* montre que l'hydroxyle en position 4 compenserait la perte du groupe 3-OH, et donc celle de l'interaction avec l'Arg95, en renforçant son interaction avec le CD1d. La perte de cette liaison forte entre le ligand et le TCR pourrait légèrement réduire la stabilité du complexe et expliquer la faible réponse Th1 obtenue. Le composé 3,4-déoxy décrit par Park *et al.*^[177] (**32**) fait exception et montre une faible activité Th2. Ce qui amène à penser que dans ce cas le groupement phényle présent à l'extrémité de la chaîne acyle écourtée est impliqué dans des interactions aromatiques qui faciliteraient la liaison du ligand et sa présentation. Cependant, le défaut de liaison hydrogène pourrait induire une faible stabilité du complexe ternaire et expliquerait la réponse Th2 obtenue.

L'étude menée par Trappeniers *et al.*^[178] révèle que les dérivés 3-amino (**33**, **34**) sont inactifs alors que les dérivés 4-amino (**35**, **36**) provoquent une faible réponse Th1, indépendamment de la configuration de la fonction amine. Dans les deux premiers dérivés, l'introduction d'un groupement amine chargé positivement et proche de l'Arg95 pourrait induire une forte répulsion électrostatique, délétère à la reconnaissance par le TCR. *A contrario*, ce même groupe chargé peut renforcer l'interaction CD1d-ligand en interagissant avec les acides aminés polaires ou chargés négativement à proximité, comme l'Asp80 ou la Ser76. Ceci serait en accord avec l'affinité accrue de ces dérivés pour le CD1d.

La configuration absolue des différents substituants du fragment sphingosine du KRN7000 sont les mêmes que ceux de la chaîne phytosphingosine naturelle, à savoir 2*S*, 3*S* et 4*R*. L'inversion de la configuration de l'hydroxyle en position 3 (**37**, **38**) réduit la force de la réponse Th1 alors que l'analogue type 4*S* (**39**) montre une activité similaire à celle de l' α -GalCer. Les changements les plus drastiques sont observés avec la position 2. Tous les épimères avec une configuration 2*R* (**40-43**) n'induisent qu'une très faible production cytokinique.^[179,180] Il apparaît donc que le stéréoisomère 2*S*, 3*S*, 4*R* correspondant à l' α -GalCer est le plus efficace. La configuration absolue de la position 2 semble plus critique que celle de la position 3, alors que celle de la position 4 a relativement peu d'impact. Il est à noter que les dérivés type raffinose (**44**), avec une configuration 2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*S*, réduisent la sécrétion d'IFN- γ , donnant lieu à une réponse immune très faible mais Th2.^[181]

Une autre variation a été le remplacement de l'hydrogène et de l'hydroxyle en position 4 par deux atomes de fluor (**45**), ce qui induit une forte réponse Th1.^[182] Cette substitution réduit la capacité d'accepteur de liaison hydrogène du 3-OH, affaiblissant sa liaison avec l'Arg95. La liaison à cette arginine ne semble donc pas aussi importante qu'on le suspectait. Cependant, des études de dynamique moléculaire tendent à montrer la présence de phénomènes

compensatoires, notamment via le renforcement de l'interaction Arg95 - l'Asp80 (CD1d).^[115,123] Le dérivé de type sérine de Fan *et al.* (**46**)^[183] présente une fonction carbonyle en position 3 qui peut, elle aussi, interagir avec l'Arg95. Néanmoins, la planéité imposée par le groupement amide peut limiter cette interaction et altérer la position de la tête polaire, expliquant la faible réponse Th1 obtenue. Au regard de toutes ces données, il apparaît que la force de l'interaction CD1d-TCR, médiée par les interactions avec l'Arg95, pourrait être un facteur prépondérant pour déterminer l'intensité de la réponse immune. Ceci renforce l'hypothèse précédente, à savoir que la stabilisation du complexe ternaire favorise la production d'IFN- γ , et donc la réponse Th1, alors que la réponse Th2 est renforcée lorsque les ligands provoquent une légère déstabilisation. (

Figure 19)

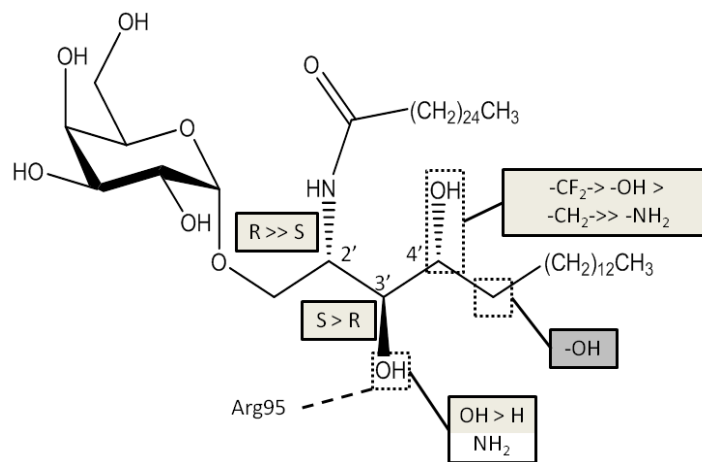
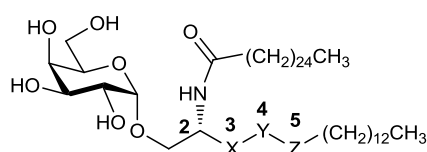


Figure 19 : Points de modulation clés de la partie sphingosine et leurs impact

La couleur de fond indique le profil induit par la modulation : le gris clair pour le Th2, le gris foncé pour le Th1 et le blanc pour la perte ou la chute drastique d'activité.



N°	Configuration de 2'	X (Conf.)	Y (Conf.)	Z (Conf.)	Activité	Réf.	
1	S	OH (S)	OH (R)	CH ₂	Th1 ^{m,h}	[131]	
29	R	CH ₂	CH ₂		Th1-- ^m	[69]	
30	S	OH (R)	CH ₂		Th1 ^{m,h}	[66,175]	
31	R	CH ₂	OH (S)		Th1- ^m	[176]	
33		NH ₂ (R)	OH (R)		Inactif ^m	[178]	
34		NH ₂ (S)					
35		S	OH (R)				NH ₂ (R)
36	NH ₂ (S)						
37	OH (R)				Th1- ^{m,h}	[179,180]	
38	OH (S)					[179]	
39	R				OH (S)	OH (R)	[179,180]
40						OH (R)	Th1-- ^{m,h}
41		OH (S)					
42		OH (R)					
43	S	OH (R)	OH (S)		Th2- ^m	[181]	
44			OH (S)				

Table 3: Modifications de la partie sphingosine

++/-- réponse plus forte/plus faible que le ligand de référence, +/- réponse légèrement plus forte/plus faible que le ligand de référence. ^m testé sur cellules murines, ^h testé sur cellules humaines, les ligands de référence sont l' α -GalCer pour le profil Th1 et l'OCH pour le profil Th2.

3.3.2 Variations autour de la fonction amide

Le remplacement de la fonction amide par un sulfonamide (RCAI39, **47**)^[184] ou un groupement 1,2,3-triazole (**48**)^[185] induit la production de cytokines Th2. L'analogie type ester décrit par Shiozaki *et al.* (**49**)^[186] provoque lui aussi une faible réponse Th2. Fuhshuku *et al.* ont également envisagé une restriction conformationnelle de cette partie du ligand en introduisant des cycles azétidine (RCAI18, **50**) et pyrrolidine (RCAI51, **51**).^[187] Le composé **50** montre une activité Th2 dose-dépendante intéressante tandis que le composé **51** induit une réponse Th2 plus modérée. Une étude de dynamique moléculaire réalisée par Hénon *et al.*^[188] met en avant le rôle prépondérant tenu par le réseau de liaisons hydrogène formé par le 2'-OH, la Thr154 (Thr156), l'Asp151 (Asp153) et l'hydrogène de la fonction amide. Ce réseau est désigné comme le réseau OTAN. (Figure 20)

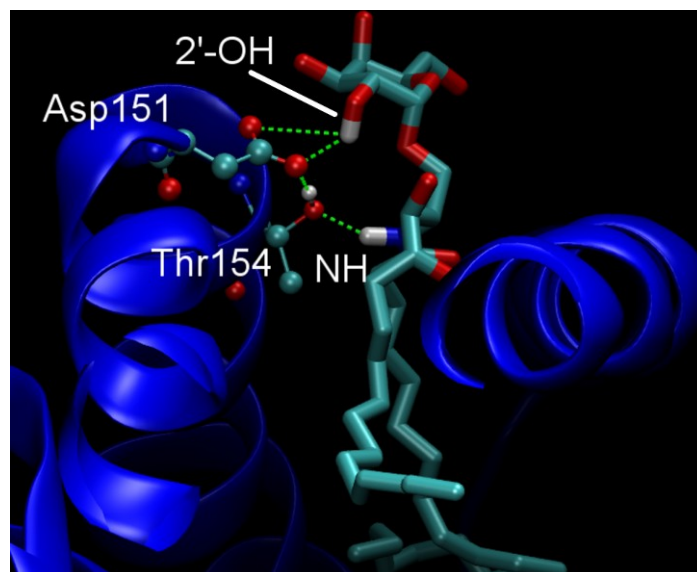


Figure 20 : Réseau de liaisons hydrogènes OTAN

Les auteurs montrent que ce réseau joue un rôle important en contribuant grandement à une présentation stable de la partie galactose. Dans le cas des composés **48** et **49**, le remplacement du groupe NH, donneur de liaison hydrogène, par un groupement accepteur peut perturber le réseau OTAN et aboutir à un complexe binaire moins stable. Il est aussi intéressant de noter que l'analogue de type éther (**52**)^[186] est totalement inactif alors que le composé **49**, qui contient un ester, induit une réponse Th2. Ceci suggère que l'emplacement du groupement carbonyle est une région importante pour l'activation des iNKT, même si elle ne semble pas avoir de contact direct avec le CD1d. La présence d'un groupement fonctionnel plan y semble favorable. Les analogues de type thioamide, urée et carbamate montrent eux aussi une activité Th1, alors que les thiourées sont pratiquement inactives.^[189,190] Un autre indice de l'importance de la liaison hydrogène NH-Thr154 (Thr156) est la faible activité obtenue avec le dérivé *N*-méthylé (**53**).^[191] Leung *et al.* ont également synthétisé un composé type α,α -difluoro-amide (**54**) dans le but d'étudier l'influence de cette liaison hydrogène en particulier.^[192] L'introduction d'atomes de fluor en α de la fonction amide permet d'augmenter l'acidité de l'hydrogène de l'amide, ce qui renforce la liaison hydrogène NH-Thr154 (Thr156) et donc devrait augmenter la force de la réponse Th1. De façon surprenante ce dérivé induit une réponse Th2. Les auteurs suggèrent que le renforcement de l'interaction NH-Thr154 (Thr156) affaiblit les autres interactions impliquant la Thr154 (Thr156), altérant ainsi l'équilibre de l'ensemble du réseau OTAN et donc pénalisant la stabilité globale du complexe. De même, Tashiro *et al.* observent que les composés dont les groupements amide ont une valeur de pKa élevée (amide, urée, carboxamide) présentent une activité Th1, alors que les composés avec un NH plus acide (sulfonamide, α,α -difluoro-amide) favorisent la production de cytokines Th2. En ce qui concerne le réseau OTAN, le groupement accepteur de liaison hydrogène en contact avec la Thr154 (Thr156) semble être un élément clé de la sélectivité de la réponse Th1/Th2. Comme avec les modulations de la sphingosine, il apparaît qu'une légère déstabilisation du complexe binaire ou ternaire favorise la réponse Th2. De plus, il semble qu'un groupement plan dans la zone de la fonction carbonyle soit très favorable à l'activité biologique. (Figure 21 et 22)

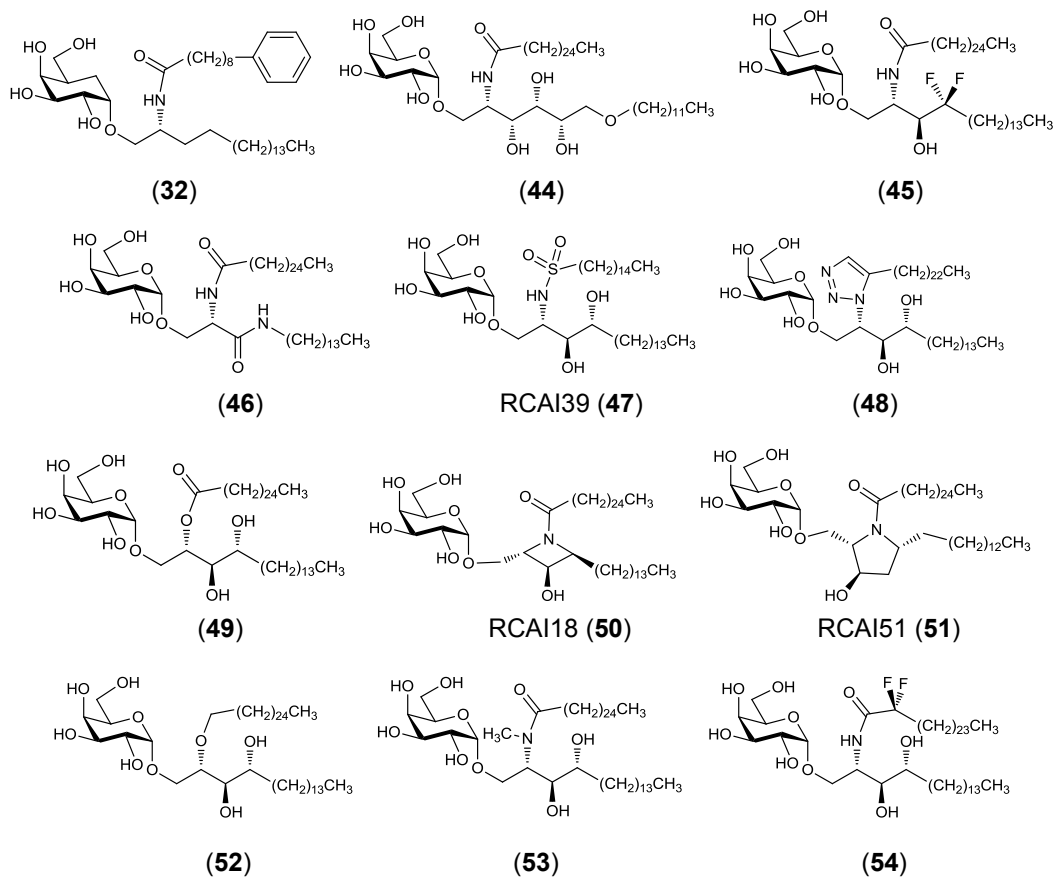


Figure 21 : Ligands de référence montrant des modulations de la fonction amide ou de la partie sphingosine

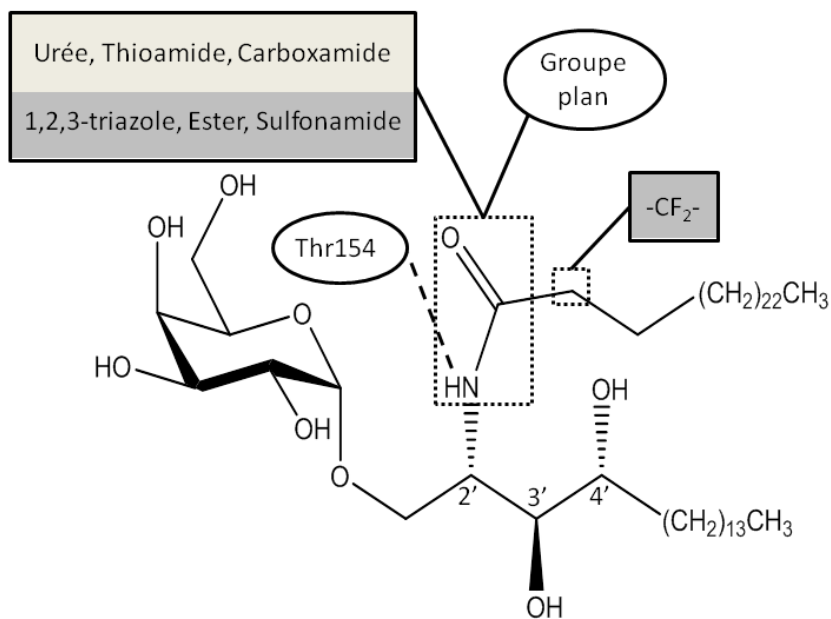
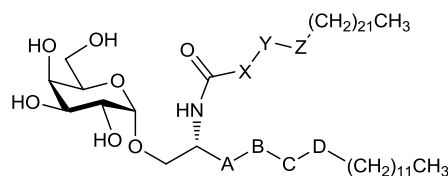


Figure 22 : Différentes modulations clés de la fonction amide et leurs impact

La couleur de fond indique le profil induit par la modulation : le gris clair pour le Th2, le gris foncé pour le Th1 et le blanc pour la perte ou la chute drastique d'activité.

Récemment, Shiozaky *et al.* ont décrit une série d'analogues du KRN7000 avec des chaînes acyles et sphingosine hydroxylées (**55-62**).^[193] De façon assez intéressante, ces composés entraînent des réponses Th1 ou Th2 en fonction du nombre d'hydroxyles présents sur la chaîne acyle. Un seul groupement hydroxyle induit un profil de réponse Th1, indépendamment du nombre de groupements OH sur la chaîne sphingosine (composés **55** à **58**). Cependant, le dérivé avec 3 hydroxyles sur la partie sphingosine semble plus efficace que celui avec 4 hydroxyles (composés **58** et **59**). La présence de 2 ou 3 groupements OH sur la chaîne acyle augmente la réponse Th2 (composés **59** à **61**). L'association de ce type de chaîne acyle avec des sphingosines à 2 ou 4 hydroxyles (composés **60** à **62**) permet de diminuer fortement la production d'IFN- γ , voire presque la faire cesser. Ces composés présentent aussi une activité contre l'EAE (Encéphalomyélite Allergique Expérimentale).



N°	A (Conf.)	B (Conf.)	C (Conf.)	D (Conf.)	X (Conf.)	Y (Conf.)	Z (Conf.)	Activité	Réf	
55	CH ₂ OH (S)	CH ₂ OH (R)	CH ₂ OH (S)	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂	Th1+ ^m	[193]	
56		CH ₂ OH (S)		CH ₂ OH (S)				CH ₂ OH (S)		CH ₂ OH (S)
57		CH ₂ OH (R)		CH ₂	CH ₂ OH (S)					
58		CH ₂ OH (S)		CH ₂ OH (S)						CH ₂ OH (S)
59		CH ₂ OH (R)		CH ₂	CH ₂ OH (S)	CH ₂ OH (S)				
60		CH ₂ OH (S)		CH ₂ OH (S)						CH ₂ OH (R)
61		CH ₂ OH (R)		CH ₂	CH ₂	CH ₂ OH (R)				
62				CH ₂	CH ₂	CH ₂ OH (R)		CH ₂ OH (R)		CH ₂ OH (R)

Table 4 : Structures des différents analogues hydroxylés de l' α -GalCer

++/-- réponse plus forte/plus faible que le ligand de référence, +/- réponse légèrement plus forte/plus faible que le ligand de référence. ^m testé sur cellules murines, ^h testé sur cellules humaines, les ligands de référence sont l' α -GalCer pour le profil Th1 et l'OCH pour le profil Th2.

3.4 Modulation des chaînes lipidiques

Chronologiquement, l'OCH (**2**) a été le premier composé connu pour orienter la production cytokinique des iNKT vers un profil Th2, cependant son activité sur cellules humaines est

très faible.^[65-67,69] Sa principale différence avec l' α -GalCer est la réduction de la chaîne sphingosine de 18 (C18) à 9 (C9) carbones. Une large gamme de composés avec des chaînes acyles et/ou sphingosines tronquées a été synthétisée par la suite.^[194-196] Il est clair que les analogues avec les chaînes les plus longues, jusqu'à C26 pour l'acyle et C14 pour la sphingosine, montrent une forte activité Th1 (cf annexe A Table S2). La réduction de l'une des deux chaînes entraîne une diminution de la production globale de cytokines et tend à produire un profil équivalent à celui de l'OCH. McCarthy *et al.*^[196] suggèrent que la différence d'affinité du TCR pour les complexes CD1d/KRN7000 et CD1d/OCH est due à la différence de positionnement de la chaîne sphingosine écourtée dans la poche F'. Ce déplacement peut altérer la position de la liaison osidique et donc de la tête polaire. Il peut aussi induire un réarrangement dans la structure du CD1d et l'effondrement de la partie supérieure de la poche F' laissée vide. Ainsi, une étude de dynamique moléculaire menée sur le complexe CD1d/OCH humain a montré une dérive de la Phe84 (Leu84) et le basculement de la tête polaire du ligand.^[188] La Phe84 interagit normalement avec la CDR3 α du TCR et la dérive de ce résidu empêche cette interaction. Sa perte est donc délétère pour la reconnaissance du TCR.

Il faut noter que la présence de chaînes lipidiques tronquées n'assure pas systématiquement une réponse Th2. Wallner *et al.*^[197] ont synthétisé un composé possédant uniquement une chaîne acyle (**63**) qui est reconnu par les cellules iNKT, sans pour autant induire de réponse cytokinique. De plus, Yu *et al.* ont démontré que l'introduction d'une ou deux doubles liaisons en configuration Z dans la chaîne acyle de l' α -GalCer (cf annexe A Table S2) produit une réponse Th2 plus forte que celle de l'OCH, c'est le cas par exemple du C20:2 (**64**).^[198] Cependant, ce même composé présentant une chaîne sphingosine écourtée type OCH (**65**) est seulement aussi efficace que l'OCH.^[65] Ces résultats sont difficiles à expliquer en utilisant simplement le concept de stabilité des complexes binaires et ternaires. Par exemple, la chaîne acyle rigide du composé **64** est supposée épouser la courbure naturelle de la poche de liaison du CD1d et ainsi stabiliser le complexe CD1d/ligand/TCR, ce qui devrait augmenter la réponse Th1. Une explication intéressante a été avancée par Bai *et al.* pour expliquer le profil Th2 observé expérimentalement.^[82] Les auteurs suggèrent que les analogues à chaîne courte ou insaturée sont préférentiellement présentés par des CPA non professionnelles, comme les cellules B, grâce à leur solubilité accrue et leur capacité à se charger directement dans le récepteur CD1d sans passer par la voie intracellulaire. Ce type de cellules n'exprime pas le récepteur CD8 α et est donc incapable de sécréter l'IL-12 nécessaire pour obtenir une production massive d'IFN- γ . Les composés **66** et **67**, qui présentent une chaîne sphingosine écourtée se terminant respectivement par un cyclopentyle ou un isopropyle, sont eux aussi capables d'activer les iNKT selon des profils de réponse Th2 et Th1.^[195,199]

Baek *et al.* ont décrit une série de composés (cf annexe A Table S2), dont le KBC007 (**68**) et le KBC009 (**69**), qui présentent une chaîne acyle branchée conçue pour enserrer l'acide aminé central de la cavité A'.^[200] Parmi eux, aussi bien les dérivés type diheptylamine que dinonylamine induisent une augmentation de la production d'IL-4 dans les modèles murins. La production d'IFN- γ reste cependant non négligeable pour certains composés. C'est le cas par exemple du composé **69** qui a un effet adjuvant quand il est co-administré par voie nasale avec un vaccin antigrippal.^[58] Le groupement amine est chargé à pH physiologique, ce qui augmente grandement la solubilité de ces composés. Selon l'hypothèse de Bai, c'est

aussi un facteur qui va favoriser sa présentation par des cellules non productrices d'IL-12, ce qui expliquerait la forte réponse Th2.

Une approche très largement utilisée pour augmenter la stabilité des complexes binaires a été d'introduire des groupements aromatiques à l'extrémité des chaînes acyle et/ou sphingosine afin d'engager des interactions π - π avec les acides aminés au fond du site de liaison.^[52,84,199,201,202] Du côté de la sphingosine, l'utilisation d'une chaîne C4 (**70**) à C9 est optimum et permettrait des interactions avec la Phe77, la Tyr73, le Trp131 et la Phe114, mais ces dérivés n'induisent au final qu'une faible réponse Th1. Un composé avec une chaîne C2 est, quant à lui, quasiment inactif. L'utilisation de chaînes sphingosines écourtées requiert de conserver une chaîne acyle longue pour maintenir un niveau d'activité égale à celui du KRN7000. Du côté de la chaîne acyle (cf annexe A Table S2), une chaîne C4 (**71**) à C10 permettrait des interactions avec le Trp40, la Phe114 (Leu116), la Phe70 et la Tyr73, augmentant la réponse Th1.^[122] L'optimum semblant être obtenu avec une chaîne à 9 carbones (7DW8-5, **72**). De plus, Liang *et al.* ont montré que la substitution en para des cycles aromatiques par un groupement électro-attracteur améliore les interactions π - π et augmente encore la réponse Th1 (cf annexe A Table S2).^[203] De manière assez surprenante, les composés présentant à la fois des aromatiques sur les chaînes acyle et sphingosine (**73**) sont totalement inactifs. Ceci est probablement dû à leur faible liaison au CD1d^[177] induite par la perte de la surface de contact hydrophobe, et qui n'est pas entièrement compensée par les interactions aromatiques. Plusieurs composés comportant des cycles naphthyle et hétéroaromatiques ont été réalisés (cf annexe A Table S2), mais seuls les composés **74** et **75** montrent une activité équivalente ou un peu supérieure à celle de l' α -GalCer.^[202] Le remplacement bioisostérique des groupements méthylènes par des oxygènes dans les chaînes lipidiques (cf annexe A Table S2) ne modifie pas la réponse immune.^[204]

Récemment, Jervis *et al.*^[205] ont synthétisé deux dérivés présentant des groupes fluorophores à l'extrémité de la chaîne acyle des composés ThCer (**76**) et C20:2 (**77**). Les auteurs ont identifié que l'hydrogène pro-S du CH₂ en α de l'amide est un point de substitution privilégié. Substituer celui-ci joue peu sur la réponse biologique, malgré le volume important des groupements qui y sont greffés.

Pour résumer, il apparaît que la nature des chaînes lipidiques joue un rôle important dans la sélectivité de la réponse immune (Figure 23 et 24). Les ligands les plus solubles ou avec des chaînes plus courtes induiront préférentiellement un profil de réponse Th2, alors que les composés plus lipophiles ou avec des chaînes acyles ou sphingosines se terminant par des groupes aromatiques vont favoriser la réponse Th1. Une longueur minimale de ces chaînes lipidiques semble cependant requise pour assurer un ancrage correct du ligand dans le récepteur CD1d.

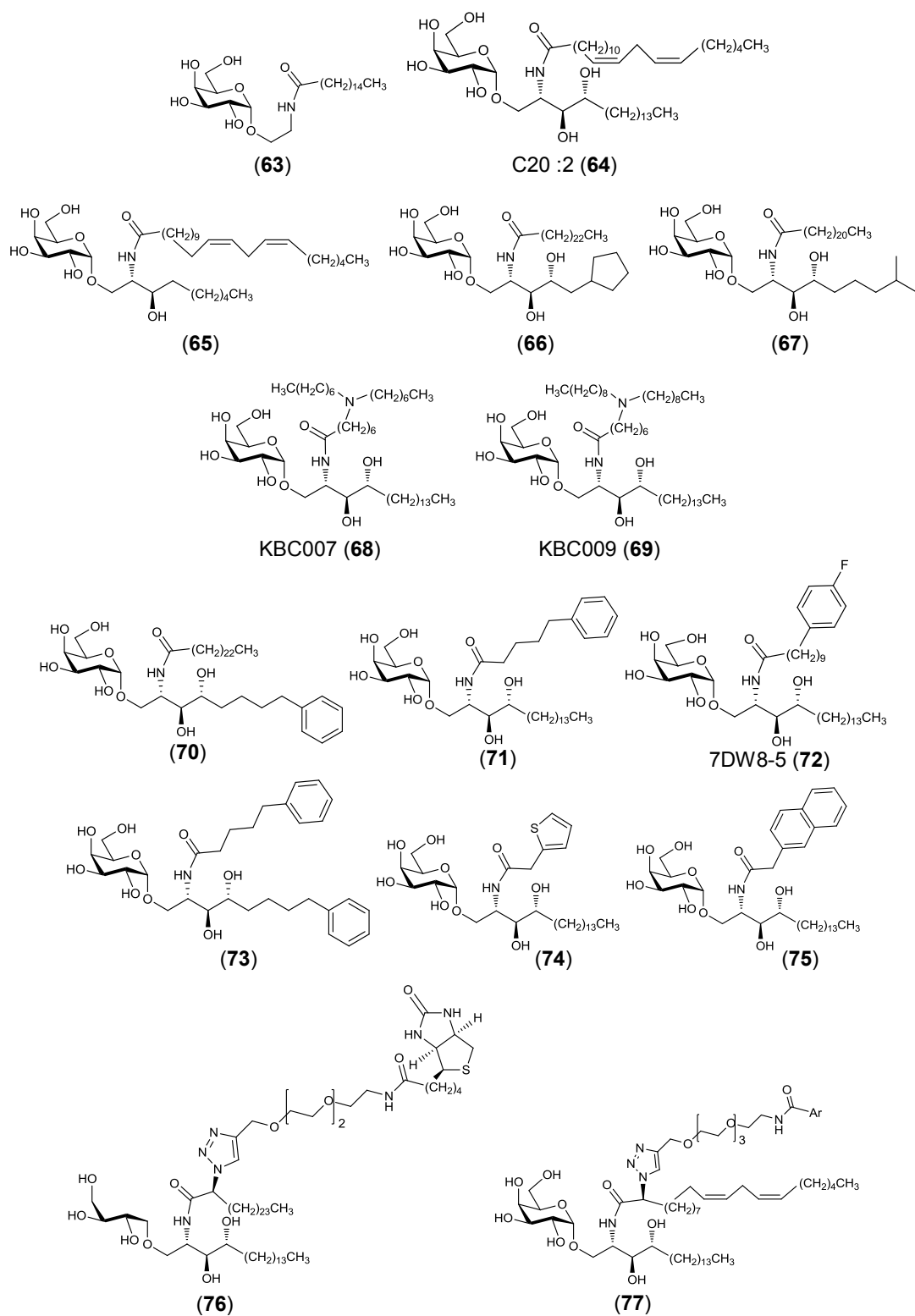


Figure 23: Composés de référence présentant des altérations de leurs chaînes lipidiques

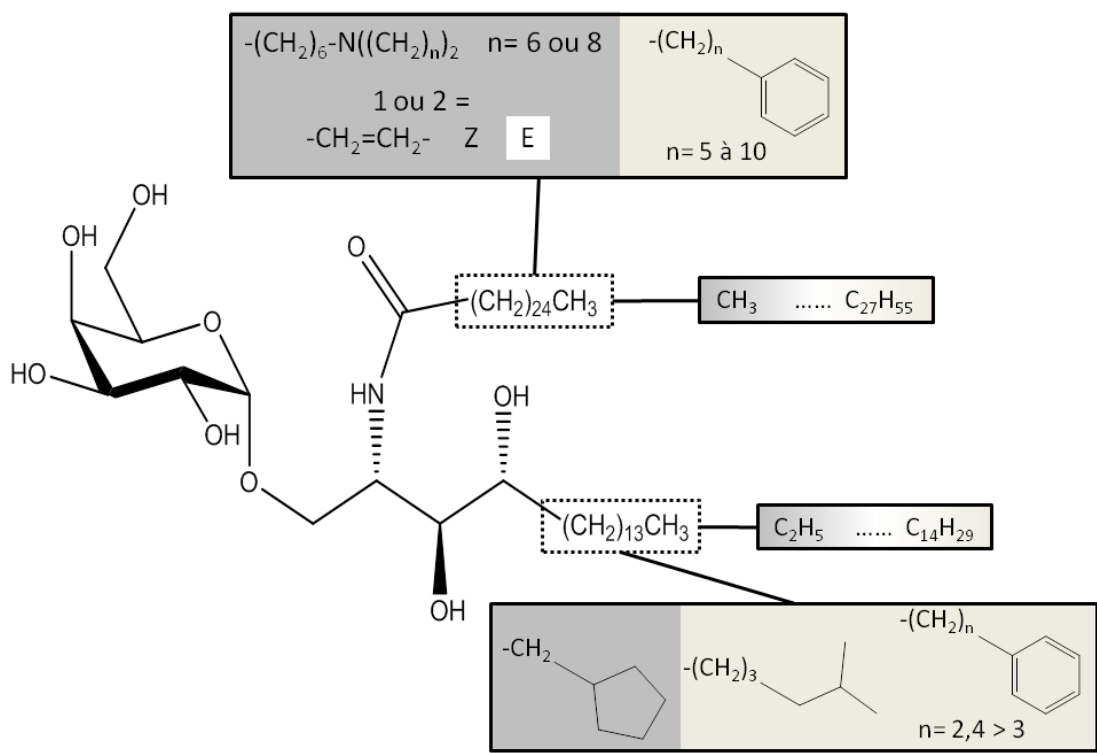


Figure 24 : Points de modulation clés des chaînes lipidiques et leurs impact.

La couleur de fond indique le profil induit par la modulation : le gris clair pour le Th2, le gris foncé pour le Th1 et le blanc pour la perte ou la chute drastique d'activité.

3.5 Eléments structuraux clés et pharmacomodulations envisageables

Comme constaté, les relations structure-activité des modulateurs des iNKT sont complexes et restent encore à préciser. Il en ressort cependant quelques modulations clés. Ces dernières peuvent s'avérer très utiles pour la conception de modulateurs originaux visant à déclencher sélectivement une réponse Th1 ou Th2. Citons, entre autre, la longueur, la nature et le degré d'hydroxylation des chaînes lipidiques, la présence d'un donneur ou d'un accepteur de liaison hydrogène à l'emplacement du groupement amide, la longueur et la nature du lien osidique

La tête polaire du KRN7000 a été très largement modulée mais la grande majorité de ces modifications mènent à des structures de type glycosidique, s'écartant au final assez peu du galactose. Une piste intéressante pour obtenir des ligands originaux sans trop nuire à la réponse biologique pourrait être de remplacer la partie galactose de l'α-GalCer par des motifs bicycliques qui conservent les groupes hydroxyle en position 2' et 3' ainsi que leurs stéréochimies.(Figure 25) Ce type de dérivé préserverait les liaisons hydrogène avec l'Asp151 (Asp153) du CD1d et la Gly96 du TCR ainsi que le réseau OTAN, éléments qui ont été identifiés comme critiques pour l'activation des iNKT, et ceci en exploitant une partie de l'espace dégagé autour de la position 6'. Si le second cycle est aromatique une interaction π-π supplémentaire avec le Trp153 (Gly155) du CD1d humain est envisageable. Le premier cycle doit, quant à lui, rester saturé pour conserver l'orientation des hydroxyles 2' et 3' qui ne pourraient pas engager leurs interactions clés autrement.

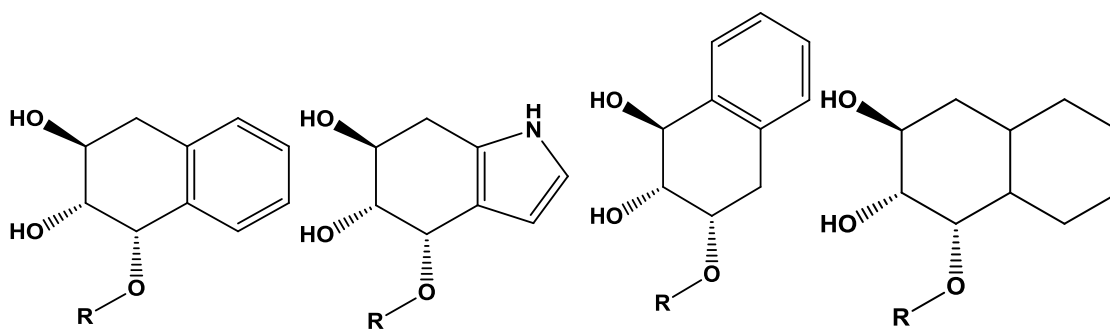


Figure 25 : Fragments bicycliques envisagés en remplacement du galactose

La sélectivité Th1/Th2 pourrait ainsi être ajustée en jouant sur la partie « immergée » du ligand, et notamment sur la longueur des chaînes lipidiques ainsi que le remplacement de la fonction amide du KRN7000. L'utilisation de chaînes lipidiques écourtées et/ou le remplacement de la fonction amide par un groupement accepteur de liaison hydrogène devrait faire pencher la balance en faveur d'une réponse Th2. La présence de chaînes lipidiques plus longues, d'un lien osidique rigidifié et/ou de donneurs de liaison hydrogène devrait induire une réponse Th1. Tout ceci est bien sûr à pondérer par la faisabilité chimique des différentes molécules résultantes, dont la synthèse peut être laborieuse, ou encore leur solubilité qui peut les empêcher d'être testées.

II - Identification des mouvements spécifiques aux profils Th1 et Th2 dans les complexes CD1d/ligand

Plusieurs éléments intéressants ressortent de l'étude des RSA et ouvrent déjà quelques pistes pour la conception de nouveaux modulateurs d'activations des iNKT. Cependant, celle-ci repose sur des extrapolations et des hypothèses basées elles-mêmes sur des observations réalisées par des équipes différentes, dans des conditions différentes et sur des modèles différents. Nous avons donc besoin de moyens techniques nous permettant d'éprouver ces hypothèses et d'en établir de nouvelles. C'est pourquoi nous avons eu d'abord recours au *docking - scoring*, une méthode classique de *drug design* direct disponible au laboratoire.

1 Approche par docking – scoring

L'arrimage moléculaire, ou *docking* suivant le terme anglo-saxon couramment employé, consiste à prédire les géométries les plus favorables aux interactions inter-moléculaires, que ce soit pour placer un ligand dans un site de liaison d'une macromolécule ou trouver des contacts protéine-protéine. Les protocoles de *docking-scoring* peuvent être décrits comme la combinaison de deux étapes. La première est une étape de recherche conformationnelle qui se divise elle-même en deux phases. Au cours de la première, des conformations sont générées, puis classées au cours de la seconde, ce qui permet d'orienter la prochaine génération de poses de *docking*. Cette première étape est répétée un nombre de fois fixé ou jusqu'à convergence des poses. La deuxième étape est optionnelle et consiste en un processus de *scoring*, qui va servir uniquement à classer les différentes poses *a posteriori*.

Le nombre de conformations à envisager, même pour des molécules simples, est très important ($36 \cdot 10^n$ pour n liaisons rotatoires en considérant un pas de rotation de 10°). C'est pourquoi divers types d'algorithmes de recherche conformationnelle (systématiques, stochastiques ou déterministes) sont employés pour générer un nombre optimal de solutions. Ces dernières sont censées reproduire, par itération, le mode de liaison résolu expérimentalement. Il faudrait aussi prendre en compte la flexibilité de la cible, ce qui augmente exponentiellement le nombre de conformations à envisager. Le *docking* est un procédé trop complexe pour être envisagé avec un système totalement flexible et nécessite donc des approximations, soit en maintenant la conformation des deux partenaires rigide, soit en autorisant la flexibilité du ligand seul ou de quelques acides aminés de la cible.

La génération d'une grande variété de modes de liaison n'est cependant pas efficace sans un modèle de classement rapide et performant. Cette étape de *scoring* final est utile pour classer les composés selon leur activité potentielle sur une cible donnée, même si une inspection visuelle des poses, pour en évaluer la pertinence, reste incontournable.

1.1 Algorithme et logiciel employés

1.1.1 *Genetic Optimization for Ligand Docking : GOLD*

GOLD, le logiciel couramment employé au laboratoire, est un programme de *docking* basé sur un algorithme génétique qui a été développé par le groupe du CCDC (Cambridge

Cristallographyc Data Centre).^[206] Il a été testé sur 133 complexes tirés de la Protein Data Bank (PDB) avec un taux de prédiction du positionnement cristallographique du ligand de 70%. Il travaille en modifiant les torsions et en conservant les distances et les angles de liaison.

Le site de liaison de la macromolécule est défini par le logiciel à partir des coordonnées d'un point, d'un atome ou d'un ligand autour duquel une cavité est recherchée dans un rayon paramétrable (10Å par défaut) à l'aide d'un algorithme prenant en compte les surfaces accessibles au solvant. L'ensemble de la cavité ainsi découverte sert au placement du ligand en considérant toutes les possibilités d'interactions dans cette cavité.

Il est également possible d'imposer des contraintes de distance (ex : distances mimant des liaisons covalentes entre un atome du ligand et un atome de la macromolécule), des liaisons hydrogène (soit en spécifiant les atomes du ligand et de la protéine engagés dans la liaison, soit en obligeant un atome de la macromolécule à former une liaison hydrogène sans préciser avec quel atome du ligand) ou des contraintes de position restreignant la position relative entre un atome du récepteur et un groupe fonctionnel du ligand. Une dernière option permet de contraindre le *docking* en faveur d'une conformation particulière proche d'une conformation de référence. Ces contraintes font toutefois perdre une partie de l'exhaustivité apportée par la définition du site de liaison comme une cavité dans laquelle toutes les possibilités d'interactions sont explorées.

D'autre part, la macromolécule est maintenue rigide, ce qui nécessite de partir d'une conformation de départ de la protéine susceptible d'accueillir le ligand et la plus proche possible de la conformation bioactive. Ce dernier point constitue d'ailleurs l'une des plus grandes limitations de cette méthode particulièrement performante.

De nombreux programmes de *docking* sont disponibles et diffèrent selon l'algorithme d'échantillonnage conformationnel, l'implémentation de la flexibilité du ligand et de la protéine, les fonctions de *scoring* employées et le temps de calcul requis. Il est important de noter que, pour le moment, aucun programme n'est capable de réaliser des procédures de *docking-scoring* robustes sur une gamme variée de protéines cibles. Il est donc nécessaire de tester les programmes et d'identifier les paramètres algorithmiques adaptés à une cible donnée avant d'entreprendre une campagne de criblage virtuel.^[207,208]

1.1.2 Algorithme génétique

L'algorithme génétique utilise la théorie de l'évolution de Darwin pour explorer l'espace conformationnel et converger vers des poses de *docking* optimales. Les degrés de liberté du système sont encodés en tant que « gènes » dans des « chromosomes » et sont perturbés aléatoirement par des opérateurs génétiques. (Figure 26)

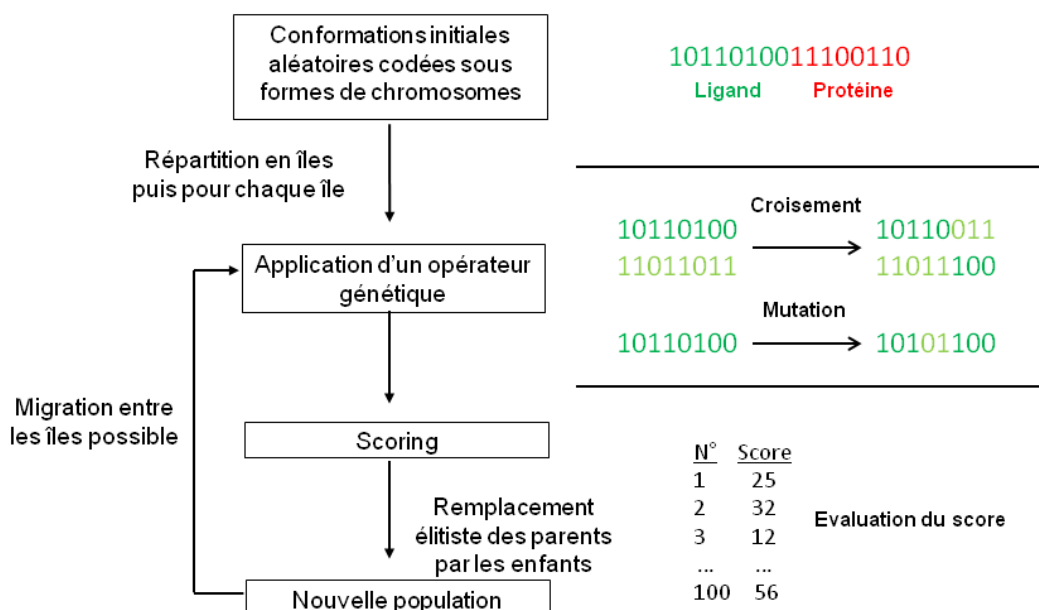


Figure 26 : Algorithme génétique

Une population initiale de conformations est répartie sur plusieurs îles, c'est-à-dire en sous-populations indépendantes. Ces sous-populations sont perturbées soit par *cross-over*, soit par mutation. Le *cross-over* simule la recombinaison génétique de 2 chromosomes (conformères) différents, c'est-à-dire l'échange de propriétés entre ces deux conformères. La mutation, quant à elle, change aléatoirement la valeur d'une propriété du conformère. Ces nouveaux conformères qui forment maintenant la population fille sont évalués par une fonction de *scoring* servant de pression sélective. Si un conformère nouvellement généré a un meilleur score que l'un de ses parents il prendra sa place, sinon les conformères parents sont conservés. On parle de sélection élitiste. Ce cycle est répété une nouvelle fois avec la population fille et ainsi de suite. Cependant, il est possible d'autoriser les échanges de chromosomes entre les îles pour renouveler les populations. Ce cycle de génération de nouvelles conformations/sélection élitiste est répété un grand nombre de fois pour obtenir un conformère le plus approprié possible. L'ensemble est lui-même répété jusqu'à l'obtention du nombre de poses de *docking* souhaité.

1.2 Paramétrage pour le complexe CD1d/α-GalCer/TCR humain

Afin de prédire le positionnement de nouveaux ligands dans le complexe, il est fondamental de s'appuyer sur un protocole paramétré en utilisant un ou plusieurs ligands de référence qui ont été co-cristallisés avec la cible d'intérêt. En gardant à l'esprit que la finalité est de concevoir des molécules d'intérêt thérapeutique, nous avons choisi de travailler sur le complexe CD1d/α-GalCer/TCR humain (référence PDB 2PO6). Le *docking* de l'α-GalCer a donc été réalisé dans différentes conditions et nous avons calculé dans chaque cas la déviation structurale moyenne (Root Mean Square Deviation, RMSD) entre les poses obtenues par *docking – scoring* et la pose observée en cristallographie. Nous nous sommes limités à étudier les deux paramètres majeurs que sont la fonction de *scoring* et le nombre d'opérations par liaison rotatoire.

1.2.1 Influence de la fonction de scoring

L'objectif est d'identifier la, ou les, fonctions de *scoring* adéquates pour l'étude des ligands iNKT. Nous en avons 4 à notre disposition :

- La fonction *Chemscore*^[209] est une fonction empirique, basée sur le calcul de termes de liaisons hydrogène, d'interactions entre le ligand et un atome métallique, de contacts lipophiles et d'entropie de rotation.
- La fonction *GoldScore* repose sur un champ de forces et a été implémenté par les développeurs du programme GOLD. Elle inclut quatre éléments : l'énergie de liaisons hydrogène entre le ligand et la macromolécule, l'énergie des interactions de Van der Waals entre les deux molécules, l'énergie de Van der Waals propre au ligand et son énergie de torsion. Des paramètres empiriques rendent compte des rayons de Van der Waals, de l'orientation préférentielle des liaisons hydrogène, de leur énergie, etc.
- La fonction *CHEMPLP* (*Chemscore* - Piecewise Linear Potential)^[210] utilise une fonction linéaire par morceau pour estimer la complémentarité stérique entre la protéine et le ligand. Elle inclut aussi les termes de liaisons hydrogène de *Chemscore*.
- *ASP* (Astex Scoring Potential)^[211] est une fonction statistique qui évalue directement les interactions interatomiques en se basant sur la probabilité que ces deux types atomiques soient en contact. Les fonctions de probabilité ont été établies en examinant toutes les structures alors enregistrées dans la PDB.

Nous avons tout d'abord réalisé le *docking* de l' α -GalCer en utilisant les paramètres standards du logiciel GOLD et en ne faisant varier que la fonction de *scoring*. On a ensuite calculé dans chaque cas le RMSD entre la conformation de référence tirée de la cristallographie et chacune des 10 poses obtenues.

	Goldscore	Chemscore	PLP	ASP
Pose 1	13,10	4,06	14,12	13,32
Pose 2	13,81	10,30	10,59	12,70
Pose 3	10,65	14,13	12,28	10,42
Pose 4	2,13	4,47	3,84	12,15
Pose 5	2,10	10,42	11,95	12,36
Pose 6	11,78	6,38	10,36	12,60
Pose 7	12,79	13,48	13,18	10,90
Pose 8	10,93	10,21	13,53	11,31
Pose 9	12,89	13,43	12,15	10,69
Pose 10	3,71	9,29	11,98	12,63
Moyenne	9,39	9,62	11,40	11,91
Moyenne/atome	0,059	0,060	0,072	0,075
Ecart-type	4,77	3,64	2,91	1,00

Table 5: Variation du RMSD (en Å) entre la pose de référence de l' α -GalCer co-cristallisé et les poses calculées par *docking* selon 4 fonctions de *scoring*

La fonction de *scoring Goldscore* semble être la plus appropriée car elle minimise davantage le RMSD entre les 10 poses de *docking* et la structure de référence co-cristallisée. Cependant, la valeur moyenne de RMSD obtenue avec cette fonction (plus de 9 Å) reste assez élevée. On observe une grande disparité parmi les conformations, avec des RMSD allant de 2,10 à 13,81 Å, ce qui signifie que l'algorithme peine à converger vers un mode de liaison consensus. Ceci est moins vrai pour la fonction de *scoring ASP* où on a un faible écart-type entre les poses, signe d'une certaine convergence. Cependant, c'est aussi la fonction pour laquelle le RMSD est le plus élevé, elle converge donc vers une autre conformation que celle obtenue en cristallographie. Cette pose n'a pas été retenue car elle se situe hors du site de liaison.

1.2.2 Influence du nombre d'opérations par liaison rotatoire

Plus le nombre d'opérations, le nombre d'îles et les fréquences de mutation, de *cross-over* ou de migration sont importantes, plus le calcul sera gourmand en temps et en ressources. Il convient donc de trouver le meilleur compromis temps/précision.

Par défaut, le logiciel GOLD adapte le nombre d'opérations à réaliser pour chaque ligand selon sa taille, et plus précisément son nombre de liaisons rotatoires. Il est possible de réaliser entre 600 et 12 000 opérations par liaison rotatoire présente dans la molécule. Nous avons tenté d'obtenir le nombre d'opérations optimal par liaison rotatoire en réalisant plusieurs *dockings* de l' α -GalCer avec la fonction *Goldscore* et les paramètres par défaut de GOLD, mais en faisant varier le nombre d'opérations.

	600	3 000	6 000	9 000	12 000
Pose 1	15,18	2,3	2,44	3,35	12,26
Pose 2	12,69	9,95	4,40	3,66	2,11
Pose 3	14,65	11,99	2,19	10,72	3,88
Pose 4	12,20	10,31	11,39	3,75	10,57
Pose 5	10,34	2,51	10,55	12,68	4,12
Pose 6	13,11	14,16	11,43	12,99	10,10
Pose 7	15,91	10,45	10,96	10,63	12,12
Pose 8	10,36	11,29	14,20	4,31	2,62
Pose 9	10,90	3,73	9,87	5,44	10,68
Pose 10	12,21	5,84	10,40	11,01	10,54
Moyenne	12,76	8,25	8,78	7,85	7,90
Moyenne/atome	0,080	0,052	0,055	0,049	0,050
Ecart-type	1,89	4,28	4,19	4,06	4,15

Table 6 : Variation du RMSD (en Å) entre la structure de référence et les poses de *docking* obtenues en fonction du nombre d'opérations par liaison rotatoire

Il apparaît nécessaire de maximiser le nombre d'opérations par liaison rotatoire aux dépens du temps de calcul. En effet, les résultats proposés avec 9 000 et 12 000 opérations par liaison rotatoire sont ceux minimisant un peu mieux le RMSD. On observe cependant une plus grande cohérence parmi les poses obtenues avec 12 000 opérations par liaison rotatoire. Le RMSD moyen reste proche de celui obtenu avec le nombre d'opération par défaut et est encore trop élevé pour considérer le protocole de *docking* comme fiable. Comme auparavant avec la fonction de *scoring ASP*, on observe un écart type plus faible à 600 opérations par liaison rotatoire. Mais là encore, le RMSD très élevé indique une convergence vers une conformation très différente de la conformation cristallographique et hors du site de liaison.

1.3 Limites de la méthode

Le *docking – scoring* de modulateurs des iNKT dans le complexe ternaire CD1d/ligand/TCR s'avère très délicat à mettre en place et d'une efficacité limitée. Le principal problème est la faible convergence des différentes poses d'un même ligand. La raison en est très certainement la grande flexibilité de ces composés, notamment celle des deux longues chaînes grasses. Le grand nombre de liaisons rotatoires par ligand implique un grand nombre de variables qui doivent être prises en compte par l'algorithme génétique, ce qui induit un échantillonnage conformationnel très important et une convergence très lente. Raccourcir virtuellement la longueur des chaînes grasses ou ajouter des contraintes de positionnement permet d'améliorer la convergence et donne des poses plus proches de la référence cristallographique. Cependant, l'ajout de contraintes implique aussi une grande perte de réalisme et d'informations, certains ligands comme l' α -GalCer et le C20:2 ne sont tous simplement plus différenciables.

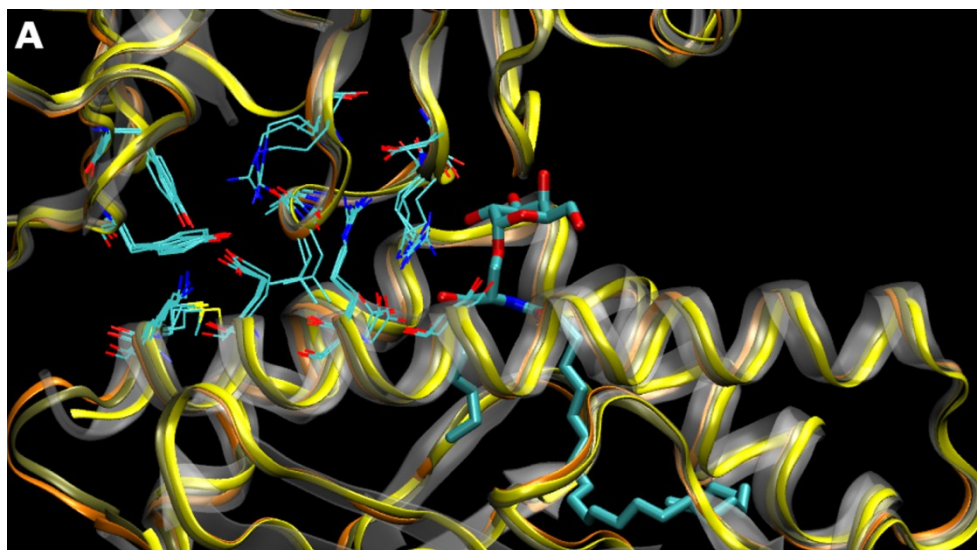
Il est également difficile avec ce type méthode de se faire une idée de la stabilité des complexes binaires et ternaires, éléments pourtant pressentis comme déterminants dans la sélectivité Th1/Th2. De manière plus globale, on suppose qu'il existe un phénomène d'adaptation partielle de la structure du CD1d au ligand, un peu comme dans le cas du NU- α -GalCer dont le groupement naphthyle se loge dans une poche auparavant inexistante du CD1d murin. Ce phénomène ne peut pas être observé dans une approche de *docking – scoring* où la protéine est considérée comme rigide.

2 Approche dynamique

Si on compare les différentes structures cristallographiques des complexes ternaires celles-ci sont structurellement très proches. Leur similarité est telle qu'il peut être difficile de différencier des complexes présentant pourtant des ligands associés à des profils de réponse opposés. (Figure 27) En effet, la déviation observée lors de la superposition des différentes structures (de 6 à 13 Å) reste faible au vu de la taille des complexes (plus de 800 acides aminés). Les interactions à l'interface CD1d/TCR sont, elles aussi, remarquablement semblables, même s'il persiste une incertitude due à la résolution des différentes structures cristallographiques (entre 2,7 et 3,2 Å).

Il est difficile d'expliquer comment des complexes si semblables peuvent avoir des différences de stabilité suffisantes pour déclencher des réponses biologiques opposées. En

effet, il est peu probable que l'apparition ou la disparition d'une ou deux liaisons hydrogène seulement suffisent pour modifier la stabilité au point d'avoir un réel impact sur le profil de réponse. Il est possible que, pour ces structures, nous ayons affaire à un biais dû à l'emploi de la cristallographie par diffraction des rayons X. En effet, celle-ci s'applique à des monocristaux, c'est-à-dire à un état de la matière fortement stabilisé. Dans ce cas précis cela pourrait partiellement fausser la structure de certains complexes Th2, qui seraient par nature moins stables et donc difficilement accessibles.



B	3ARB (OCH)	3TN0 (α-C-GalCer)	3HE6 (α-GalCer)	3ARF (C20:2)
	Th2	Th1	Th1	Th2
3ARB	0	6,36172	13,1162	10,9591
3TN0	6,36172	0	10,4096	6,2426
3HE6	13,1162	10,4096	0	7,92937
3ARF	10,9591	6,2426	7,92937	0

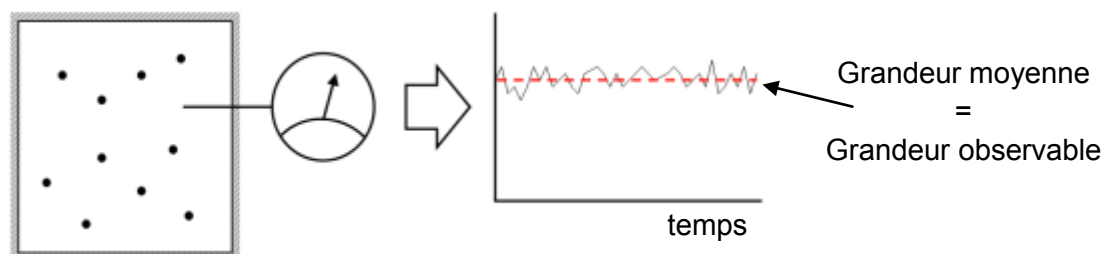
Figure 27 : **A.** Interface CD1d-TCR murin des complexes chargés avec l'OCH (PDB 3ARB,^[108] blanc), le C20:2 (PDB 3ARF,^[108] cuivre), l' α -GalCer (PDB 3HE6,^[110] jaune) et l' α -C-GalCer (PDB 3TN0,^[120] orange). **B.** Table de RMSD entre les carbones alpha des différents complexes ternaires (en Å)

Pour tenter de répondre à ces questions et envisager de façon plus précise la stabilité des différents complexes binaires et ternaires, nous avons opté pour une approche dynamique. L'objectif n'étant plus de comparer deux structures figées mais leurs différences de comportement sur une courte période de temps (quelques centaines de nanosecondes). Pour cela nous avons utilisé une technique appelée la dynamique moléculaire.

2.1 Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une technique se basant sur des concepts de physique classique (mécanique moléculaire) pour simuler le comportement d'un système atomique sur une période de temps donnée. Le mouvement simulé des particules permet d'accéder à des grandeurs thermodynamiques macroscopiques (dites « observables ») grâce au principe

d'ergodicité. Pour un système composé d'un très grand nombre de particules à l'équilibre, la valeur moyenne d'une grandeur calculée de manière statistique est égale à la moyenne d'un très grand nombre de mesures prises dans le temps. (Figure 28) La dynamique moléculaire permet aussi d'étudier l'évolution de la structure des différents éléments d'un système moléculaire et de détailler la façon dont ils s'influencent. De nombreux paramètres, notamment thermodynamiques, sont à prendre en compte pour ce type de simulation.



Système thermodynamique simulé

Figure 28 : Evaluation des grandeurs « observables » d'un système

2.1.1 Calcul quantique des charges

Le calcul des charges atomiques, ou charges partielles, est une étape essentielle dans la préparation des systèmes. Elle va conditionner le champ des interactions électrostatiques (cf II-2.1.2.3) et donc influencer considérablement le comportement dynamique du système moléculaire étudié.

Comme dans la majorité des méthodes dérivant de la physique classique, les charges sont généralement considérées comme constantes en dynamique moléculaire pour simplifier l'étude du système. Elles doivent donc être calculées avec la plus grande précision possible. Leur calcul n'est en fait pas possible directement, elles sont attribuées de façon à reproduire les moments multipolaires électriques de la molécule. Ces moments multipolaires sont calculables avec précision, pour une conformation donnée, en utilisant des méthodes de calcul quantique.

Les méthodes quantiques sont relativement nombreuses (*ab initio*, semi-empirique, DFT...) mais reposent toutes sur le calcul d'orbitales moléculaires et la répartition des électrons.^[212] Les calculs quantiques sont très lourds et nécessitent des ressources conséquentes pour obtenir des résultats dans un délai raisonnable, c'est pourquoi ce type de méthode est limité à de petits systèmes (quelques dizaines voir centaines d'atomes). Il est également possible avec ces méthodes de réaliser des simulations dynamiques quantiques (c'est-à-dire à charges atomiques variables), mais qui sont extrêmement gourmandes en ressources de calcul.

Nous avons utilisé pour nos calculs de charges ESP la méthode Hartree-Fock 631G*, recommandé dans le protocole de la méthode classique que nous détaillerons par la suite.

La méthode Hartree-Fock est une méthode dite *ab initio*, c'est-à-dire où la fonction d'onde n'est pas spécifiée en entrée, comme un paramètre, mais est d'abord approchée puis optimisée au cours du processus. La fonction d'onde est une fonction mathématique

représentant le comportement du système, peu importe sa nature, et qu'il est nécessaire de connaître pour pouvoir calculer les propriétés physico-chimiques du dit système.

Dans cette méthode, la fonction d'onde ϕ d'un système à N électrons est exprimée sous une forme que l'on appelle déterminant de Slater :

$$\phi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{bmatrix} \varphi_1(\epsilon_1) & \cdots & \varphi_N(\epsilon_1) \\ \vdots & & \vdots \\ \varphi_1(\epsilon_N) & \cdots & \varphi_N(\epsilon_N) \end{bmatrix}$$

φ_i est la spinorbitale i appliquée à un électron

Les fonctions spinorbitales représentent des orbitales moléculaires qui correspondent à la combinaison linéaire d'orbitales atomiques. Celles-ci sont elles même approchées par un ensemble de fonctions gaussiennes appelées « jeux de bases ». On distingue différents types de jeux de bases selon le nombre de fonctions gaussiennes utilisées pour décrire un type d'électron (de cœur ou de valence), le nombre de fonctions gaussiennes à paramètres variables et la prise en compte ou non de l'effet de polarisation des orbitales. Ces ensembles de fonctions sont identifiés par une nomenclature spécifique. Par exemple, le jeu de gaussiennes 6-31G* comprend 6 fonctions pour décrire les électrons de cœur, 4 pour les électrons de valence (3 à coefficients fixes et une à coefficient variable) et le symbole * indique qu'il tient compte de la polarisation pour les atomes lourds (tous sauf l'hydrogène).

Toutes ces spinorbitales sont ensuite soumises à l'équation d'Hartree-Fock :

$$\hat{F}\varphi_i = \varepsilon_i\varphi_i$$

\hat{F} est l'opérateur de Fock

ε_i est la valeur propre de l'opérateur de Fock et est proportionnelle à la somme de l'énergie cinétique et potentiel de l'électron i dans le champs moyen de tous les autres électrons

L'opérateur de Fock \hat{F} est en fait une version modifiée de l'Hamiltonien électronique qui s'applique à un seul électron. Il est composé de trois termes :

$$\hat{F} = \hat{H}_c + \sum_k (\hat{J}_k - \hat{K}_k)$$

\hat{H}_c est appelé Hamiltonien de cœur, il permet d'obtenir la somme de l'énergie cinétique et de l'interaction électrostatique avec le noyau.

\hat{J}_k est l'opérateur de Coulomb

\hat{K}_k est l'opérateur d'échange

On obtient donc après résolution des équations d'Hartree-Fock, un nouvel ensemble de fonctions φ_i , avec des coefficients de combinaison linéaire d'orbitales atomiques ajustés, qui vont nous permettre d'obtenir une nouvelle fonction d'onde. L'opération est répétée un nombre de cycle déterminé ou jusqu'à convergence de la valeur de ε_i . En effet, le théorème de variation dit que l'énergie calculée par cette méthode sera toujours supérieur à l'énergie

réelle du système. Ainsi on est certain que les fonctions d'onde associées aux énergies les plus basses sont les plus précises.

2.1.2 Mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire est une approche basée sur la mécanique newtonienne. Chaque atome est considéré comme une sphère rigide chargée et chaque liaison comme un ressort. Chaque type d'atome est donc caractérisé par un rayon, une charge et une masse, chaque liaison par une constante de force et des valeurs d'angle et de distance à l'équilibre. Ceci permet de calculer facilement et rapidement l'énergie potentielle de gros systèmes moléculaires mais aussi de simuler leurs mouvements.

Les principales forces prises en compte par la mécanique moléculaire^[213] sont :

- La vibration des liaisons
- La torsion
- Les interactions électrostatiques
- Les interactions de van der Waals

Soit :

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Vibration}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{Electrostatique}} + E_{\text{VdW}}$$

En modélisation moléculaire, sont réunis sous le terme « champ de forces » les équations mathématiques et l'ensemble des paramètres utilisés pour le calcul de l'énergie potentielle d'un système. Ces éléments sont obtenus à partir de données expérimentales ou de calculs quantiques à haut degré de précision.

On distingue trois types de champs de forces différents :

- Champ de forces explicite

Ce type de champs de forces définit des paramètres différents pour tous les types d'atomes ou groupes d'atomes, y compris les hydrogènes. On définira aussi les différentes valeurs, à l'équilibre, des liaisons et angles entre tous les types d'atomes possibles. CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) est l'un des premiers champs de forces moléculaires explicites à avoir été conçu.^[214,215]

- Champ de forces unifié

Dans ce cas, on attribue des paramètres pour tous les atomes sauf les hydrogènes non polaires, ou en excluant totalement les hydrogènes. Les propriétés de ces hydrogènes sont en fait incluses dans les types atomiques des atomes lourds auxquels ils sont liés. OPLS-ua^[216] (Optimized Potential for Liquid Simulations – united atom) est un champ de forces de ce type.

- Champ de forces à « gros grains »

Les différents groupes (fonctions chimiques, acides nucléiques, acides aminés ...) sont simplifiés et représentés par un ou plusieurs objets représentant un groupe d'atomes.

Il existe de très nombreux champs de forces, chacun étant paramétré dans un but précis. En effet, un champ de forces est en général construit pour refléter le comportement d'un objet précis (protéine, ADN, catalyseur ...) ou les variations de certaines propriétés (moment dipolaire, enthalpie de sublimation ...).

Ainsi, le champ de forces AMBER (Assisted Molecular Building and Energy Refinement)^[217] a été optimisé spécifiquement pour les dynamiques moléculaires de sucres, protéines, ADN et ARN. MARTINI^[218] est quant à lui un champ de forces à « gros grains » initialement développé pour les dynamiques moléculaires de membranes lipidiques puis étendu aux protéines.

Même si la majorité des champs de forces sont basés sur des données expérimentales, ils présentent des défauts. Certains, par exemple, ne prennent pas en compte la polarisation de l'environnement, ce qui réduit de manière significative la valeur des interactions électrostatiques. Pour palier ce problème, on utilise des champs de forces polarisables ou des constantes diélectriques globales. Cependant, ces dernières ne reflètent pas les variations électrostatiques locales qui peuvent être importantes, notamment dans les membranes et les protéines. Les forces de van der Waals sont aussi très dépendantes de leur environnement. Ce qui n'est pas pris en compte en mécanique moléculaire.

Comme nous allons par la suite utiliser la version FF99SB^[219] du champ de forces explicite AMBER, c'est donc les équations employées dans celui-ci que nous allons détailler.

2.1.2.1 Vibration

On distingue deux types de vibrations qui sont modélisées de manières distinctes : l'élongation et la déformation.

2.1.2.1.1 Elongation

L'énergie d'élongation, aussi appelée énergie de liaison est fonction de la longueur r de la liaison, de sa longueur à l'équilibre r_0 et de la constante de force associée k_r . Dans AMBER on considère le ressort figurant la liaison comme un oscillateur harmonique, l'énergie de liaison prend donc une forme quadratique :

$$E_{\text{Elongation}} = \frac{1}{2}k_r(r - r_0)^2$$

Il est cependant possible de prendre en compte qu'une molécule est :

- peu compressible : la répulsion est très forte si r est inférieur à la somme des rayons de van der Waals des atomes r_0 .
- n'est pas infiniment extensible : pour une certaine énergie D_e il y a rupture de la liaison.

On peut utiliser pour cela l'approximation de Morse qui tient compte de ces impératifs, pour laquelle l'énergie de liaison devient :

$$E_{\text{Elongation}} = D_e [1 - e^{-\alpha(r-r_0)}]^2$$

$$\alpha = \sqrt{k_r/2D_e}$$

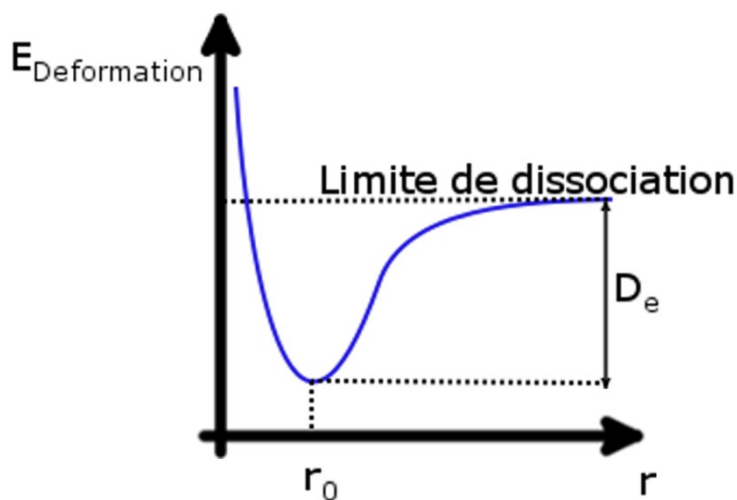


Figure 29 : Potentiel dans l'approximation anharmonique

2.1.2.1.2 Déformation

L'énergie de déformation caractérise la déformation d'un angle de liaison θ par rapport à sa valeur expérimentale θ_0 . On se limite dans ce cas à une approximation harmonique.

$$E_{\text{Deformation}} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

k_θ : constante de force de déformation

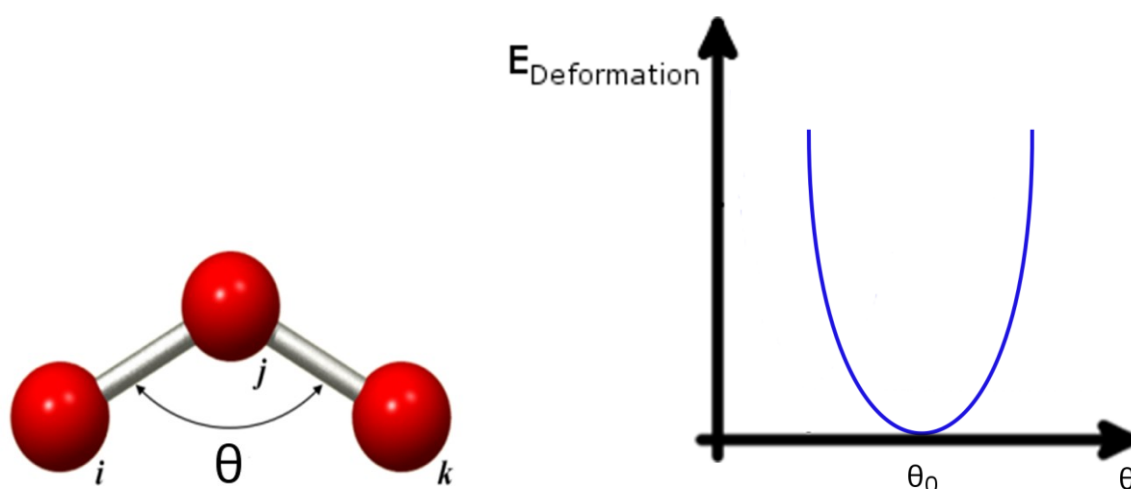


Figure 30 : Représentation d'un angle de déformation angulaire et potentiel associé

2.1.2.2 Torsion

On distingue deux types de torsion, liés chacun à un type d'angle dièdre différent.

2.1.2.2.1 Angle dièdre propre

L'énergie de torsion dépend de l'angle dièdre Φ , de sa périodicité $\frac{2\pi}{n}$ et de sa phase φ .

$$E_{\text{Torsion}} = \sum_{n=1}^3 \frac{k_n}{2} (1 + \cos(n\phi - \varphi_n))$$

k_n : barrière énergétique de rotation

Ce terme représente l'énergie nécessaire à la rotation autour d'une liaison.

Pour une meilleure approximation, on considère l'énergie de torsion d'un angle dièdre comme la somme des énergies pour plusieurs valeurs de n . Ce type de périodicité « mélangée » permet de favoriser certaines conformations parmi un ensemble de minima normalement équivalents ; on peut ainsi par exemple simuler la tendance du groupe R-O-P-O à adopter une conformation gauche plutôt que trans.

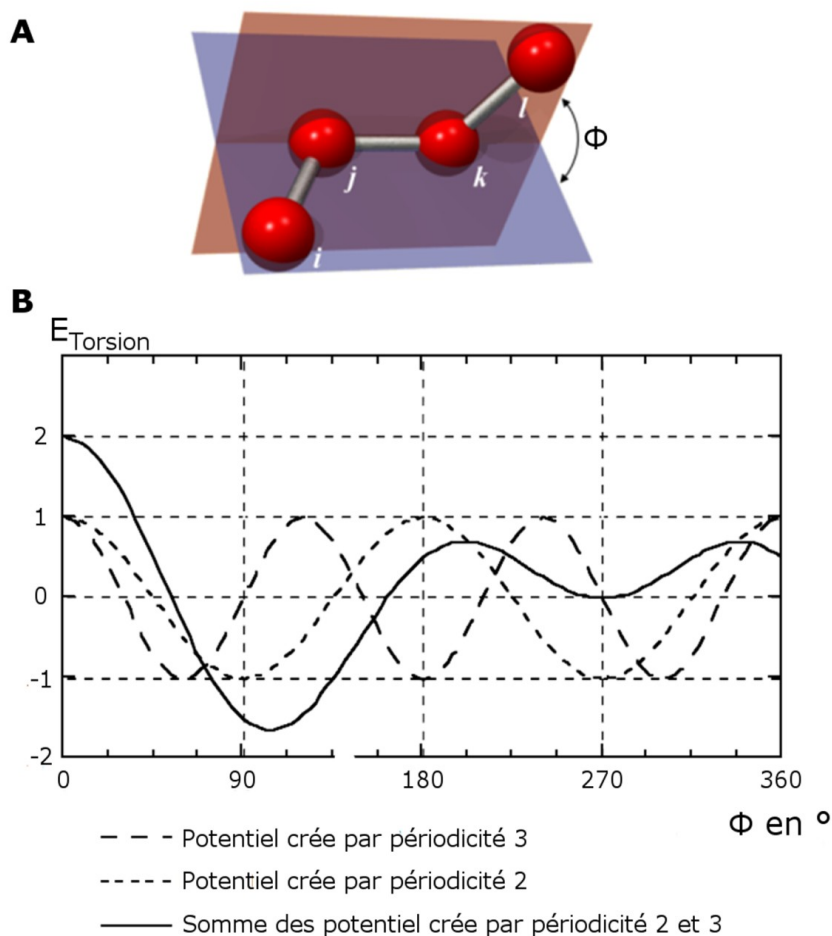


Figure 31 : Représentation d'une torsion (A) et variation du potentiel selon la périodicité (B)

2.1.2.2.2 Angle dièdre impropre

Le potentiel associé aux angles impropres a pour rôle principal de contraindre les systèmes aromatiques à la planéité ou de conserver les chiralités.

Un angle dièdre impropre Ψ est défini comme l'angle entre deux plans tracés par deux groupes de trois atomes différents (i, j, k) et (j, k, l).

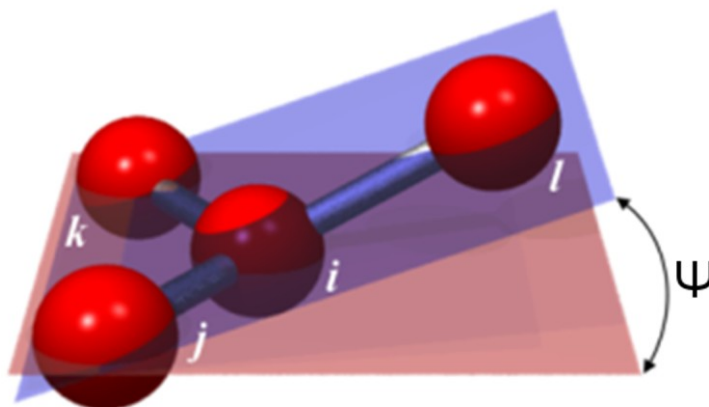


Figure 32 : Représentation d'un angle dièdre impropre

L'énergie quadratique associée est la suivante :

$$E_{\text{impropre}} = k_i(\Psi - \Psi_0)^2$$

k_i : force de la contrainte

Ψ_0 : angle impropre de référence

2.1.2.3 Interaction électrostatique

Cette énergie calculée entre atomes non liés dépend de la distance r entre les deux atomes, de leurs charges q et de la constante diélectrique ϵ . La constante diélectrique simule l'effet d'écran des charges par le solvant, en général on la considère dépendante de la distance entre les deux atomes.

$$E_{\text{Electrostatique}} = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

La distribution des électrons, considérée comme implicite, est localisée sur les liaisons et représentée par des charges atomiques partielles q .

2.1.2.4 Interaction de van der Waals

Ce terme, aussi nommé terme de Lennard-Jones, est représenté par un potentiel appelé potentiel 6-12.

$$E_{\text{vdw}} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

σ : distance interatomique pour laquelle le potentiel est égal à 0

ε : profondeur du puits de van der Waals à la distance σ

r : distance interatomique

Le terme en $-\sigma^6$ représente la dispersion attractive de London entre deux atomes et celui en σ^{12} la répulsion due à l'exclusion de Pauli.

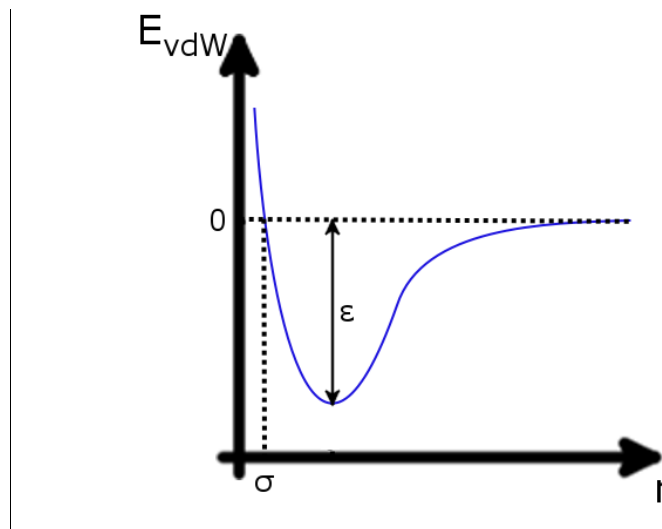


Figure 33 : Potentiel pour les interactions type van der Waals

2.1.3 Minimisation énergétique

Dans de nombreux cas, on veut étudier un système dans son état le plus stable, c'est-à-dire à son minimum d'énergie. La dérivation de la fonction d'énergie potentielle associée au champ de forces permet de déterminer la direction à prendre pour atteindre un minimum. Le minimum atteint n'est pas forcément le minimum global mais peut être le minimum local le plus proche du point de départ. (Figure 34) On utilise des méthodes de dynamique moléculaire particulières pour passer les différentes barrières énergétiques et atteindre le minimum global.

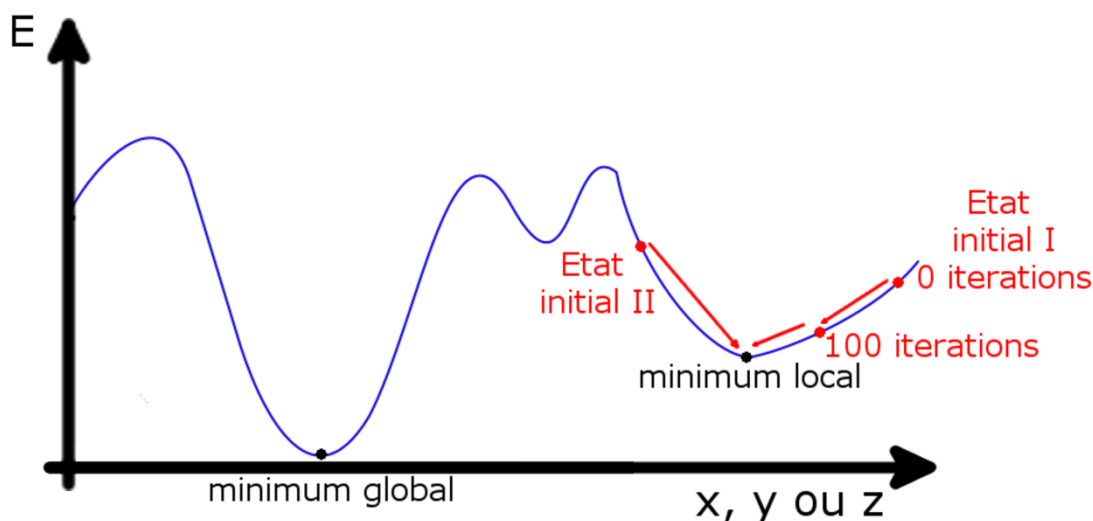


Figure 34 : Comportement classique d'une minimisation moléculaire

Chaque atome pouvant se déplacer dans les 3 dimensions de l'espace, la fonction d'énergie potentielle à minimiser d'une molécule à N atomes comprend donc 3N variables. A partir de la géométrie initiale, on recherche le jeu de coordonnées cartésiennes qui réduit à son minimum la somme de toutes les contributions énergétiques. On distingue les algorithmes de premier ordre, utilisant la dérivée première de la fonction énergie potentielle, et de second ordre, utilisant la dérivée seconde. Ces dernières étant plus précises mais plus coûteuses en temps de calcul. Nous n'utiliserons par la suite que deux méthodes de premier ordre : celles de la « plus grande pente » et du gradient conjugué.

2.1.3.1 Algorithme *steepest descent* ou de la plus grande pente

A partir d'une énergie potentielle initiale E_0 , chaque atome est déplacé individuellement selon ses coordonnées x, y, z d'un pas dx, dy, dz , puis la nouvelle énergie E est calculée. On peut donc assimiler la dérivée de l'énergie potentielle à la variation d'énergie ΔE .

$$\frac{dE}{d(x, y, z)} = \Delta E = E - E_0$$

On peut donc, à partir du signe du ΔE , connaître le sens de variation de l'énergie potentielle.

- Si $\Delta E < 0$, la variation de coordonnées a permis de diminuer l'énergie
- Si $\Delta E > 0$, la variation de coordonnées a permis d'augmenter l'énergie

L'itération suivante définit le déplacement de chaque atome sur une distance dépendante de ΔE . Cet algorithme suivra donc la direction imposée par les forces interatomiques dominantes et consiste à rechercher la direction de la plus grande pente au cours de laquelle l'énergie décroît le plus rapidement. Cette méthode converge rapidement dans les premiers cycles mais très lentement sur les derniers.

2.1.3.2 Algorithme du gradient conjugué

Cet algorithme est une amélioration de la méthode de la « plus grande pente » : le pas est ajusté à chaque cycle en fonction des cycles précédents afin d'obtenir la meilleure diminution d'énergie et d'augmenter la convergence. Le temps de convergence reste le facteur limitant en plus de son inefficacité en cas de point de départ trop haut en énergie.

2.1.4 Equation de mouvement

L'accès à la trajectoire des différents atomes se fait par la résolution de l'équation du mouvement. Cette équation peut être envisagée sous trois formalismes différents : Newton, Lagrange et Hamilton. Nous ne détaillerons ici que les équations de Newton.

La mécanique de Newton est régie par l'équation de mouvement :

$$\sum \vec{F} = m\vec{a}$$

Que l'on écrit pour chacune des N particules du système :

$$\sum \vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2}$$

On doit donc connaître l'ensemble des forces \vec{F} qui s'appliquent sur chaque particule i et sa masse m pour pouvoir accéder à son accélération \vec{a} . L'accélération permettant de remonter ensuite jusqu'au vecteur position \vec{r} .

Or comme

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}E$$

E étant l'énergie potentielle accessible par le champ de forces.

Avec

$$\vec{\nabla} = \frac{\partial}{\partial x} \vec{i} + \frac{\partial}{\partial y} \vec{j} + \frac{\partial}{\partial z} \vec{k}$$

$\vec{i}, \vec{j}, \vec{k}$: vecteurs unitaires du repère

On a donc un système composé de N équations différentielles couplées du second degré en \vec{r} à résoudre pour obtenir la trajectoire de chaque particule i du système. Pour cela, on a besoin de N conditions initiales : les N positions initiales \vec{r}_{i0} .

2.1.5 Intégrateur

Pour résoudre ces équations, on a besoin de discrétiser en temps. Ceci est réalisé en utilisant ce que l'on appelle des intégrateurs. Il existe plusieurs algorithmes différents

(velocity Verlet, position Verlet, leap frog ...) et celui que nous allons utiliser dans nos simulations est l'algorithme *leap frog* ou saute-mouton.

Dans cet algorithme, les vitesses et la position des atomes sont calculées à des instants alternés $\frac{\delta t}{2}$ et δt , et les vitesses font explicitement partie de l'algorithme qui calcule les nouvelles positions.

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \delta t + O(\delta t^3)$$

On calcule ainsi la vitesse de chaque atome i à l'instant $t + \frac{\delta t}{2}$ à partir de la force totale $\vec{F}_i(t)$ et de la vitesse à l'instant $t - \frac{\delta t}{2}$. La nouvelle position de l'atome est obtenue par la relation

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) \delta t$$

Dans laquelle la vitesse à l'instant $t - \frac{\delta t}{2}$ est directement insérée.

Pour initier l'algorithme, on doit donner la position $\vec{r}_i(0)$ de chaque atome i à l'instant $t=0$ de la simulation et la vitesse $\vec{v}_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right)$ à l'instant précédent $t - \frac{\delta t}{2}$. On calcule également la force totale $\vec{F}_i(0)$ à l'instant $t=0$. L'algorithme permet d'intégrer le mouvement $\vec{r}_i(t+\delta t)$ aux instants ultérieurs.

D'autres algorithmes écrits à des ordres supérieurs existent. Ils peuvent être plus précis mais sont toujours plus coûteux en temps de calcul car il faut garder en mémoire beaucoup plus de données. Ils ne seront pas forcément meilleurs pour permettre de conserver les grandeurs qui doivent l'être tout au long de la simulation comme l'énergie totale.

2.1.6 Ensembles thermodynamiques

En physique, c'est la connaissance de la fonction de partition d'un système qui permet d'accéder à l'ensemble des grandeurs thermodynamiques. L'apport des simulations numériques est de permettre le calcul des moyennes d'ensemble sans avoir à calculer la fonction de partition explicitement. Il existe plusieurs ensembles thermodynamiques en mécanique statistique : l'ensemble microcanonique, l'ensemble canonique, l'ensemble grand canonique et l'ensemble isobare-isotherme. Les ensembles sont caractérisés par leurs grandeurs constantes ($N, V, E, P, T \dots$), les autres grandeurs n'étant connues que par une valeur moyenne d'ensemble.

2.1.6.1 Ensemble microcanonique NVE

Le nombre de particules N , le volume V et l'énergie E sont constants. Ce qui correspond à un système totalement isolé. Cet ensemble n'est pas l'ensemble naturel pour des observations expérimentales, mais c'est celui imposé *de facto* par les équations de mouvement qui conservent l'énergie.

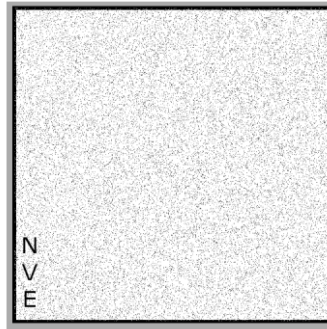


Figure 35 : Représentation d'un système microcanonique

2.1.6.2 Ensemble canonique NVT

Dans l'ensemble canonique, le système est caractérisé par un nombre de particules N , un volume V et une température T constants, ce qui veut dire que seuls les échanges thermiques (δQ) sont possibles. Les simulations de Monte-Carlo sont naturellement les plus adaptées pour générer les états de cet ensemble, on peut cependant modifier les équations de Newton pour atteindre le même objectif avec des simulations de dynamique moléculaire classiques.

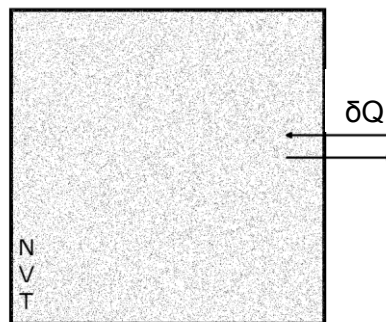


Figure 36 : Représentation d'un système canonique

2.1.6.3 Ensemble grand canonique $VT\mu$

Le volume V , la température T et le potentiel chimique μ , reflétant la variation d'énergie libre G par rapport à la quantité de matière n , sont constants.

$$\mu = \frac{\partial G}{\partial n}$$

Pour explorer les états de cet ensemble, il faut notamment être capable de faire varier le nombre de particules et pouvoir calculer le potentiel chimique, ce qui n'est pas trivial. Les simulations de Monte-Carlo sont les plus appropriées pour atteindre cet objectif.

2.1.6.4 Ensemble isobare-isotherme NPT

Comme son nom l'indique, la pression P, la température T mais aussi le nombre de particules N sont constants, donc les échanges thermiques et les variations de volume (δV) sont tolérés. C'est l'ensemble le plus commun avec le NVT pour les dynamiques moléculaires de systèmes protéiques.

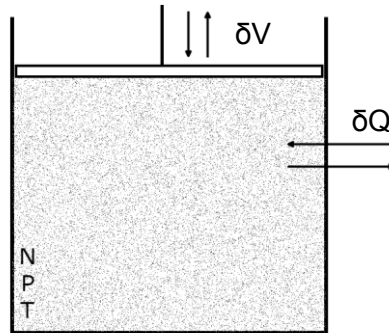


Figure 37 : Représentation d'un système isobare-isotherme

2.1.7 Thermostats

Pour les dynamiques en ensemble à T constante, les équations de Newton doivent être modifiées pour pouvoir contrôler cette température.

On sait que la température est liée à l'énergie cinétique du système par l'équation :

$$E_{cin} = \sum_{i=1}^{N_{atomes}} \frac{1}{2} m_i v_i^2 = \frac{k_b T}{2} \times 3(N - N_c)$$

E_{cin} : énergie cinétique

k_b : constante de Boltzman

m_i : masse de la particule i

v_i : vitesse de la particule i

N_c : Nombre de degrés de liberté contraints ou sans impact sur l'énergie

$3(N - N_c)$: nombre de degrés de liberté

L'objectif est donc de modifier tout ou partie des vecteurs vitesse du système pour ajuster la température. Ce qui peut se faire grâce à différents thermostats.

2.1.7.1 Thermostat de Berendsen

Ce thermostat ne contrôle pas à proprement parler la température, mais se contente de la ramener à la valeur référence T_0 à intervalles de temps réguliers τ .^[220] Ce qui en équation donne :

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau} (T_0 - T(t))$$

On ajuste ensuite toutes les vitesses du système d'un facteur λ tel que :

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)$$

δt : pas d'intégration

ΔT : variation de température

2.1.7.2 Thermostat de Langevin

Ce thermostat introduit un terme supplémentaire à l'Hamiltonien de la dynamique classique, celui-ci est un terme de « friction ».^[221] Il mime les collisions à grande vitesse qui peuvent survenir quand le système est en solution. Les particules considérées sont fictives, elles ont donc une masse nulle et ne font aucune interaction.

On obtient donc une nouvelle équation de mouvement de la forme suivante :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = -\vec{\nabla} E_i - \gamma m_i \vec{v}_i + \sqrt{2\gamma k_b T m_i} \vec{R}(t)$$

\vec{F}_i : force total appliquée sur l'atome i

\vec{a}_i : accélération de l'atome i

\vec{v}_i : vitesse de l'atome i

m_i : masse de l'atome i

E_i : énergie de l'atome i

γ : probabilité de collision de la particule fictive

k_b : constante de Boltzman

$\vec{R}(t)$: fonction aléatoire de moyenne zéro sur la durée de la dynamique

2.1.8 Problèmes pratiques

Dans les faits, on se trouve confronté à différents problèmes dus aux conditions aux limites et à la taille des systèmes de simulation. Il est nécessaire de trouver un compromis entre précision des résultats et temps de simulation.

2.1.8.1 Gestion du solvant

Simuler un système dépourvu de solvant, en plus de ne pas être réaliste, amènerait une déformation importante. En effet, la tension de surface tend à rendre le système plus compact, jusqu'à le rendre globulaire, pour diminuer la surface moléculaire en interface avec le vide. Ceci est bien sûr gênant pour les systèmes non sphériques comme l'ADN ou certaines protéines.

Le solvant peut être traité de deux manières différentes : implicitement ou explicitement.

2.1.8.1.1 Solvation implicite

Aussi appelée solvation continue, cette méthode représente le solvant comme un continuum au lieu de particules. Ces milieux sont continus mais pas forcément homogènes, leurs propriétés pouvant être décrites par différentes fonctions. Cela permet par exemple de simuler des bicouches lipidiques. Le modèle le plus connu est le *Generalized Born*^[222] qui est de la forme :

$$\Delta G_s = \frac{1}{8\pi} \left(\frac{1}{\epsilon_0} - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_{i,j}^N \frac{q_i q_j}{f_{GB}}$$

Où

$$f_{GB} = \sqrt{r_{ij}^2 + a_{ij}^2} e^{-D}$$

Et

$$D = \left(\frac{r_{ij}}{2a_{ij}} \right)^2, a_{ij} = \sqrt{a_i a_j}$$

ΔG_s : énergie libre de solvation

N : nombre de particules

ϵ_0 : permittivité du vide

ϵ : constante diélectrique du solvant modélisé

q_i : charge électrostatique de la particule i

r_{ij} : distance entre les particules i et j

a_i : rayon de Born effectif. Cette valeur représente le niveau d'enfouissement de la particule i dans le soluté. Ce peut être par exemple la distance entre la particule et la surface moléculaire. La définition de a_i est critique pour ce modèle de solvant.

Ce modèle de solvation, bien que peu gourmand en ressources, souffre de quelques défauts. La contribution entropique due à l'interaction hydrophobe n'est que peu, voire pas, prise en compte. Par exemple, la restriction conformationnelle des chaînes latérales du

segment transmembranaire d'une protéine est inexistante. Les liaisons hydrogène avec le solvant sont bien sûr absentes. Même si l'effet énergétique global peut être reproduit par les solvants implicites, l'importance individuelle des liaisons n'est pas considérée. On ignore notamment les liaisons hydrogènes entre acides aminés relayées par une molécule de solvant.

2.1.8.1.2 Solvation explicite

Cette fois, le solvant est physiquement présent dans la simulation. Il existe parfois de nombreux modèles pour un même solvant, comme c'est le cas pour l'eau. (Figure 38)

Dans tous les modèles, l'énergie d'interaction E_{ij} entre les particules i et j est calculée de la même façon : l'interaction électrostatique est modélisée par la loi de Coulomb et la répulsion par le potentiel de Lennard-Jones.

$$E_{ij} = \frac{k_C q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6}$$

k_C : constante électrostatique

q_i : charge partielle dépendante du modèle

r_{ij} : distance entre les atomes ou sites chargés i et j

A et B : sont les paramètres de Lennard-Jones

La molécule d'eau est représentée différemment selon le modèle.

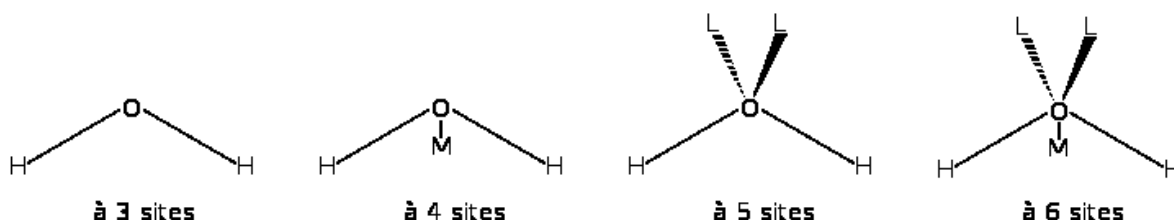


Figure 38 : Différents modèles de molécules d'eau

M : centre de masse, c'est sur ce centre de masse qu'est placée la charge négative de l'oxygène quand il est pris en compte.

L : Paires libres de l'oxygène

Le modèle le plus utilisé est le modèle TIP3P^[223], modèle à 3 sites caractérisé par les paramètres suivants :

$r(\text{OH}), \text{Å}$	0,9572	$B, \text{kcal Å}^6/\text{mol}$	595,0
$\text{HOH}, ^\circ$	104,52	$q(\text{O})$	-0,834
$A \times 10^{-3}, \text{kcal Å}^{12}/\text{mol}$	582,0	$q(\text{H})$	+0,417

Table 7 : Caractéristiques du modèle TIP3P

$r(\text{OH})$: distance O-H

HOH : angle H-O-H

A et B : paramètres de Lennard-Jones

q : charge partielle

2.1.8.2 Conditions aux limites

Dans un système réel, on doit considérer un très grand nombre de molécules (de l'ordre du nombre d'Avogadro $6,02 \cdot 10^{23}$), dont très peu sont ainsi influencées par les limites (interface air-solvant, parois...). Pour imiter cette situation, la simulation se passe dans une boîte répliquée dans toutes les directions de l'espace. On parle de conditions périodiques.

Il existe de multiples formes de boîtes :

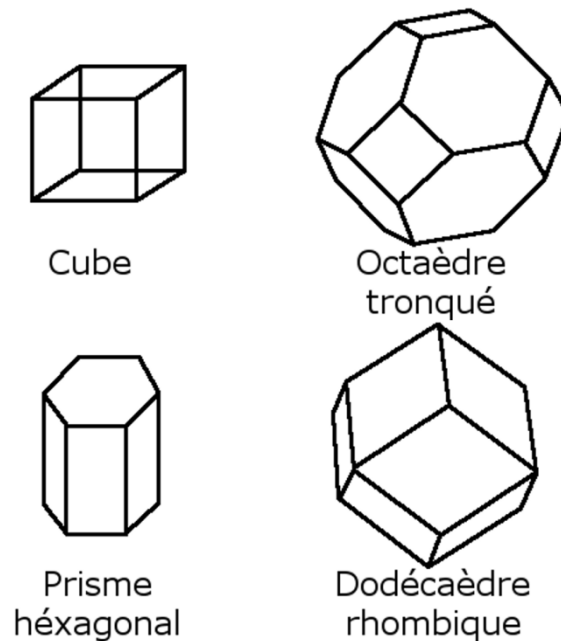


Figure 39 : Boîtes de simulation couramment utilisées

La boîte centrale, appelée boîte principale, est la seule où sont réalisés les calculs. Toutes les autres boîtes sont des répliques de celle-ci

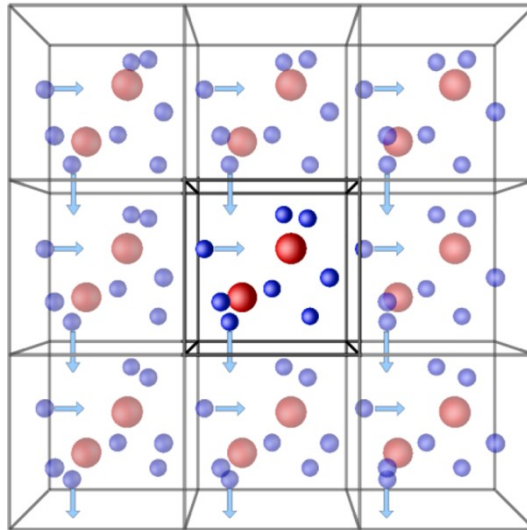


Figure 40 : Application des conditions périodiques à la boîte centrale

Toute particule qui, au cours de son mouvement, sort par un côté de la boîte principale a son image qui entre dans la boîte la plus proche ; par symétrie une copie exacte de cette particule entre dans la boîte par le côté opposé. On a donc toujours un nombre constant de N particules dans la boîte principale. Les interactions sont calculées en tenant compte des particules présentes dans les boîtes voisines.

2.1.8.3 Gestion du potentiel

Malgré la taille limitée du système, le nombre d'interactions à calculer est très important et monopolise beaucoup de ressources (jusqu'à 90% du temps de calcul). Il est donc nécessaire, dans la grande majorité des cas, d'alléger le nombre d'interactions à calculer. Les interactions non liées diminuant rapidement avec la distance (décroissance en $\frac{1}{r^6}$ pour les interactions de van der Waals et en $\frac{1}{r}$ pour les interactions Coulombiennes), certaines peuvent être négligées.

2.1.8.3.1 Rayon de coupure (cut-off)

On définit simplement une limite de distance au-delà de laquelle les interactions sont négligées. Là aussi, les particules présentes dans les boîtes adjacentes sont considérées pour le calcul de ces interactions.

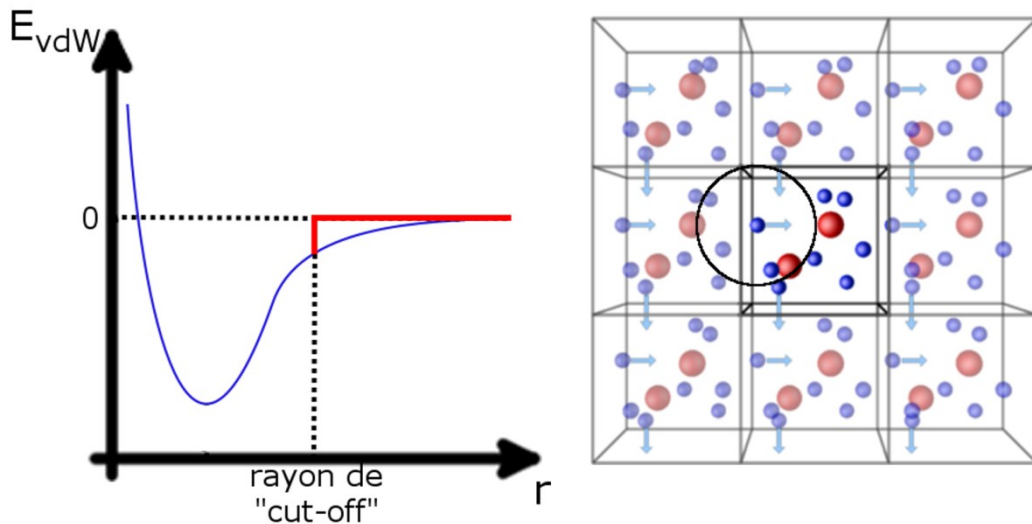


Figure 41 : Gestion du potentiel de Van der Waals par *cut-off*

Le rayon de *cut-off* doit être plus petit que la moitié de la taille de la boîte, sinon il engloberait la totalité de cette dernière et toutes les interactions seraient calculées deux fois.

Pour gagner un peu de temps de calcul, une liste de voisins est générée et mise à jour tous les n pas pour chaque particule. Seules les interactions avec les particules de la liste sont calculées. On appelle cette liste la liste de Verlet.

2.1.8.3.2 *Cut-off par groupe*

Dans cette approximation, on prend en compte le fait que les interactions charge-charge décroissent plus lentement ($\sim \frac{1}{r}$) que les interactions dipôle-dipôle ($\sim \frac{1}{r^3}$). Les particules sont donc réparties en deux groupes selon leurs charges nettes (égale à 0 ou non) et les *cut-off* utilisés sont différents.

2.1.8.3.3 *Fonction de shift et de switch*

Avec la technique du *cut-off*, il y a une discontinuité au niveau de la distance limite. Ce changement brutal peut induire un échauffement du système. Il est donc préférable d'envisager un retour plus doux du potentiel à 0 par *switch* ou par *shift*.

La fonction de *shift* permet de décaler la courbe d'énergie potentielle afin qu'elle atteigne 0 pour une valeur de r égale au *cut-off*.

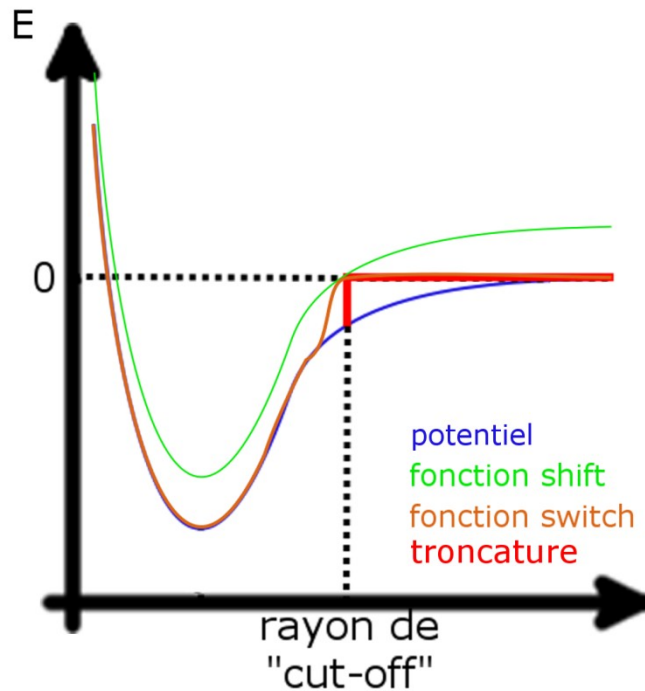


Figure 42 : Application de la fonction de *shift* (en vert) et de la fonction de *switch* (orange) à un potentiel de van der Waals

La fonction de *switch* prend le relais de la courbe d'énergie potentielle pour les valeurs de r supérieures à r_d afin de ramener progressivement le potentiel à 0 pour une valeur de r égale au *cut-off*.

Cependant, l'utilisation de telles fonctions peut modifier l'équilibre entre les forces à courte et longue portée et modifier légèrement le comportement du système.

2.1.8.3.4 *Twin range cut-off*

Cette méthode consiste à définir deux *cut-off* différents : un premier qui englobera les interactions à courte portée et un autre pour les interactions à moyenne portée.

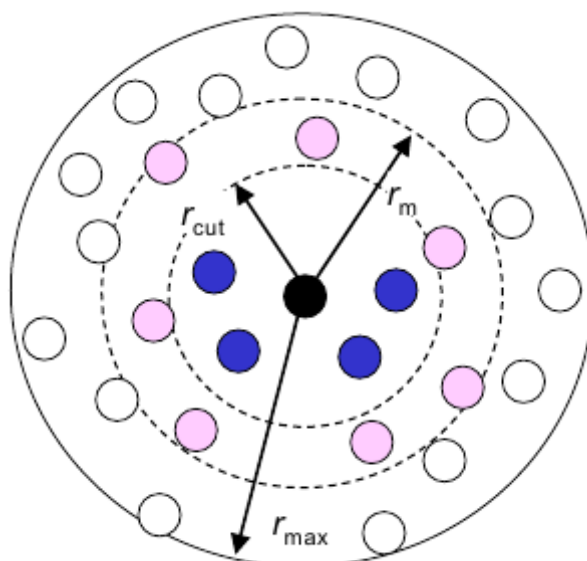


Figure 43 : Représentation de la méthode *twin-range cut-off*. En noir l'atome d'intérêt, en bleu les atomes qui sont considérés à courte portée, en rose à moyenne portée et en blanc à longue portée.

Les interactions à courte portée sont évaluées à chaque pas. Les interactions à moyenne portée (dites de portée intermédiaire) sont évaluées lorsque la liste des voisins est mise à jour et, sinon, considérées constantes. Les interactions à courte portée ont un poids plus important que les interactions à moyenne portée.

Avec ce modèle, on ne tient cependant toujours pas compte des interactions à longue portée, ce qui est gênant quand on traite des systèmes fortement chargés (ADN, lipides, solutions salines...).

2.1.8.3.5 « Particle Mesh Ewald » (PME) ou maillage particulaire d'Ewald

Cette méthode utilise la périodicité supposée infinie du système. Cette périodicité permet de remplacer la sommation directe de l'énergie d'interaction E_{ij} entre chaque particule i et j :

$$E_{ij} = \frac{k_c q_i q_j}{r_{ij}}$$

k_c : constante électrostatique

q_i : charge partielle dépendante du modèle

r_{ij} : distance entre les atomes ou sites chargés i et j

La somme d'Ewald^[224] est la décomposition des interactions électrostatiques en deux termes :

$$E = \sum_{i,j} E_{ij} = E_{sr} + E_{lr}$$

Où E_{sr} est la somme directe des interactions à courte portée (interaction avec les particules de la boîte principale) :

$$E_{sr} = \sum_{i,j} \varphi_{sr}(r_j - r_i)$$

φ_{sr} est le potentiel électrique calculé de manière classique en utilisant les méthodes de *cut-off* et de liste de Verlet.

E_{lr} est l'intégration dans l'espace de Fourier des interactions longue portée (interactions avec les particules des boîtes adjacentes) :

$$E_{lr} = \sum_k \tilde{\varphi}_{lr}(k) |\tilde{\rho}(k)|$$

$\tilde{\varphi}_{lr}$: transformée de Fourier du potentiel électrique

$\tilde{\rho}$: transformée de Fourier de la densité de charge

Ces deux termes convergent rapidement dans leur espace respectif (réel et de Fourier) et peuvent être tronqués avec une perte de précision minimale, ce qui permet de gagner en temps de calcul. Cette formulation tient compte des différents types d'interactions électrostatiques : courte, moyenne et très longue portée (jusqu'à plusieurs fois la taille du système).

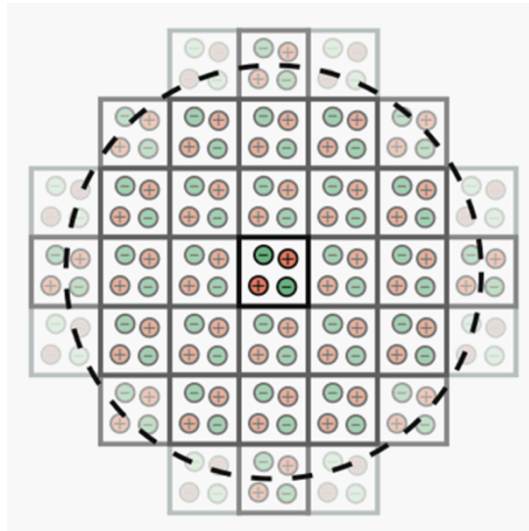
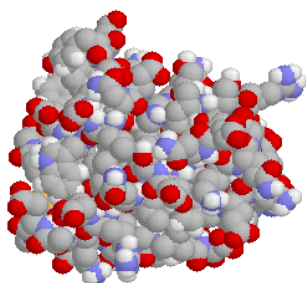


Figure 44 : Représentation du système selon la théorie d'Ewald, le cercle noir représente la distance après laquelle on considère que la somme d'Ewald a convergé.

2.1.9 Champ d'applications et limites

La dynamique moléculaire a un champ d'application très large. Initialement issue de la recherche en physique théorique, elle est très vite devenue populaire en sciences des matériaux car elle permet d'étudier ou de prédire leurs propriétés mécaniques et thermodynamiques. En chimie, on l'utilise principalement pour la détermination et l'affinement de structures complexes (polymères, protéines ...) en se basant sur des données expérimentales issues d'outils comme la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ou la cristallographie à rayons X.

Il existe cependant plusieurs limites ; la première, et la plus importante, étant celle du temps de simulation. En effet, le temps de calcul augmente de façon exponentielle avec la taille du système étudié. Ceci est dû majoritairement à l'augmentation drastique du nombre d'interactions devant être calculées à chaque pas.



Protéine dans le vide :

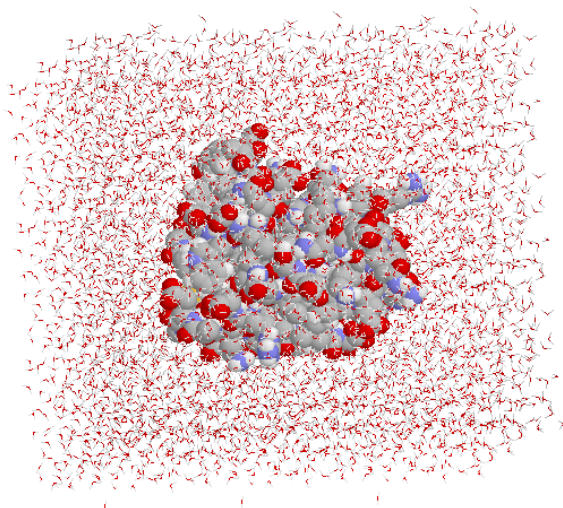
915 atomes

1 354 angles de valence

483 angles dièdres

415 390 interactions de van der Waals

415 390 interactions électrostatiques



Protéine dans une boîte d'eau :

18 114 atomes

7 087 angles de valence

483 angles dièdres

164 029 477 interactions de van der Waals

164 029 477 interactions électrostatiques

Figure 45 : Evolution du nombre d'interactions à calculer en fonction de la taille du système

Or l'étude de certains phénomènes, comme le repliement d'une protéine, nécessite des simulations longues de l'ordre de la nanoseconde à la seconde. Le temps de simulation et la taille du système vont dépendre de l'objectif de l'étude. Le calcul de propriétés thermodynamiques est plus précis si la simulation est longue mais en général on peut se contenter de quelques dizaines de nanosecondes. Si le but est d'observer un mouvement ou

l'évolution vers un état particulier, le temps de simulation nécessaire peut être beaucoup plus long. (Figure 46)

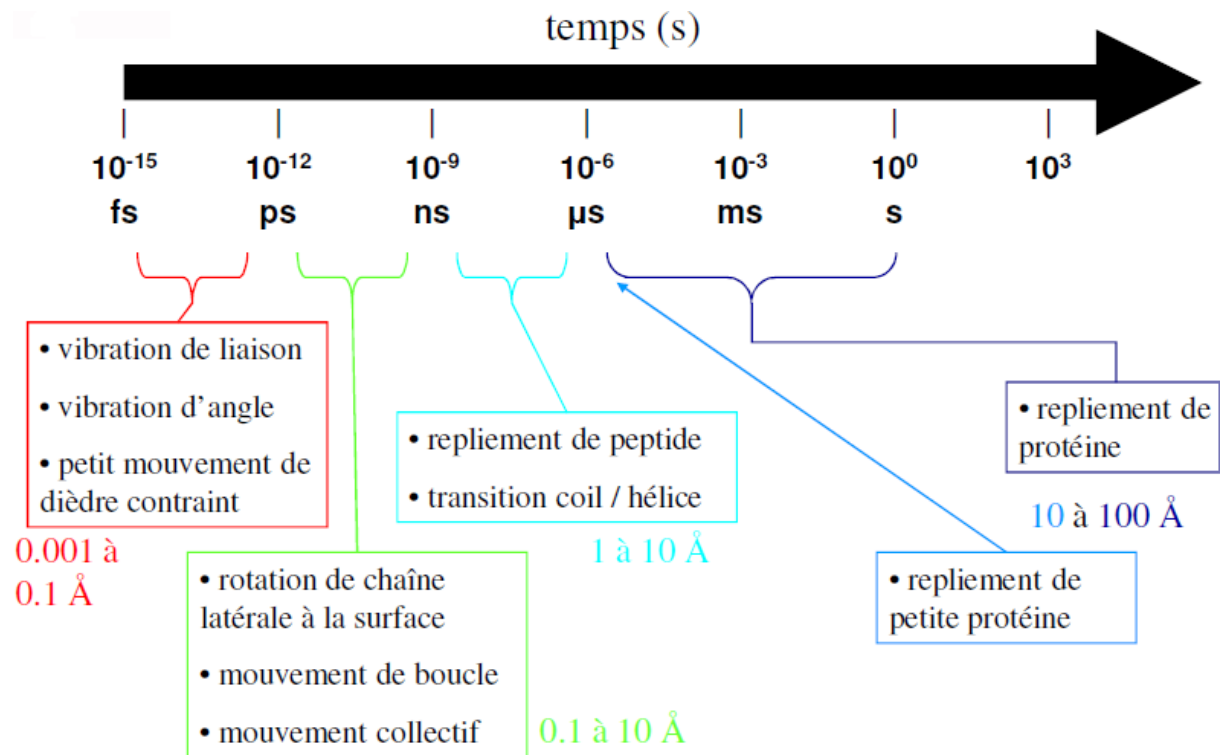


Figure 46 : Echelle temporelle de différents mouvements protéiques

Le second problème majeur de la dynamique est celui des événements rares. Chaque système a un profil énergétique déterminé et la majorité des états ne sont pas énergétiquement équivalents. Les états de plus haute énergie ou séparés par une grande barrière énergétique sont rarement atteints.

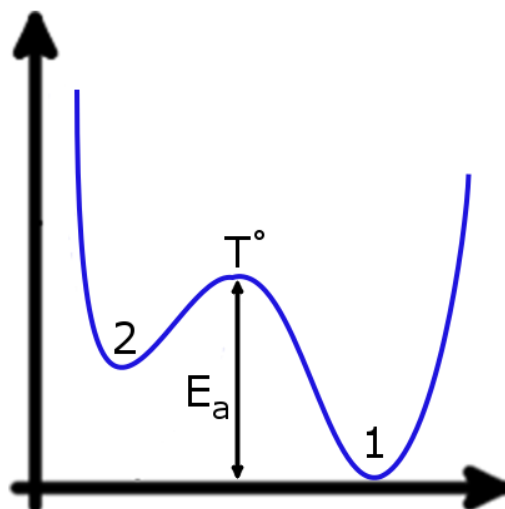


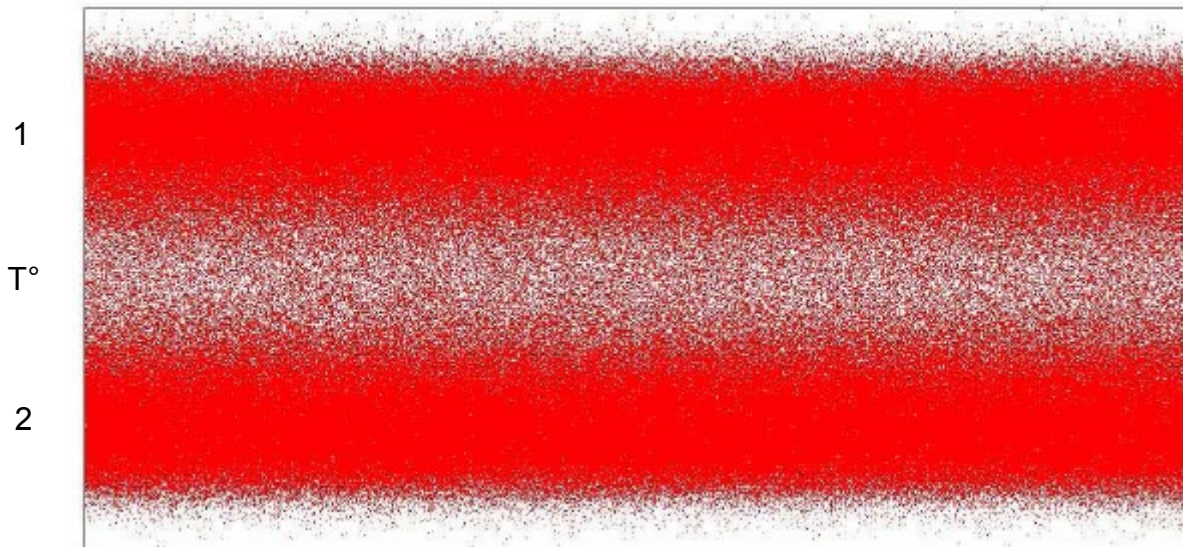
Figure 47 : Exemple de profil énergétique

E_a : énergie d'activation

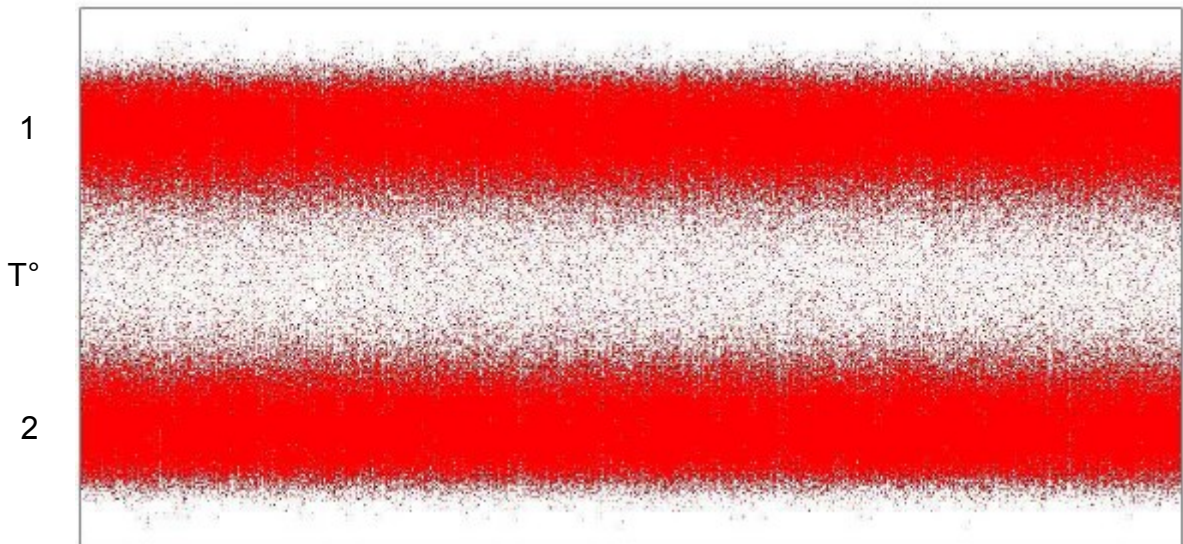
1,2 : états stables

T° : état de transition

Ceci est dû au fait que, dans la plupart des simulations, l'énergie est gardée constante ou quasi-constante. Les fluctuations d'énergie locale sont de faible amplitude et rarement suffisantes pour provoquer la transition. Le temps de résidence du système dans l'état de plus basse énergie est le plus important tandis que pour les hautes barrières énergétiques (E_a) le temps de transition, et par extension la chance d'échantillonner l'état de transition, est quasi-négligeable.



$$E_a = 2k_bT$$



$$E_a = 5k_bT$$

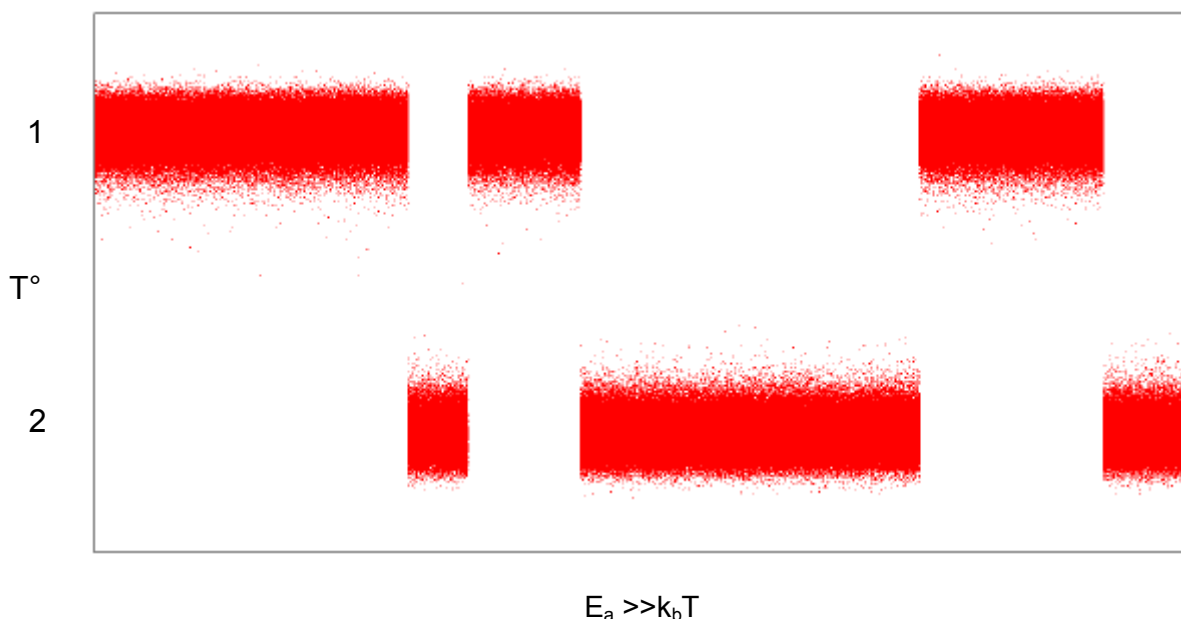


Figure 48 : Evolution de la population du système pour différentes valeurs de l'énergie d'activation E_a

Ces événements rares peuvent être obtenus si la simulation est assez longue (microseconde, seconde, minute), mais cela nécessite des ressources de calcul conséquentes et beaucoup de temps. Il est possible d'atteindre plus facilement ces états rares en augmentant la température du système mais certains phénomènes se passent différemment en fonction de la température. Il existe d'autres méthodes basées sur un potentiel biaisé qui donnent le même résultat sans changer la température mais qui nécessite de connaître les ou la coordonnée de réaction.

2.2 Protocole d'analyse

La comparaison, ou plus largement l'analyse, de simulations dynamiques longues n'est pas une chose triviale. La grande quantité de mouvements parasites, la longueur des simulations et le grand nombre d'atomes affichés simultanément empêchent une analyse visuelle claire et efficace. Notre objectif étant d'étudier les mouvements du squelette peptidique du récepteur CD1d, nous avons choisi d'analyser nos trajectoires par dihedral Principal Component Analysis (dPCA). C'est une méthode qui présente l'avantage d'être exhaustive, moins lourde que l'analyse en composante principale basée sur les coordonnées cartésiennes et qui permet d'identifier précisément des groupes d'acides aminés charnières.^[225]

La dPCA est une méthode d'analyse qui se déroule en deux étapes successives. La première est une étude de paysage énergétique unidimensionnel (1D) où l'objectif est d'identifier les angles dièdres, ou torsions peptidiques, dont le comportement diffère en présence d'un ligand Th1 ou Th2. Cela implique de pouvoir comparer le paysage énergétique d'un même angle lors de simulations différentes, ce qui peut être fait en se basant sur deux critères : la différence d'harmonicité ou la similarité. Une Analyse en

Composante Principale (ACP) est ensuite réalisée sur les torsions identifiées pour évaluer si leurs variations sont corrélées et spécifiques (non dues à l'agitation thermique). Il est possible d'utiliser les composantes principales issues de l'ACP pour réduire la dimensionnalité du problème et permettre la représentation du paysage d'énergie libre global de la protéine (paysage énergétique 3D).

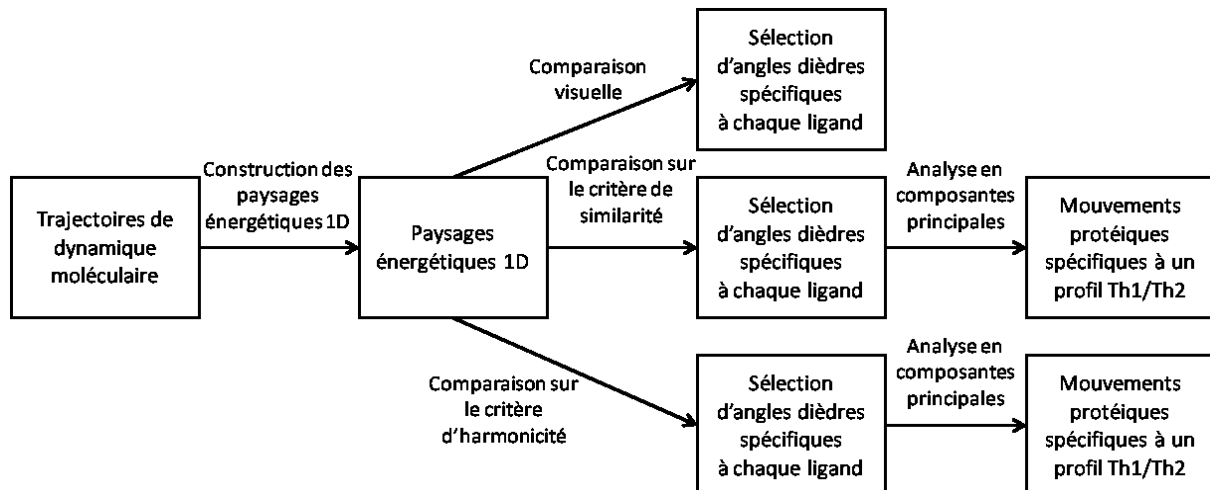


Figure 49 : Protocole d'analyse des simulations

2.2.1 Etude du paysage énergétique 1D

2.2.1.1 Abstraction moléculaire

Dans l'optique d'étudier l'impact des différents ligands sur la structure globale du récepteur CD1d, on peut se contenter d'analyser les fluctuations des carbones α de la protéine.

Au contraire d'une analyse en composante principale classique qui s'appuie sur les coordonnées cartésiennes, la dPCA se base sur la valeur des angles dièdres formés par 4 carbones α consécutifs.

L'utilisation des angles dièdres permet de simplifier le système et de réduire le nombre de variables à analyser sans pour autant perdre de l'information structurale. Pour une protéine à n acides aminés, on passe de $3n$ variables en coordonnées cartésiennes (une par coordonnée) à $n-3$ (une par angle dièdre, sauf pour les 3 derniers résidus) dans l'espace des angles dièdres. Dans le cas des carbones α du récepteur CD1d (373 acides aminés), on réduit donc le nombre de variables de 1119 à 370, ce qui accélère significativement le processus d'analyse.

2.2.1.2 Calcul du paysage d'énergie libre

Le paysage d'énergie libre, ou Free Energy Landscape (FEL) du squelette peptidique total est complexe à représenter puisqu'il dépend de la variation individuelle de chaque angle dièdre. Il ne peut donc être représenté que dans un paysage à N dimensions, où N est le nombre d'angles dièdres utilisé pour décrire la protéine. Cependant, chaque angle dièdre

reflète le comportement d'un fragment de la protéine (4 résidus), il est donc possible d'avoir un aperçu du paysage énergétique local en représentant le FEL d'un angle dièdre particulier.

Le paysage d'énergie libre d'un angle dièdre est calculé en utilisant une formule dérivée de la loi de Boltzmann :

$$F(\gamma_i) = -k_b T \ln[p(\gamma_i)]$$

Où :

$F(\gamma_i)$ est l'énergie libre associée à la probabilité $p(\gamma_i)$, issue de la dynamique moléculaire, que l'angle i prenne une valeur γ

k_b est la constante de Boltzmann

T est la température en Kelvin (K)

$p(\gamma_i)$ est la probabilité que l'angle dièdre i prenne la valeur γ

On remarquera que le temps n'est pas pris en compte dans cette équation. On ne peut pas différencier les cas où γ a une occurrence totale de a car le système est resté dans la même conformation pendant un temps T de ceux où il a adopté cette conformation plusieurs fois au cours de la dynamique pour un temps cumulé T .

2.2.2 Détection des angles dièdres d'intérêt

Les paysages énergétiques obtenus sont une suite de graphiques 1D associés à un système protéine-ligand qu'il est laborieux de comparer objectivement. Le moyen le plus simple et le plus rapide reste la comparaison systématique sur deux critères complémentaires : la similarité et l'harmonie. L'ACP permet ensuite l'identification des potentiels angles dièdres charnières et des mouvements associés. Une dernière étape permet de vérifier que ces différents mouvements sont bien significatifs et non pas simplement dus à l'agitation thermique (mouvements Browniens).

2.2.2.1 Indice de similarité

L'indice de similarité S , est défini comme suit^[226] :

$$S(i)^{traj1/traj2} = \frac{2 \int_{-\pi}^{+\pi} p_{traj1}(\gamma_i) p_{traj2}(\gamma_i) d\gamma_i}{\int_{-\pi}^{+\pi} p_{traj1}^2(\gamma_i) d\gamma_i + \int_{-\pi}^{+\pi} p_{traj2}^2(\gamma_i) d\gamma_i}$$

Où :

$S(i)^{traj1/traj2}$ est la similarité de l'angle dièdre i entre les simulations $traj1$ et $traj2$

$p_{traj1}(\gamma_i)$ est la probabilité que l'angle dièdre i ait une valeur γ_i lors de la trajectoire $traj1$

$p_{traj2}(\gamma_i)$ est la probabilité que l'angle dièdre i ait une valeur γ_i lors de la trajectoire $traj2$

Cet indice varie entre 0 et 1 et reflète le taux recouvrement des fonctions de densité de probabilité $p_{traj1}(\gamma_i)$ et $p_{traj2}(\gamma_i)$. Si S est égal à 0, alors les fonctions ne se recouvrent pas et sont donc totalement dissimilaires. Au contraire, si S est égal à 1, le recouvrement est parfait et les fonctions sont identiques. De cette façon, la comparaison prend en compte à la fois la forme et l'amplitude des fonctions de densité de probabilité. Cependant, cela ne fournit aucune information sur la nature du FEL en lui-même (harmonicité, largeur du/des puits ...).

2.2.2.2 Indice d'harmonicité

L'indice d'harmonicité H que nous allons utiliser est le paramètre d'ordre généralisé S^2 .^[227] Sa définition est la suivante :

$$H(i) = 1 - 4 \int_{-\pi}^{+\pi} \cos^2(\gamma_i) p(\gamma_i) d\gamma_i + 4 \left[\left(\int_{-\pi}^{+\pi} \cos^2(\gamma_i) p(\gamma_i) d\gamma_i \right)^2 + \left(\int_{-\pi}^{+\pi} \cos(\gamma_i) \sin(\gamma_i) p(\gamma_i) d\gamma_i \right)^2 \right]$$

Où :

$H(i)$ est la valeur de l'indice d'harmonicité pour l'angle dièdre i

$p(\gamma_i)$ est la probabilité que l'angle dièdre i prenne la valeur γ_i

Cet indice varie entre 0 et 1, 0 indiquant un paysage totalement anharmonique et 1 un paysage parfaitement harmonique (Figure 50 A).

Dans les faits, l'indice S^2 ne représente pas directement l'harmonicité mais plutôt la rigidité du paysage. Un S^2 élevé correspondant à un paysage dit rigide, c'est-à-dire étroit et aux parois raides. La valeur obtenue n'est donc pas directement proportionnelle au nombre de puits présents dans le paysage énergétique (Figure 50 B).

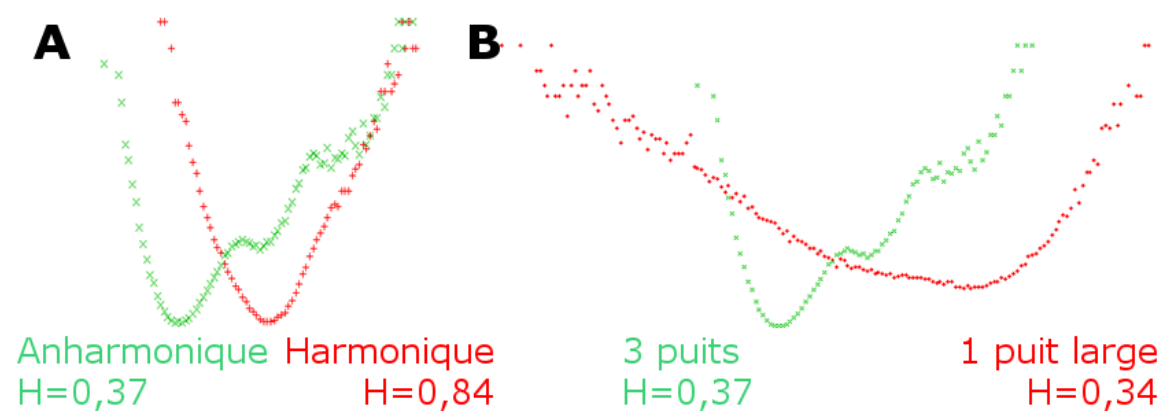


Figure 50 : A) Exemple de paysage type harmonique et anharmonique. B) Exemple de paysage énergétique à indice d'harmonicité proche

2.2.2.3 Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale est une méthode qui a pour but, à partir d'un ensemble de variables, de regrouper celles dont la variation est corrélée pour former de nouvelles variables appelées composantes principales. Dans notre cas, cela va nous permettre de regrouper les angles dièdres qui varient de façon coordonnée parmi ceux qui ont été identifiés via l'étude du paysage énergétique 1D. Cela nous donnera une idée à la fois de la pertinence des torsions choisies et du poids de chacune dans le mouvement observé.

Pour pouvoir réaliser l'ACP, les données traitées ne sont pas directement les valeurs des angles dièdres mais leurs cosinus et leurs sinus. On utilise cette décomposition pour éviter les sauts de valeur d'angle trop brutaux (passage de -179 à 180 degrés ou de 359 à 0) qui pourraient fausser la distribution des valeurs de torsion, et donc les corrélations.

Les données seront donc représentées sous la forme matricielle suivante pour un ensemble de N angles mesurés K fois au cours de la simulation.

$$M = \begin{bmatrix} \cos(\gamma_{1,1}) & \sin(\gamma_{1,1}) & \cdots & \cos(\gamma_{N,1}) & \sin(\gamma_{N,1}) \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ \cos(\gamma_{1,K}) & \sin(\gamma_{1,K}) & \cdots & \cos(\gamma_{N,K}) & \sin(\gamma_{N,K}) \end{bmatrix}$$

La matrice est ensuite centrée sur la moyenne de chaque variable :

$$\bar{M} = \begin{bmatrix} \cos(\gamma_{1,1}) - \overline{\cos(\gamma_1)} & \sin(\gamma_{1,1}) - \overline{\sin(\gamma_1)} & \cdots & \cos(\gamma_{N,1}) - \overline{\cos(\gamma_N)} & \sin(\gamma_{N,1}) - \overline{\sin(\gamma_N)} \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ \cos(\gamma_{1,K}) - \overline{\cos(\gamma_1)} & \sin(\gamma_{1,K}) - \overline{\sin(\gamma_1)} & \cdots & \cos(\gamma_{N,K}) - \overline{\cos(\gamma_N)} & \sin(\gamma_{N,K}) - \overline{\sin(\gamma_N)} \end{bmatrix}$$

Par commodité la notation sera simplifiée de la manière suivante :

$$\bar{M} = \begin{bmatrix} X_{1,1} & X_{2,1} & \cdots & X_{2N-1,1} & X_{2N,1} \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ X_{1,K} & X_{2,K} & \cdots & X_{2N-1,K} & X_{2N,K} \end{bmatrix}$$

Cette matrice est ensuite multipliée par la transposée \bar{M}^T pour obtenir la matrice de variance-covariance C :

$$C = \frac{1}{K} \cdot \bar{M} \cdot \bar{M}^T$$

Avec

$$\bar{M}^T = \begin{bmatrix} X_{1,1} & X_{1,2} & \cdots & X_{1,K-1} & X_{1,K} \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ X_{2N,1} & X_{2N,2} & \cdots & X_{2N,K-1} & X_{2N,K} \end{bmatrix}$$

C est une matrice carrée, symétrique et réelle, qui est donc diagonalisable. Cela se traduit par :

$$C = v^t \cdot \Delta \cdot v$$

Où :

v est la matrice des vecteurs propres et v^t sa matrice transposée

Δ est la matrice diagonale des vecteurs propres associés à chaque valeur propre λ

$$\Delta = \begin{bmatrix} \lambda_1 & \cdots & 0 \\ \vdots & & \vdots \\ 0 & \cdots & \lambda_N \end{bmatrix}$$

Il y a autant de valeurs propres que de variables. La grandeur d'une valeur propre est proportionnelle à la quantité de variation expliquée par le vecteur propre associé. Un vecteur propre lié à une grande valeur propre sous-entendra que les variables impliquées sont fortement corrélées.

La composante principale est la projection d'un état sur un vecteur propre. Dans le cas de la dPCA, un état correspond à une conformation de la protéine. Une composante principale est donc une valeur unique qui va refléter la projection de l'ensemble des valeurs d'angle dièdre sur un vecteur propre. Pour chaque état il y a autant de composantes principales possibles que de vecteurs propres.

Le but étant de diminuer la dimensionnalité du problème, on exploite en général seulement les deux premiers vecteurs propres. Ceux-ci sont associés aux valeurs propres les plus élevées et donc détiennent le maximum d'information sur les variations du système. L'ensemble des N variables utilisées initialement pour décrire le système est donc réduit à deux composantes principales.

Il est possible de calculer l'influence de chaque variable en utilisant les coefficients donnés par les vecteurs propres.

L'influence I_γ^i de l'angle γ dans le vecteur propre i s'obtient donc par :

$$I_\gamma^i = c_{\cos}(\gamma)^2 + c_{\sin}(\gamma)^2$$

$c_{\cos}(\gamma)$ correspond au coefficient du vecteur propre i associé au cosinus de l'angle γ

$c_{\sin}(\gamma)$ correspond au coefficient du vecteur propre i associé au sinus de l'angle γ

I_γ^i varie entre 0 et 1. Une influence de 1 indique que l'angle γ décrit la totalité du mouvement contenu dans le vecteur propre, alors qu'une influence de 0 révèle que l'angle n'y est pas du tout impliqué.

2.2.2.4 Evaluation de la quantité de mouvement Brownien

L'ACP nous permet de nous assurer que les angles dièdres choisis varient de façon corrélée et décrivent donc bien un mouvement protéique. Cependant, il nous faut vérifier que ce mouvement est bien spécifique et pas dû simplement à l'agitation thermique (mouvement Brownien), comme ce serait le cas notamment avec une simulation qui n'a pas convergé. C'est dans cette optique que nous avons calculé pour chaque composante principale utilisée le contenu en cosinus^[228] qui est défini comme suit :

$$c^k = \frac{2}{T} \left(\int_0^T \cos\left(\frac{k\pi t}{T}\right) dPC^k(t) dt \right)^2 \left(\int_0^T dPC^k(t)^2 dt \right)^{-1}$$

Où :

c^k est le contenu en cosinus de la composante principale numéro k

T est la durée totale de la simulation

$dPC^k(t)$ est la valeur de la composante principale numéro k à l'instant t

Le contenu en cosinus varie entre 0 et 1. Puisque les composantes qui correspondent à un mouvement Brownien ont une variation de type cosinus, un contenu en cosinus de 1 correspondra à une composante principale contenant l'information d'un mouvement totalement Brownien alors qu'un contenu en cosinus de 0 correspondra à un mouvement significatif.

Les vecteurs propres associés à des composantes principales avec un contenu en cosinus élevé ne pourront donc pas être considérés comme décrivant des mouvements protéiques significatifs.

2.3 Comparaison des systèmes CD1d seul, CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés aux complexes humains CD1d/ α -GalCer, CD1d/OCH et au récepteur CD1d seul en tant que témoin négatif. Dans chaque cas, nous avons produit une trajectoire de 220 ns en suivant le protocole décrit ci-après. Afin de réduire le temps d'obtention des trajectoires, nous avons étudié uniquement les complexes CD1d/ligand en absence de TCR. L'activation des lymphocytes iNKT se réalise en effet en deux temps (chargement du ligand puis présentation du complexe CD1d/ligand au TCR), ce qui laisse penser que l'impact majeur du ligand porté sur la structure du récepteur CD1d et non sur le TCR. Il devrait donc être possible de distinguer les complexes chargés avec des ligands Th1 de ceux chargés de ligands Th2 en étudiant la dynamique de leurs formes binaires.

De même, les chaînes glycanes ne sont pas prises en compte afin d'alléger le système et le temps de calcul. Même si de part leur taille et leurs possibles interactions avec le CD1d, elles vont influencer la dynamique du CD1d, il a été montré que des CD1d non glycosylés pouvaient être reconnus et activer les iNKT humains et murins^[106] ; Ainsi les glycanes ne jouent pas de rôle majeur sur la fixation des ligands.

Toutes les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec les programmes sander ou pmemd de la version 11 du logiciel AMBER.^[229]

Les systèmes ont été obtenus de la manière suivante :

- Les coordonnées cartésiennes du complexe CD1d/ligand humain ont été téléchargées sur le site de la PDB sous la référence 2PO6, puis le ligand modifié ou supprimé au besoin. Les 3 ponts disulfures identifiés dans la séquence ont été

vérifiés et les hydrogènes ajoutés grâce au programme xLeap. Les ligands étudiés étant des glycolipides plus ou moins dénaturés, nous avons choisi de les décrire avec le champ de forces polyvalent GAFF (General AMBER Force Field).^[229]

- La structure du ligand a été minimisée, puis les charges atomiques calculées à l'aide du logiciel Gaussian^[230] via la méthode Hartree-Fock avec un jeu de fonctions 6-31G*.
- Le système a été neutralisé par l'ajout d'un ion Na⁺ puis solvato de manière explicite en disposant des molécules d'eau type TIP3P. Le solvant remplit une boîte octaédrique dont tous les cotés sont à au moins 7Å de tout élément de la protéine.

Afin de s'assurer que les structures de départ de nos simulations sont stables, nous avons optimisé la géométrie du système en minimisant les contacts stériques défavorables et en relaxant la structure du complexe.

Sauf indication contraire, les simulations ont été réalisées dans un ensemble canonique NVT (Nombre de particule, Volume et Température constants) en utilisant l'intégrateur *leap frog* et le maillage particulière d'Ewald. Un *cut off* de 8 Å a été paramétré pour le calcul des interactions de van der Waals et électrostatiques. La température est quant à elle régulée par un thermostat de Langevin (fréquence de collision de 2.ps⁻¹).

Le protocole utilisé est le suivant :

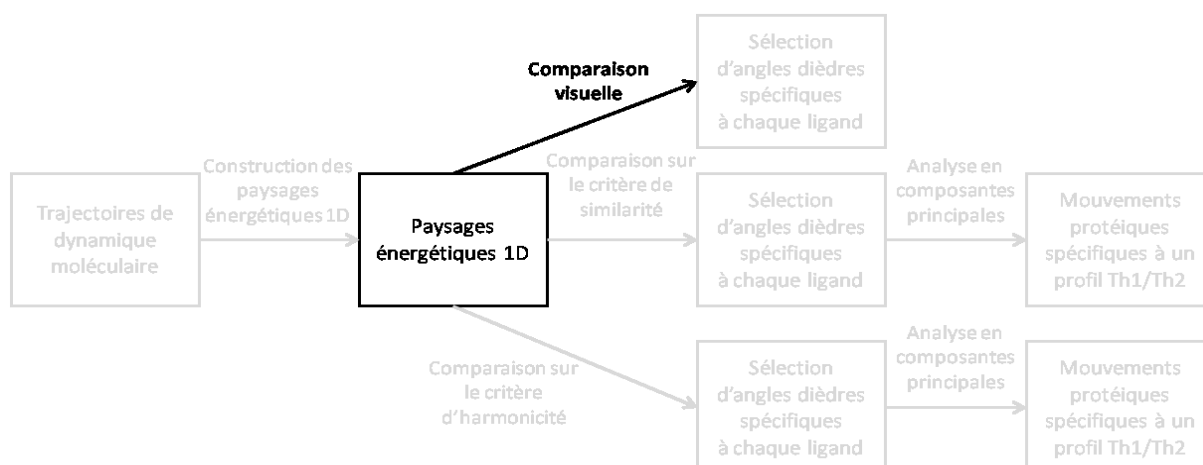
- On débute par une minimisation énergétique globale du système afin de corriger les clashes stériques et autres défauts majeurs. Chaque processus de minimisation est composé de 1000 cycles où on utilise l'algorithme de *Steepest Descent* suivi de 1000 autres avec celui du Gradient Conjugué. On répète le processus de minimisation jusqu'à obtenir une énergie totale satisfaisante et un gradient énergétique stable.
- On effectue un premier chauffage en fixant la position de la protéine, du ligand et du contre ion. La température augmente linéairement de 0 à 300 K sur une durée de 20 ps puis s'ensuivent 20 ps d'équilibrage.
- On relaxe l'énergie du système en baissant la température de 300 à environ 0 K (+- 10) sur 20 ps. La position de la protéine, du ligand et du contre ion est toujours contraints.
- On effectue une deuxième étape de chauffage, cette fois ci sans aucune contrainte. Comme précédemment, la température augmente linéairement de 0 à 300 K sur une durée de 20 ps à laquelle succède une période d'équilibrage de 20 ps.
- Le système est ensuite refroidi de 300 à 0 K en 20 ps avant d'être de nouveau chauffé à 300 K de la même manière que dans l'étape précédente.
- La dernière étape est une phase d'équilibrage de 40 ps en ensemble Isotherme-Isobare (Nombre de particule, Pression et Température constante). Cette opération permet d'ajuster le volume de la boîte de simulation et ainsi la densité du système. Dans notre cas la pression a été fixée à 1 bar.

La conformation du complexe CD1d/Ligand résultante est utilisée comme point de départ. Les trajectoires dynamiques ont été calculées durant 220 ns, durée choisie empiriquement, mais semblant être un bon compromis pour obtenir un échantillonnage conformationnel correct, tout en conservant des temps de calcul accessibles (de l'ordre de 25 jours par simulation). Ces simulations couvrent une plage de temps suffisante pour permettre l'analyse des mouvements protéiques différentiels pouvant survenir en présence de ligands à profil Th1 ou Th2.

2.3.1 Identification des angles dièdres discriminants

Afin de déterminer s'il existe des angles dièdres dont la variation est caractéristique d'un profil Th1 ou Th2, toutes les simulations ont été comparées deux à deux, d'abord visuellement, puis selon les critères de similarité et d'harmonicité. La comparaison visuelle nous servira de référence pour évaluer la qualité de sélection des deux autres critères.

2.3.1.1 Etude visuelle des paysages énergétiques 1D



2.3.1.1.1 CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer

Afin d'appréhender le comportement global du récepteur au cours de sa trajectoire dynamique, nous avons identifié les angles dièdres avec les paysages d'énergie libre les moins harmoniques.

53 angles du CD1d seul et 58 du complexe CD1d/ α -GalCer présentent un profil anharmonique. (Figure 51) De nombreux angles se retrouvent dans les deux sélections et caractérisent des acides aminés principalement situés dans les régions variables (boucles et régions terminales) plutôt que dans les structures secondaires plus rigides (type feuillet β ou hélice α). Ces régions variables sont soumises à de fortes fluctuations structurales et sont donc caractérisées par des paysages énergétiques larges mais non spécifiques à la présence ou l'absence d' α -GalCer. Toutefois, certaines de ces torsions communes sont localisées dans des régions structurées, comme les feuillets β de la partie C terminale du CD1d.

A contrario, certaines zones de la protéine ne comportent que des angles dièdres aux profils anharmoniques dans l'une ou l'autre des simulations. Les angles ayant un comportement remarquable uniquement dans la simulation sans ligand sont assez nombreux et situés majoritairement dans des éléments très structurés (hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, feuillets β de la $\beta 2$ -microglobuline). De façon prévisible, cela traduit une déformation de ces éléments en absence d' α -GalCer et un changement majeur du fragment du CD1d impliqué dans l'interface CD1d/TCR. Peu de torsions anharmoniques sont reliées spécifiquement à la simulation CD1d/ α -GalCer. De plus, elles sont pour la plupart situées dans des régions relativement mobiles (extrémités de l'hélice $\alpha 2$, fin de feuillet β) et très dispersées, il est donc possible qu'elles ne soient pas significatives.

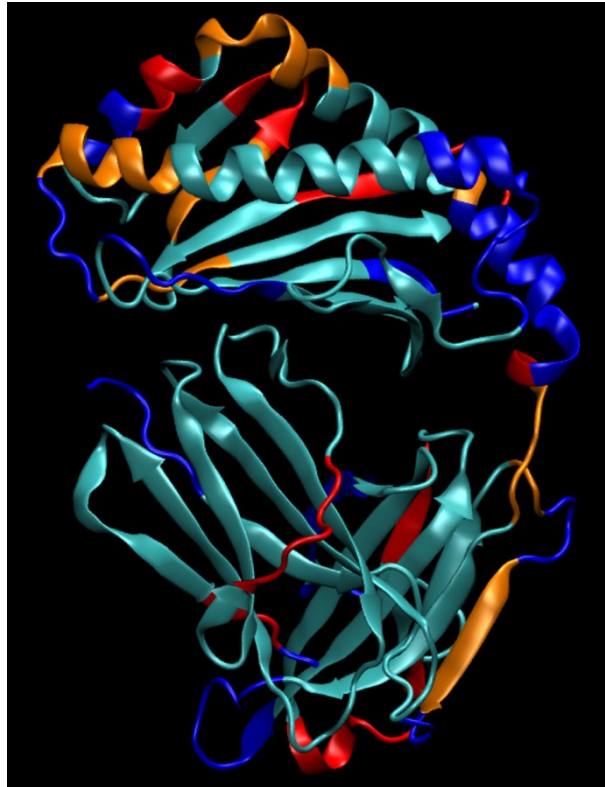


Figure 51 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations du CD1d seul (orange), du complexe CD1d/ α -GalCer (rouge) et communs aux deux systèmes (bleu foncé)

2.3.1.1.2 CD1d seul vs CD1d/OCH

La simulation du complexe CD1d/OCH est celle qui comporte le plus d'angles dièdres anharmoniques avec 63 torsions relevées. (Figure 52) Encore une fois, les angles au comportement remarquable retrouvés dans les deux systèmes sont situés dans les zones les plus flexibles de la protéine, exception faite de ceux du feuillet β de la partie C terminale du CD1d. Par contre, la majorité des torsions identifiées comme anharmoniques uniquement dans la simulation CD1d/OCH sont au cœur des éléments structuraux les plus rigides et très concentrées autour du site de liaison du ligand. Comme pour la simulation avec le CD1d seul, on peut prévoir qu'en présence d'OCH il y a une déformation prononcée des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Cependant, si les angles dièdres identifiés pour le CD1d seul sont majoritairement aux alentours de la poche F', ceux du complexe CD1d/OCH sont plutôt situés au centre des deux

hélices. On peut donc envisager que les deux groupes de torsions soient impliqués dans deux mouvements différents.



Figure 52 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations du CD1d seul (orange), du complexe CD1d/OCH (violet) et communs aux deux systèmes (bleu foncé)

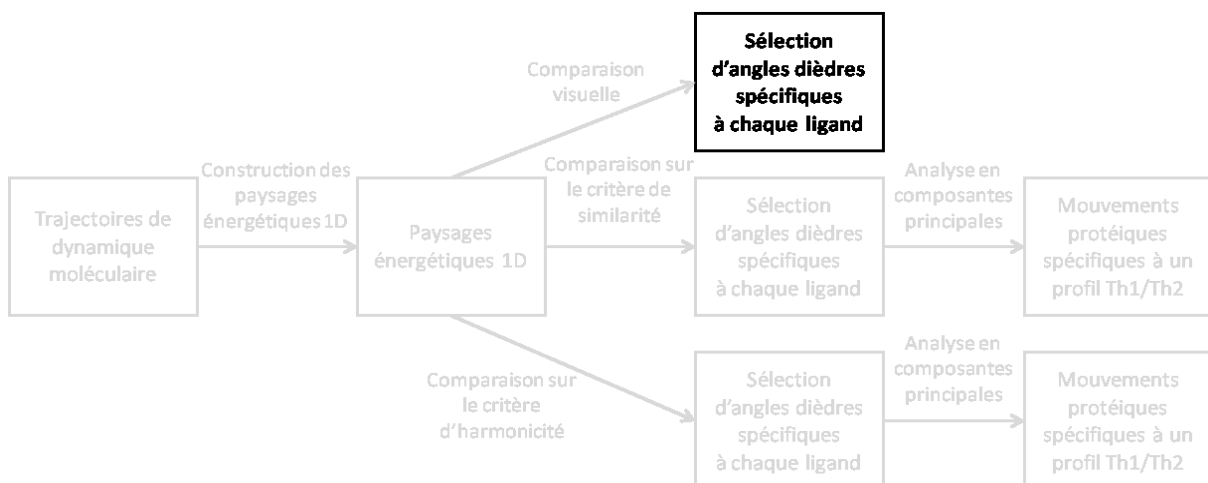
2.3.1.1.3 *CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer*

La comparaison directe des systèmes Th1 et Th2 confirme les différentes observations faites précédemment. Même si elles sont moins nombreuses, les zones comportant des angles dièdres anharmoniques communes aux deux simulations restent les régions les plus flexibles de la protéine, sauf pour le feuillet β de la partie C terminale du CD1d. On distingue clairement une différence dans la répartition des torsions spécifique à chaque simulation. Leur impact sur la surface d'interaction CD1d/TCR devrait donc être différent. De part leur placement, les angles dièdres associés aux complexes CD1d/OCH vont grandement influencer la géométrie de l'interface, notamment en introduisant une déformation des hélices α_1 et α_2 . Les torsions anharmoniques relevées dans la simulation CD1d/ α -GalCer sont trop dispersées et situées trop loin des zones charnières pour avoir un impact structural majeur.



Figure 53 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations des complexes CD1d/ α -GalCer (rouge), du complexe CD1d/OCH (violet) et communs aux deux systèmes (bleu foncé)

2.3.1.1.4 Angles dièdres spécifiques



L'objectif consiste à identifier des torsions spécifiques à une réponse biologique induite par un ligand donné. Tous les angles dièdres spécifiquement anharmoniques à chaque système ont ainsi été relevés. Par exemple, l'angle dièdre 139 présente un profil anharmonique au cours de la simulation CD1d/ α -GalCer, mais pas lors des simulations avec le complexe

CD1d/OCH et le CD1d seul. On va donc considérer qu'il a un comportement spécifique en présence d' α -GalCer, ou autrement dit qu'il est spécifique à l' α -GalCer.

3 torsions seulement peuvent être définies comme spécifiques à l' α -GalCer : la 139, la 210 et la 368. (Figure 54) Ces angles sont très dispersés et seul le numéro 139 est proche du site de liaison. Il y a donc très peu de chances que ces angles soient impliqués dans un changement conformationnel majeur. Il est assez inattendu d'identifier majoritairement ces angles dièdres spécifiques à l' α -GalCer sur la partie basse du CD1d et la β 2-microglobuline.

On recense 18 torsions spécifiques à l'OCH (11, 12, 68, 69, 70, 71, 72, 77, 98, 128, 156, 157, 158, 216, 217, 220, 345, 347). Au contraire de ce que l'on observe pour l' α -GalCer, 13 des angles identifiés sont répartis en 4 zones autour du site de liaison (hélices α 1 et α 2, plancher β et fond du plancher β). Il est probable que ces hélices se courbent sous l'influence de ces angles dièdres, modifiant la surface de reconnaissance avec le TCR.

Les derniers angles dièdres relevés sont spécifiques à l'absence de ligand. 12 torsions ont un comportement particulier en absence de tout ligand (75, 78, 80, 81, 88, 117, 144, 146, 148, 163, 177, 267). La majorité de ces angles sont, eux aussi, situés autour du site de liaison, et particulièrement sur les portions d'hélices α 1 et α 2 autour de la poche F'. Il est probable que l'absence de ligand entraîne un effondrement des segments d'hélices au dessus de la poche F', voir même une dénaturation de leurs structure. La présence de torsions dans les boucles lié à α 1 coté F' et α 2 coté A' laisse penser à un mouvement global des deux hélices.

Nous avons donc réussi à identifier visuellement quelques ensembles d'angles dièdres bien distincts qui pourraient être spécifiques à certains ligands. La présence d'OCH ou l'absence de glycolipide semble déformer de façon non négligeable la partie CD1d de l'interface CD1d/TCR, alors que l' α -GalCer paraît avoir peu ou pas d'impact sur la structure du complexe binaire.



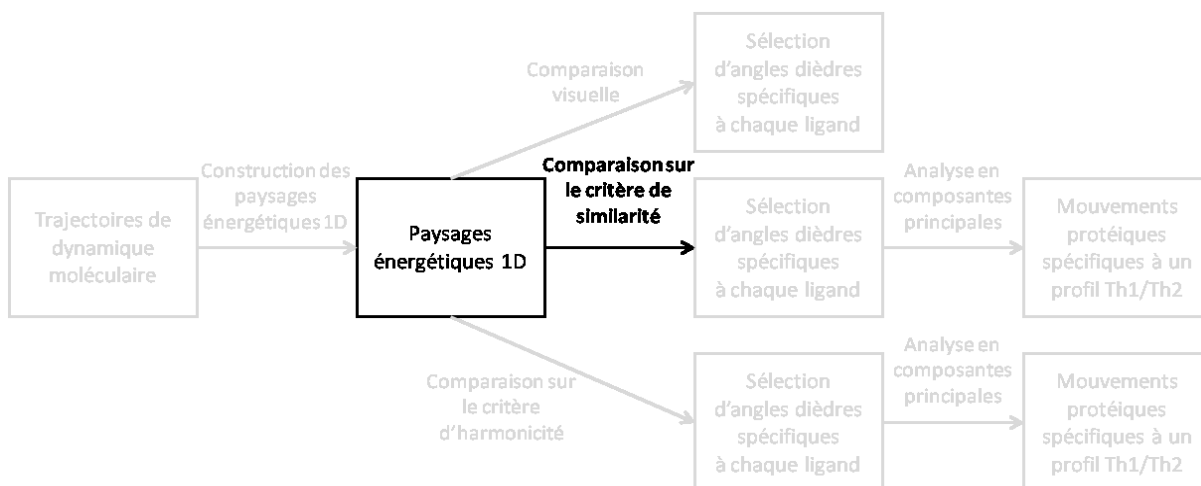
Figure 54 : Disposition des angles dièdres spécifiques des ligands α -GalCer (rouge), OCH (violet) et de l'absence de ligand (orange)

2.3.1.2 Critère de similarité

Dans toutes les analyses suivantes, les angles dièdres ont été classés en trois catégories en fonction de leur indice de similarité S entre les deux simulations :

- Si $S \geq 0,7$ on considère que le comportement de l'angle dièdre est identique entre les deux simulations et qu'il n'est donc pas significatif.
- Si $0,7 > S \geq 0,3$ on considère que la différence de comportement de l'angle dièdre entre les deux simulations est significative.
- Si $S < 0,3$ alors on considère que l'angle dièdre a un comportement très différent entre les deux simulations.

Comme nous cherchons à repérer des mouvements protéiques de grande ampleur, nous nous intéresserons uniquement aux torsions dont $S < 0,3$.



2.3.1.2.1 CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer

En comparant les trajectoires du complexe CD1d/ α -GalCer et du CD1d sans ligand, on remarque 16 angles dièdres (4,31% du système) qui ont des comportements très différents dans les deux simulations. 43 (11,59%) montrent des différences significatives et 312 (84,1%) ne sont pas significatifs. L'indice de similarité maximum est de 0,9997 et le minimum de 0,03121.

Dièdre	S	Dièdre	S
7	0,202	50	0,0846
14	0,282	68	0,0378
18	0,289	72	0,246
20	0,0312	88	0,233
21	0,295	222	0,256
22	0,206	224	0,283
39	0,172	248	0,254
49	0,295	249	0,293

La répartition des angles dièdres est assez semblable à celle obtenue par l'inspection visuelle. On retrouve quelques torsions communes sur l'hélice α 1, le plancher β et la boucle à l'extrémité A' de α 1. Cependant, on identifie très peu d'angles dans la partie C terminale du CD1d et sur la β 2-microglobuline. Peu de torsions relevées dans la simulation CD1d/ α -GalCer apparaissent via le critère de similarité et la seule région très structurée à porter des éléments anharmoniques est l'hélice α 1. Il semble également que les angles dièdres associés au CD1d seul soient surreprésentés.

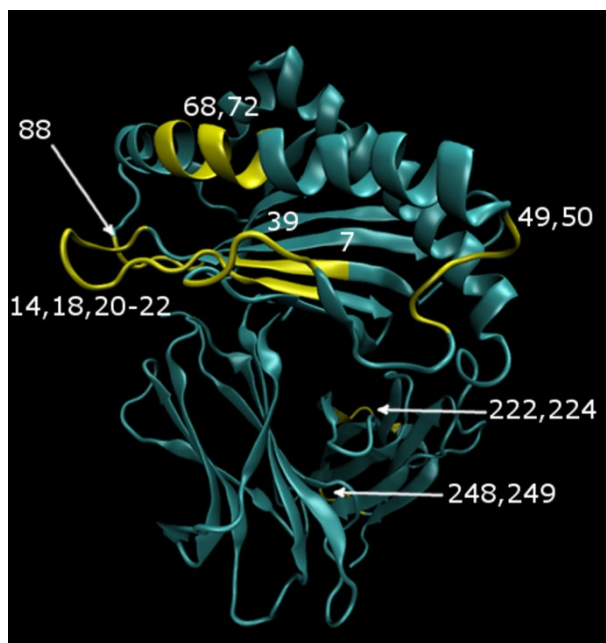


Figure 55 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/ α -GalCer et du CD1d seul

2.3.1.2.2 CD1d seul vs CD1d/OCH

La comparaison entre les simulations CD1d/OCH et CD1d seul met en avant 10 angles dièdres (2,70% du système) avec un comportement très différent, 41 (11,05%) avec une différence de comportement significative et 320 (86,25%) au comportement identique dans les deux simulations. L'indice de similarité maximum est de 0,9998 et le minimum 0,005223.

Dièdre	S	Dièdre	S
10	0,293	39	0,254
12	0,268	49	0,262
18	0,00522	50	0,102
20	0,0265	67	0,258
21	0,108	88	0,0875

Les angles dièdres identifiés dans ce cas sont très semblables à ceux de la comparaison CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer, seules les torsions présentes sur la β 2-microglobuline ne sont pas retrouvées ici. Il est donc très probable que les angles dièdres identifiés soient uniquement représentatif de l'absence de ligand, seul critère présent dans les deux comparaisons. On note aussi que l'hélice α 2 et la C terminale du CD1d ne comportent aucun angle anharmonique, au contraire de ce qu'on observe par comparaison visuelle.

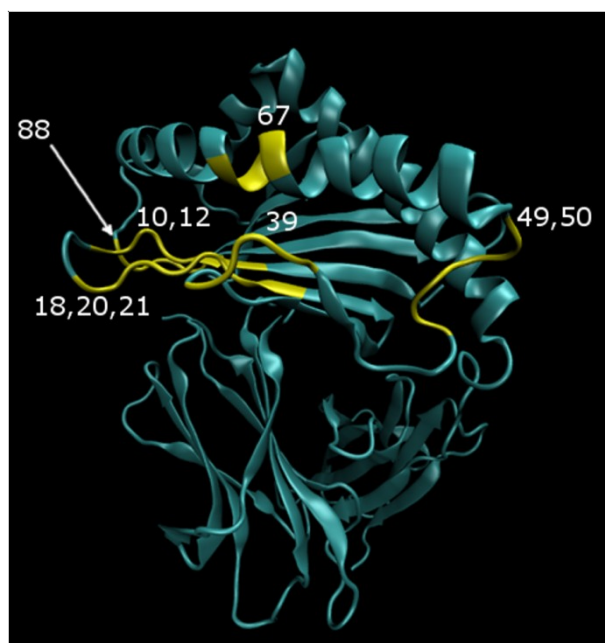


Figure 56 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/OCH et CD1d seul

2.3.1.2.3 CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer

En ce qui concerne la comparaison des complexes CD1d/OCH et CD1d/ α -GalCer, 8 angles dièdres (2,16% du système) ont un comportement fortement dissimilaire entre les deux simulations. 37 (9,97%) montrent une différence significative et 326 (87,87%) peuvent être considérés comme non pertinents. L'indice de similarité maximum est de 0,9998 et le minimum de 0,210. On remarque que l'indice de similarité minimum est relativement élevé, ce qui voudrait dire que même les angles dièdres les plus dissimilaires sont globalement plus proches que dans les cas précédents.

Dièdre	S
102	0,269
179	0,254
180	0,291
222	0,210
223	0,263
224	0,273
248	0,267
249	0,278

Là encore, les angles dièdres identifiés sont très différents de ceux retenus par comparaison visuelle. Aucun élément structural majeur n'est affecté et les torsions considérées sont

toutes très éloignées du site de liaison. Cette analyse suggère que la présence d' α -GalCer et d'OCH induisent des déformations similaires, y compris au niveau de l'hélice α 1, ce qui est contradictoire avec les observations en II-2.3.1.1.1.

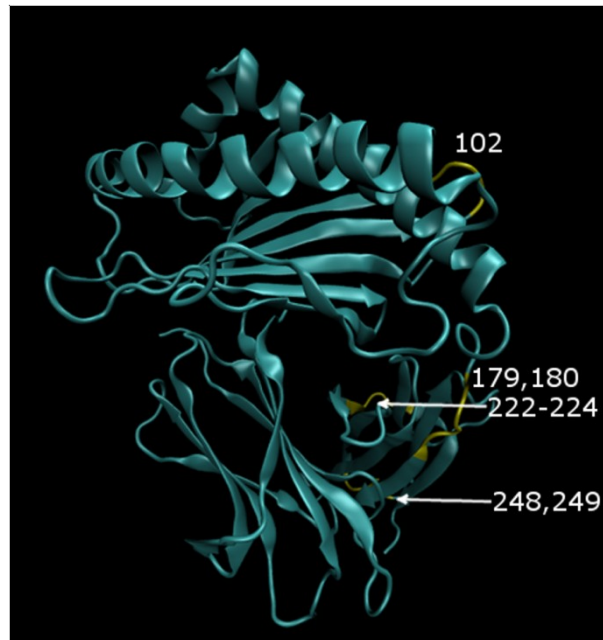
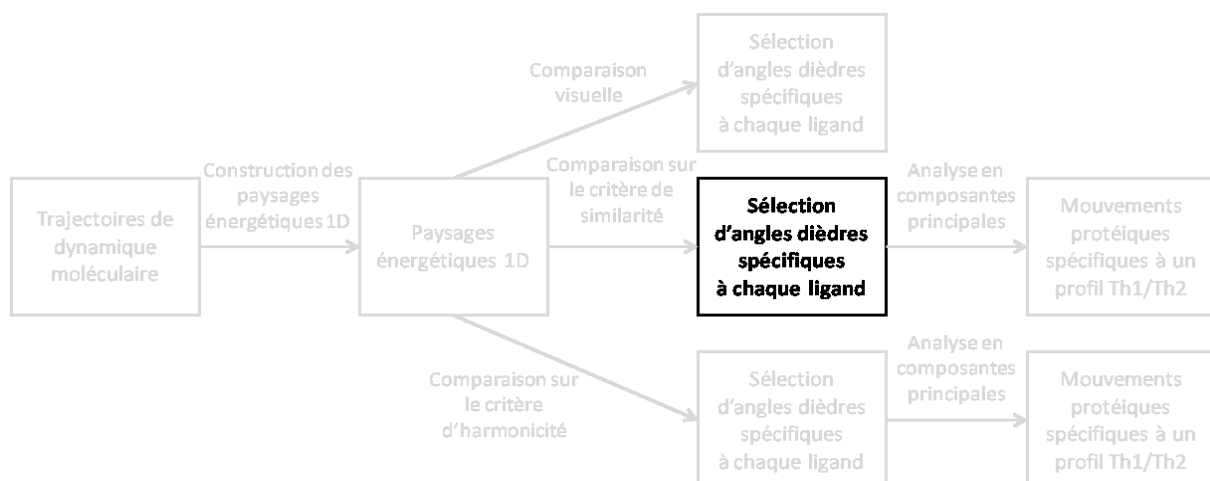


Figure 57 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH

2.3.1.2.4 Angles dièdres spécifiques



On remarque que les angles dièdres 222, 224, 248 et 249 ont été identifiés à la fois dans la comparaison CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer mais pas lors de la comparaison CD1d/OCH vs CD1d seul. On peut donc supposer que ces angles dièdres ont un comportement spécifique en présence d' α -GalCer. Même si on ne retrouve pas exactement les mêmes angles dièdres que lors de la comparaison visuelle, ceux-ci sont

eux aussi situés dans la partie basse du CD1d et vont très peu influencer la structure de la région du CD1d à l'interface avec le TCR.

De même, les angles dièdres 18, 20, 21, 39, 49, 50 et 88 ont été identifiés lors des comparaisons impliquant le récepteur CD1d sans ligand mais ne ressortent pas lors de la comparaison CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer. On peut donc supposer que ces torsions ont un comportement spécifique en l'absence de ligand dans le récepteur. Le seul angle commun avec ceux identifiés *via* l'analyse visuelle est le 88, situé à l'extrémité de l'hélice α 1. L'unique information révélée est le probable gain ou perte d'un tour d'hélice à cet endroit. Les autres angles sont situés dans des boucles très mobiles et donc sont peu informatifs.

Il faut noter qu'aucun angle dièdre spécifique à l'OCH ne peut être identifié. Les torsions relevées lors des comparaisons CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH vs CD1d seul sont situés dans des zones distinctes de la protéine et aucun recoupement n'est possible. Dans ce cas, nous avons choisi pour étudier la simulation CD1d/OCH les angles dièdres 10, 12, 67, 102, 179, 180 et 223 qui sont identifiés dans l'une des deux comparaisons et spécifique ni de l'absence de ligand ni de la présence d' α -GalCer.

L'utilisation du critère de similarité fournit des résultats très différents de ceux obtenus par comparaison visuelle des FEP 1D. Jusqu'à maintenant, le critère de similarité semble mal adapté pour différencier les paysages énergétiques. Cela expliquerait l'obtention de si peu d'angles dièdres spécifiques à chaque système et le fait que la disposition de ces derniers soit si différente de celle obtenue précédemment. Néanmoins, bien que la comparaison visuelle des paysages soit assez objective, il faut vérifier la validité des jeux d'angles dièdres retenus sur la similarité.

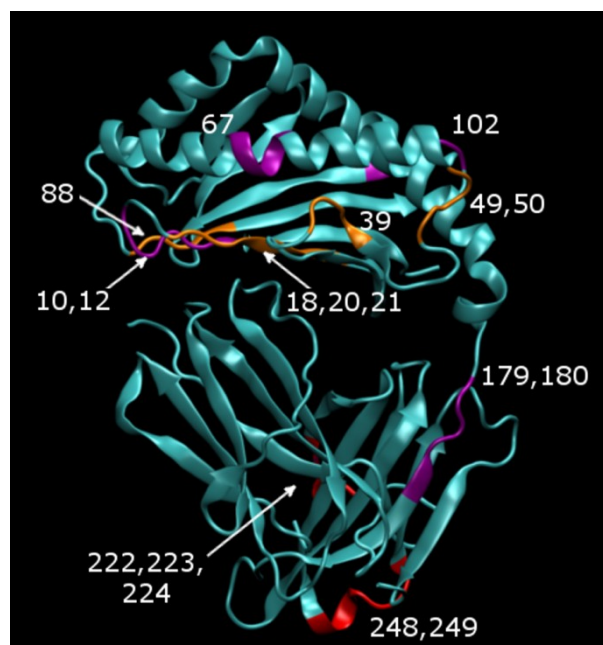
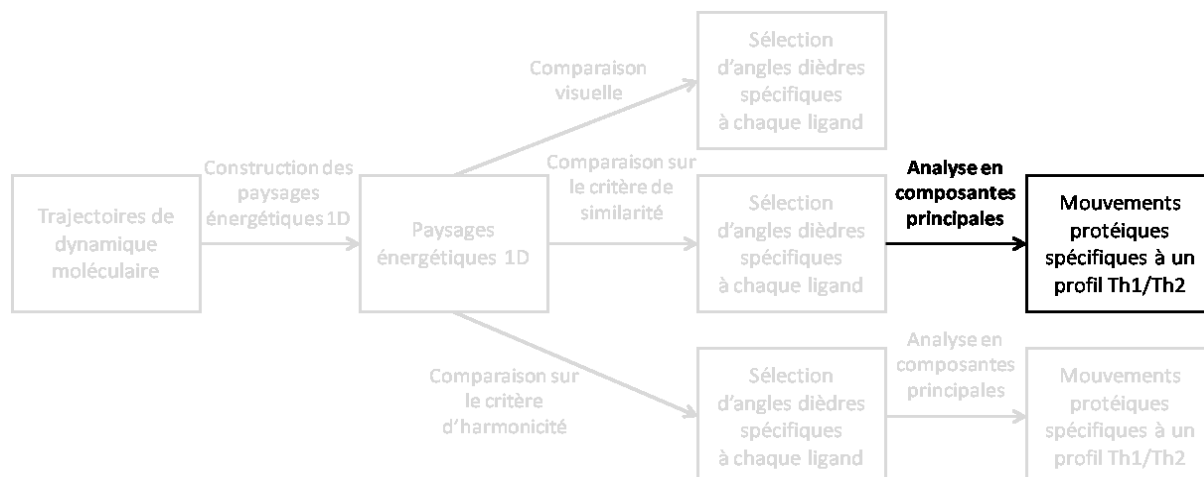


Figure 58 : Torsions spécifiques identifiées par le critère de similarité

2.3.1.2.5 Analyse en composante principale et contenu en cosinus

Pour vérifier qu'il y ait un lien entre les différents angles dièdres supposés spécifiques à la présence d'un ligand donné, nous avons réalisé pour chaque groupe une ACP sur la simulation associée. Nous avons également évalué dans chaque cas la quantité de mouvement Brownien contenu dans les deux premières composantes.



2.3.1.2.5.1 CD1d/ α -GalCer

Les valeurs propres obtenues lors de l'ACP sont les suivantes :

Composante principale	Valeur propre	Variance expliquée en %	Somme de la variance expliquée En %
1	0,986	45,22	45,22
2	0,395	18,12	63,35
3	0,345	15,80	79,15
4	0,182	8,35	87,50
5	0,123	5,62	93,12
6	0,100	4,60	97,72
7	0,0358	1,64	99,36
8	0,0139	0,64	100,00

63,35% de la fluctuation globale des angles dièdres étudiés est expliquée par les deux premières composantes principales. Bien que cette valeur soit relativement modeste pour ce type d'analyse, la variation des différents angles peut être considérée comme corrélée. Les angles dièdres choisis décrivent donc bien un mouvement protéique. Les valeurs basses de contenu en cosinus (0,148 sur la première composante principale et 0,0762 sur la seconde) suggèrent que le mouvement capté par l'ACP est principalement non Brownien et donc significatif.

En analysant de plus près les vecteurs propres associés à une composante principale, il est possible de connaître l'influence de chaque angle dièdre dans le mouvement collectif. En ce qui concerne les deux vecteurs précédents on obtient les résultats suivants :

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
222	-0,404	48,65	-0,156	3,10
	-0,569		0,0822	
224	0,629	49,07	0,00317	3,78
	0,309		0,194	
248	-0,00451	0,02	0,521	55,21
	0,0136		-0,530	
249	-0,0994	2,26	-0,00786	37,92
	0,113		-0,616	

Pour chaque angle dièdre, on s'intéresse aux coefficients cosinus et sinus composant les vecteurs propres.

Même si les résultats observés semblent satisfaisants d'un point de vue purement statistique, on peut s'interroger sur la qualité du jeu d'angles dièdres utilisé. En effet, la proximité spatiale de ces angles suggère que le mouvement perçu lors de la ACP est un mouvement local, et donc non spécifique à la présence d' α -GalCer. De plus, l'éloignement de ces angles dièdres du site de liaison au ligand encourage à tempérer ces résultats.

2.3.1.2.5.2 CD1d/OCH

Composante principale	Valeur propre	Variance expliquée (%)	Somme de la variance expliquée (%)
1	0,448	42,80	42,80
2	0,254	24,27	67,07
3	0,0925	8,84	75,91
4	0,0875	8,36	84,27
5	0,0513	4,90	89,17
6	0,0460	4,40	93,57
7	0,0234	2,24	95,81
8	0,0199	1,91	97,72
9	0,0178	1,70	99,41
10	0,00260	0,25	99,66
11	0,00140	0,13	99,80
12	0,00105	0,10	99,90
13	0,000595	0,06	99,95
14	0,000483	0,05	100,00

67,07% de la variance est expliquée dans les deux premières composantes. Ceci est suffisant pour considérer que les angles dièdres concernés sont impliqués dans un même mouvement protéique. D'autre part, ce mouvement semble significatif au vu du faible taux de mouvement Brownien révélé par le calcul du contenu en cosinus (0,0166 pour la première composante et 0,0333 pour la seconde).

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
10	0,0133	0,02	-0,00748	0,04
	-0,00432		0,0194	
12	-0,102	2,27	0,984	96,99
	-0,111		0,0420	
67	-0,0231	0,05	-0,0586	0,54
	0,00359		0,0441	
102	-0,289	96,42	-0,0868	1,26
	0,938		0,0713	
179	-0,0107	0,02	-0,00892	0,02
	0,0101		0,0115	
180	0,000531	0,00	-0,00148	0,00
	0,00254		0,00278	
223	0,0775	1,21	0,0686	1,14
	0,0781		0,0820	

Avec l'analyse des vecteurs propres, on remarque que la quasi-totalité du mouvement capturé repose sur un changement de conformation des angles dièdres 12 et 102. Le choix initialement orienté des angles dièdres suggérait que certains angles avaient peu d'influence dans le mouvement. Cependant, il est peu probable que la totalité de l'impact structural de l'OCH se résume à la perturbation de deux angles dièdres seulement. La position de ces angles à deux extrémités du plancher β n'est pas très informative. On ne retrouve pas certains angles dièdres qui paraissaient pourtant intéressants, comme le 72 qui présente un paysage anharmonique marqué au milieu de l'hélice α_1 , ou les 156 et 158 de α_2 . Il est donc possible qu'à cause du choix approximatif des angles dièdres, le mouvement observé ne corresponde qu'à une fraction du mouvement spécifique à l'OCH.

2.3.1.2.5.3 CD1d seul

Composante Principale	Valeur propre	Variance expliquée en %	Somme de la variance expliquée En %
1	1,250	69,74	69,74
2	0,174	9,72	79,46
3	0,112	6,26	85,72
4	0,0811	4,52	90,25
5	0,0616	3,44	93,68
6	0,0396	2,21	95,89
7	0,0259	1,44	97,33
8	0,0228	1,27	98,60
9	0,0125	0,70	99,30
10	0,00698	0,39	99,69
11	0,00344	0,19	99,88
12	0,00147	0,08	99,96
13	0,000406	0,02	99,99
14	0,000267	0,01	100,00

En ce qui concerne la trajectoire du CD1d seul, 79,46% de l'information est contenue dans les deux premières composantes, les différents angles dièdres sont donc bien corrélés. Malheureusement le contenu en cosinus élevé pour la première composante (0,497) indique que le mouvement capté est essentiellement dû à l'agitation thermique. Même si la seconde composante montre un contenu en cosinus de 0,0875 seulement, cette dernière représente moins de 10% de la variance totale et ne peut pas être considérée comme significative. Si le principal mouvement repéré est Brownien, cela signifie que les mouvements d'ensemble sont rares, voir inexistantes et donc que la conformation du récepteur est globalement stable tout au long de la simulation. Il est également possible que le jeu d'angles dièdres utilisé soit inadapté et ne puisse pas décrire le mouvement. Cependant la similitude entre les structures de début et de fin de simulation est tel que la première hypothèse semble la plus probable.

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
18	0,0184	0,038	0,0148	0,022
	-0,00612		-0,00183	
20	0,0145	0,033	-0,0646	0,64
	0,0111		-0,0477	
21	-0,0500	0,36	-0,0322	0,17
	-0,0332		-0,0251	
39	-0,141	2,07	0,557	31,69
	0,0297		-0,0788	
49	-0,287	44,48	0,652	42,66
	-0,602		-0,0332	
50	-0,133	52,29	-0,377	22,84
	-0,711		-0,293	
88	-0,0753	0,73	0,104	1,975
	0,0400		-0,0949	

Pour résumer, les résultats obtenus avec les angles dièdres retenus sur le critère de similarité sont mitigés. Les angles dièdres repérés semblent assez mal adaptés à la description des mouvements protéiques d'ensemble, de plus aucun angle dièdre spécifique à l'OCH n'a pu être identifié. Même si, d'un point de vu statistique, les analyses sont satisfaisantes, les résultats sont à exploiter avec précaution car les angles dièdres repérés sont trop dispersés pour être impliqués dans un même mouvement protéique.

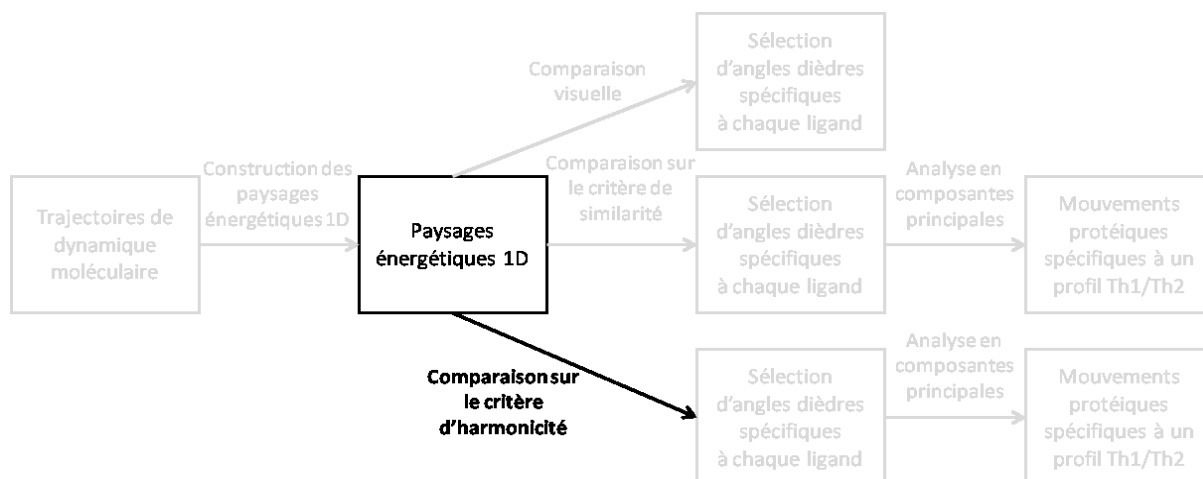
2.3.1.3 Critère d'harmonicité

Pour réaliser cette analyse, chaque angle dièdre i a été classé dans l'une des trois catégories suivantes en fonction de sa différence d'harmonicité :

$$\Delta H(i) = |H_{\text{système1}}(i) - H_{\text{système2}}(i)|$$

- Si $\Delta H \geq 0,4$ on considère que le comportement de l'angle dièdre est très différent entre les deux simulations.
- Si $0,4 > \Delta H \geq 0,2$ on considère que la différence de comportement de l'angle dièdre entre les deux simulations est significative.
- Si $\Delta H < 0,2$ alors on considère que l'angle dièdre a un comportement très proche entre les deux simulations et qu'il n'est donc pas pertinent.

Comme nous cherchons à repérer des mouvements protéiques de grande ampleur nous nous intéresserons uniquement aux angles dièdres dont $\Delta H \geq 0,4$.



2.3.1.3.1 CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer

La comparaison des trajectoires du complexe CD1d/ α -GalCer et du CD1d sans ligand révèle 12 angles dièdres (3,23% du système) dont l'harmonicité du paysage d'énergie libre varie fortement entre les deux simulations. 27 autres angles (7,28%) varient de façon significative, les 332 (89,49%) derniers peuvent être négligés. La différence d'harmonicité maximum est de 0,7691 et le minimum de $3,937 \cdot 10^{-5}$.

Dièdre	$H_{\alpha\text{GalCer}}$	H_{vide}	ΔH
18	0,252	0,899	0,647
48	0,788	0,294	0,495
49	0,841	0,0718	0,769
50	0,797	0,174	0,623
139	0,414	0,891	0,477
146	0,956	0,525	0,432
223	0,0858	0,502	0,416
225	0,111	0,530	0,419
228	0,102	0,593	0,492
248	0,187	0,819	0,632
249	0,302	0,754	0,452
370	0,308	0,848	0,539

On retrouve plusieurs angles dièdres dans des zones déjà identifiées par l'inspection visuelle et la comparaison sur le critère d'identité, comme la région F' de l'hélice α_2 , la boucle A' de α_1 , la boucle du plancher β et la partie basse du CD1d. On ne retrouve cependant pas la torsion au centre de α_1 qui est pourtant la seule que l'on repérait systématiquement lors de cette comparaison. La critique reste malgré tout la même que pour le critère similarité : les

angles associés à la simulation du CD1d non chargé semblent surreprésentés et seule l'hélice $\alpha 2$ porte des angles dièdres identifiés comme anharmonique, alors que l'inspection visuelle nous en avait révélé sur les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et le plancher β .

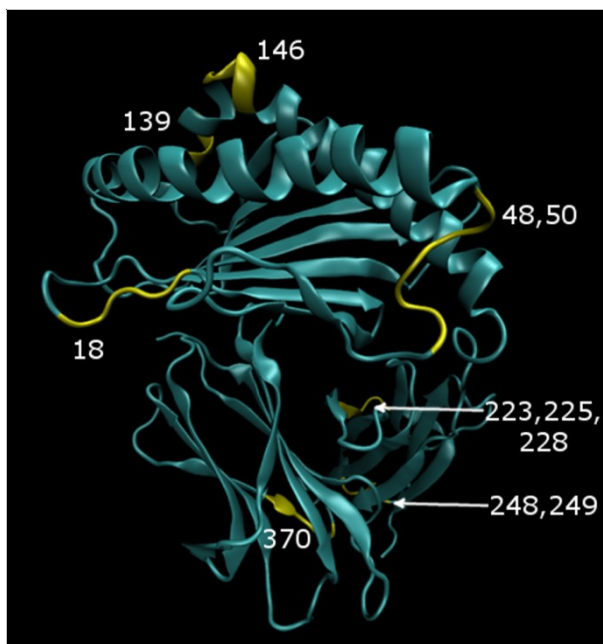


Figure 59 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité pour la comparaison CD1d non chargé vs CD1d/ α -GalCer

2.3.1.3.2 CD1d seul vs CD1d/OCH

Uniquement 7 angles dièdres (1,89% du système) ont des comportements bien distincts en présence ou en absence d'OCH. 22 (5,93%) autres ont des comportements proches et 342 (92,18%) ne diffèrent que légèrement. La différence d'harmonicité maximale est de 0,8905 et la minimale de $5,823 \cdot 10^{-5}$.

Dièdre	H _{OCH}	H _{vide}	ΔH
17	0,117	0,782	0,665
18	0,00892	0,899	0,891
48	0,808	0,294	0,514
49	0,853	0,0718	0,781
50	0,792	0,174	0,618
72	0,373	0,864	0,491
146	0,954	0,525	0,429

Parmi le faible nombre d'angles identifiés, on retrouve le 72 situé sur l'hélice $\alpha 1$ et le 146 sur l'hélice $\alpha 2$. Ces angles font partie de ceux qui ont été retenus par comparaison visuelle et

sont respectivement associés aux simulations CD1d/OCH et CD1d seul. Même si les torsions anharmoniques exclusives au système non chargé restent majoritaires, on a cette fois une nette différence entre les angles révélés par les comparaisons CD1d seul vs CD1d/OCH et CD1d seul vs CD1d/ α -GalCer. Il semblerait donc que le critère d'harmonicité soit plus à même de différencier les FEL 1D que le critère de similarité, au moins sur cette comparaison.

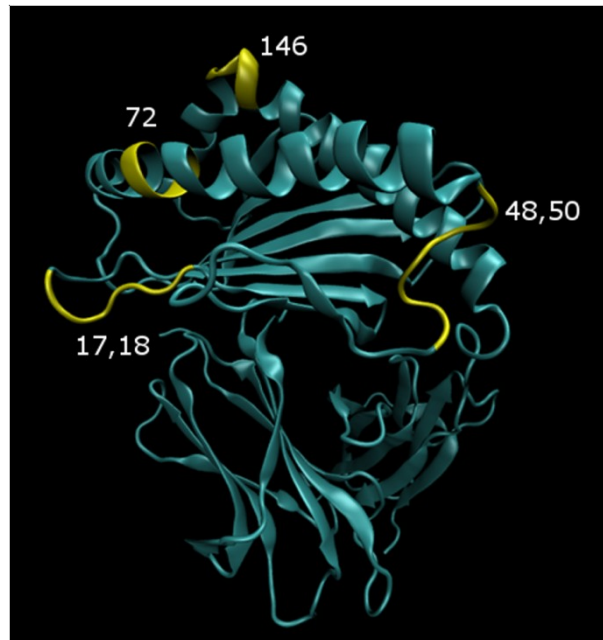


Figure 60 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité pour la comparaison CD1d vide vs CD1d/OCH

2.3.1.3.3 CD1d/OCH vs CD1d/ α -GalCer

Les profils de 11 (2,96% du système) angles dièdres montrent une grande différence d'harmonicité selon la présence de l'un ou l'autre ligand. 24 (6,47%) montrent des différences significatives alors que les 336 (90,57%) restants ont un comportement identique ou presque. Le ΔH maximal est de 0,6641 et le minimal de $2,125 \cdot 10^{-4}$.

Dièdre	H _{OCH}	H _{αGalCer}	ΔH
11	0,510	0,919	0,409
12	0,237	0,761	0,523
72	0,373	0,838	0,465
139	0,869	0,414	0,454
171	0,714	0,205	0,509
223	0,715	0,0858	0,630
225	0,552	0,111	0,441
226	0,639	0,113	0,526
228	0,766	0,102	0,664
248	0,710	0,187	0,522
370	0,846	0,308	0,537

Cette fois on retrouve à la fois des angles dièdres apparaissant dans les comparaisons CD1d seul vs CD1d/α-GalCer et CD1d seul vs CD1d/OCH. Ces angles sont aussi très proches de ceux identifiés par inspection visuelle. La présence des angles 72 et 139 confirme que les variations autour du site de liaison, et particulièrement de la poche F', sont prédominantes pour différencier l'impact de l'α-GalCer et de l'OCH sur la structure du CD1d. On retrouve également les angles 11 et 12 de la boucle du plancher β qui sont systématiquement très mouvants.

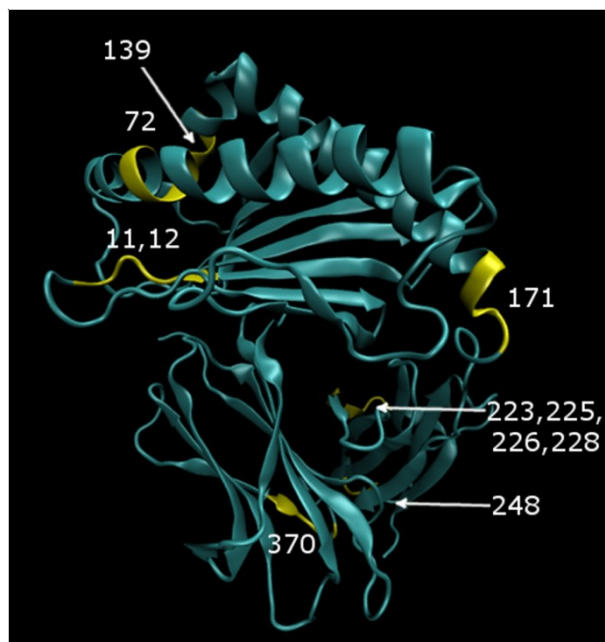
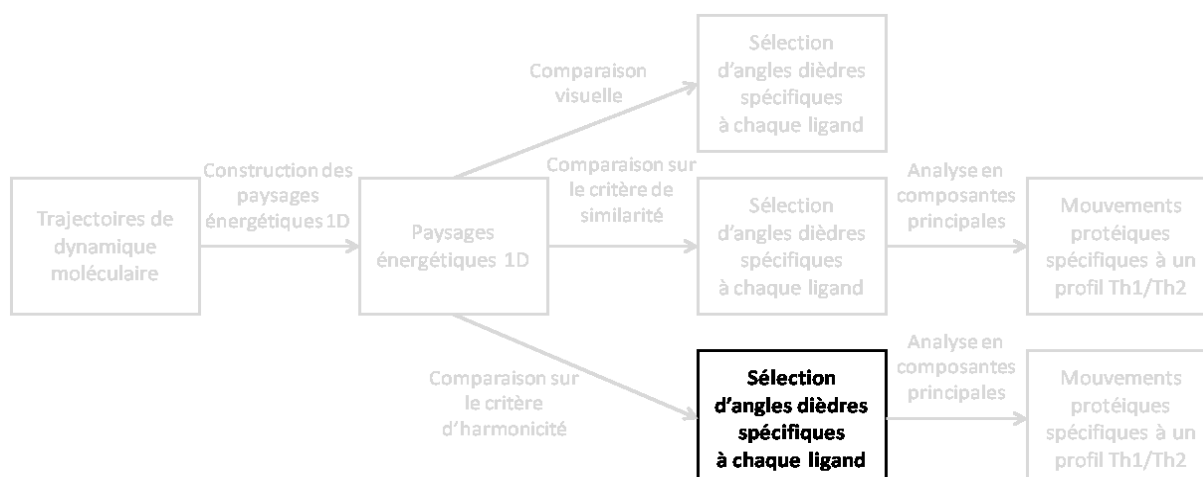


Figure 61 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité

2.3.1.3.4 Angles dièdres spécifiques



De la même façon que pour le critère de similarité, on peut identifier des ensembles d'angles dièdres dont le comportement diffère en présence ou en absence d'un ligand spécifique.

Les angles 139, 223, 225, 226, 228 et 370 semblent sensibles à la présence d' α -GalCer. On remarque que ces angles dièdres sont assez proches de ceux identifiés via le critère de similarité. Ils sont là aussi assez regroupés, ce qui favorise la capture des mouvements locaux par l'ACP aux dépens des mouvements globaux.

L'angle dièdre 72 semble avoir un comportement particulier en présence d'OCH. C'est le seul angle dièdre avec une différence d'harmonicité conséquente à la fois lorsque l'on compare les trajectoires des complexes CD1d/OCH vs CD1d vide et CD1d/ α -GalCer vs CD1d/OCH. L'ACP ne pouvant être réalisée sur un jeu d'un seul angle dièdre nous avons dû y ajouter les angles 11, 12, 171 et 248 qui ont été identifiés dans la comparaison CD1d/ α -GalCer vs CD1d/OCH mais non retenus comme spécifiques à l' α -GalCer.

Enfin, le comportement des torsions 18, 48, 49, 50 et 146 semble être caractéristique de l'absence de ligand. Là aussi on note que certains angles dièdres ont déjà été repérés via le critère de similarité.

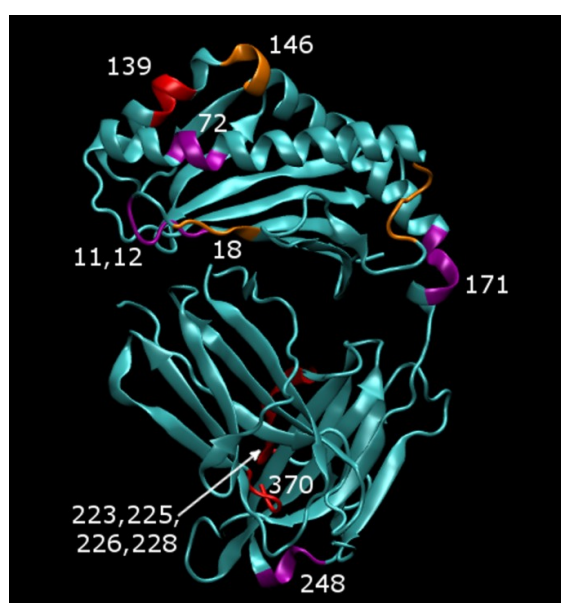
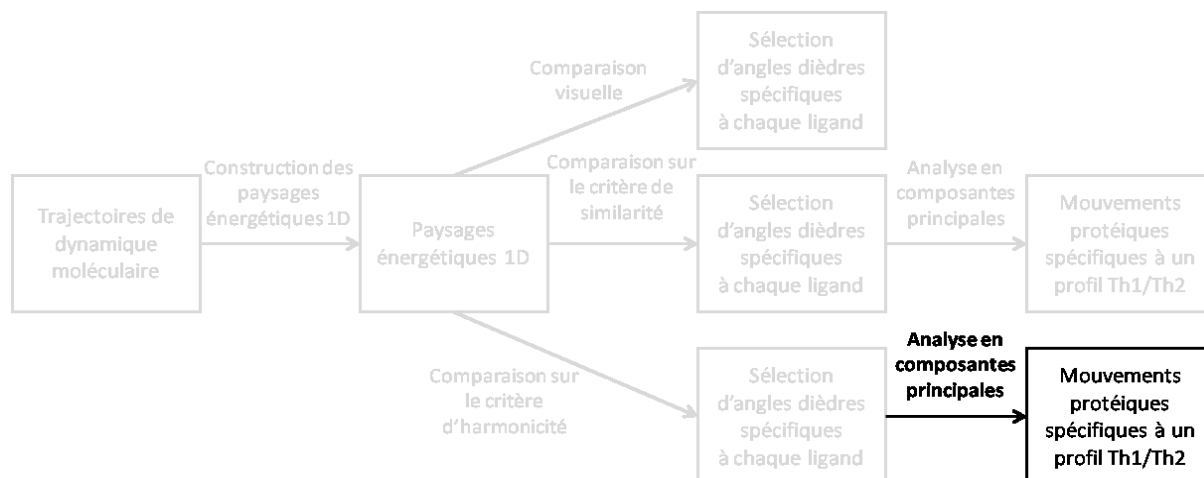


Figure 62 : Angles dièdres spécifiques retenus sur le critère d'harmonicité

2.3.1.3.5 Analyse en composante principale et contenu en cosinus



2.3.1.3.5.1 CD1d/ α -GalCer

Composante principale	Valeur propre	Variance expliquée en %	Somme de la variance expliquée En %
1	1,085	44,83	44,83
2	0,605	25,02	69,85
3	0,210	8,68	78,52
4	0,177	7,33	85,85
5	0,0978	4,04	89,89
6	0,0874	3,61	93,51
7	0,0629	2,60	96,11
8	0,0330	1,36	97,47
9	0,0252	1,04	98,51
10	0,0186	0,77	99,28
11	0,0132	0,54	99,83
12	0,00423	0,17	100,00

Comme précédemment, en expliquant 69,85% de la variance observée, les deux premières composantes principales permettent d'avancer que les fluctuations des différents angles dièdres du jeu étudié sont corrélées. Cependant, le contenu en cosinus élevé (0,606 pour la première composante et 0,498 pour la seconde) nous révèle que le mouvement capté par l'ACP est fortement Brownien, et donc difficilement exploitable. L'hypothèse que l'on peut avancer est la même que précédemment dans l'analyse de la trajectoire du CD1d seul : soit la conformation du système change peu et donc les seuls mouvements détectables sont Browniens, soit le jeu d'angles dièdres utilisé est mal adapté et ils ne sont pas impliqués dans des réarrangements structuraux majeurs. La similitude des structures initiale et finale de la simulation CD1d/ α -GalCer nous fait cependant pencher pour la première hypothèse.

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
139	0,205	4,21	0,174	3,04
	-0,0122		-0,00969	
223	0,251	10,17	-0,289	42,83
	-0,197		-0,587	
225	0,481	26,20	-0,0681	1,85
	-0,174		0,118	
226	0,285	27,07	-0,0940	9,06
	-0,435		0,286	
228	-0,480	28,46	0,0489	1,04
	0,233		0,0897	
370	0,0238	3,90	0,0583	42,18
	-0,196		-0,647	

2.3.1.3.5.2 CD1d/OCH

Composante principale	Valeur propre	Variance expliquée en %	Somme de la variance expliquée En %
1	0,571	49,43	49,43
2	0,190	16,46	65,89
3	0,161	13,94	79,83
4	0,0665	5,76	85,59
5	0,0567	4,92	90,50
6	0,0506	4,38	94,88
7	0,0255	2,21	97,09
8	0,00914	0,79	97,88
9	0,00867	0,75	98,63
10	0,00727	0,63	99,26
11	0,00476	0,41	99,67
12	0,00378	0,33	100,00

Avec 65,89% de la variance totale expliquée par les deux premières composantes et un contenu en cosinus de 0,154 sur la composante 1 et 0,176 sur la composante 2, il semble que le jeu d'angles dièdres choisi soit effectivement impliqué dans un mouvement protéique non Brownien.

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
11	0,00691	10,22	-0,0258	22,78
	-0,320		0,477	
12	-0,487	24,00	-0,118	10,40
	-0,0576		0,300	
17	-0,0509	49,62	0,00730	4,00
	-0,703		0,200	
72	-0,00423	13,98	0,174	58,98
	-0,374		-0,748	
171	-0,139	2,15	0,173	3,32
	-0,0449		0,0566	
248	-0,0160	0,03	-0,0683	0,51
	-0,00355		0,0203	

Les angles dièdres ayant une influence importante sont situés au niveau du plancher β (angles dièdres 11, 12, 17) et de l'hélice α (angle dièdre 72), ce qui est en accord avec les changements observés entre les structures initiale et finale de la trajectoire. L'influence élevée de l'angle 72 dans le second vecteur propre le désigne une nouvelle fois comme étant très sensible à la présence d'OCH.

2.3.1.3.5.3 CD1d seul

Composante principale	Valeur propre	Variance expliquée en %	Somme de la variance expliquée En %
1	1,448	76,76	76,76
2	0,166	8,78	85,54
3	0,132	7,00	92,54
4	0,0551	2,92	95,46
5	0,0249	1,32	96,78
6	0,0234	1,24	98,02
7	0,0217	1,15	99,17
8	0,00821	0,44	99,60
9	0,00707	0,37	99,98
10	0,000405	0,02	100,00

Dans le cas du CD1d non lié à un ligand, les observations sont exactement les mêmes que lorsque l'angle dièdre a été choisi sur le critère de similarité. Même si 85,54% des fluctuations du jeu d'angles dièdres sont contenus dans les deux premières composantes principales, le contenu en cosinus (0,497 pour la première composante et 0,0875 pour la seconde) indique que le mouvement perçu par l'ACP est essentiellement causé par l'agitation thermique. La seconde composante représente un mouvement non Brownien, cependant elle ne regroupe que 8,78% de la variance globale et n'est donc pas exploitable.

Dièdres	Vecteur propre 1	Influence (%)	Vecteur propre 2	Influence (%)
18	0,0172	0,03	-0,0427	0,19
	-0,00569		0,00656	
48	-0,235	12,82	0,166	12,46
	0,271		-0,311	
49	-0,251	37,76	-0,661	50,09
	-0,561		-0,253	
50	-0,130	45,55	0,337	22,04
	-0,662		0,327	
146	-0,186	3,84	-0,359	15,23
	0,0598		0,152	

Si les résultats obtenus pour le CD1d non chargé sont identiques pour les deux critères, l'analyse de la trajectoire CD1d/OCH donne de bien meilleurs résultats en utilisant le jeu d'angles dièdres sélectionnés sur le critère d'harmonicité. De même, l'analyse de la simulation CD1d/ α -GalCer est moins sujette à caution avec ce nouvel ensemble. Globalement, on a une plus grande cohérence avec les observations préliminaires en se basant sur l'harmonicité, même s'il est probable que le choix des angles dièdres spécifiques à l' α -GalCer et à l'absence de ligand puisse être amélioré. L'analyse visuelle, bien que subjective, reste incontournable au vu de la quantité d'information qu'elle fournit.

2.3.2 Comportements dynamiques identifiés et limites de la méthode

Que ce soit en se basant sur les critères de similarité, d'harmonicité ou l'inspection visuelle, il apparaît que l'hélice α 1, le plancher β et l'interface CD1d/ β 2-microglobuline sont les zones les plus influencées par la nature du ligand. Seul le mouvement de l'hélice α 1 observé lors de la simulation dynamique du complexe CD1d/OCH est suffisamment important pour être considéré comme significatif. Cependant, cela ne signifie pas forcément que les complexes CD1d/ α -GalCer et CD1d seul sont statiques. Ils peuvent présenter des mouvements de grande ampleur, peu fréquents et rapides mais qui se retrouveraient statistiquement noyés dans le bruit de fond formé par les mouvements Browniens. Il est aussi possible que les mouvements que nous cherchons soient d'ampleur plus réduite que prévu, et donc difficilement identifiable par ACP. Dans tous les cas, il apparaît que le type de mouvement perçu par l'ACP est trop spécifique. Il nous faut envisager de nouveaux outils pour nous

permettre d'étudier des mouvements moins amples et plus rapides. Il faut également envisager les mouvements du ligand. Les fluctuations de la tête polaire, seul élément du ligand à être en contact direct avec le TCR, pourraient être particulièrement informatives.

Comme toute méthode basée sur une approche statistique, il nous est aussi nécessaire d'étoffer notre base de données. C'est pourquoi à cette étude pilote a succédé une étude de plus grande ampleur réalisée sur plusieurs répliques des systèmes précédents, ainsi que de nouveaux systèmes murins ou humains renfermant des ligands de structure chimique variée.

III - Analyse de 8 complexes de référence CD1d/ligand/TCR par dynamique moléculaire

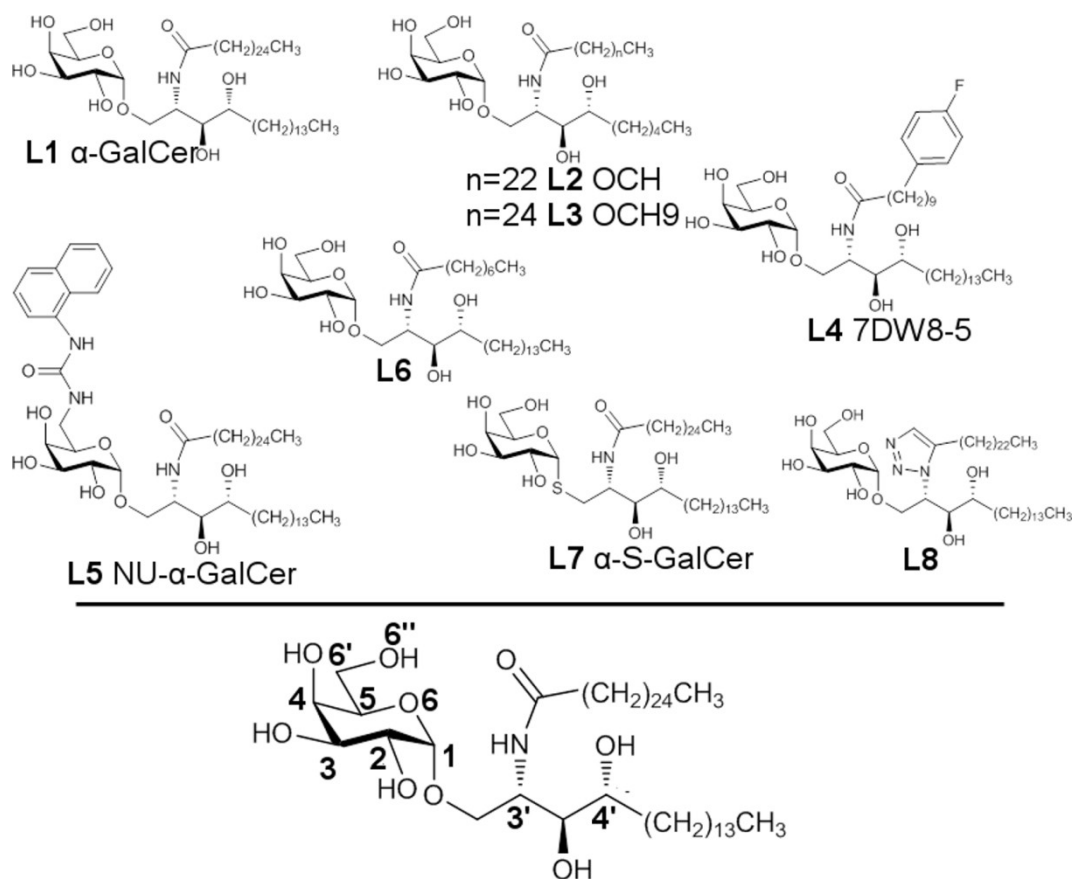
Il est difficile d'isoler des comportements dynamiques représentatifs de complexes CD1d/ligand induisant des réponses Th1 ou Th2. Dans ce but, nous avons renforcé la valeur statistique de notre approche en élargissant le panel de systèmes Th1 et Th2 étudiés ainsi que le nombre de simulations effectués pour chacun d'entre eux. L'objectif était aussi de mettre en place des méthodes d'analyses complémentaires qui permettraient des études à différentes échelles (protéine entière, hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, ligand ...) et moins sensibles au bruit de fond que l'ACP.

Même si la priorité de cette étude reste la compréhension des mécanismes moléculaires influençant la sélectivité Th1/Th2, nous nous sommes aussi intéressés à certaines problématiques peu étudiées. Par exemple, aucune simulation de dynamique moléculaire n'a jamais été réalisée dans le but d'identifier les différences de présentation d'un même glycolipide par des CD1d humains ou murins. Ceci est pourtant un point important, puisqu'on a vu que certains antigènes pouvaient induire des profils de réponse différents selon la nature du système hôte (cf I-3.2). De même, il n'existe pas non plus d'étude sur l'influence des lipides complémentaires que l'on retrouve dans certaines structures cristallographiques. Ces lipides remplissent les poches partiellement occupées par les ligands comportant des chaînes acyles ou sphingosines tronquées. Actuellement, on ne sait toujours pas si ces lipides, dont la nature varie d'une structure cristallographique à l'autre, ont un réel impact sur la conformation du CD1d ou sur la nature de la réponse biologique. Il n'a pas non plus été établi si leur présence est naturelle ou liée aux protocoles de cristallisation utilisés. D'autres questions se posent pour le CD1d ne présentant aucun ligand : Le récepteur CD1d vide est-il structuralement viable ? N'y aurait-il pas, à minima, des chaînes lipidiques libres dans les poches A' et F' pour assurer le maintien de la structure ?

C'est en gardant toutes ces interrogations à l'esprit que nous avons sélectionné les différents complexes CD1d/ligands à étudier et élaboré le protocole d'analyse.

1 Systèmes d'étude

Au total, 16 systèmes différents ont été simulés puis analysés. (Figure 63) Les complexes CD1d/ligand ont été choisis pour faciliter les comparaisons suivantes : CD1d humain vs CD1d murin, activité Th1 vs activité Th2 et simulations avec ou sans lipides complémentaires. Les structures du CD1d humain et murin proviennent respectivement des références cristallographiques 2PO6 et 3SDA.^[93,121]



Nom	N°	Ligand	PDB CD1d	Organisme	Lipide complémentaire	Activité	Ref.
H_aGAL	S1	L1	2PO6	Homme	Non	Th1	[39,40]
M_aGAL	S2		3SDA	Souris			[2]
H_OCH	S3	L2	2PO6	Homme	PDB 3ARB	Th2	[12]
M_OCH	S4		3SDA	Souris			[12,41]
H_OCH9	S5	L3	2PO6	Homme	Non	Th2	[11]
H_7DW	S6	L4	2PO6	Homme	Non	Th1	[23]
M_7DW	S7		3SDA	Souris			[23]
H_NUaGAL	S8	L5	2PO6	Homme	Non	Th1	[42]
M_NUaGAL	S9		3SDA	Souris			[27,42]
H_GOF	S10	L6	2PO6	Homme	PDB 1Z5L	Th2	[26]
M_GOF	S11		3SDA	Souris			[26]
H_SaGAL	S12	L7	2PO6	Homme	Non	Th2	[29]
M_SaGAL	S13		3SDA	Souris			Inactif
M_AZOL	S14	L8	3SDA	Souris	Non	Th2	[30]
H_CD1d	S15	Lipides libres	2PO6	Homme	Non	NA	
H_LIP	S16	Deux lipides	2PO6	Homme	PDB 3ARB&1Z5L	NA	

Figure 63: Liste des systèmes étudiés

En plus de l' α -GalCer (**L1**) et de l'OCH (**L2**), 6 autres analogues ont été choisis de façon à avoir la meilleure diversité chimique possible. Cet ensemble de composés comprend au moins un exemple de modulation sur chacun des 4 grands fragments du KRN7000 (cf I-3).

Deux autres systèmes ne présentant pas de ligand ont été ajoutés : H_CD1d et H_LIP. La dénomination H_LIP désigne les simulations où le glycolipide a été remplacé par deux lipides libres placés dans les poches A' (chaîne C₁₂) et F' (chaîne C₁₆) du CD1d humain. Le H_CD1d est un système avec un CD1d humain non chargé.

2 Méthodes et outils d'analyse employés

Tous les systèmes ont été préparés en suivant le même protocole que dans l'étude précédente (cf II - 2.3) et simulés en triple exemplaire sur 240 ns (6*40 ns pour limiter la taille des fichiers de simulation), correspondant au total à 720 ns de simulation par système.

2.1 RMSD-2D et RMSF

Le RMSD-2D représente le RMSD de chacune des conformations de la simulation contre toutes les autres (cf annexe B). Le tout est représenté classé graduellement en fonction du temps associé aux conformations. Chaque point correspond au RMSD entre deux structures de la même trajectoire, la valeur associée est représentée par un code couleur. Les éléments de la diagonale (noir) sont des auto-comparaisons (RMSD = 0) alors que les points jaunes correspondent à la valeur de RMSD la plus haute recensée. Les RMSD ont été calculés à partir d'une sélection de carbones alpha de la zone d'interaction avec le TCR, c'est-à-dire les hélices α 1 et α 2 (résidus 58-92 et 137-184 pour le récepteur humain, 58-92 et 139-186 pour le récepteur murin). Pour résumer la fluctuation globale de chaque simulation, la valeur de RMSD moyenne de toute la matrice a été calculée.

Pour chaque simulation, on calcule également la fluctuation de chacun des carbones alpha de la protéine autour de sa position moyenne (Root Mean Square Fluctuation, RMSF), cela permet d'avoir un aperçu de la mobilité de chaque acide aminé (cf annexe C).

2.2 Empreinte diédrale et distance inter-hélices

Comme son nom l'indique, l'empreinte diédrale est un indice calculé à partir de 9 angles dièdres formés par les carbones alpha des résidus en contact direct avec le TCR (76, 79, 80, 83, 84, 87, 99, 147 (149) et 150 (152)). Il permet de comparer la position relative de ces différents acides aminés entre une structure donnée et une structure référence (cf annexe D).

Pour un angle dièdre donné θ_i , la déviation angulaire d , calculée par rapport à sa position de référence θ_0 , se mesure :

$$d_i = \sqrt{2(1 - \cos(\theta_i - \theta_0))}$$

On calcule ensuite l'indice d_e qui est la valeur moyenne des d_i pour les 9 angles dièdres.

d_e varie entre 0 et 2, 0 correspondant à des interfaces totalement similaires et 2 à une disposition où tous les angles dièdres subissent un décalage de 180° . Ce sont les valeurs de torsion de la structure cristallographique 2PO6 qui ont été utilisées comme référence.

Les changements dans la distance inter-hélices sont identifiés en mesurant les écarts entre des paires de centres de masse situés sur les hélices α_1 et α_2 (cf annexe E). Chaque centre de masse, ou centroïde, prend en compte 4 carbones alpha consécutifs. Les hélices α_1 et α_2 sont ainsi constituées respectivement de 7 et 10 centroïdes.

La procédure que nous avons choisie est basée sur une version modifiée du calcul de distance de Hausdorff. Pour chaque centre de masse d' α_1 , on détermine quelle est la distance avec le centroïde d' α_2 le plus proche. On calcule la somme de toutes ces distances puis on répète la procédure en se centrant sur α_2 . La valeur finale utilisée est le total des distances une fois tous les centroïdes passés en revue.

2.3 3D-FEL et similarité 1DFEL

Tout comme les FEL 1D établis dans l'étude précédente (cf II - 2.2.1), nous avons construit des paysages énergétiques 3D (3D-FEL) liés aux torsions φ_x , φ_y et φ_z du lien osidique. (Figure 64 et annexe F) La valeur de ces angles dièdres a été associée à une énergie libre grâce à une relation logarithmique analogue à celle utilisée pour l'obtention des FEL 1D et la fonction de densité de probabilité $P(\varphi_x, \varphi_y, \varphi_z)$ calculée à partir de nos simulations. Par la suite, le paysage énergétique est représenté par des iso-surfaces où chaque point dans l'espace 3D ($\varphi_x, \varphi_y, \varphi_z$) correspond à une énergie libre fixe (en kcal.mol^{-1}).

Pour chaque simulation, seules les iso-surfaces entre 1 et $9 k_B T$ ont été envisagées, les paysages d'énergie libre ne changeant pratiquement plus au delà.

Comme vu précédemment, l'anharmonicité semble être un critère intéressant pour identifier des résidus au comportement remarquable à partir des FEL 1D (cf annexe G). Une version améliorée de l'indice de similarité pourrait également convenir, et peut être même s'avérer plus précise. Pour calculer cet indice, les minima des deux profils énergétiques à comparer sont alignés selon l'axe des énergies. L'une des deux courbes est ensuite déplacée en abscisse pour minimiser la distance de Hausdorff entre les deux graphes. De cette manière, la valeur de Hausdorff finale obtenue reflète la différence de forme entre les deux paysages superposés (cf annexe H).

Tous les points avec une énergie supérieure à $20 k_B T$ ont été exclus lors de cette procédure car ils reflètent des valeurs d'angle trop peu échantillonnées.

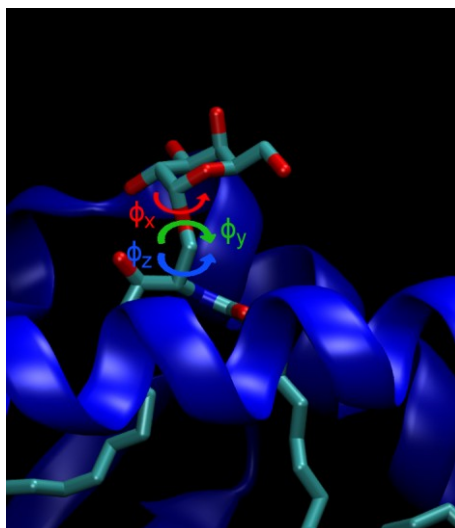


Figure 64 : Torsions utilisées pour la construction des 3D-FEL

3 Comparaison détaillée des systèmes CD1d/ α -GalCer et CD1d seul

Pour illustrer notre protocole d'analyse, nous avons choisi de comparer les systèmes **S1** (CD1d humain/ α -GalCer) et **S15** (CD1d humain non chargé) qui sont supposés avoir des comportements dynamiques assez différents.

On commence par l'analyse des RMSD-2D. (Figure 65) Cette analyse peut être utile pour détecter la présence de différents sous-états conformationnels. Même si les simulations I et II du système H_aGAL paraissent relativement homogènes sur le plan de la diversité structurale, la simulation III laisse deviner deux grandes populations conformationnelles (A et B) (Figure 65). Les trajectoires du système H_CD1d semblent plus contrastées. La simulation III montre notamment trois clusters conformationnels différents. La valeur de RMSD moyenne de chaque matrice reflète assez fidèlement la granularité des paysages. Ces graphes montrent bien que les hélices du CD1d peuvent avoir des comportements très variés. Elles peuvent aussi bien rester stables durant les 240 ns de simulation que présenter plusieurs sous-états à durée de vie d'une dizaine de nanosecondes. Cette variabilité inter-simulation nous confirme que l'utilisation de plusieurs répliques avec des points de départ différents pour chacune est indispensable, 3 simulations semblant le minimum au vu de nos résultats.

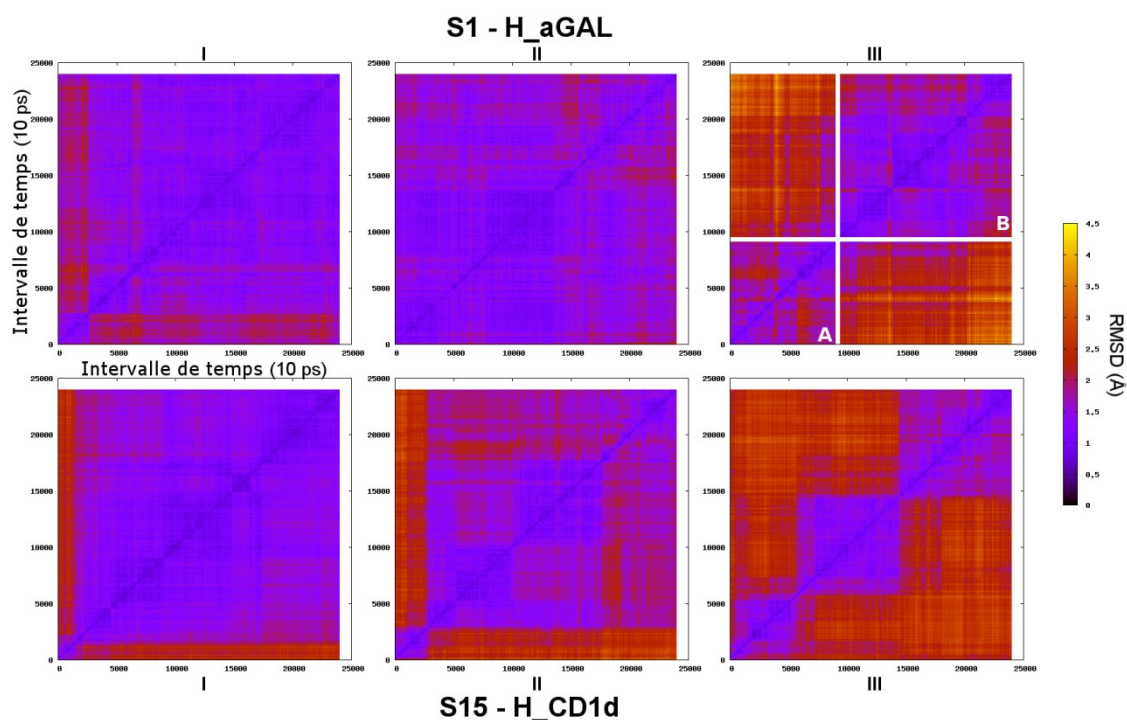


Figure 65 : Matrice de RMSD-2D pour les simulations des systèmes H_aGAL et H_CD1d

En se basant uniquement sur ces matrices RMSD-2D, on remarque peu de différences dans le comportement dynamique des systèmes H_CD1d et H_aGAL.

De même, malgré la présence de l' α -GalCer dans le système H_aGAL, la comparaison des RMSF pour chaque résidu du complexe binaire révèle une bonne similarité. (Figure 66 A) En particulier, il n'y a pas de différence notable au niveau du site de liaison du ligand. Comme on pouvait s'y attendre, dans les deux systèmes ce sont les boucles entre les hélices et le plancher β qui sont les parties les plus flexibles. Les extrémités des hélices sont, elles aussi, assez mobiles, alors que le plancher β reste stable. Ces observations sont valables pour les 6 simulations étudiées. L'avantage de l'analyse des RMSF sur le RMSD-2D est de pouvoir localiser précisément les zones de forte variation, cet indice étant calculé à l'échelle du résidu. Il ne permet cependant pas de distinguer l'origine et la fréquence des mouvements. Ainsi, il n'est pas possible de différencier les acides aminés charnières de ceux qui sont simplement présents dans un segment soumis à un mouvement de grande ampleur.

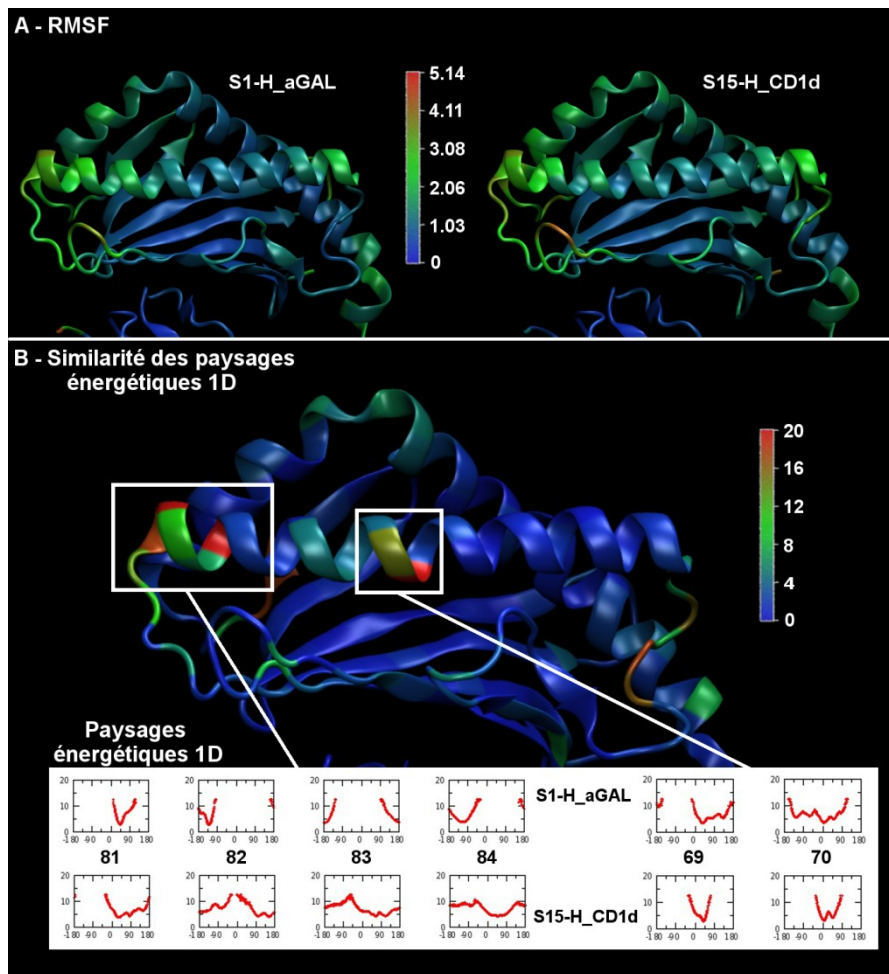


Figure 66 : Analyse des RMSF (A) et des paysages énergétiques 1D (B) des systèmes H_aGAL et H_CD1d

L'analyse des paysages énergétiques 1D est utilisée pour détecter la présence de déformation structurale. Cette méthode a été récemment appliquée à l'étude de systèmes protéiques.^[231] Les profils énergétiques d'un même angle dièdre pour différentes simulations sont comparés deux à deux *via* un indice de similarité (Figure 66 B). L'indice de similarité des paysages peut ensuite être projeté directement sur la structure du CD1d en utilisant un code couleur, ce qui permet de mettre en avant les zones subissant une possible déformation. Les paysages énergétiques 1D les plus influencés par la présence ou l'absence d' α -GalCer ont été reportés au bas de la Figure 66 B. Comme on peut le voir, les FEL associés aux angles dièdres au dessus de la poche F' deviennent plus anharmoniques en l'absence de ligand. On observe également une rigidification du milieu de l'hélice $\alpha 1$ et une déstructuration des extrémités de cette même hélice.

L'empreinte diédrale et la distance inter-hélices sont utilisées de manière complémentaire pour mesurer l'impact de ces déformations sur la disposition des centres d'interaction directs CD1d/TCR. La distance inter-hélice montre clairement un rapprochement des deux hélices portail et donc la fermeture du site de liaison en absence de ligand. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Garzón *et al* dans leur étude sur la famille de récepteur CD1.^[100] (Figure 67) Cela se traduit aussi par une déviation moyenne de l'empreinte diédrale plus

élevée pour le système H_CD1d (50%) que pour le système H_aGAL (35%). Il est d'ailleurs à noter que, même si les torsions de référence dans le calcul de cet index sont issues de la structure cristallographique CD1d/ α -GalCer/TCR humain, la déviation moyenne pour le complexe chargé avec l' α -GalCer est très loin des 0%. Cela laisse à penser que la structure obtenue par cristallographie aux rayons X est effectivement en partie biaisée par les états stabilisés nécessaires à son obtention.

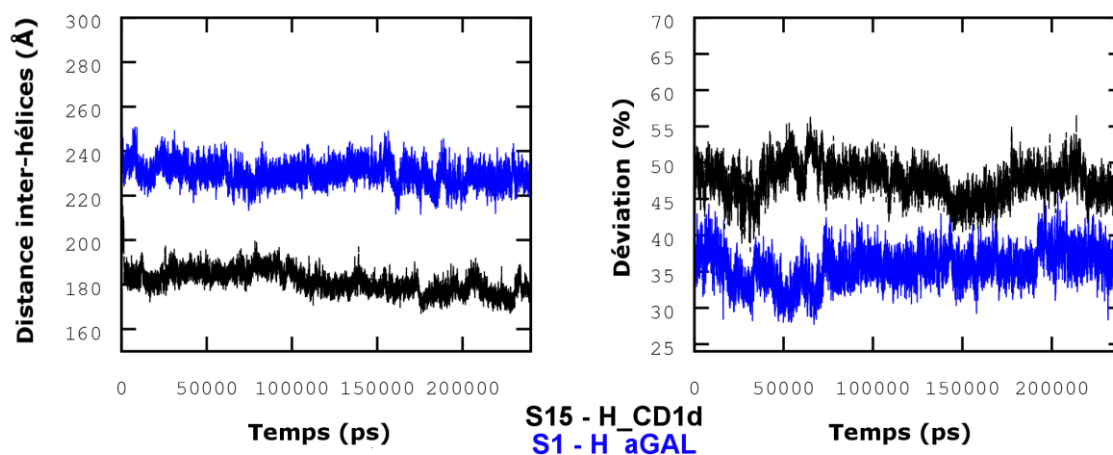


Figure 67 : Evolution de la distance inter-hélices et de la déviation de l'empreinte diédrale des systèmes H_aGAL et H_CD1d

Pour finir, on s'intéresse à l'espace conformationnel exploré par la tête polaire du ligand durant les simulations. On utilise pour décrire cela les trois torsions associées aux trois liaisons rotatoires du lien glycosidique. (Figure 68) On nomme la première « pivot anomérique » (φ_x), « pivot central » la seconde (φ_y) et « axe amide » la dernière (φ_z). Théoriquement, les rotations autour des axes φ_x et φ_z correspondent à des mouvements horizontaux au dessus de l'entrée de la cavité du ligand. Ces rotations sont stériquement restreintes par les hélices α_1 et α_2 . De même pour la rotation autour du pivot central qui obligerait la tête polaire à se loger entre les hélices. Dans tous les cas, un mouvement autour de l'un de ces axes conduirait à la perte, partielle ou totale, du réseau de liaisons hydrogène OTAN. La Figure 68 représente différentes iso-surfaces d'énergie libre associées au FEL 3D du système H_aGAL. Pour la réplique I, le 3D-FEL présente un seul état conformationnel, ce qui indique que la tête polaire conserve une orientation pratiquement identique pendant les 240 ns de simulation. Cet état, que l'on nommera par la suite « état OTAN » est centré sur les coordonnées (50° , 157° , 51°) dans l'espace (φ_x , φ_y , φ_z) et correspond à une conformation du complexe binaire où le réseau OTAN est intact. (Figure 68)

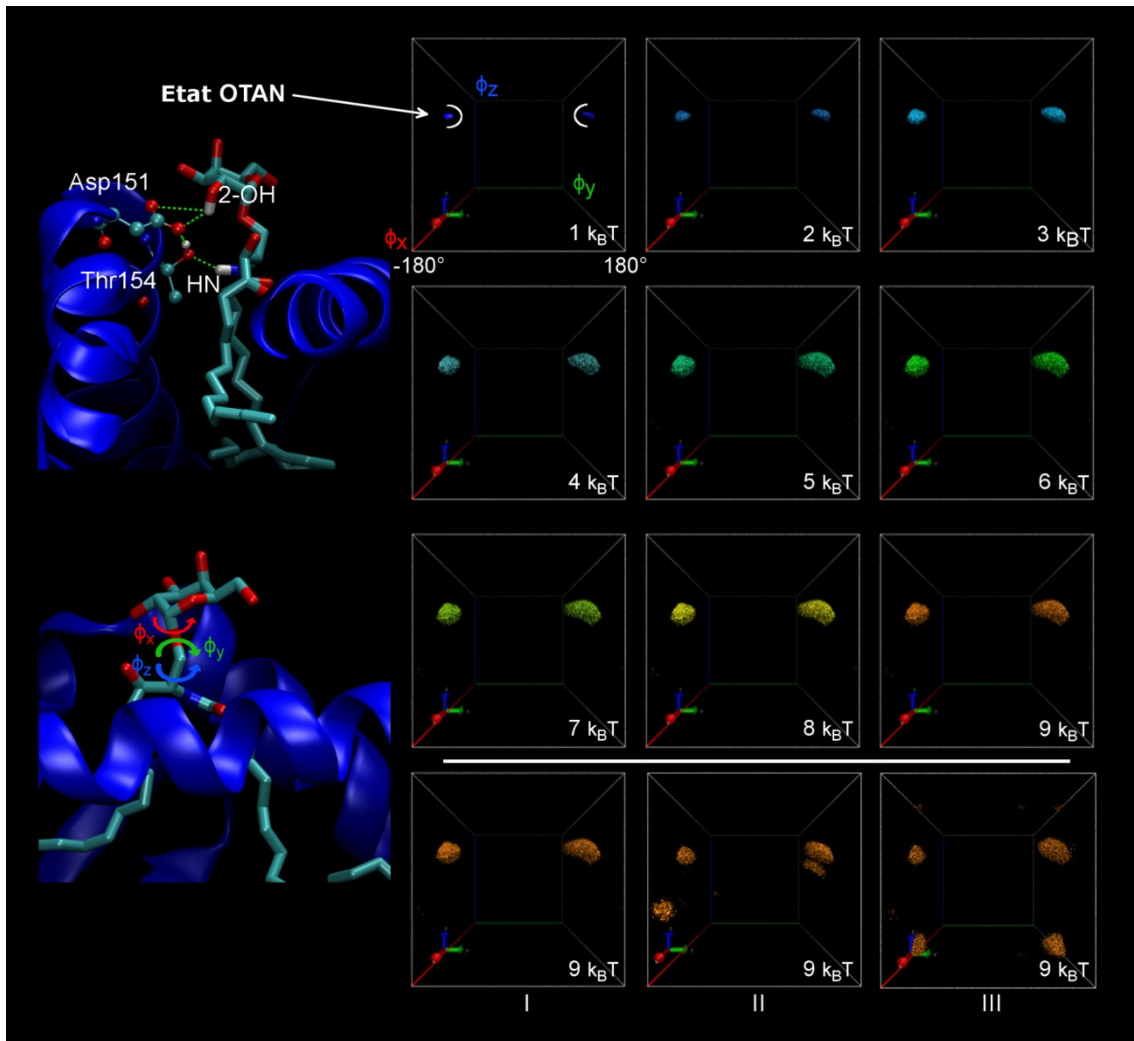


Figure 68 : Paysages énergétiques 1D du système H_aGAL de 1 à 9 k_B T pour la simulation I, puis à 9 k_B T pour les répliques I, II, III et représentation de la conformation associée à l'état OTAN

La comparaison des paysages à 9 k_B T pour les trois simulations de ce système montre que cet état OTAN y est systématiquement présent. Deux autres états conformationnels secondaires situés dans le plan (ϕ_x , ϕ_z) ont également été visités. Tous les deux sont associés à des conformations où la tête polaire interagit avec l'hélice α_2 et maintient un réseau OTAN au moins partiellement intact. En effet, l'état secondaire observé dans la simulation II correspond à une combinaison de rotations autour de ϕ_x et ϕ_z qui se compensent et ne déplacent que modérément la partie galactose. (Figure 69 A) Le sous-état visité lors de la simulation III est associé à un angle ϕ_z d'environ 180° , ce qui amène la tête polaire au dessus de la chaîne sphingosine. (Figure 69 B) Dans cette conformation, la perte de l'interaction entre le galactose et l'hélice α_2 est compensée par l'interaction de l'Asp151 (Asp153) avec l'hydroxyle 4'-OH. Aucune conformation correspondant à une rotation marquée autour de l'axe ϕ_y n'est observée pendant ces trois simulations.

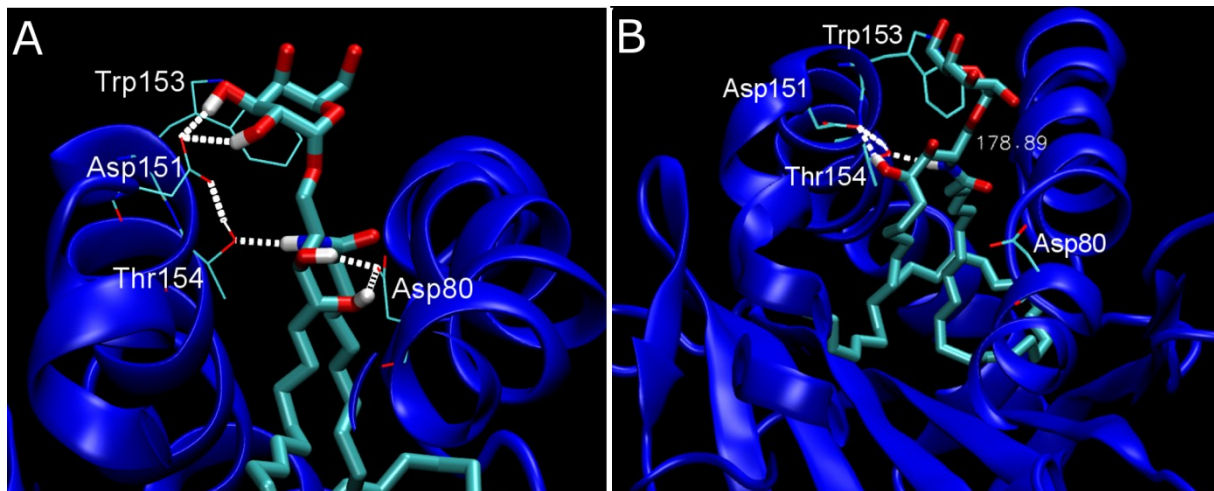


Figure 69 : Etats conformationnels secondaires observés pour le système H_aGAL

4 Effet différentiel de la présentation par des CD1d humains ou murins

L'objectif est ici d'identifier de possibles différences dans la présentation de ligands par des CD1d humains ou murins, qui pourraient peut-être expliquer le changement de réponse biologique parfois observé entre les deux hôtes. Pour pouvoir tirer les conclusions les plus pertinentes possibles, seuls les systèmes chargés avec des ligands identiques et induisant les mêmes profils de réponse chez l'humain et la souris ont été comparés. Ainsi, 4 comparaisons ont été réalisées : **S1/S2**, **S3/S4**, **S6/S7** et **S8/S9**, soit l'analyse de 24 trajectoires.

Un premier point intéressant est que dans toutes les simulations avec le CD1d murin, on observe une augmentation moyenne de 1,3 Å dans la distance inter-hélices localisée au dessus de la poche A'. (Figure 70 et Table 8) Ceci n'est pas très surprenant car ces portions d'hélices sont celles où la séquence est la moins conservée entre les récepteurs humains et murins (10 acides aminés différents, 2 sur $\alpha 1$ et 8 sur $\alpha 2$), ce qui induit des différences locales dans l'encombrement stérique et les propriétés physico-chimiques. (Figure 8) Cet écartement est contrebalancé par un rapprochement des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ au niveau de la poche F', au point que la distance inter-hélices moyenne est pratiquement la même lors des simulations des systèmes humains et murins. (Figure 70 et Table 8)

	Système	Distance Inter-hélices (Å) sur 17 centroïdes (hélices α 1 et α 2 cotés A' et F')			moyenne (Å)	RMSD (Å)	moyenne par centroïde (Å)
		Replique 1	Replique 2	Replique 3			
		H_aGAL	1	225,8			
M_aGAL	2	236,0	232,0	227,0	231,7	4,5	13,6±0,3
H_OCH	3	227,9	231,4	225,9	228,4	2,8	13,4±0,2
M_OCH	4	228,4	231,4	225,9	228,6	2,7	13,4±0,2
H_OCH9	5	231,9	229,4	234,9	232,1	2,8	13,7±0,2
H_7DW	6	228,0	230,6	224,1	227,6	3,3	13,4±0,2
M_7DW	7	225,2	223,0	230,8	226,3	4,0	13,3±0,3
H_NUaGAL	8	231,0	233,6	230,8	231,8	1,6	13,6±0,1
M_NUaGAL	9	235,2	240,4	240,5	238,7	3,0	14,0±0,2
H_GOF	10	236,8	232,0	233,1	234,0	2,5	13,8±0,2
M_GOF	11	231,7	232,5	234,0	232,7	1,1	13,7±0,1
H_SaGAL	12	229,4	233,2	227,4	230,0	3,0	13,5±0,2
M_SaGAL	13	231,4	235,1	236,5	234,3	2,7	13,8±0,2
M_AZOL	14	233,2	233,6	231,3	232,7	1,2	13,7±0,1
H_CD1d	15	194,6	181,5	193,3	189,8	7,2	11,2±0,5
H_LIP	16	234,7	214,4	223,9	224,3	10,2	13,2±0,6

	Système	Distance Inter-hélices (Å) sur 11 centroïdes (hélices α 1 α 2 coté A')			moyenne (Å)	RMSD (Å)	moyenne par centroïde (Å)
		Replique 1	Replique 2	Replique 3			
		H_aGAL	1	140,2			
M_aGAL	2	154,8	154,6	152,2	153,9	1,4	14,0±0,1
H_OCHLip	3	138,3	135,9	138,9	137,7	1,6	12,5±0,1
M_OCHLip	4	149,6	152,5	153,5	151,9	2,0	13,8±0,2
H_OCH9	5	142,8	143,5	138,7	141,6	2,6	12,9±0,2
H_7DW	6	133,1	135,5	137,4	135,3	2,1	12,3±0,2
M_7DW	7	147,8	147,3	150,9	148,6	2,0	13,5±0,2
H_NUaGAL	8	139,3	140,9	139,8	140,0	0,8	12,7±0,1
M_NUaGAL	9	157,6	168,9	162,7	163,1	5,7	14,8±0,4
H_GOF	10	143,7	136,3	140,2	140,0	3,7	12,7±0,3
M_GOF	11	152,9	157,0	156,5	155,5	2,2	14,1±0,2
H_SaGAL	12	139,5	137,2	137,4	138,1	1,3	12,6±0,1
M_SaGAL	13	153,1	153,2	153,4	153,2	0,2	13,9±0,1
M_AZOL	14	157,7	156,5	153,5	155,9	2,2	14,2±0,2
H_CD1d	15	119,6	110,2	118,0	116,0	5,0	10,5±0,3
H_LIP	16	143,7	125,2	139,9	136,3	9,7	12,4±0,6

Table 8 : Distances inter-hélice moyennes pour tous les systèmes

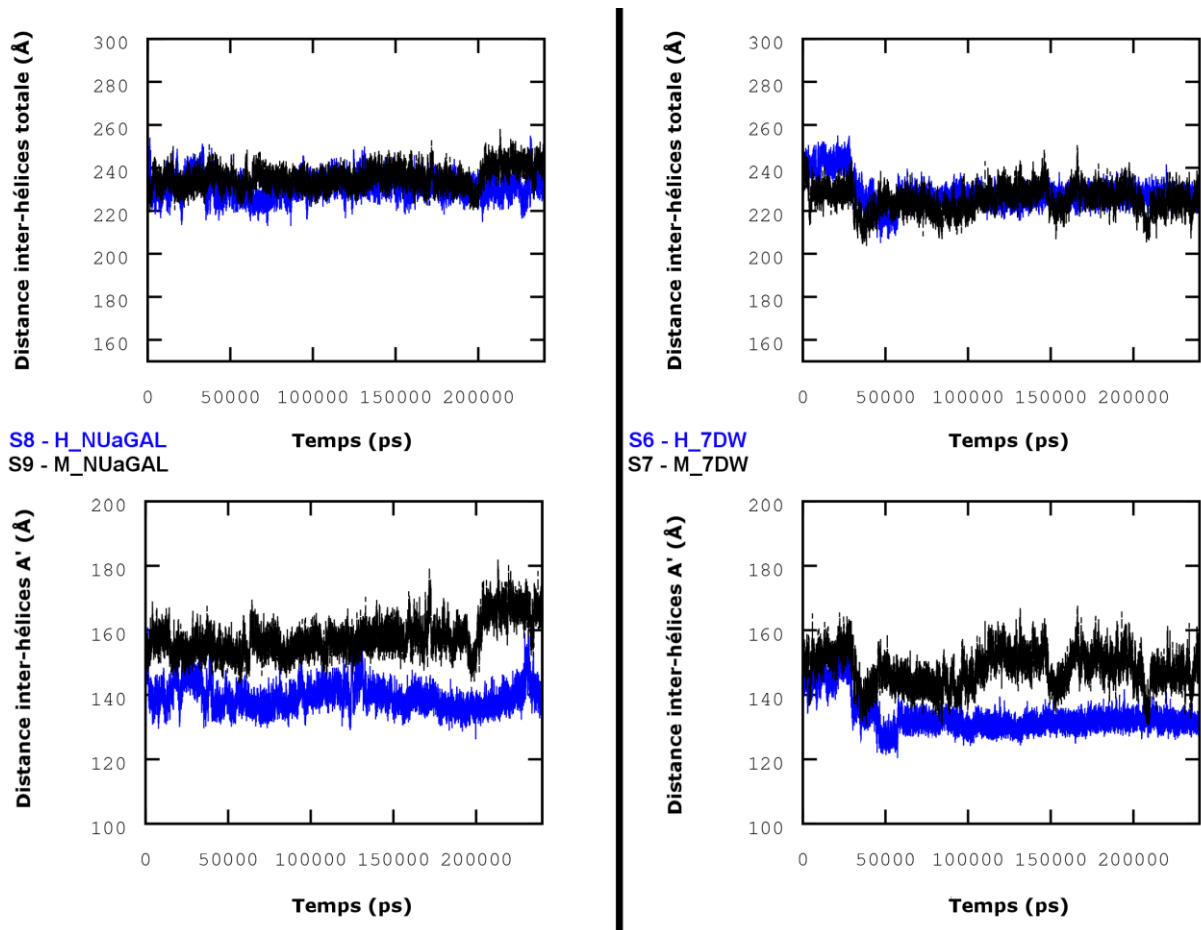


Figure 70 : Variation de la distance inter-hélice totale et localisée au dessus de la poche A' pour les complexes H_NUaGAL, M_NUaGAL, H_7DW et M_7DW

C'est dans le couple M_NUaGAL/H_NUaGAL que l'écart au dessus de la poche A' est le plus marqué (différence de 2,1 Å). Ceci est peut être lié au positionnement particulier du groupement uréido-naphtyle lié à la tête polaire de cet analogue. Celui-ci peut s'insérer dans une petite poche entre les deux hélices, comme on peut l'observer dans la structure cristallographique du système ternaire murin PDB 3QUZ.^[115]

Les acides aminés Met69 et Met161, en contact direct avec ce naphtyle, sont remplacés respectivement par l'Ile69 et le Trp160 dans le CD1d humain. L'augmentation de l'encombrement stérique associée pourrait empêcher le placement du bicyclic entre les hélices et impliquerait une distance inter-hélice plus faible. (Figure 71) De façon assez surprenante, la variation de distance relevée dans la disposition des hélices ne semble pourtant pas s'accompagner d'une déviation de l'empreinte diédrale. (cf annexes D et E)

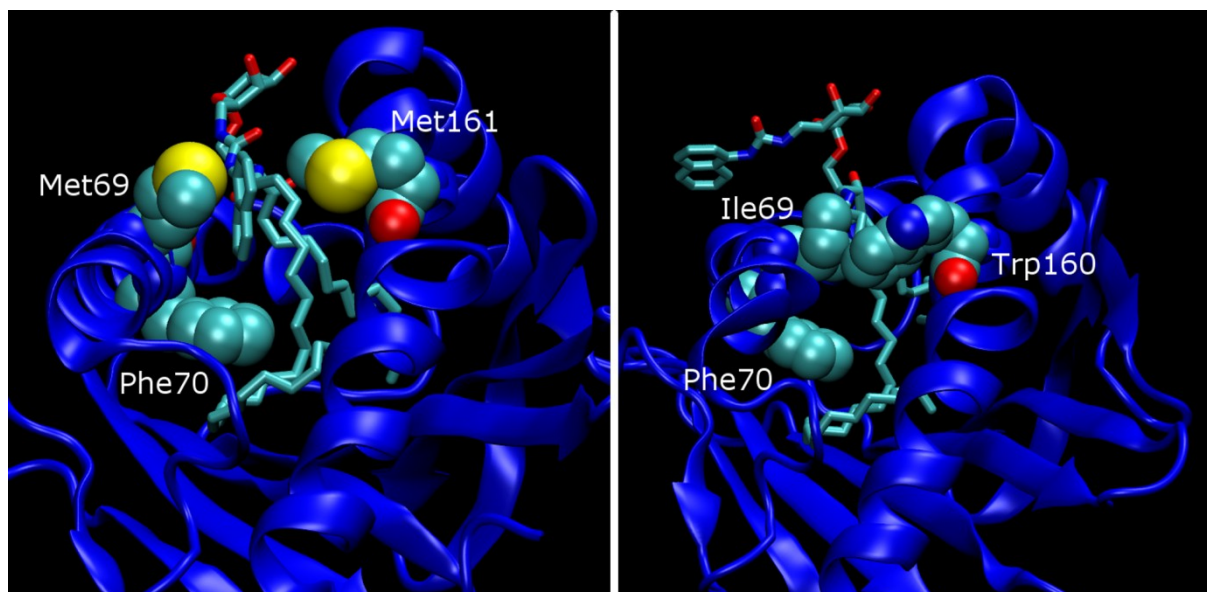


Figure 71 : Conformation des acides aminés de la poche A' pour les CD1d humains (à droite) et murins (à gauche)

D'un point de vue dynamique, le CD1d humain semble plus mobile que son équivalent murin. En effet, on remarque une augmentation du RMSD moyen des matrices de RMSD-2D (Table 9) et un RMSF plus élevé pour les récepteurs humains, notamment au niveau des boucles entre l'hélice $\alpha 1$ et le plancher β . (cf annexes B et C)

	H_aGAL	H_OCH	H_7DW	H_NUaGAL	M_aGAL	M_OCH	M_7DW	M_NUaGAL
I	1,40	1,67	1,30	1,39	1,41	1,55	1,48	1,33
II	1,38	1,59	1,68	1,45	1,35	1,17	1,42	1,56
III	1,93	1,46	1,75	1,52	1,41	1,28	1,44	1,19
Moyenne	1,57	1,57	1,58	1,45	1,39	1,33	1,45	1,36

Table 9 : RMSD moyen des matrices de RMSD-2D pour les systèmes S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8 et S9

La tête polaire du ligand chargé dans un CD1d humain apparaît, elle aussi, plus libre que dans un CD1d murin. La comparaison du volume des iso-surfaces à $9 k_B T$ montre que les paysages énergétiques associés aux systèmes humains ont un volume plus important. (Figure 72) Le volume des FEL 3D étant proportionnel à la diversité conformationnelle, on peut en déduire une plus grande mobilité de la partie galactose. Cependant, l'état OTAN reste l'état prédominant quel que soit la nature du récepteur CD1d, la région associée étant largement peuplée même à de très basses énergies.(cf annexe F) Le FEL de la simulation II du système H_OCH est assez remarquable et présente pas moins de 5 états conformationnels. Nous nous attarderons plus en détail sur ce paysage dans la section suivante.

	Système	Volume de l'espace conformationnel exploré par la tête polaire dans le repère (ϕ_x, ϕ_y, ϕ_z); isovaleur : 9kBT			
		Replique 1	Replique 2	Replique 3	Moyenne
H_aGAL	1	86378	68188	95901	83489±14081
M_aGAL	2	62752	49152	49508	53804±7752
H_OCH	3	82155	108184	67056	85798±20805
M_OCH	4	54821	53602	54284	54235±611
H_OCH9	5	92216	115631	95732	101193±12627
H_7DW	6	60985	54762	56786	57511±3175
M_7DW	7	47898	44679	43921	45499±2112
H_NUaGAL	8	70690	60571	81386	70882±10409
M_NUaGAL	9	58740	54208	67780	60243±6910
H_GOF	10	66759	77904	72976	72546±5585
M_GOF	11	50149	76376	65937	64154±13204
H_SaGAL	12	107635	135507	131751	124964±15125
M_SaGAL	13	130392	127213	152169	136591±13584
M_AZOL	14	92705	93522	82534	89587±6122

Figure 72 : Volume total des iso-surfaces d'énergie libre à 9 k_BT pour les différents systèmes

5 Comparaison des systèmes induisant des réponses immunitaires Th1 ou Th2

Comme pour l'analyse réalisée en II - 2.3, le but est de trouver une corrélation entre la structure du ligand, la géométrie du complexe binaire, sa dynamique et le profil de réponse biologique. Pour cela, nous avons comparé des simulations Th1 et Th2 utilisant un CD1d de même nature. Pour diminuer le nombre de comparaisons à mener, nous nous sommes limités à un seul ligand de référence Th1, celui qui a été le plus largement étudié : l' α -GalCer. Nous avons donc étudié les systèmes **S1**, **S2**, **S3**, **S12** et **S14** répartis en 3 comparaisons, deux avec le récepteur humain (**S1/S3** et **S1/S12**), une avec le récepteur murin (**S2/S14**).

D'un point de vue structural, ce sont les systèmes H_OCH et M_AZOL qui se démarquent le plus. L'analyse des FEL 1D de la réplique II du système chargé avec l'OCH montre une modification majeure de l'hélice α 1 impliquant les angles dièdres 70 à 77, du côté de la poche F'. (Figure 73) Globalement, le CD1d du système H_OCH apparaît un peu plus fluctuant que celui du système H_aGAL. En effet, l'analyse de RMSF indique que les résidus autour de la poche F' ont une mobilité accrue. (cf annexe C) Il est très probable que cela soit lié à la chaîne sphingosine tronquée de l'OCH qui ne va pas permettre de stabiliser l'ensemble de l'interface CD1d/TCR et ce malgré la présence d'un lipide complémentaire. Le ligand **L8** provoque un élargissement prononcé du paysage énergétique des angles dièdres 146 à 150 du CD1d (acides aminés 146 à 153 de l'hélice α 2) visible dans toutes les simulations.(cf annexes G et H) L'introduction d'un groupe 1,2,3-triazole à la place de la fonction amide semble donc augmenter la flexibilité de l'hélice α 2, et donc perturber le réseau de liaisons hydrogène OTAN qui inclut l'Asp151 (Asp153) et la Thr154 (Thr156). On

s'attend donc à une déstabilisation de la tête polaire du ligand dans ce complexe. Le ligand **L7** ne présente pas de changement notable dans la structure du CD1d comparativement à l' α -GalCer, hormis des FEL 1D assez larges qui dénotent une certaine souplesse au niveau du milieu de l'hélice α 1. Dans aucune comparaison la déviation de l'empreinte diédrale ou la distance inter-hélice ne sont apparues comme des critères pertinents pour différencier les systèmes Th1 et Th2.

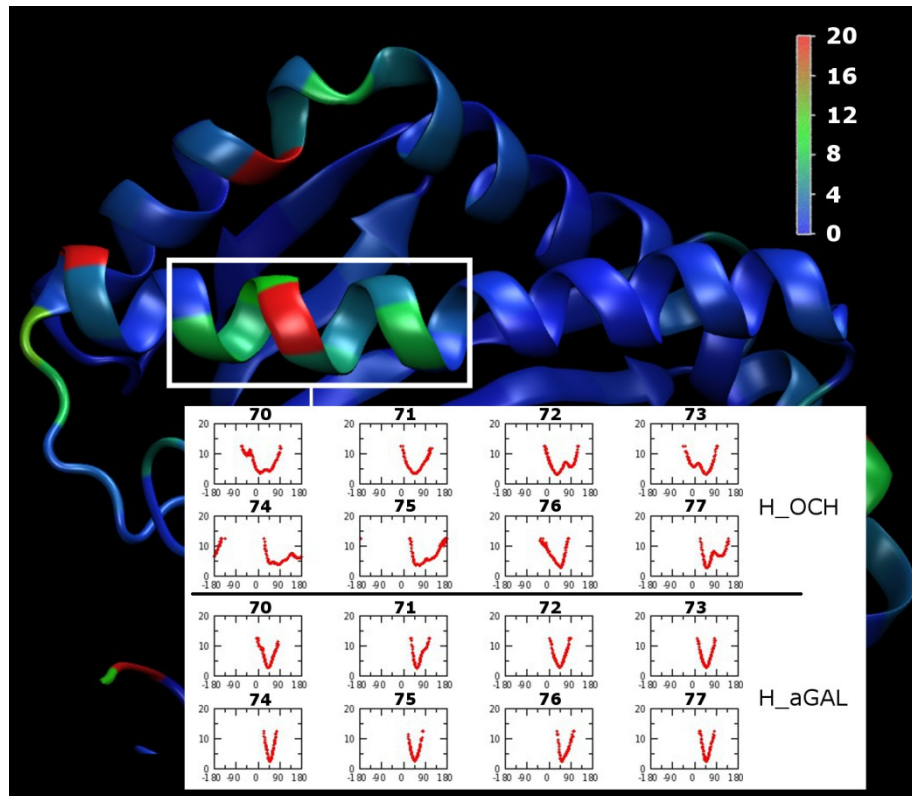


Figure 73 : Comparaison des FEL 1D des hélices α 1 et α 2 pour les systèmes H_OCH et H_aGAL

En ce qui concerne les mouvements de la partie galactose, les 3 ligands qui induisent une réponse biologique Th2 ont tous la possibilité de visiter de nombreux états conformationnels secondaires, ce qui n'est pas du tout le cas pour le système H_aGAL. (Figure 74) Certains systèmes, comme le H_OCH, ne présentent ce type de paysage que pour une simulation sur 3. Réaliser 3 répliques par système semble donc être le minimum pour révéler ce type de comportement. Parmi tous les états conformationnels secondaires observables dans ces différents FEL, un seul est commun aux 3 ligands Th2. Il est situé à l'aplomb de l'état OTAN dans l'espace (ϕ_x , ϕ_y , ϕ_z) et s'obtient par une rotation d'environ 110° autour de l'axe ϕ_z . (Figure 74) Ce nouvel état, que l'on nommera « état décalé », est accessible à des énergies plus élevées que l'état OTAN (3 à 4 $k_B T$), il est donc légèrement moins stable. Dans cette conformation, le réseau OTAN est partiellement rompu et la liaison hydrogène avec l'Asp80 est perdue. La tête polaire est orientée vers l'hélice α 1 mais aucun contact direct n'a été relevé. En effet, les deux acides aminés qui font face à la partie galactose (Val72 et His68) sont trop éloignés de celle-ci pour pouvoir l'attirer. Le contact entre la tête polaire et le Trp153 du CD1d humain est également perdu dans cette conformation. Au vu de la disposition des hydroxyles et du décalage de la tête polaire, cette nouvelle conformation ne paraît pas favorable à la reconnaissance du complexe binaire par le TCR. Cette réorientation

vers l'hélice $\alpha 1$ étant énergétiquement moins stable que l'état OTAN, elle n'est que temporaire avec une durée de vie moyenne de 5 à 30 ns. La transition de l'état OTAN à l'état décalé ne prenant que quelques picosecondes, il est très difficile de l'analyser et d'en trouver la cause. Cependant, il semble que la perte de la liaison hydrogène entre le 3'-OH et l'Asp80 soit l'élément déclencheur. Elle entraîne ensuite le déplacement de la tête polaire et la perte partielle du réseau OTAN. On observe pour ces systèmes quelques points correspondant à une rotation autour du pivot central ϕy mais aucun véritable état secondaire stable, au contraire du système M_SaGAL sur lequel nous reviendrons. Bien que l'état décalé soit présent dans toutes les simulations du système H_SaGAL, celui-ci est visité à des niveaux énergétiques plus bas que de coutume ($2 k_B T$ environ). Il existe pour ce système un autre état secondaire particulièrement stable que l'on retrouve aussi dans la simulation II du système H_aGAL. (Figure 69 B) La tête polaire semble donc encore plus mobile dans ce complexe puisque on observe 3 états conformationnels de basse énergie (OTAN, décalé et secondaire).

Un point très intéressant est que ces résultats sur la dynamique spécifique de la tête polaire en fonction du profil de réponse biologique observé peuvent être étendus à tous les systèmes. Parmi les simulations de complexes binaires qui engendrent une réponse Th1 (**S1, S2, S6, S7, S8, S9**), aucune ne présente un état décalé. De même, les FEL associés présentent très peu d'états conformationnel secondaires. Au contraire, les 7 autres systèmes, pour lesquels une activité Th2 a été démontrée, présentent tous au moins une réplique avec un FEL comportant l'état décalé, exception faite des systèmes **S4** et **S10**. Il est bien sûr possible que malgré la longueur de nos simulations ce résultat soit une pure coïncidence et un plus grand nombre de simulations par système soit nécessaire pour confirmer cette tendance. Cependant, ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse qui associe le profil Th2 à des complexes binaires et ternaires moins stables. Ici, la déstabilisation viendrait de la mobilité accrue de la tête polaire au dessus des hélices portail, ce qui défavoriserait la formation et la stabilité du complexe CD1d/TCR.

Les simulations du système M_SaGAL engendrent des FEL 3D très particuliers. (cf annexe F) Tous présentent l'état décalé et de très larges états conformationnels secondaires, au point d'obtenir de véritables bassins. C'est également le seul système pour lequel l'état OTAN n'est pas l'état de plus basse énergie, ce dernier étant l'état décalé. L'état OTAN est visité à des énergies environ $2 k_B T$ supérieures à celle de l'état décalé. De plus, on distingue clairement des états conformationnels secondaires correspondant à de larges rotations autour du pivot central. Ce type de conformation est associé à un état que nous avons nommé « état renversé » dans lequel la tête polaire est liée par liaison hydrogène à l'hélice $\alpha 1$. (Figure 74) Ceci est très surprenant puisque toute rotation autour de l'axe ϕy est sensée emmener la tête polaire buter contre les hélices. Dans ce cas précis, la tête polaire semble légèrement surélevée et placée au dehors du CD1d au cours de la simulation. Le galactose ainsi lié à l'hélice $\alpha 1$ ne peut pas interagir avec le TCR, plus aucune reconnaissance n'est donc possible. Ceci est cohérent avec les tests de ce composé qui ne démontrent pas d'activation des iNKT murins.^[167,168,201]

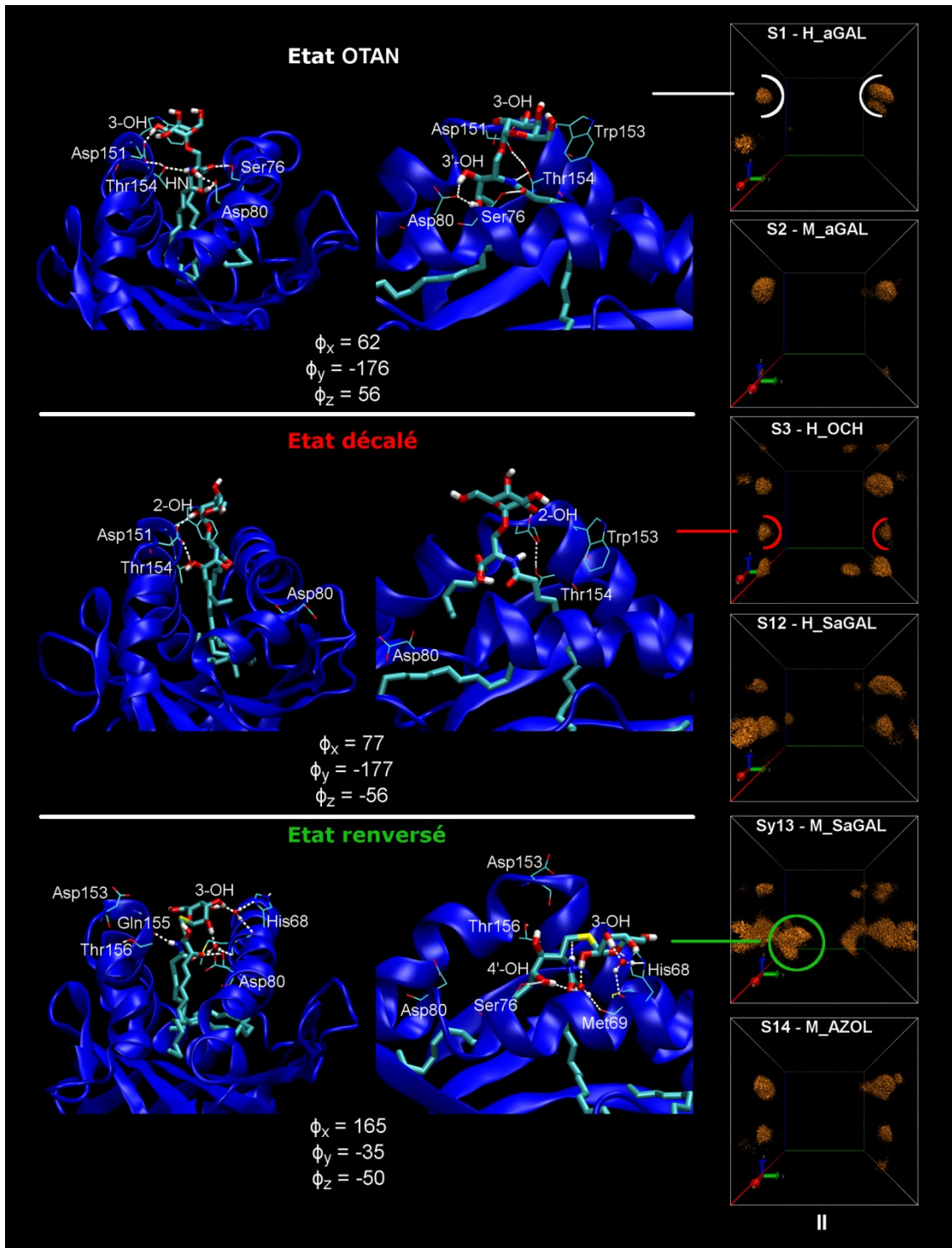


Figure 74 : Etats conformationnels significatifs et paysages énergétiques associés à 9 k_BT

Nous avons mentionné précédemment que, bien qu'induisant une réponse biologique Th2, les systèmes **S4** (M_OCH) et **S10** (H_GOF) ne présentent pas d'état décalé. Il se peut simplement que plus de simulations de ces complexes soient nécessaires pour l'observer. Cependant, ces systèmes possédant respectivement une chaîne sphingosine et une chaîne acyle tronquée, provoquent des changements importants dans les FEL 1D des angles

dièdres du centre de l'hélice $\alpha 1$. (cf annexes G et H) Cela révèle la formation d'un coude prononcé à ce niveau de l'hélice qui porte la majorité des résidus connus pour être en contact direct avec le TCR. (Figure 75) La perturbation de l'intégrité structurale de l'hélice $\alpha 1$ pourrait donc, en plus de la mobilité accrue de la tête polaire du ligand, déstabiliser les complexes binaires et ternaires au point de provoquer une réponse Th2. Cependant, cette déformation n'est pas spécifique à ce profil puisqu'on la retrouve notamment dans la simulation III du système H_aGAL. (cf annexes G et H)

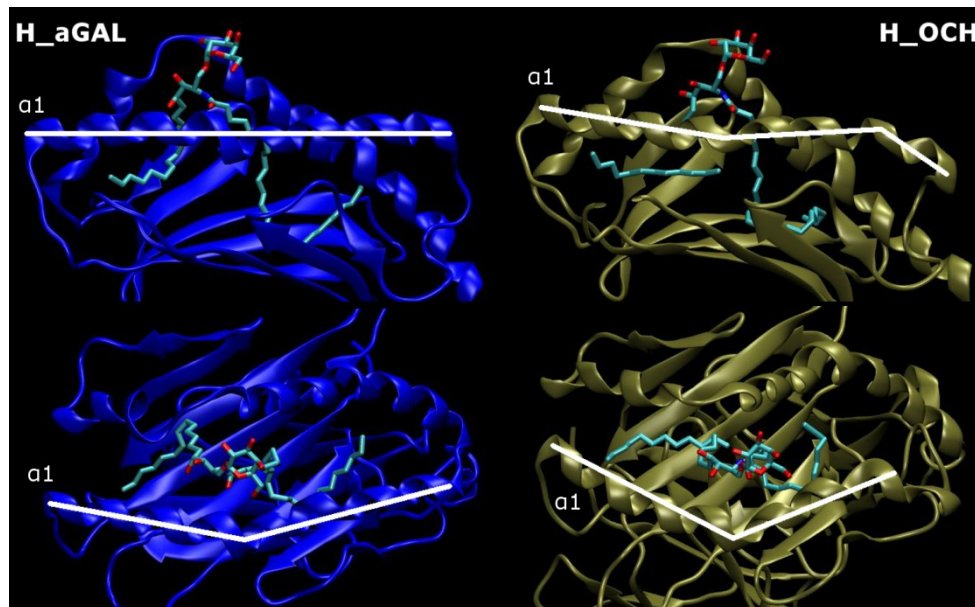


Figure 75 : Déformation de l'hélice $\alpha 1$ dans les systèmes H_aGAL et H_OCH

6 Influence du lipide complémentaire

Pour rappel, un lipide complémentaire est une chaîne lipidique qui vient se loger dans la poche A' ou F' en supplément du ligand si ce dernier présente une chaîne acyle ou sphingosine écourtée. Par exemple, les structures cristallographiques des complexes CD1d/L2/TCR (PDB 3ARB) et CD1d/L6 (PDB 1Z5L) contiennent ce type de lipide. (Figure 76) En l'absence de ligand type glycolipide dans le CD1d, il est aussi supposé que des lipides libres endogènes viennent occuper la totalité de la cavité du ligand pour maintenir la cohésion structural de la protéine et éviter sa dénaturation.^[118] Nous nous sommes donc intéressés à l'importance de ces lipides complémentaires sur la dynamique de la tête polaire et leur impact sur la structure du CD1d.

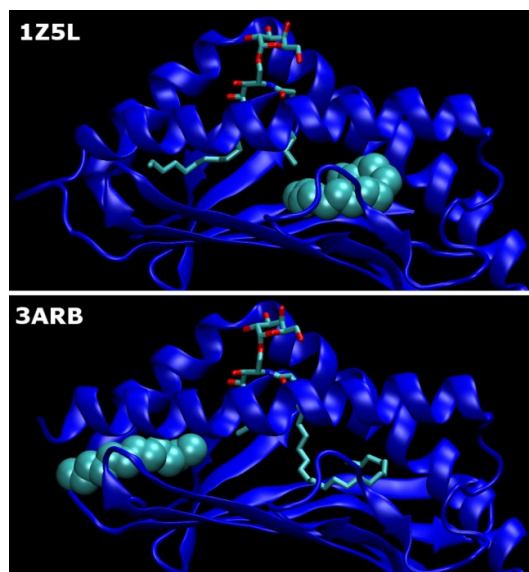


Figure 76 : Positions du lipide complémentaires (représentation de van der Waals) dans les références cristallographique 1Z5L et 3ARB

Dans un premier temps, l'influence de la présence d'un lipide complémentaire a été étudiée en comparant les systèmes **S3** (OCH + lipide) et **S5** (OCH9 seul). Ces deux ligands sont pratiquement identiques, l'OCH9 présentant un groupement méthylène de plus à l'extrémité de sa chaîne acyle. La différence principale est donc que dans **S3** un lipide linéaire de formule $C_{12}H_{26}$ est présent dans la poche F' du CD1d en plus de la chaîne sphingosine tronquée de l'OCH. Comme prévu, les analyses RMSD-2D et RMSF montrent une plus grande fluctuation de la structure du CD1d en absence de lipide complémentaire. (cf annexes B et C) Les acides aminés à l'extrémité de la poche F' sont les plus affectés. Il faut aussi noter que la distance inter-hélices est légèrement plus grande (d'environ 0,3 Å) avec le ligand seul. De même, les paysages énergétiques associés au système **S5** sont plus volumineux que ceux du système **S3**, ce qui révèle une plus grande mobilité de la tête polaire. Les simulations II des systèmes H_OCH et H_OCH9 présentent toutes deux l'état décalé. (Figure 77) Dans le cas de l'OCH9, il est cependant inclus dans un bassin plus large qui s'étend sur une grande partie de l'axe ϕ_x . Ceci révèle là encore une grande fluctuation de la partie galactose. Tous ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment publiés par Garcia *et al.*^[232] qui concluaient que le lipide complémentaire semble travailler de concert avec le ligand pour stabiliser le site de liaison.

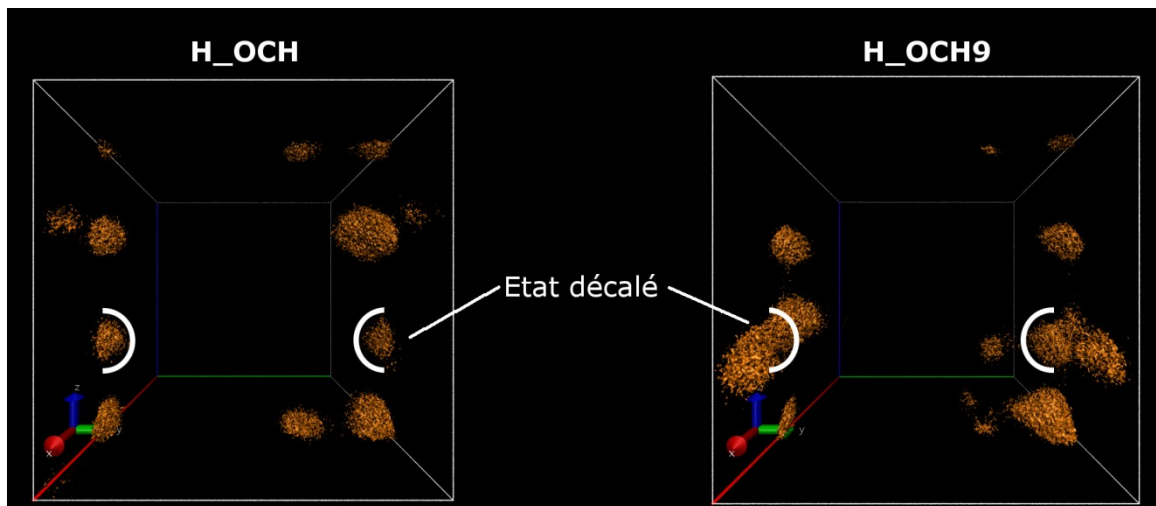


Figure 77 : Paysages énergétiques à $9 k_B T$ pour les simulations II des systèmes H_OCH et H_OCH9

La seconde comparaison a été menée entre les systèmes **S1** et **S16**. Elle nous permet d'en apprendre plus sur l'importance de la tête polaire dans la stabilisation de la structure du CD1d et de savoir si la présence de lipides libres dans les poches A' et F' suffit réellement à stabiliser et éviter la dénaturation du récepteur. Même si la valeur moyenne des matrices RMSD-2D est très variable, elle reste plus élevée pour le système H_LIP. L'inspection du RMSF par résidu et celle des FEL 1D nous montre que les fluctuations sont les plus importantes au centre des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 1$. (Figure 78) Même si la distance inter-hélices est assez différente d'une simulation à l'autre, elle reste assez proche de celle observée pour le système H_aGAL. L'empreinte diédrale ne semble pas non plus réellement discriminante. (cf annexe D) Il semble donc que la tête polaire, et par extension le réseau OTAN, ne soient pas seulement indispensables à la reconnaissance du TCR, mais aussi à l'intégrité structurale des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La présence de lipides libres seuls empêche la fermeture du site de liaison, mais ne permet pas de conserver une interface CD1d/TCR stable, ce qui nuit à la formation du complexe. Il est par conséquent possible que le CD1d puisse être chargé temporairement avec des chaînes lipidiques libres pour faciliter l'arrivée et la liaison d'un ligand capable d'activer les iNKT.

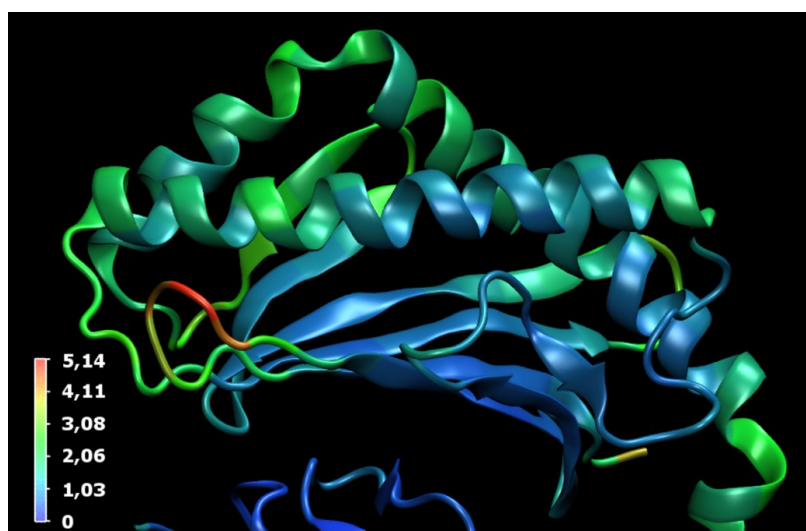


Figure 78 : RMSF relevé pour la simulation II du système H_LIP

7 Apport pour la conception de nouveaux modulateurs

L'analyse de 48 simulations a permis de mettre en avant plusieurs éléments qui pourraient être utiles à la conception de nouveaux modulateurs des iNKT. Par exemple, le CD1d murin présentant un écart légèrement plus grand entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ au dessus de la poche A', il faut prendre en considération que des composés avec des chaînes acyles raccourcies ou substitués par des groupements volumineux risquent de ne pas déclencher les même profils de réponse dans des modèles humains ou murins. En effet, les groupements volumineux devraient être accommodés plus facilement et avoir un effet stabilisant plus important sur le récepteur murin, donc un profil Th1 plus marqué. De même, la présence du Trp153 à proximité de la tête polaire dans le récepteur humain est un facteur déstabilisant qui va naturellement augmenter la mobilité de celle-ci, et donc défavoriser la réponse Th1. Cette hypothèse pourrait partiellement expliquer les ratios de cytokine Th1/Th2 plus modérés observés sur les modèles humains.

La dynamique de la tête polaire et l'intégrité du réseau de liaisons hydrogène OTAN semblent être des facteurs déterminants pour la sélectivité Th1/Th2. La présentation stable du galactose dans une conformation proche de celle observée dans les structures cristallographiques (conformation OTAN) favoriserait la réponse Th1. Le réseau OTAN y est intact et participe à la restriction de la mobilité de la tête polaire. Une possibilité pour améliorer le profil Th1 semble donc de renforcer encore la stabilité de la tête polaire en augmentant ses interactions avec l'hélice $\alpha 2$, en renforçant le réseau OTAN ou en rigidifiant le lien polaire. C'est d'ailleurs cette dernière approche qui a été tenté par Chen *et al.* en introduisant une double liaison en conformation E qui provoque en effet une augmentation de la réponse Th1. Cette observation permet d'expliquer une bonne partie des résultats obtenues lors de la modulation du lien osidique (cf I-3.2) et notamment le cas des liens osidiques rallongés, qui accorderaient une trop grande flexibilité à la partie galactose et donc empêcheraient la formation du complexe ternaire. Comme il est délicat de modifier la force du réseau de liaisons hydrogène sans modifier sa géométrie, reste donc la possibilité de moduler la tête polaire pour améliorer son interaction avec l'hélice $\alpha 2$. C'est là aussi une approche difficile, les éléments cruciaux pour la reconnaissance par le TCR devant être conservés (2'-OH et 3'-OH), il ne reste plus que la substitution des positions 4' et 6'' qui ont déjà été largement décrites.

En ce qui concerne l'augmentation du profil Th2 par contre, la perturbation du réseau OTAN semble une solution de choix. En effet, la déstabilisation temporaire de la tête polaire et l'accès possible à des conformations secondaires pourrait favoriser le profil de réponse Th2. Même si l'état décalé est commun à tous les systèmes Th2, il est toujours associé à d'autres états conformationnels plus ou moins peuplés. L'affaiblissement ou la perturbation de la géométrie du réseau OTAN permet à la tête polaire d'accéder plus facilement à des conformations secondaires, mais peut aussi légèrement influencer sur la structure de l'hélice $\alpha 2$, et donc directement sur l'interface avec le TCR. C'est notamment le cas pour le ligand **L8**. Bien que n'étant pas systématique, ni même exclusif aux systèmes Th2, il est fréquent que la mobilité accrue de la tête polaire soit associée à une déformation plus ou moins prononcée de l'hélice $\alpha 1$ ou $\alpha 2$. Difficile de dire si ce changement de conformation fait partie intégrante du processus de déstabilisation du complexe ou est juste un élément permettant d'augmenter la mobilité du galactose. Il est ainsi possible de trouver des paysages

énergétiques très amples pour les angles dièdres du milieu de l'hélice $\alpha 1$ dans certaines répliques des systèmes H_aGAL ou H_NUaGAL. Cependant, il est envisageable qu'une déformation assez importante soit capable de perturber suffisamment l'interface CD1d/TCR pour déstabiliser le complexe ternaire, ce que suggère le système Th2 H_GOF dont la tête polaire n'opte jamais pour la conformation décalée. Il est probable qu'à la fois la déformation structurale et la mobilité accrue de la partie galactose jouent un rôle dans l'obtention de la réponse Th2, l'important étant la déstabilisation globale du complexe binaire ou ternaire quelqu'en soit le moyen. Dans cette optique, la combinaison d'une chaîne sphingosine ou acyle légèrement raccourcie et d'un groupe amide remplacé par un groupement accepteur de liaison hydrogène pourrait être une piste intéressante. Il est difficile de favoriser directement la mobilité de la tête polaire sans lui accorder une trop grande liberté qui s'avérerait délétère à l'activité, c'est pourquoi il semble plus profitable de se concentrer sur les moyens de perturber le réseau OTAN. Par exemple, il est envisageable de remplacer certains hydrogènes du galactose par des atomes de fluor, ce qui modulerait la force de l'interaction entre les hydroxyles 2-OH, 3-OH et l'Asp151(Asp153).

Dans tous les cas, l'utilisation de la dynamique moléculaire pour étudier la mobilité de la tête polaire du ligand et la géométrie des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ peut s'avérer un outil précieux dans la prédiction des profils de réponse et la conception d'activateurs sélectifs Th1 ou Th2.

Conclusion générale

Bien que la régulation de la réponse immune par les iNKT soit une machinerie bien trop complexe pour être totalement décryptée *via* des techniques de modélisation moléculaire, nos différentes études menées sur les complexes CD1d/ligand nous ont permis d'en apprendre plus sur ce processus.

Au premier abord, il peut sembler que la diversité chimique des différents ligands iNKT décrits dans la littérature soit pauvre comparée à d'autres cibles thérapeutiques, ceci n'est en fait que le reflet de relations structure-activité très strictes et exigeantes. Il existe en effet de nombreux éléments d'interaction indispensables à la reconnaissance du complexe binaire par le TCR, notamment certains hydroxyles de la tête polaire du ligand et de sa chaîne sphingosine. Même si quelques modulations clés ont été identifiées pour la sélectivité Th1/Th2, il est difficile de trouver les déterminants structuraux exacts auxquels elles sont liées. Ceci, associé au fait qu'il n'existe pas de protocole de *docking-scoring* efficace et rapide pour prédire précisément les interactions de molécules aussi flexibles avec leur récepteur, ne facilite pas la conception de nouveaux composés.

La stabilité des complexes CD1d/ligand et CD1d/Ligand/TCR semble être un élément décisif de la sélectivité Th1/Th2, or c'est un point très difficile à évaluer. L'utilisation de multiples simulations de dynamique moléculaire de longue durée se révèle une bonne solution pour aborder ce problème mais nécessite des outils adaptés ainsi qu'un échantillonnage statistique et des moyens de calcul conséquents. En effet, 3 répliques par systèmes apparaissent comme le minimum requis pour avoir accès à certaines conformations représentatives, 5 à 10 simulations par système permettraient de confirmer les tendances observées dans notre étude.

Ainsi, plusieurs indicateurs se sont révélés pertinents pour discriminer les différentes simulations selon nos problématiques. La distance inter-hélice a permis de mettre en avant une différence intéressante dans la disposition des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ entre les récepteurs CD1d humains et murins. Constat renforcé par les matrices de RMSD-2D, l'analyse de RMSF et l'inspection des paysages énergétiques 1D qui ont souligné une variabilité structurale globale accrue de la forme humaine. Les paysages d'énergie libre 3D qui permettent de repérer les conformations prises par la tête polaire du ligand au cours d'une simulation se sont révélés particulièrement discriminants en ce qui concerne la sélectivité Th1/Th2. En effet, nous avons identifié 2 états conformationnels majeurs de la tête polaire qui semblent fortement corrélés aux profils Th1 et Th2. La présentation stable de la partie galactose dans une conformation proche de ce que nous avons appelé l'« état OTAN » favoriserait la réponse Th1, alors que la possibilité d'adopter temporairement un « état décalé » favoriserait la production de cytokines du profil Th2.

En plus d'expliquer plusieurs points révélés par l'étude des relations structure-activité, nous avons donc révélé certains facteurs structuraux qui pourraient servir de base à la mise en place d'un modèle prédictif de l'activité biologique de nouveaux modulateurs des iNKT. Cependant, il reste beaucoup à apprendre et à comprendre de ce système biologique avant de réellement maîtriser la conception d'activateurs sélectifs, notamment l'impact du TCR sur le comportement et la stabilité du complexe. L'utilisation d'une méthode de dynamique hybride quantique-mécanique moléculaire (QM/MM) pourrait aussi être envisagée pour lever les incertitudes dues à l'emploi du champ de forces généraliste GAFF pour décrire le ligand

et à l'emploi de charges atomiques statiques. Il serait alors possible d'envisager une description quantique des éléments du réseau OTAN et de la tête polaire du ligand, tout en gardant une description classique des autres atomes.

Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

AMBER : Assisted Molecular Building and Energy Refinement

ASP : Astex Scoring Potential

CCDC : Cambridge Crystallographic Data Centre

CDR : Complementarity Determining Region

CHARMM : Chemistry at HARvard Molecular Mechanics

ChemPLP : *Chemscore* - Piecewise Linear Potential

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSP : Cholangite Sclérosante Primitive

DFT : Density Functional Theory

dPCA : dihedral Principal Component Analysis

EAE : Encéphalomyélite Allergique Expérimentale

FEL : Free Energy Landscape

GOLD : Genetic Optimization for Ligand Docking

IFN- γ : Interféron γ

IL : Interleukine

iNKT : invariant Natural Killer T

MAIT : Mucosal Associated Invariant T

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T

OPLS-ua : Optimized Potential for Liquid Simulations – united atom

OTAN : réseau de liaisons hydrogène formé par le 2'-OH, la Thr154 (Thr156), l'Asp151 (Asp153) et l'hydrogène de la fonction amide du ligand

PDB : Protein Data Bank

PRR : Pattern Recognition Receptors

QM/MM : Quantum Mechanics/Molecular Mechanics

RCH : RectoColite Hémorragique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root Mean Square Deviation

RMSF : Root Mean Square Fluctuation

RSA : Relations Structure-Activité

TCR : T Cell Receptor

Th : T helper

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

vNKT : variant NKT

Index des figures

Figure 1 : Les différents mécanismes d'activation des cellules iNKT. ^[8]	6
Figure 2 : Implication pathologique des iNKT ^[28]	9
Figure 3 : Structure et numérotation de l' α -GalCer (gauche) et de l'OCH (droite)	10
Figure 4 : Le CD1d (référence PDB 2PO6) ^[93] , exemple de la structure d'un récepteur CD1.11	
Figure 5 : Forme et volume des sites de liaison des différents récepteurs CD1 (références PDB 1ONQ, 2H26, 3OV6, 2AKR, 2PO6 et 3S6C)	12
Figure 6 : Exemple d'antigènes présentés par les récepteurs CD1 ^[101-104]	12
Figure 7 : Sites de glycosylation confirmés par cristallographie pour les différents récepteurs CD1	13
Figure 8 : Alignement des séquences des CD1d murins (au dessus) et humains (en dessous).....	14
Figure 9 : Recombinaison génétique des domaines variables des TCR	15
Figure 10 : Complexe binaire CD1d/ α -GalCer humain.....	16
Figure 11 : Interface CD1d-TCR du complexe ternaire humain chargé avec l' α -GalCer (Référence PDB 2PO6)	17
Figure 12 : Fragments communément modifiés dans les dérivés de l' α -GalCer	18
Figure 13 : Saccharides capables de remplacer efficacement le galactose	18
Figure 14 : Fragments arabinitol (gauche) et glycérol (droite).....	20
Figure 15 : Points de modulation clés de la partie sucre et leur impact.....	20
Figure 16 : Composés de référence présentant des modulations de la tête polaire	21
Figure 17: Points de modulation clés du lien osidique et leur impact	23
Figure 18 : Composés de référence présentant une modulation du lien osidique	23
Figure 19 : Points de modulation clés de la partie sphingosine et leurs impact.....	25
Figure 20 : Réseau de liaisons hydrogènes OTAN	27
Figure 21 : Ligands de référence montrant des modulations de la fonction amide ou de la partie sphingosine	28
Figure 22 : Différentes modulations clés de la fonction amide et leurs impact	28
Figure 23: Composés de référence présentant des altérations de leurs chaînes lipidiques ..	32
Figure 24 : Points de modulation clés des chaînes lipidiques et leurs impact.	33
Figure 25 : Fragments bicycliques envisagés en remplacement du galactose	34
Figure 26 : Algorithme génétique.....	37
Figure 27 : A. Interface CD1d-TCR murin des complexes chargés avec l'OCH (PDB 3ARB, ^[108] blanc), le C20:2 (PDB 3ARF, ^[108] cuivre), l' α -GalCer (PDB 3HE6, ^[110] jaune) et l' α -C-GalCer (PDB 3TN0, ^[120] orange). B. Table de RMSD entre les carbones alpha des différents complexes ternaires (en Å).....	41

Figure 28 : Evaluation des grandeurs « observables » d'un système	42
Figure 29 : Potentiel dans l'approximation anharmonique	46
Figure 30 : Représentation d'un angle de déformation angulaire et potentiel associé.....	46
Figure 31 : Représentation d'une torsion (A) et variation du potentiel selon la périodicité (B)	47
Figure 32 : Représentation d'un angle dièdre impropre	48
Figure 33 : Potentiel pour les interactions type van der Waals.....	49
Figure 34 : Comportement classique d'une minimisation moléculaire.....	50
Figure 35 : Représentation d'un système microcanonique	53
Figure 36 : Représentation d'un système canonique	53
Figure 37 : Représentation d'un système isobare-isotherme	54
Figure 38 : Différents modèles de molécules d'eau	57
Figure 39 : Boîtes de simulation couramment utilisées	58
Figure 40 : Application des conditions périodiques à la boîte centrale.....	59
Figure 41 : Gestion du potentiel de Van der Waals par <i>cut-off</i>	60
Figure 42 : Application de la fonction de <i>shift</i> (en vert) et de la fonction de <i>switch</i> (en bleu) à un potentiel de van der Waals	61
Figure 43 : Représentation de la méthode <i>twin-range cut-off</i> . En noir l'atome d'intérêt, en bleu les atomes qui sont considérés à courte portée, en rose à moyenne portée et en blanc à longue portée.	62
Figure 44 : Représentation du système selon la théorie d'Ewald, le cercle noir représente la distance après laquelle on considère que la somme d'Ewald a convergé.....	63
Figure 45 : Evolution du nombre d'interactions à calculer en fonction de la taille du système	64
Figure 46 : Echelle temporelle de différents mouvements protéiques	65
Figure 47 : Exemple de profil énergétique	65
Figure 48 : Evolution de la population du système pour différentes valeurs de l'énergie d'activation E_a	67
Figure 49 : Protocole d'analyse des simulations	68
Figure 50 : A) Exemple de paysage type harmonique et anharmonique. B) Exemple de paysage énergétique à indice d'harmonicité proche	70
Figure 51 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations du CD1d seul (orange), du complexe CD1d/ α -GalCer (rouge) et communs aux deux systèmes (bleu foncé)	76
Figure 52 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations du CD1d seul (orange), du complexe CD1d/OCH (violet) et communs aux deux systèmes (bleu foncé)	77

Figure 53 : Localisation des angles dièdres au FEL 1D anharmonique dans les simulations des complexes CD1d/ α -GalCer (rouge), du complexe CD1d/OCH (violet) et communs aux deux systèmes (bleu foncé).....	78
Figure 54 : Disposition des angles dièdres spécifiques des ligands α -GalCer (rouge), OCH (violet) et de l'absence de ligand (orange).....	80
Figure 55 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/ α -GalCer et du CD1d seul.....	82
Figure 56 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/OCH et CD1d seul.....	83
Figure 57 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère de similarité pour la comparaison des complexes CD1d/ α -GalCer et CD1d/OCH.....	84
Figure 58 : Torsions spécifiques identifiées par le critère de similarité.....	85
Figure 59 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité pour la comparaison CD1d non chargé vs CD1d/ α -GalCer.....	92
Figure 60 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité pour la comparaison CD1d vide vs CD1d/OCH.....	93
Figure 61 : Disposition des angles dièdres retenus sur critère d'harmonicité.....	94
Figure 62 : Angles dièdres spécifiques retenus sur le critère d'harmonicité.....	95
Figure 63: Liste des systèmes étudiés.....	102
Figure 64 : Torsions utilisées pour la construction des 3D-FEL.....	105
Figure 65 : Matrice de RMSD-2D pour les simulations des systèmes H_aGAL et H_CD1d	106
Figure 66 : Analyse des RMSF (A) et des paysages énergétiques 1D (B) des systèmes H_aGAL et H_CD1d.....	107
Figure 67 : Evolution de la distance inter-hélices et de la déviation de l'empreinte diédrale des systèmes H_aGAL et H_CD1d.....	108
Figure 68 : Paysages énergétiques 1D du système H_aGAL de 1 à 9k _B T pour la simulation I, puis à 9 k _B T pour les répliques I, II, III et représentation de la conformation associée à l'état OTAN.....	109
Figure 69 : Etats conformationnels secondaires observés pour le système H_aGAL.....	110
Figure 70 : Variation de la distance inter-hélice totale et localisée au dessus de la poche A' pour les complexes H_NUaGAL, M_NUaGAL, H_7DW et M_7DW.....	112
Figure 71 : Conformation des acides aminés de la poche A' pour les CD1d humains (à droite) et murins (à gauche).....	113
Figure 72 : Volume total des iso-surfaces d'énergie libre à 9 k _B T pour les différents systèmes.....	114
Figure 73 : Comparaison des FEL 1D des hélices α 1 et α 2 pour les systèmes H_OCH et H_aGAL.....	115
Figure 74 : Etats conformationnels significatifs et paysages énergétiques associés à 9 k _B T.....	117

Figure 75 : Déformation de l'hélice $\alpha 1$ dans les systèmes H_aGAL et H_OCH.....	118
Figure 76 : Positions du lipide complémentaires (représentation de van der Waals) dans les références cristallographique 1Z5L et 3ARB	119
Figure 77 : Paysages énergétiques à 9 $k_B T$ pour les simulations II des systèmes H_OCH et H_OCH9.....	120
Figure 78 : RMSF relevé pour la simulation II du système H_LIP	120

Index des tables

Table 1 : Classification des cellules NKT	5
Table 2 : Modifications du lien osidique	22
Table 3: Modifications de la partie sphingosine	26
Table 4 : Structures des différents analogues hydroxylés de l'α-GalCer	29
Table 5: Variation du RMSD (en Å) entre la pose de référence de l'α-GalCer co-cristallisé et les poses calculées par <i>docking</i> selon 4 fonctions de <i>scoring</i>	38
Table 6 : Variation du RMSD (en Å) entre la structure de référence et les poses de <i>docking</i> obtenues en fonction du nombre d'opérations par liaison rotatoire	39
Table 7 : Caractéristiques du modèle TIP3P	57
Table 8 : Distances inter-hélice moyennes pour tous les systèmes	111
Table 9 : RMSD moyen des matrices de RMSD-2D pour les systèmes S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8 et S9	113

Bibliographie

1. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci Sch Ed*. 2011;3:236–51.
2. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):231–7.
3. Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res*. 1995;7(10-11):529–34.
4. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):741–54.
5. Pellicci DG, Hammond KJL, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med*. 2002 Apr 1;195(7):835–44.
6. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010 Mar;11(3):197–206.
7. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):164–9.
8. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun;20(3):358–68.
9. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G-W, Poles MA, Ho DD, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):520–5.
10. Wu D, Xing G-W, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, et al. Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1351–6.
11. Mattner J, DeBord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, Zhou D, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):525–9.
12. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1230–7.
13. Paget C, Mallevaey T, Speak AO, Torres D, Fontaine J, Sheehan KCF, et al. Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity*. 2007 Oct 26;27(4):597–609.
14. Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2706–13.
15. Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJL, Hayakawa Y, Sidobre S, et al. Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Oct 15;171(8):4020–7.

16. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877–900.
17. Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, et al. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med.* 2005 Nov 7;202(9):1279–88.
18. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, et al. IL-21 Is Produced by NKT Cells and Modulates NKT Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):2827–34.
19. Brennan PJ, Brigi M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013 Feb;13(2):101–17.
20. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002 Dec;2(12):933–44.
21. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):139–45.
22. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2013;8(1):477–512.
23. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, et al. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1052–6.
24. Lehuen A, Fazilleau N. Innate iNKT cell help to B cells: fast but does not last. *Nat Immunol.* 2012 Jan;13(1):11–3.
25. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Taura I, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science.* 1997 Nov 28;278(5343):1623–6.
26. Wu L, Kaer L. Natural Killer T Cells and Autoimmune Disease. *Curr Mol Med.* 2009 Feb 1;9(1):4–14.
27. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The Biology of NKT Cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):297–336.
28. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):131–42.
29. Morita M, Natori T, Akimoto K, Osawa T, Fukushima H, Koezuka Y. Syntheses of α -, β -monoglycosylceramides and four diastereomers of an α -galactosylceramide. *Bioorg Med Chem Lett.* 1995 Apr 6;5(7):699–704.
30. Nakagawa R, Motoki K, Nakamura H, Ueno H, Iijima R, Yamauchi A, et al. Antitumor activity of α -galactosylceramide, KRN7000, in mice with EL-4 hepatic metastasis and its cytokine production. *Oncol Res.* 1998;10(11-12):561–2.
31. Nakagawa R, Motoki K, Ueno H, Iijima R, Nakamura H, Kobayashi E, et al. Treatment of hepatic metastasis of the Colon26 adenocarcinoma with an α -galactosylceramide, KRN7000. *Cancer Res.* 1998;58(6):1202–7.

32. Nakagawa R, Serizawa I, Motoki K, Sato M, Ueno H, Iijima R, et al. Antitumor activity of α -galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol Res.* 2000;12(2):51–8.
33. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(10):5690–3.
34. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* 2002;168(3):1356–61.
35. Hayakawa Y, Rovero S, Forni G, Smyth MJ. α -galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9464–9.
36. Nishio S, Yamada N, Ohyama H, Yamanegi K, Nakasho K, Hata M, et al. Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of α -galactosylceramide and interleukin-18. *Cancer Sci.* 2008;99(1):113–20.
37. Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, Yamamoto H, Kunii N, Motohashi S, et al. Phase I study of α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(3):337–45.
38. Giaccone G, Punt CJA, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, et al. A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand α -Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2002 Dec 1;8(12):3702–9.
39. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, et al. Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):383–9.
40. Okai M, Nieda M, Tazbirkova A, Horley D, Kikuchi A, Durrant S, et al. Human peripheral blood V α 24+ V β 11+ NKT cells expand following administration of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Vox Sang.* 2002 Oct 1;83(3):250–3.
41. Richter J, Neparidze N, Zhang L, Nair S, Monesmith T, Sundaram R, et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood.* 2013 Jan 17;121(3):423–30.
42. Kunii N, Horiguchi S, Motohashi S, Yamamoto H, Ueno N, Yamamoto S, et al. Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and α -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* 2009 Jun 1;100(6):1092–8.
43. Hansen DS, Siomos M-A, de Koning-Ward T, Buckingham L, Crabb BS, Schofield L. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *Eur J Immunol.* 2003;33(9):2588–98.
44. Gonzalez-Aseguinolaza G, De Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, et al. α -Galactosylceramide-activated V α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8461–6.

45. Gonzalez-Aseguinolaza G, Van Kaer L, Bergmann CC, Wilson JM, Schmiege J, Kronenberg M, et al. Natural killer T cell ligand α -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med*. 2002;195(5):617–24.
46. Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. *Infect Immun*. 2002;70(11):6302–9.
47. Gansert JL, Kießler V, Engele M, Wittke F, Röllinghoff M, Krensky AM, et al. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol*. 2003;170(6):3154–61.
48. Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Tohyama M, et al. Enhanced gamma interferon production through activation of V α 14+ natural killer T cells by α -Galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis. *Infect Immun*. 2001;69(11):6643–50.
49. Lin K-H, Liang J-J, Huang W-I, Lin-Chu S-Y, Su C-Y, Lee Y-L, et al. In Vivo Protection Provided by a Synthetic New Alpha-Galactosyl Ceramide Analog against Bacterial and Viral Infections in Murine Models. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct 1;54(10):4129–36.
50. Schmiege J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide. *J Exp Med*. 2003 Dec 1;198(11):1631–41.
51. Padte NN, Li X, Tsuji M, Vasan S. Clinical development of a novel CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Clin Immunol*. 2011 Aug;140(2):142–51.
52. Li X, Fujio M, Imamura M, Wu D, Vasan S, Wong C-H, et al. Design of a Potent CD1d-Binding NKT Cell Ligand as a Vaccine Adjuvant. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jul 20;107(29):13010–5.
53. Huang Y, Chen A, Li X, Chen Z, Zhang W, Song Y, et al. Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, α -galactosylceramide. *Vaccine*. 2008;26(15):1807–16.
54. Ko S-Y, Ko H-J, Chang W-S, Park S-H, Kweon M-N, Kang C-Y. α -Galactosylceramide Can Act As a Nasal Vaccine Adjuvant Inducing Protective Immune Responses against Viral Infection and Tumor. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3309–17.
55. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, et al. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol*. 2008 Mar 5;1(3):208–18.
56. Youn H-J, Ko S-Y, Lee K-A, Ko H-J, Lee Y-S, Fujihashi K, et al. A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and α -galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central nervous system. *Vaccine*. 2007 Jul 9;25(28):5189–98.
57. Kopecky-Bromberg SA, Fraser KA, Pica N, Carnero E, Moran TM, Franck RW, et al. Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine*. 2009 Jun 8;27(28):3766–74.
58. Lee Y-S, Lee K-A, Lee J-Y, Kang M-H, Song YC, Baek DJ, et al. An α -GalCer analogue with branched acyl chain enhances protective immune responses in a nasal influenza vaccine. *Vaccine*. 2011 Jan 10;29(3):417–25.

59. Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, et al. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2051–9.
60. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):667–76.
61. Singh AK, Yang J-Q, Parekh VV, Wei J, Wang C-R, Joyce S, et al. The natural killer T cell ligand α -galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice. *Eur J Immunol*. 2005;35(4):1143–54.
62. Zeng D, Liu Y, Sidobre S, Kronenberg M, Strober S. Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. *J Clin Invest*. 2003;112(8):1211–22.
63. Zeng D, Lee M-K, Tung J, Brendolan A, Strober S. Cutting edge: A role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J Immunol*. 2000;164(10):5000–4.
64. Subleski JJ, Jiang Q, Weiss JM, Wiltrout RH. The split personality of NKT cells in malignancy, autoimmune and allergic disorders. *Immunotherapy*. 2011 Oct;3(10):1167–84.
65. Velmourougane G, Raju R, Bricard G, Im JS, Besra GS, Porcelli SA, et al. Synthesis and evaluation of an acyl-chain unsaturated analog of the Th2 biasing, immunostimulatory glycolipid, OCH. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Jul 1;19(13):3386–8.
66. Ndonge RM, Izmirian DP, Dunn MF, Yu KOA, Porcelli SA, Khurana A, et al. Synthesis and Evaluation of Sphinganine Analogues of KRN7000 and OCH. *J Org Chem*. 2005 Dec 1;70(25):10260–70.
67. Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S, et al. Total Synthesis of an Immunosuppressive Glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O- (α -d-Galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. *J Org Chem*. 2005 Mar 1;70(6):2398–401.
68. Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of V α 14 natural killer T cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun 1;52(6):1941–8.
69. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 2001 Oct 4;413(6855):531–4.
70. Lisbonne M, Diem S, de Castro Keller A, Lefort J, Araujo LM, Hachem P, et al. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Aug 15;171(4):1637–41.
71. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M, et al. CD4+ Invariant T-Cell–Receptor+ Natural Killer T Cells in Bronchial Asthma. *N Engl J Med*. 2006;354(11):1117–29.
72. Matangkasombut P, Marigowda G, Ervine A, Idris L, Pichavant M, Kim HY, et al. Natural Killer T Cells in the Lungs of Patients with Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1181–5.

73. Reynolds C, Barkans J, Clark P, Kariyawasam H, Altmann D, Kay B, et al. Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):860–2.
74. Parlak E, Ulker A, Alkim C, Ozderin Y, Dişibeyaz S, Tunç B, et al. The course of colonic disease in ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Turk J Gastroenterol Off J Turk Soc Gastroenterol*. 2002 Sep;13(3):134–8.
75. Moayyeri A, Daryani NE, Bahrami H, Haghpanah B, Nayyer-Habibi A, Sadatsafavi M. Clinical course of ulcerative colitis in patients with and without primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Mar;20(3):366–70.
76. Loftus EV Jr, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2005 Jan;54(1):91–6.
77. Florin THJ, Pandeya N, Radford-Smith GL. Epidemiology of appendicectomy in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: its influence on the clinical behaviour of these diseases. *Gut*. 2004 Jul;53(7):973–9.
78. Loftus EV Jr, Aguilar HI, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Krom RA, Zinsmeister AR, et al. Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis following orthotopic liver transplantation. *Hepatol Baltim Md*. 1998 Mar;27(3):685–90.
79. Papatheodoridis GV, Hamilton M, Rolles K, Burroughs AK. Liver transplantation and inflammatory bowel disease. *J Hepatol*. 1998 Jun;28(6):1070–6.
80. Verdonk RC, Dijkstra G, Haagsma EB, Shostrom VK, Van den Berg AP, Kleibeuker JH, et al. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: risk factors for recurrence and de novo disease. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006 Jun;6(6):1422–9.
81. Ho G-T, Seddon AJ, Therapondos G, Satsangi J, Hayes PC. The clinical course of ulcerative colitis after orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: further appraisal of immunosuppression post transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Dec;17(12):1379–85.
82. Bai L, Constantinides MG, Thomas SY, Reboulet R, Meng F, Koentgen F, et al. Distinct APCs Explain the Cytokine Bias of A-Galactosylceramide Variants In Vivo. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3053–61.
83. Bozna BL, Polzella P, Rankl C, Zhu R, Salio M, Shepherd D, et al. Binding Strength and Dynamics of Invariant Natural Killer Cell T Cell Receptor/CD1d-Glycosphingolipid Interaction on Living Cells by Single Molecule Force Spectroscopy. *J Biol Chem*. 2011 May 6;286(18):15973–9.
84. Wu T-N, Lin K-H, Chang Y-J, Huang J-R, Cheng J-Y, Yu AL, et al. Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1 (Th1) polarization and anticancer efficacy. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Oct 10;108(42):17275–80.
85. Kim HS, Garcia J, Exley M, Johnson KW, Balk SP, Blumberg RS. Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9289–95.

86. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, et al. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med*. 1998 Oct 19;188(8):1521–8.
87. Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner MB. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol Today*. 1998 Aug 1;19(8):362–8.
88. Moody DB, Zajonc DM, Wilson IA. Anatomy of CD1–lipid antigen complexes. *Nat Rev Immunol*. 2005 May;5(5):387–99.
89. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol*. 2007 Dec 1;7(12):929–41.
90. Silk JD, Salio M, Brown J, Jones EY, Cerundolo V. Structural and Functional Aspects of Lipid Binding by CD1 Molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24(1):369–95.
91. Salio M, Silk JD, Cerundolo V. Recent advances in processing and presentation of CD1 bound lipid antigens. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):81–8.
92. De Libero G, Mori L. Novel insights into lipid antigen presentation. *Trends Immunol*. 2012 Mar;33(3):103–11.
93. Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L, Wilce MCJ, Pellicci DG, Koh R, et al. CD1d–lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*. 2007 Jun 20;448(7149):44–9.
94. Zeng Z-H, Castaño AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove. *Science*. 1997 Jul 18;277(5324):339–45.
95. Zajonc DM, Elsliger MA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nat Immunol*. 2003 Aug;4(8):808–15.
96. Gadola SD, Zaccai NR, Harlos K, Shepherd D, Castro-Palomino JC, Ritter G, et al. Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains. *Nat Immunol*. 2002 Aug;3(8):721–6.
97. Scharf L, Li N-S, Hawk AJ, Garzón D, Zhang T, Fox LM, et al. The 2.5 Å Structure of CD1c in Complex with a Mycobacterial Lipid Reveals an Open Groove Ideally Suited for Diverse Antigen Presentation. *Immunity*. 2010 Dec 14;33(6):853–62.
98. Zajonc DM, Maricic I, Wu D, Halder R, Roy K, Wong C-H, et al. Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *J Exp Med*. 2005 Dec 5;202(11):1517–26.
99. Garcia-Alles LF, Giacometti G, Versluis C, Maveyraud L, Paepe D de, Guiard J, et al. Crystal structure of human CD1e reveals a groove suited for lipid-exchange processes. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Aug 9;108(32):13230–5.
100. Garzon D, Anselmi C, Bond PJ, Faraldo-Gomez JD. Dynamics of the Antigen-binding Grooves in CD1 Proteins: REVERSIBLE HYDROPHOBIC COLLAPSE IN THE LIPID-FREE STATE. *J Biol Chem*. 2013 May 15;288(27):19528–36.
101. Moody DB, Young DC, Cheng T-Y, Rosat J-P, Roura-mir C, O'Connor PB, et al. T Cell Activation by Lipopeptide Antigens. *Science*. 2004 Jan 23;303(5657):527–31.

102. Gilleron M, Stenger S, Mazorra Z, Wittke F, Mariotti S, Böhmer G, et al. Diacylated Sulfoglycolipids Are Novel Mycobacterial Antigens Stimulating CD1-restricted T Cells during Infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med*. 2004;199(5):649–59.
103. Matsunaga I, Bhatt A, Young DC, Cheng T-Y, Eyles SJ, Besra GS, et al. Mycobacterium tuberculosis pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. *J Exp Med*. 2004;200(12):1559–69.
104. Natori T, Morita M, Akimoto K, Koezuka Y. Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebrosides from the marine sponge *Agelas mauritanus*. *Tetrahedron*. 1994;50(9):2771–84.
105. Van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, et al. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1420–31.
106. Karadimitris A, Gadola S, Altamirano M, Brown D, Woolfson A, Klenerman P, et al. Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Mar 13;98(6):3294–8.
107. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Dec;6(12):883–94.
108. Wun KS, Cameron G, Patel O, Pang SS, Pellicci DG, Sullivan LC, et al. A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells. *Immunity*. 2010 Nov 27;34:327–39.
109. Wun KS, Ross F, Patel O, Besra GS, Porcelli SA, Richardson SK, et al. Human and Mouse Type I Natural Killer T Cell Antigen Receptors Exhibit Different Fine Specificities for CD1d-Antigen Complex. *J Biol Chem*. 2012 Nov 9;287(46):39139–48.
110. Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, Pang SS, Sullivan LC, Kyparissoudis K, et al. Differential Recognition of CD1d- α -Galactosyl Ceramide by the V β 8.2 and V β 7 Semi-invariant NKT T Cell Receptors. *Immunity*. 2009;31(1):47–59.
111. Kerzerho J, Yu ED, Barra CM, Alari-Pahisa E, Girardi E, Harrak Y, et al. Structural and functional characterization of a novel nonglycosidic type I NKT agonist with immunomodulatory properties. *J Immunol*. 2011 May 3;188:2254–65.
112. Yu ED, Girardi E, Wang J, Zajonc DM. Cutting Edge: Structural Basis for the Recognition of B-Linked Glycolipid Antigens by Invariant NKT Cells. *J Immunol*. 2011 Sep 1;187(5):2079–83.
113. Li Y, Girardi E, Wang J, Yu ED, Painter GF, Kronenberg M, et al. The V α 14 Invariant Natural Killer T Cell TCR Forces Microbial Glycolipids and CD1d into a Conserved Binding Mode. *J Exp Med*. 2010 Oct 25;207(11):2383–93.
114. Zajonc DM, Savage PB, Bendelac A, Wilson IA, Teyton L. Crystal Structures of Mouse CD1d-iGb3 Complex and its Cognate V α 14 T Cell Receptor Suggest a Model for Dual Recognition of Foreign and Self Glycolipids. *J Mol Biol*. 2008 Apr 4;377(4):1104–16.
115. Aspeslagh S, Li Y, Yu ED, Pauwels N, Trappeniers M, Girardi E, et al. Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *EMBO J*. 2011 May 6;30(11):2294–305.

116. Patel O, Pellicci DG, Gras S, Clarke AJ, Sandoval-Romero M, Le Nours J, et al. Type-II Natural Killer T Cell Antigen Receptor Mediated Recognition of Cd1D-Sulfatide. *Be Publ.* 2012 Apr 5;null–null.
117. Mallevaey T, Clarke AJ, Scott-Browne JP, Young MH, Roisman LC, Pellicci DG, et al. A Molecular Basis for NKT Cell Recognition of CD1d-Self-Antigen. *Immunity.* 2011 Mar;34(3):315–26.
118. Koch M, Stronge VS, Shepherd D, Gadola SD, Mathew B, Ritter G, et al. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *NatImmunol.* 2005 May 26;6:819–26.
119. Lopez-Sagaseta J, Sibener LV, Kung JE, Gumperz J, Adams EJ. Lysophospholipid presentation by CD1d and recognition by a human Natural Killer T-cell receptor. *EMBO J.* 2012 Mar 6;31(8):2047–59.
120. Patel O, Cameron G, Pellicci DG, Liu Z, Byun H-S, Beddoe T, et al. NKT TCR Recognition of CD1d-A-C-Galactosylceramide. *J Immunol.* 2011 Nov 1;187(9):4705–13.
121. Pellicci DG, Clarke AJ, Patel O, Mallevaey T, Beddoe T, Le Nours J, et al. Recognition of beta-linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *NatImmunol.* 2011 Jun 9;12:827–33.
122. Schiefner A, Fujio M, Wu D, Wong CH, Wilson IA. Structural evaluation of potent NKT cell agonists: implications for design of novel stimulatory ligands. *JMolBiol.* 2009 Mar 14;394:71–82.
123. Aspeslagh S, Nemčovič M, Pauwels N, Venken K, Wang J, Calenbergh SV, et al. Enhanced TCR Footprint by a Novel Glycolipid Increases NKT-Dependent Tumor Protection. *J Immunol.* 2013 Sep 15;191(6):2916–25.
124. Wun KS, Borg NA, Kjer-Nielsen L, Beddoe T, Koh R, Richardson SK, et al. A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR. *J Exp Med.* 2008 Apr 14;205(4):939–49.
125. Nadas J, Li C, Wang PG. Computational Structure Activity Relationship Studies on the CD1d/Glycolipid/TCR Complex Using AMBER and AUTODOCK. *J Chem Inf Model.* 2009 Feb 23;49(2):410–23.
126. Sidobre S, Hammond KJL, Bénazet-Sidobre L, Maltsev SD, Richardson SK, Ndonge RM, et al. The T cell antigen receptor expressed by V α 14i NKT cells has a unique mode of glycosphingolipid antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12254–9.
127. Morita M, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E, et al. Structure-Activity Relationship of .alpha.-Galactosylceramides against B16-Bearing Mice. *J Med Chem.* 1995 Jun 1;38(12):2176–87.
128. Banchet-Cadeddu A, Hénon E, Dauchez M, Renault J-H, Monneaux F, Haudrechy A. The stimulating adventure of KRN 7000. *Org Biomol Chem.* 2011;9(9):3080–104.
129. East JE, Kennedy AJ, Webb TJ. Raising the Roof: The Preferential Pharmacological Stimulation of Th1 and Th2 Responses Mediated by NKT Cells. *Med Res Rev.* 2012;n/a–n/a.

130. Tashiro T. Structure-Activity Relationship Studies of Novel Glycosphingolipids That Stimulate Natural Killer T-Cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(6):1055–67.
131. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science.* 1997 Nov 28;278(5343):1626–9.
132. Motoki K, Morita M, Kobayashi E, Uchida T, Akimoto K, Fukushima H, et al. Immunostimulatory and antitumor activities of monoglycosylceramides having various sugar moieties. *Biol Pharm Bull.* 1995 Nov;18(11):1487–91.
133. Uchimura A, Shimizu T, Morita M, Ueno H, Motoki K, Fukushima H, et al. Immunostimulatory activities of monoglycosylated α -d-pyranosylceramides. *Bioorg Med Chem.* 1997 Dec;5(12):2245–9.
134. Kobayashi E, Motoki K, Yamaguchi Y, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. Enhancing effects of α -, β -monoglycosylceramides on natural killer cell activity. *Bioorg Med Chem.* 1996 Apr;4(4):615–9.
135. Motoki K, Kobayashi E, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. Antitumor activities of α -, β -monogalactosylceramides and four diastereomers of an α -galactosylceramide. *Bioorg Med Chem Lett.* 1995 Apr 6;5(7):705–10.
136. Raju R, Castillo BF, Richardson SK, Thakur M, Severins R, Kronenberg M, et al. Synthesis and evaluation of 3"- and 4"-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glycolipid, KRN7000. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Aug 1;19(15):4122–5.
137. Barbieri L, Costantino V, Fattorusso E, Mangoni A, Aru E, Parapini S, et al. Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of a 2'-O-Methyl- α -Gal-GSL and Evaluation of Its Immunostimulating Capacity. *Eur J Org Chem.* 2004;2004(3):468–73.
138. Barbieri L, Costantino V, Fattorusso E, Mangoni A, Basilico N, Mondani M, et al. Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of 2'-Fluoro-2'-deoxy- α -galactosylceramide and an Evaluation of Its Immunostimulating Properties. *Eur J Org Chem.* 2005;2005(15):3279–85.
139. Costantino V, Fattorusso E, Imperatore C, Mangoni A. Immunomodulating glycosphingolipids: an efficient synthesis of a 2'-deoxy- α -galactosyl-GSL. *Tetrahedron.* 2002 Jan 7;58(2):369–75.
140. Xing G-W, Wu D, Poles MA, Horowitz A, Tsuji M, Ho DD, et al. Synthesis and human NKT cell stimulating properties of 3-O-sulfo- α/β -galactosylceramides. *Bioorg Med Chem.* 2005 Apr 15;13(8):2907–16.
141. Xia C, Zhang W, Zhang Y, Chen W, Nadas J, Severin R, et al. The Roles of 3' and 4' Hydroxy Groups in α -Galactosylceramide Stimulation of Invariant Natural Killer T Cells. *ChemMedChem.* 2009;4(11):1810–5.
142. Franchini L, Matto P, Ronchetti F, Panza L, Barbieri L, Costantino V, et al. Synthesis and evaluation of human T cell stimulating activity of an α -sulfatide analogue. *Bioorg Med Chem.* 2007 Aug 15;15(16):5529–36.

143. Kanamori M, Tasumi Y, Iyoda T, Ushida M, Inaba K. Sulfatide inhibits α -galactosylceramide presentation by dendritic cells. *Int Immunol*. 2012 Feb 1;24(2):129–36.
144. Zhang W, Xia C, Nadas J, Chen W, Gu L, Wang PG. Introduction of aromatic group on 4'-OH of α -GalCer manipulated NKT cell cytokine production. *Bioorg Med Chem*. 2011 Apr 15;19(8):2767–76.
145. Uchimura A, Shimizu T, Nakajima M, Ueno H, Motoki K, Fukushima H, et al. Immunostimulatory activities of mono- or diglycosylated α -galactosylceramides. *Bioorg Med Chem*. 1997 Jul;5(7):1447–52.
146. Veerapen N, Brigl M, Garg S, Cerundolo V, Cox LR, Brenner MB, et al. Synthesis and biological activity of α -galactosyl ceramide KRN7000 and galactosyl (α 1 \rightarrow 2) galactosyl ceramide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Aug 1;19(15):4288–91.
147. Prigozy TI, Naidenko O, Qasba P, Elewaut D, Brossay L, Khurana A, et al. Glycolipid Antigen Processing for Presentation by CD1d Molecules. *Science*. 2001 Jan 26;291(5504):664–7.
148. Liu Y, Deng S, Bai L, Freigang S, Mattner J, Teyton L, et al. Synthesis of diglycosylceramides and evaluation of their iNKT cell stimulatory properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 May;18(10):3052–5.
149. Tashiro T, Nakagawa R, Inoue S, Shiozaki M, Watarai H, Taniguchi M, et al. RCAI-61, the 6'-O-methylated analog of KRN7000: its synthesis and potent bioactivity for mouse lymphocytes to produce interferon- γ in vivo. *Tetrahedron Lett*. 2008 Nov 24;49(48):6827–30.
150. Trappeniers M, Beneden KV, Decruy T, Hillaert U, Linclau B, Elewaut D, et al. 6'-Derivatized α -GalCer Analogues Capable of Inducing Strong CD1d-Mediated Th1-Biased NKT Cell Responses in Mice. *J Am Chem Soc*. 2008 Dec 10;130(49):16468–9.
151. Liu Y, Goff RD, Zhou D, Mattner J, Sullivan BA, Khurana A, et al. A modified α -galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J Immunol Methods*. 2006 May 30;312(1–2):34–9.
152. Jervis PJ, Moulis M, Jukes J-P, Ghadbane H, Cox LR, Cerundolo V, et al. Towards multivalent CD1d ligands: synthesis and biological activity of homodimeric α -galactosyl ceramide analogues. *Carbohydr Res*. 2012 Jul 15;356(0):152–62.
153. Cheng JMH, Chee SH, Knight DA, Acha-Orbea H, Hermans IF, Timmer MSM, et al. An improved synthesis of dansylated α -galactosylceramide and its use as a fluorescent probe for the monitoring of glycolipid uptake by cells. *Carbohydr Res*. 2011 May 15;346(7):914–26.
154. Zhou X-T, Forestier C, Goff RD, Li C, Teyton L, Bendelac A, et al. Synthesis and NKT Cell Stimulating Properties of Fluorophore- and Biotin-Appended 6'-Amino-6'-deoxy-galactosylceramides. *Org Lett*. 2002 Apr 1;4(8):1267–70.
155. Jervis PJ, Graham LM, Foster EL, Cox LR, Porcelli SA, Besra GS. New CD1d agonists: Synthesis and biological activity of 6"-triazole-substituted α -galactosyl ceramides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jul 1;22(13):4348–52.

156. Pauwels N, Aspeslagh S, Elewaut D, Calenbergh SV. Synthesis of 6"-triazole-substituted α -GalCer analogues as potent iNKT cell stimulating ligands. *Bioorg Med Chem*. 2012 Dec;20(24):7149–54.
157. Tashiro T, Nakagawa R, Hirokawa T, Inoue S, Watarai H, Taniguchi M, et al. RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, cyclitol and carbasugar analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines. *Bioorg Med Chem*. 2009 Sep 1;17(17):6360–73.
158. Tashiro T, Nakagawa R, Hirokawa T, Inoue S, Watarai H, Taniguchi M, et al. RCAI-56, a carbocyclic analogue of KRN7000: its synthesis and potent activity for natural killer (NK) T cells to preferentially produce interferon- γ . *Tetrahedron Lett*. 2007 May 7;48(19):3343–7.
159. Tashiro T, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Nakagawa R, Inoue S, Omori-Miyake M, et al. Induction of Th1-biased cytokine production by α -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells. *Int Immunol*. 2010 Apr 1;22(4):319–28.
160. Silk JD, Salio M, Reddy BG, Shepherd D, Gileadi U, Brown J, et al. Cutting Edge: Nonglycosidic CD1d Lipid Ligands Activate Human and Murine Invariant NKT Cells. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6452–6.
161. Reddy BG, Silk JD, Salio M, Balamurugan R, Shepherd D, Ritter G, et al. Nonglycosidic Agonists of Invariant NKT Cells for Use as Vaccine Adjuvants. *ChemMedChem*. 2009;4(2):171–5.
162. Yang G, Schmiegl J, Tsuji M, Franck RW. The C-Glycoside Analogue of the Immunostimulant α -Galactosylceramide (KRN7000): Synthesis and Striking Enhancement of Activity. *Angew Chem Int Ed*. 2004;43(29):3818–22.
163. Li X, Chen G, Garcia-Navarro R, Franck RW, Tsuji M. Identification of C-glycoside analogues that display a potent biological activity against murine and human invariant natural killer T cells. *Immunology*. 2009 Jun;127(2):216–25.
164. Li X, Shiratsuchi T, Chen G, Dellabona P, Casorati G, Franck RW, et al. Invariant TCR Rather Than CD1d Shapes the Preferential Activities of C-Glycoside Analogues Against Human Versus Murine Invariant NKT Cells. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4415–21.
165. Sullivan BA, Nagarajan NA, Wingender G, Wang J, Scott I, Tsuji M, et al. Mechanisms for Glycolipid Antigen-Driven Cytokine Polarization by V α 14i NKT Cells. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):141–53.
166. Dere RT, Zhu X. The First Synthesis of a Thioglycoside Analogue of the Immunostimulant KRN7000. *Org Lett*. 2008 Oct 16;10(20):4641–4.
167. Blauvelt ML, Khalili M, Jaung W, Paulsen J, Anderson AC, Brian Wilson S, et al. α -S-GalCer: Synthesis and evaluation for iNKT cell stimulation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Dec 15;18(24):6374–6.
168. Hogan AE, O'Reilly V, Dunne MR, Dere RT, Zeng SG, O'Brien C, et al. Activation of human invariant natural killer T cells with a thioglycoside analogue of α -galactosylceramide. *Clin Immunol*. 2011 Aug;140(2):196–207.
169. Harrak Y, Barra CM, Delgado A, Castaño AR, Llebaria A. Galacto-Configured Aminocyclitol Phytoceramides Are Potent in Vivo Invariant Natural Killer T Cell Stimulators. *J Am Chem Soc*. 2011 Aug 10;133(31):12079–84.

170. Harrak Y, Barra CM, Bedia C, Delgado A, Castaño AR, Llebaria A. Aminocyclitol-Substituted Phytoceramides and their Effects on iNKT Cell Stimulation. *ChemMedChem*. 2009;4(10):1608–13.
171. Chen G, Schmiegl J, Tsuji M, Franck RW. Efficient Synthesis of α -C-Galactosyl Ceramide Immunostimulants: Use of Ethylene-Promoted Olefin Cross-Metathesis. *Org Lett*. 2004 Oct 1;6(22):4077–80.
172. Chen W, Xia C, Cai L, Wang PG. Efficient synthesis of galactosylceramide analogues for iNKT cell stimulation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Jul 1;20(13):3859–62.
173. Liu Z, Byun H-S, Bittman R. Total Synthesis of α -1-Galactosylceramide, an Immunostimulatory -Glycosphingolipid, and Confirmation of the Stereochemistry in the First-Generation Synthesis. *J Org Chem*. 2011 Nov 4;76(21):8588–98.
174. Lu X, Song L, Metelitsa LS, Bittman R. Synthesis and Evaluation of an α -C-Galactosylceramide Analogue that Induces Th1-biased Responses in Human Natural Killer T Cells. *ChemBioChem*. 2006;7(11):1750–6.
175. Lacône V, Hunault J, Pipelier M, Blot V, Lecourt T, Rocher J, et al. Focus on the Controversial Activation of Human iNKT Cells by 4-Deoxy Analogue of KRN7000. *J Med Chem*. 2009;52(15):4960–3.
176. Baek DJ, Seo J-H, Lim C, Kim JH, Chung DH, Cho W-J, et al. The 3-Deoxy Analogue of α -GalCer: Disclosing the Role of the 4-Hydroxyl Group for CD1d-Mediated NKT Cell Activation. *ACS Med Chem Lett*. 2011 Jul 14;2(7):544–8.
177. Park J-J, Lee JH, Seo K-C, Bricard G, Venkataswamy MM, Porcelli SA, et al. Syntheses and biological activities of KRN7000 analogues having aromatic residues in the acyl and backbone chains with varying stereochemistry. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Feb 1;20(3):814–8.
178. Trappeniers M, Chofer R, Aspeslagh S, Li Y, Linclau B, Zajonc DM, et al. Synthesis and Evaluation of Amino-Modified α -GalCer Analogues. *Org Lett*. 2010 Jul 2;12(13):2928–31.
179. Park J-J, Lee JH, Ghosh SC, Bricard G, Venkataswamy MM, Porcelli SA, et al. Synthesis of all stereoisomers of KRN7000, the CD1d-binding NKT cell ligand. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Jul 15;18(14):3906–9.
180. Trappeniers M, Goormans S, Van Beneden K, Decruy T, Linclau B, Al-Shamkhani A, et al. Synthesis and in vitro Evaluation of α -GalCer Epimers. *ChemMedChem*. 2008;3(7):1061–70.
181. Zhang Z, Zhao W, Wang B, Xia C, Zhang W, Wang PG. The Total Synthesis of Immunostimulant α -Galactosylceramides from Naturally Configured α -Galactoside Raffinose. *Org Lett*. 2011 Sep 2;13(17):4530–3.
182. Leung L, Tomassi C, Van Beneden K, Decruy T, Elewaut D, Elliott T, et al. Synthesis and In Vivo Evaluation of 4-Deoxy-4,4-difluoro-KRN7000. *Org Lett*. 2008 Oct 16;10(20):4433–6.
183. Fan G-T, Pan Y, Lu K-C, Cheng Y-P, Lin W-C, Lin S, et al. Synthesis of α -galactosyl ceramide and the related glycolipids for evaluation of their activities on mouse splenocytes. *Tetrahedron*. 2005 Feb 14;61(7):1855–62.

184. Tashiro T, Hongo N, Nakagawa R, Seino K, Watarai H, Ishii Y, et al. RCAI-17, 22, 24–26, 29, 31, 34–36, 38–40, and 88, the analogs of KRN7000 with a sulfonamide linkage: Their synthesis and bioactivity for mouse natural killer T cells to produce Th2-biased cytokines. *Bioorg Med Chem*. 2008 Oct 1;16(19):8896–906.
185. Lee T, Cho M, Ko S-Y, Youn H-J, Baek DJ, Cho W-J, et al. Synthesis and Evaluation of 1,2,3-Triazole Containing Analogues of the Immunostimulant α -GalCer. *J Med Chem*. 2007;50(3):585–9.
186. Shiozaki M, Tashiro T, Koshino H, Nakagawa R, Inoue S, Shigeura T, et al. Synthesis and biological activity of ester and ether analogues of α -galactosylceramide (KRN7000). *Carbohydr Res*. 2010 Aug 16;345(12):1663–84.
187. Fuhshuku K, Hongo N, Tashiro T, Masuda Y, Nakagawa R, Seino K, et al. RCAI-8, 9, 18, 19, and 49–52, conformationally restricted analogues of KRN7000 with an azetidine or a pyrrolidine ring: Their synthesis and bioactivity for mouse natural killer T cells to produce cytokines. *Bioorg Med Chem*. 2008 Jan 15;16(2):950–64.
188. Hénon E, Dauchez M, Haudrechy A, Banchet A. Molecular dynamics simulation study on the interaction of KRN 7000 and three analogues with human CD1d. *Tetrahedron*. 2008 Sep;64(40):9480–9.
189. Wojno J, Jukes J-P, Ghadbane H, Shepherd D, Besra GS, Cerundolo V, et al. Amide analogues of CD1d agonists modulate i NKT-cell-mediated cytokine production. *ACS Chem Biol*. 2012;7(5):847–55.
190. Tashiro T, Shigeura T, Watarai H, Taniguchi M, Mori K. RCAI-84, 91, and 105-108, ureido and thioureido analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(14):4540–8.
191. Tashiro T, Ishii Y, Shigeura T, Nakagawa R, Watarai H, Taniguchi M, et al. RCAI-39, 41, 53, 100, 127 and 128, the analogues of KRN7000, activate mouse natural killer T cells to produce Th2-biased cytokines by their administration as liposomal particles. *MedChemComm*. 2011;2(7):620–5.
192. Leung L, Tomassi C, Van Beneden K, Decruy T, Trappeniers M, Elewaut D, et al. The Synthesis and in vivo Evaluation of 2',2'-Difluoro KRN7000. *ChemMedChem*. 2009;4(3):329–34.
193. Shiozaki M, Tashiro T, Koshino H, Shigeura T, Watarai H, Taniguchi M, et al. Synthesis and biological activity of hydroxylated analogues of KRN7000 (α -galactosylceramide). *Carbohydr Res*. 2013 Apr 5;370:46–66.
194. Goff RD, Gao Y, Mattner J, Zhou D, Yin N, Cantu C, et al. Effects of Lipid Chain Lengths in α -Galactosylceramides on Cytokine Release by Natural Killer T Cells. *J Am Chem Soc*. 2004 Oct 1;126(42):13602–3.
195. Toba T, Murata K, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Akabane M, et al. Minimum structure requirement of immunomodulatory glycolipids for predominant Th2 cytokine induction and the discovery of non-linear phytosphingosine analogs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 May 15;17(10):2781–4.
196. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, et al. The Length of Lipids Bound to Human CD1d Molecules Modulates the Affinity of NKT Cell

- TCR and the Threshold of NKT Cell Activation. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1131–44.
197. Wallner FK, Chen L, Moliner A, Jondal M, Elofsson M. Loading of the antigen-presenting protein CD1d with synthetic glycolipids. *ChemBioChem*. 2004;5(4):437–44.
 198. Yu KOA, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, et al. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1;102(9):3383–8.
 199. Matto P, Modica E, Franchini L, Facciotti F, Mori L, De Libero G, et al. A General and Stereoselective Route to α - or β -Galactosphingolipids via a Common Four-Carbon Building Block. *J Org Chem*. 2007 Sep 1;72(20):7757–60.
 200. Baek DJ, Lee Y-S, Lim C, Lee D, Lee T, Lee J-Y, et al. Rational Design and Evaluation of a Branched-Chain-Containing Glycolipid Antigen That Binds to CD1d. *Chem - Asian J*. 2010 Jun 8;5(7):1560–4.
 201. Chang Y-J, Huang J-R, Tsai Y-C, Hung J-T, Wu D, Fujio M, et al. Potent immunomodulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Jun 19;104(25):10299–304.
 202. Fujio M, Wu D, Garcia-Navarro R, Ho DD, Tsuji M, Wong C-H. Structure-Based Discovery of Glycolipids for CD1d-Mediated NKT Cell Activation: Tuning the Adjuvant versus Immunosuppression Activity. *J Am Chem Soc*. 2006 Jul 1;128(28):9022–3.
 203. Liang P-H, Imamura M, Li X, Wu D, Fujio M, Guy RT, et al. Quantitative Microarray Analysis of Intact Glycolipid–CD1d Interaction and Correlation with Cell-Based Cytokine Production. *J Am Chem Soc*. 2008 Sep 17;130(37):12348–54.
 204. Michieletti M, Bracci A, Compostella F, De Libero G, Mori L, Fallarini S, et al. Synthesis of α -Galactosyl Ceramide (KRN7000) and Analogues Thereof via a Common Precursor and Their Preliminary Biological Assessment. *J Org Chem*. 2008 Nov 21;73(22):9192–5.
 205. Jervis PJ, Polzella P, Wojno J, Jukes J-P, Ghabbane H, Garcia Diaz YR, et al. Design, Synthesis, and Functional Activity of Labeled CD1d Glycolipid Agonists. *Bioconjug Chem*. 2013 Mar 4;24(4):586–584.
 206. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*. 1997 Apr 4;267(3):727–48.
 207. Plewczynski D, Łażniewski M, Augustyniak R, Ginalski K. Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. *J Comput Chem*. 2011 Mar 1;32(4):742–55.
 208. Lape M, Elam C, Paula S. Comparison of current docking tools for the simulation of inhibitor binding by the transmembrane domain of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Biophys Chem*. 2010 Aug;150(1–3):88–97.
 209. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des*. 1997 Sep 1;11(5):425–45.
 210. Korb O, Stützle T, Exner TE. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J Chem Inf Model*. 2009 Jan 26;49(1):84–96.

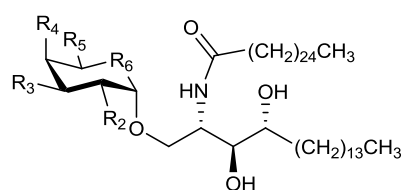
211. Mooij WTM, Verdonk ML. General and targeted statistical potentials for protein–ligand interactions. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2005 Nov 1;61(2):272–87.
212. Cusachs LC, Politzer P. On the problem of defining the charge on an atom in a molecule. *Chem Phys Lett*. 1968 Jan;1(11):529–31.
213. Leach AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education; 2001. 784 p.
214. Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009 Jul 30;30(10):1545–614.
215. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem*. 1983;4(2):187–217.
216. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc*. 1988 Mar 1;110(6):1657–66.
217. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2012;n/a–n/a.
218. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J Phys Chem B*. 2007 Jul 1;111(27):7812–24.
219. Wang J, Cieplak P, Kollman PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J Comput Chem*. 2000 Sep 1;21(12):1049–74.
220. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*. 1984 Oct 15;81(8):3684–90.
221. Grest GS, Kremer K. Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath. *Phys Rev A*. 1986 May 1;33(5):3628–31.
222. Zhou R. Free energy landscape of protein folding in water: Explicit vs. implicit solvent. *Proteins Struct Funct Genet*. 2003 Nov 1;53(2):148–61.
223. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79(2):926.
224. Ewald PP. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann Phys*. 1921;369(3):253–87.
225. Nicolai A, Delarue P, Senet P. Conformational dynamics of full-length inducible human Hsp70 derived from microsecond molecular dynamics simulations in explicit solvent. *J Biomol Struct Dyn*. 2013;31(10):1111–26.
226. Hodgkin EE, Richards WG. A semi-empirical method for calculating molecular similarity. *J Chem Soc Chem Commun*. 1986 Jan 1;(17):1342–4.

227. Cote Y, Senet P, Delarue P, Maisuradze GG, Scheraga HA. Nonexponential decay of internal rotational correlation functions of native proteins and self-similar structural fluctuations. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Nov 16;107(46):19844–9.
228. Hess B. Similarities between principal components of protein dynamics and random diffusion. *Phys Rev E*. 2000 Dec 1;62(6):8438–48.
229. Case DA, Darden TA, Cheatham, III TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, et al. AMBER 11. University of California, San Francisco; 2010.
230. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 09 Revision A.1. 2009.
231. Altis A, Nguyen PH, Hegger R, Stock G. Dihedral angle principal component analysis of molecular dynamics simulations. *J Chem Phys*. 2007 Jun 29;126(24):244111–244111–10.
232. Garcia-Alles LF, Versluis K, Maveyraud L, Vallina AT, Sansano S, Bello NF, et al. Endogenous phosphatidylcholine and a long spacer ligand stabilize the lipid-binding groove of CD1b. *EMBO J*. 2006 Aug 9;25(15):3684–92.

Annexe A – Relations structure-activité

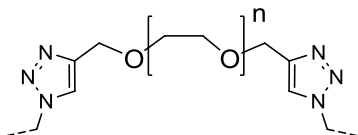
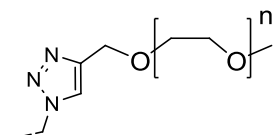
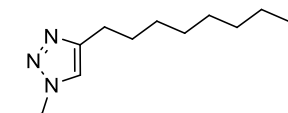
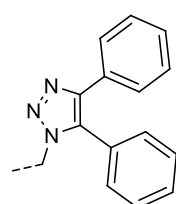
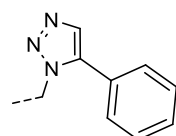
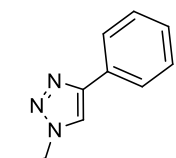
Table A1. Substitutions sur la tête polaire.....	150
Table A2. Substitutions des chaines lipidiques	154
Références.....	157

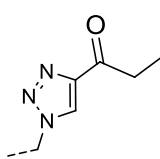
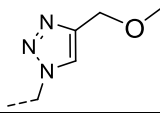
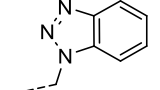


Table A1. Substitutions sur la tête polaire



N°	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Activité	Ref	
α-GalCer	OH					Th1 ^{h,m}	1	
3		OH	OH			Inactif ^m	2	
4	F						3	
5	H						4	
6	NH ₂						5	
7							N ₃	6
8							NH ₃	
9								
10		H						
12	OH	OH		Th1— ^m				
13				O	Th2— ^m			
14								
15			H					
16			OH	OH		Th1 ^m	7	
17		Th1+ ^m						
18		Th1— ^m						
19			OH			Activation des iNKT ^m	8	
20	OH		OH					

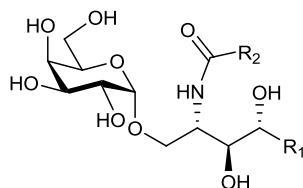
N°	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Activité	Ref					
24	OH	OH	OH		O	Th1+ ^m	9					
25												
26				CH ₃								
27				C ₂ H ₅								
28				CH ₂ F								
29				H								
30											Th1- ^m	10
31	OH	OH	OH		O	Th1 ^m	10					
32												
33												
34												
35												
36												
37												
36								Th1- ^m	11			
									n = 4, 12 or 18			

N°	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Activité	Ref
40						n = 0 Th1- ^m	
41						n = 2 Th1- ^m	
42	OH	OH	OH		O	n = 3 Th1+ ^m	
43						n = 5 Th1+ ^m	
44						n = 8 Th1+ ^m	
45						n = 0 Th1- ^m	
46						n = 2 Th1- ^m	
47	OH	OH	OH		O	n = 3 Th1+ ^m	
48						n = 5 Th1+ ^m	
49						n = 8 Th1+ ^m	
50						Th1 ^m	
51	OH	OH	OH		O	Th2- ^m	12
52						Th2 ^m	
53						Th2- ^m	

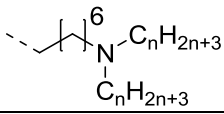
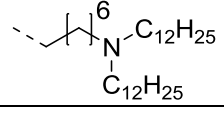
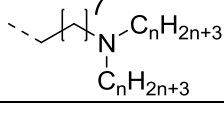
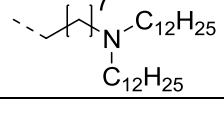
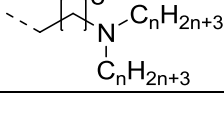
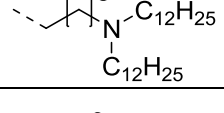
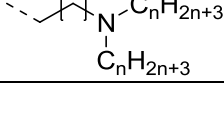
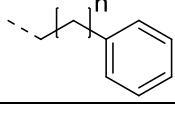
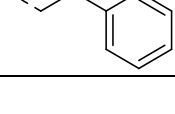
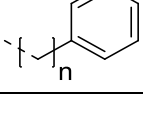
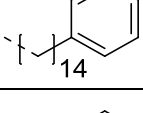
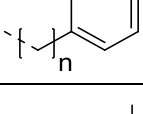
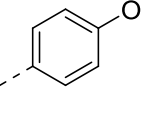
N°	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Activité	Ref
54							
55							
56							
59				OH		Inactif ^m	
62				CH ₃			13
63					CH ₂	Th1+ ^m	

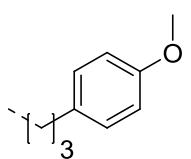
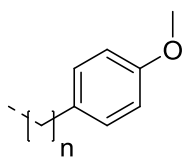
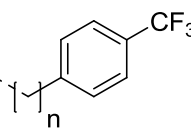
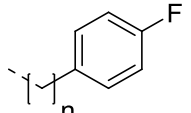
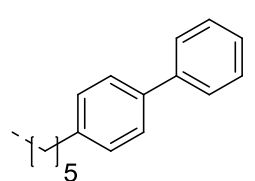
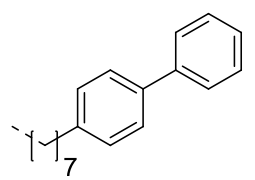
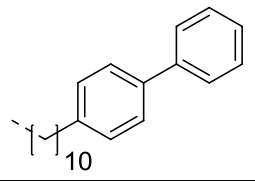
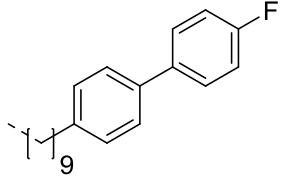
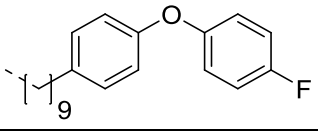
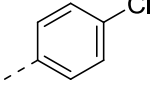
++/-- réponse plus forte/plus faible que le ligand de référence, +/- réponse légèrement plus forte/plus faible que le ligand de référence. ^m testé sur cellules murines, ^h testé sur cellules humaines, les ligands de références sont l' α -GalCer pour le profil Th1 et l'OCH pour le profil Th2

Table A2. Substitutions des chaînes lipidiques



N°	R ₁	R ₂	Activité	Ref
112	C ₁₄ H ₂₉	C _n H _{2n+1}	n = 1, 7 Th1 ^m Th2 ^h	14,15
113			n = 15, 19 Th1- ^{m,h}	
114			n = 23, 24 Th1 ^m	
115	C ₉ H ₁₉	C ₂₃ H ₄₇	Th2- ^m	14
116	C ₅ H ₁₁	C ₁₉ H ₃₉	Inactif ^m	16
117		C ₂₁ H ₄₃	Th2- ^m	
118		C _n H _{2n+1}	n = 23, 24 Th2 ^m	
119			n = 25, 26 Th1 ^m	
120	C _n H _{2n+1}	C ₂₃ H ₄₇	n = 2 to 4 Th2 ^m	
122	C ₁₄ H ₂₉		Th2- ^m	15
123			Th2 ^m	
125				
126				
127			Inactif ^m	
133				

N°	R ₁	R ₂	Activité	Ref
134			n = 7 to 9 Th2+ ^m	
135			Inactif ^m	
136			n = 7 to 9 Th2+ ^m	
137			Inactif ^m	
138	C ₁₄ H ₂₉		n = 7 to 9 Th2+ ^m	
139	C ₁₄ H ₂₉		Inactif ^m	17
140	C ₁₄ H ₂₉		n = 7 to 9, 12 Inactif ^m	
141		C ₂₅ H ₅₁	n = 3, 6, 8 Th1- ^h	18
142			Th1-- ^h	
143	C ₁₄ H ₂₉		n = 4 to 10 Th1+ ^h	18– 20
144			Th1-- ^h	
145			n = 20, 24 Inactif ^h	
146			Inactif ^h	

N°	R ₁	R ₂	Activité	Ref
147			Th1- ^h	
148			n = 5, 7 Th1+ ^h	
149			n = 3, 5, 7, 10 Th1+ ^h	
150				
151			Th1- ^h	20
152			Inactif ^m	
153			Th1+ ^h	20
154	C ₁₄ H ₂₉		Th1- ^h	
155			Th1+ ^h	
156			Th1- ^h	19

N°	R ₁	R ₂	Activité	Ref
157			n = 4, 6, 8 Inactif ^m	20,21
158			n = 6, 9 Inactif ^m	20
159	C ₁₄ H ₂₉		Inactif ^h	19
162				
163				
164				
165		X =	Activation des iNKT ^m	22
166		X =		
167		X =		
168		X = C ₁₁ H ₂₃		

++/-- réponse plus forte/plus faible que le ligand de référence, +/- réponse légèrement plus forte/plus faible que le ligand de référence. ^m testé sur cellules murines, ^h testé sur cellules humaines, les ligands de références sont l' α -GalCer pour le profil Th1 et l'OCH pour le profil Th2.

Références

- (1) Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H.; Taniguchi, M. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science* **1997**, *278*, 1626–1629.
- (2) Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Aru, E.; Parapini, S.; Taramelli, D. Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of a 2'-O-Methyl- α -Gal-GSL and Evaluation of Its Immunostimulating Capacity. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 468–473.
- (3) Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Basilico, N.; Mondani, M.; Taramelli, D. Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of 2'-Fluoro-2'-deoxy- α -galactosylceramide and an Evaluation of Its Immunostimulating Properties. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 3279–3285.

- (4) Costantino, V.; Fattorusso, E.; Imperatore, C.; Mangoni, A. Immunomodulating Glycosphingolipids: An Efficient Synthesis of a 2'-deoxy- α -galactosyl-GSL. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 369–375.
- (5) Xing, G.-W.; Wu, D.; Poles, M. A.; Horowitz, A.; Tsuji, M.; Ho, D. D.; Wong, C.-H. Synthesis and Human NKT Cell Stimulating Properties of 3-O-sulfo- α/β -galactosylceramides. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2907–2916.
- (6) Xia, C.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Chen, W.; Nadas, J.; Severin, R.; Woodward, R.; Wang, B.; Wang, X.; Kronenberg, M.; Wang, P. G. The Roles of 3' and 4' Hydroxy Groups in α -Galactosylceramide Stimulation of Invariant Natural Killer T Cells. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1810–1815.
- (7) Zhang, Z.; Zhao, W.; Wang, B.; Xia, C.; Zhang, W.; Wang, P. G. The Total Synthesis of Immunostimulant α -Galactosylceramides from Naturally Configured α -Galactoside Raffinose. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4530–4533.
- (8) Uchimura, A.; Shimizu, T.; Nakajima, M.; Ueno, H.; Motoki, K.; Fukushima, H.; Natori, T.; Koezuka, Y. Immunostimulatory Activities of Mono- or Diglycosylated A-galactosylceramides. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1447–1452.
- (9) Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Inoue, S.; Shiozaki, M.; Watarai, H.; Taniguchi, M.; Mori, K. RCAI-61, the 6'-O-methylated Analog of KRN7000: Its Synthesis and Potent Bioactivity for Mouse Lymphocytes to Produce Interferon- γ in Vivo. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6827–6830.
- (10) Aspeslagh, S.; Li, Y.; Yu, E. D.; Pauwels, N.; Trappeniers, M.; Girardi, E.; Decruy, T.; Beneden, K. V.; Venken, K.; Drennan, M.; Leybaert, L.; Wang, J.; Franck, R. W.; Calenbergh, S. V.; Zajonc, D. M.; Elewaut, D. Galactose-modified iNKT Cell Agonists Stabilized by an Induced Fit of CD1d Prevent Tumour Metastasis. *EMBO J.* **2011**, *30*, 2294–2305.
- (11) Jervis, P. J.; Moulis, M.; Jukes, J.-P.; Ghadbane, H.; Cox, L. R.; Cerundolo, V.; Besra, G. S. Towards Multivalent CD1d Ligands: Synthesis and Biological Activity of Homodimeric A-galactosyl Ceramide Analogues. *Carbohydr. Res.* **2012**, *356*, 152–162.
- (12) Jervis, P. J.; Graham, L. M.; Foster, E. L.; Cox, L. R.; Porcelli, S. A.; Besra, G. S. New CD1d Agonists: Synthesis and Biological Activity of 6"-triazole-substituted A-galactosyl Ceramides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4348–4352.
- (13) Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Hirokawa, T.; Inoue, S.; Watarai, H.; Taniguchi, M.; Mori, K. RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, Cyclitol and Carbasugar Analogs of KRN7000: Their Synthesis and Bioactivity for Mouse Lymphocytes to Produce Th1-biased Cytokines. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6360–6373.
- (14) Goff, R. D.; Gao, Y.; Mattner, J.; Zhou, D.; Yin, N.; Cantu, C.; Teyton, L.; Bendelac, A.; Savage, P. B. Effects of Lipid Chain Lengths in α -Galactosylceramides on Cytokine Release by Natural Killer T Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13602–13603.
- (15) Yu, K. O. A.; Im, J. S.; Molano, A.; Dutronc, Y.; Illarionov, P. A.; Forestier, C.; Fujiwara, N.; Arias, I.; Miyake, S.; Yamamura, T.; Chang, Y.-T.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A. Modulation of CD1d-restricted NKT Cell Responses by Using N-acyl Variants of A-galactosylceramides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3383–3388.

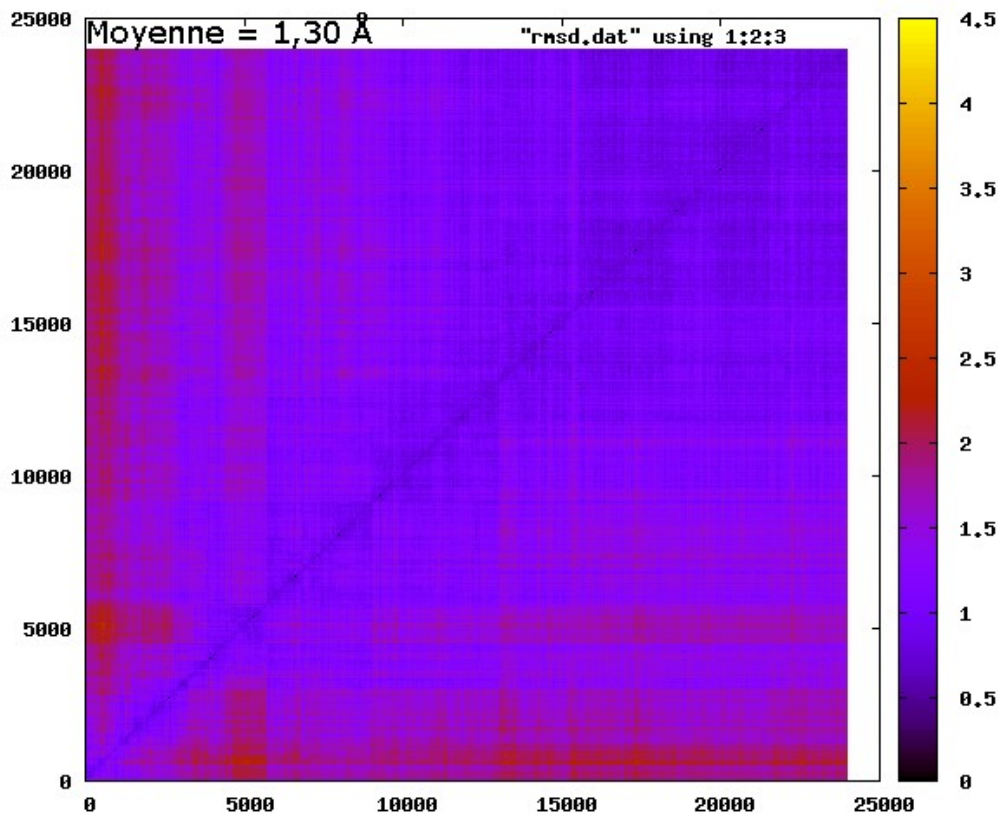
- (16) Toba, T.; Murata, K.; Nakanishi, K.; Takahashi, B.; Takemoto, N.; Akabane, M.; Nakatsuka, T.; Imajo, S.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. Minimum Structure Requirement of Immunomodulatory Glycolipids for Predominant Th2 Cytokine Induction and the Discovery of Non-linear Phytosphingosine Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2781–2784.
- (17) Baek, D. J.; Lee, Y.-S.; Lim, C.; Lee, D.; Lee, T.; Lee, J.-Y.; Lee, K.-A.; Cho, W.-J.; Kang, C.-Y.; Kim, S. Rational Design and Evaluation of a Branched-Chain-Containing Glycolipid Antigen That Binds to CD1d. *Chem. - Asian J.* **2010**, *5*, 1560–1564.
- (18) Li, X.; Fujio, M.; Imamura, M.; Wu, D.; Vasan, S.; Wong, C.-H.; Ho, D. D.; Tsuji, M. Design of a Potent CD1d-Binding NKT Cell Ligand as a Vaccine Adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 13010–13015.
- (19) Fujio, M.; Wu, D.; Garcia-Navarro, R.; Ho, D. D.; Tsuji, M.; Wong, C.-H. Structure-Based Discovery of Glycolipids for CD1d-Mediated NKT Cell Activation: Tuning the Adjuvant Versus Immunosuppression Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9022–9023.
- (20) Wu, T.-N.; Lin, K.-H.; Chang, Y.-J.; Huang, J.-R.; Cheng, J.-Y.; Yu, A. L.; Wong, C.-H. Avidity of CD1d-ligand-receptor Ternary Complex Contributes to T-helper 1 (Th1) Polarization and Anticancer Efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 17275–17280.
- (21) Park, J.-J.; Lee, J. H.; Seo, K.-C.; Bricard, G.; Venkataswamy, M. M.; Porcelli, S. A.; Chung, S.-K. Syntheses and Biological Activities of KRN7000 Analogues Having Aromatic Residues in the Acyl and Backbone Chains with Varying Stereochemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 814–818.
- (22) Michieletti, M.; Bracci, A.; Compostella, F.; De Libero, G.; Mori, L.; Fallarini, S.; Lombardi, G.; Panza, L. Synthesis of α -Galactosyl Ceramide (KRN7000) and Analogues Thereof via a Common Precursor and Their Preliminary Biological Assessment. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9192–9195.

Annexe B – RMSD-2D

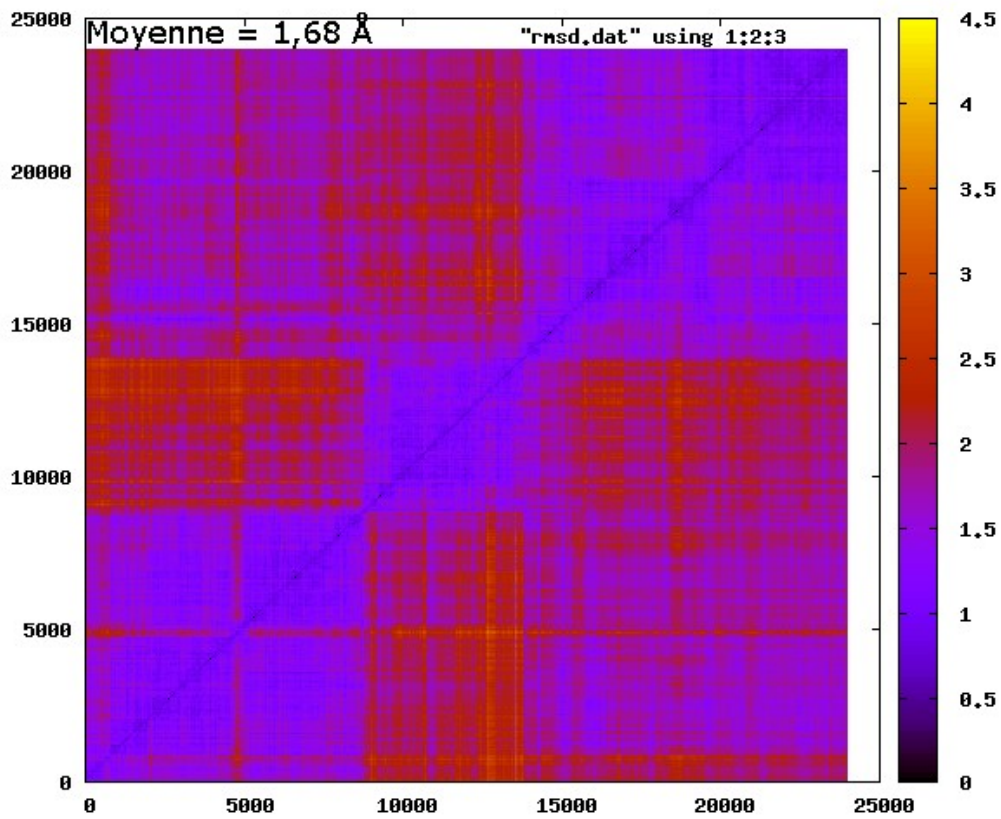
Dans tous les graphes, sont représentés en abscisse et en ordonnée le temps associé à chaque conformation comparé (unité = 10ps). Sur l'échelle de couleur, le RMSD est exprimé en angström.

Annexe B 1 : H_7DW réplique I	162
Annexe B 2 : H_7DW réplique II	162
Annexe B 3 : H_7DW réplique III	163
Annexe B 4 : H_aGAL réplique I	163
Annexe B 5 : H_aGAL réplique II	164
Annexe B 6 : H_aGAL réplique III	164
Annexe B 7 : H_CD1d réplique I	165
Annexe B 8 : H_CD1d réplique II	165
Annexe B 9 : H_CD1d réplique III	166
Annexe B 10 : H_GOF réplique I	166
Annexe B 11 : H_GOF réplique II	167
Annexe B 12 : H_GOF réplique III	167
Annexe B 13 : H_LIP réplique I	168
Annexe B 14 : H_LIP réplique II	168
Annexe B 15 : H_LIP réplique III	169
Annexe B 16 : H_NUaGAL réplique I	169
Annexe B 17 : H_NUaGAL réplique II	170
Annexe B 18 : H_NUaGAL réplique III	170
Annexe B 19 : H_OCH réplique I	171
Annexe B 20 : H_OCH réplique II	171
Annexe B 21 : H_OCH réplique III	172
Annexe B 22 : H_OCH9 réplique I	172
Annexe B 23 : H_OCH9 réplique II	173
Annexe B 24 : H_OCH9 réplique III	173
Annexe B 25 : H_SaGAL réplique I	174
Annexe B 26 : H_SaGAL réplique II	174
Annexe B 27 : H_SaGAL réplique III	175
Annexe B 28 : M_7DW réplique I	175
Annexe B 29 : M_7DW réplique II	176

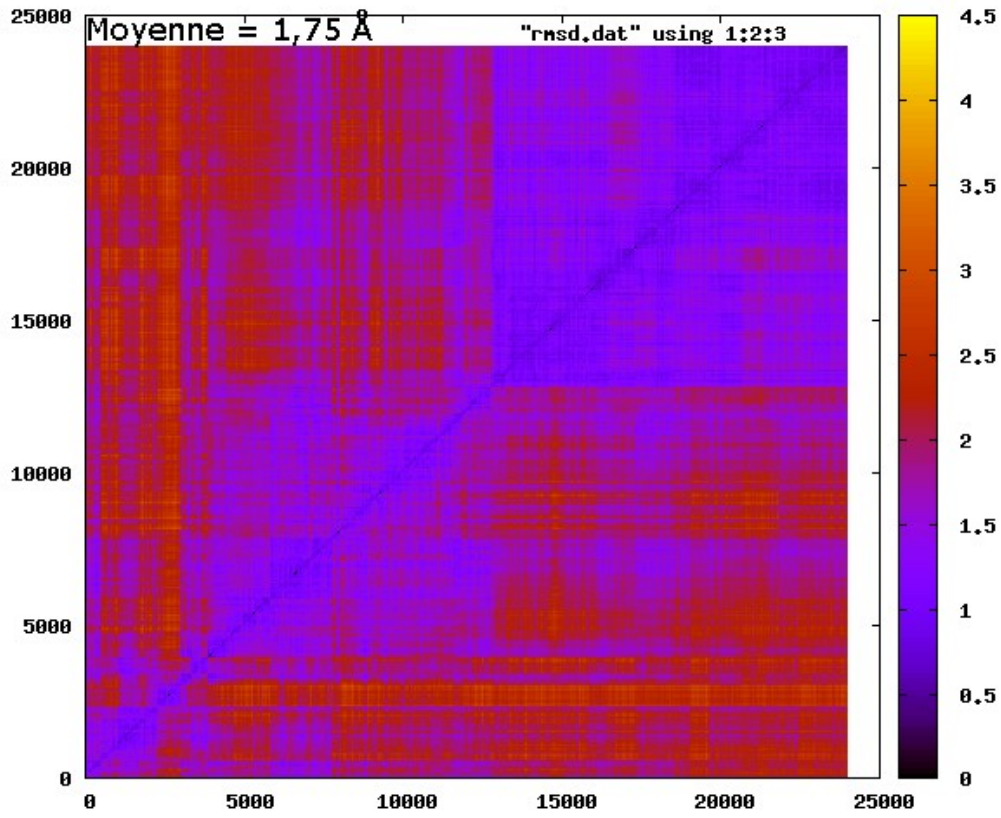
Annexe B 30 : M_7DW réplique III.....	176
Annexe B 31 : M_aGAL réplique I	177
Annexe B 32 : M_aGAL réplique II	177
Annexe B 33 : M_aGAL réplique III	178
Annexe B 34 : M_AZOL réplique I	178
Annexe B 35 : M_AZOL réplique II	179
Annexe B 36 : M_AZOL réplique III	179
Annexe B 37 : M_GOF réplique I.....	180
Annexe B 38 : M_GOF réplique II.....	180
Annexe B 39 : M_GOF réplique III.....	181
Annexe B 40 : M_NUaGAL réplique I	181
Annexe B 41 : M_NUaGAL réplique II	182
Annexe B 42 : M_NUaGAL réplique III	182
Annexe B 43 : M_OCH réplique I	183
Annexe B 44 : M_OCH réplique II.....	183
Annexe B 45 : M_OCH réplique III.....	184
Annexe B 46 : M_SaGal réplique I.....	184
Annexe B 47 : M_SaGal réplique II.....	185
Annexe B 48 : M_SaGal réplique III.....	185



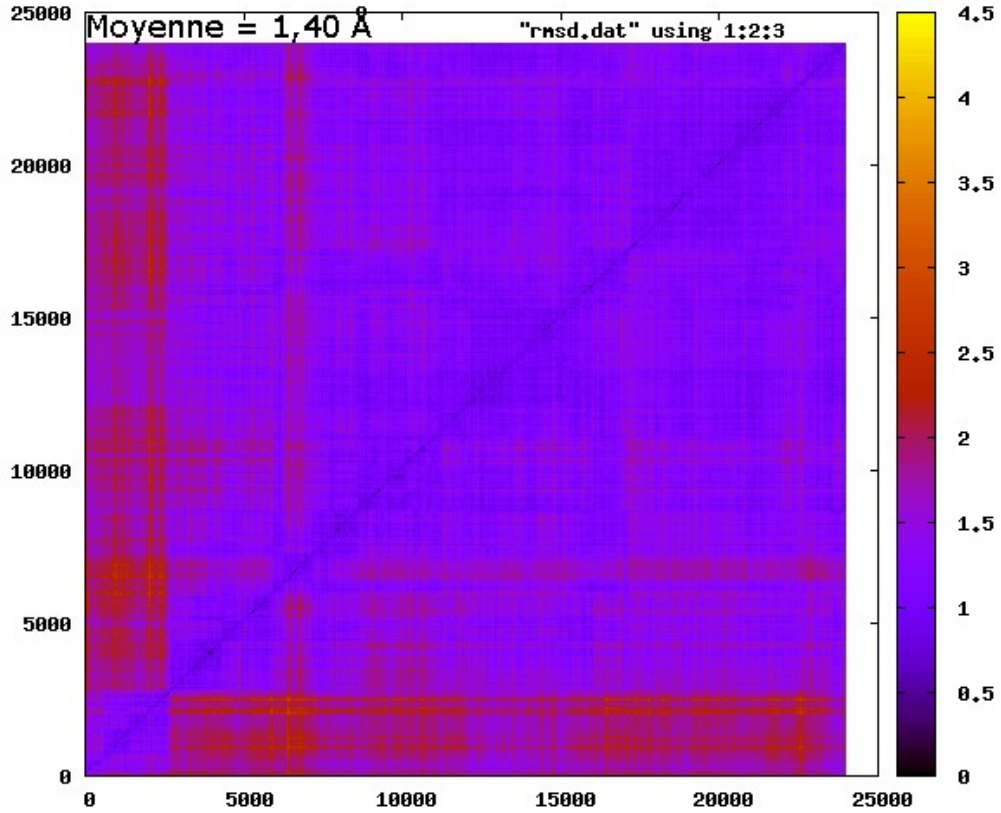
Annexe B 1 : H_7DW réplique I



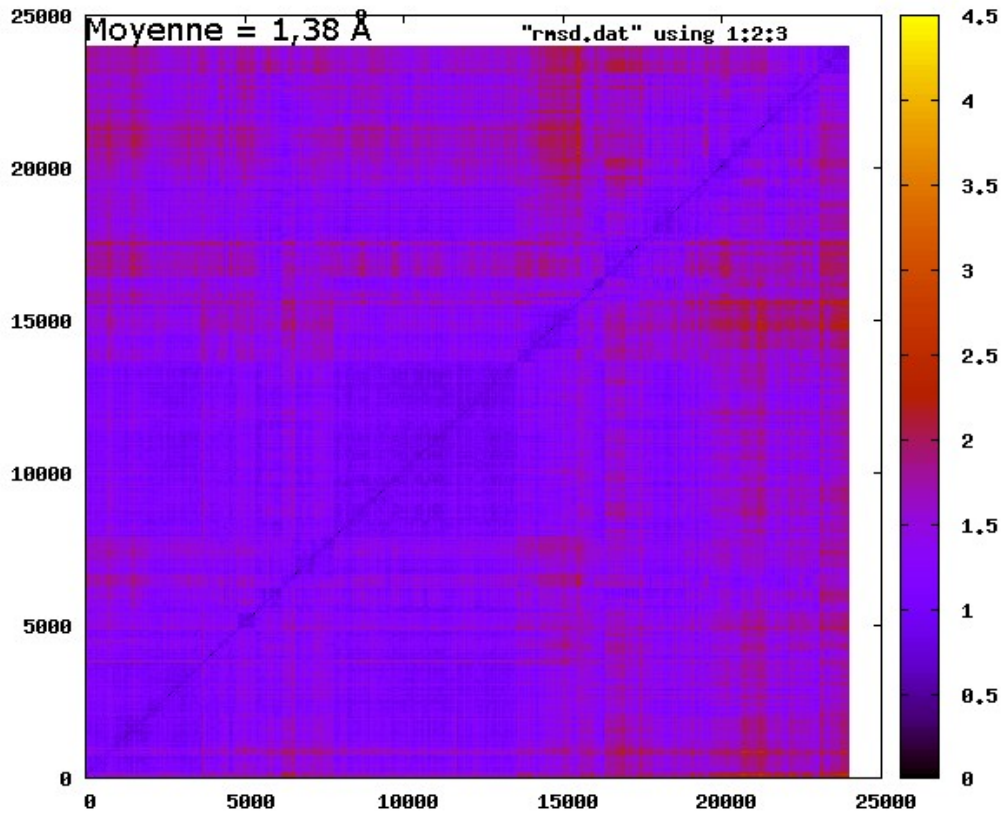
Annexe B 2 : H_7DW réplique II



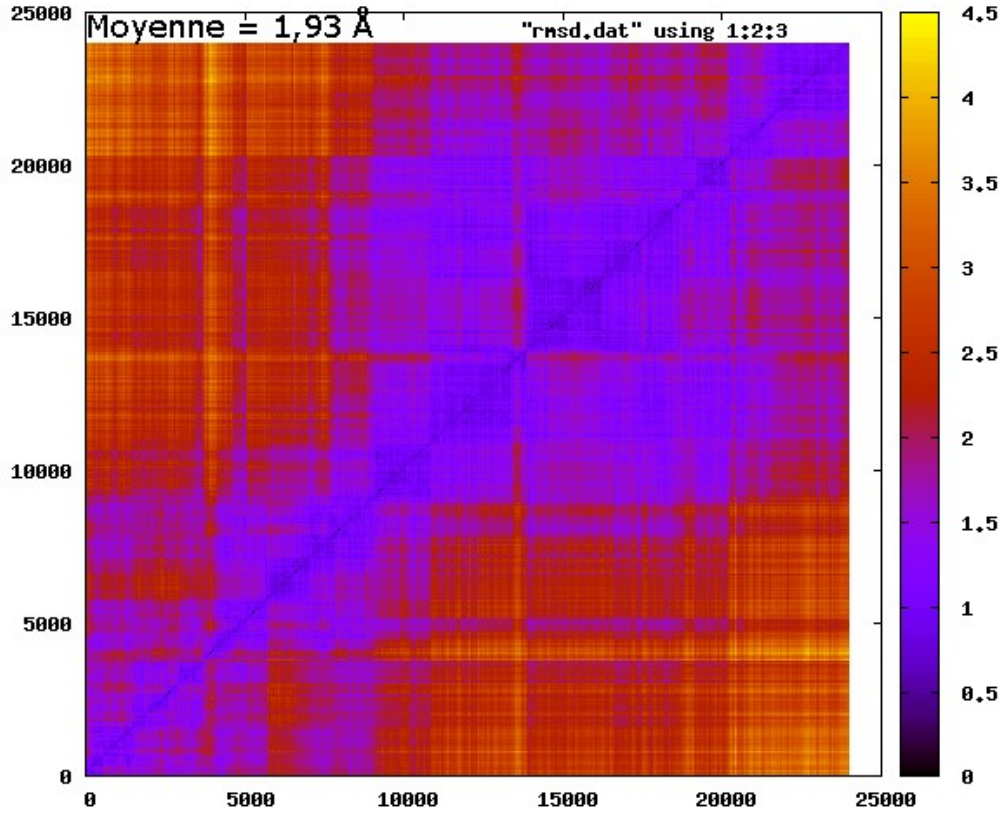
Annexe B 3 : H_7DW réplique III



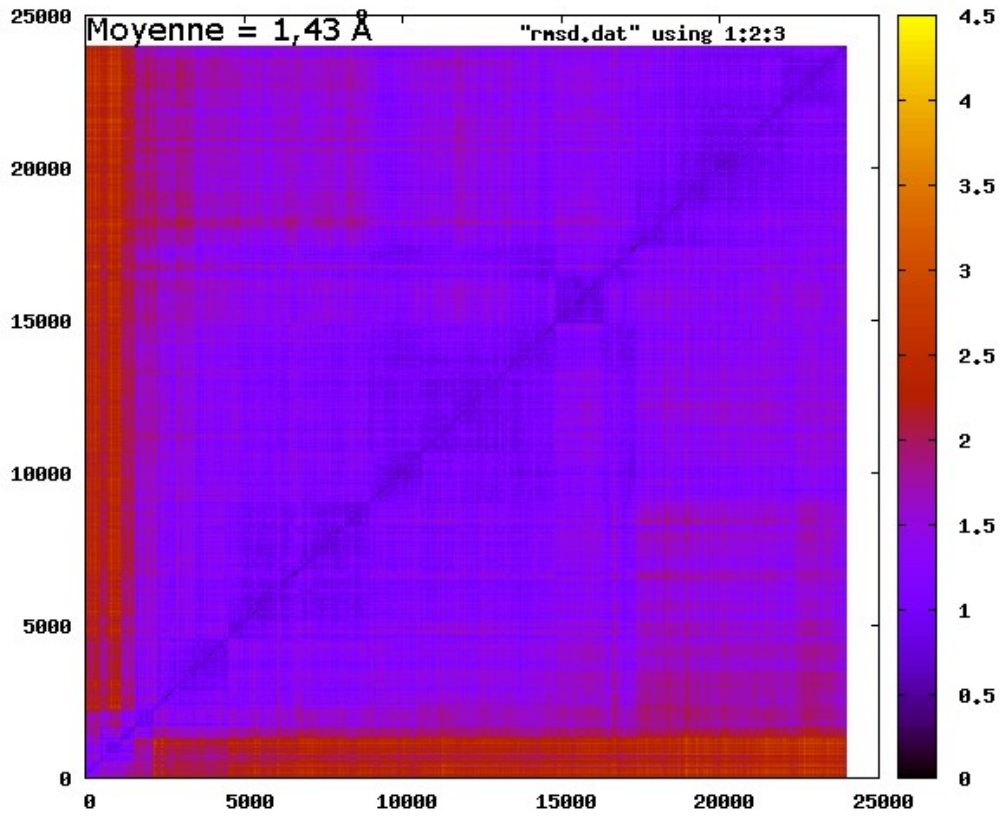
Annexe B 4 : H_aGAL réplique I



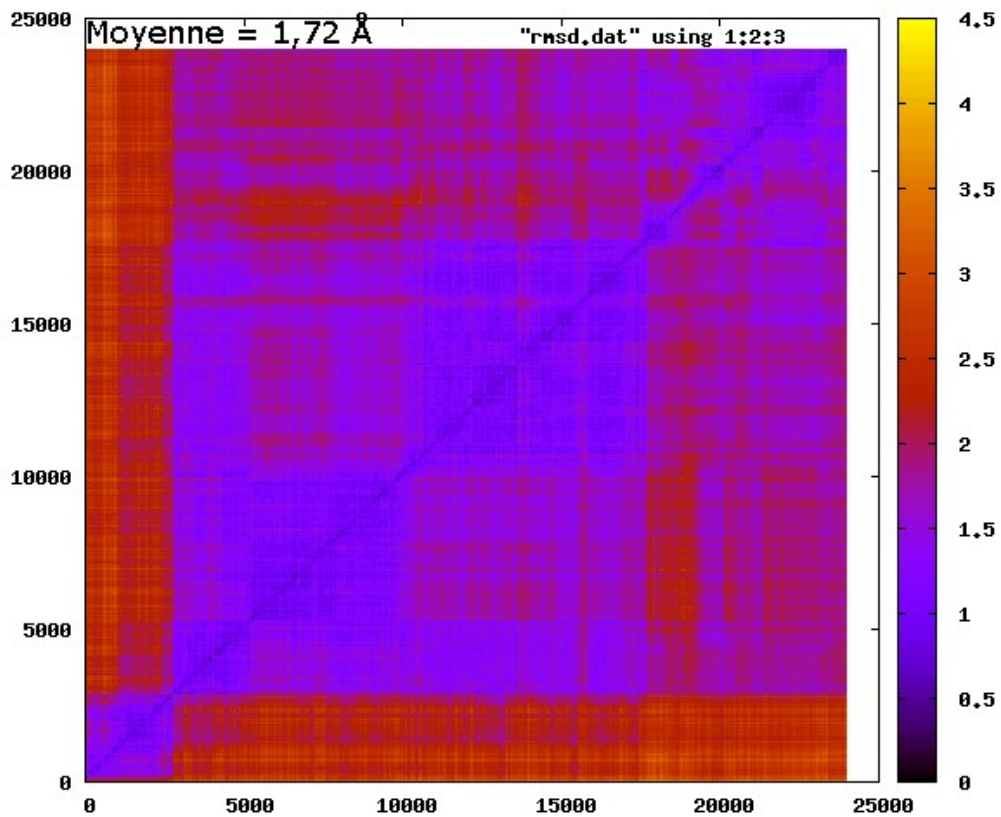
Annexe B 5 : H_aGAL réplique II



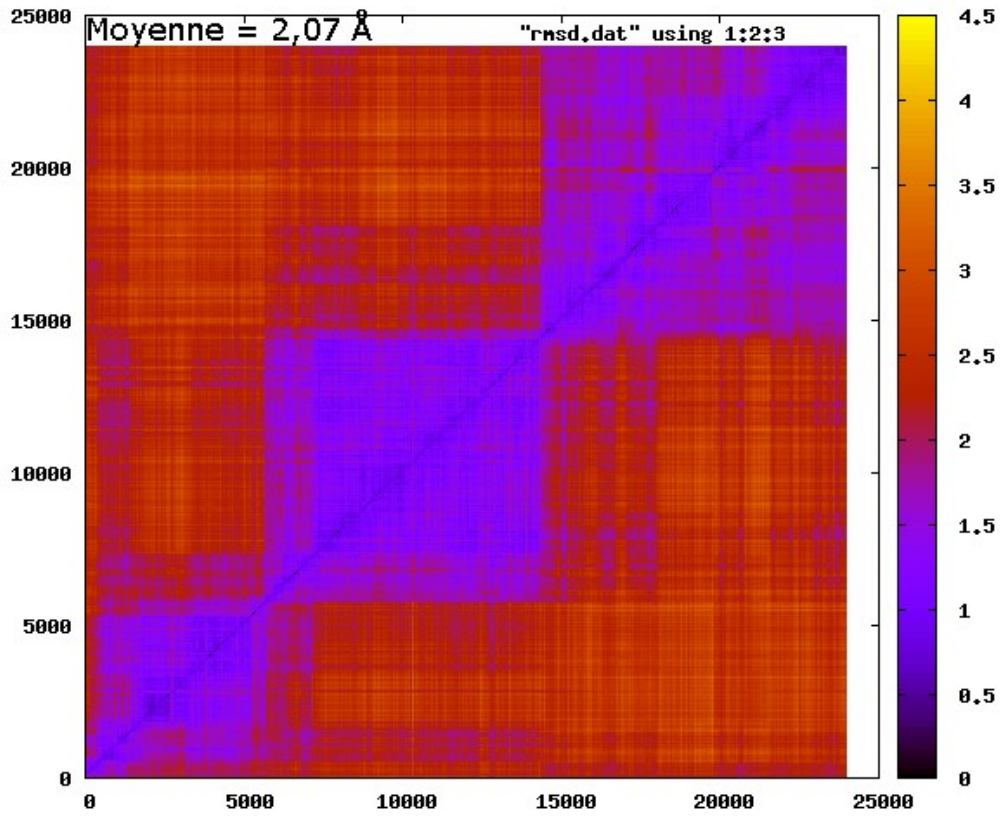
Annexe B 6 : H_aGAL réplique III



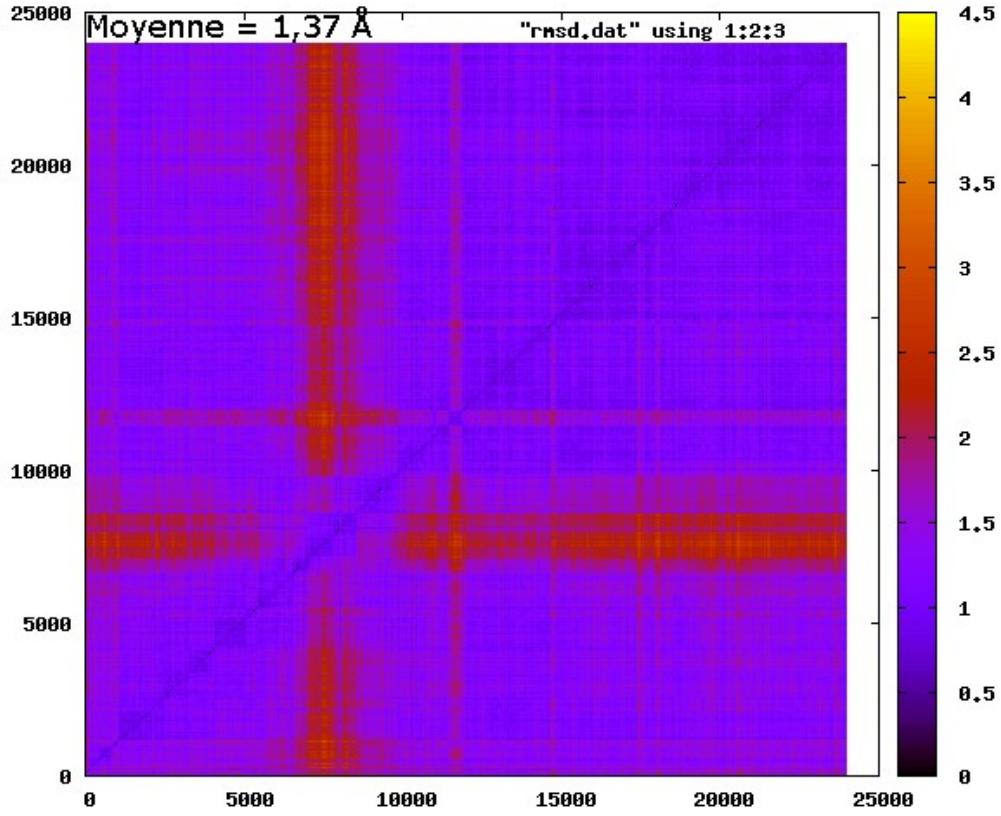
Annexe B 7 : H_CD1d réplique I



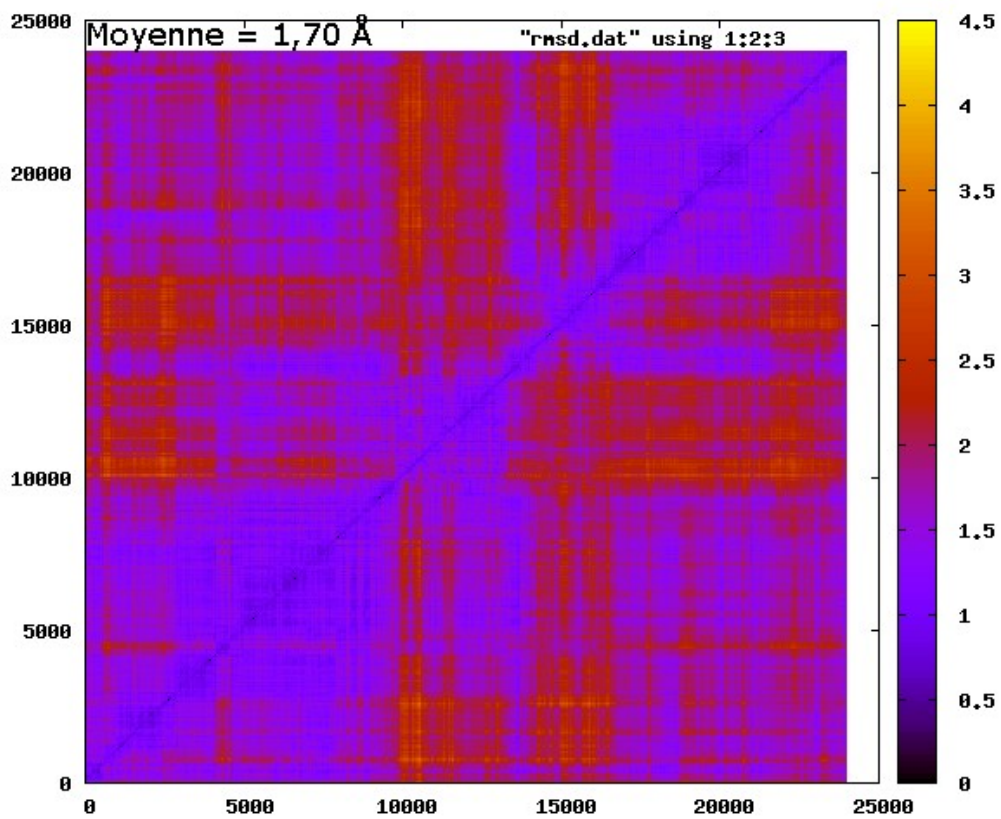
Annexe B 8 : H_CD1d réplique II



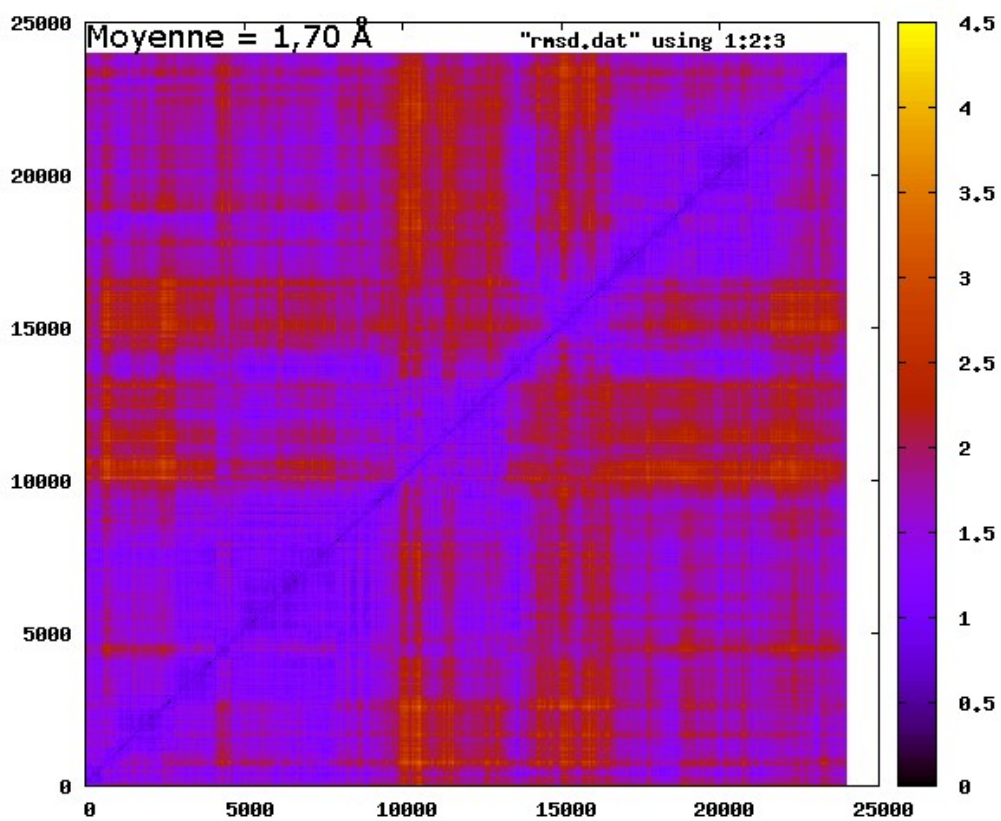
Annexe B 9 : H_CD1d réplique III



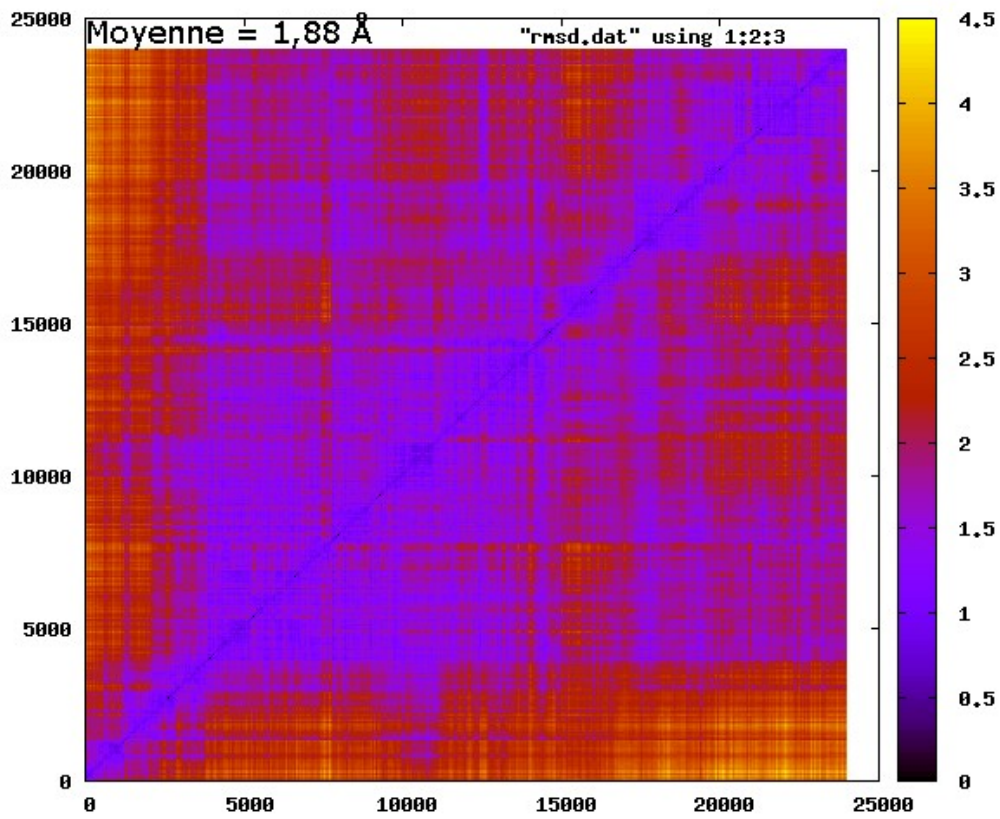
Annexe B 10 : H_GOF réplique I



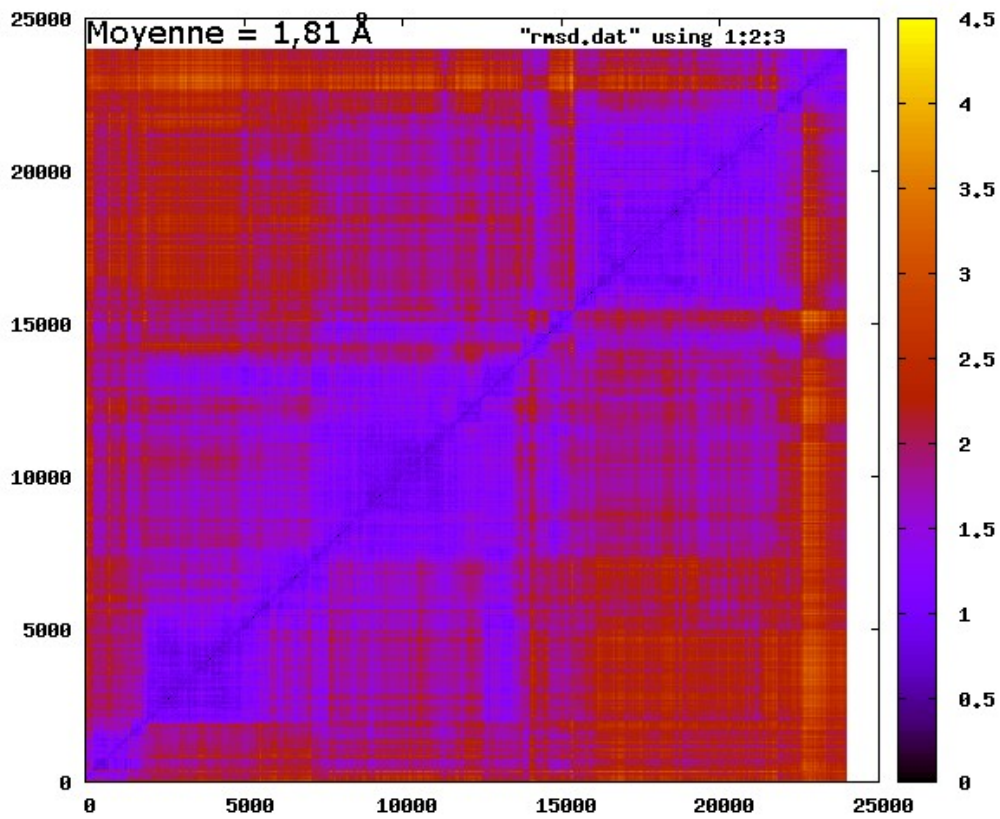
Annexe B 11 : H_GOF réplique II



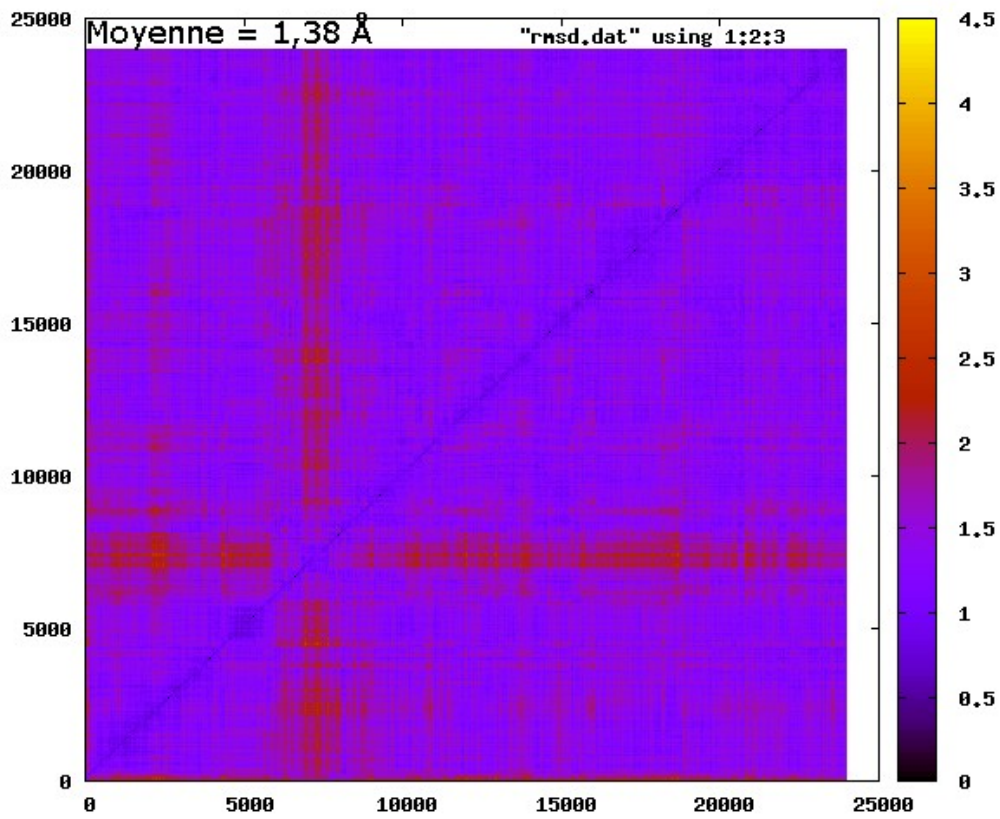
Annexe B 12 : H_GOF réplique III



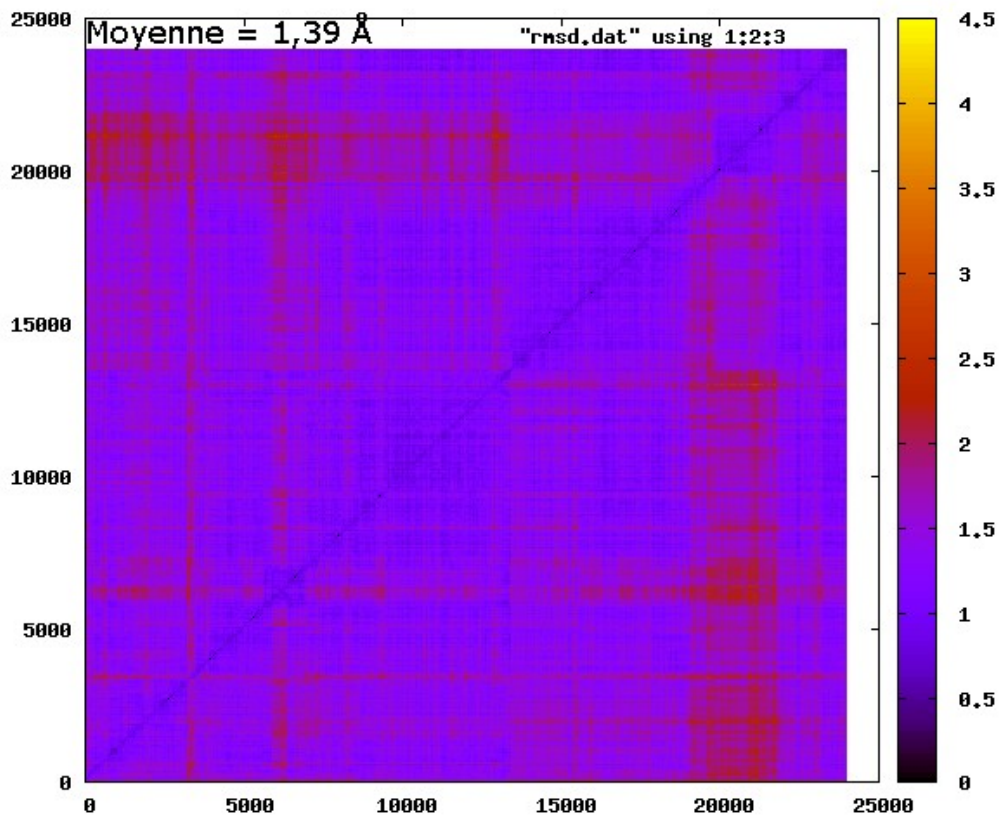
Annexe B 13 : H_LIP réplique I



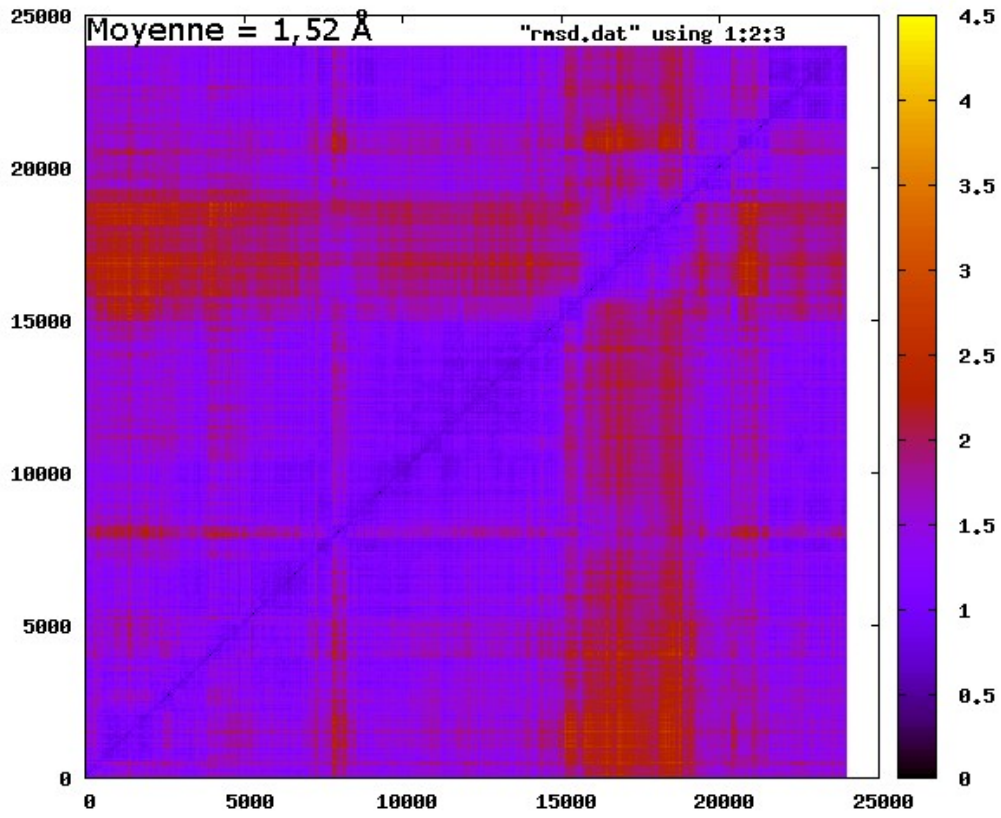
Annexe B 14 : H_LIP réplique II



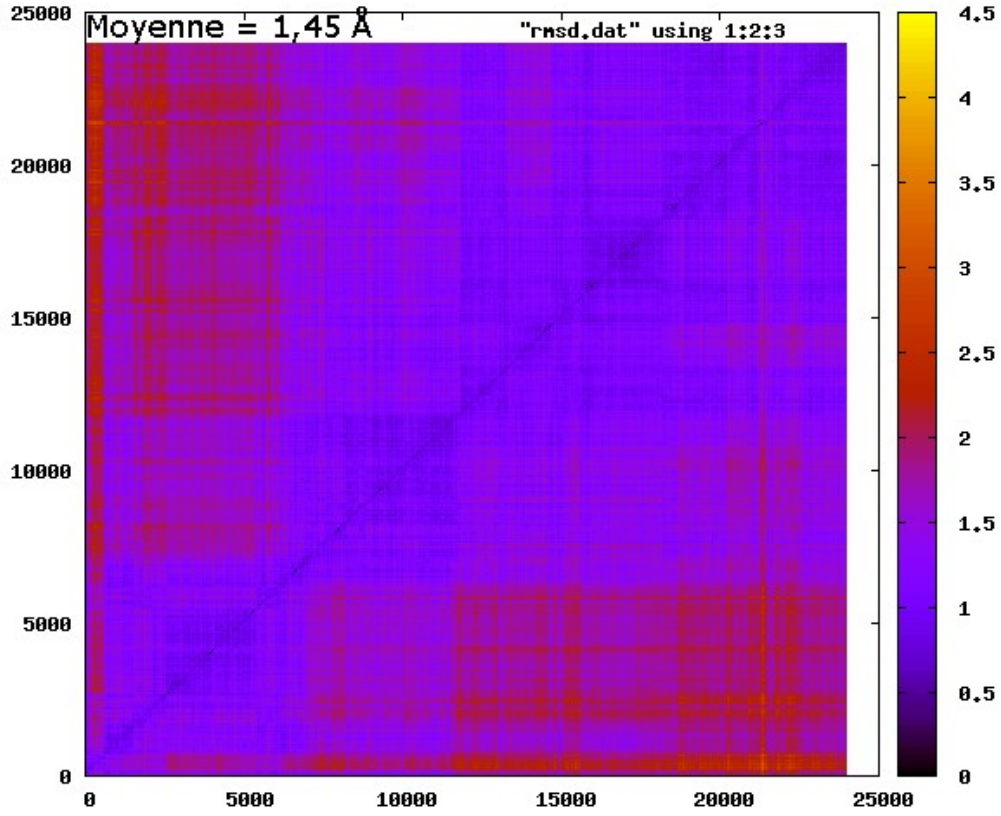
Annexe B 15 : H_LIP réplique III



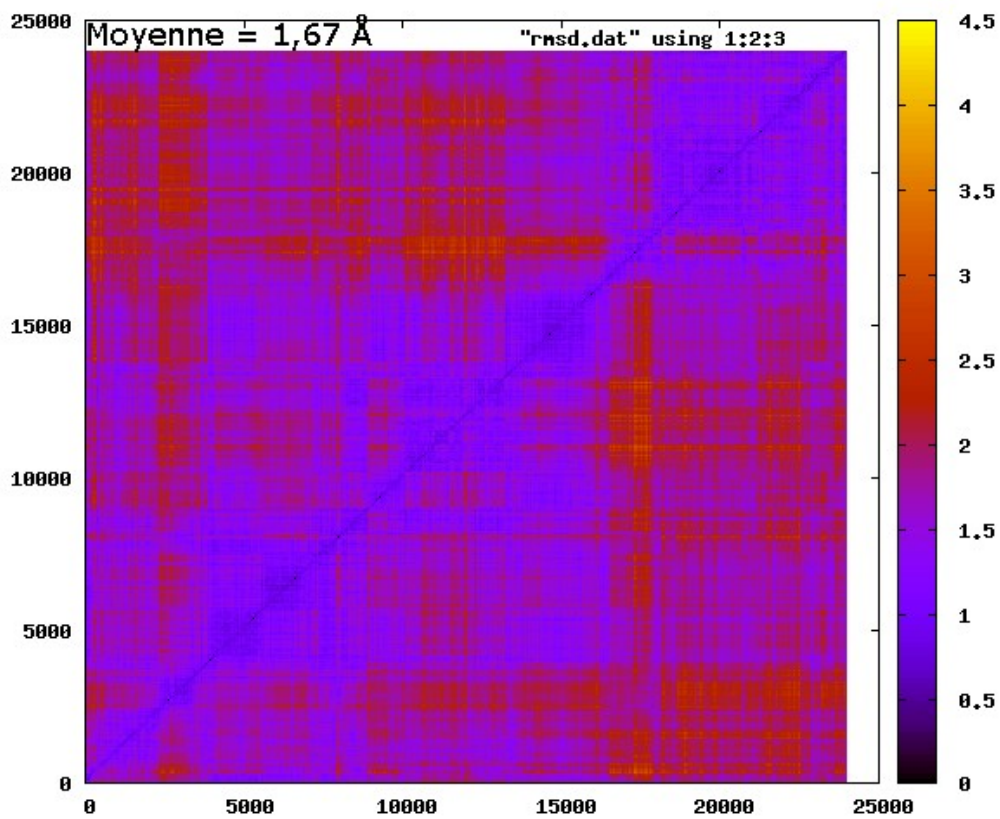
Annexe B 16 : H_NUaGAL réplique I



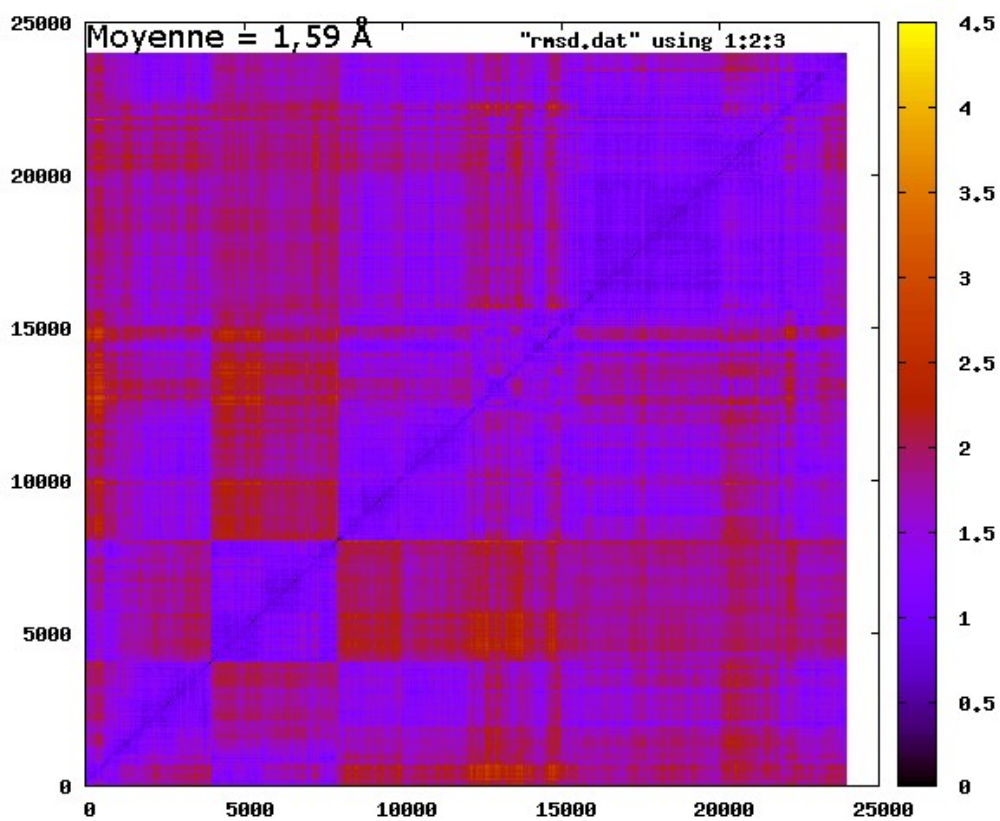
Annexe B 17 : H_NUaGAL réplique II



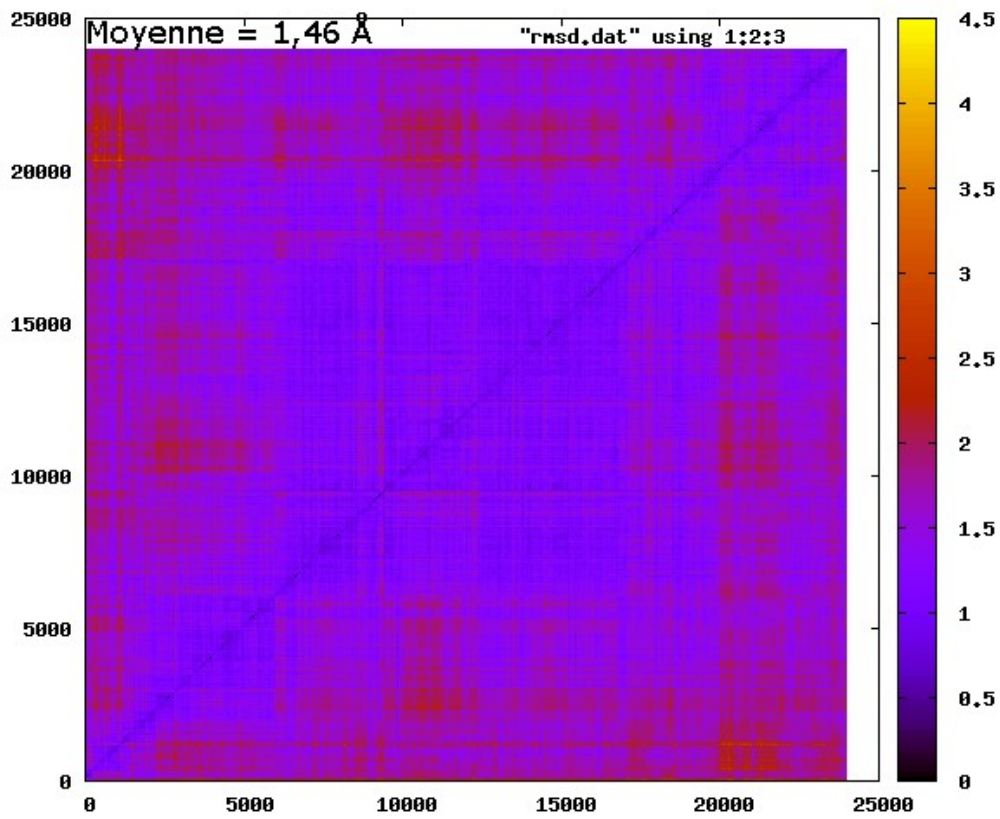
Annexe B 18 : H_NUaGAL réplique III



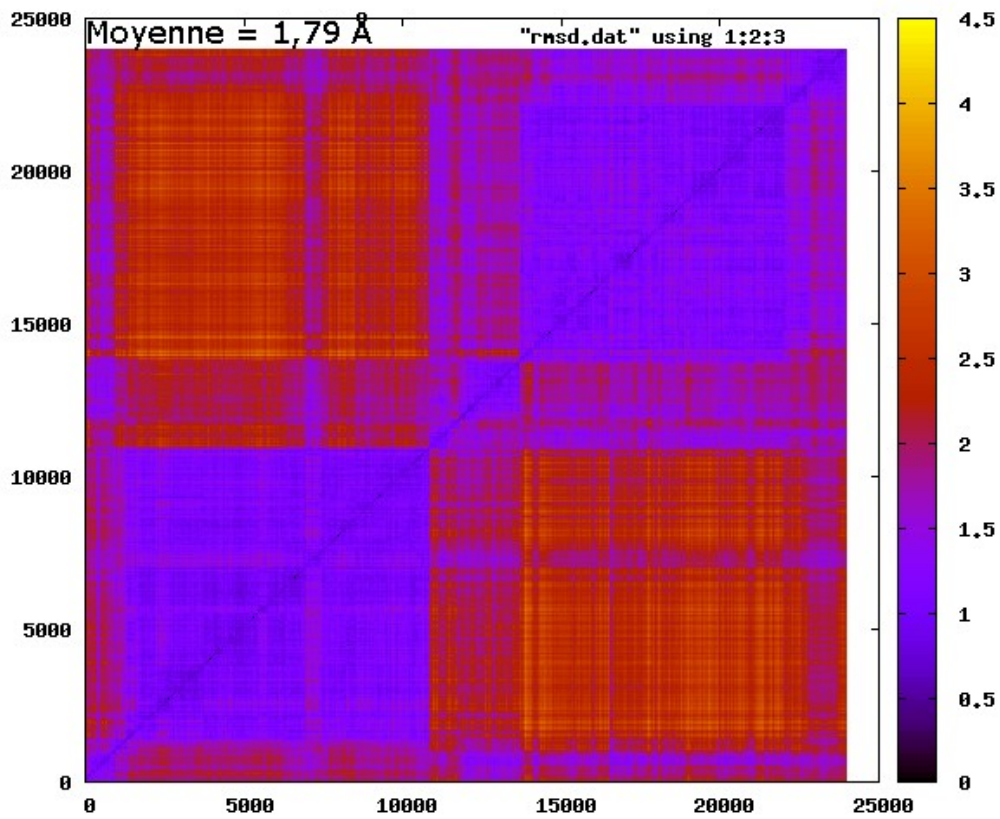
Annexe B 19 : H_OCH réplique I



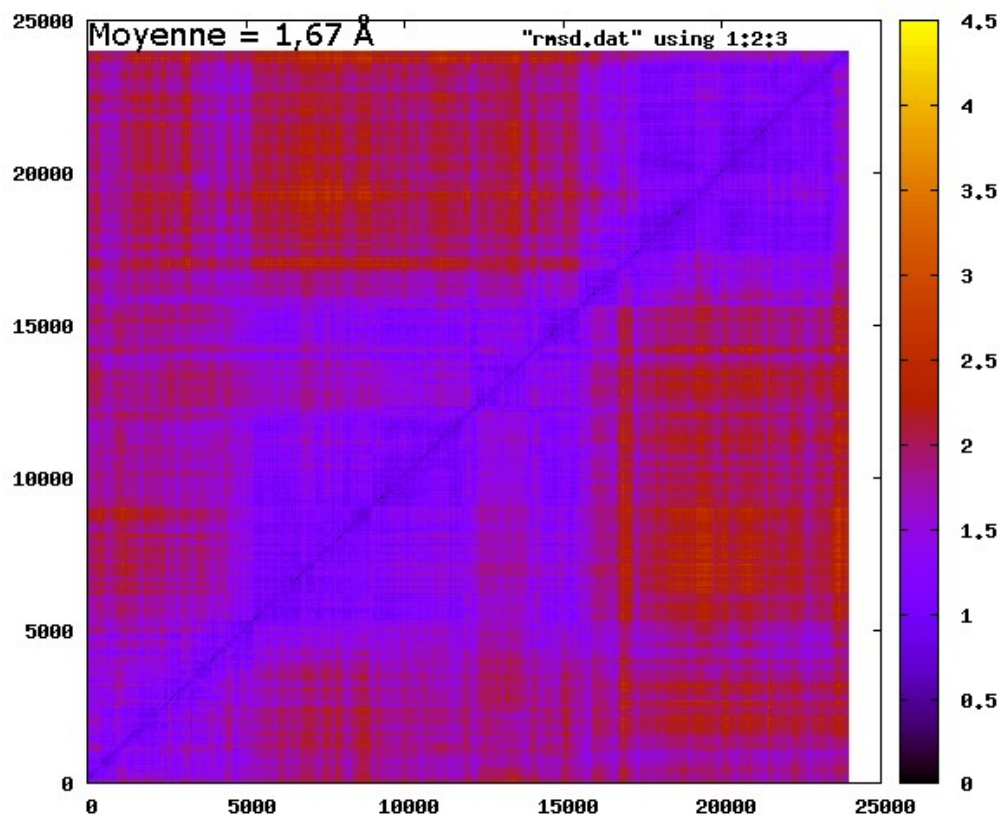
Annexe B 20 : H_OCH réplique II



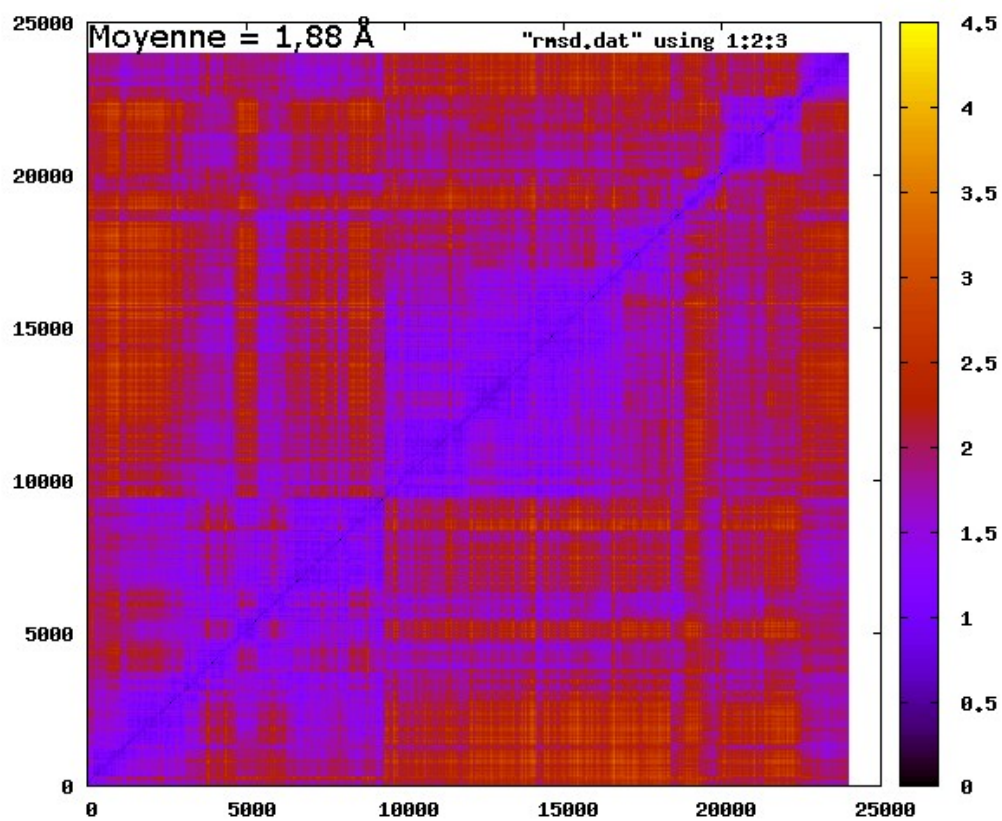
Annexe B 21 : H_OCH réplique III



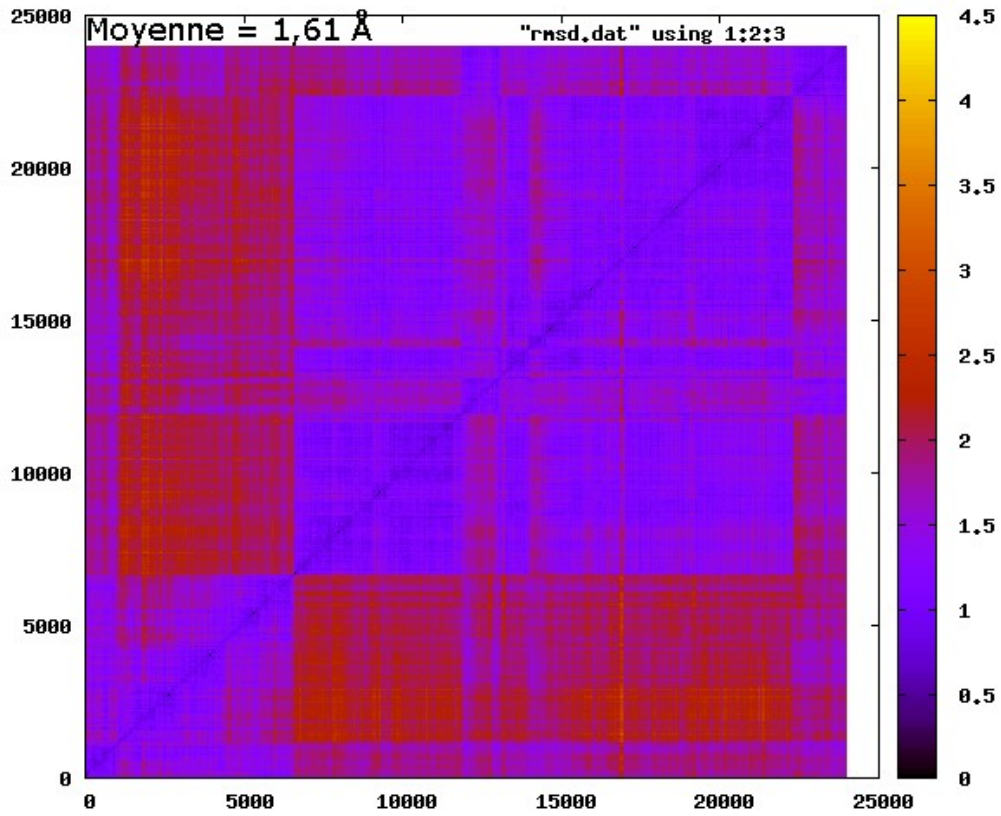
Annexe B 22 : H_OCH9 réplique I



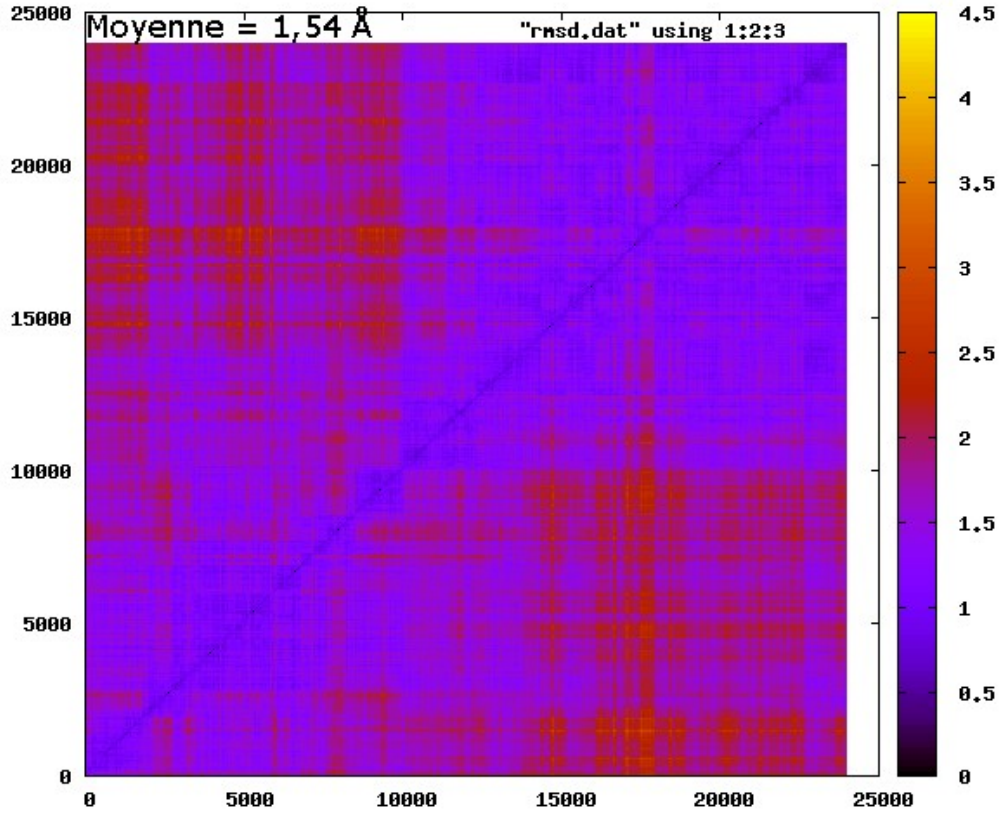
Annexe B 23 : H_OCH9 réplique II



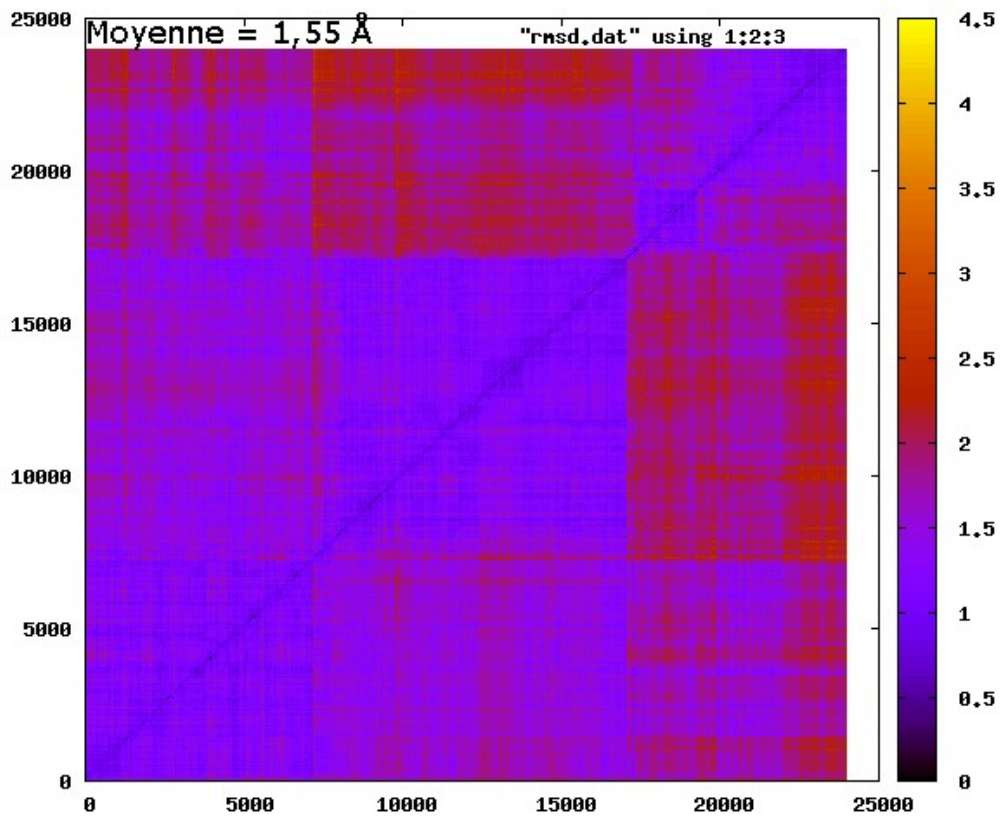
Annexe B 24 : H_OCH9 réplique III



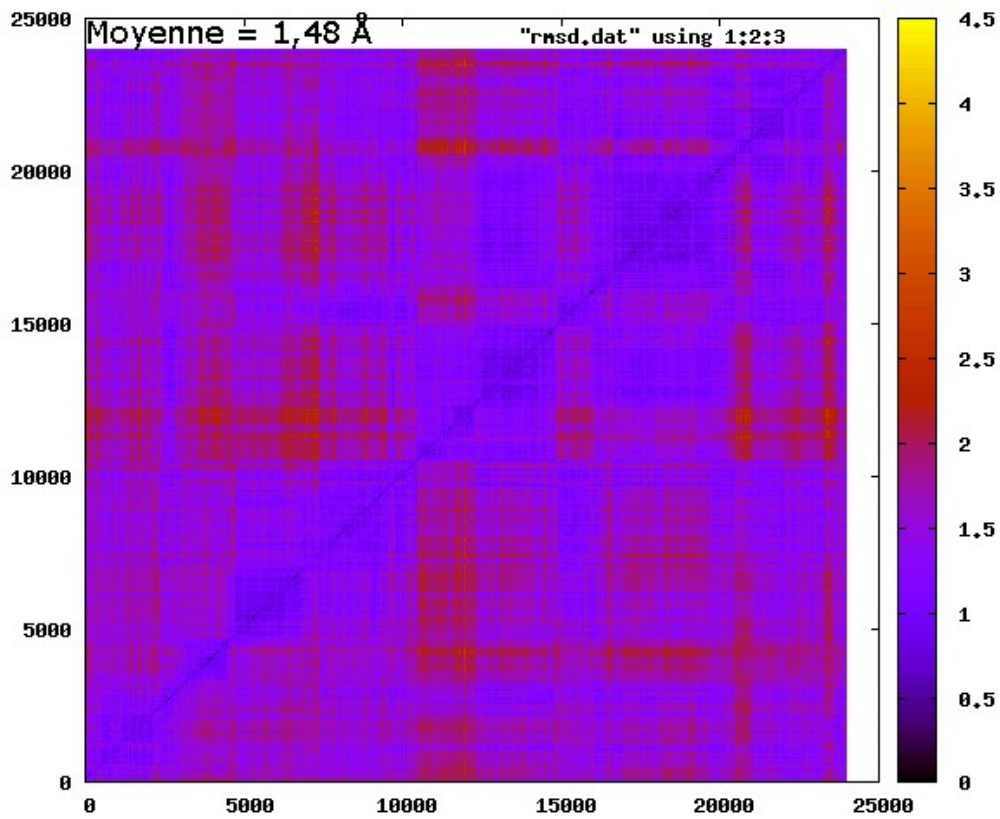
Annexe B 25 : H_SaGAL réplique I



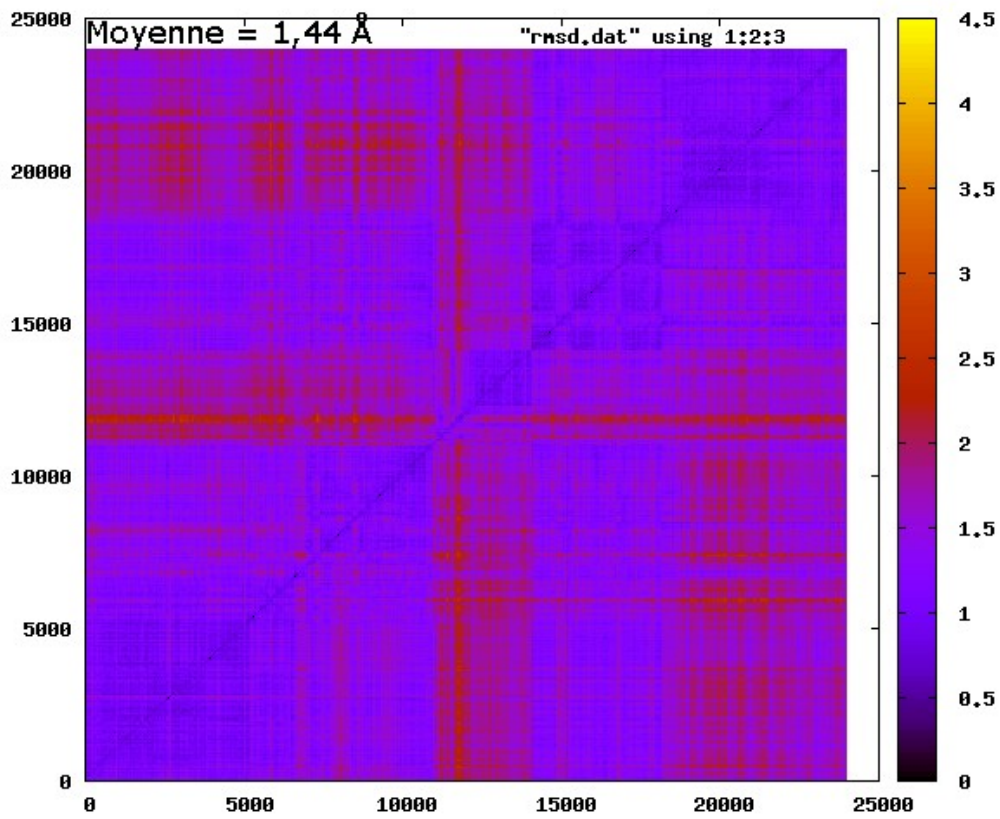
Annexe B 26 : H_SaGAL réplique II



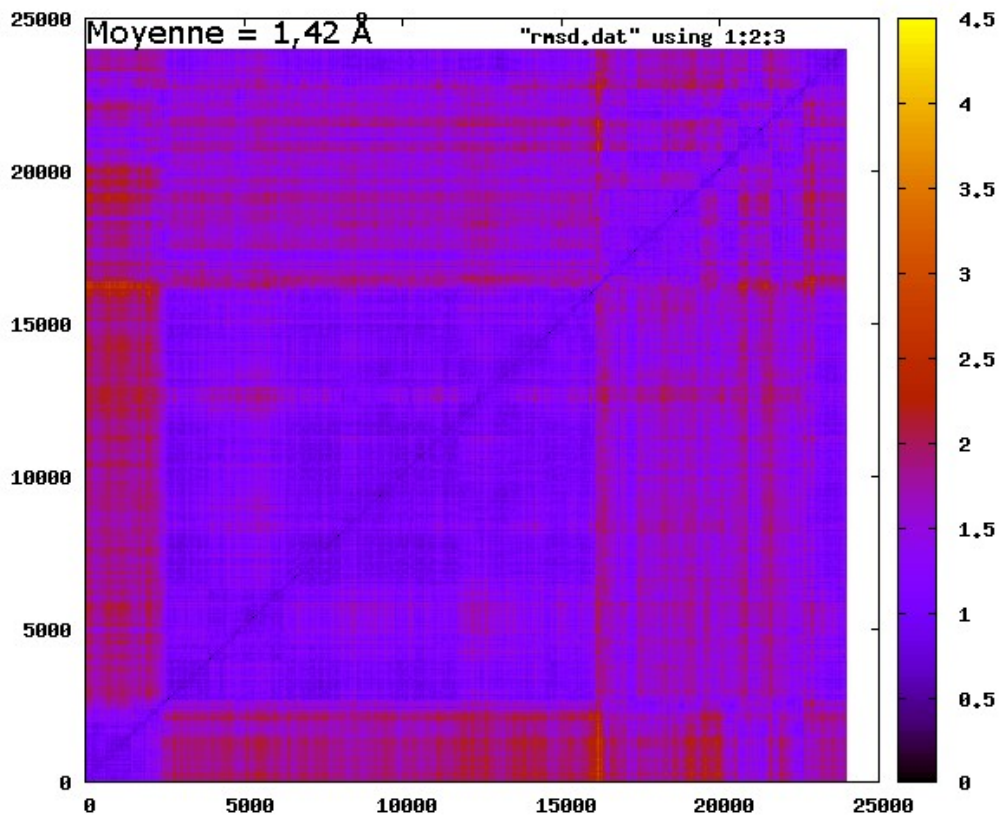
Annexe B 27 : H_SaGAL réplique III



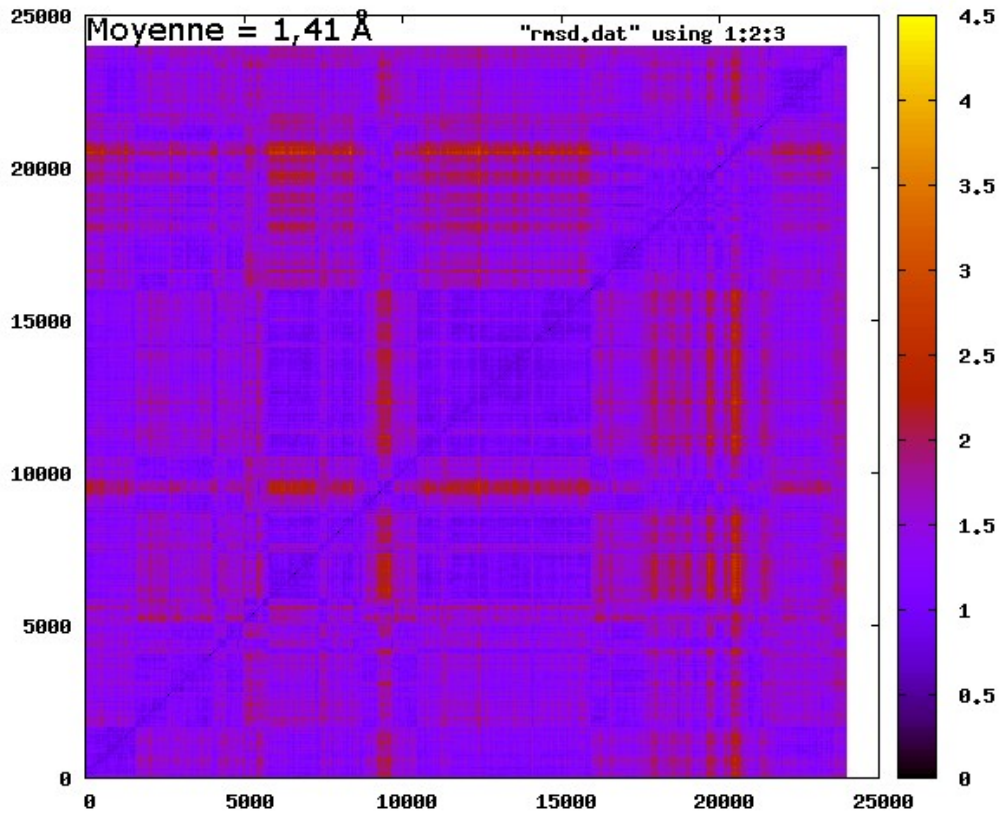
Annexe B 28 : M_7DW réplique I



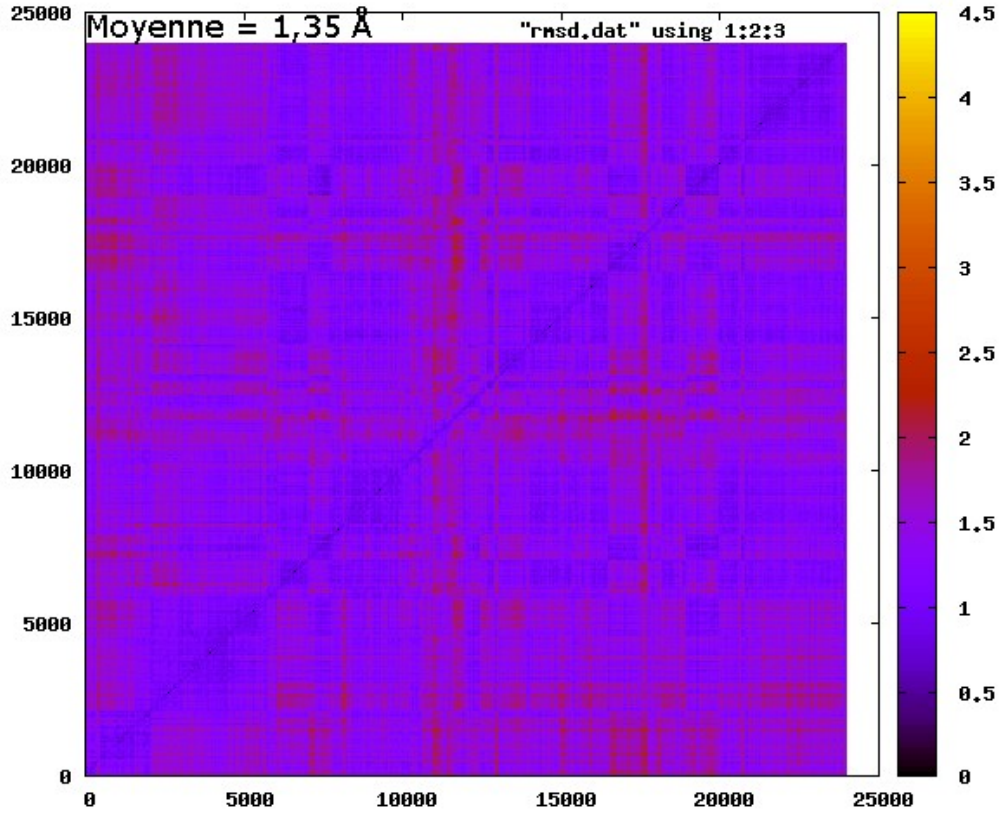
Annexe B 29 : M_7DW réplique II



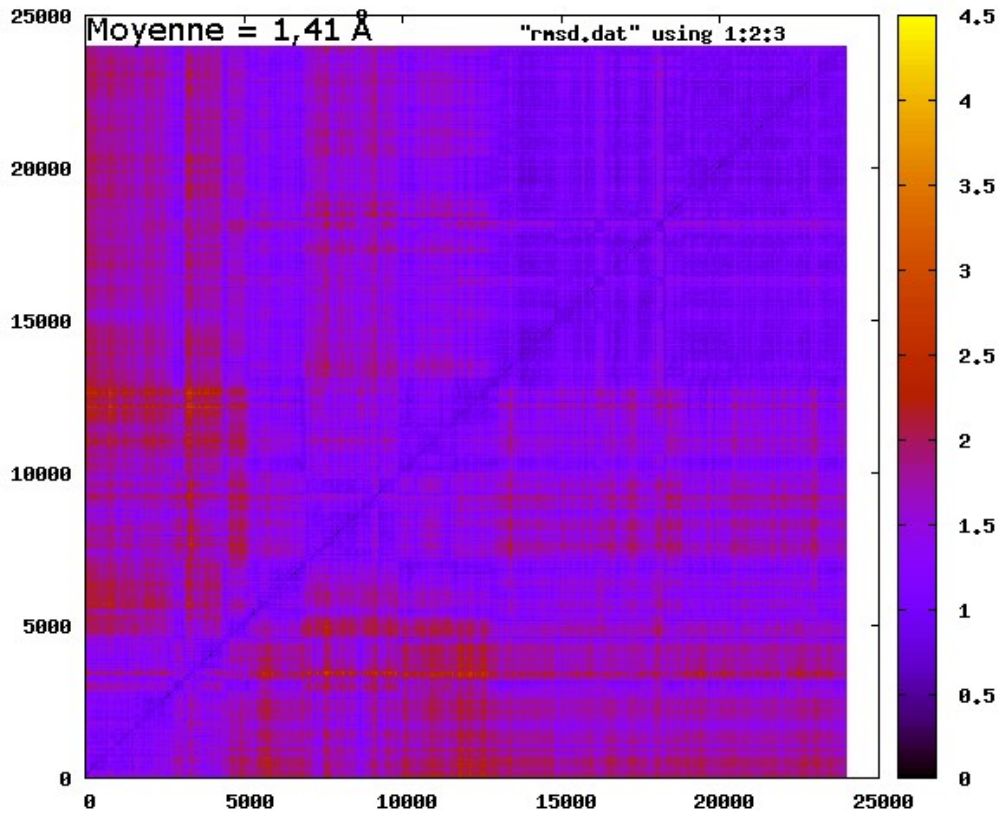
Annexe B 30 : M_7DW réplique III



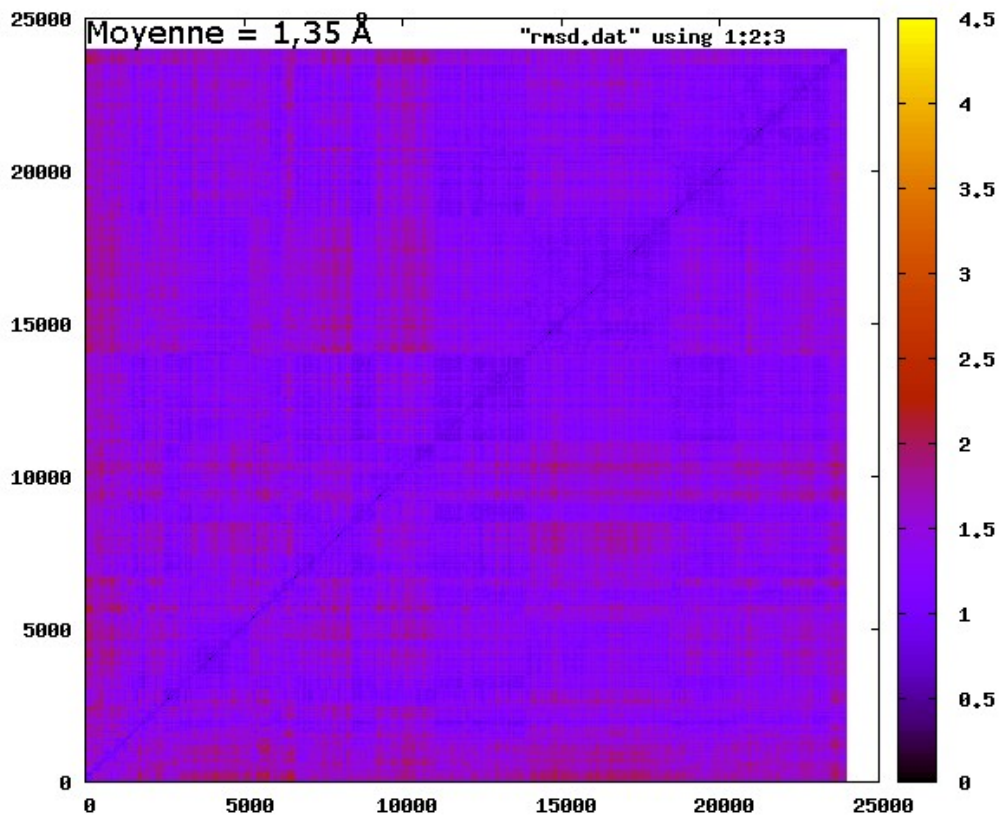
Annexe B 31 : M_aGAL réplique I



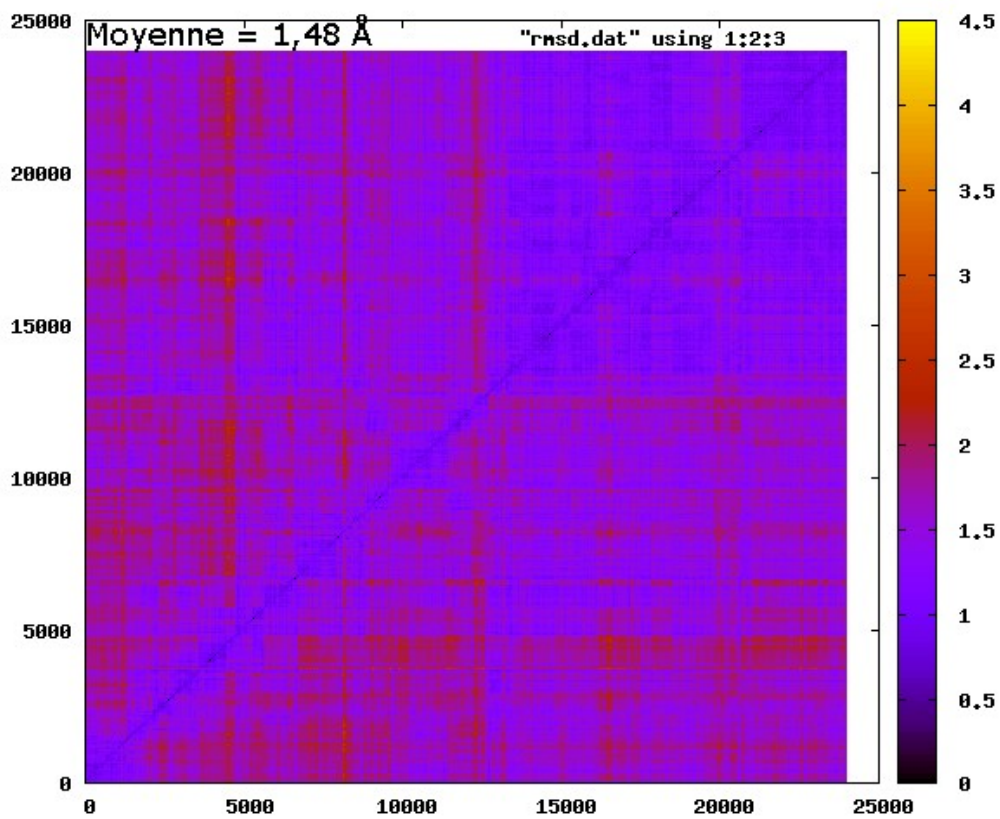
Annexe B 32 : M_aGAL réplique II



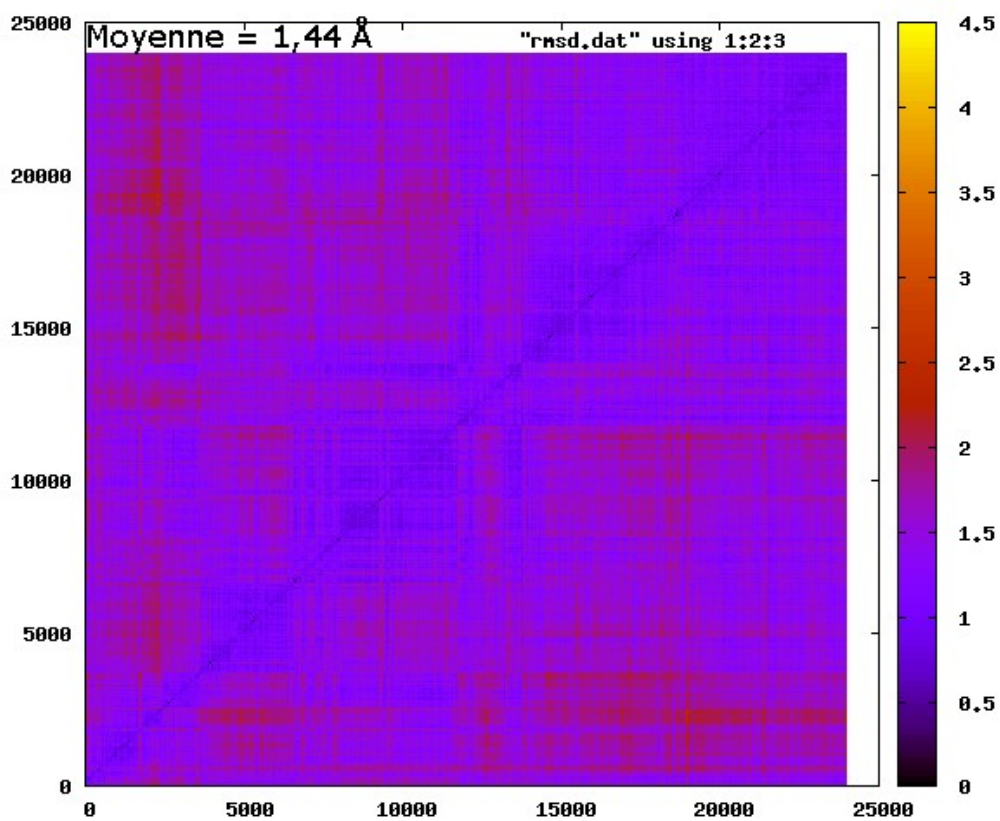
Annexe B 33 : M_aGAL réplique III



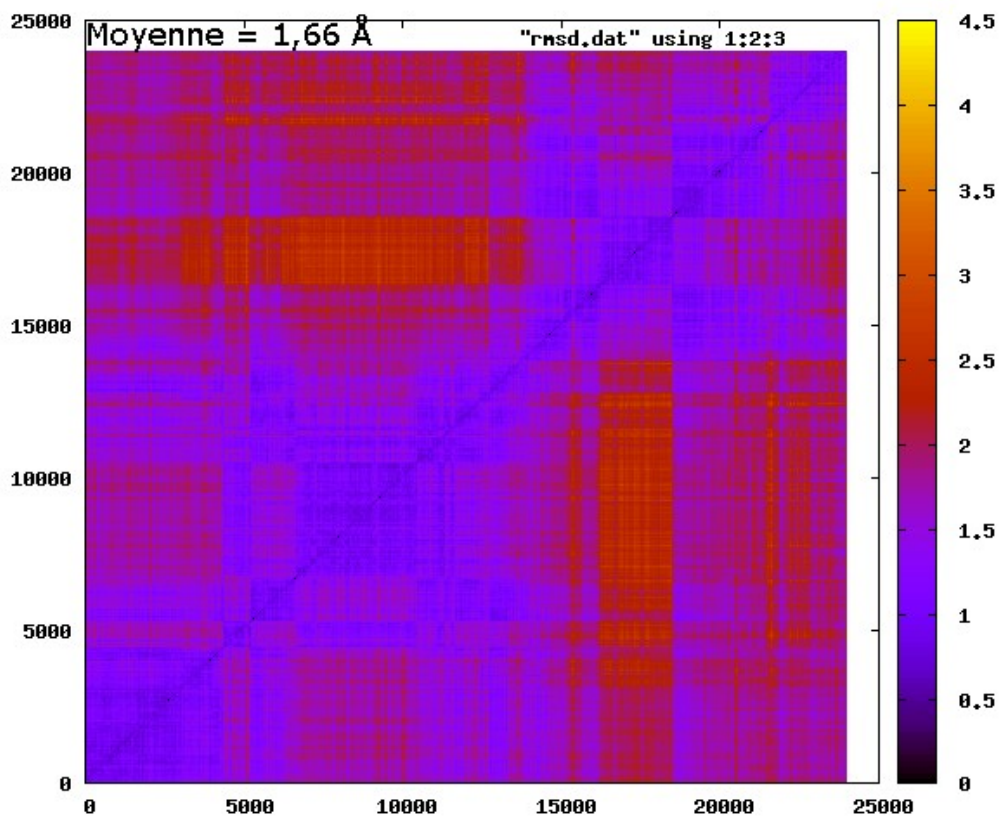
Annexe B 34 : M_AZOL réplique I



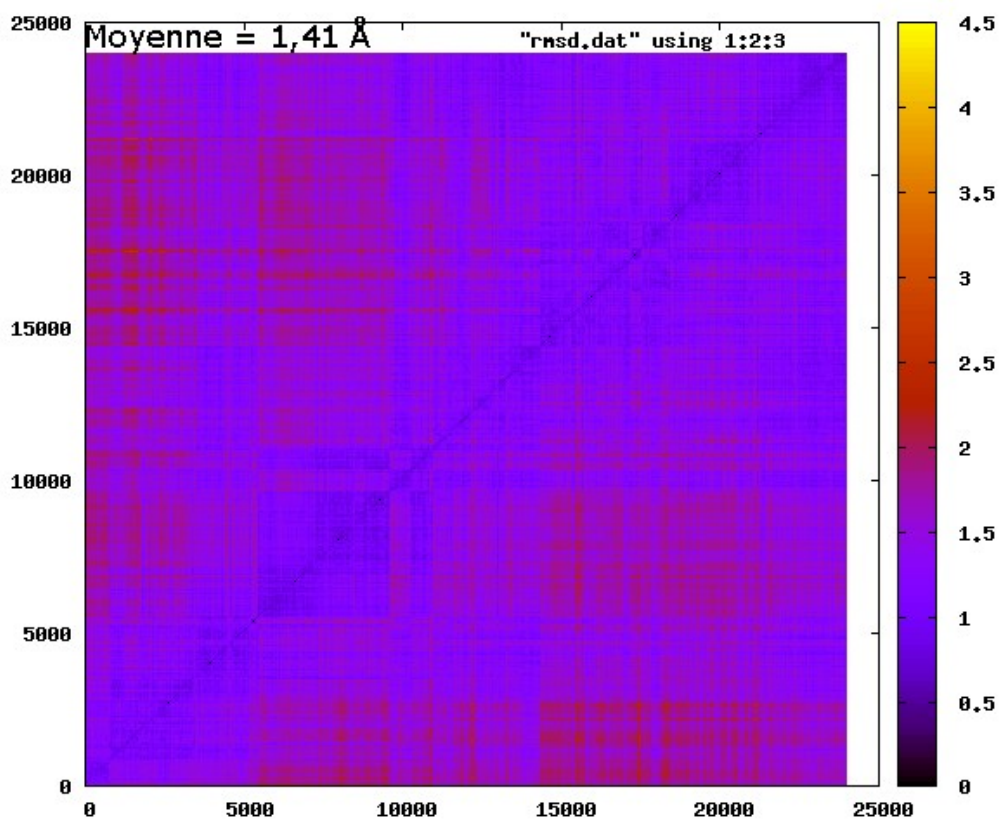
Annexe B 35 : M_AZOL réplique II



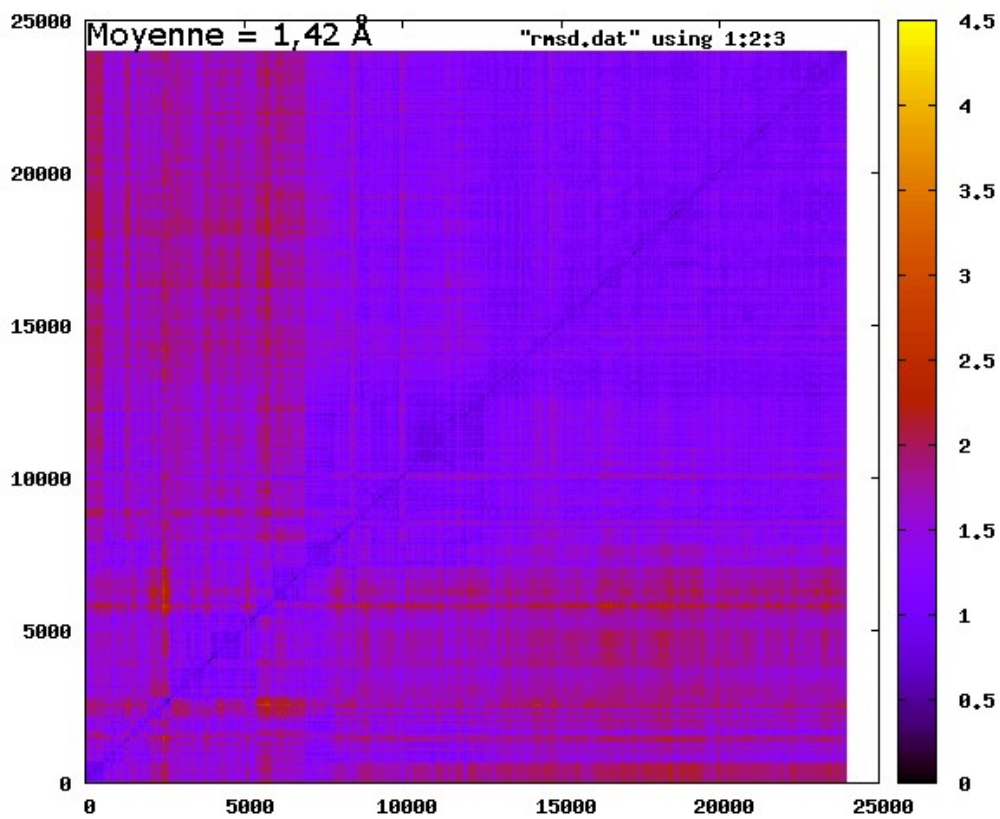
Annexe B 36 : M_AZOL réplique III



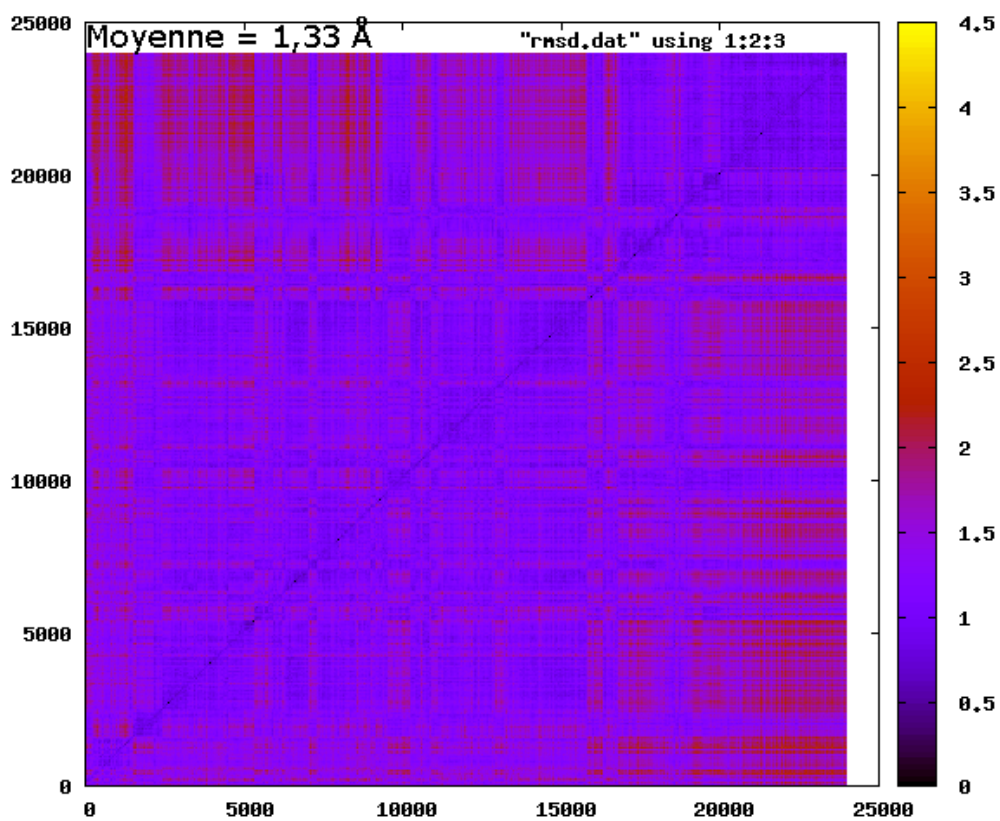
Annexe B 37 : M_GOF réplique I



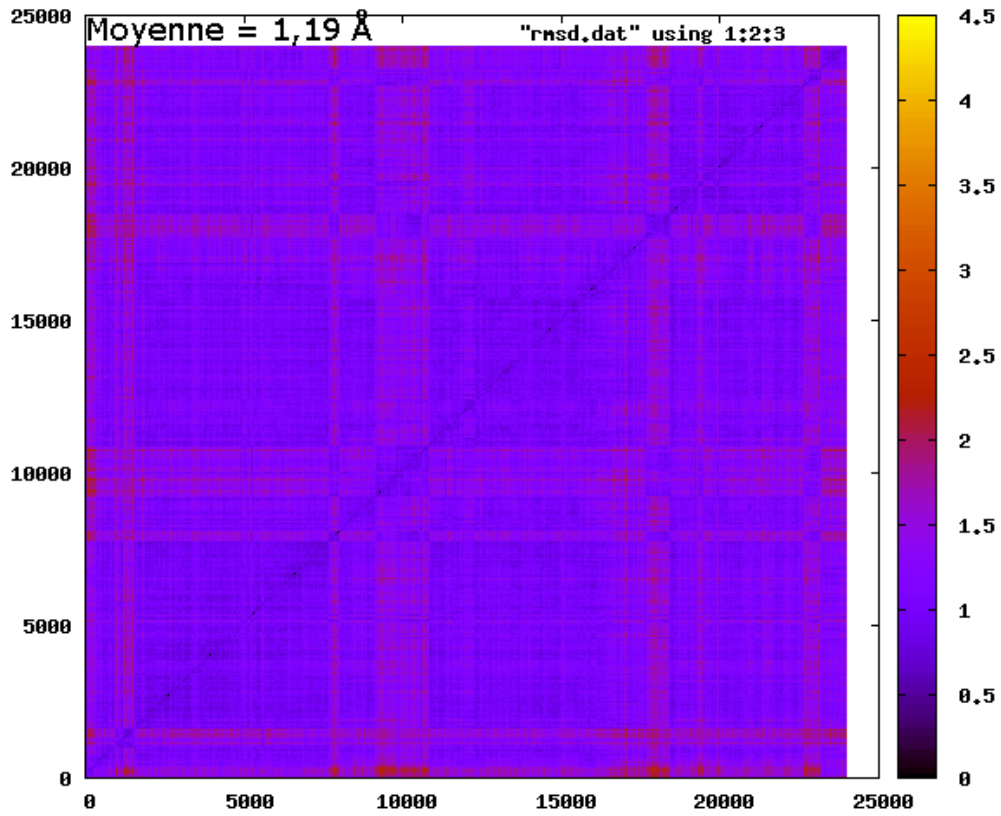
Annexe B 38 : M_GOF réplique II



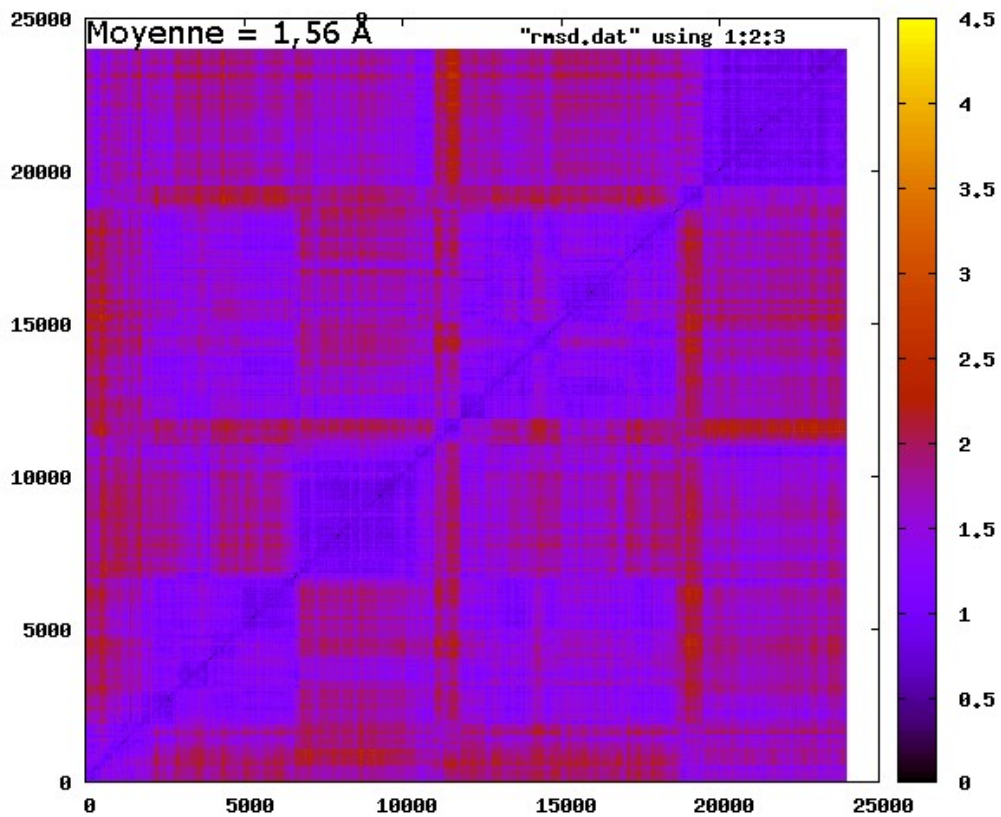
Annexe B 39 : M_GOF réplique III



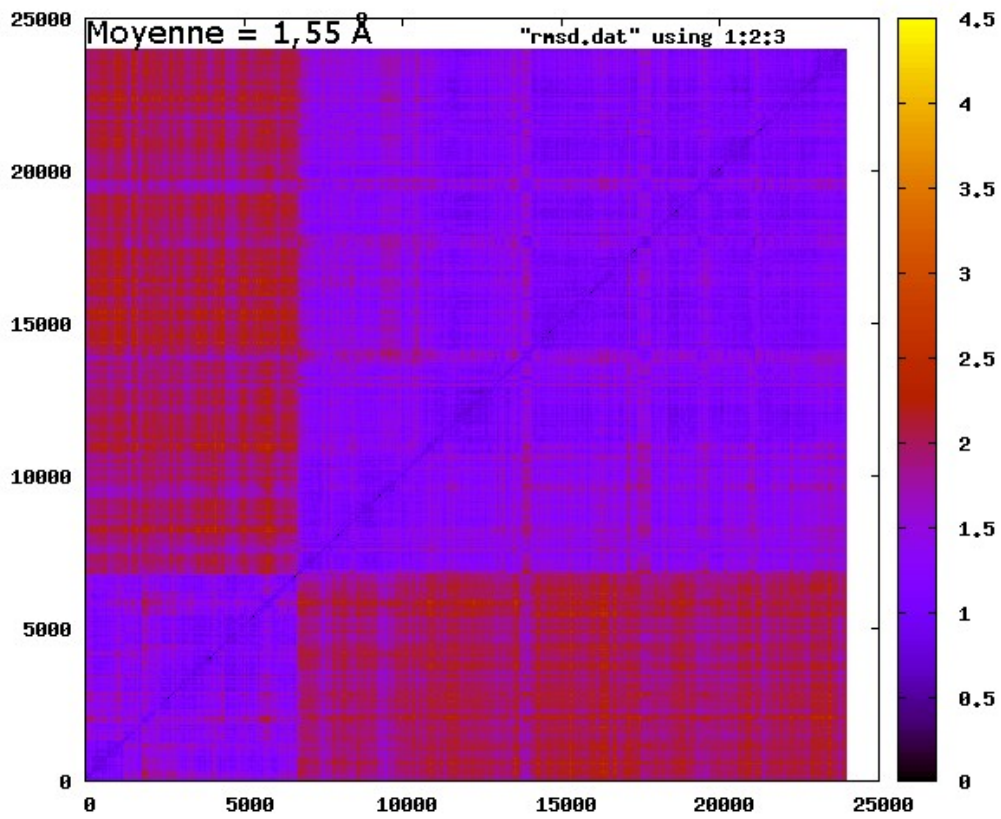
Annexe B 40 : M_NUaGAL réplique I



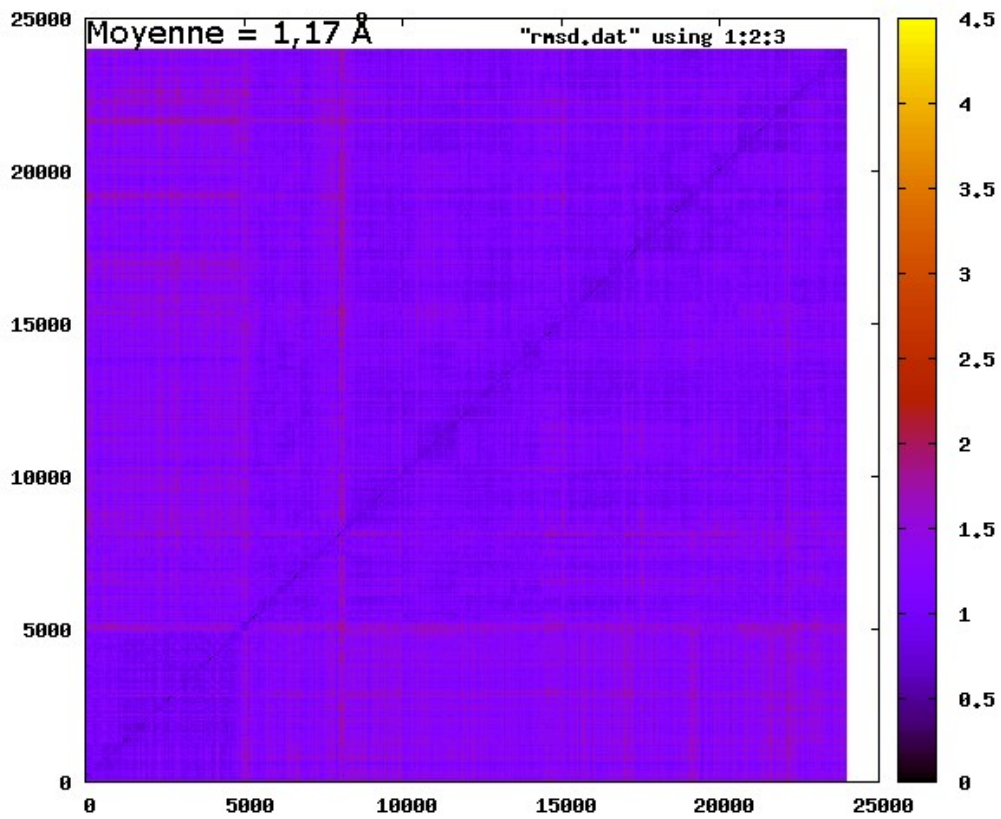
Annexe B 41 : M_NUaGAL réplique II



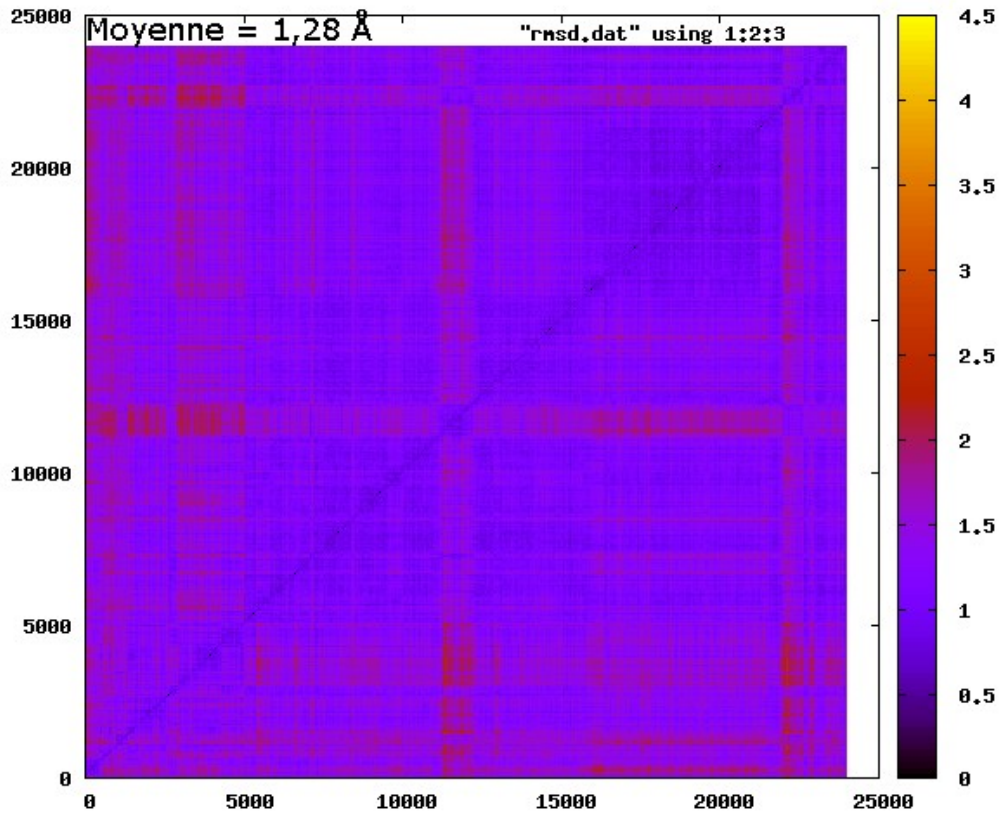
Annexe B 42 : M_NUaGAL réplique III



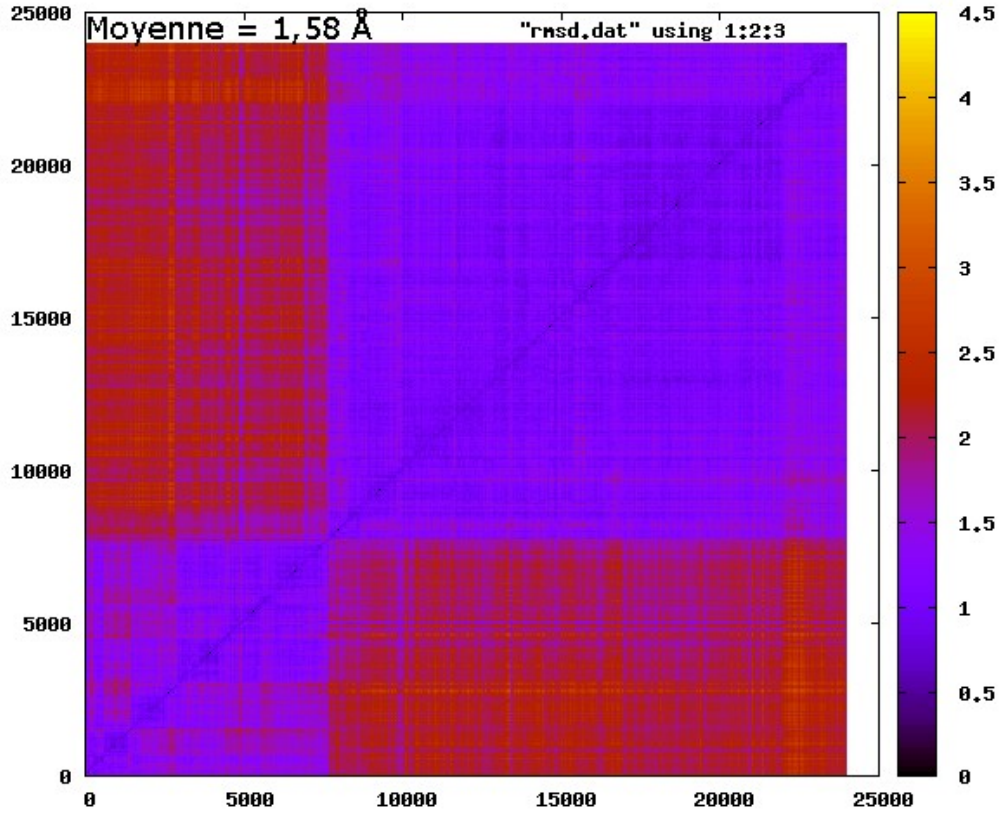
Annexe B 43 : M_OCH réplique I



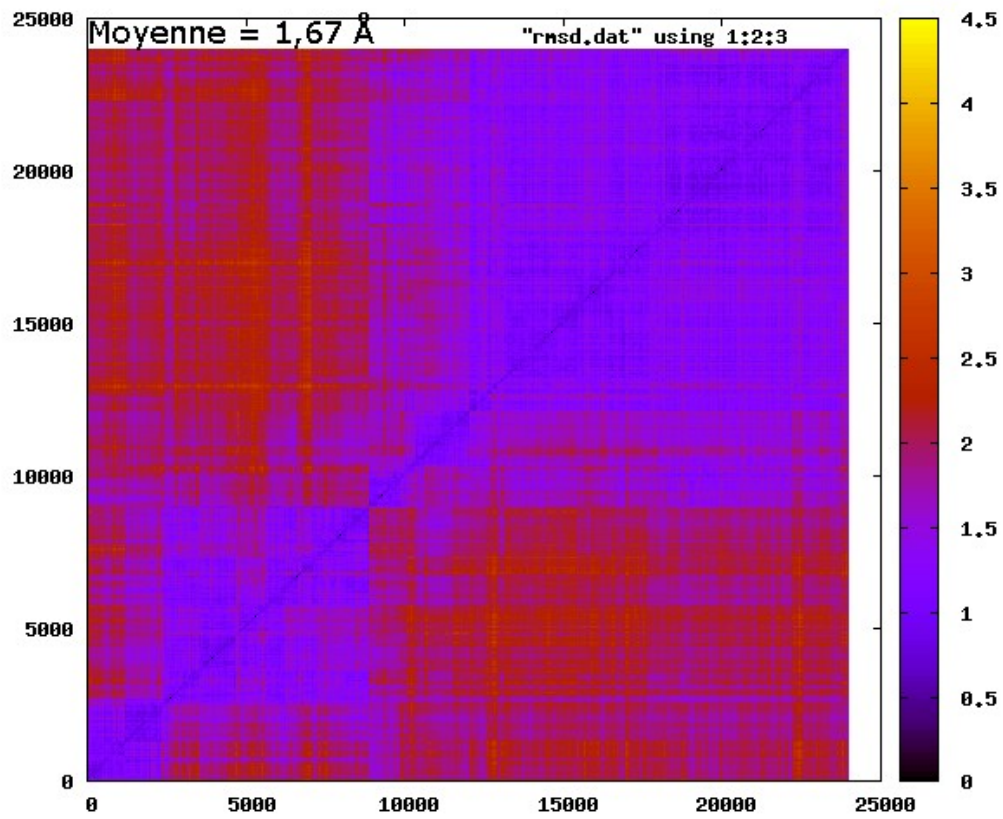
Annexe B 44 : M_OCH réplique II



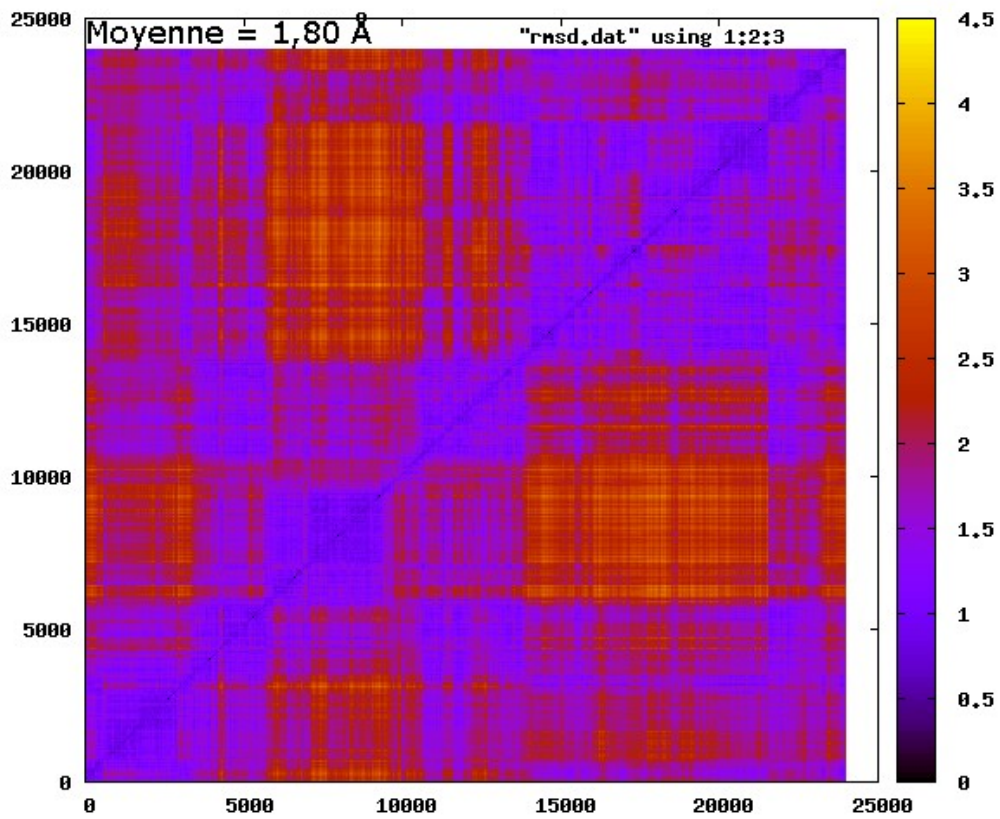
Annexe B 45 : M_OCH réplique III



Annexe B 46 : M_SaGal réplique I



Annexe B 47 : M_SaGal réplique II

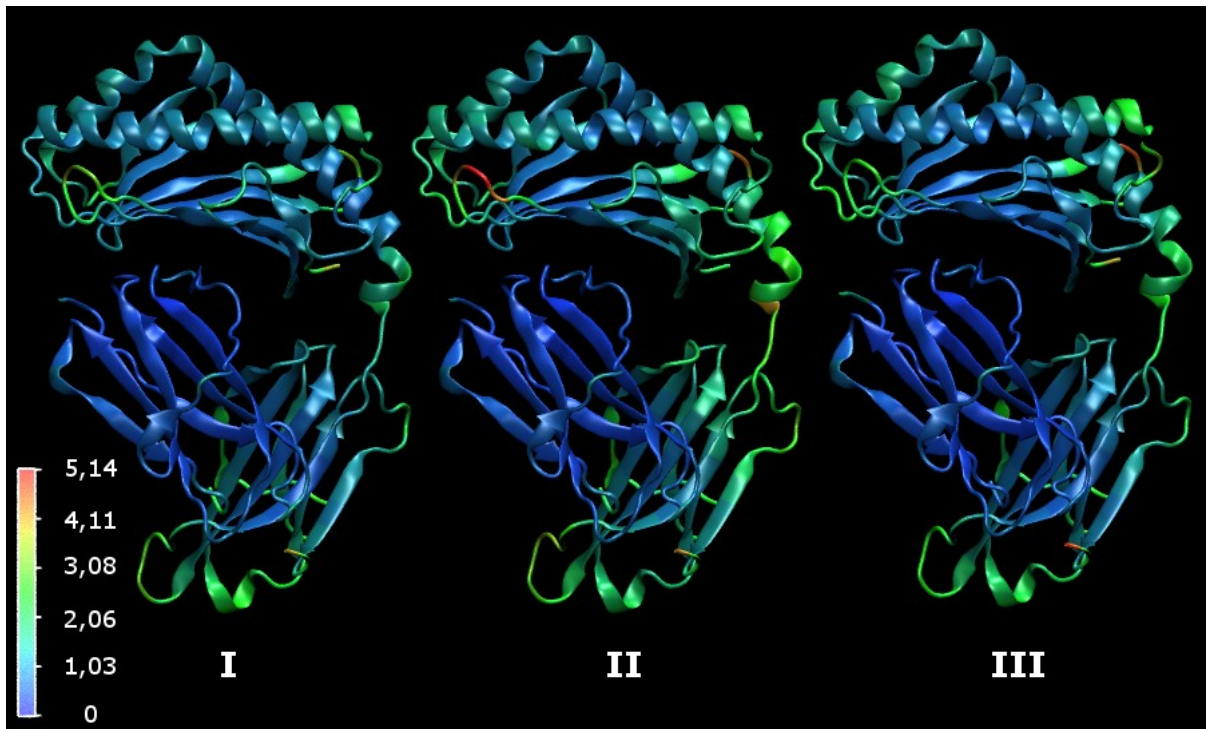


Annexe B 48 : M_SaGal réplique III

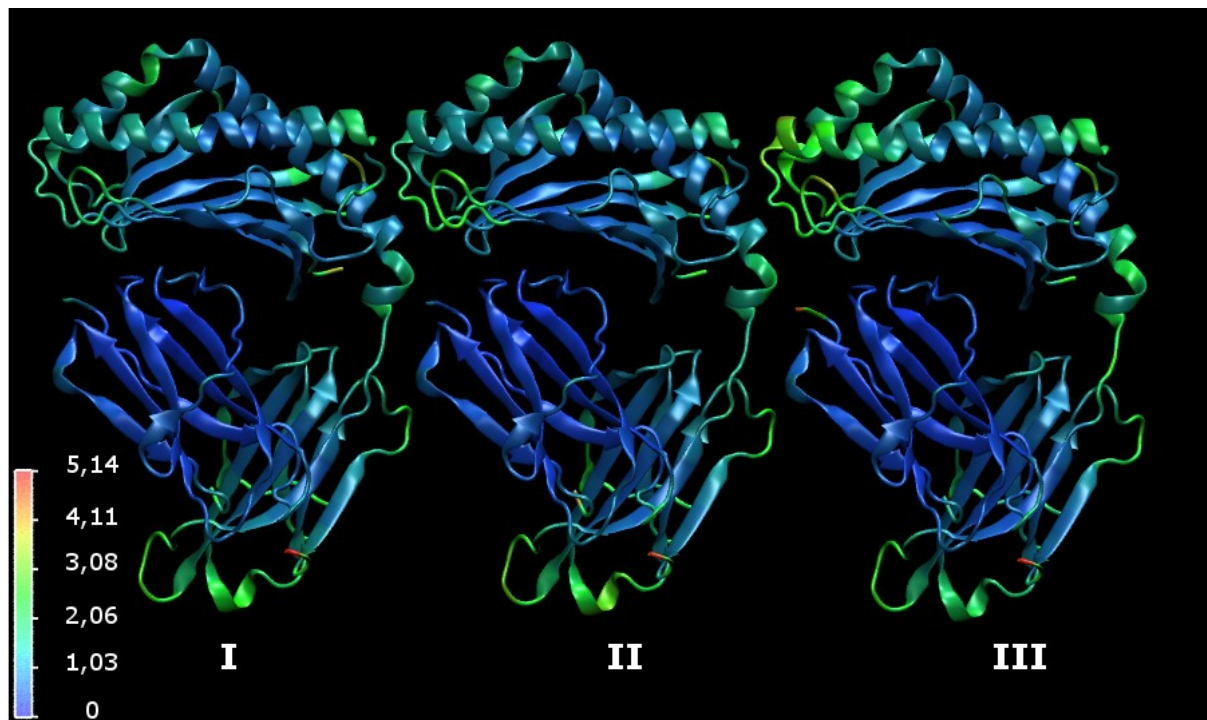
Annexe C – RMSF

Dans tous les graphes, le RMSF est exprimé en unité arbitraire.

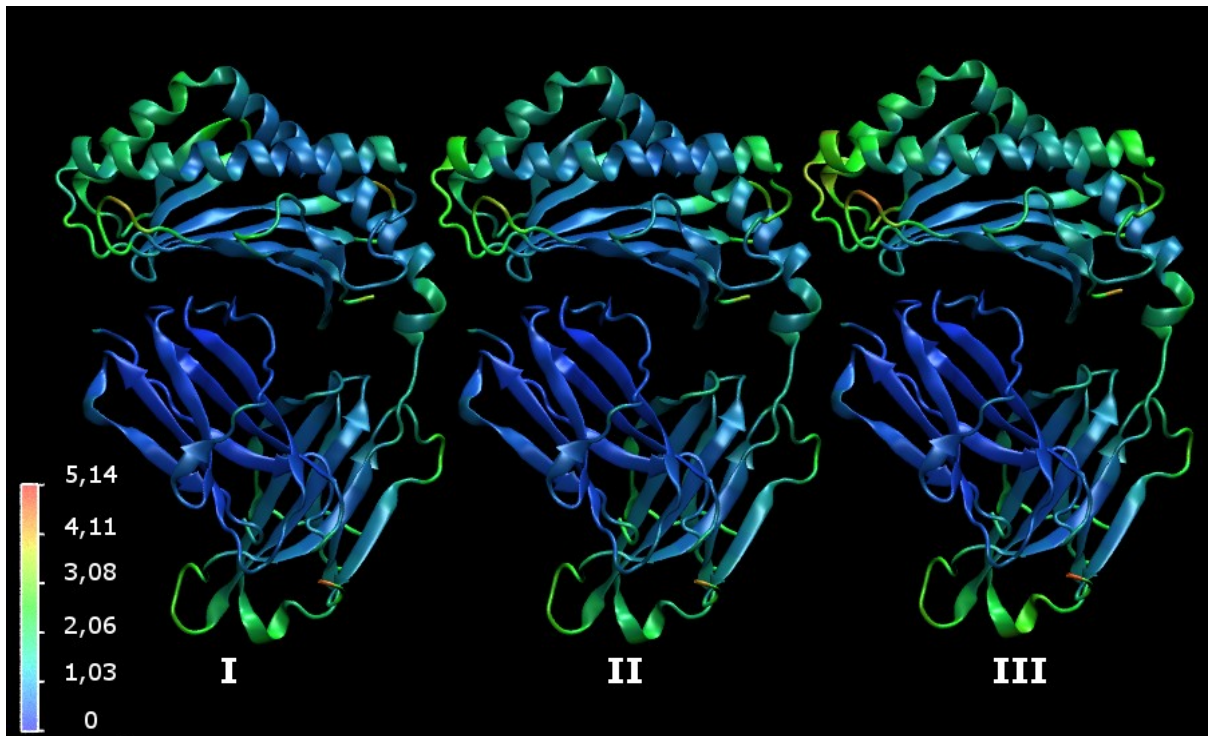
Annexe C 1 : H_7DW	187
Annexe C 2 : H_aGAL	187
Annexe C 3 : H_CD1d	188
Annexe C 4 : H_GOFF	188
Annexe C 5 : H_LIP	189
Annexe C 6 : H_NUaGAL	189
Annexe C 7 : H_OCH	190
Annexe C 8 : H_OCH9	190
Annexe C 9 : H_SaGAL	191
Annexe C 10 : M_7DW	191
Annexe C 11 : M_aGAL	192
Annexe C 12 : M_AZOL	192
Annexe C 13 : M_GOF	193
Annexe C 14 : M_NUaGAL	193
Annexe C 15 : M_OCH	194
Annexe C 16 : M_SaGAL	194



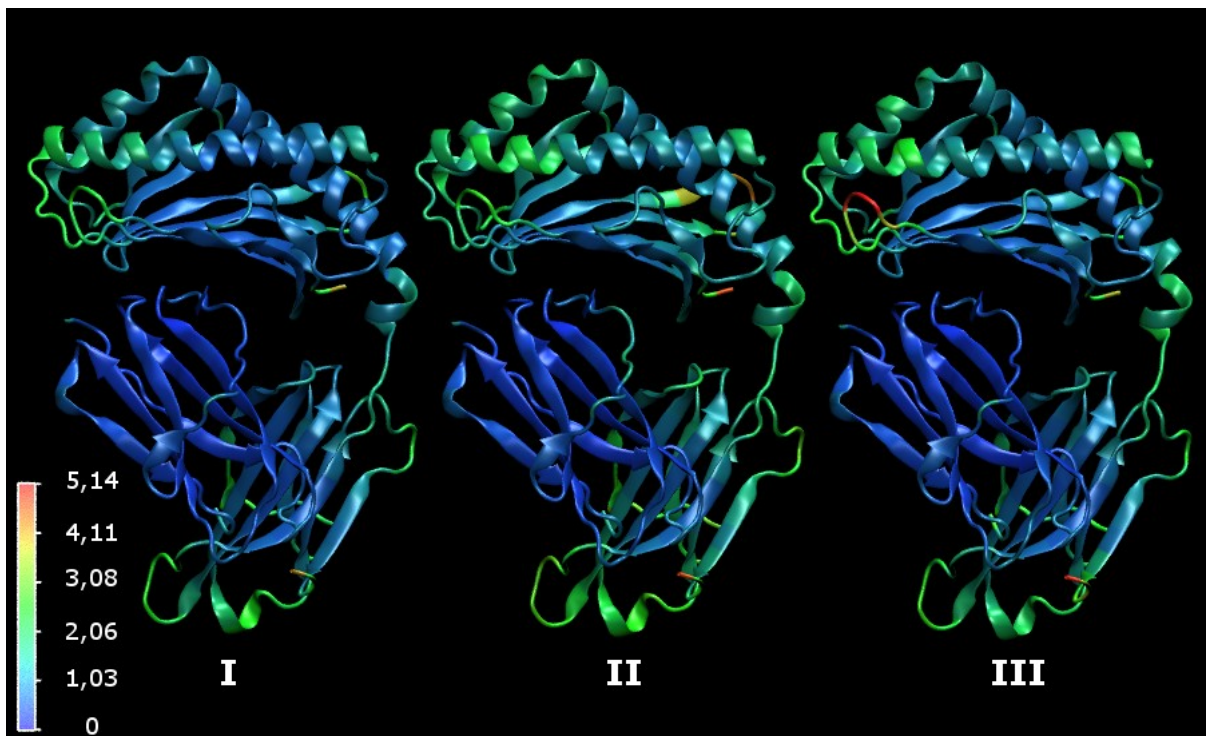
Annexe C 1 : H_{7DW}



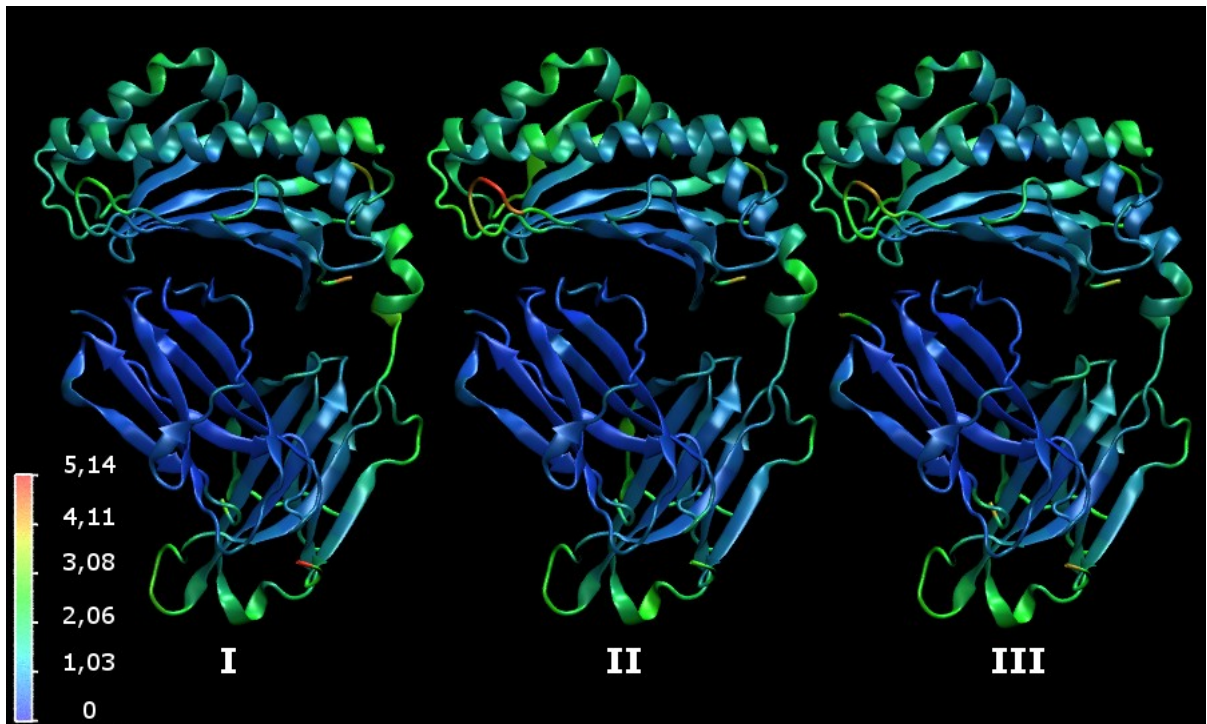
Annexe C 2 : H_{aGAL}



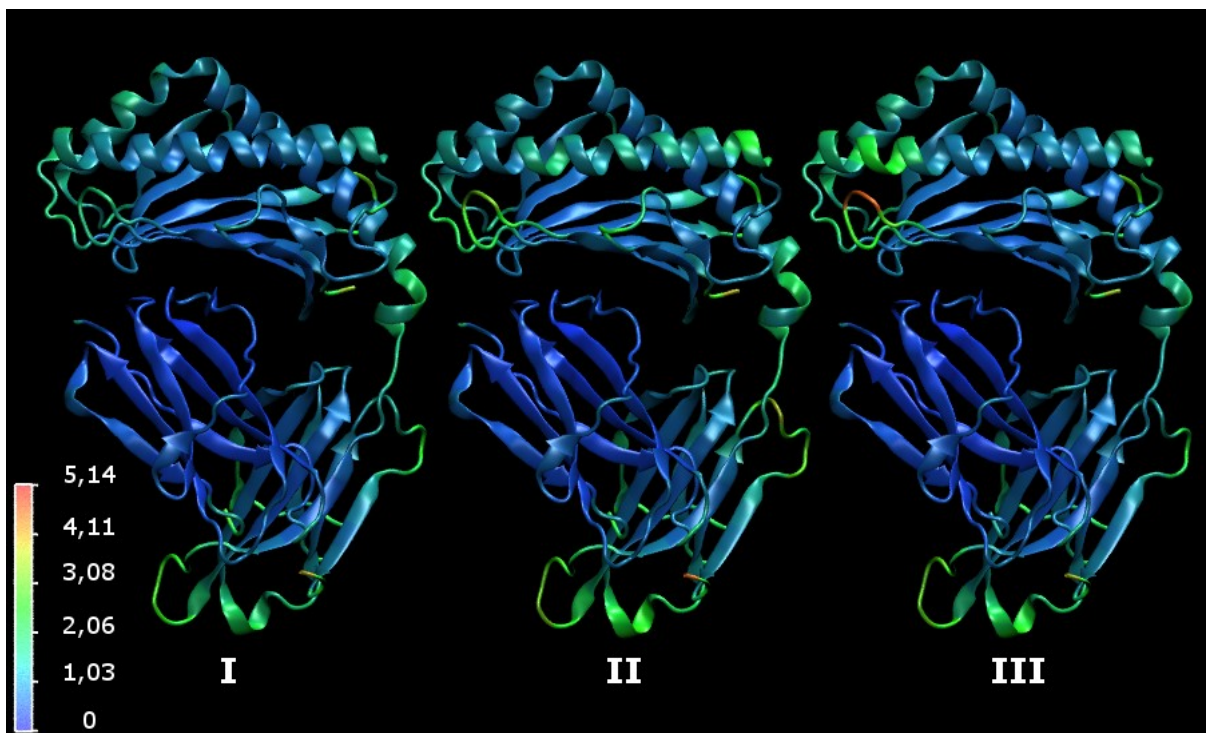
Annexe C 3 : H_CD1d



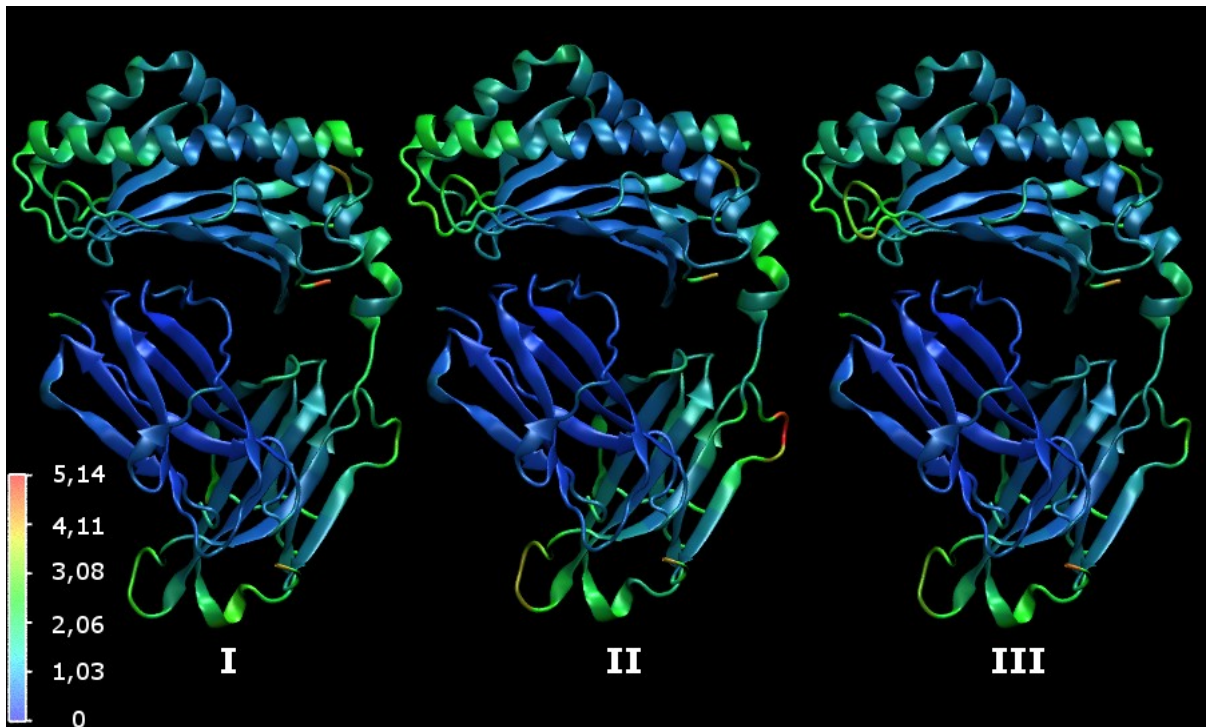
Annexe C 4 : H_GOFF



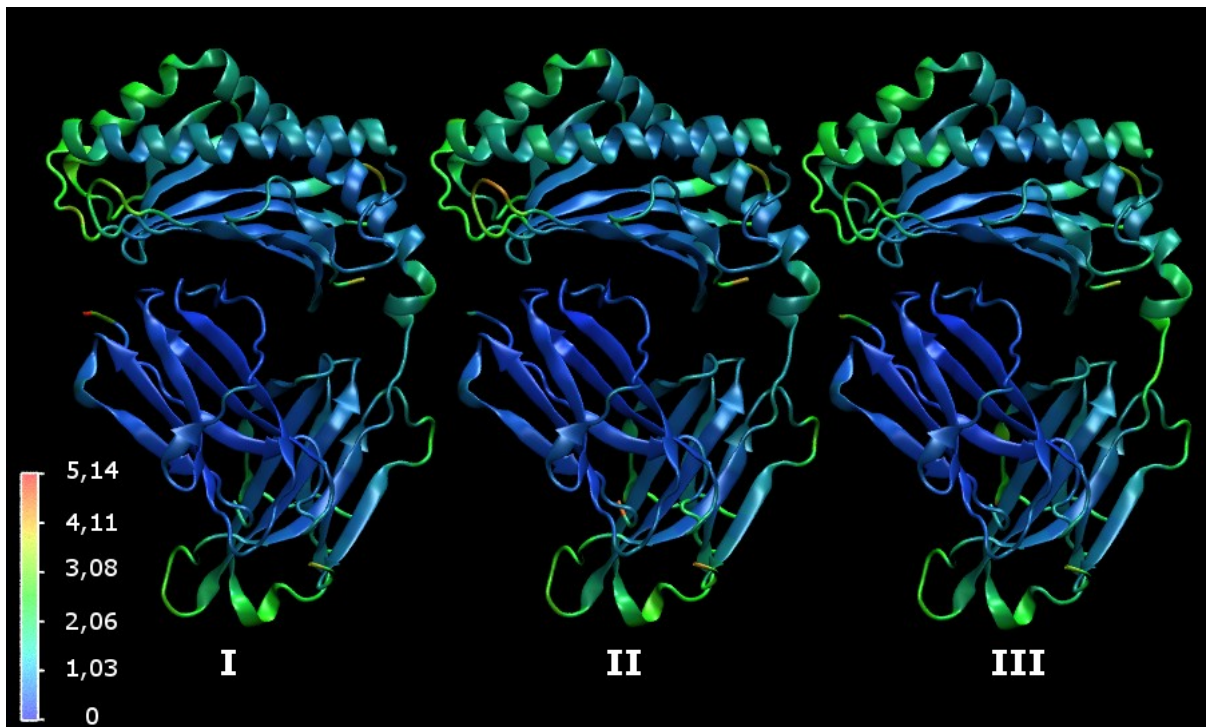
Annexe C 5 : H_LIP



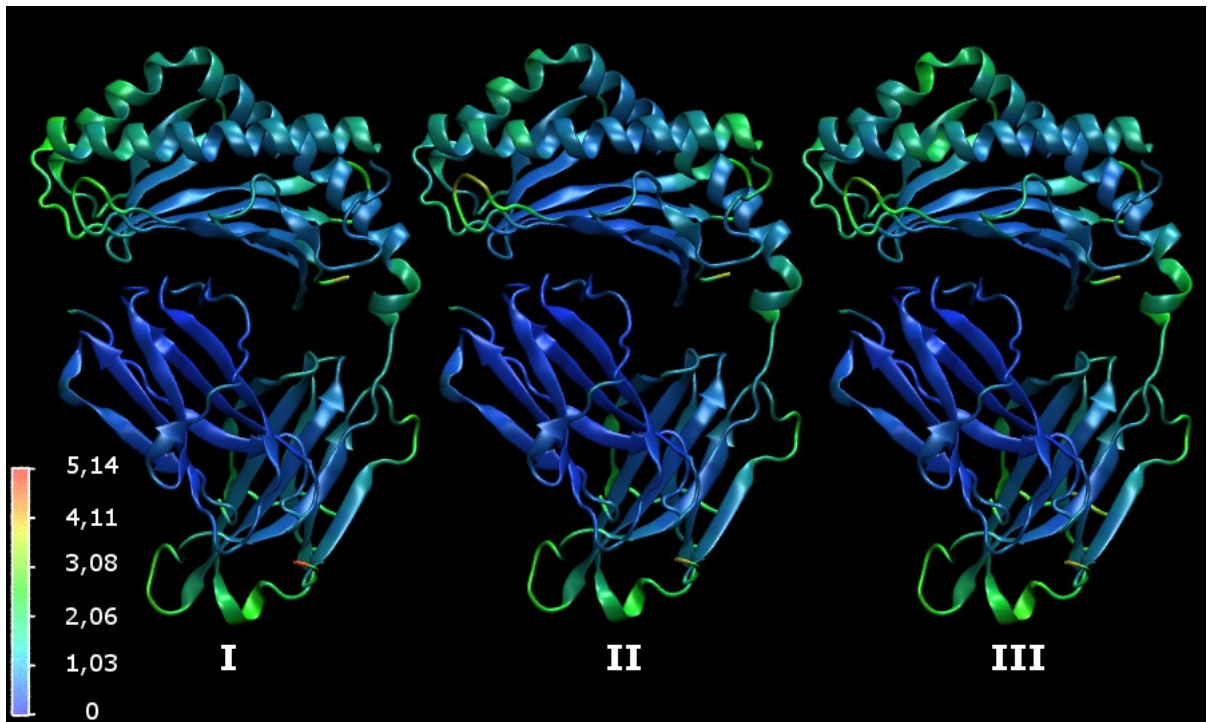
Annexe C 6 : H_NUaGAL



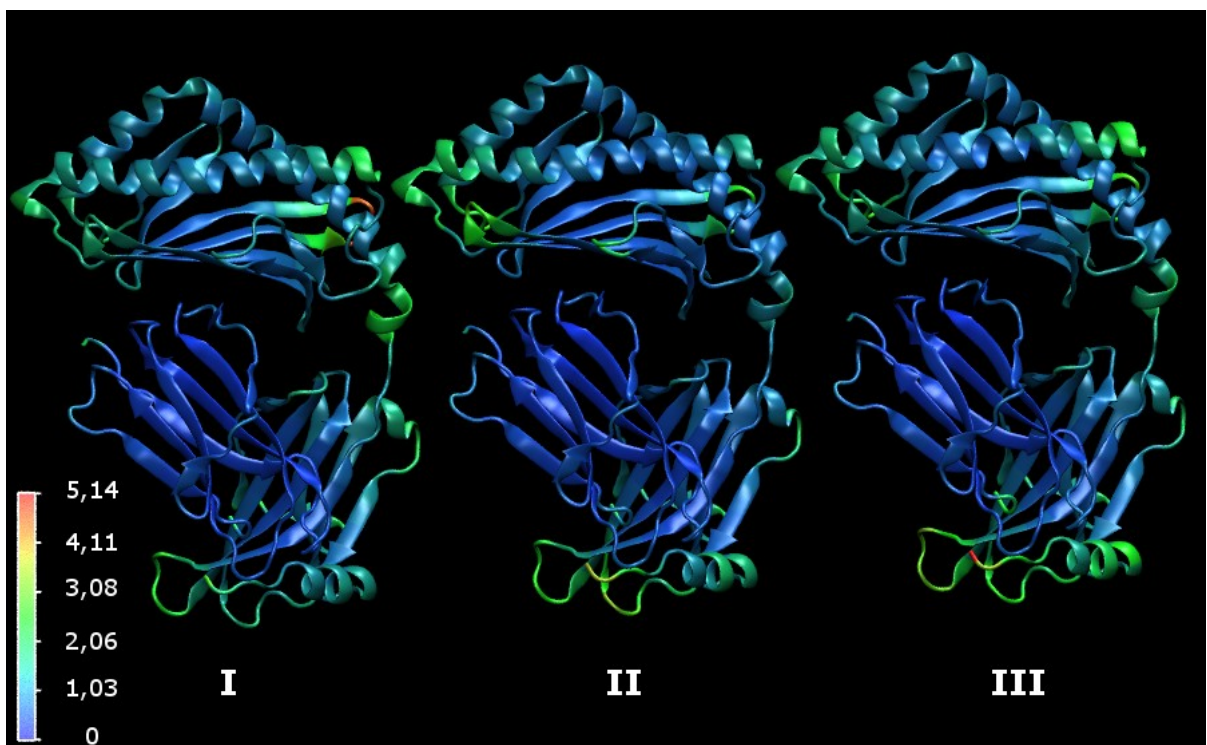
Annexe C 7 : H_OCH



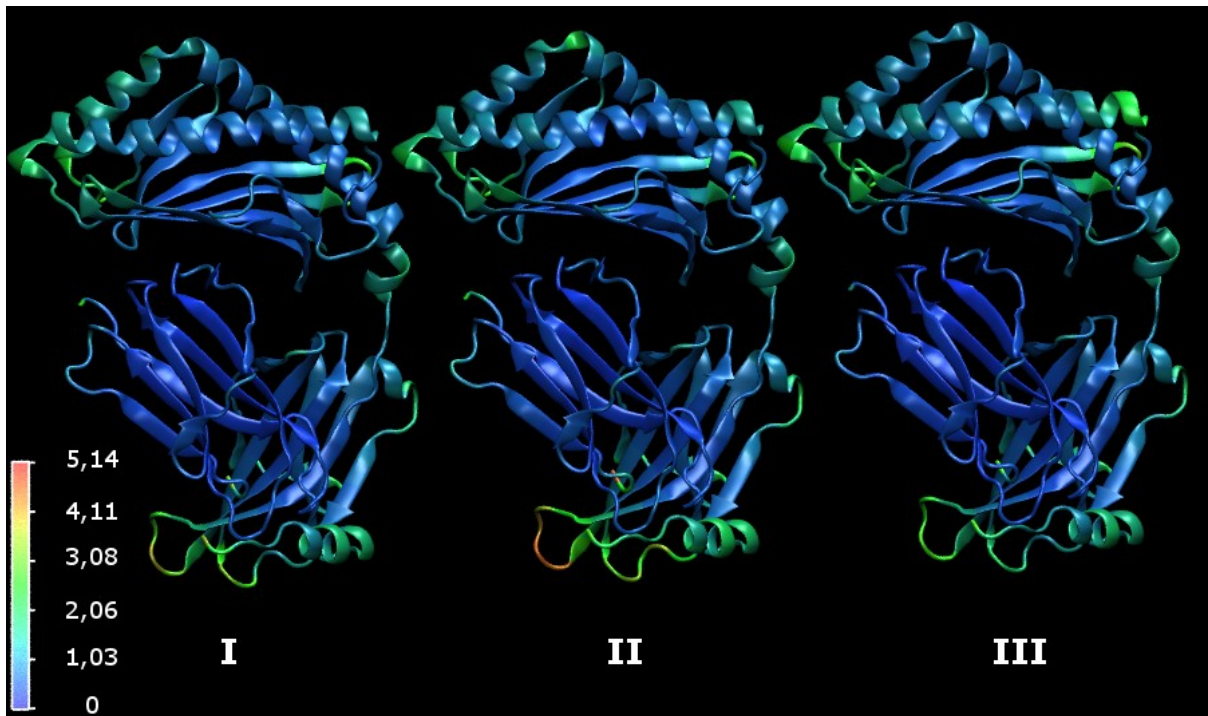
Annexe C 8 : H_OCH9



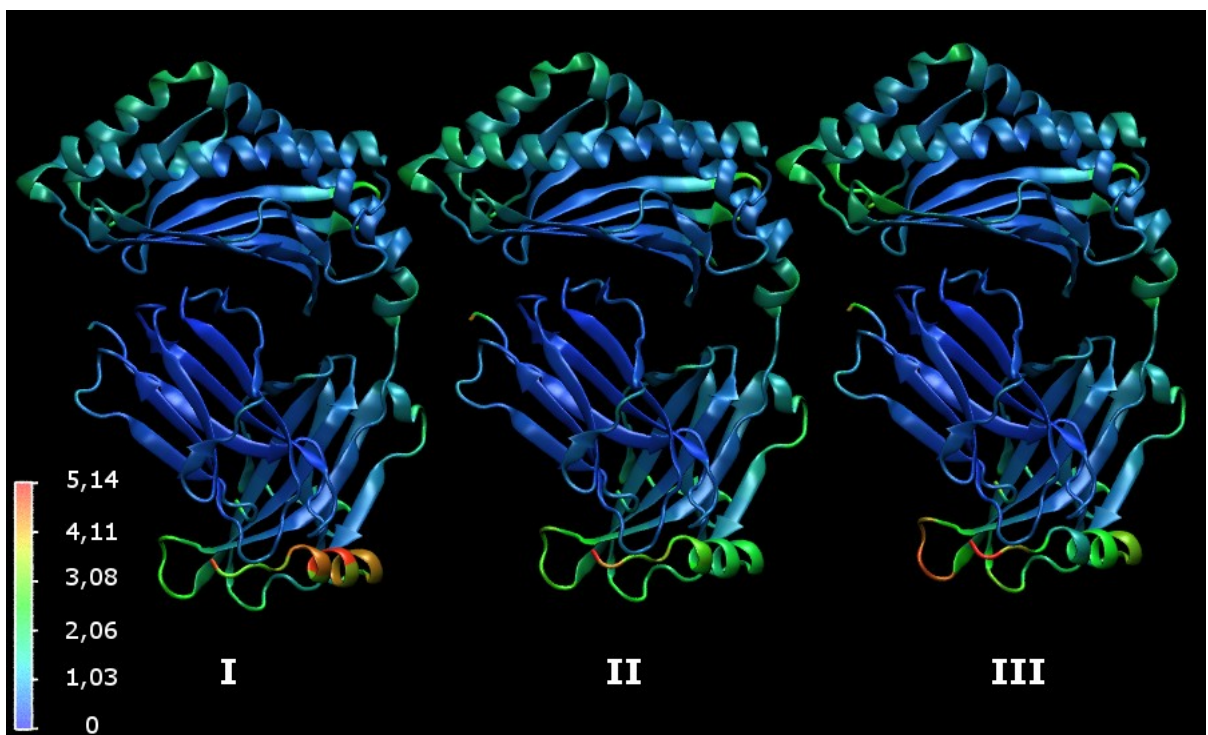
Annexe C 9 : H_SaGAL



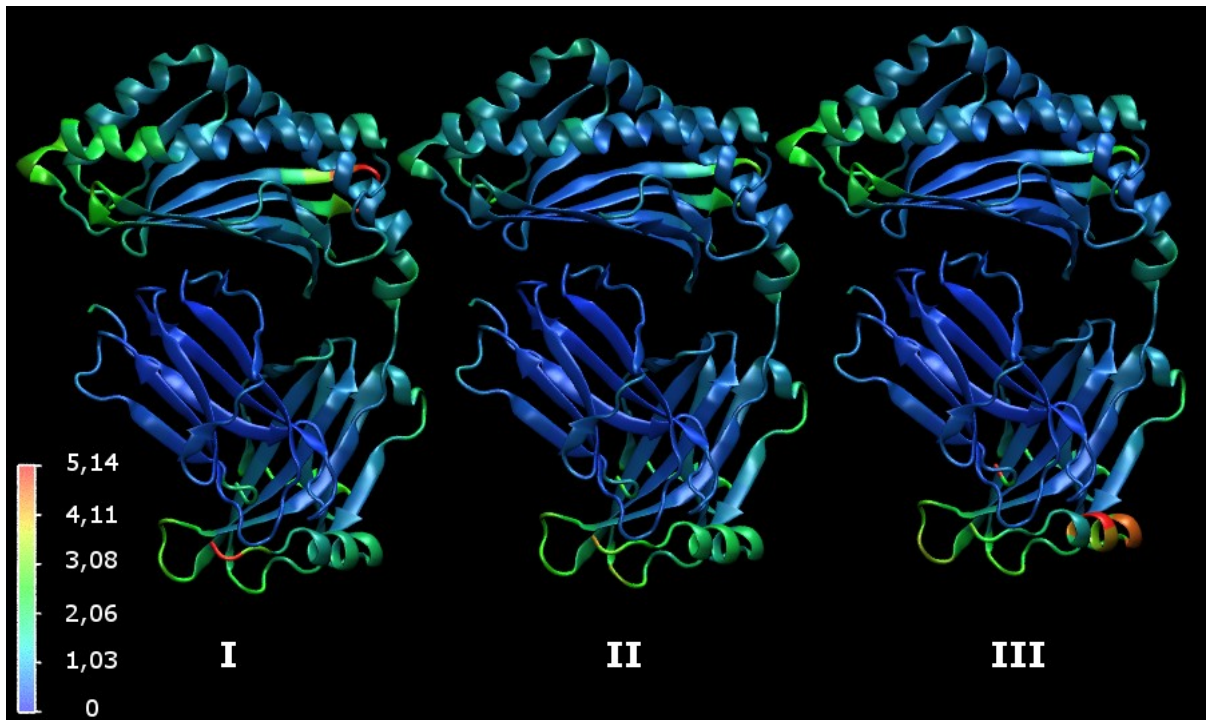
Annexe C 10 : M_7DW



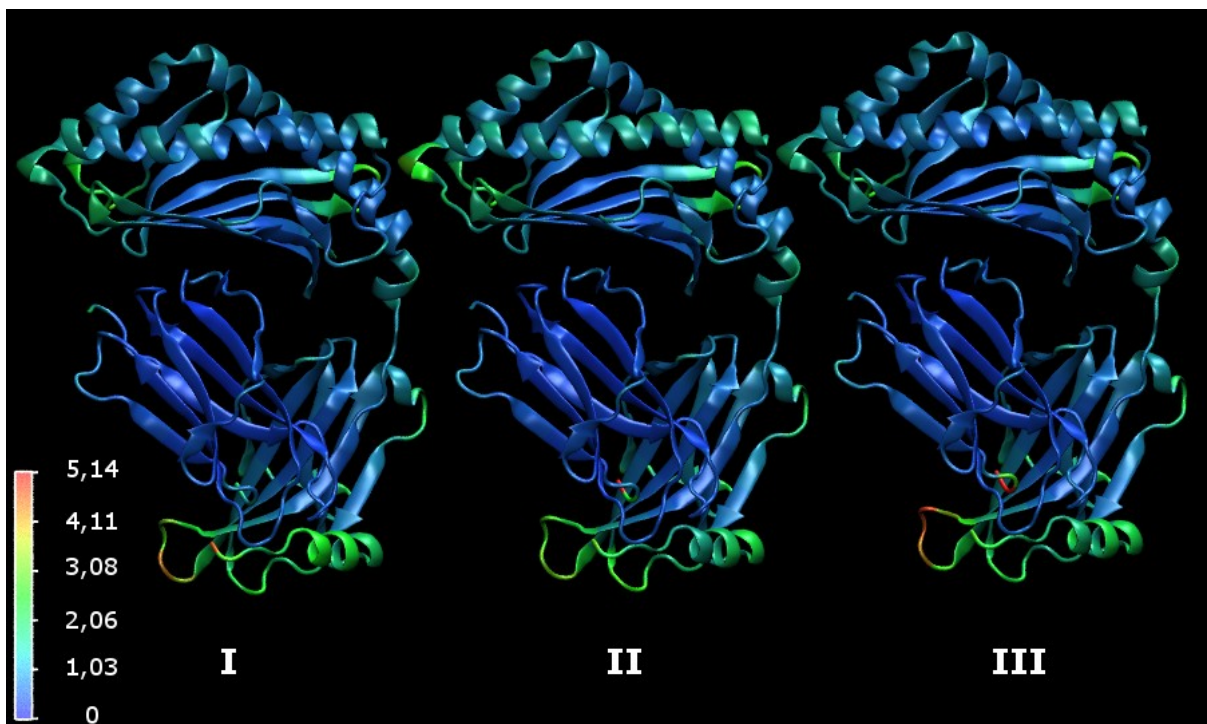
Annexe C 11 : M_aGAL



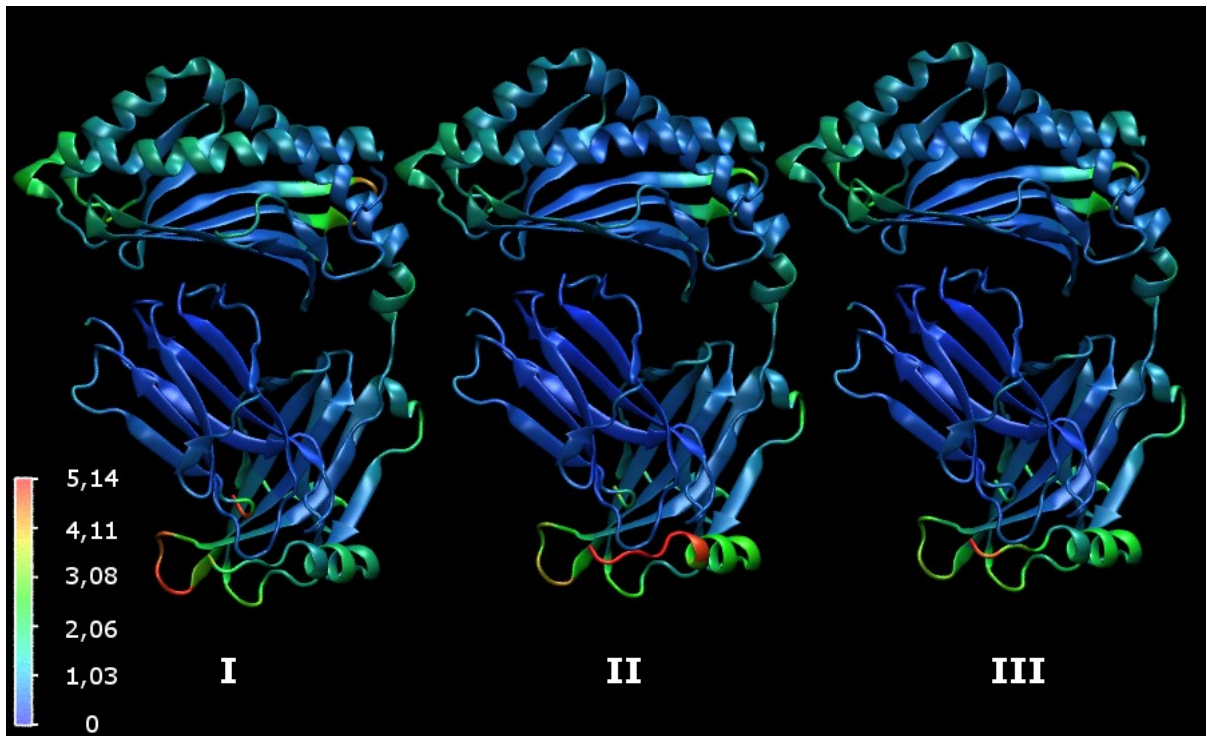
Annexe C 12 : M_AZOL



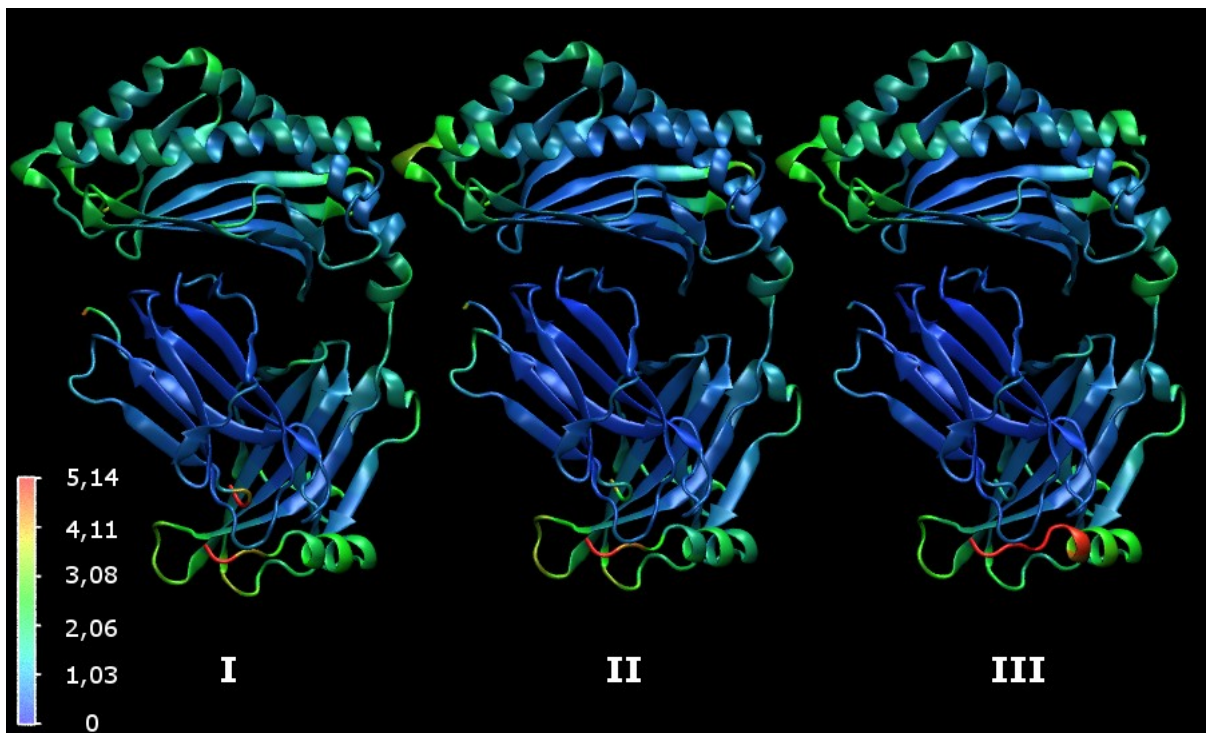
Annexe C 13 : M_GOF



Annexe C 14 : M_NUaGAL



Annexe C 15 : M_OCH



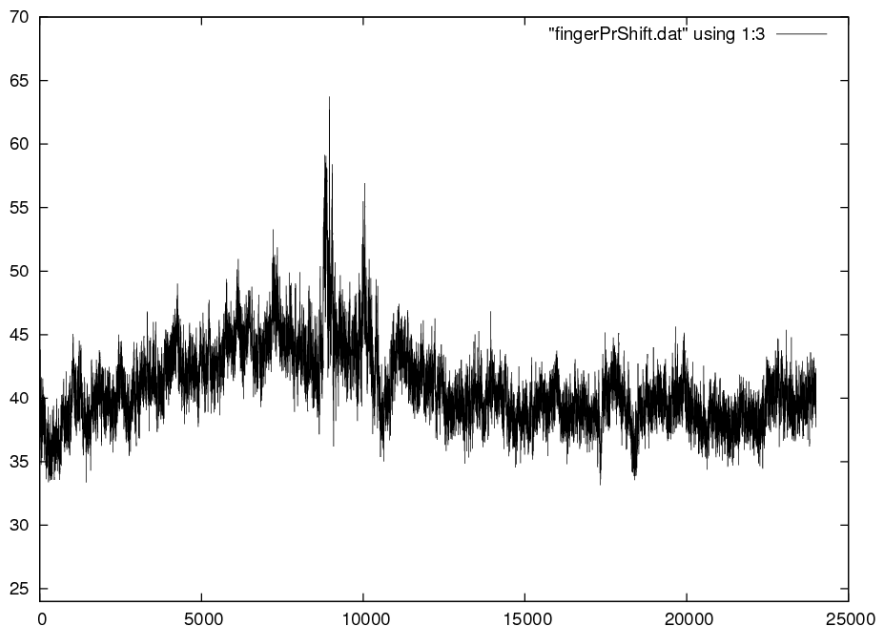
Annexe C 16 : M_SaGAL

Annexe D – Empreinte diédrales

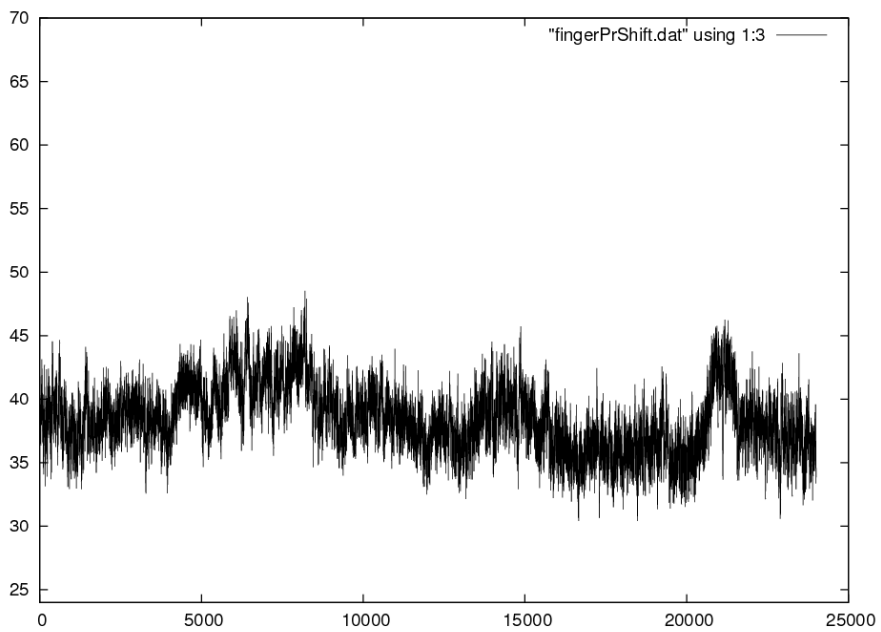
Dans tous les graphes, sont représentés en abscisse le temps associé à chaque conformation comparé (unité = 10ps) et en ordonnée la déviation de l'empreinte diédrale en %.

Annexe D 1 : H_7DW réplique I.....	197
Annexe D 2 : H_7DW réplique II.....	197
Annexe D 3 : H_7DW réplique III.....	198
Annexe D 4 : H_aGAL réplique I	198
Annexe D 5 : H_aGAL réplique II	199
Annexe D 6 : H_aGAL réplique III	199
Annexe D 7 : H_CD1d réplique I	200
Annexe D 8 : H_CD1d réplique II	200
Annexe D 9 : H_CD1d réplique III	201
Annexe D 10 : H_GOF réplique I.....	201
Annexe D 11 : H_GOF réplique II.....	202
Annexe D 12 : H_GOF réplique III.....	202
Annexe D 13 : H_LIP réplique I	203
Annexe D 14 : H_LIP réplique II	203
Annexe D 15 : H_LIP réplique III	204
Annexe D 16 : H_NUaGAL réplique I	204
Annexe D 17 : H_NUaGAL réplique II	205
Annexe D 18 : H_NUaGAL réplique III	205
Annexe D 19 : H_OCH réplique I.....	206
Annexe D 20 : H_OCH réplique II.....	206
Annexe D 21 : H_OCH réplique III.....	207
Annexe D 22 : H_OCH9 réplique I.....	207
Annexe D 23 : H_OCH9 réplique II.....	208
Annexe D 24 : H_OCH9 réplique III.....	208
Annexe D 25 : H_SaGAL réplique I	209
Annexe D 26 : H_SaGAL réplique II	209
Annexe D 27 : H_SaGAL réplique III	210
Annexe D 28 : M_7DW réplique I	210

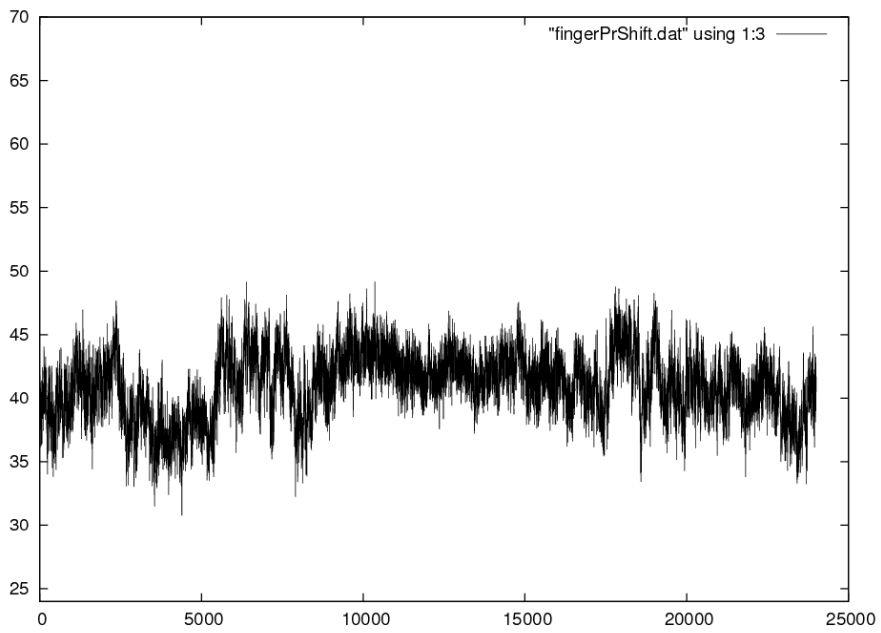
Annexe D 29 : M_7DW réplique II	211
Annexe D 30 : M_7DW réplique III	211
Annexe D 31 : M_aGAL réplique I	212
Annexe D 32 : M_aGAL réplique II	212
Annexe D 33 : M_aGAL réplique III	213
Annexe D 34 : M_AZOL réplique I	213
Annexe D 35 : M_AZOL réplique II	214
Annexe D 36 : M_AZOL réplique III	214
Annexe D 37 : M_GOF réplique I	215
Annexe D 38 : M_GOF réplique II.....	215
Annexe D 39 : M_GOF réplique III.....	216
Annexe D 40 : M_NUaGAL réplique I	216
Annexe D 41 : M_NUaGAL réplique II	217
Annexe D 42 : M_NUaGAL réplique III	217
Annexe D 43 : M_OCH réplique I	218
Annexe D 44 : M_OCH réplique II	218
Annexe D 45 : M_OCH réplique III	219
Annexe D 46 : M_SaGAL réplique I.....	219
Annexe D 47 : M_SaGAL réplique II.....	220
Annexe D 48 : M_SaGAL réplique III.....	220



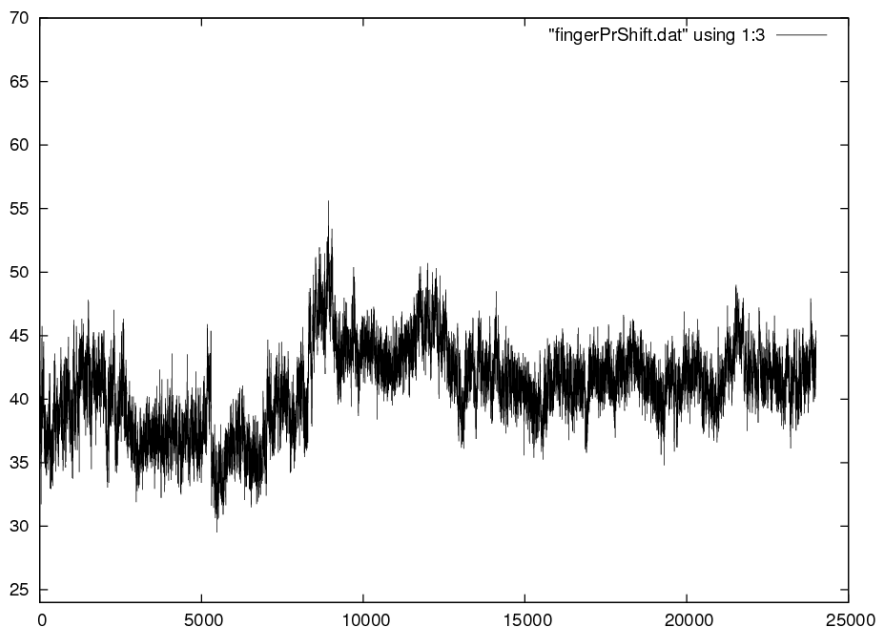
Annexe D 1 : H_7DW réplique I



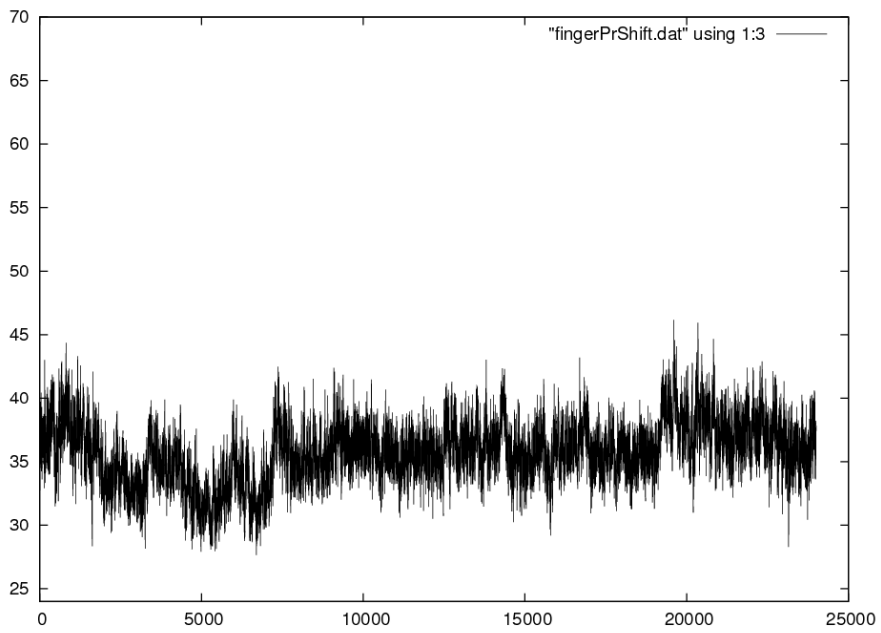
Annexe D 2 : H_7DW réplique II



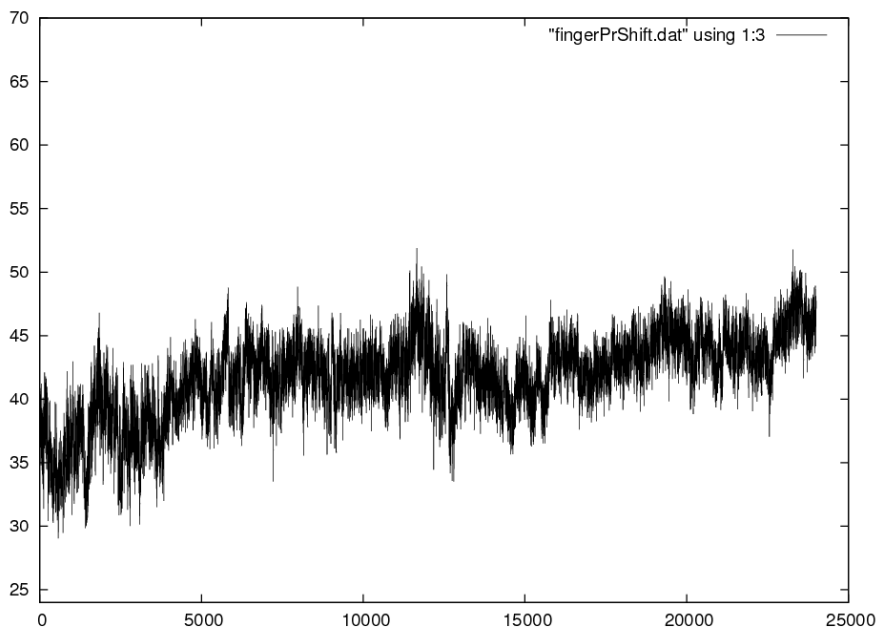
Annexe D 3 : H_7DW réplique III



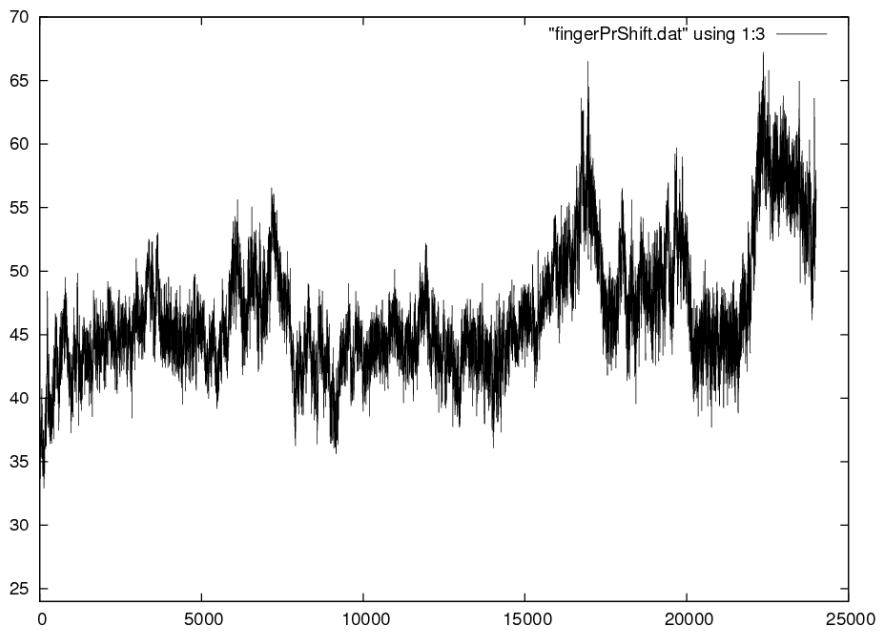
Annexe D 4 : H_aGAL réplique I



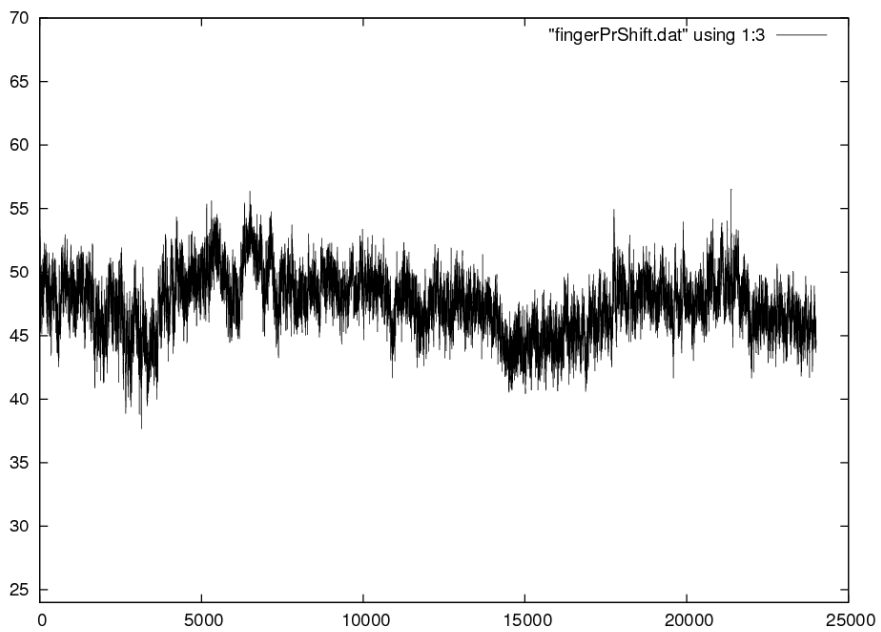
Annexe D 5 : H_aGAL réplique II



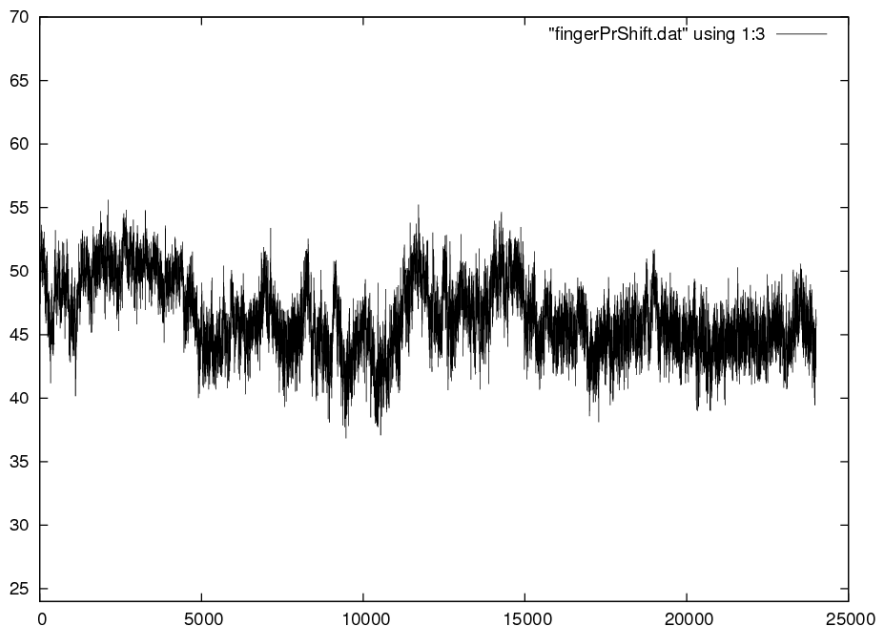
Annexe D 6 : H_aGAL réplique III



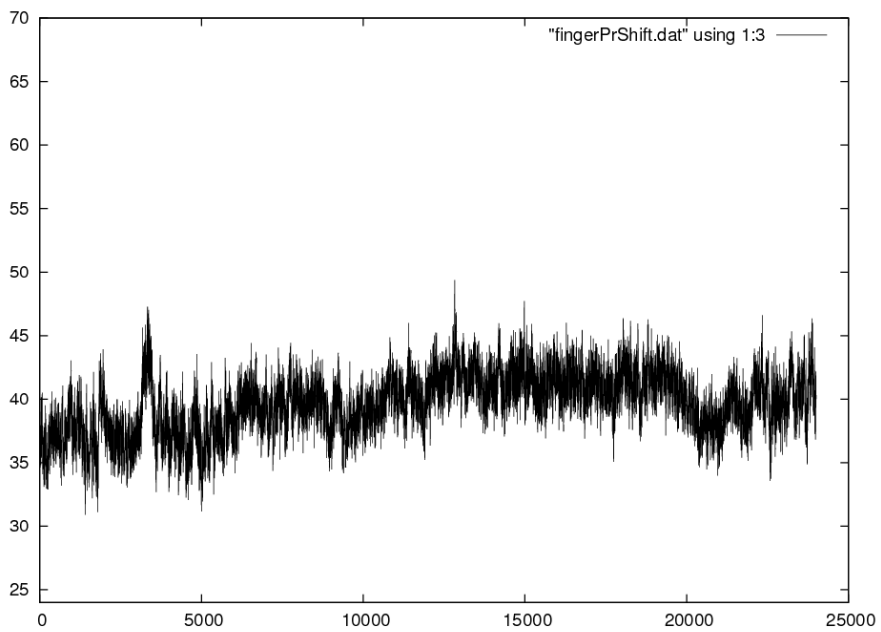
Annexe D 7 : H_CD1d réplique I



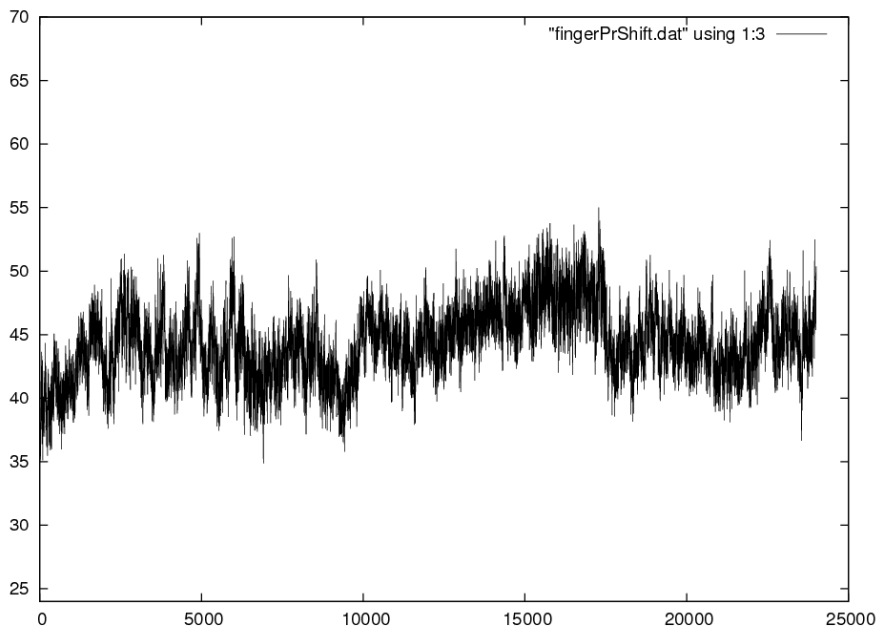
Annexe D 8 : H_CD1d réplique II



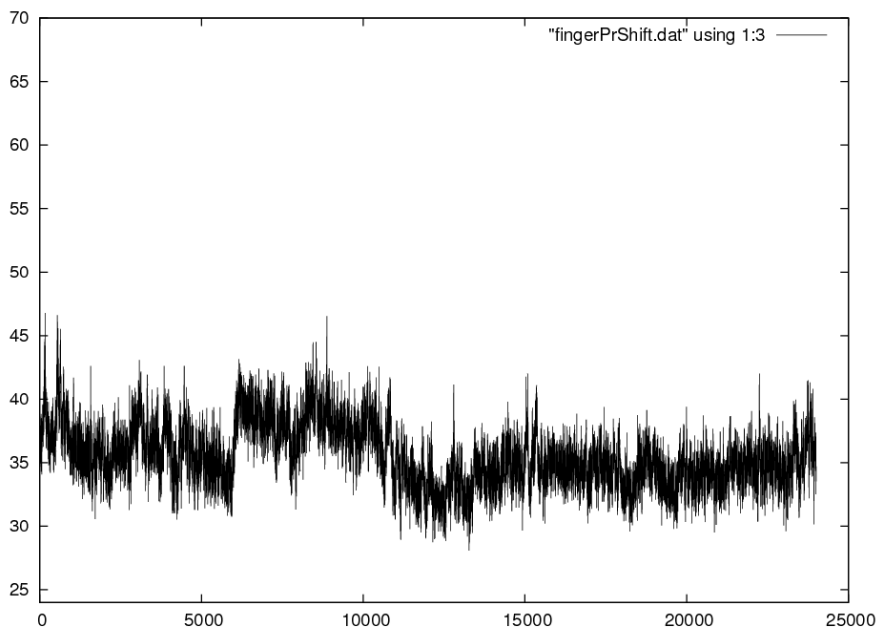
Annexe D 9 : H_CD1d réplique III



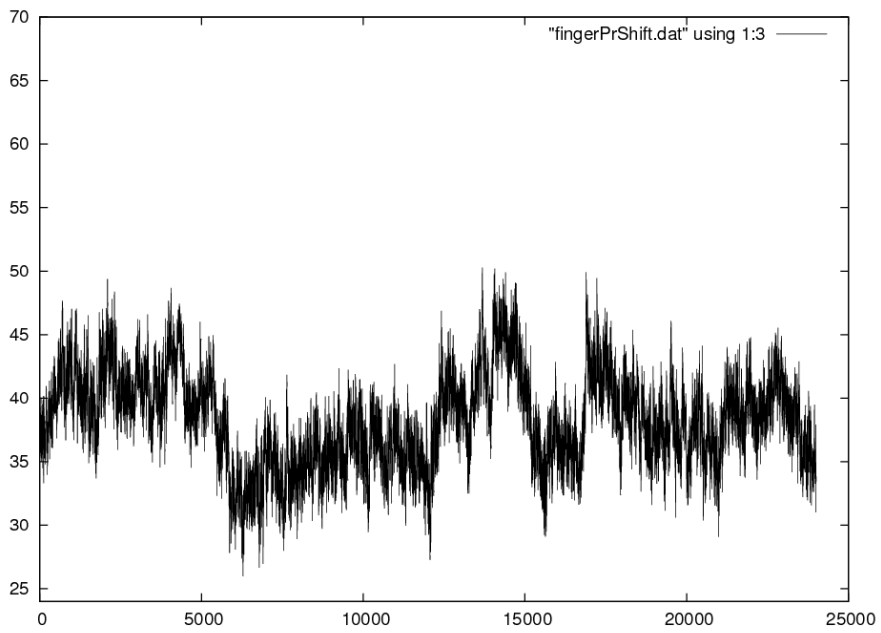
Annexe D 10 : H_GOF réplique I



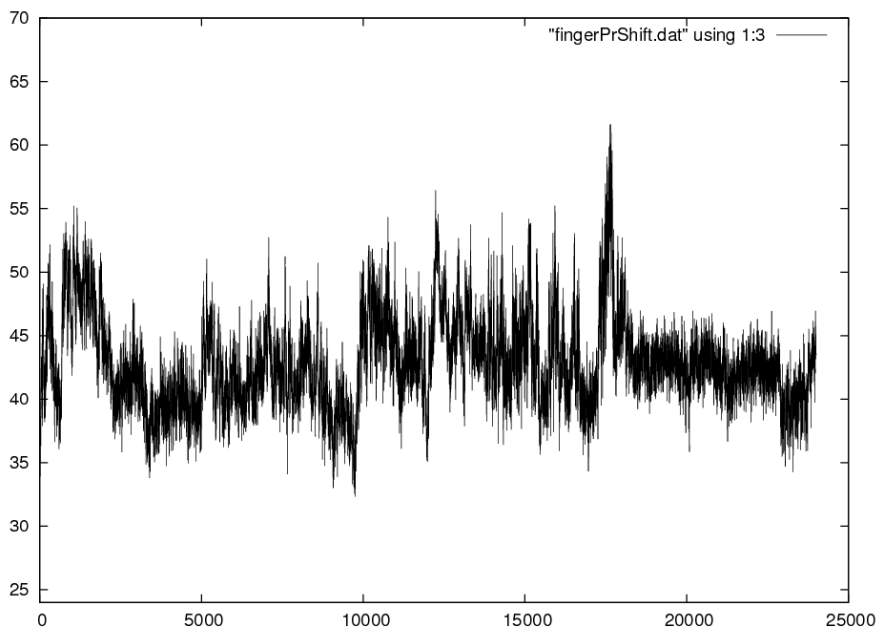
Annexe D 11 : H_GOF réplique II



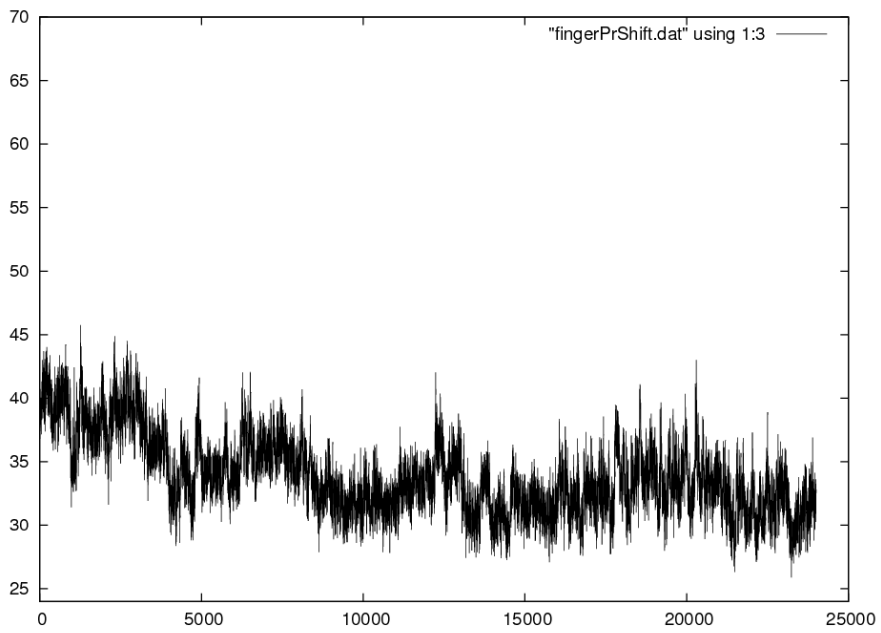
Annexe D 12 : H_GOF réplique III



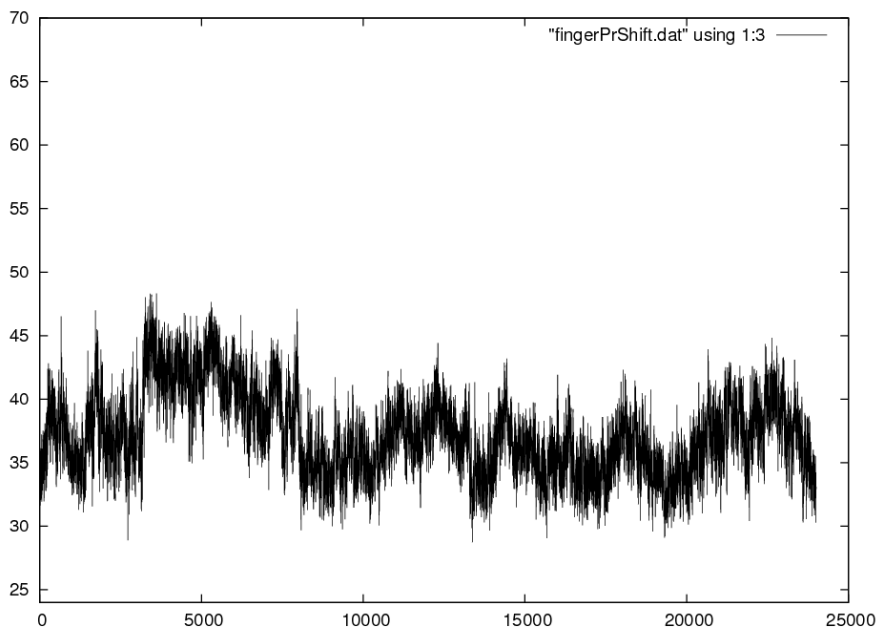
Annexe D 13 : H_LIP réplique I



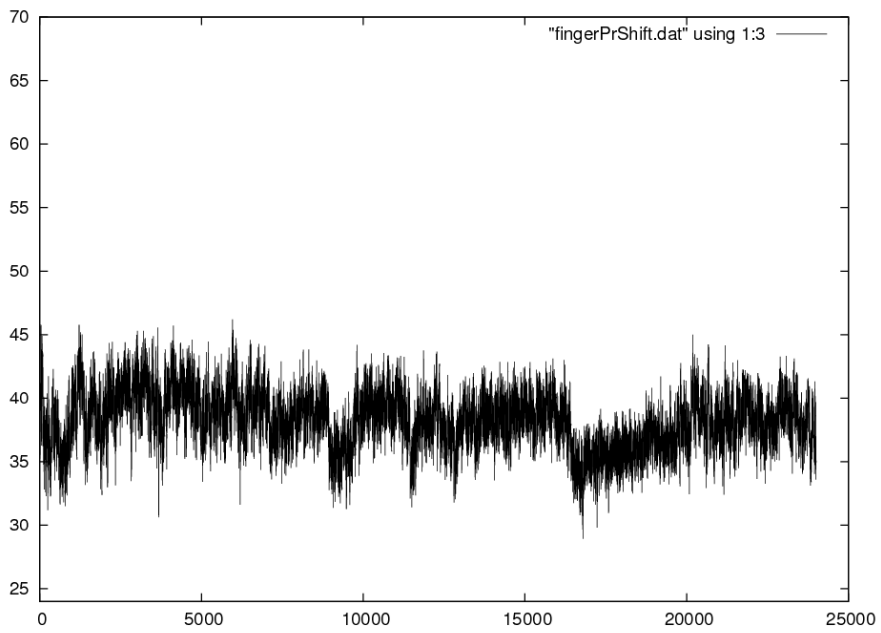
Annexe D 14 : H_LIP réplique II



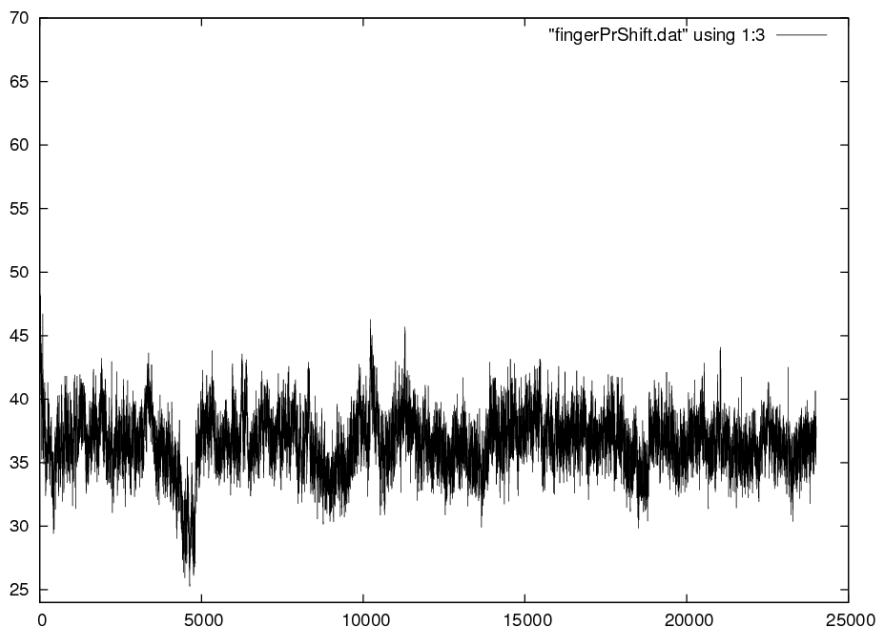
Annexe D 15 : H_LIP réplique III



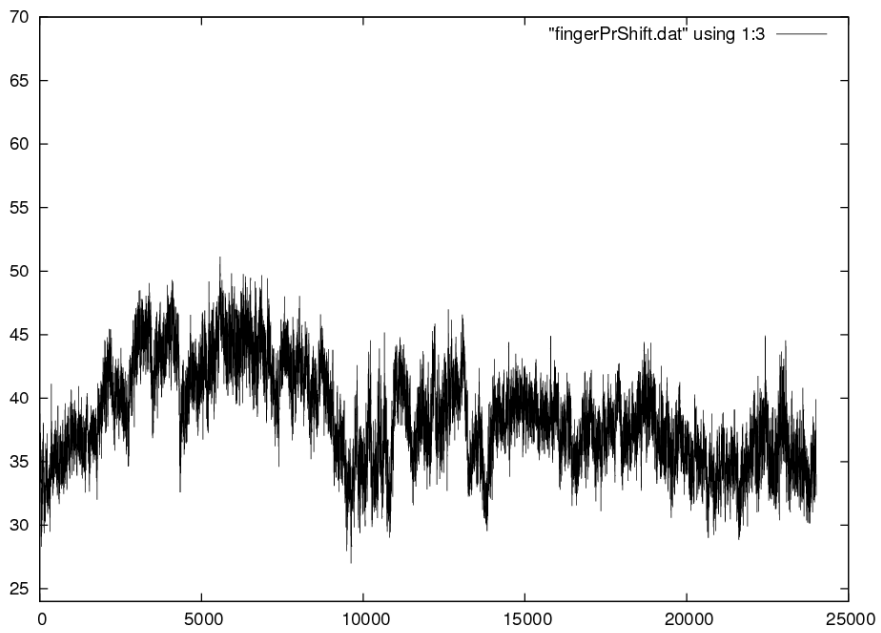
Annexe D 16 : H_NUaGAL réplique I



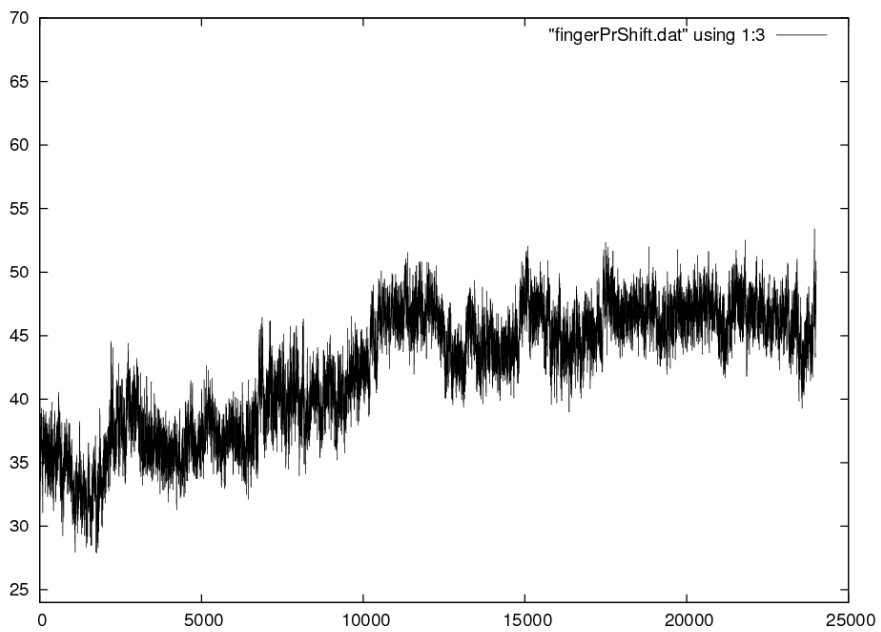
Annexe D 17 : H_NUaGAL réplique II



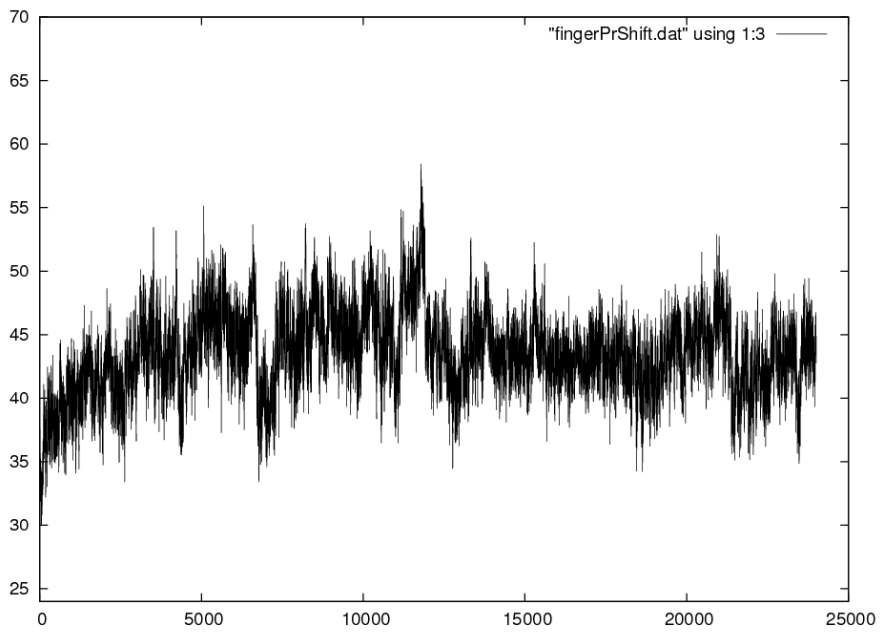
Annexe D 18 : H_NUaGAL réplique III



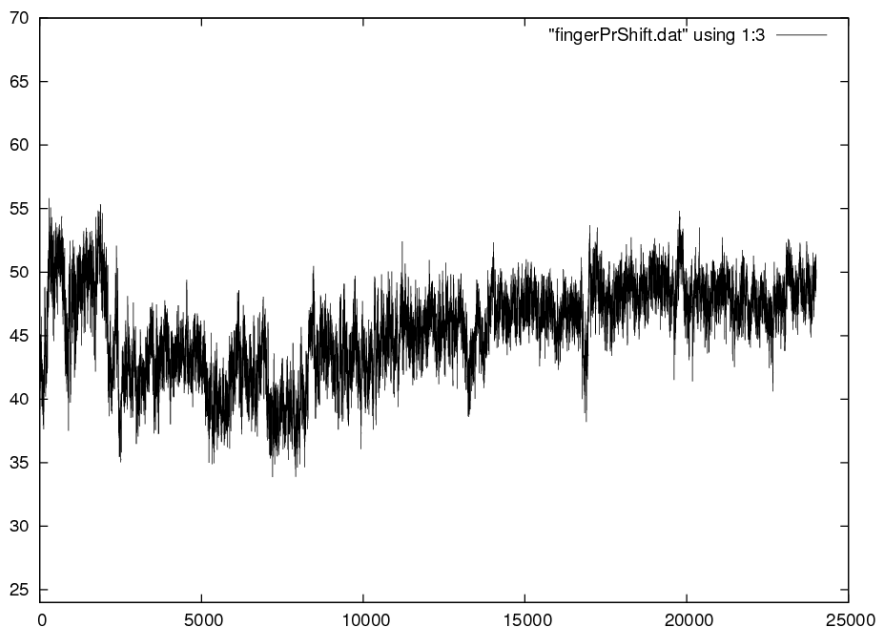
Annexe D 19 : H₂OCH réplique I



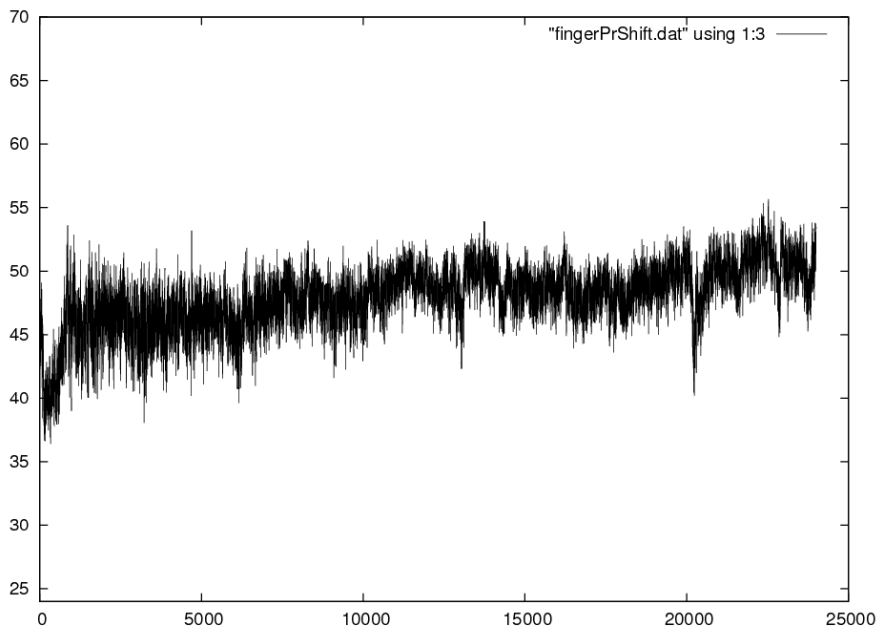
Annexe D 20 : H₂OCH réplique II



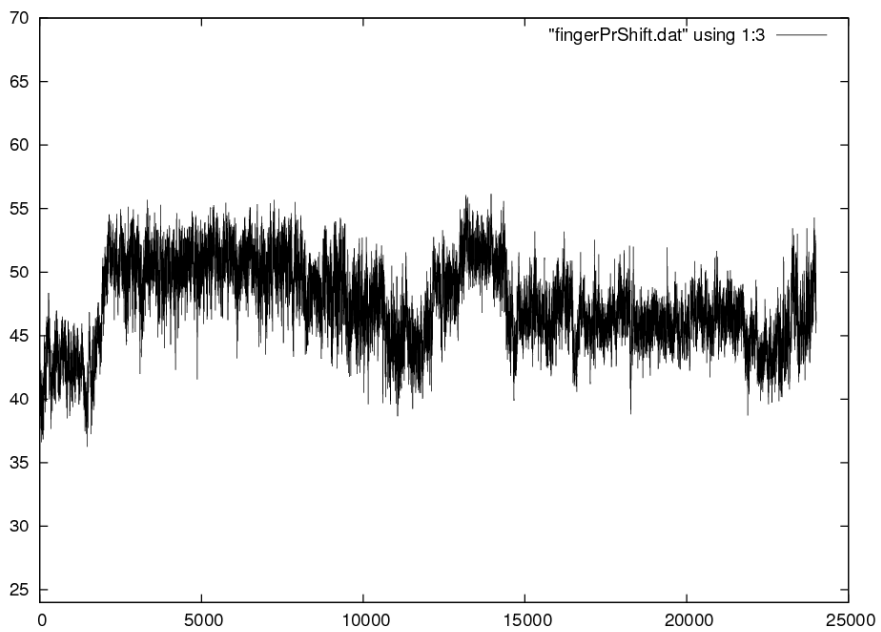
Annexe D 21 : H_OCH réplique III



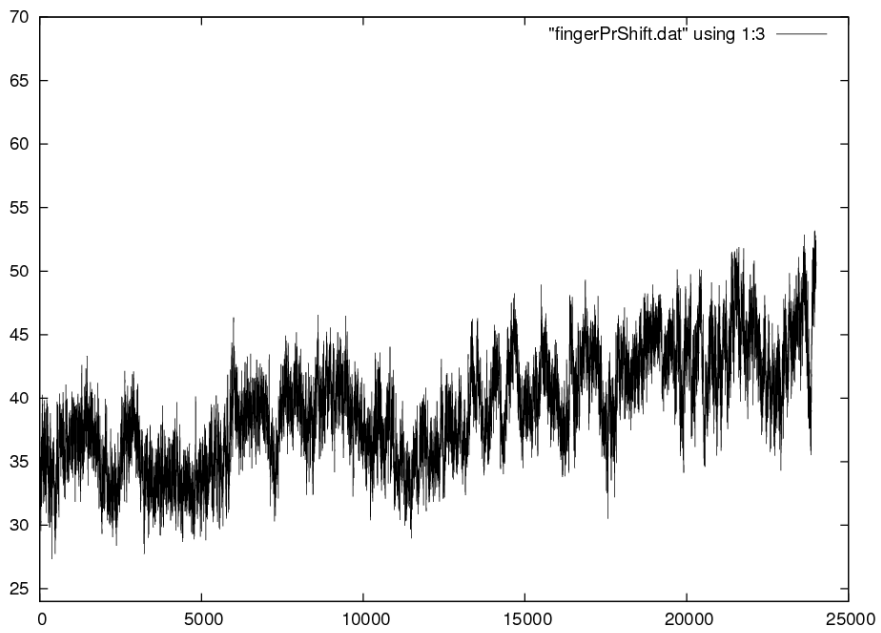
Annexe D 22 : H_OCH9 réplique I



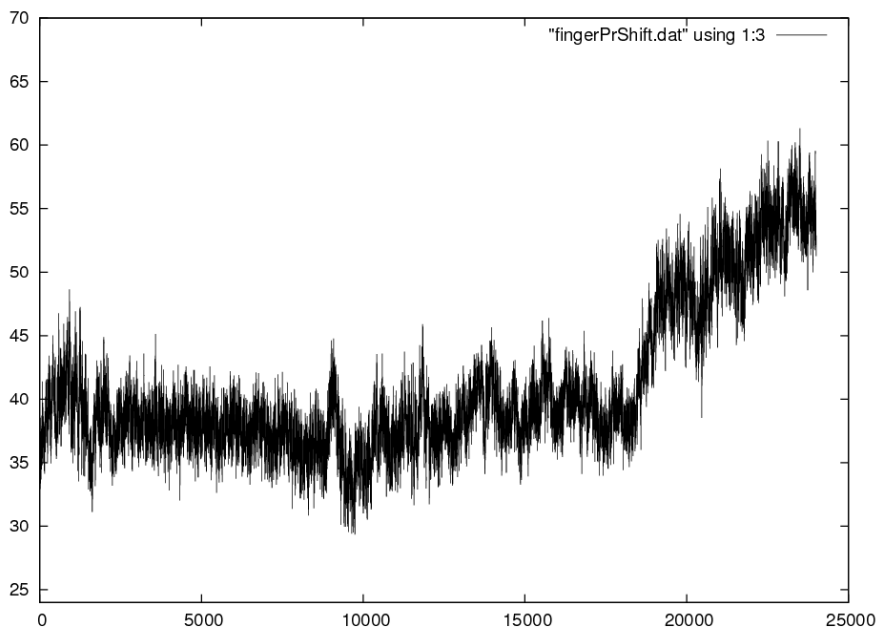
Annexe D 23 : H₂OCH₉ réplique II



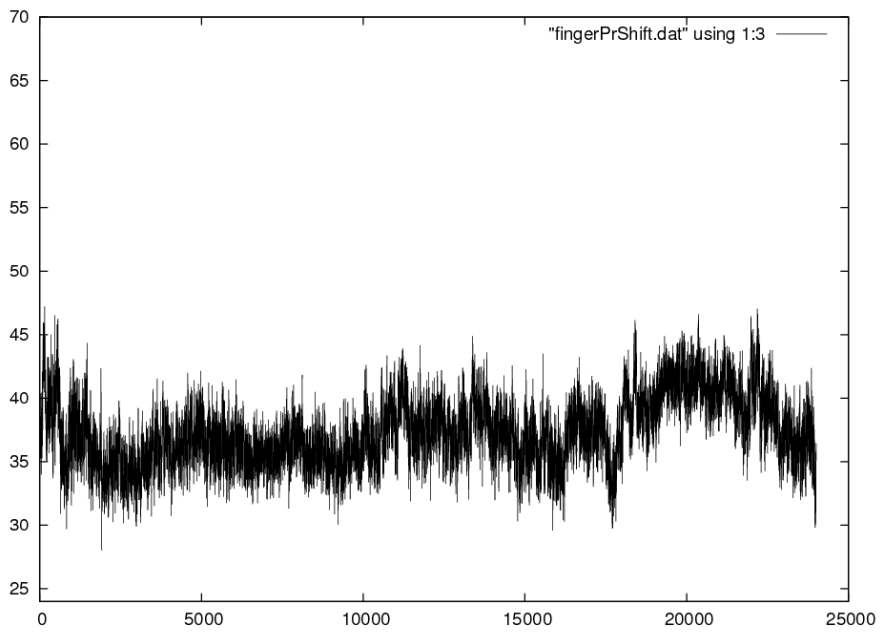
Annexe D 24 : H₂OCH₉ réplique III



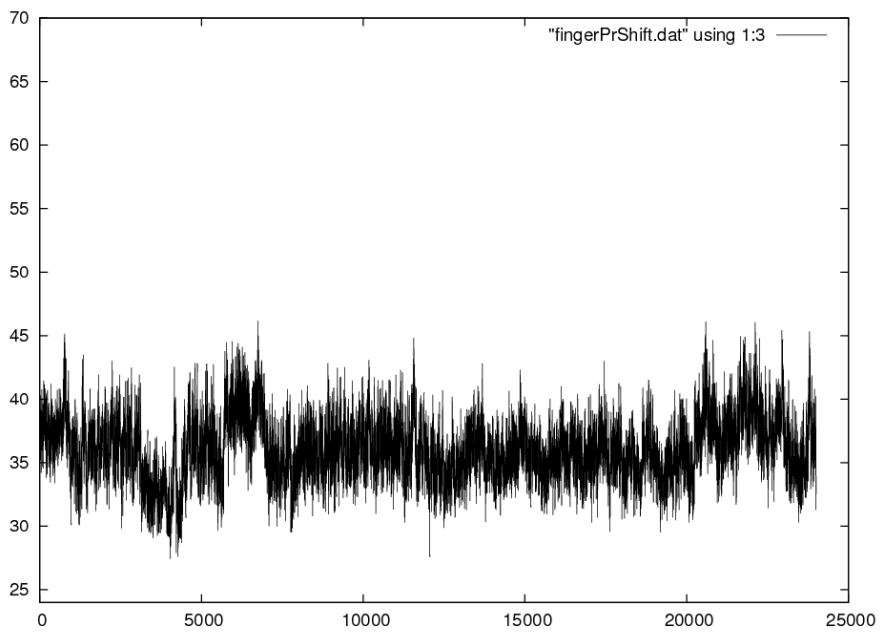
Annexe D 25 : H_SaGAL réplique I



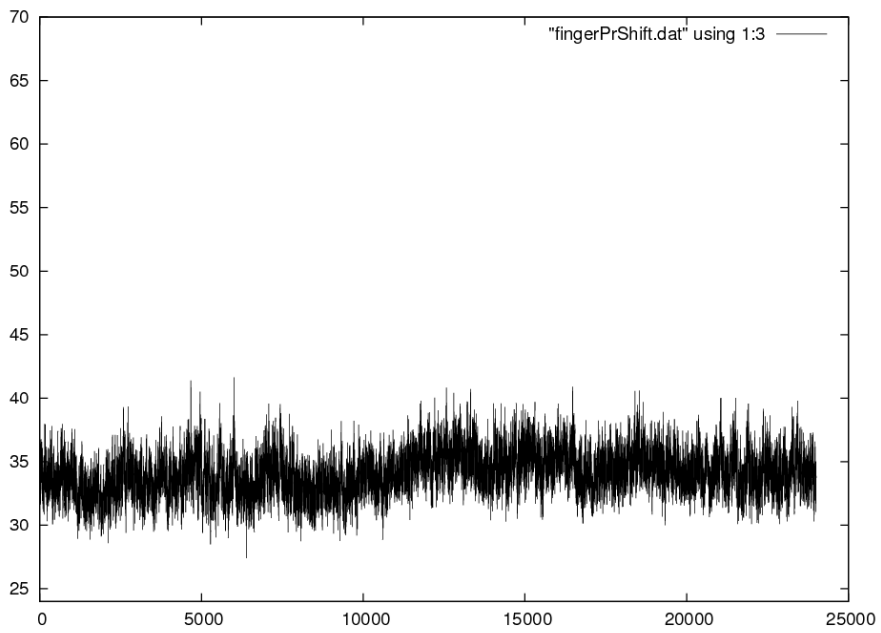
Annexe D 26 : H_SaGAL réplique II



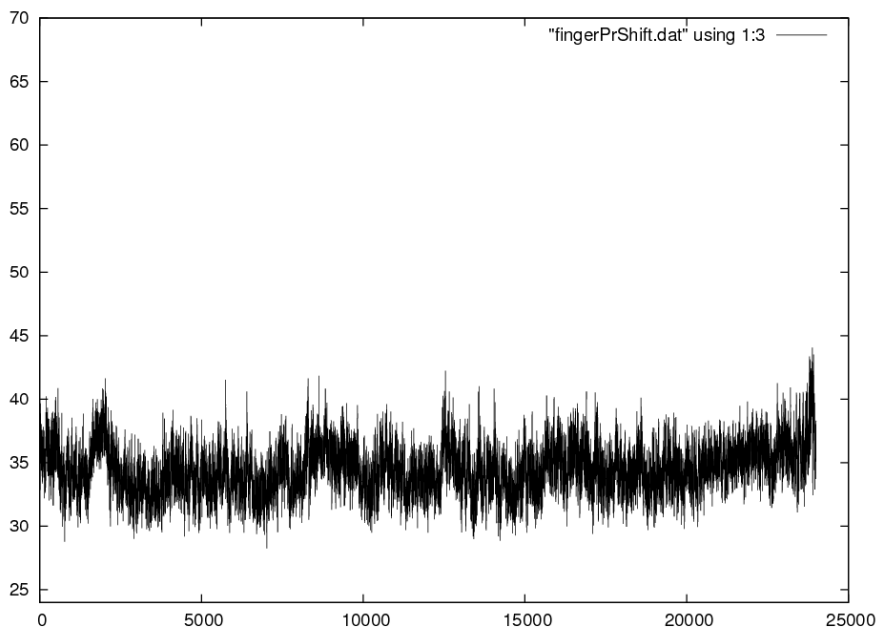
Annexe D 27 : H_SaGAL réplique III



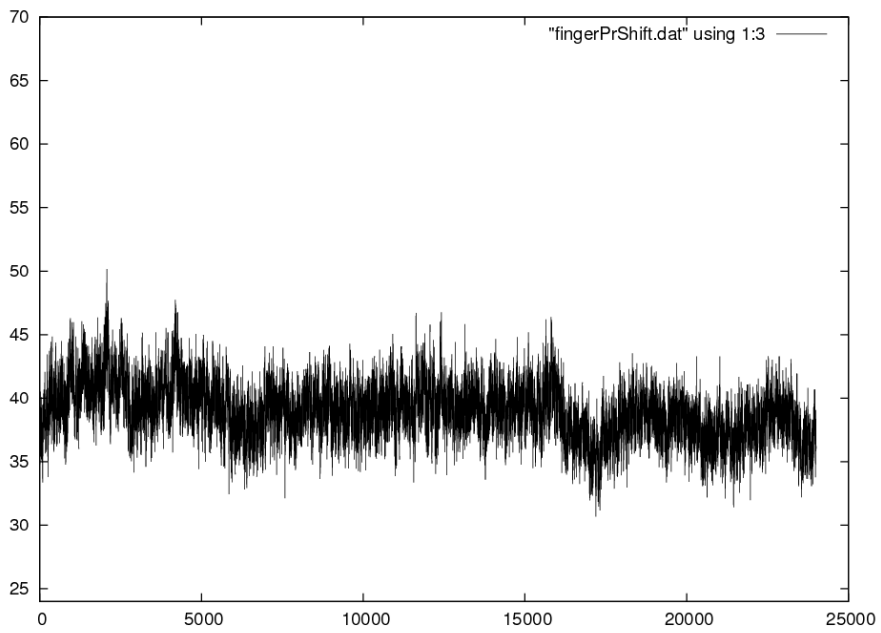
Annexe D 28 : M_7DW réplique I



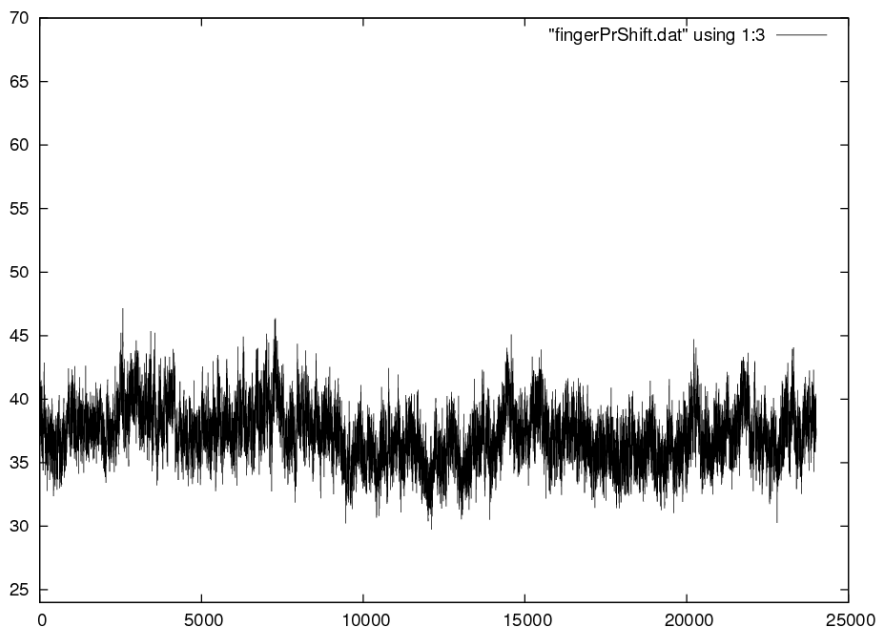
Annexe D 29 : M_7DW réplique II



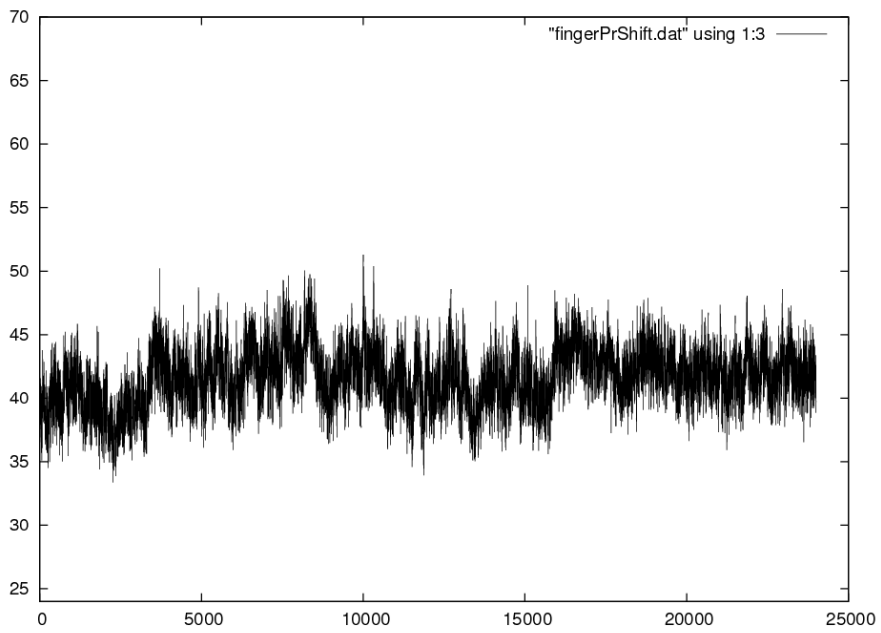
Annexe D 30 : M_7DW réplique III



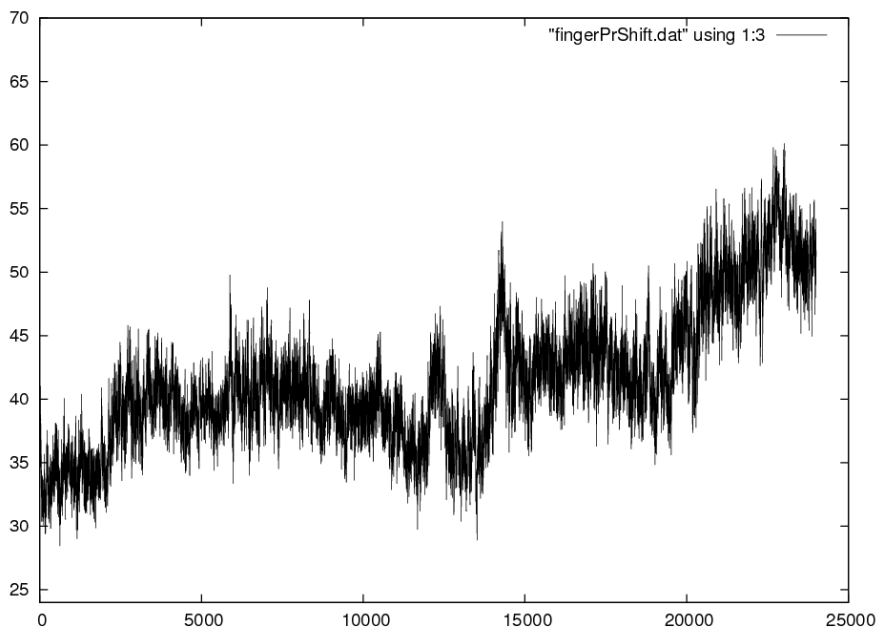
Annexe D 31 : M_aGAL réplique I



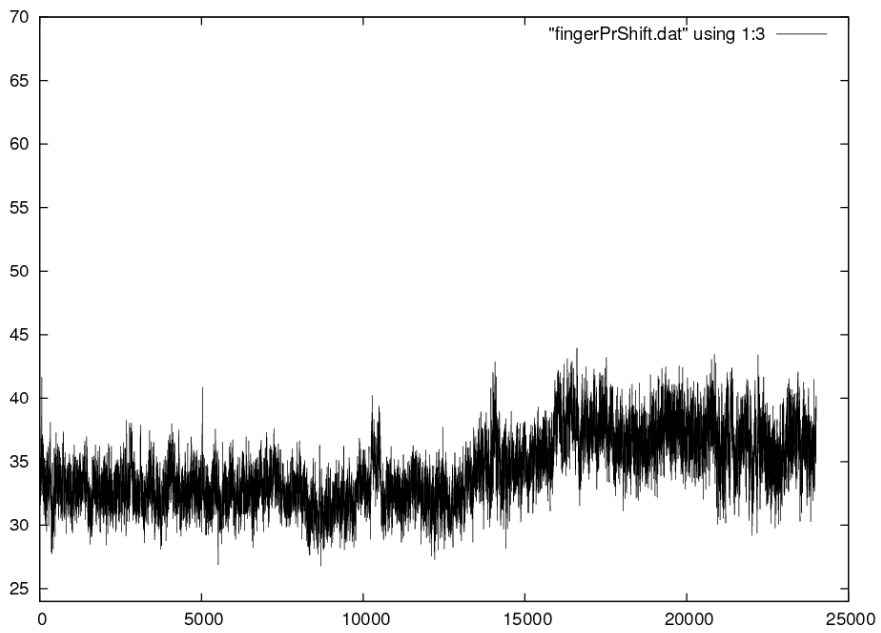
Annexe D 32 : M_aGAL réplique II



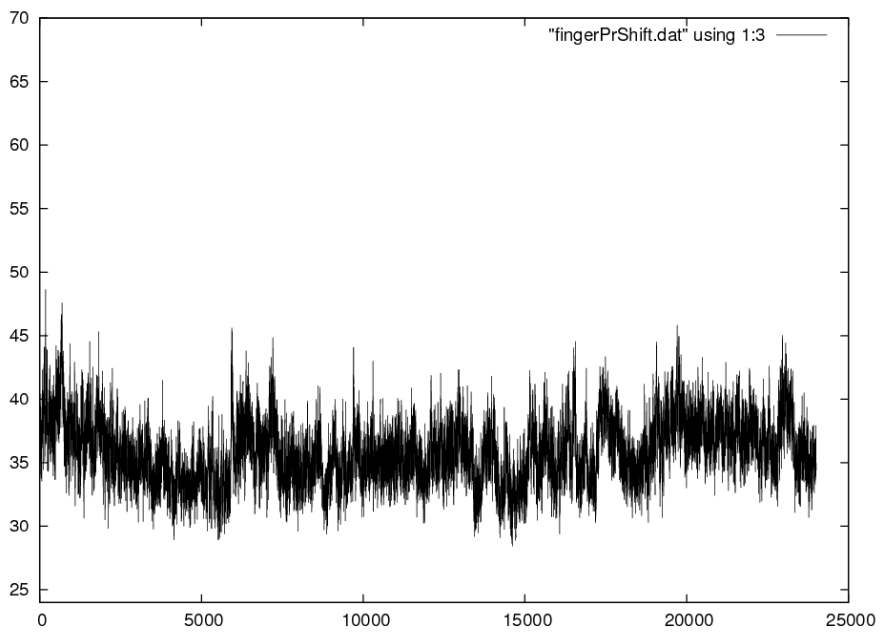
Annexe D 33 : M_aGAL réplique III



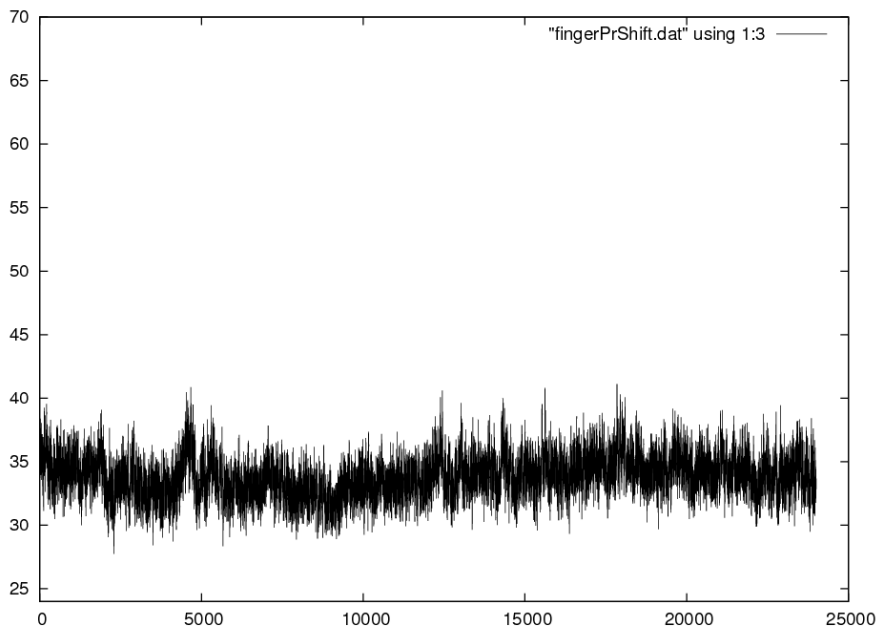
Annexe D 34 : M_AZOL réplique I



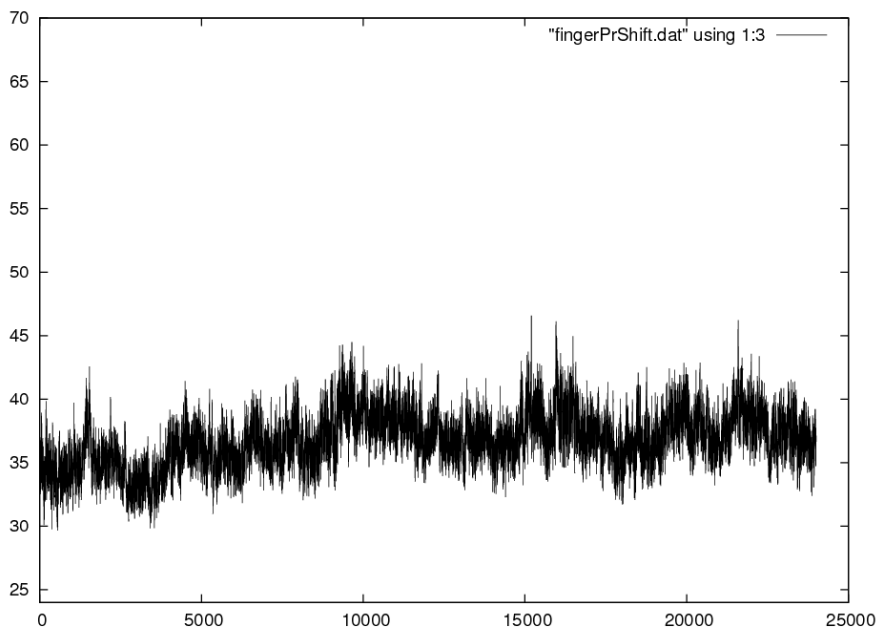
Annexe D 35 : M_AZOL réplique II



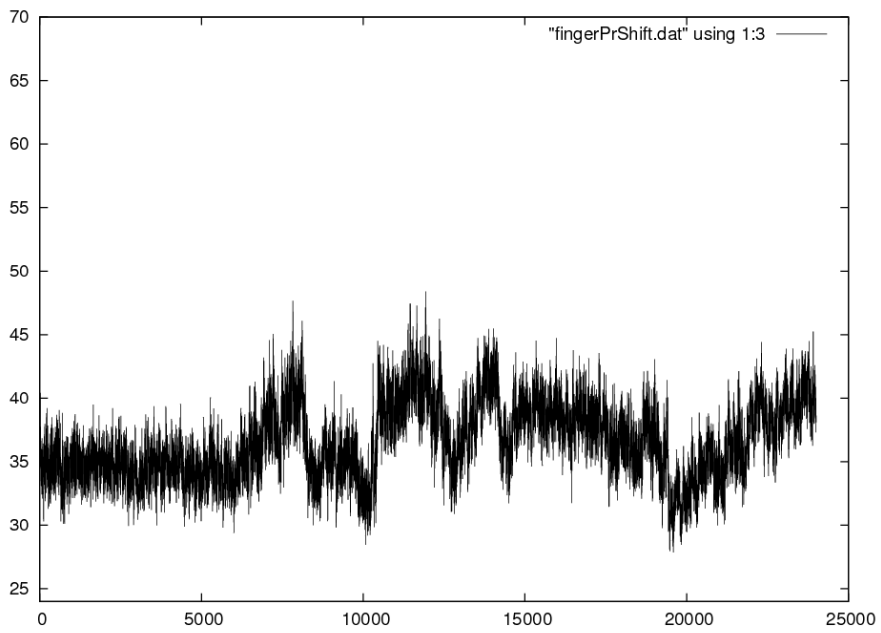
Annexe D 36 : M_AZOL réplique III



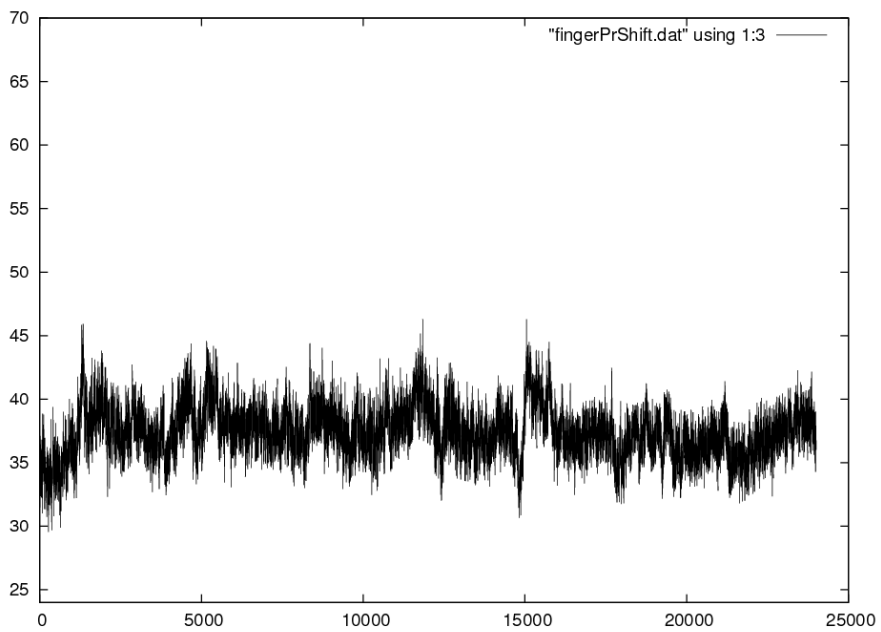
Annexe D 37 : M_GOF réplique I



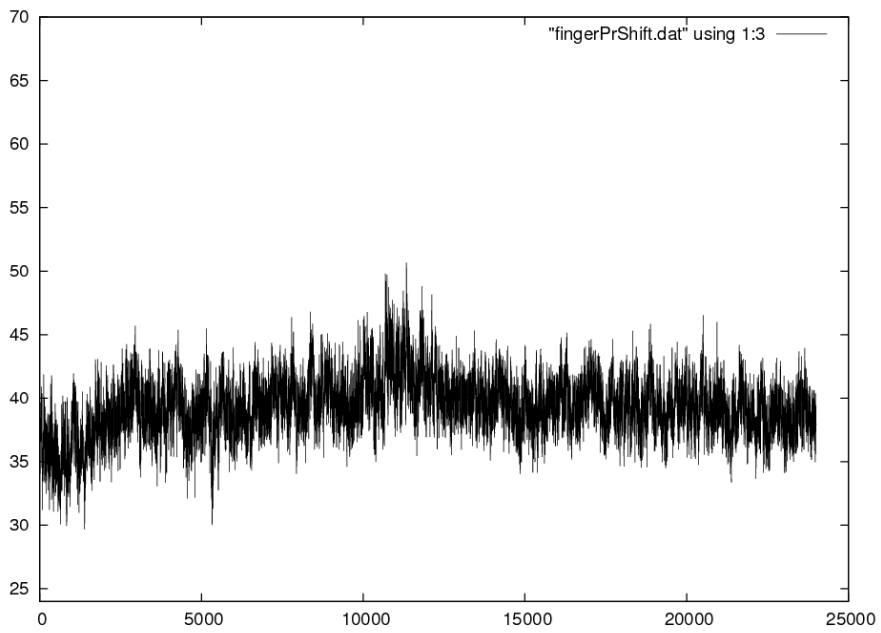
Annexe D 38 : M_GOF réplique II



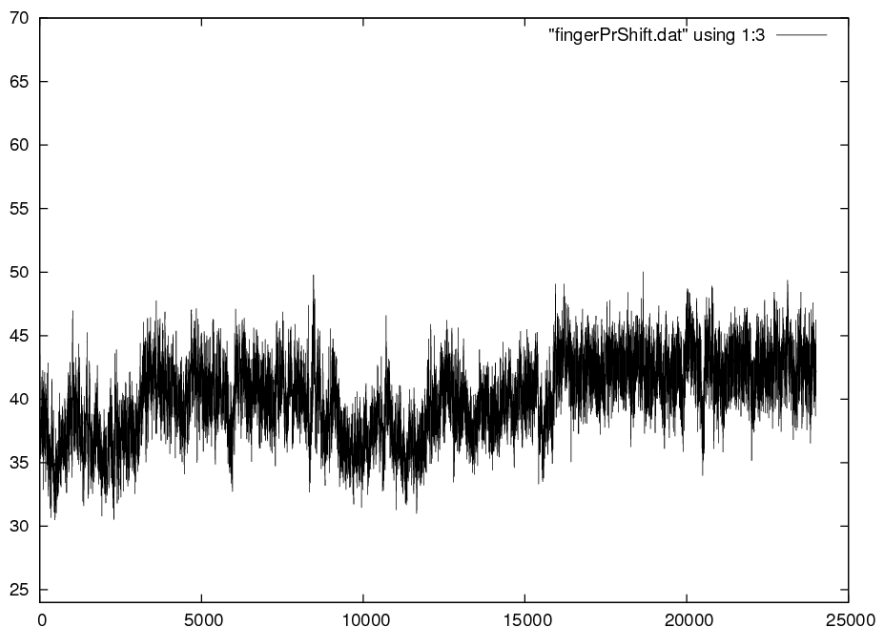
Annexe D 39 : M_GOF réplique III



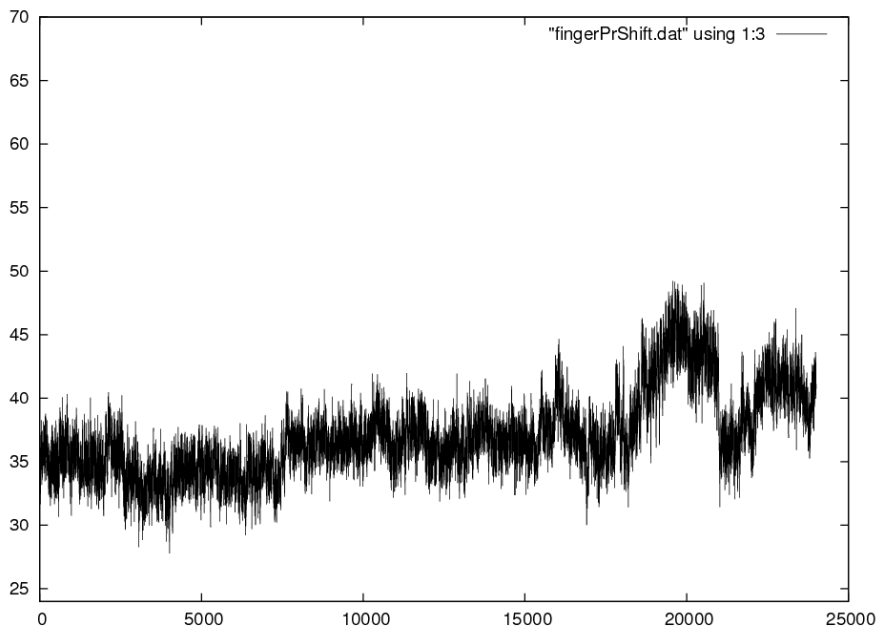
Annexe D 40 : M_NUaGAL réplique I



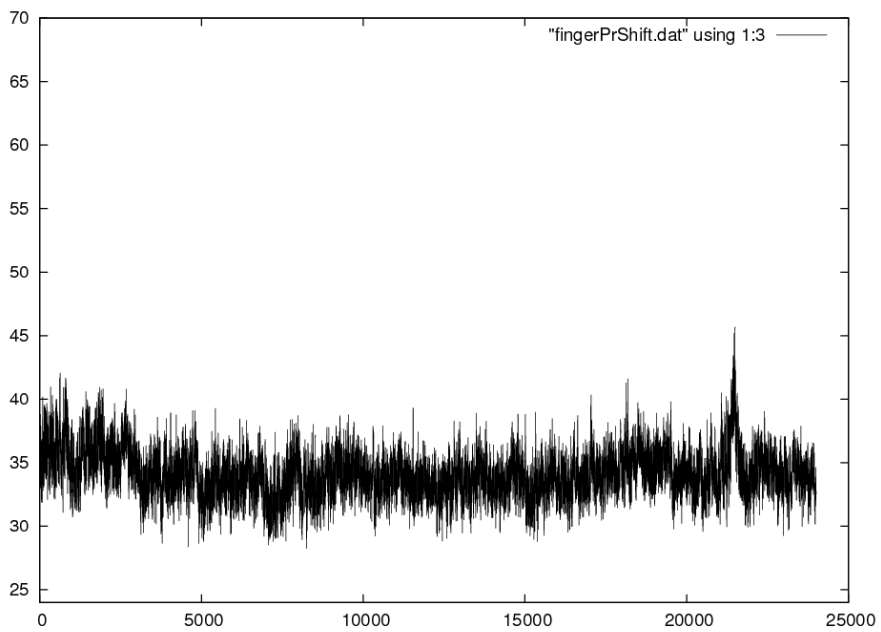
Annexe D 41 : M_NUaGAL réplique II



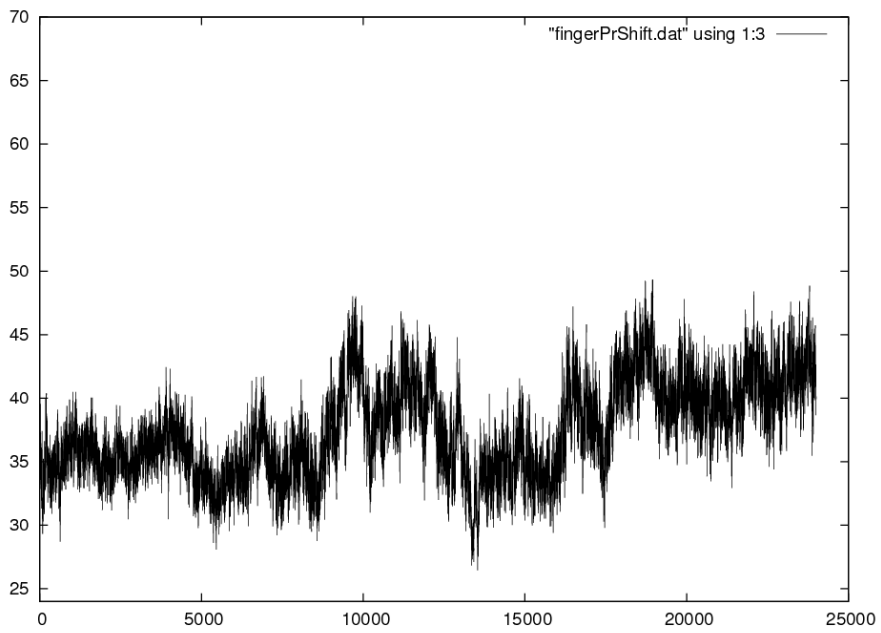
Annexe D 42 : M_NUaGAL réplique III



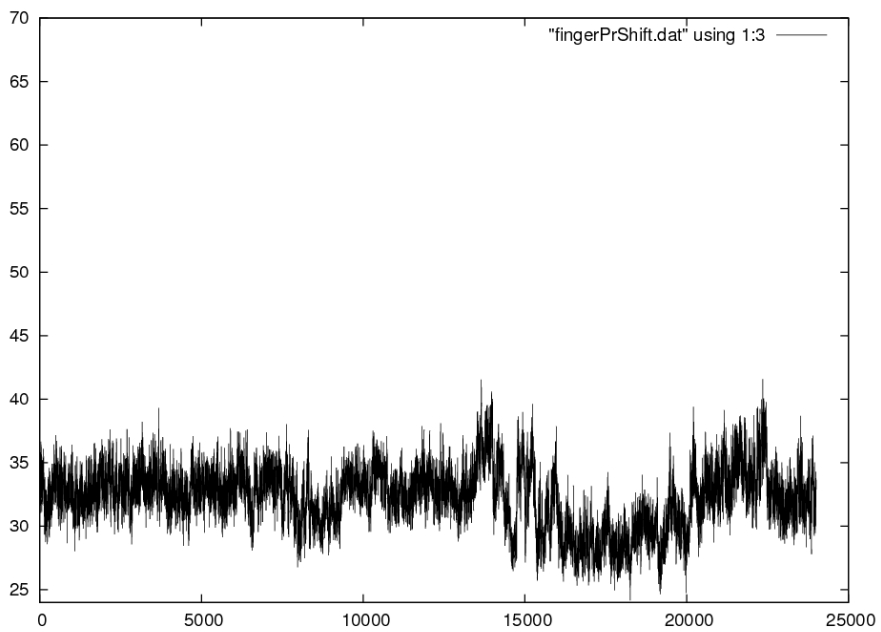
Annexe D 43 : M_OCH réplique I



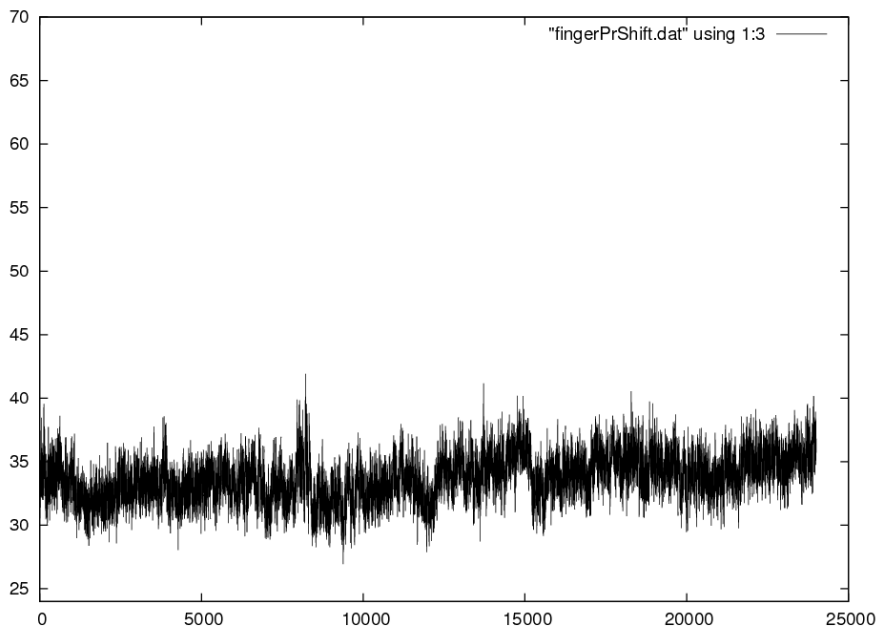
Annexe D 44 : M_OCH réplique II



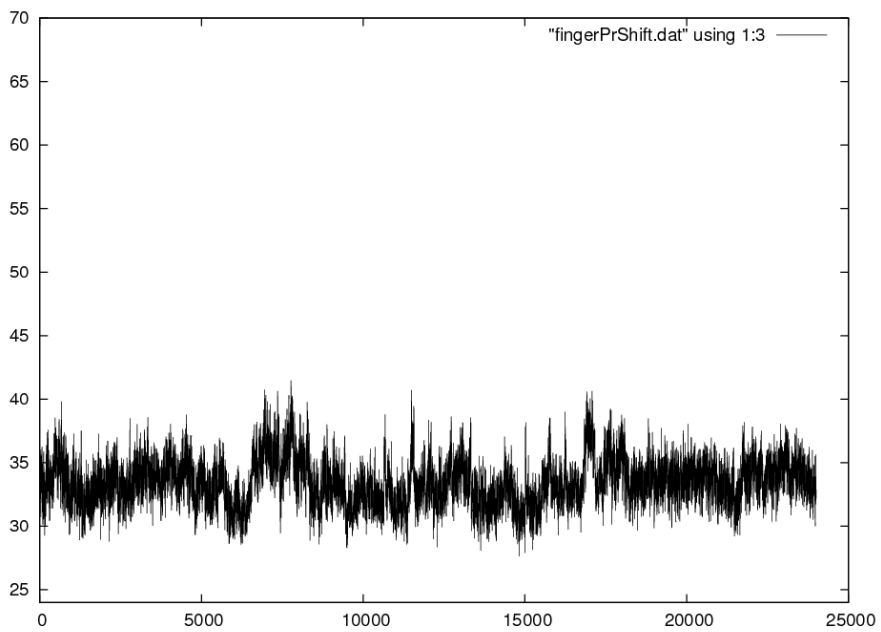
Annexe D 45 : M_OCH réplique III



Annexe D 46 : M_SaGAL réplique I



Annexe D 47 : M_SaGAL réplique II



Annexe D 48 : M_SaGAL réplique III

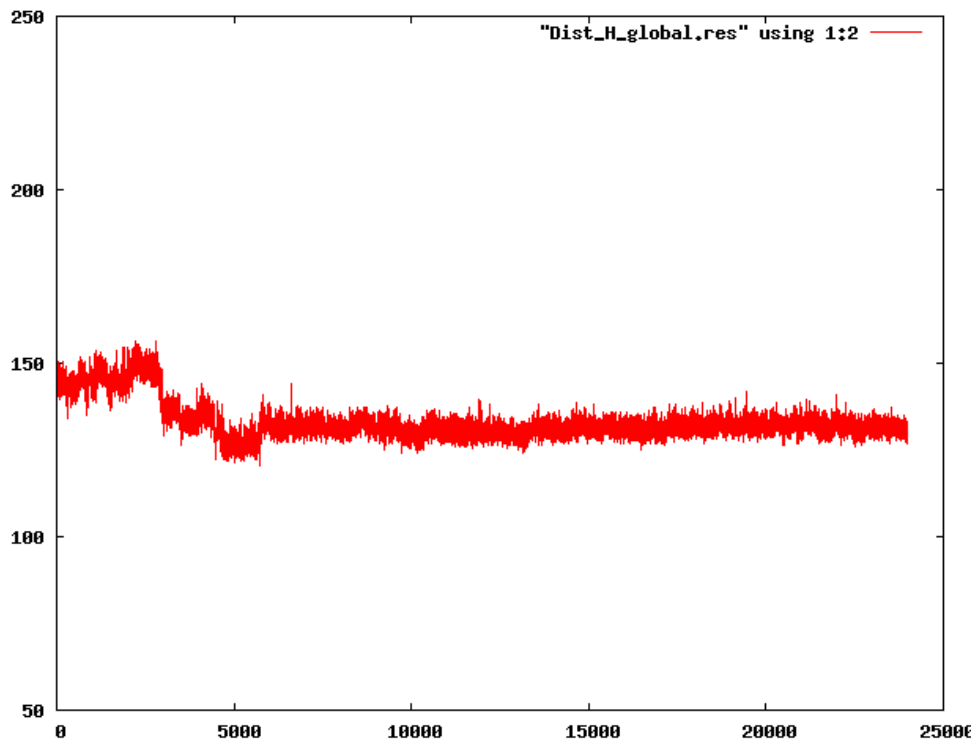
Annexe E – Distance inter-hélices

Dans tous les graphes, sont représentés en abscisse le temps associé à chaque conformation comparé (unité = 10ps) et en ordonnée la distance inter-hélice en angström.

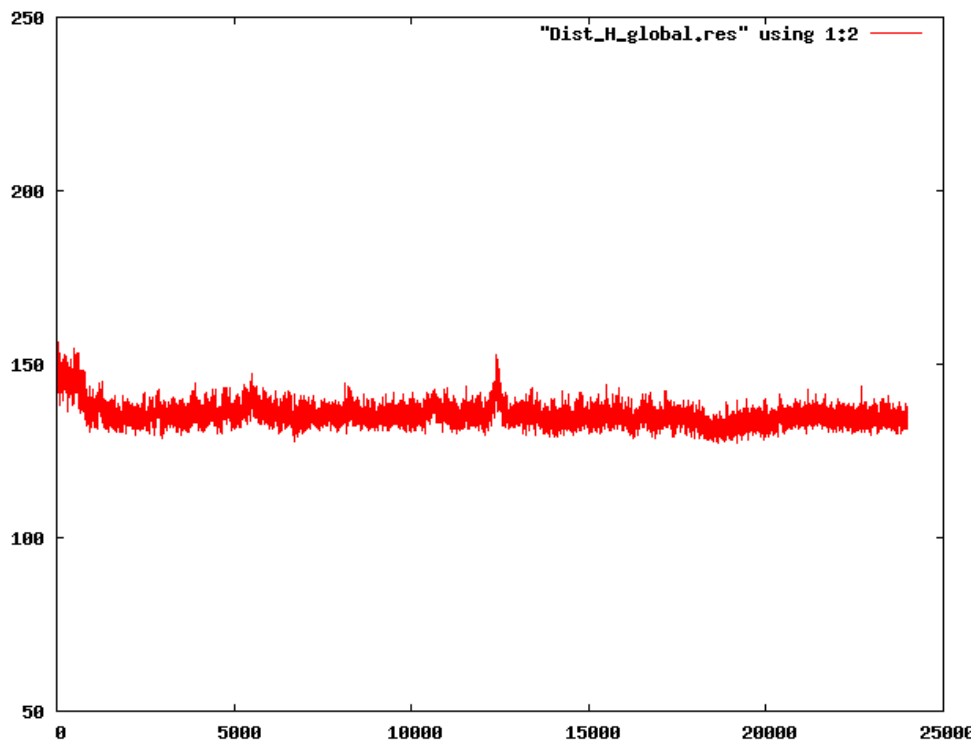
Annexe E 1 : H_7DW poche A' réplique I	224
Annexe E 2 : H_7DW poche A' réplique II	224
Annexe E 3 : H_7DW poche A' réplique III	225
Annexe E 4 : H_aGAL poche A' réplique I	225
Annexe E 5 : H_aGAL poche A' réplique II	226
Annexe E 6 : H_aGAL poche A' réplique III	226
Annexe E 7 : H_CD1d poche A' réplique I	227
Annexe E 8 : H_CD1d poche A' réplique II	227
Annexe E 9 : H_CD1d poche A' réplique III	228
Annexe E 10 : H_GOF poche A' réplique I	228
Annexe E 11 : H_GOF poche A' réplique II	229
Annexe E 12 : H_GOF poche A' réplique III.....	229
Annexe E 13 : H_LIP poche A' réplique I.....	230
Annexe E 14 : H_LIP poche A' réplique II.....	230
Annexe E 15 : H_LIP poche A' réplique III.....	231
Annexe E 16 : H_NUaGAL poche A' réplique I	231
Annexe E 17 : H_NUaGAL poche A' réplique II	232
Annexe E 18 : H_NUaGAL poche A' réplique III	232
Annexe E 19 : H_OCH poche A' réplique I	233
Annexe E 20 : H_OCH poche A' réplique II	233
Annexe E 21 : H_OCH poche A' réplique III	234
Annexe E 22 : H_OCH9 poche A' réplique I	234
Annexe E 23 : H_OCH9 poche A' réplique II	235
Annexe E 24 : H_OCH9 poche A' réplique III	235
Annexe E 25 : H_SaGAL poche A' réplique I.....	236
Annexe E 26 : H_SaGAL poche A' réplique II.....	236
Annexe E 27 : H_SaGAL poche A' réplique III.....	237
Annexe E 28 : M_7DW poche A' réplique I.....	237
Annexe E 29 : M_7DW poche A' réplique II.....	238
Annexe E 30 : M_7DW poche A' réplique III.....	238

Annexe E 31 : M_aGAL poche A' réplique I.....	239
Annexe E 32 : M_aGAL poche A' réplique II.....	239
Annexe E 33 : M_aGAL poche A' réplique III.....	240
Annexe E 34 : M_AZOL poche A' réplique I.....	240
Annexe E 35 : M_AZOL poche A' réplique II.....	241
Annexe E 36 : M_AZOL poche A' réplique III.....	241
Annexe E 37 : M_GOF poche A' réplique I.....	242
Annexe E 38 : M_GOF poche A' réplique II.....	242
Annexe E 39 : M_GOF poche A' réplique III.....	243
Annexe E 40 : M_NUaGAL poche A' réplique I.....	243
Annexe E 41 : M_NUaGAL poche A' réplique II.....	244
Annexe E 42 : M_NUaGAL poche A' réplique III.....	244
Annexe E 43 : M_OCH poche A' réplique I.....	245
Annexe E 44 : M_OCH poche A' réplique II.....	245
Annexe E 45 : M_OCH poche A' réplique III.....	246
Annexe E 46 : M_SaGAL poche A' réplique I.....	246
Annexe E 47 : M_SaGAL poche A' réplique II.....	247
Annexe E 48 : M_SaGAL poche A' réplique III.....	247
Annexe E 49 : H_7DW distance totale réplique I.....	248
Annexe E 50 : H_7DW distance totale réplique II.....	248
Annexe E 51 : H_7DW distance totale réplique III.....	249
Annexe E 52 : H_aGAL distance totale réplique I.....	249
Annexe E 53 : H_aGAL distance totale réplique II.....	250
Annexe E 54 : H_aGAL distance totale réplique III.....	250
Annexe E 55 : H_CD1d distance totale réplique I.....	251
Annexe E 56 : H_CD1d distance totale réplique II.....	251
Annexe E 57 : H_CD1d distance totale réplique III.....	252
Annexe E 58 : H_GOF distance totale réplique I.....	252
Annexe E 59 : H_GOF distance totale réplique II.....	253
Annexe E 60 : H_GOF distance totale réplique III.....	253
Annexe E 61 : H_LIP distance totale réplique I.....	254
Annexe E 62 : H_LIP distance totale réplique II.....	254
Annexe E 63 : H_LIP distance totale réplique III.....	255
Annexe E 64 : H_NUaGAL distance totale réplique I.....	255

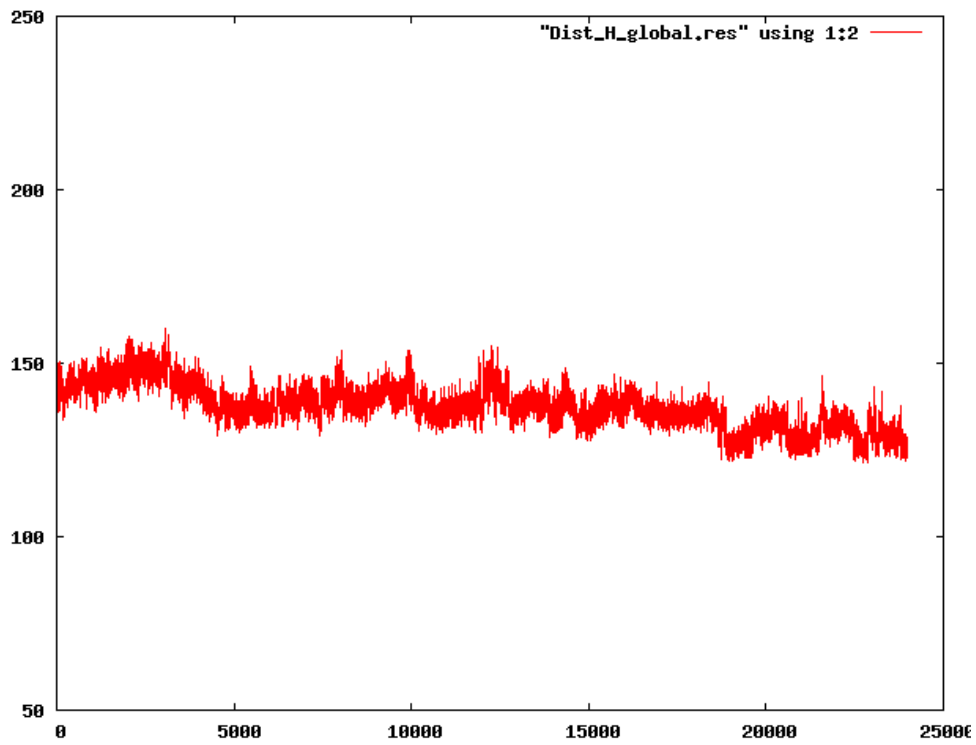
Annexe E 65 : H_NUaGAL distance totale réplique II	256
Annexe E 66 : H_NUaGAL distance totale réplique III	256
Annexe E 67 : H_OCH distance totale réplique I	257
Annexe E 68 : H_OCH distance totale réplique II	257
Annexe E 69 : H_OCH distance totale réplique III	258
Annexe E 70 : H_OCH9 distance totale réplique I	258
Annexe E 71 : H_OCH9 distance totale réplique II	259
Annexe E 72 : H_OCH9 distance totale réplique III	259
Annexe E 73 : H_SaGAL distance totale réplique I	260
Annexe E 74 : H_SaGAL distance totale réplique II	260
Annexe E 75 : H_SaGAL distance totale réplique III	261
Annexe E 76 : M_7DW distance totale réplique I	261
Annexe E 77 : M_7DW distance totale réplique II	262
Annexe E 78 : M_7DW distance totale réplique III	262
Annexe E 79 : M_aGAL distance totale réplique I	263
Annexe E 80 : M_aGAL distance totale réplique II	263
Annexe E 81 : M_aGAL distance totale réplique III	264
Annexe E 82 : M_AZOL distance totale réplique I	264
Annexe E 83 : M_AZOL distance totale réplique II	265
Annexe E 84 : M_AZOL distance totale réplique III	265
Annexe E 85 : M_GOF distance totale réplique I	266
Annexe E 86 : M_GOF distance totale réplique II	266
Annexe E 87 : M_GOF distance totale réplique III	267
Annexe E 88 : M_NUaGAL distance totale réplique I	267
Annexe E 89 : M_NUaGAL distance totale réplique II	268
Annexe E 90 : M_NUaGAL distance totale réplique III	268
Annexe E 91 : M_OCH distance totale réplique I	269
Annexe E 92 : M_OCH distance totale réplique II	269
Annexe E 93 : M_OCH distance totale réplique III	270
Annexe E 94 : M_SaGAL distance totale réplique I	270
Annexe E 95 : M_SaGAL distance totale réplique II	271
Annexe E 96 : M_SaGAL distance totale réplique III	271



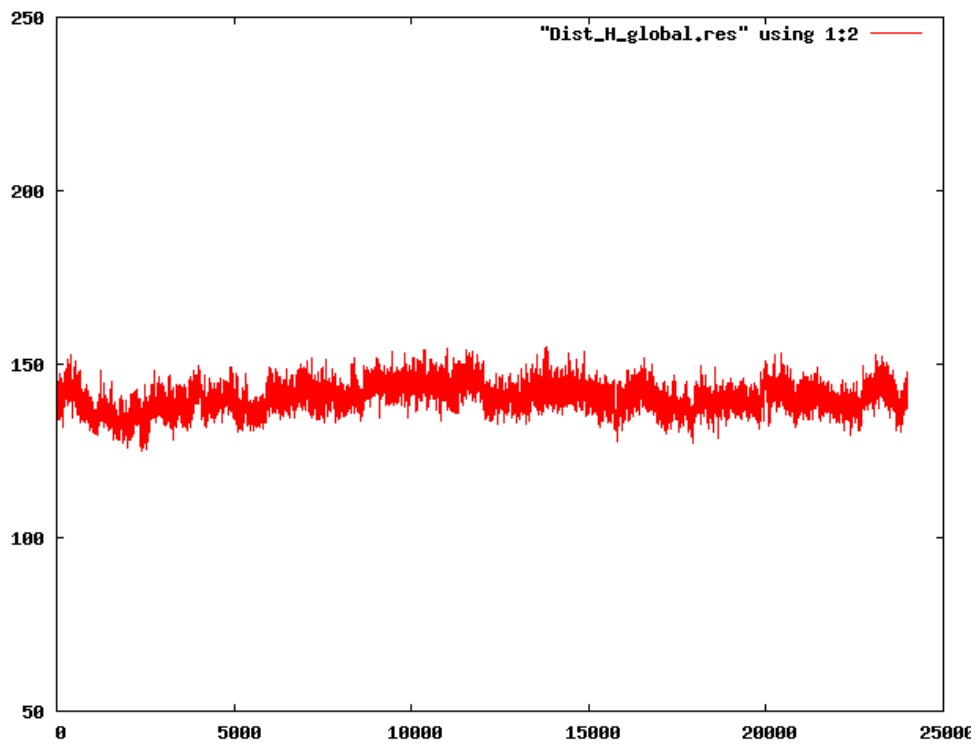
Annexe E 1 : H_7DW poche A' réplique I



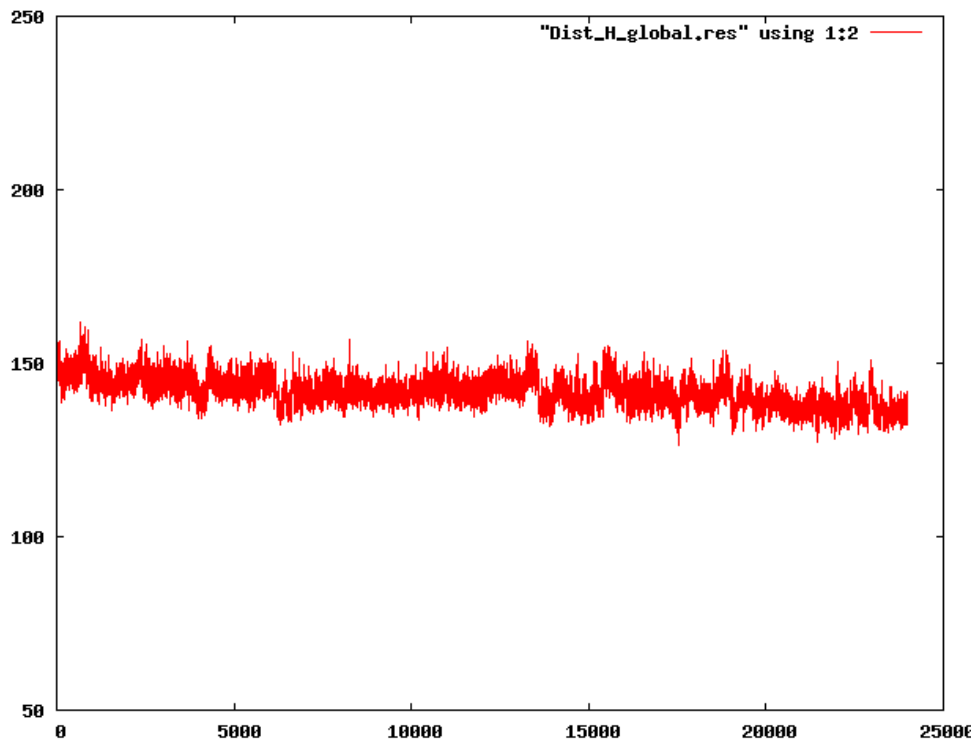
Annexe E 2 : H_7DW poche A' réplique II



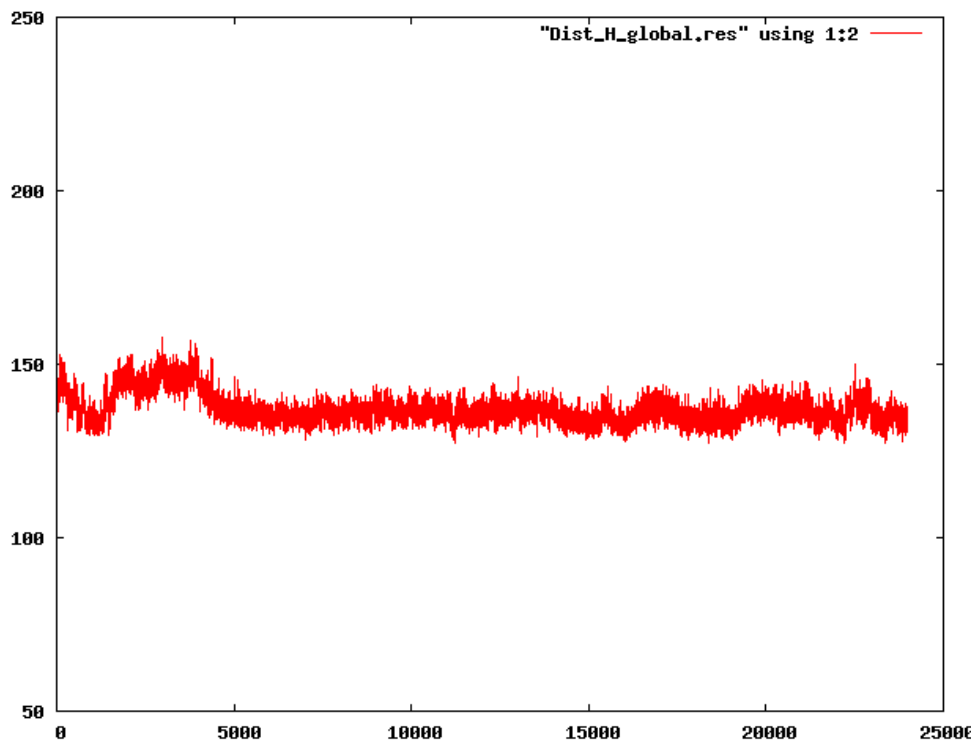
Annexe E 3 : H_7DW poche A' réplique III



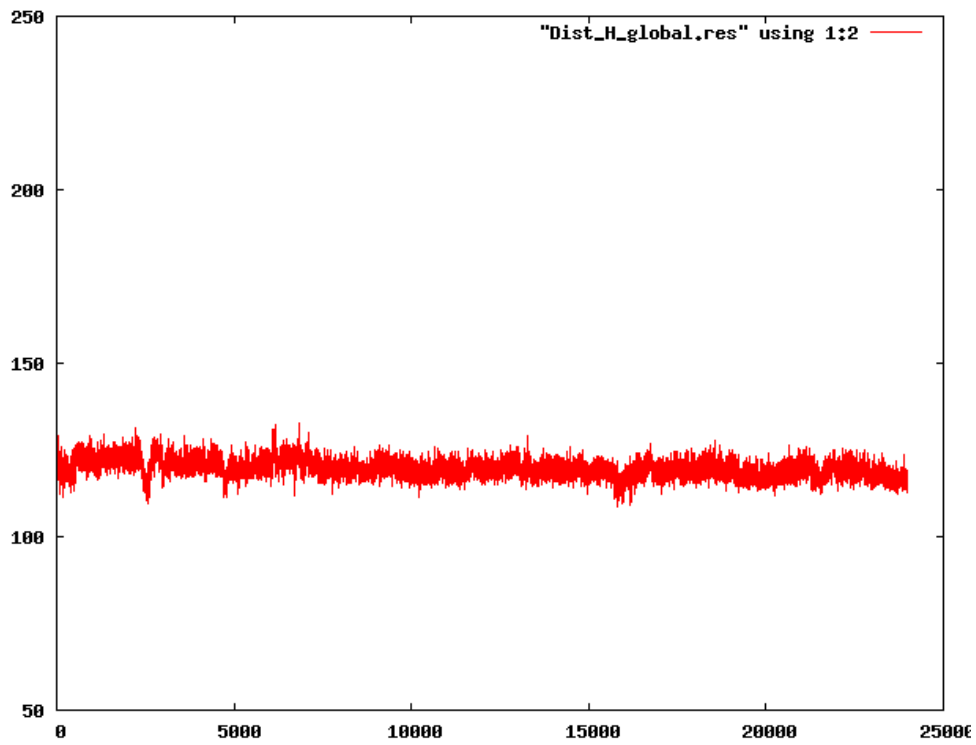
Annexe E 4 : H_aGAL poche A' réplique I



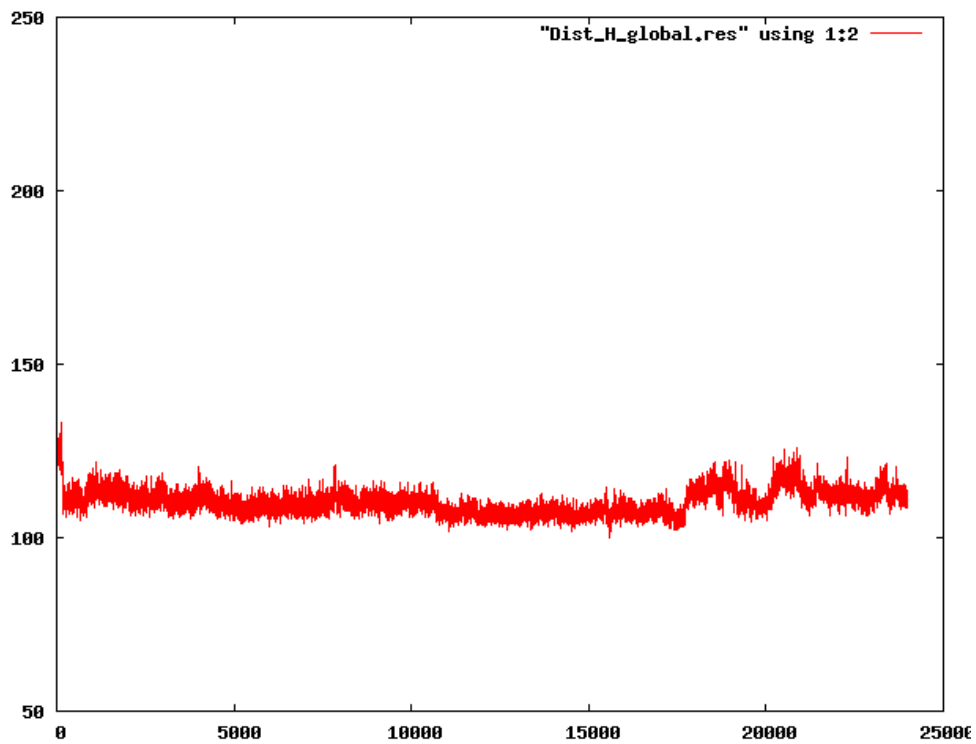
Annexe E 5 : H_aGAL poche A' réplique II



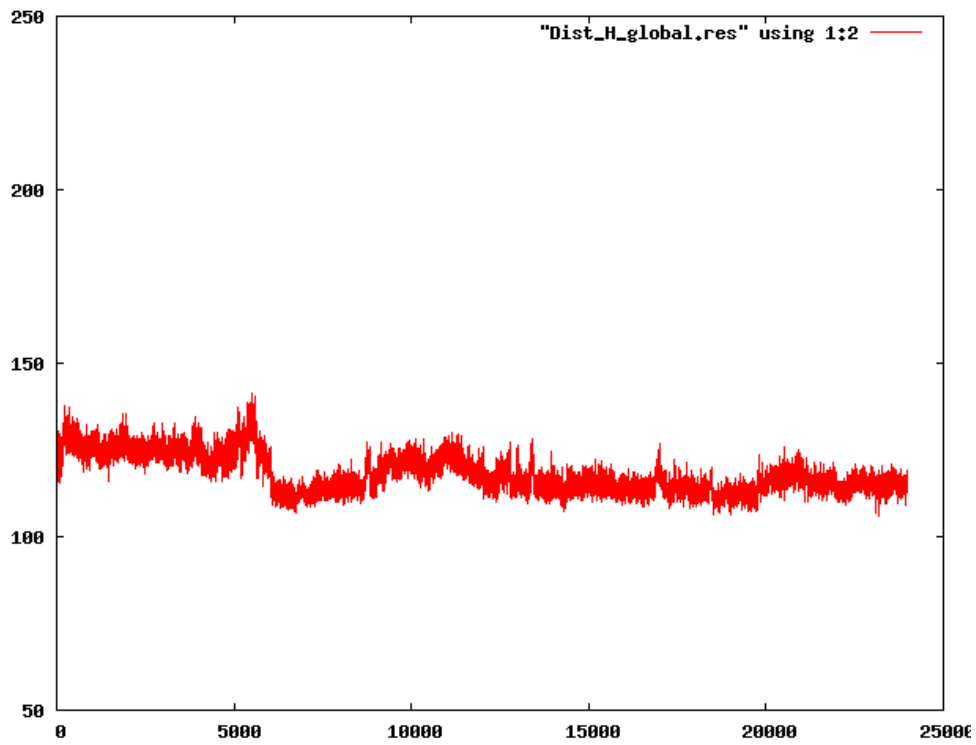
Annexe E 6 : H_aGAL poche A' réplique III



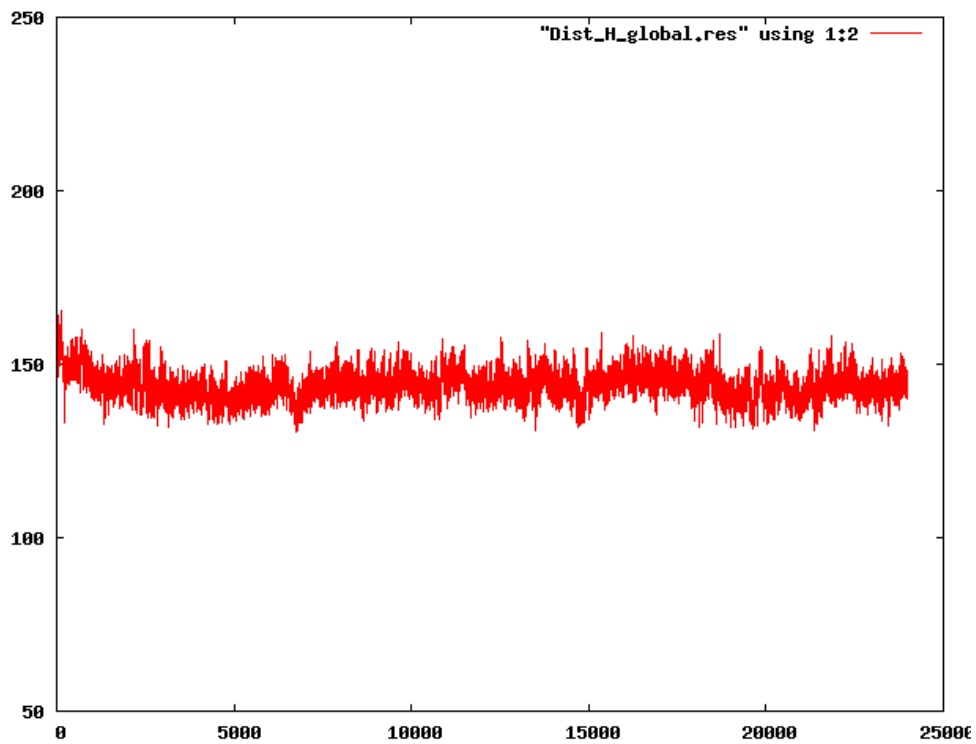
Annexe E 7 : H_CD1d poche A' réplique I



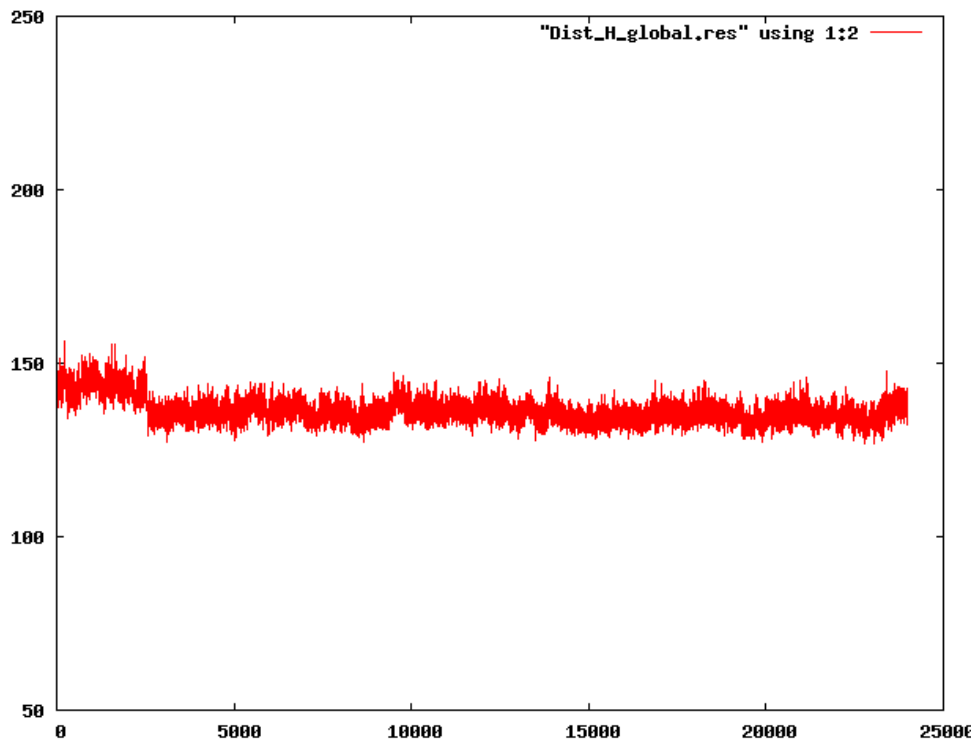
Annexe E 8 : H_CD1d poche A' réplique II



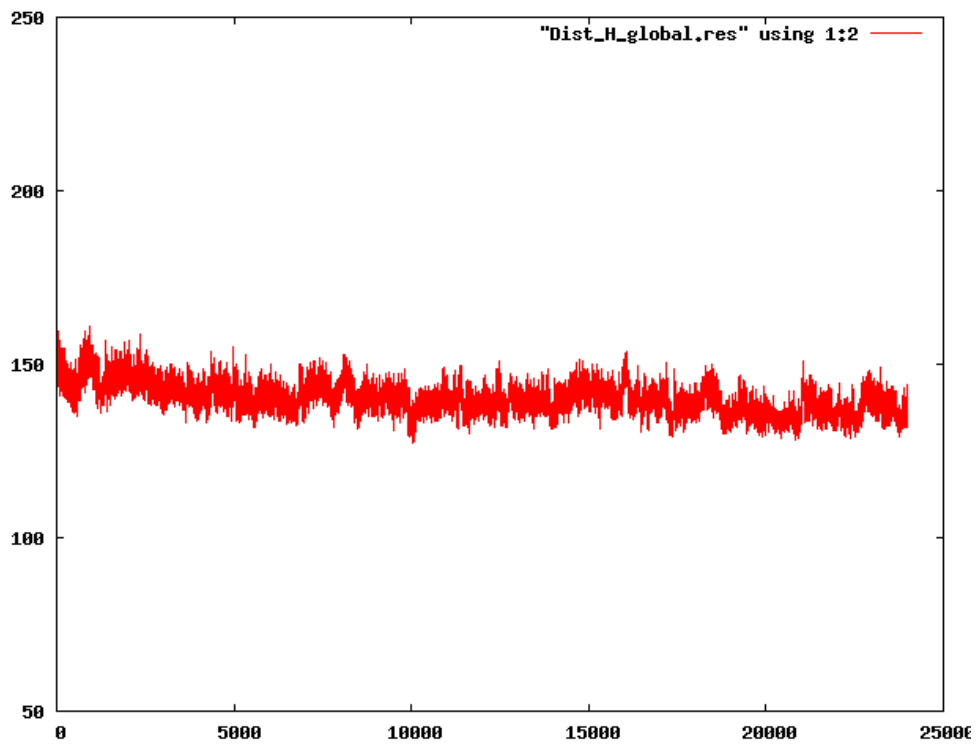
Annexe E 9 : H_CD1d poche A' réplique III



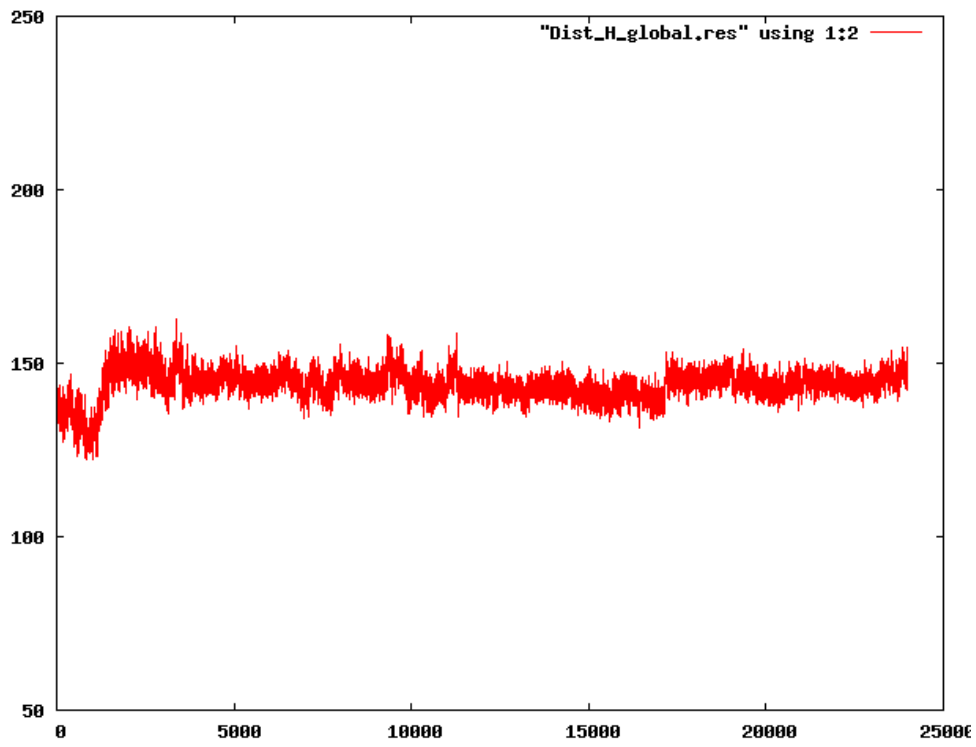
Annexe E 10 : H_GOF poche A' réplique I



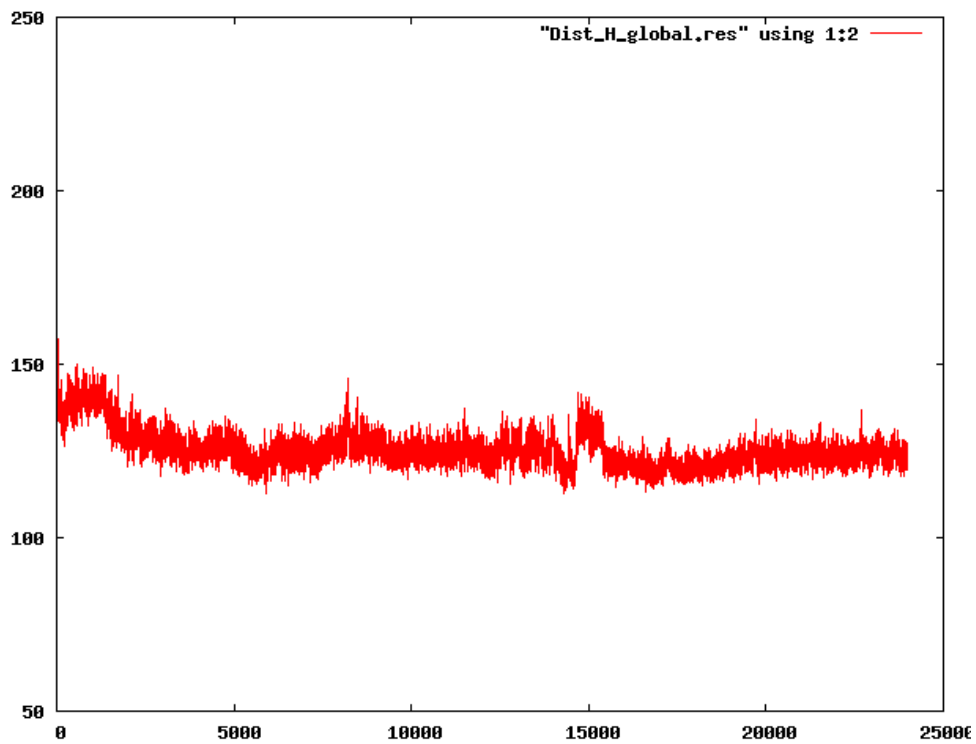
Annexe E 11 : H_GOF poche A' réplique II



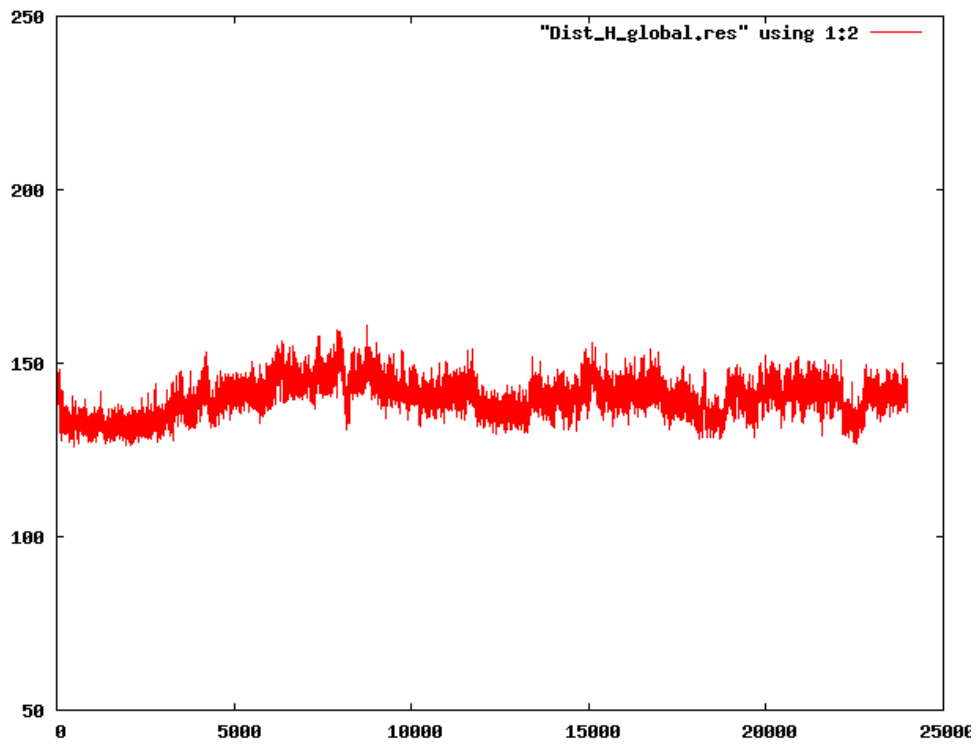
Annexe E 12 : H_GOF poche A' réplique III



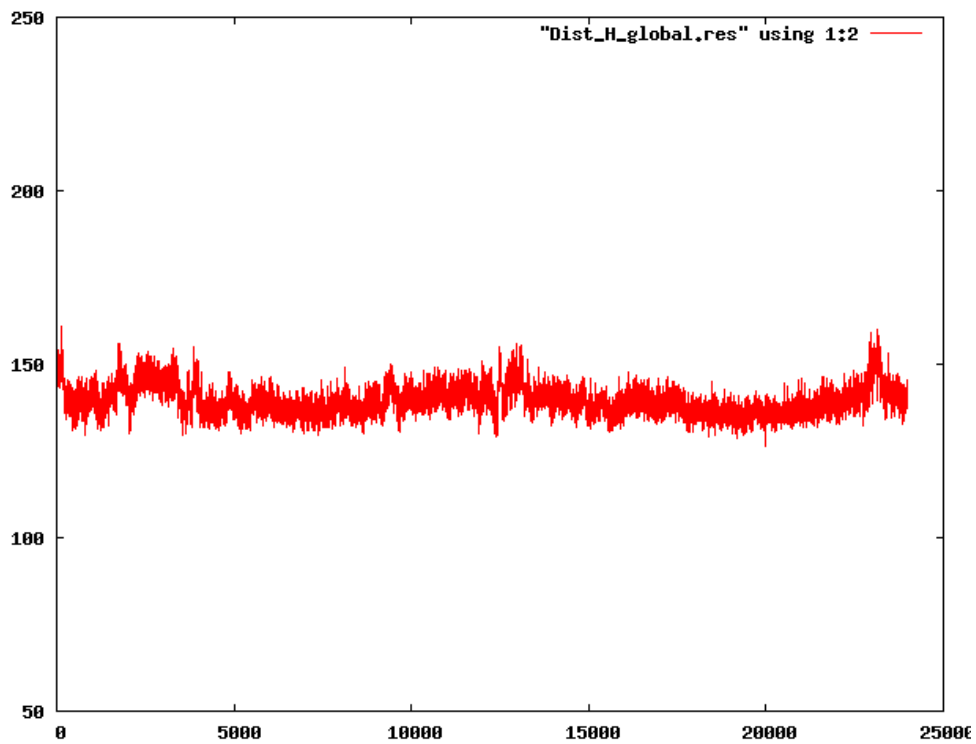
Annexe E 13 : H_LIP poche A' réplique I



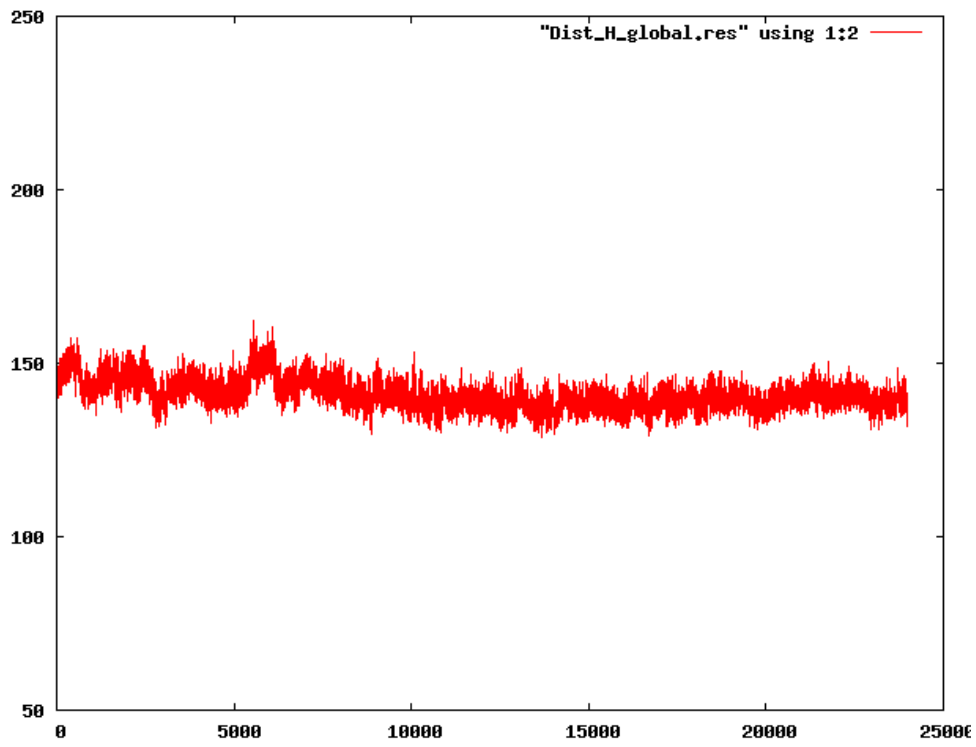
Annexe E 14 : H_LIP poche A' réplique II



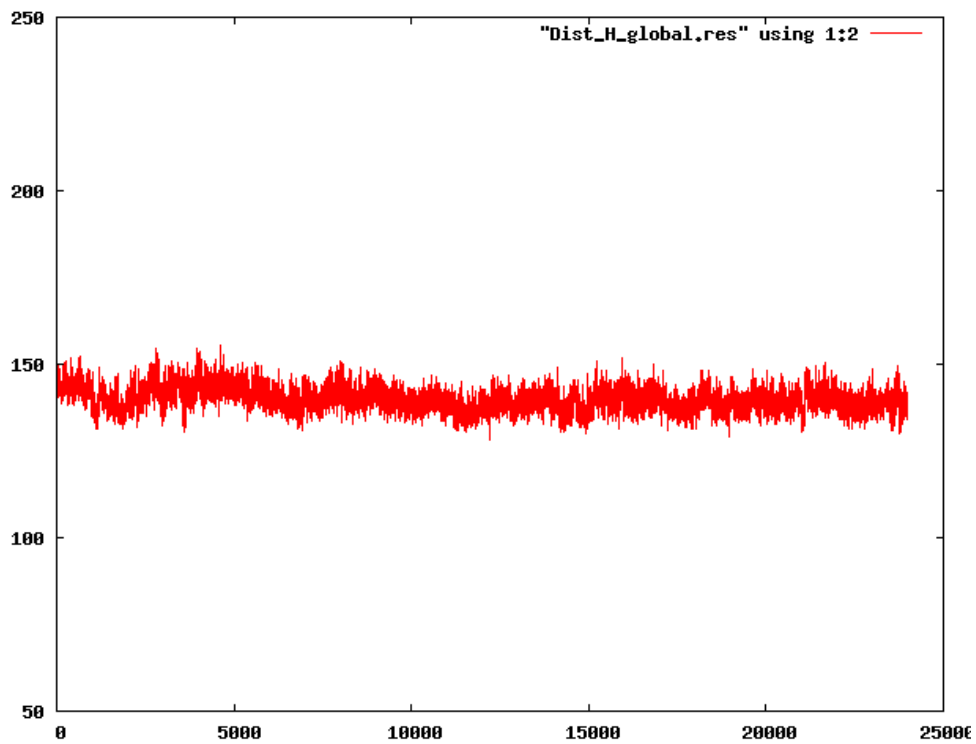
Annexe E 15 : H_LIP poche A' réplique III



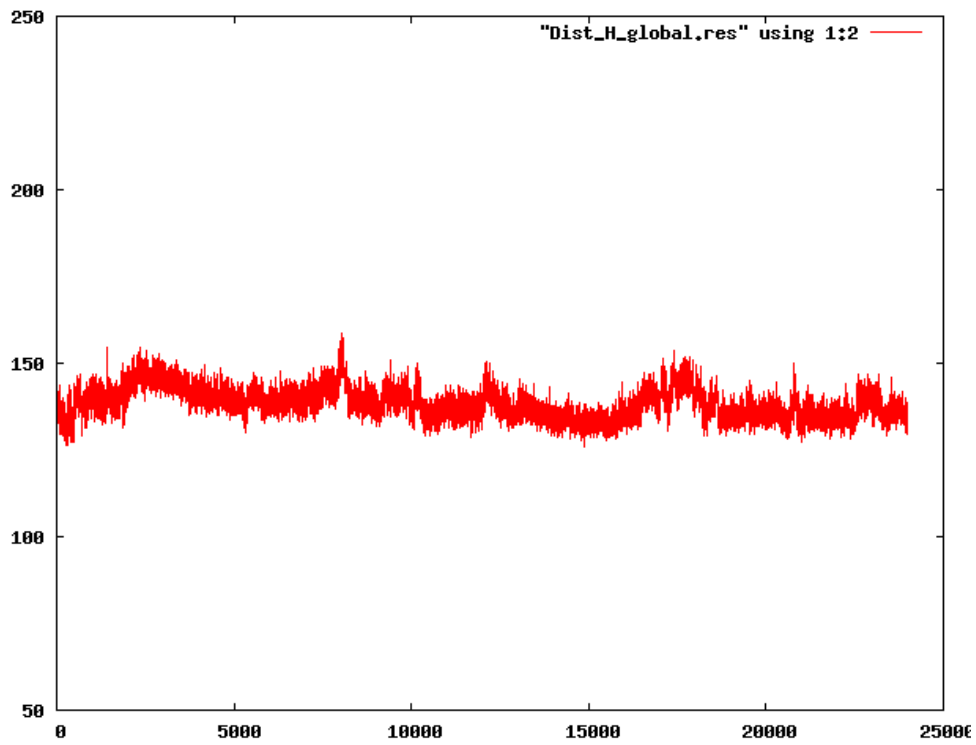
Annexe E 16 : H_NUaGAL poche A' réplique I



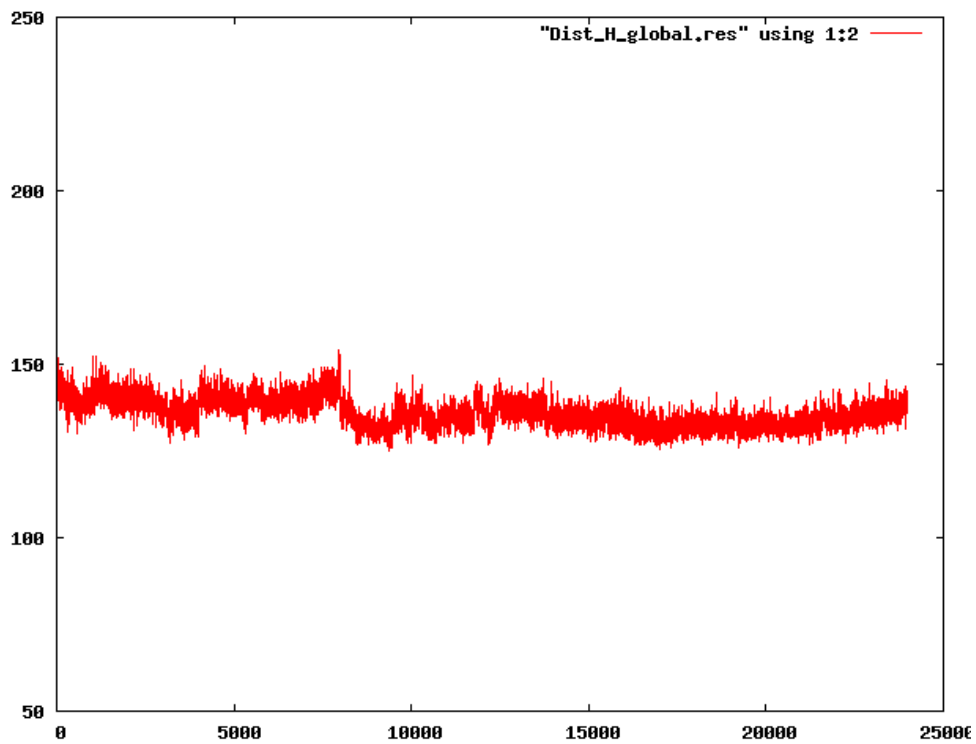
Annexe E 17 : H_NUaGAL poche A' réplique II



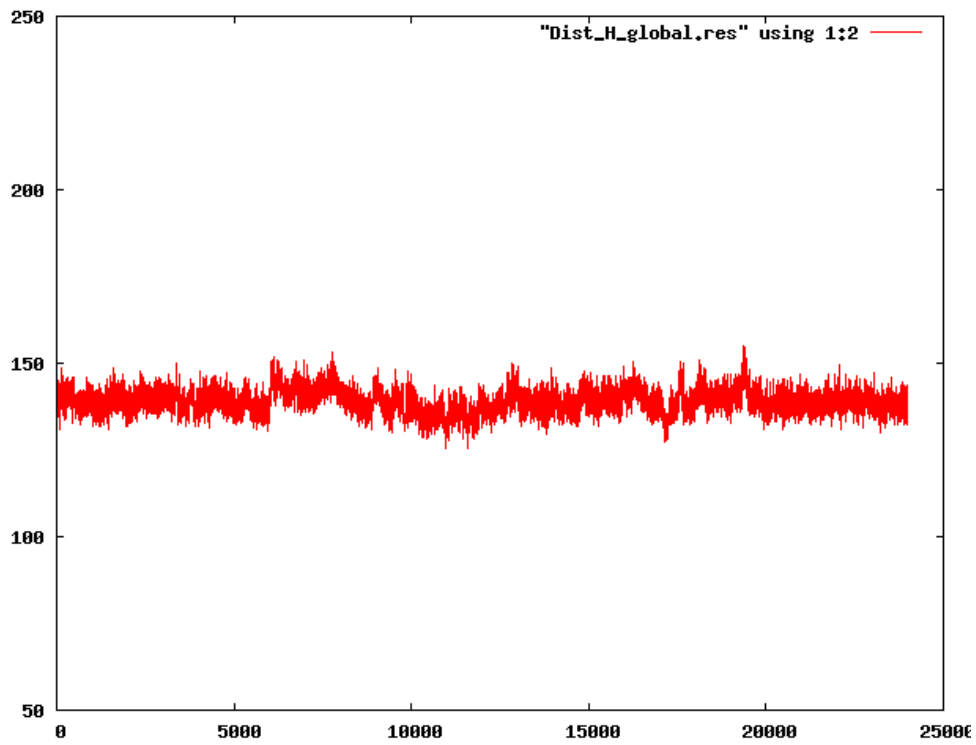
Annexe E 18 : H_NUaGAL poche A' réplique III



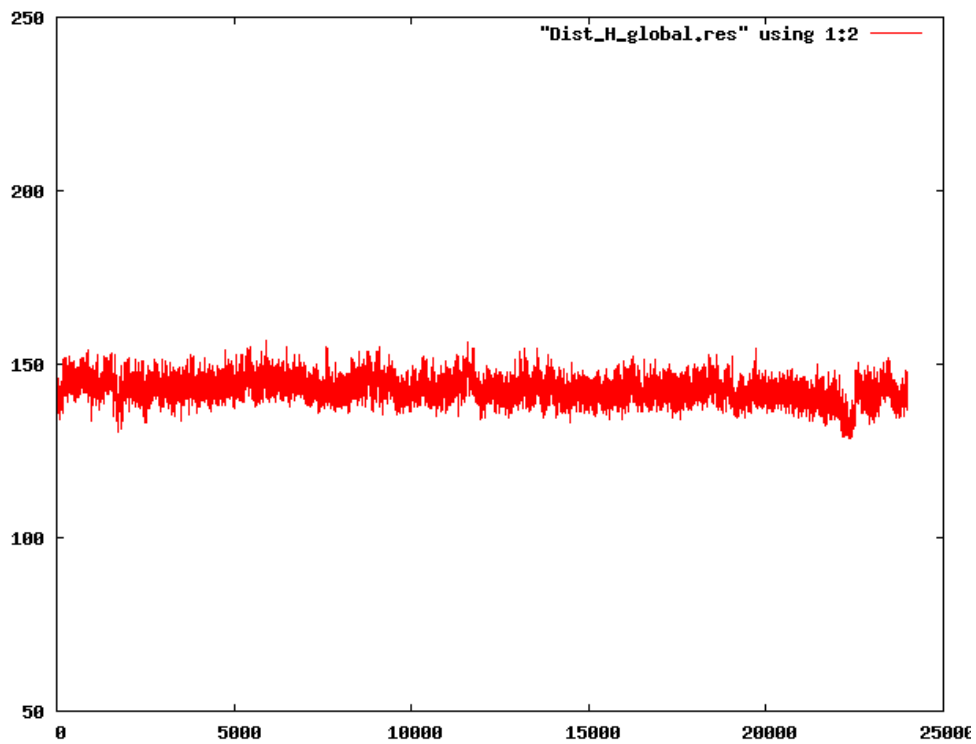
Annexe E 19 : H_OCH poche A' réplique I



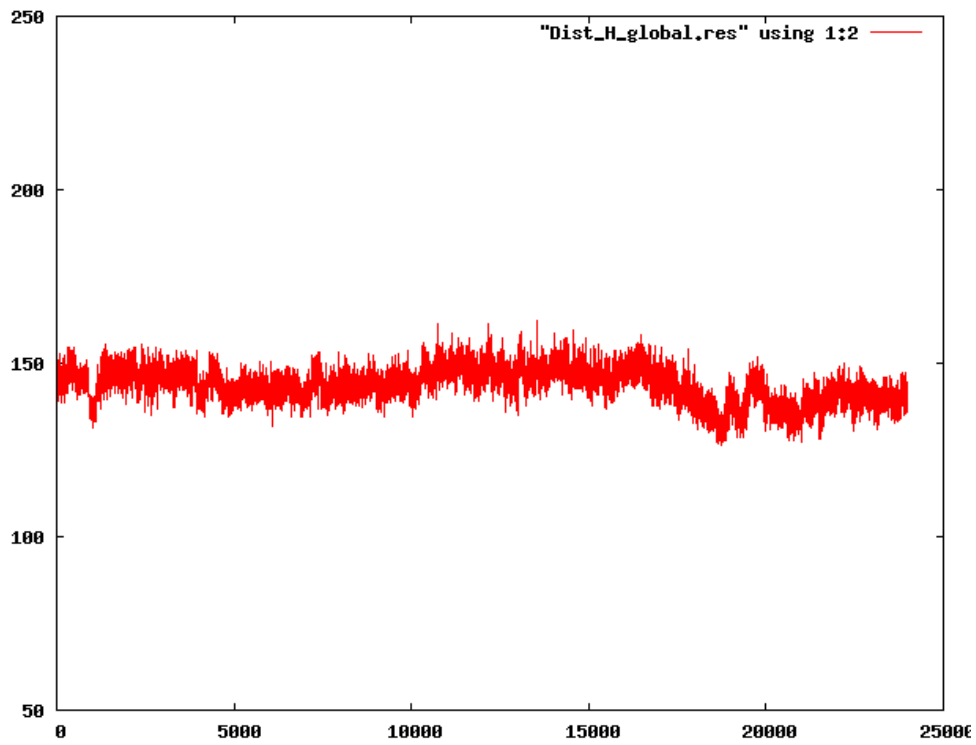
Annexe E 20 : H_OCH poche A' réplique II



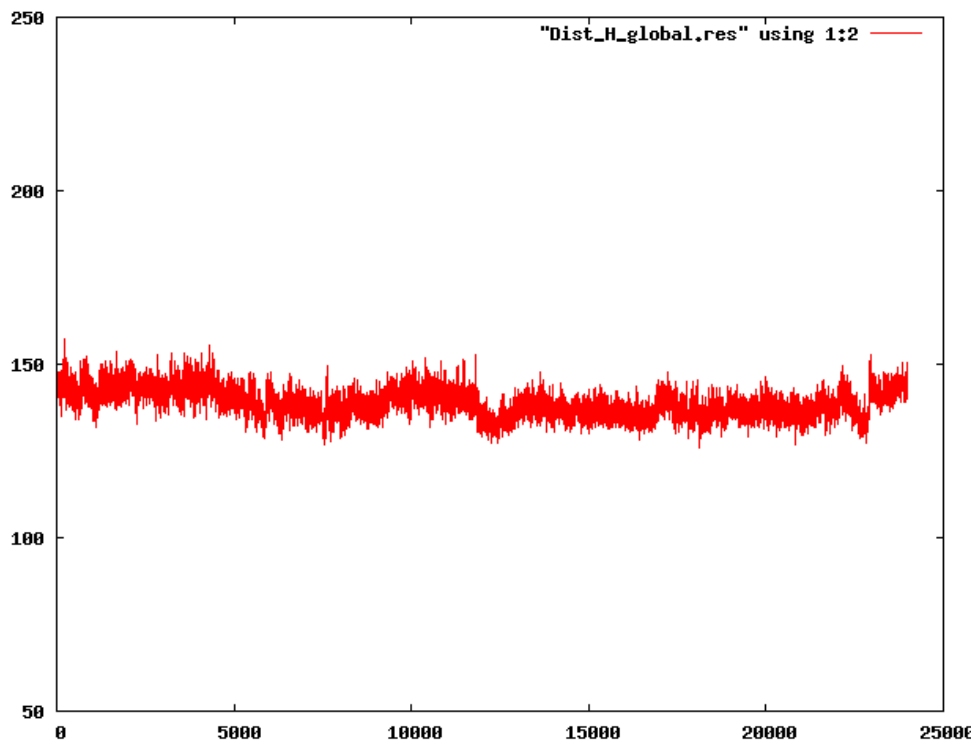
Annexe E 21 : H_OCH poche A' réplique III



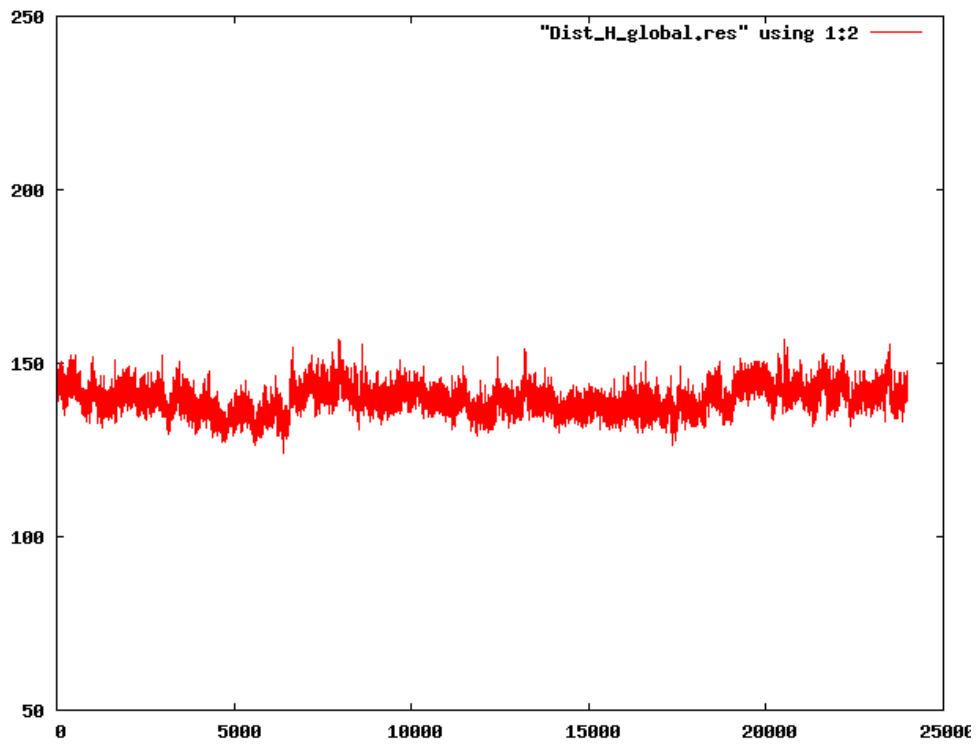
Annexe E 22 : H_OCH9 poche A' réplique I



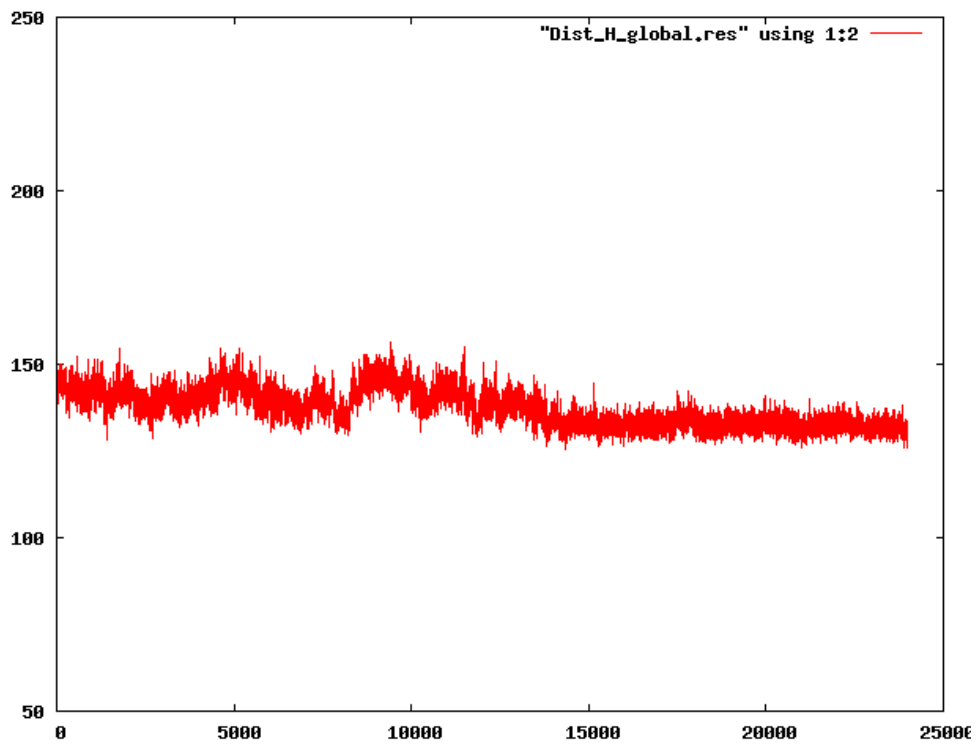
Annexe E 23 : H_OCH9 poche A' réplique II



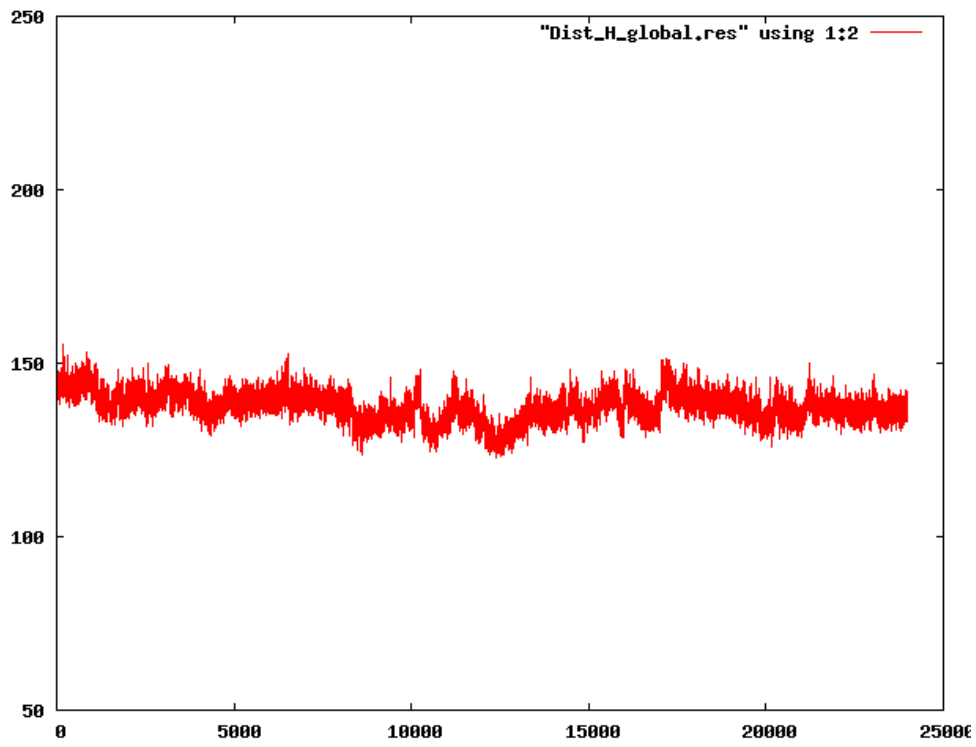
Annexe E 24 : H_OCH9 poche A' réplique III



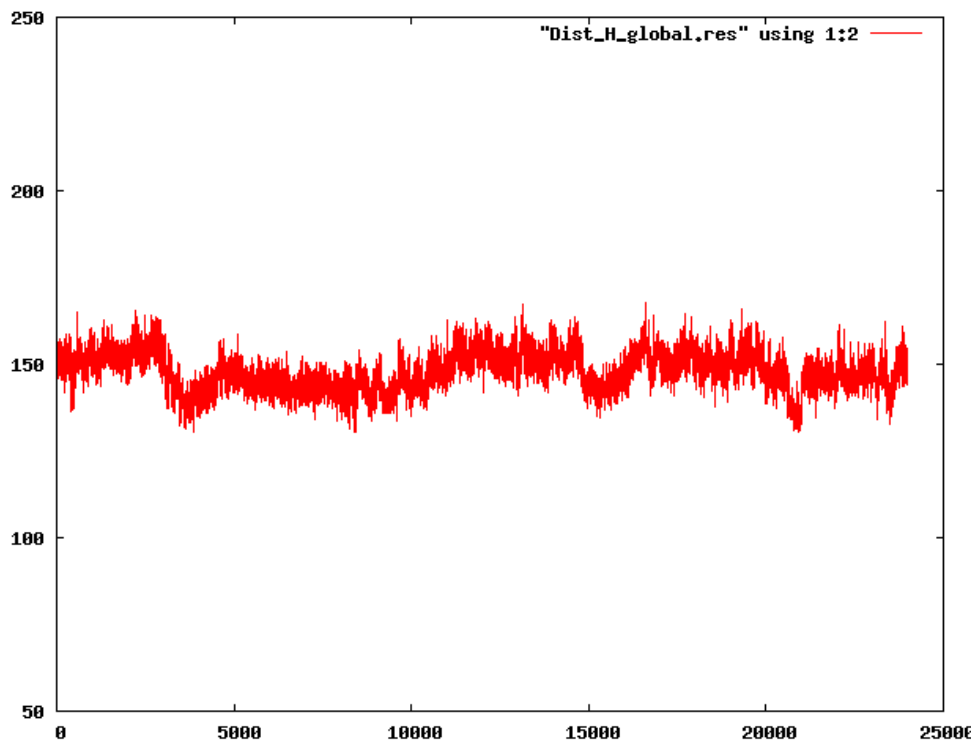
Annexe E 25 : H_SaGAL poche A' réplique I



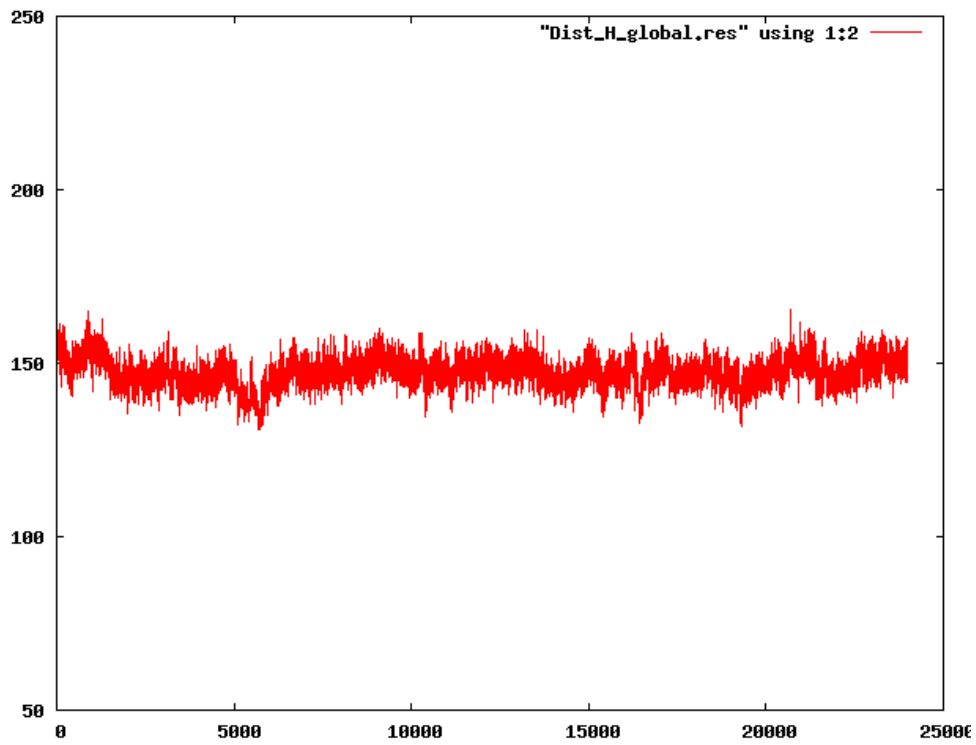
Annexe E 26 : H_SaGAL poche A' réplique II



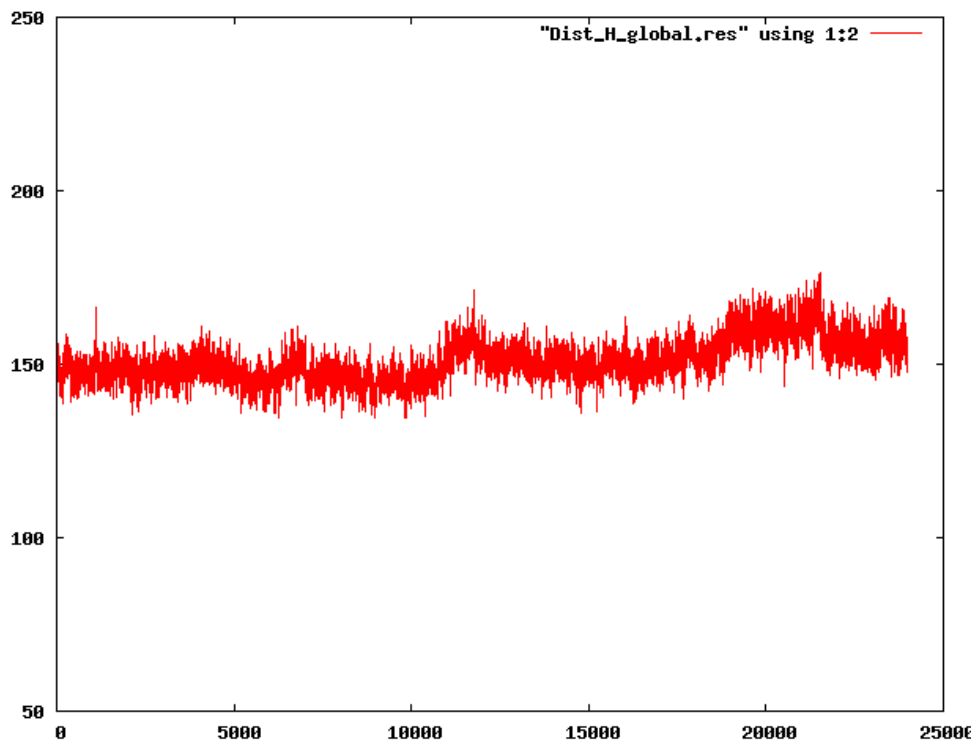
Annexe E 27 : H_SaGAL poche A' réplique III



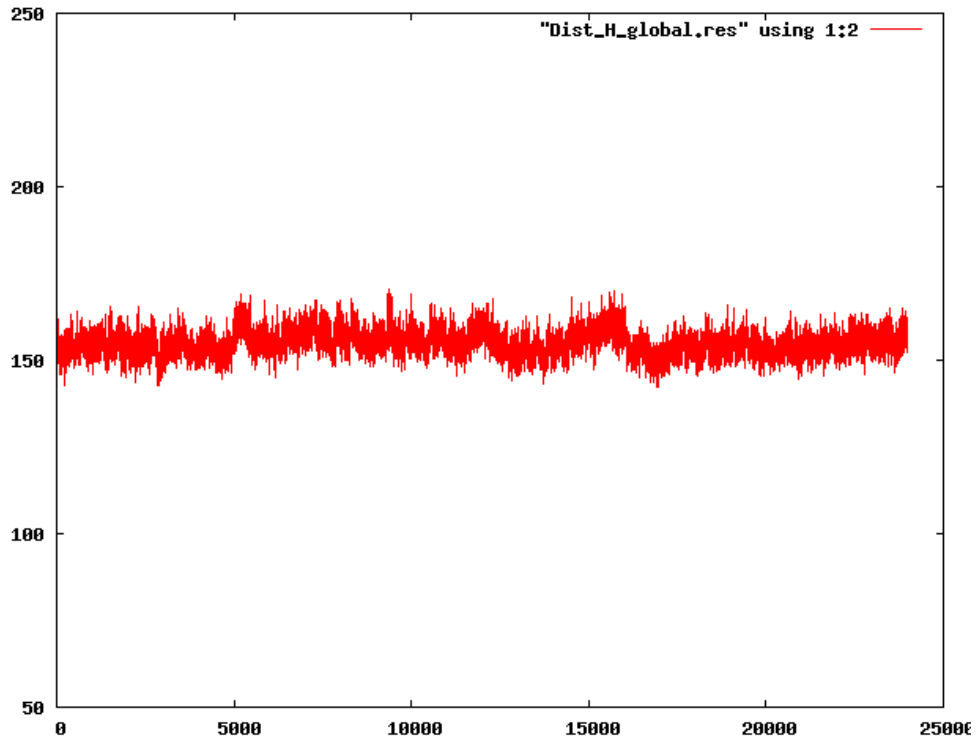
Annexe E 28 : M_7DW poche A' réplique I



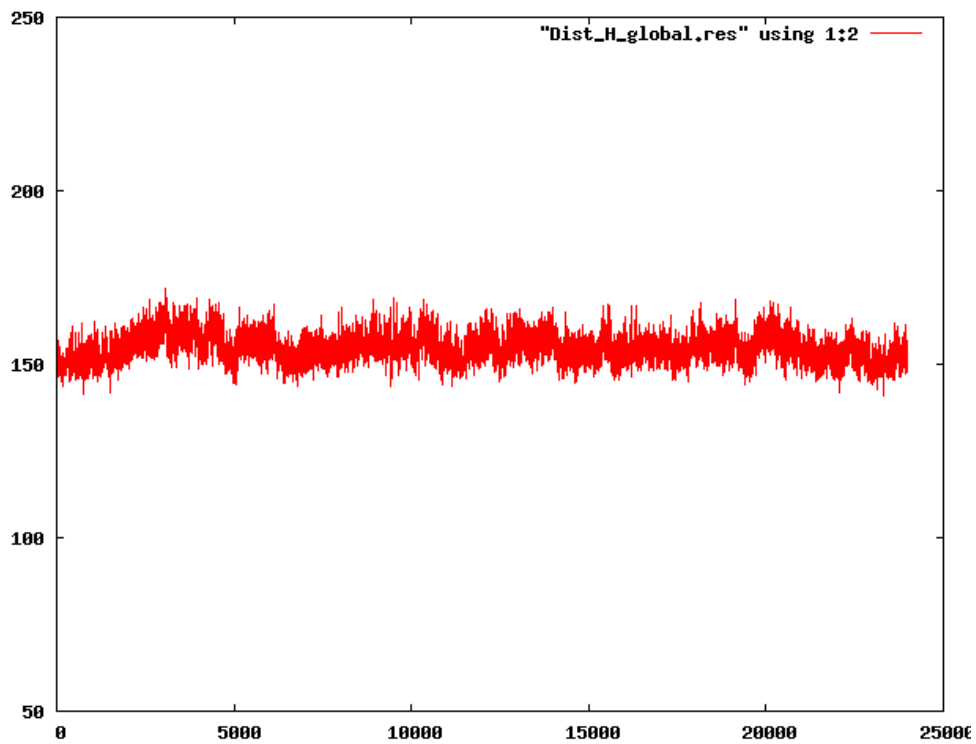
Annexe E 29 : M_7DW poche A' réplique II



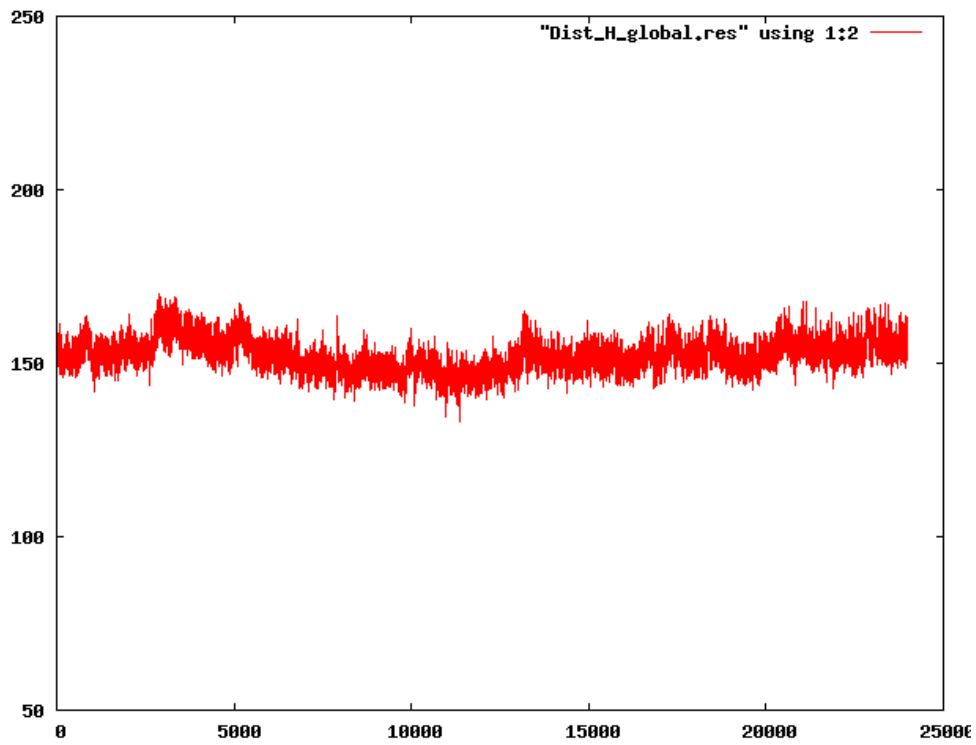
Annexe E 30 : M_7DW poche A' réplique III



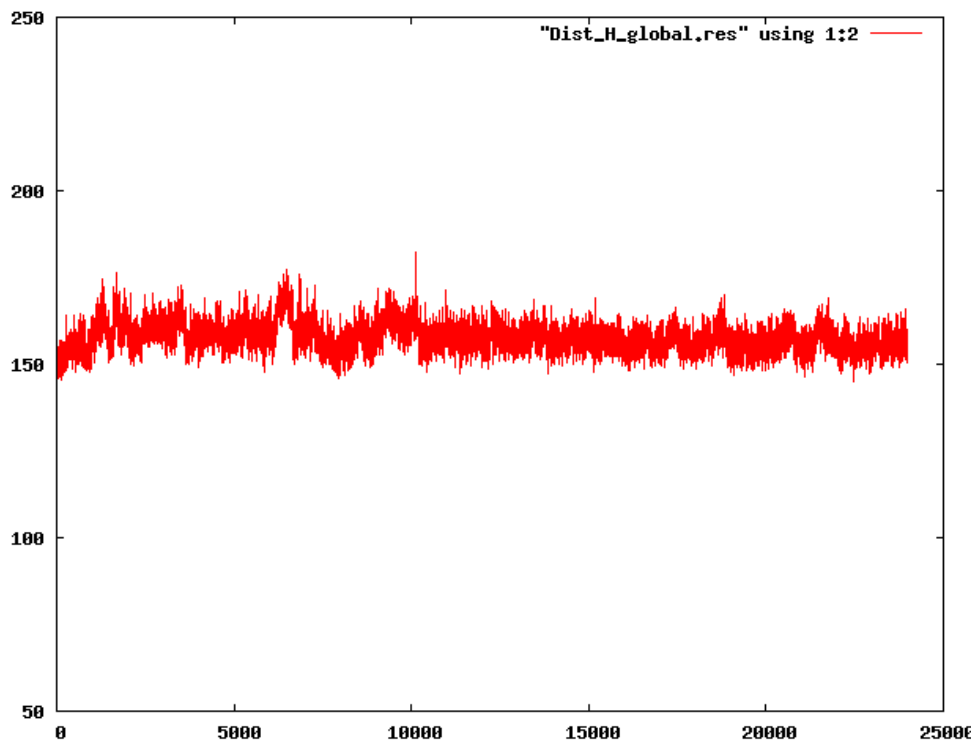
Annexe E 31 : M_aGAL poche A' réplique I



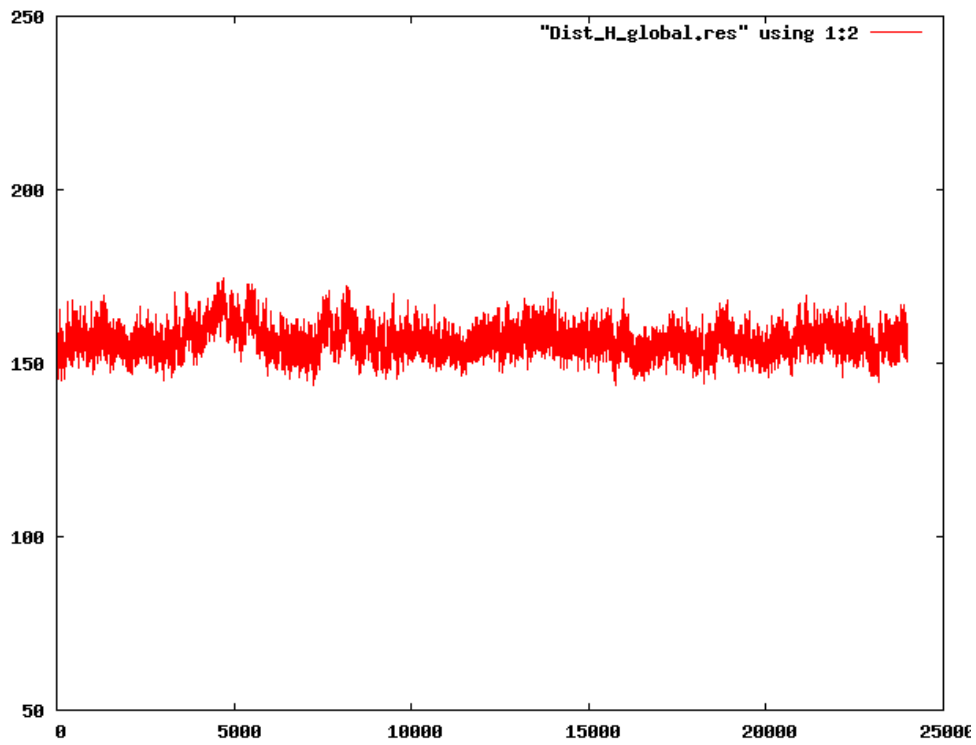
Annexe E 32 : M_aGAL poche A' réplique II



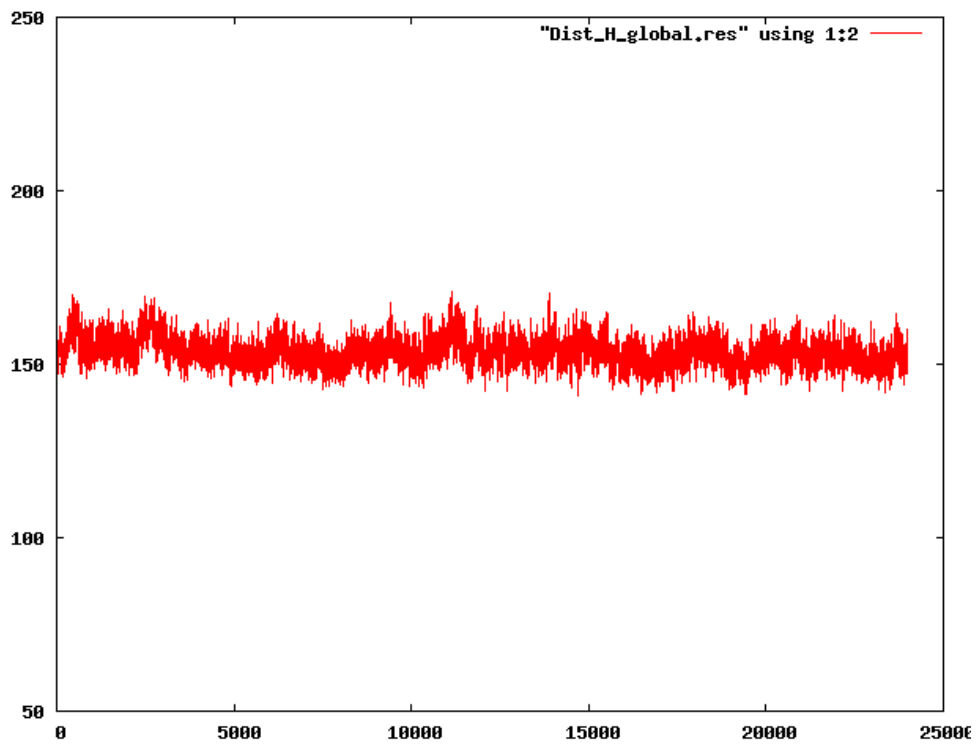
Annexe E 33 : M_aGAL poche A' réplique III



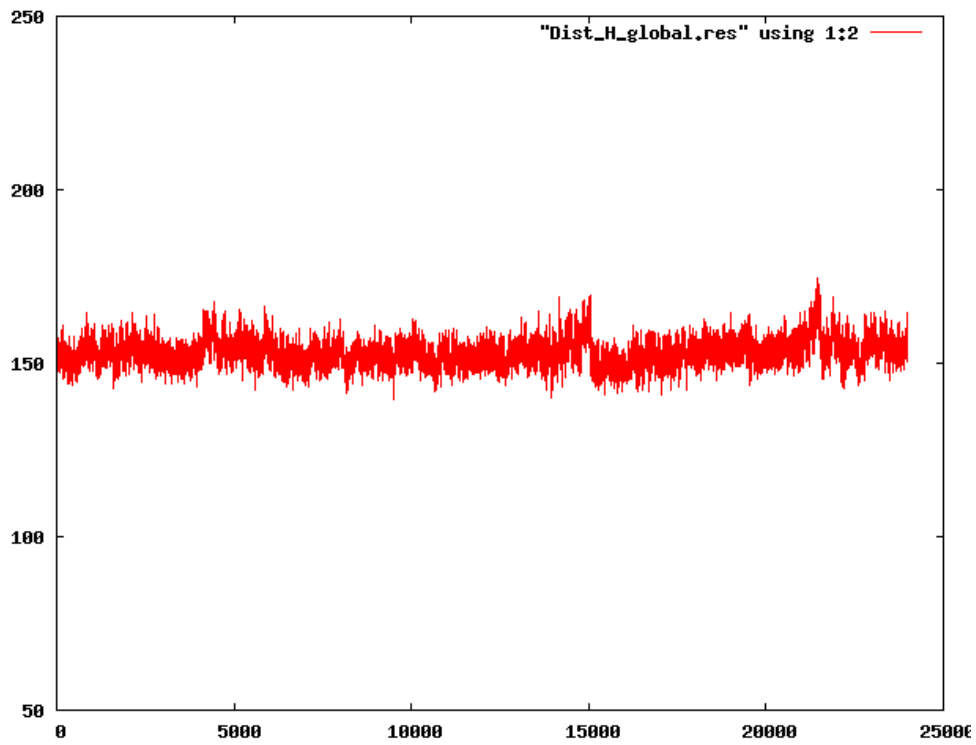
Annexe E 34 : M_AZOL poche A' réplique I



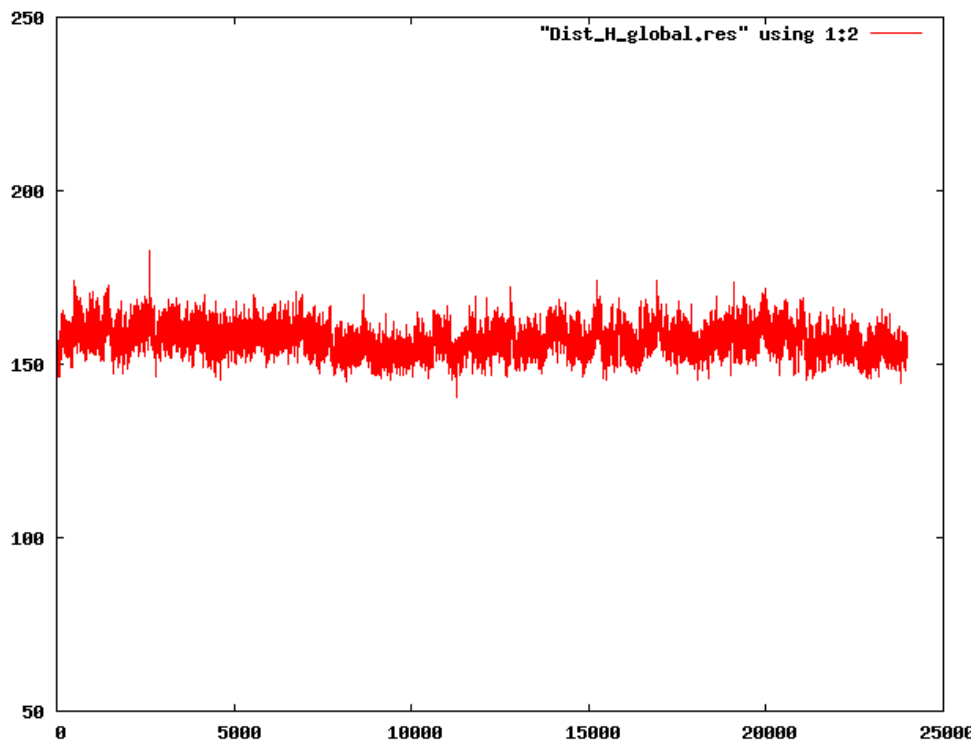
Annexe E 35 : M_AZOL poche A' réplique II



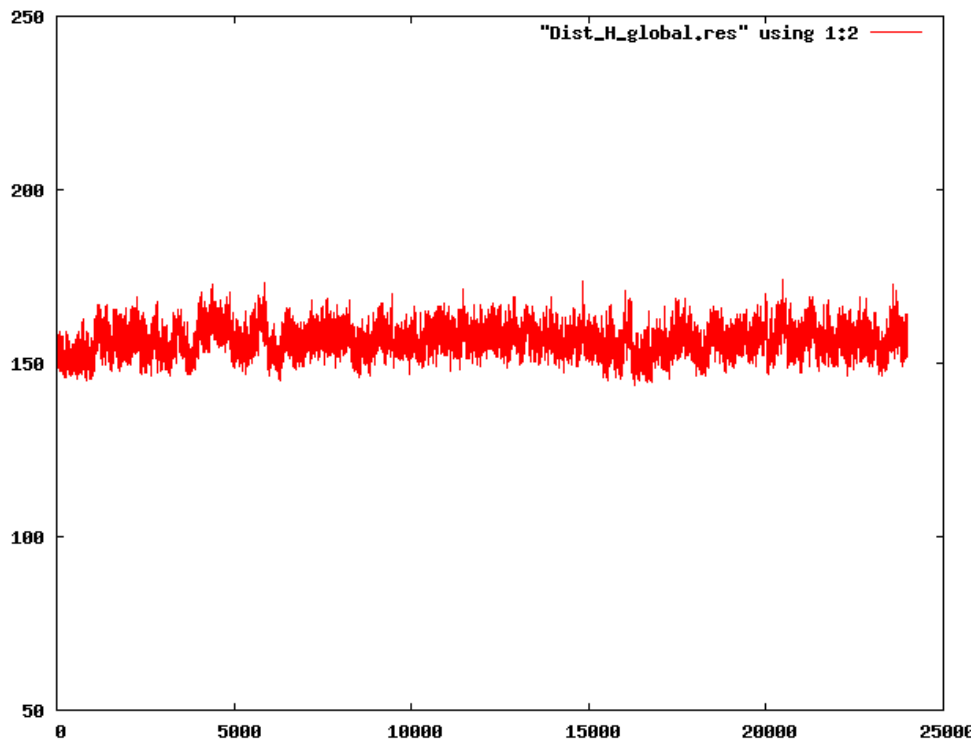
Annexe E 36 : M_AZOL poche A' réplique III



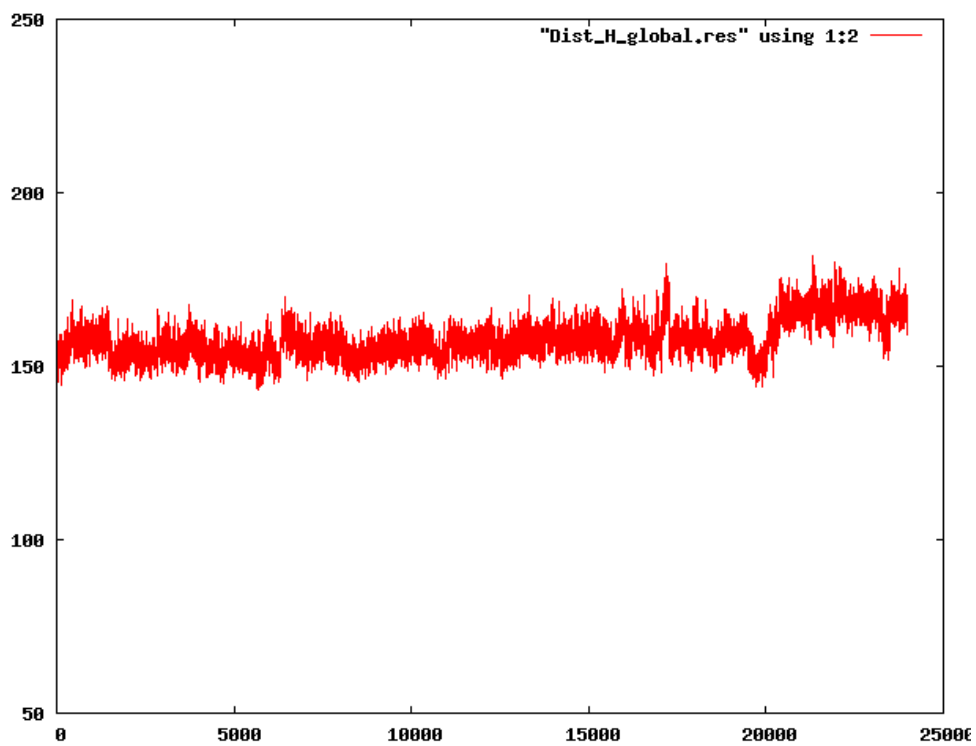
Annexe E 37 : M_GOF poche A' réplique I



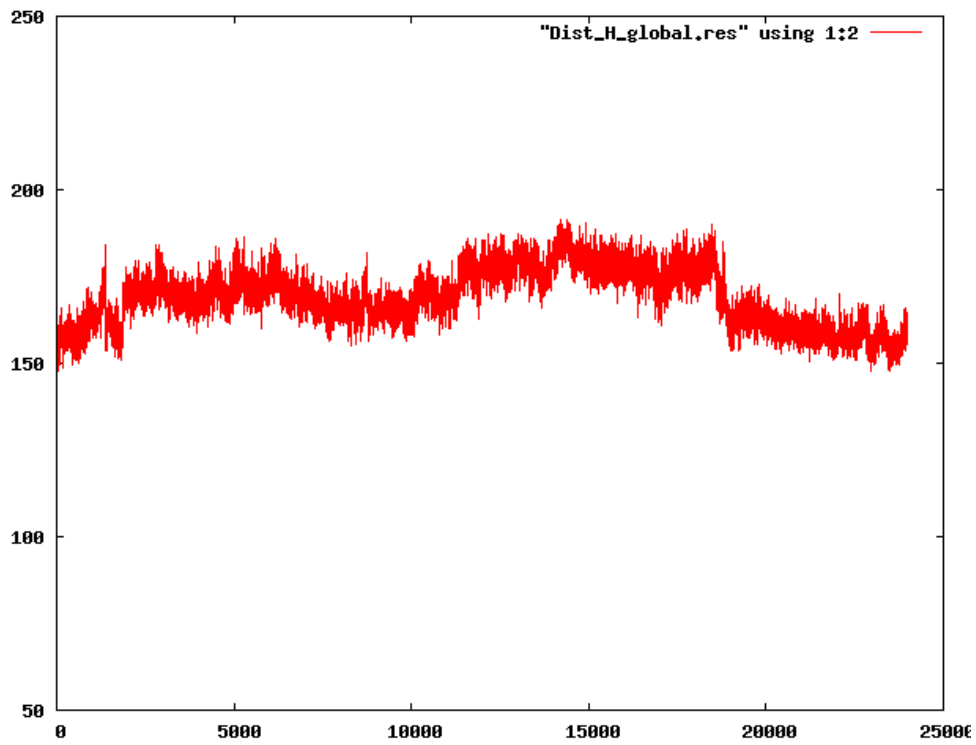
Annexe E 38 : M_GOF poche A' réplique II



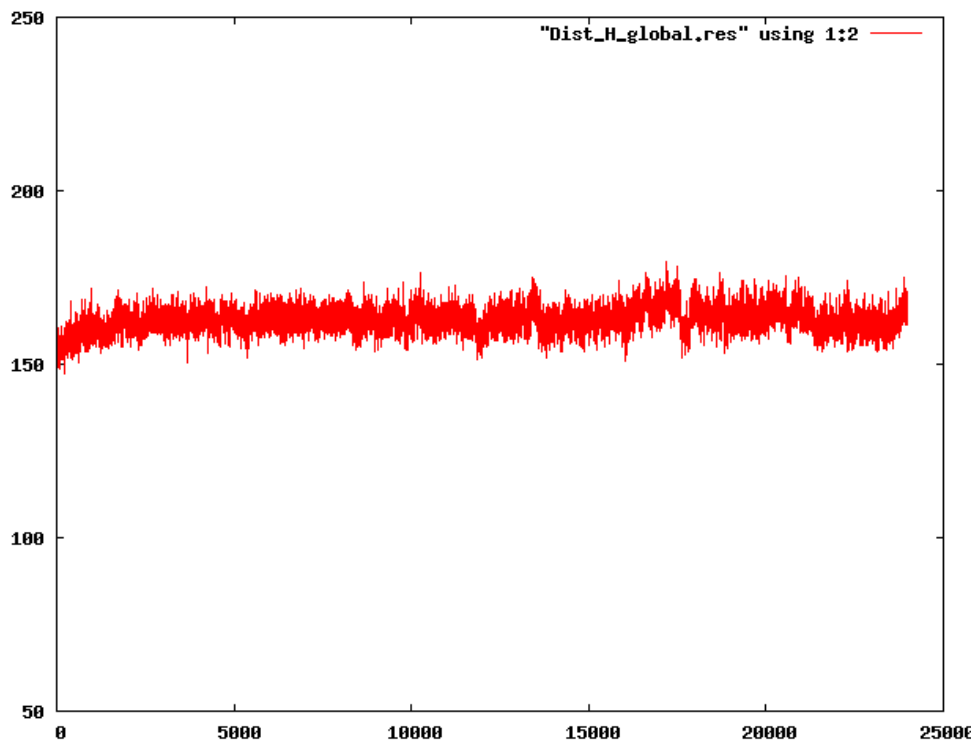
Annexe E 39 : M_GOF poche A' réplique III



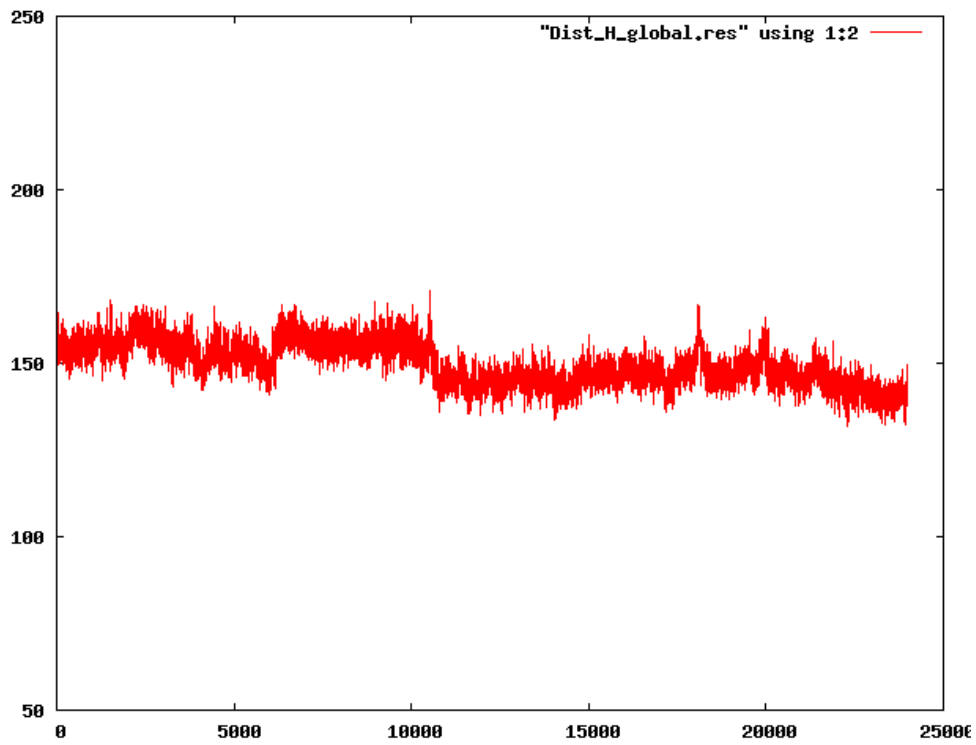
Annexe E 40 : M_NUaGAL poche A' réplique I



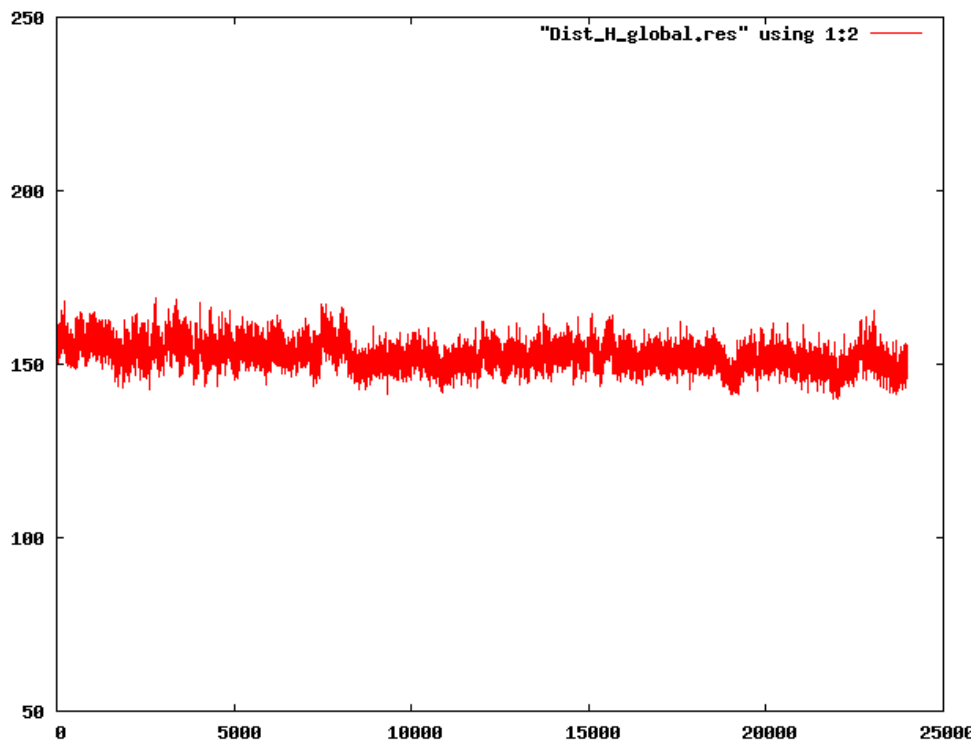
Annexe E 41 : M_NUaGAL poche A' réplique II



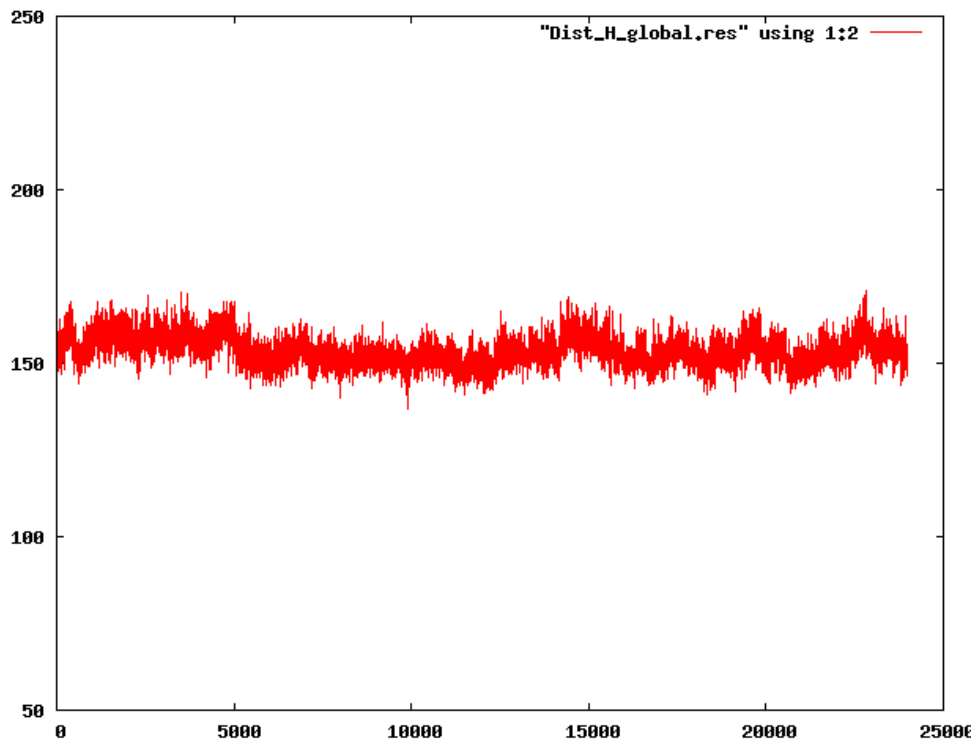
Annexe E 42 : M_NUaGAL poche A' réplique III



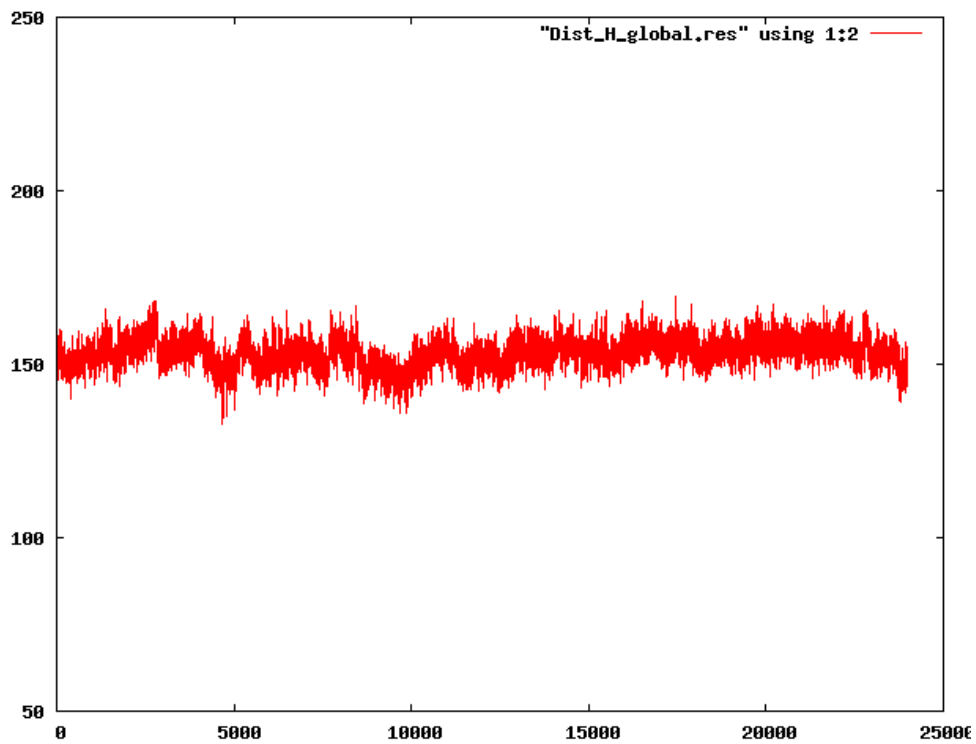
Annexe E 43 : M_OCH poche A' réplique I



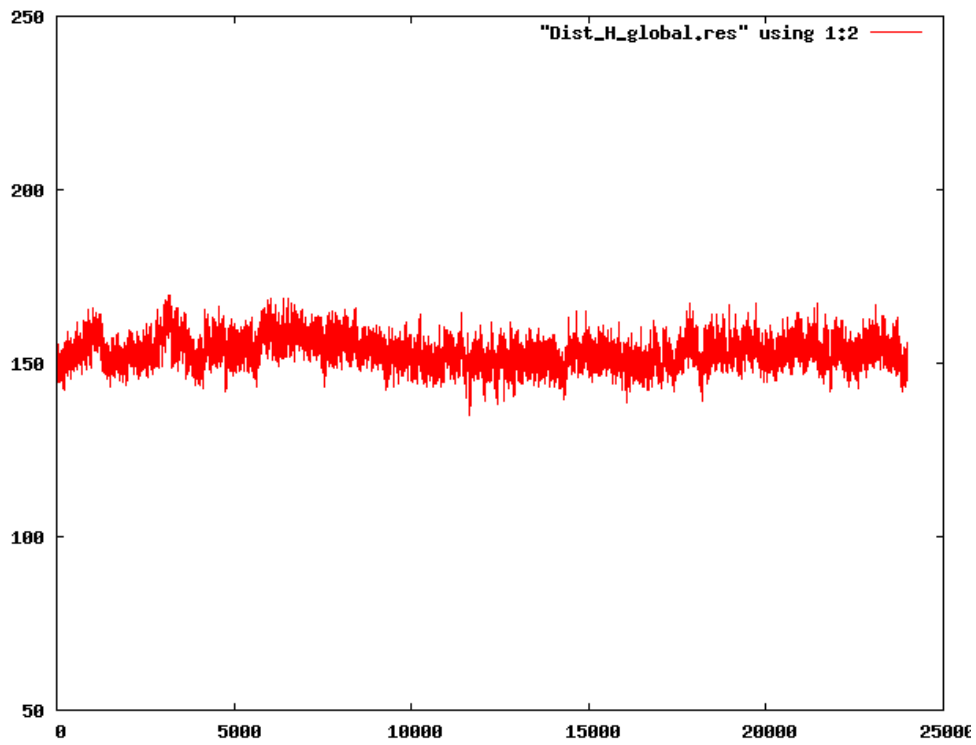
Annexe E 44 : M_OCH poche A' réplique II



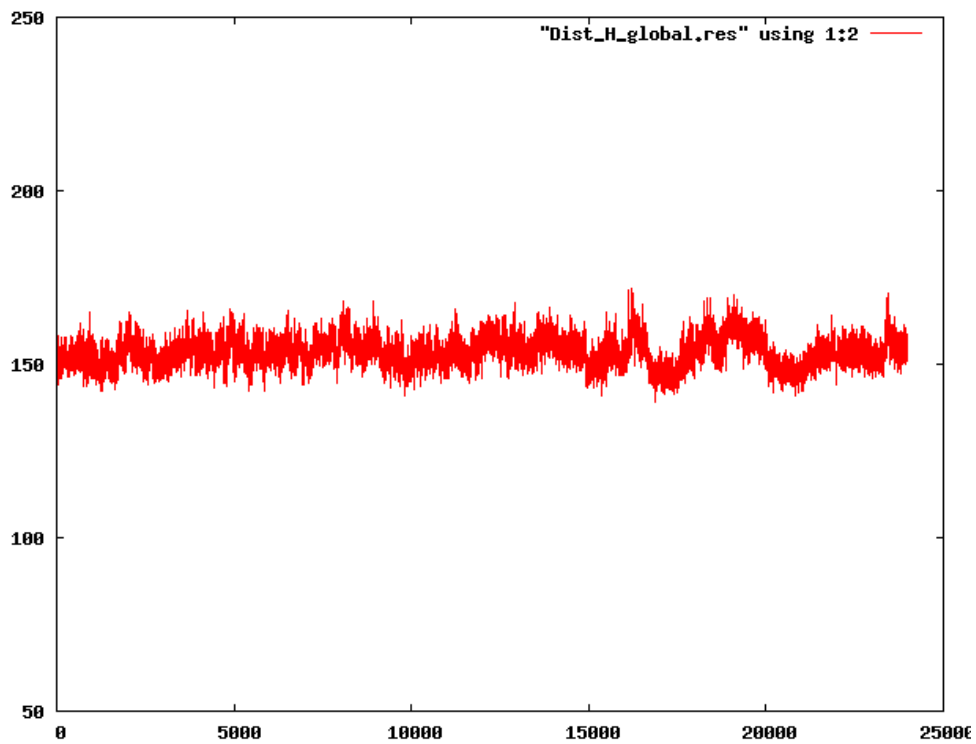
Annexe E 45 : M_OCH poche A' réplique III



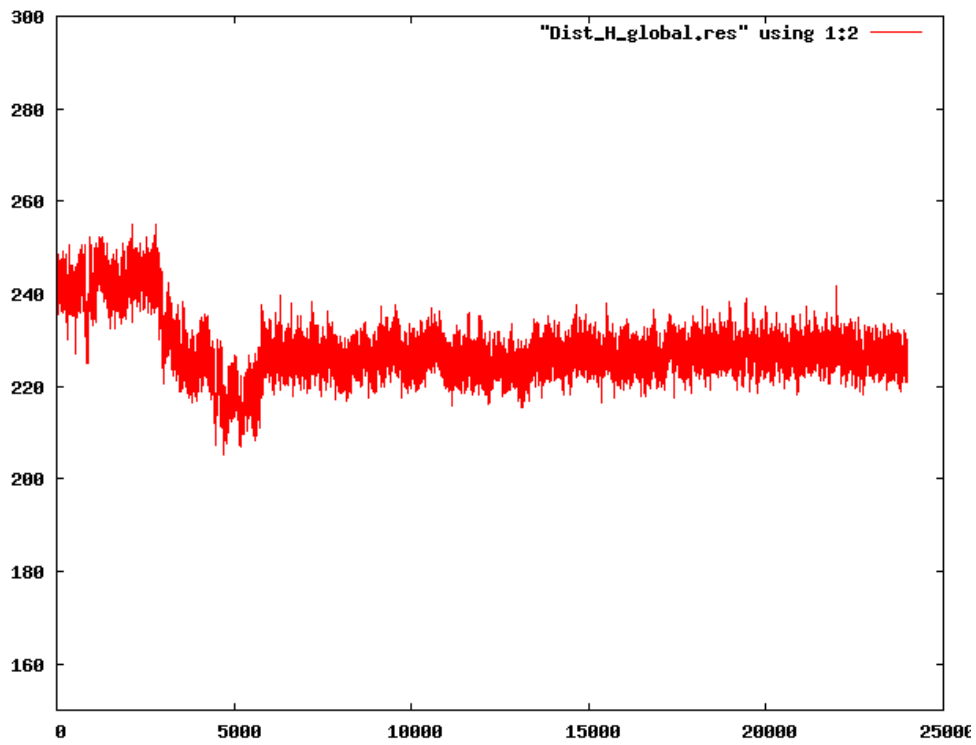
Annexe E 46 : M_SaGAL poche A' réplique I



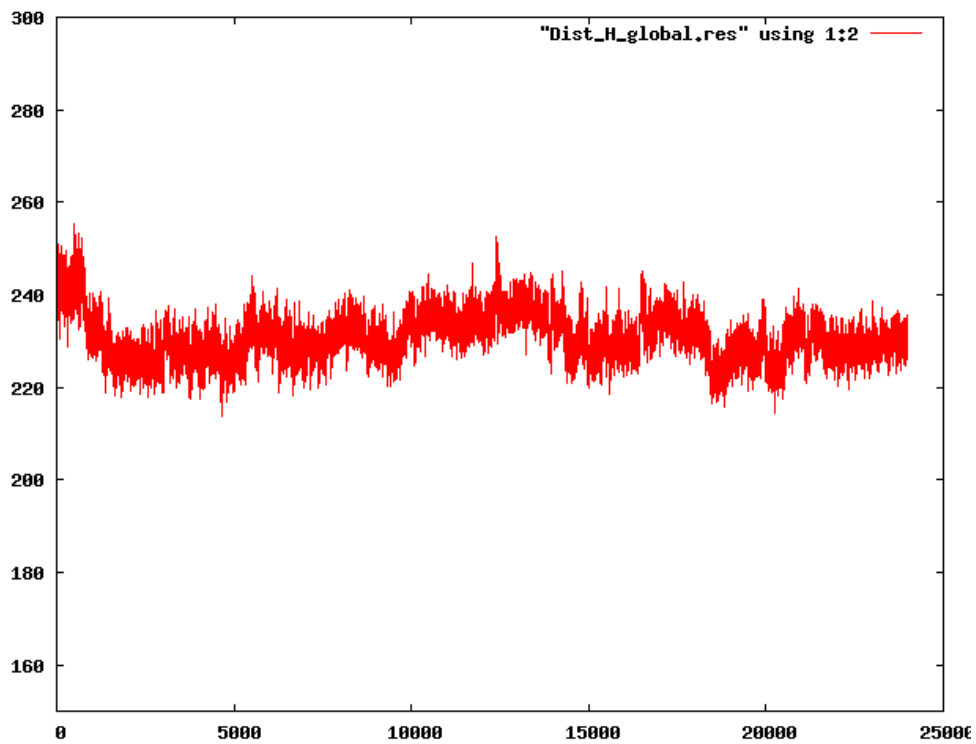
Annexe E 47 : M_SaGAL poche A' réplique II



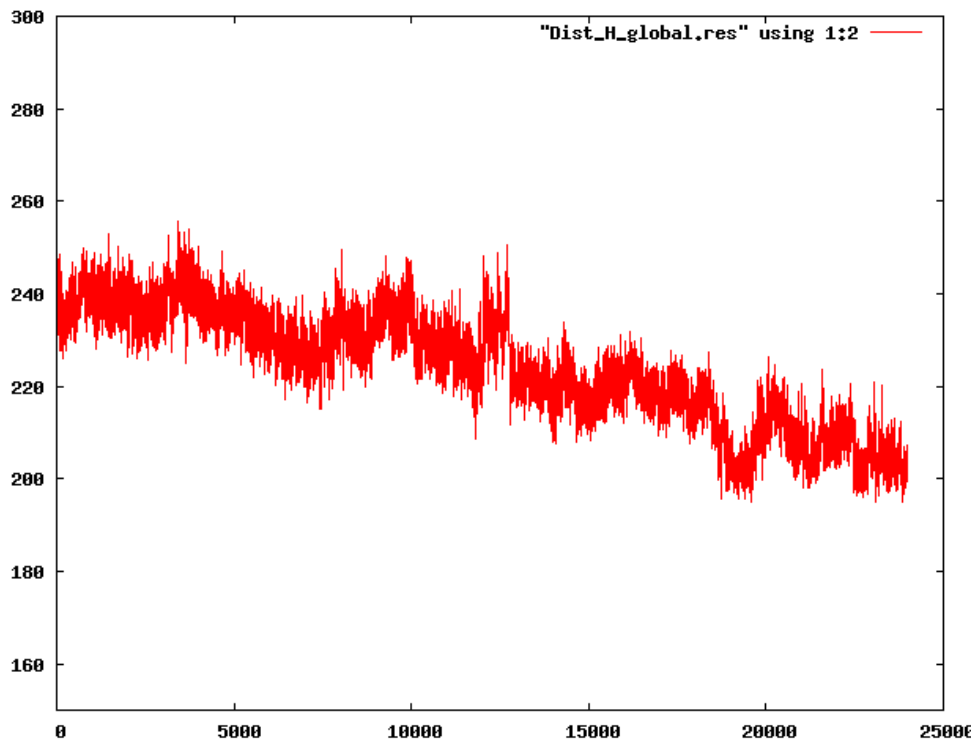
Annexe E 48 : M_SaGAL poche A' réplique III



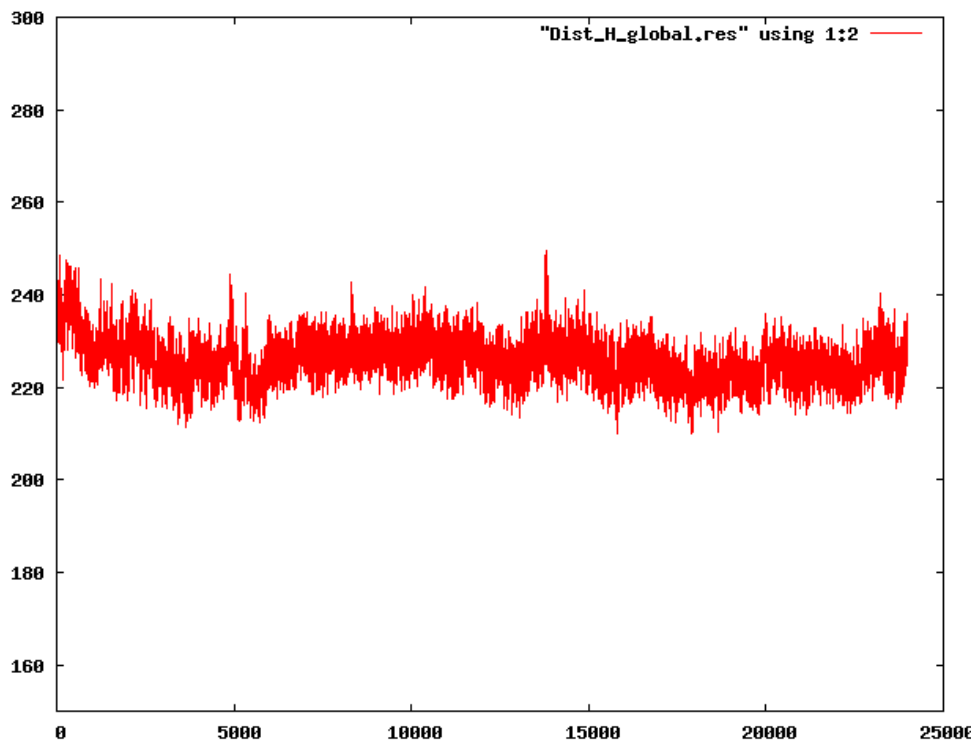
Annexe E 49 : H_7DW distance totale réplique I



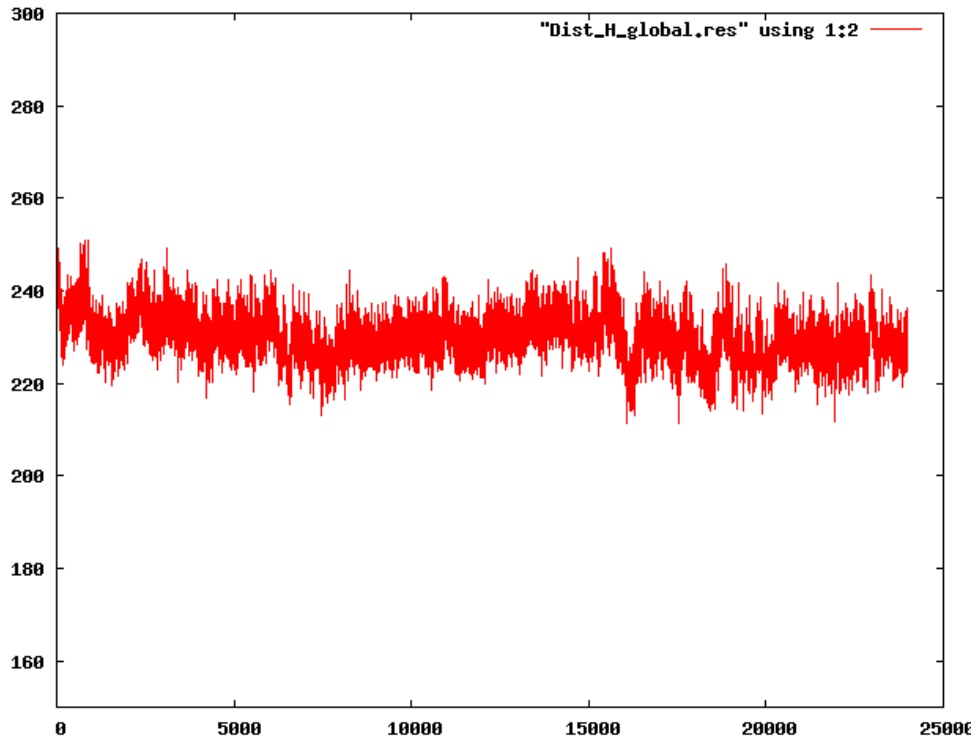
Annexe E 50 : H_7DW distance totale réplique II



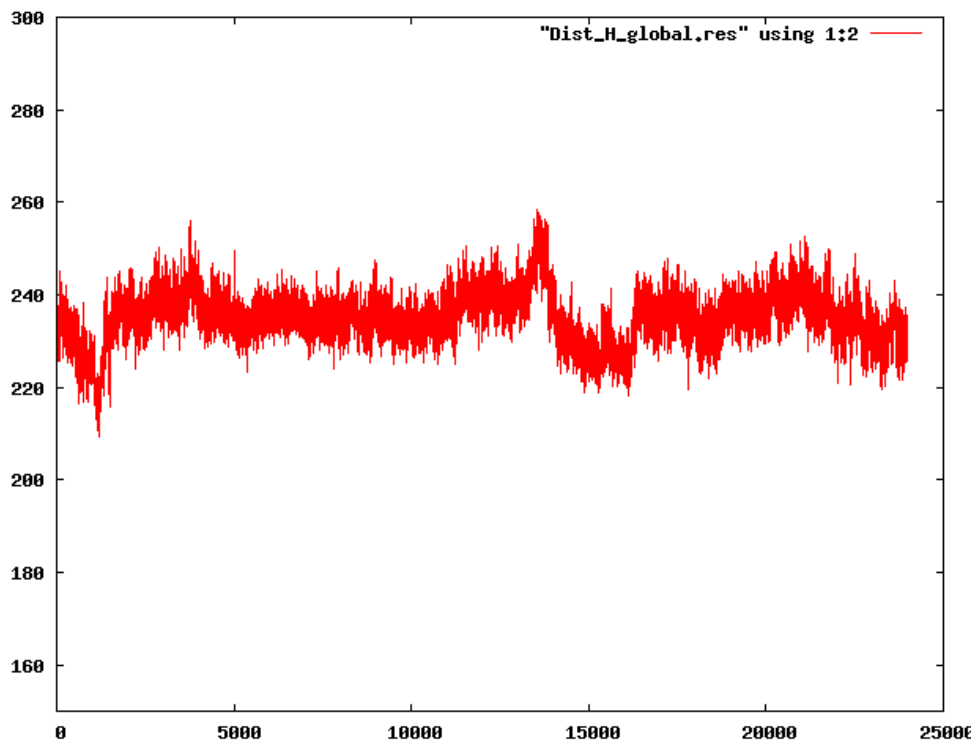
Annexe E 51 : H_7DW distance totale réplique III



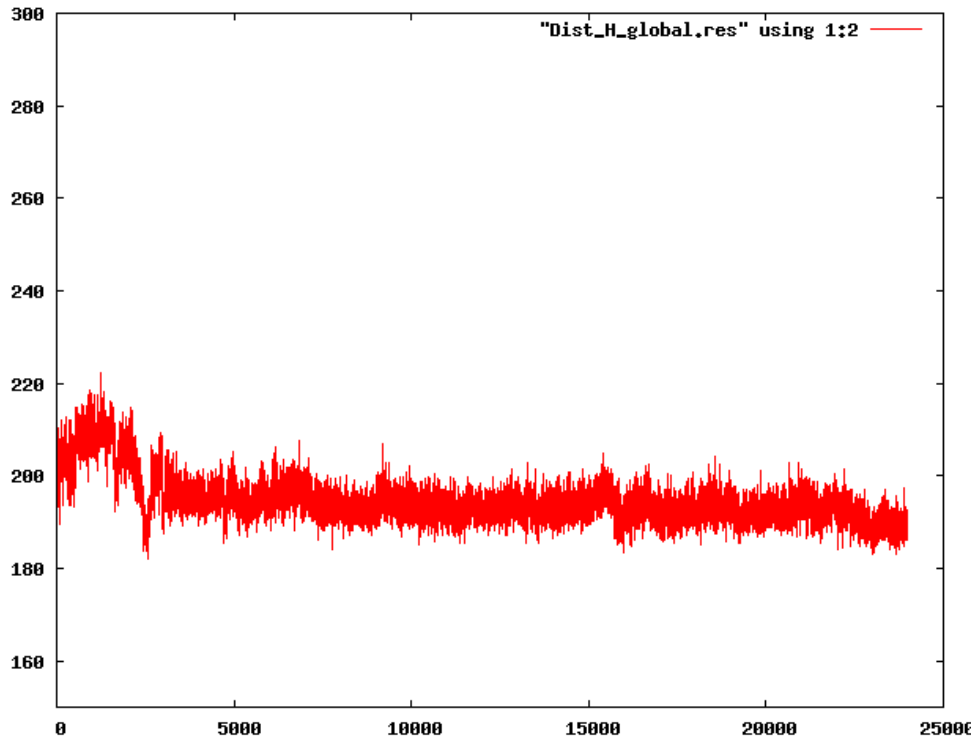
Annexe E 52 : H_aGAL distance totale réplique I



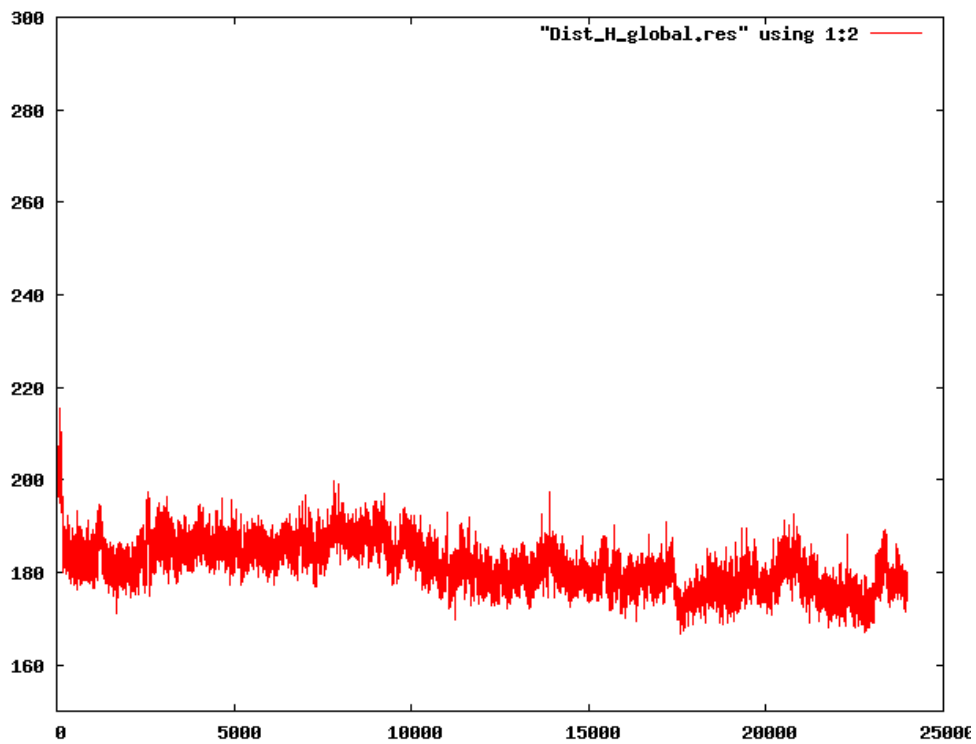
Annexe E 53 : H_aGAL distance totale réplique II



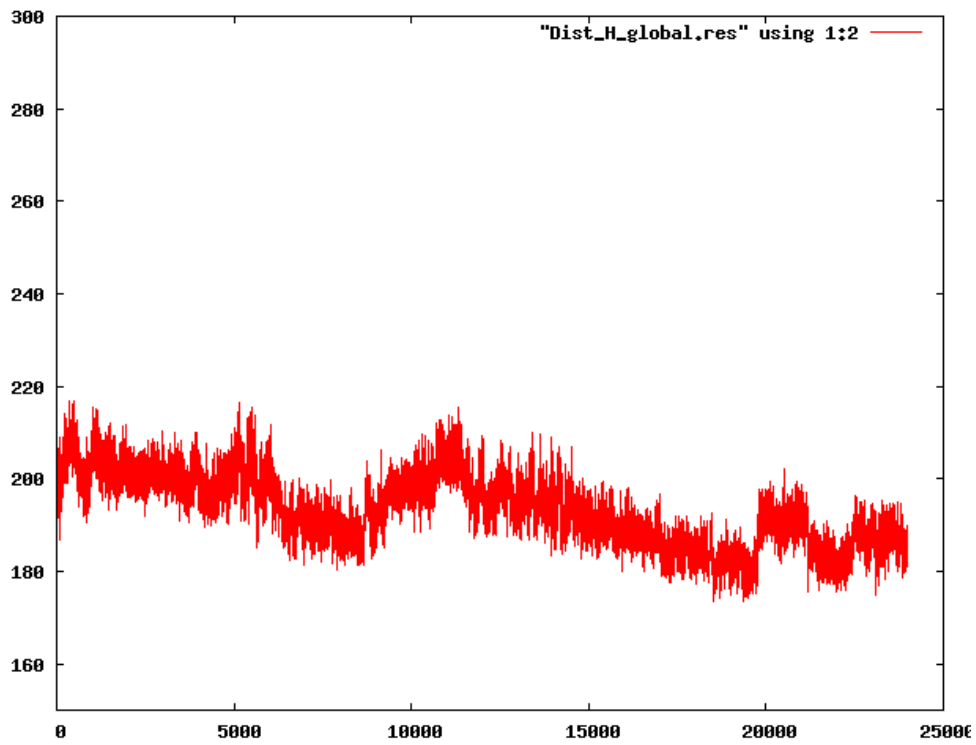
Annexe E 54 : H_aGAL distance totale réplique III



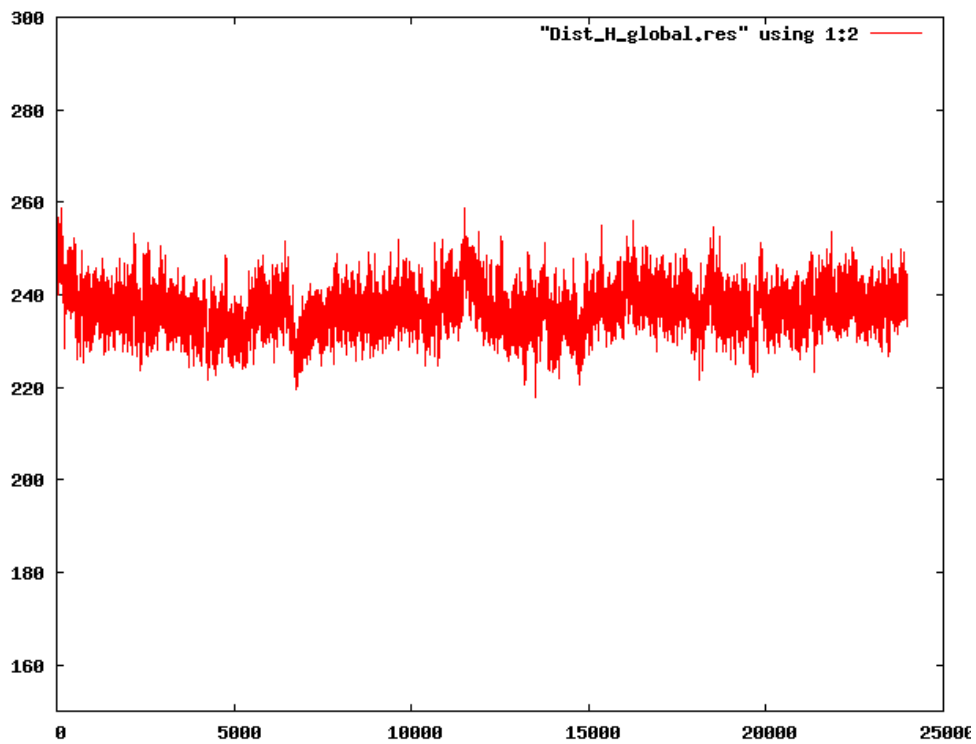
Annexe E 55 : H_CD1d distance totale réplique I



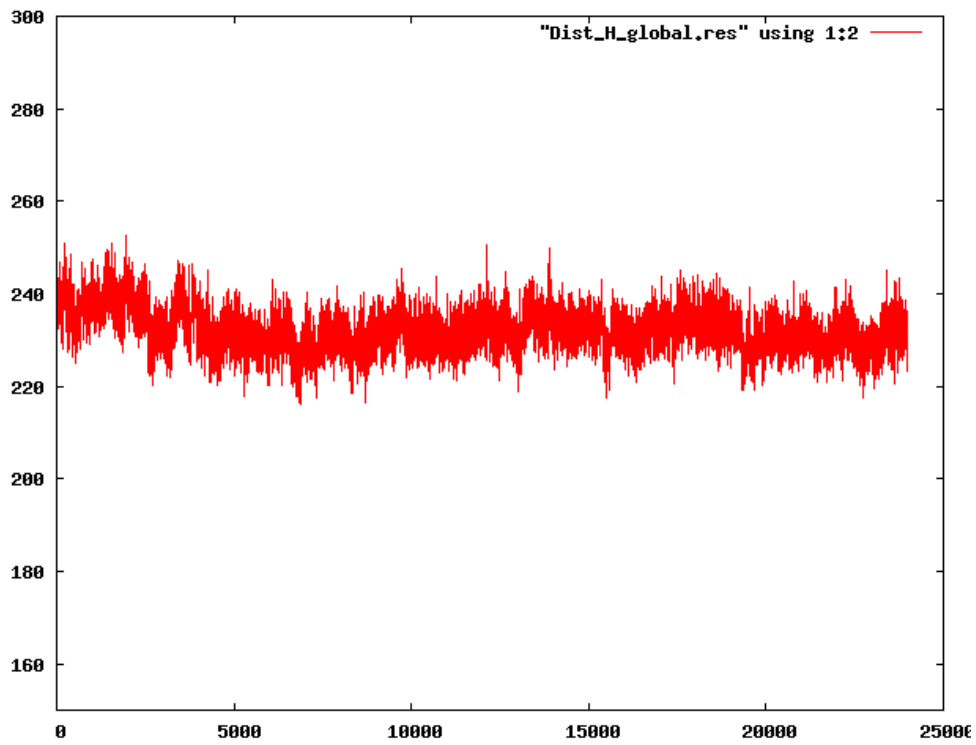
Annexe E 56 : H_CD1d distance totale réplique II



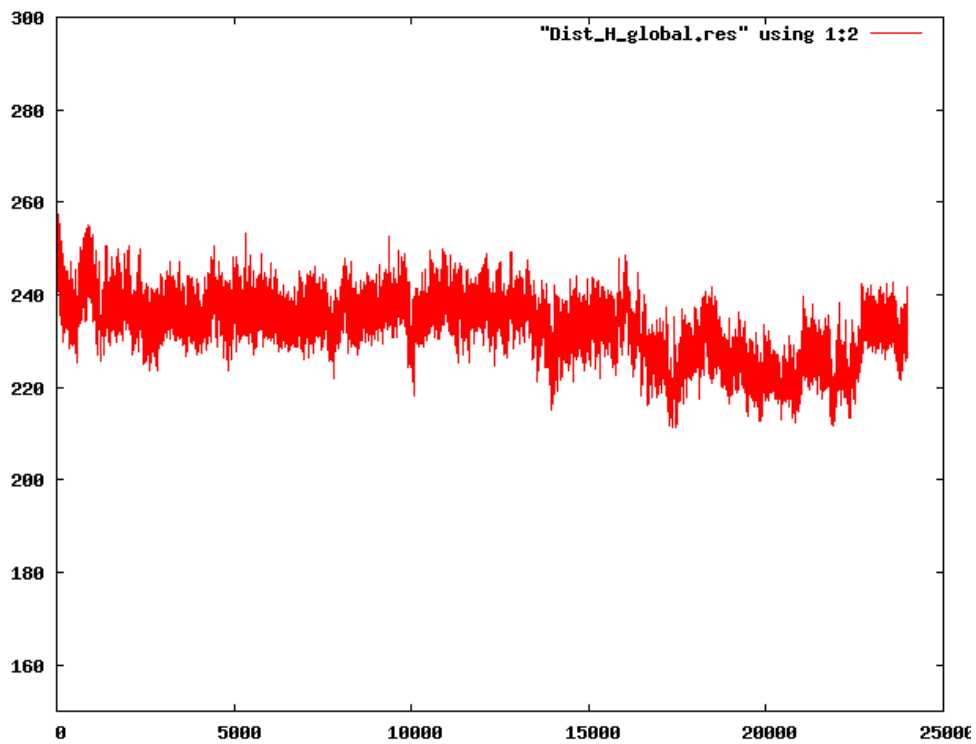
Annexe E 57 : H_CD1d distance totale réplique III



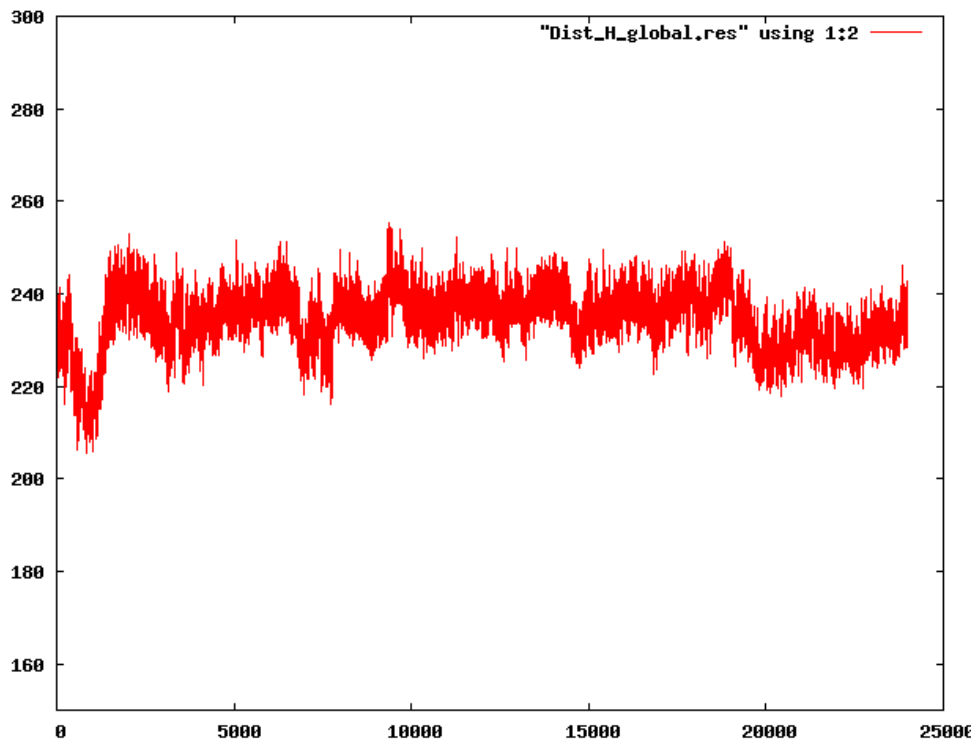
Annexe E 58 : H_GOF distance totale réplique I



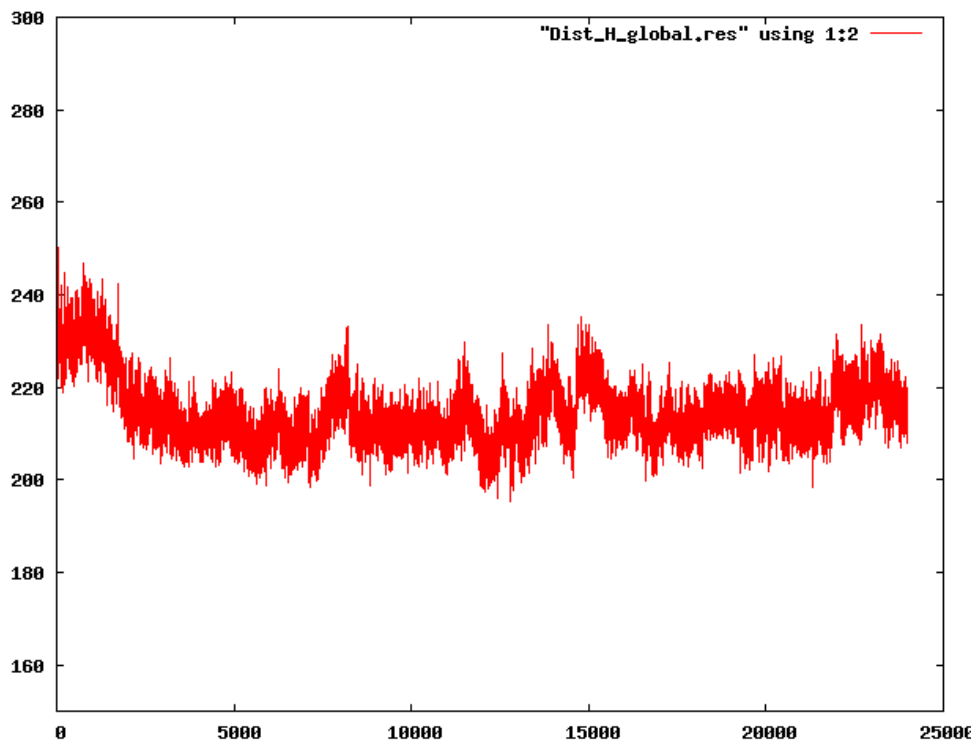
Annexe E 59 : H_GOF distance totale réplique II



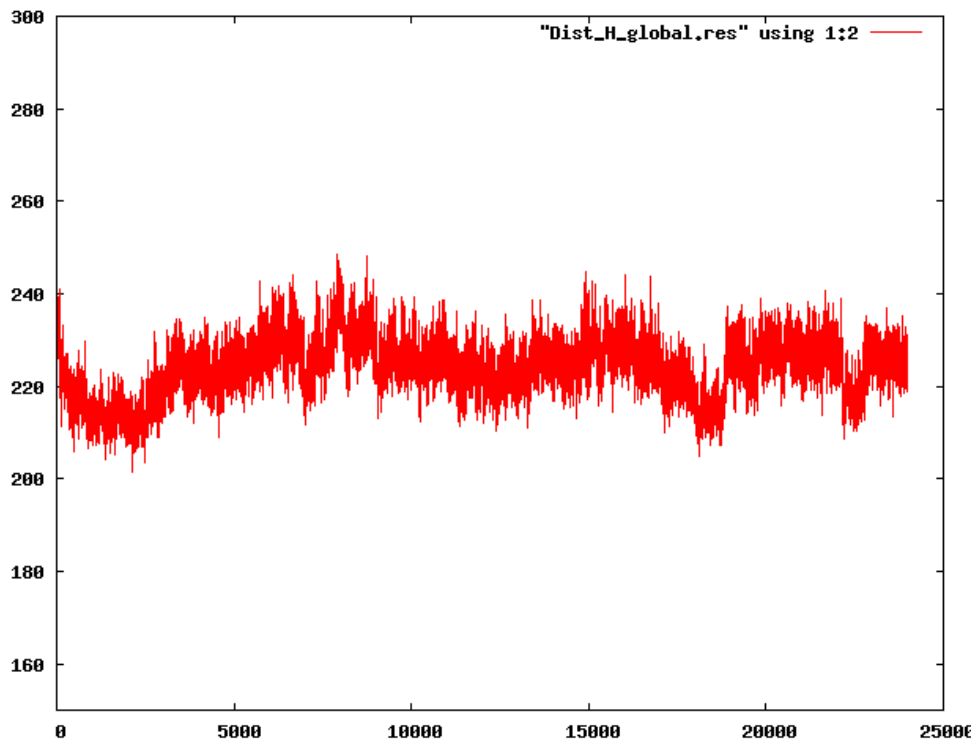
Annexe E 60 : H_GOF distance totale réplique III



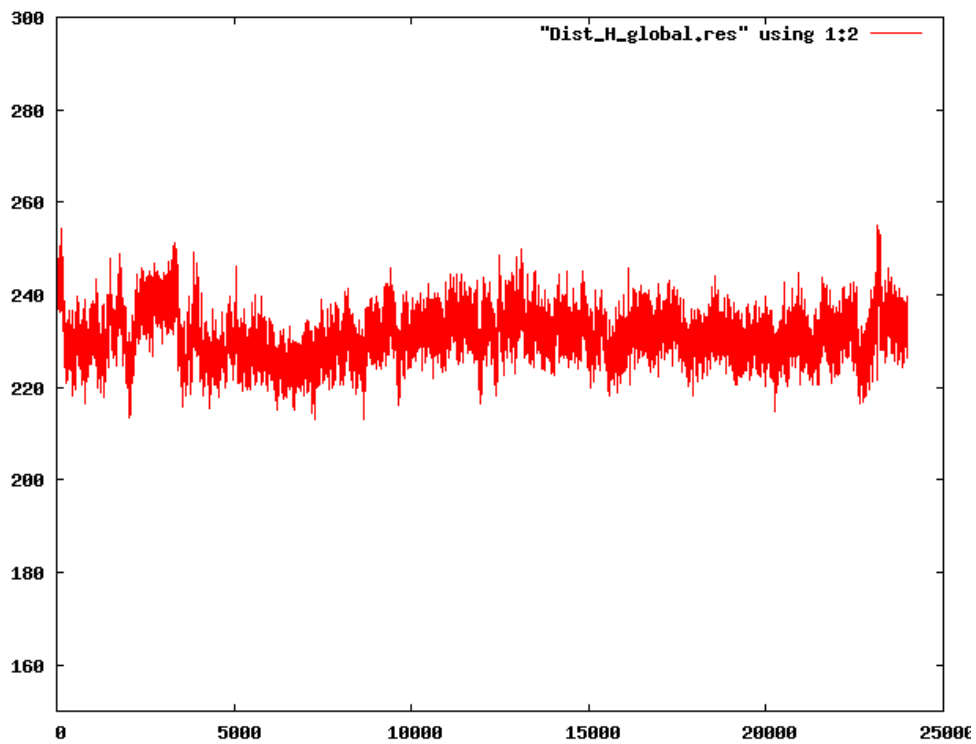
Annexe E 61 : H_LIP distance totale réplique I



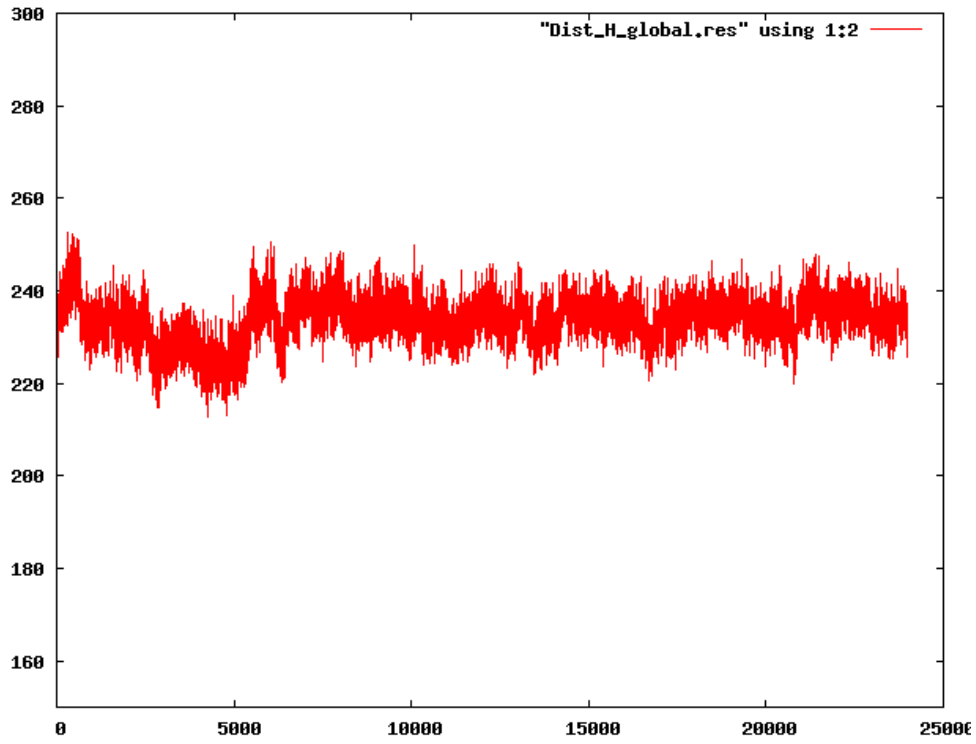
Annexe E 62 : H_LIP distance totale réplique II



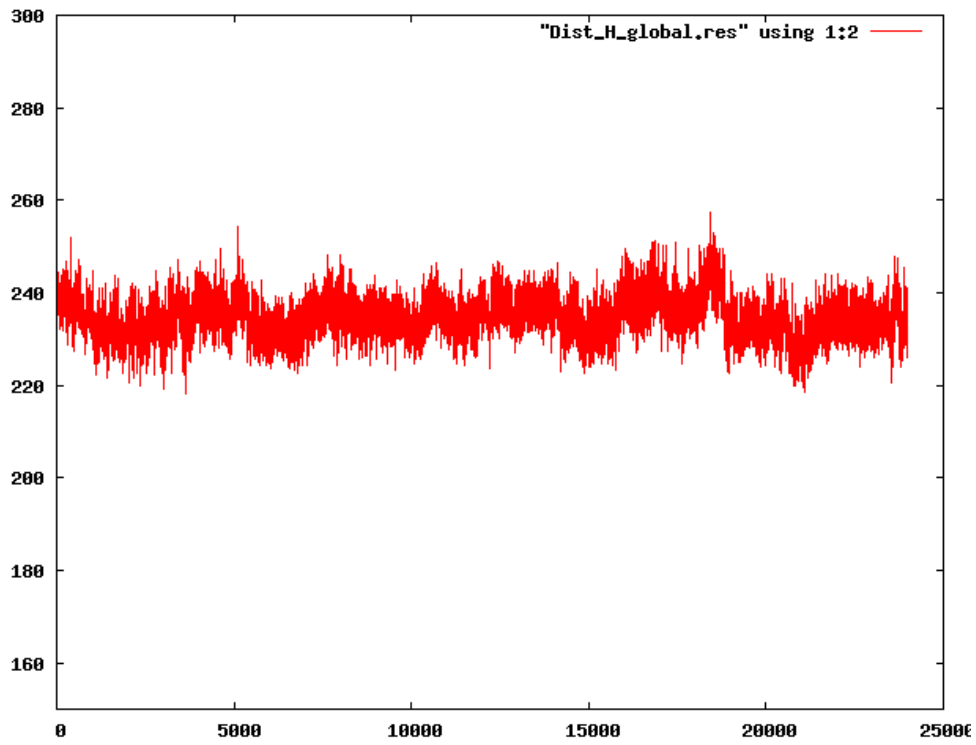
Annexe E 63 : H_LIP distance totale réplique III



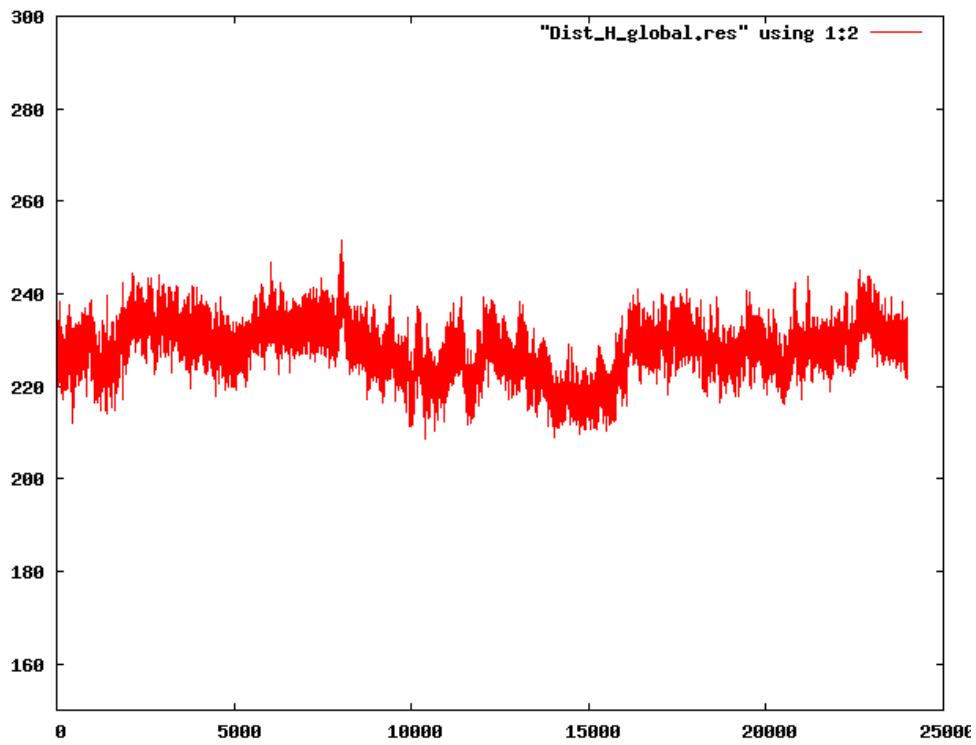
Annexe E 64 : H_NUaGAL distance totale réplique I



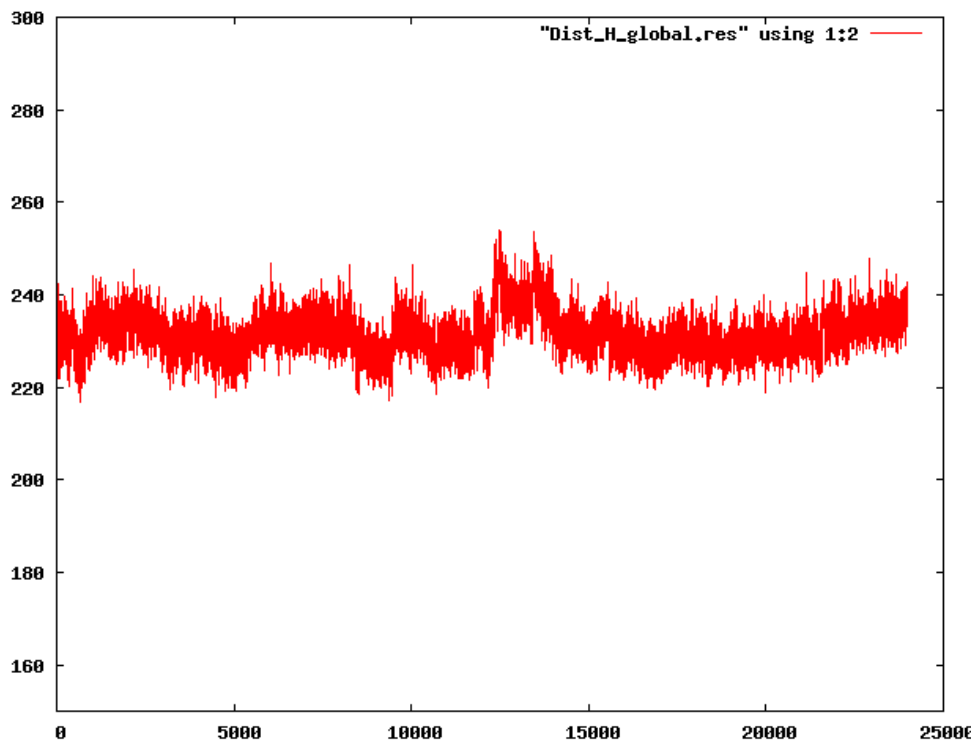
Annexe E 65 : H_NUaGAL distance totale réplique II



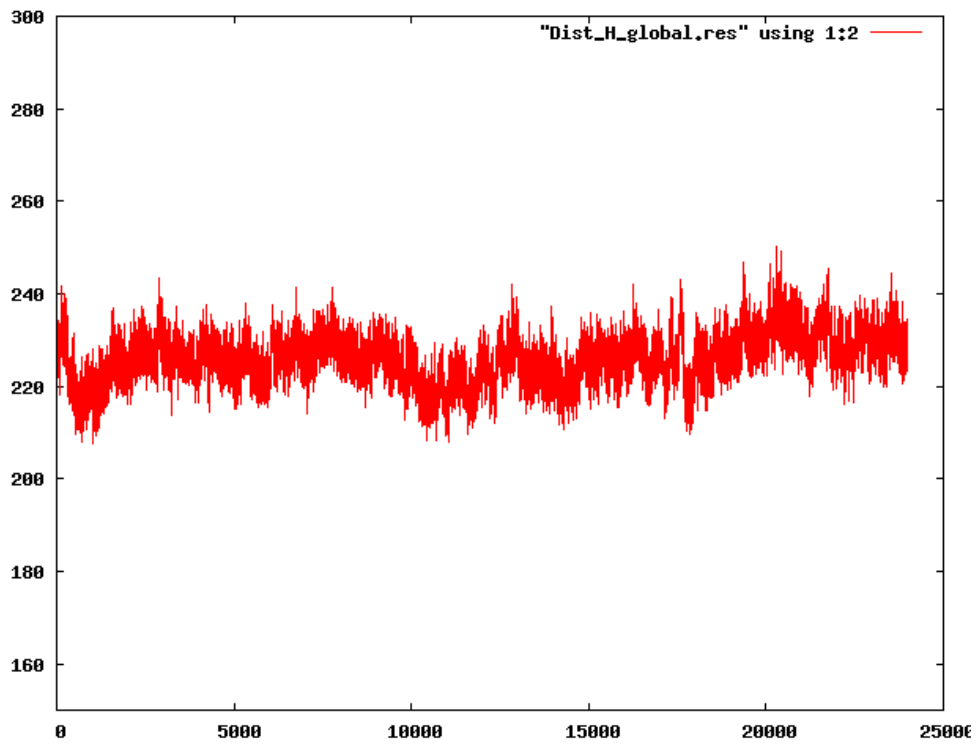
Annexe E 66 : H_NUaGAL distance totale réplique III



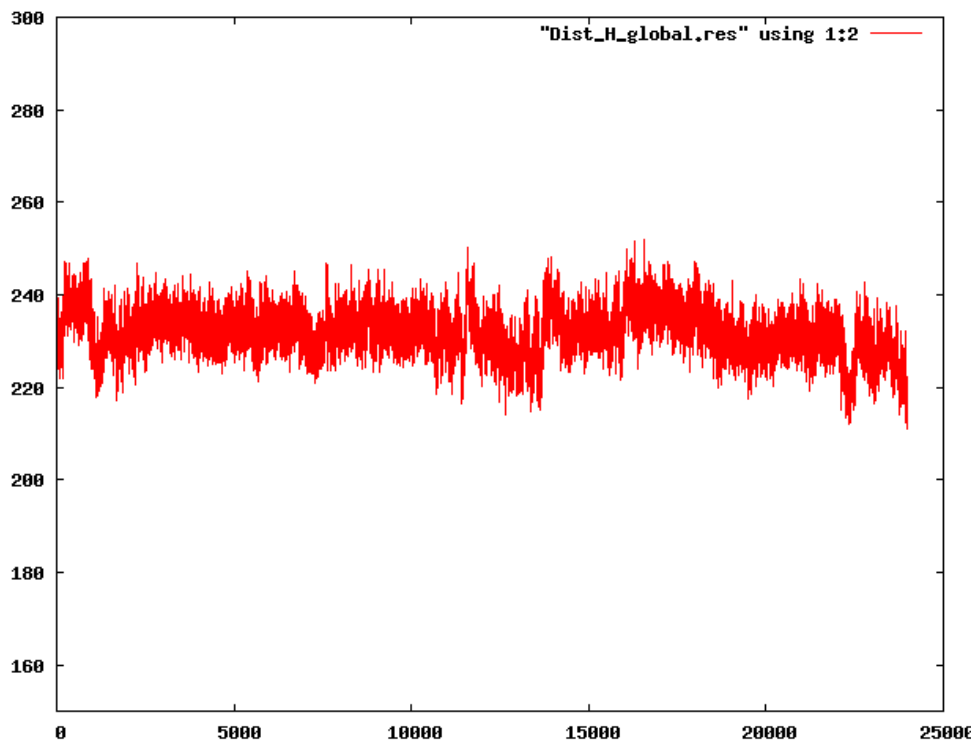
Annexe E 67 : H_OCH distance totale réplique I



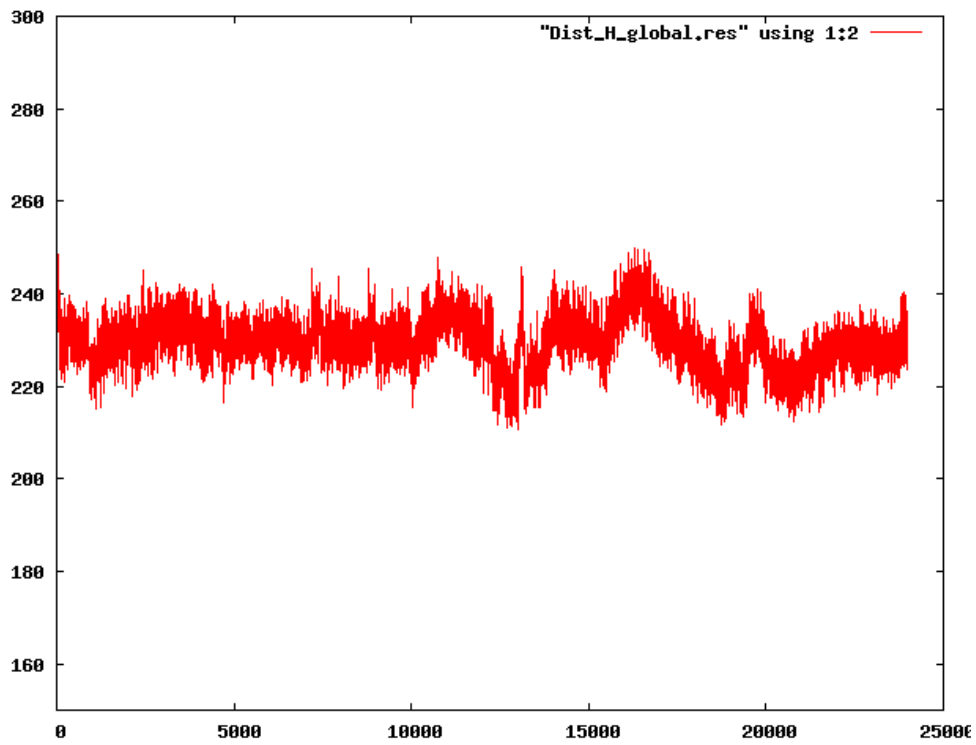
Annexe E 68 : H_OCH distance totale réplique II



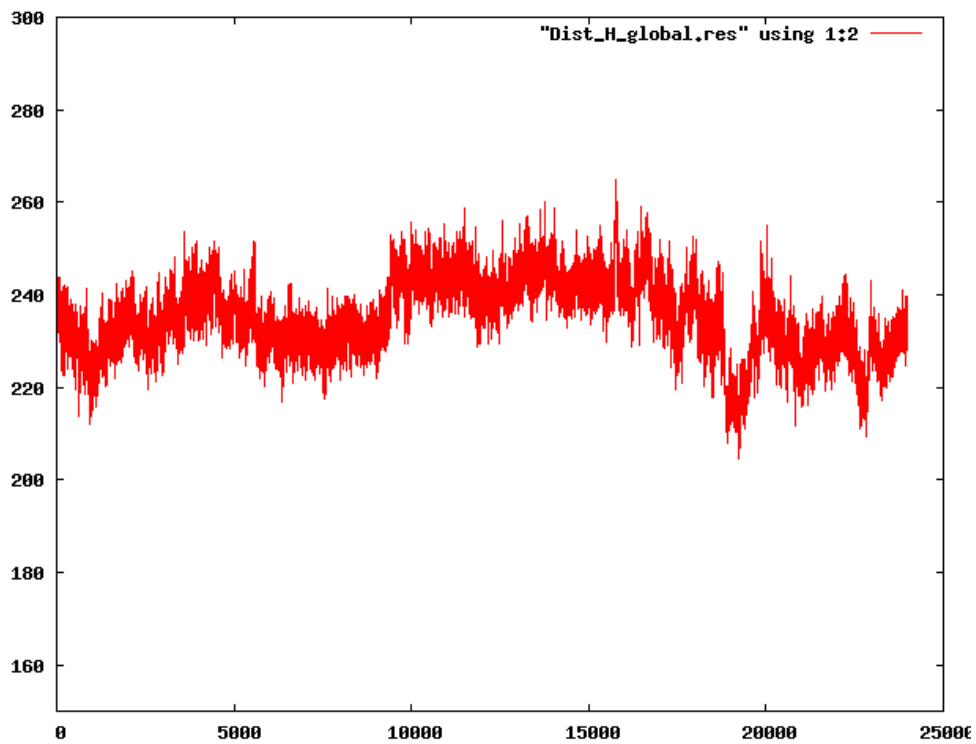
Annexe E 69 : H_OCH distance totale réplique III



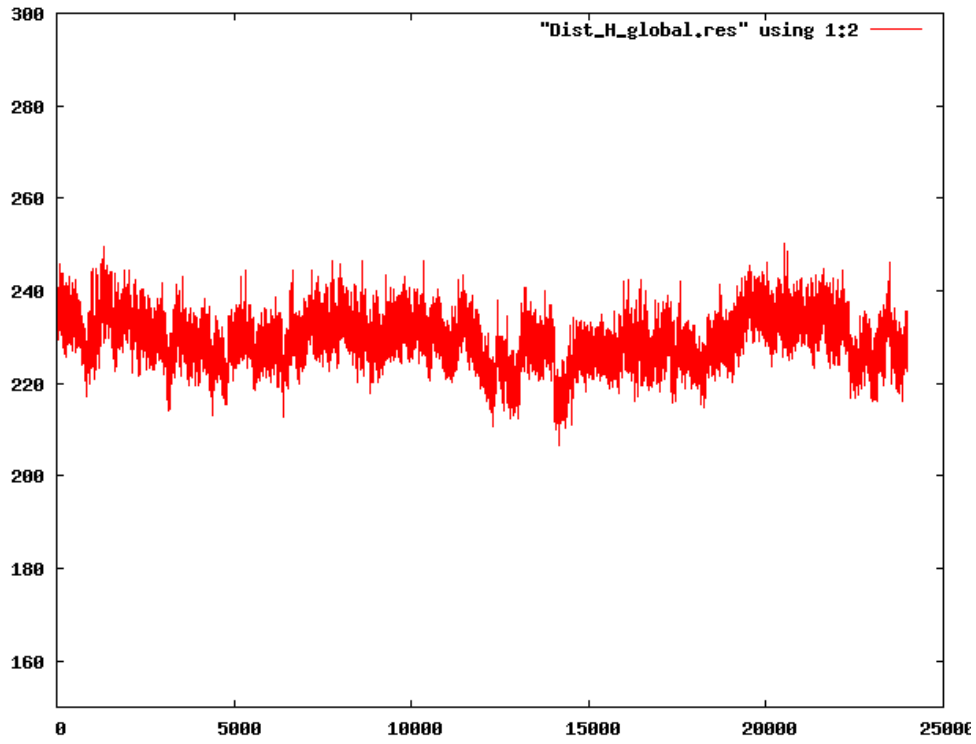
Annexe E 70 : H_OCH9 distance totale réplique I



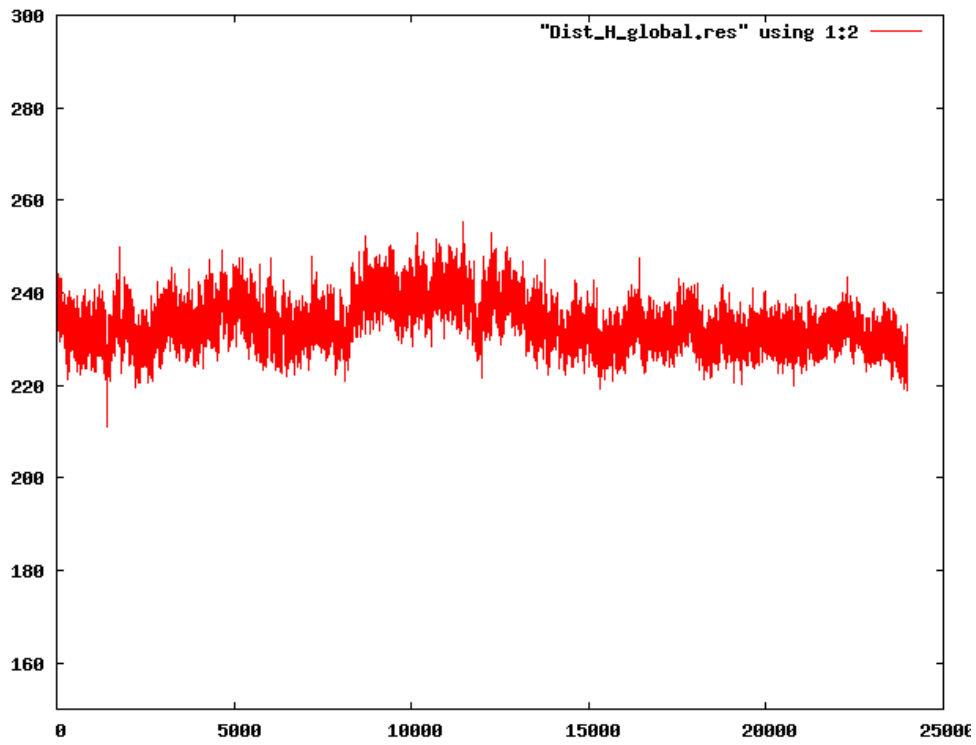
Annexe E 71 : H_OCH9 distance totale réplique II



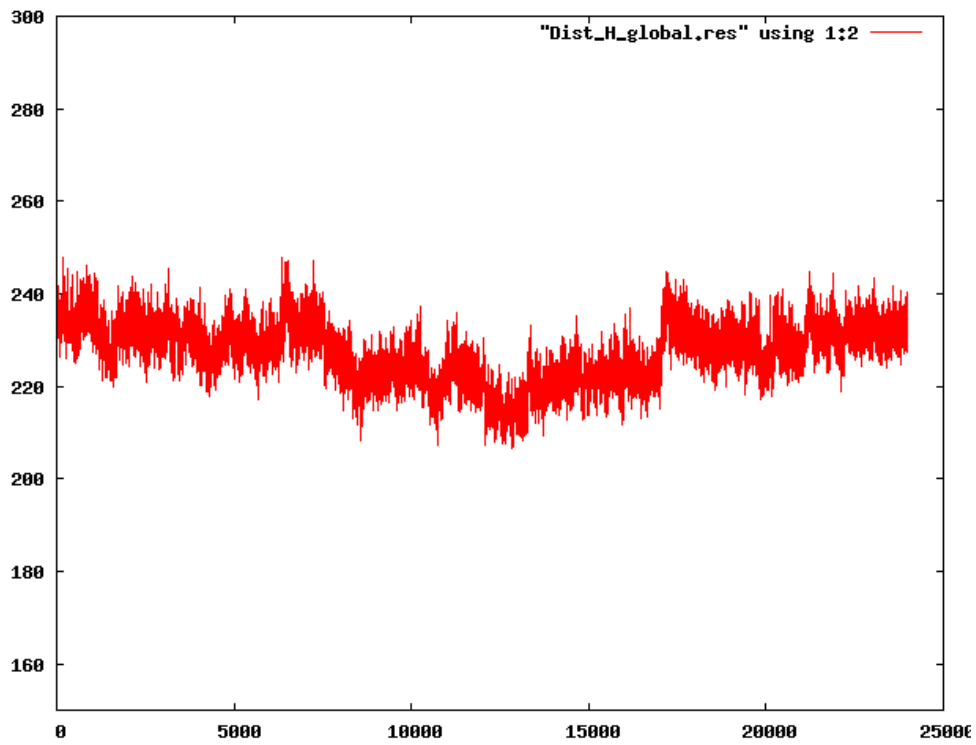
Annexe E 72 : H_OCH9 distance totale réplique III



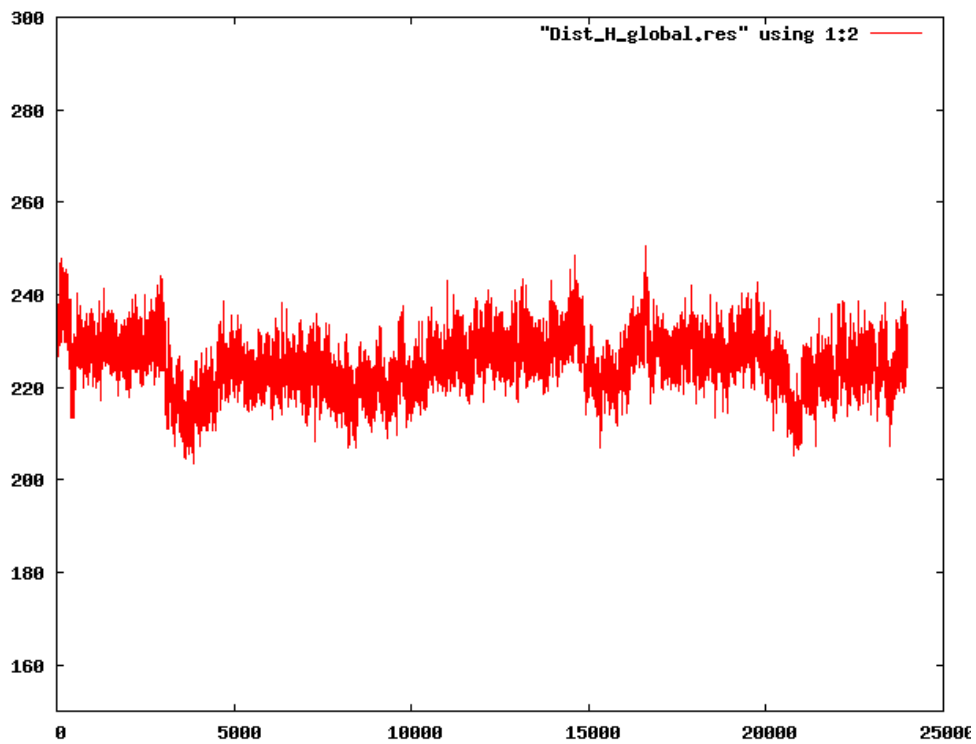
Annexe E 73 : H_SaGAL distance totale réplique I



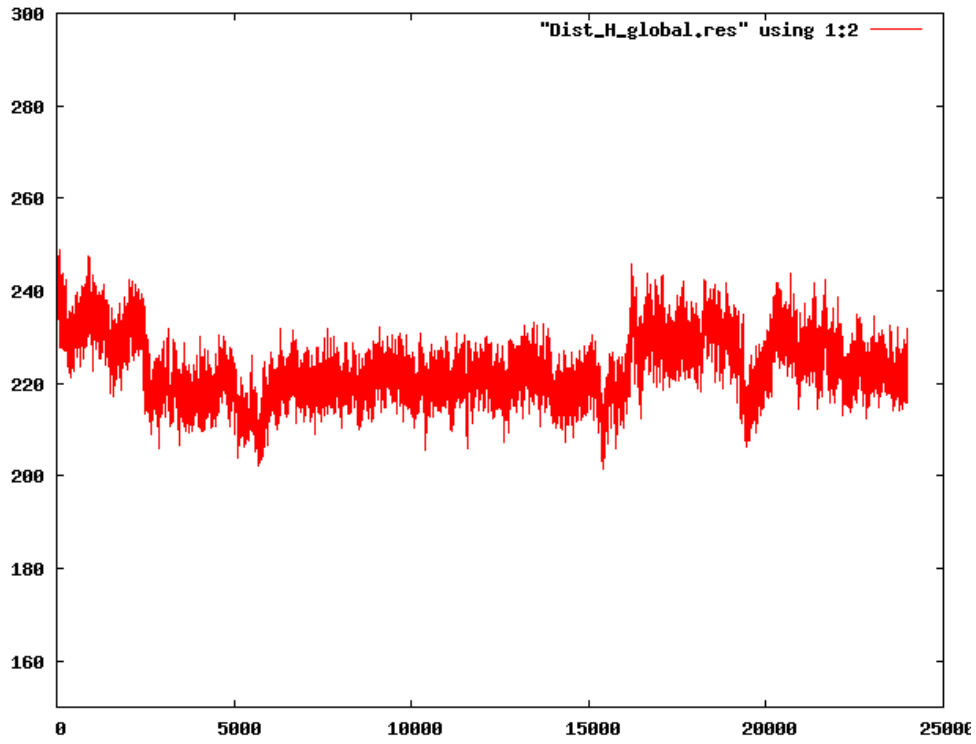
Annexe E 74 : H_SaGAL distance totale réplique II



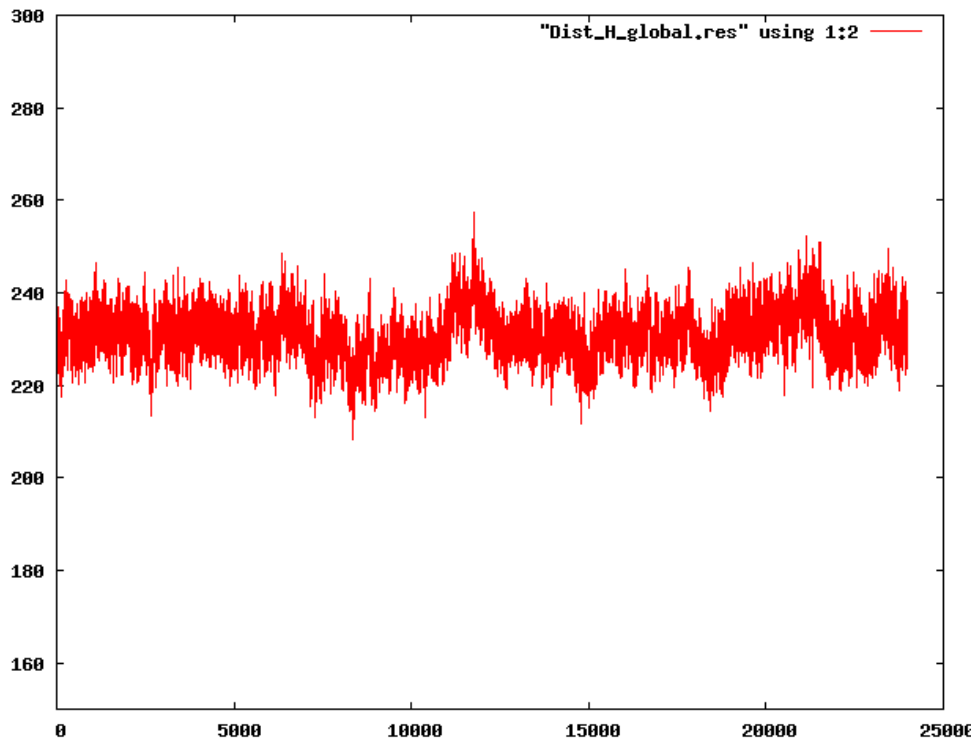
Annexe E 75 : H_SaGAL distance totale réplique III



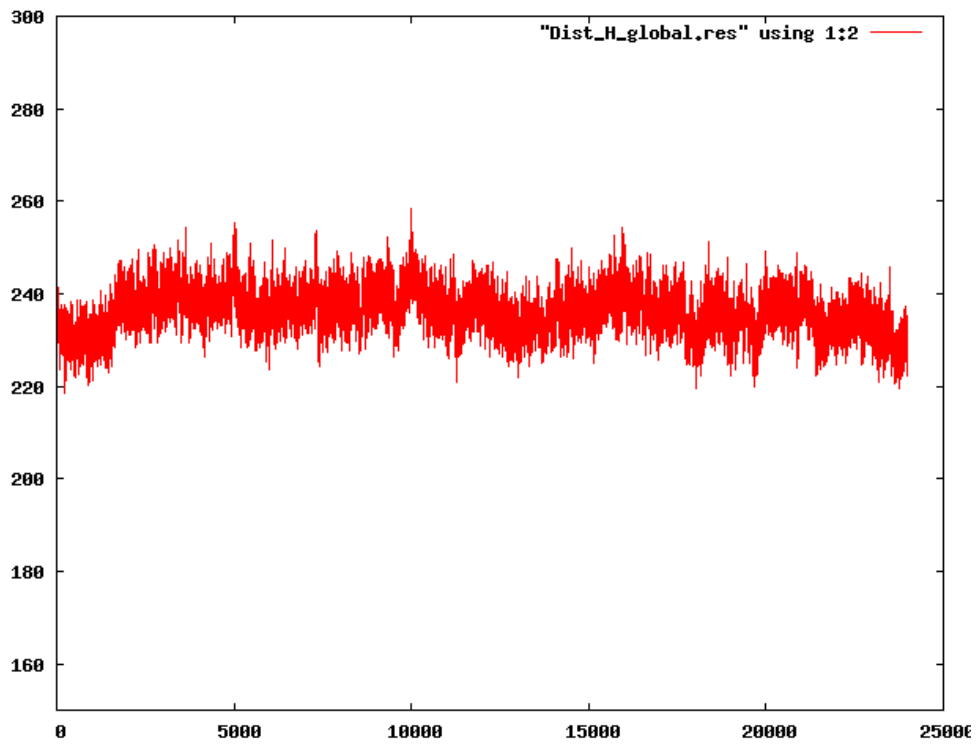
Annexe E 76 : M_7DW distance totale réplique I



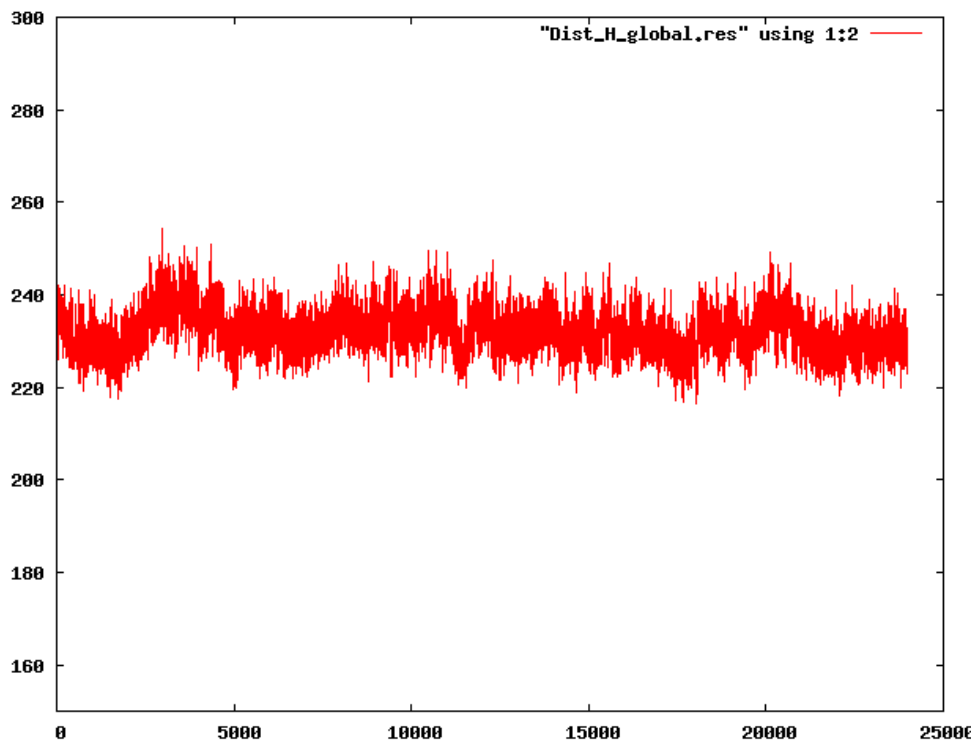
Annexe E 77 : M_7DW distance totale réplique II



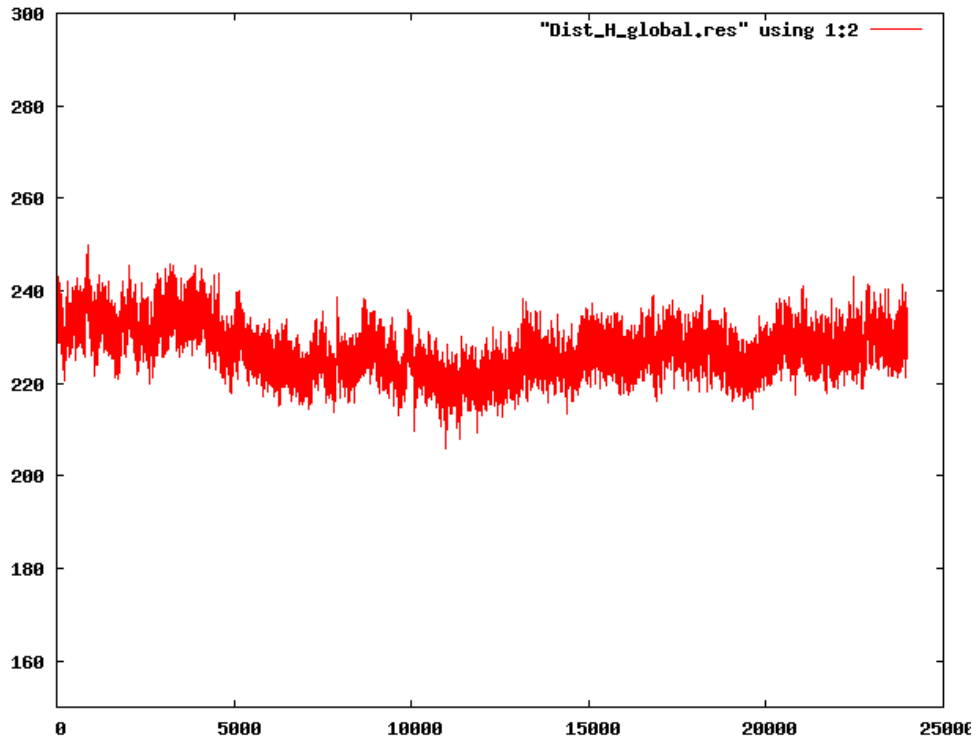
Annexe E 78 : M_7DW distance totale réplique III



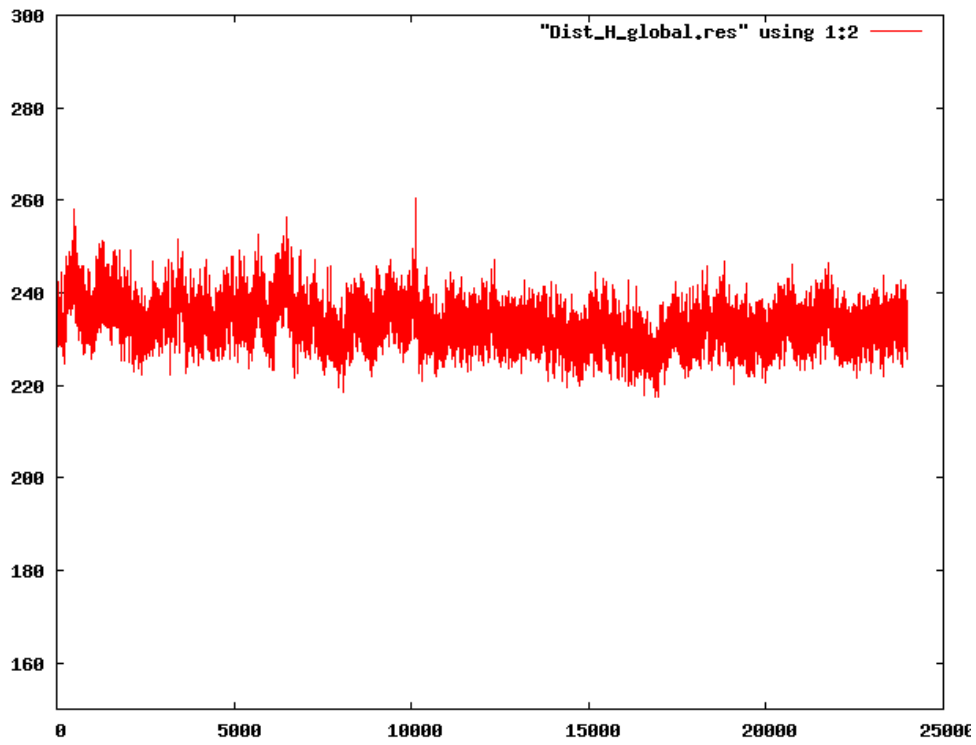
Annexe E 79 : M_aGAL distance totale réplique I



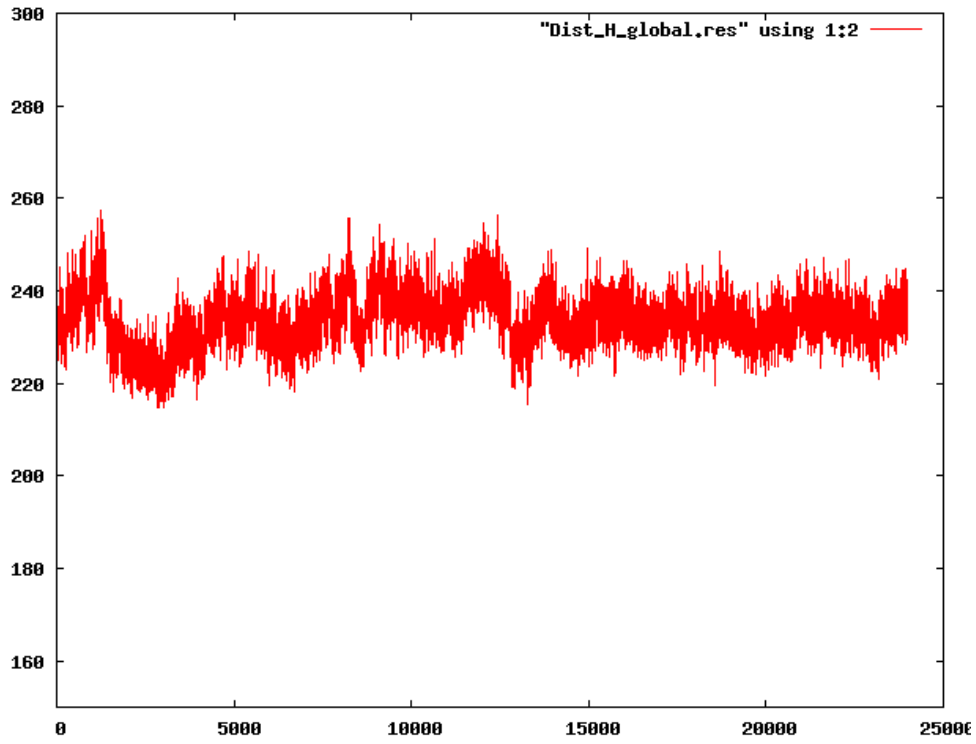
Annexe E 80 : M_aGAL distance totale réplique II



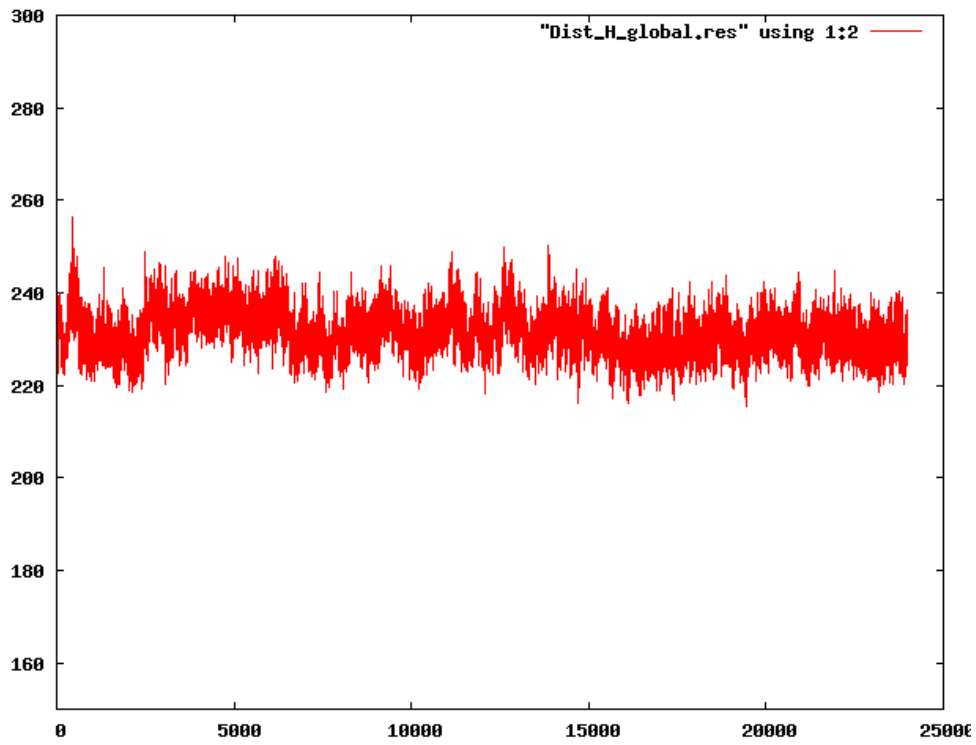
Annexe E 81 : M_aGAL distance totale réplique III



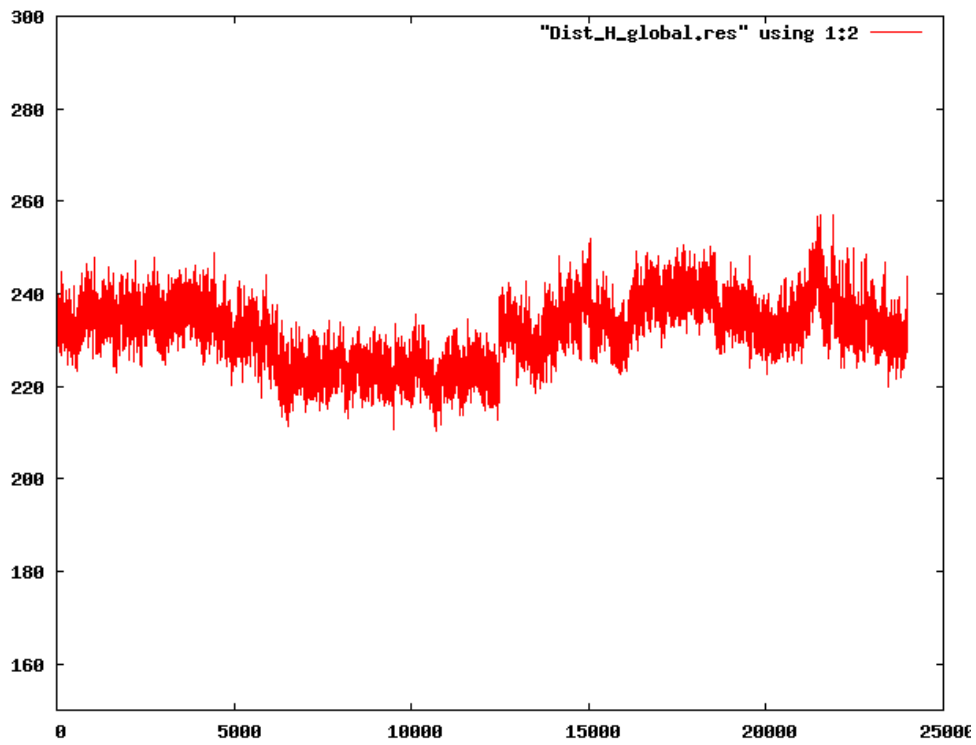
Annexe E 82 : M_AZOL distance totale réplique I



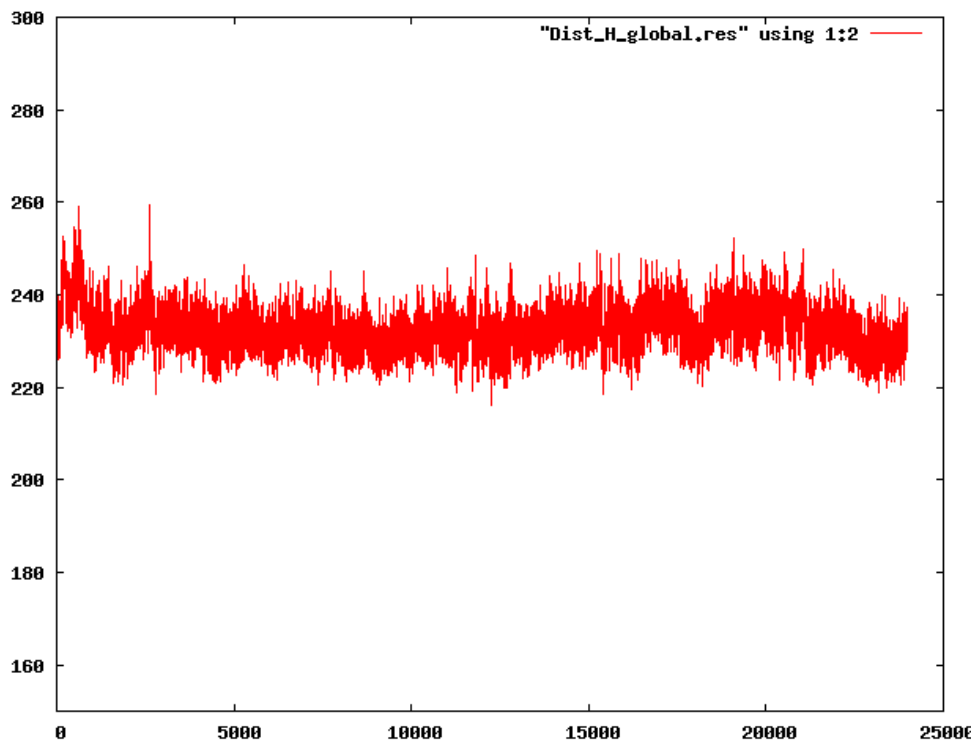
Annexe E 83 : M_AZOL distance totale réplique II



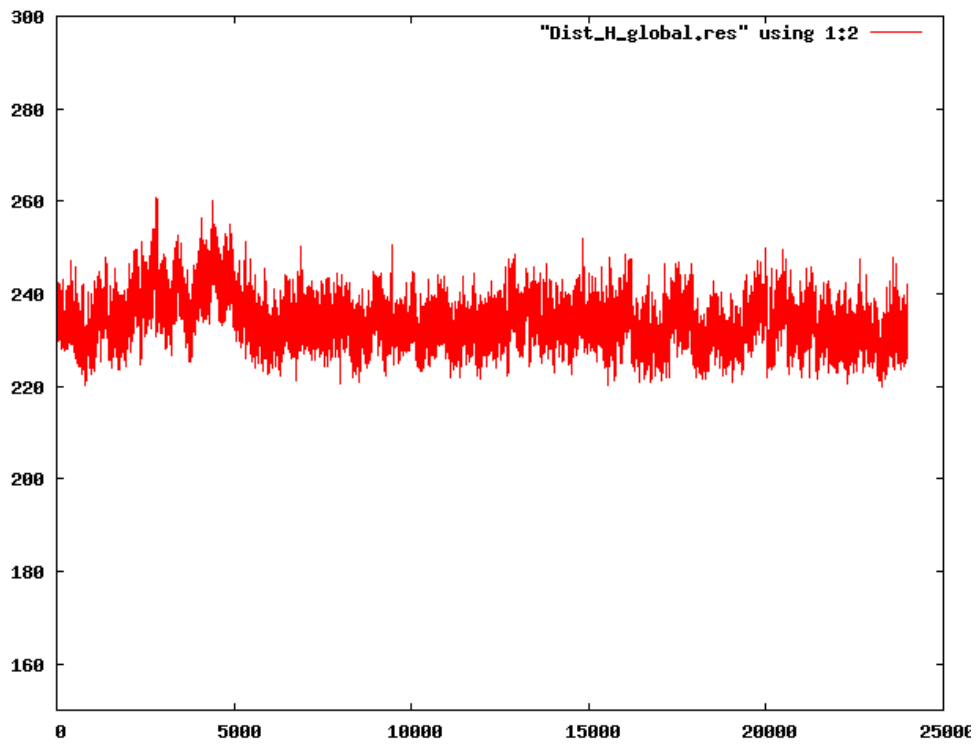
Annexe E 84 : M_AZOL distance totale réplique III



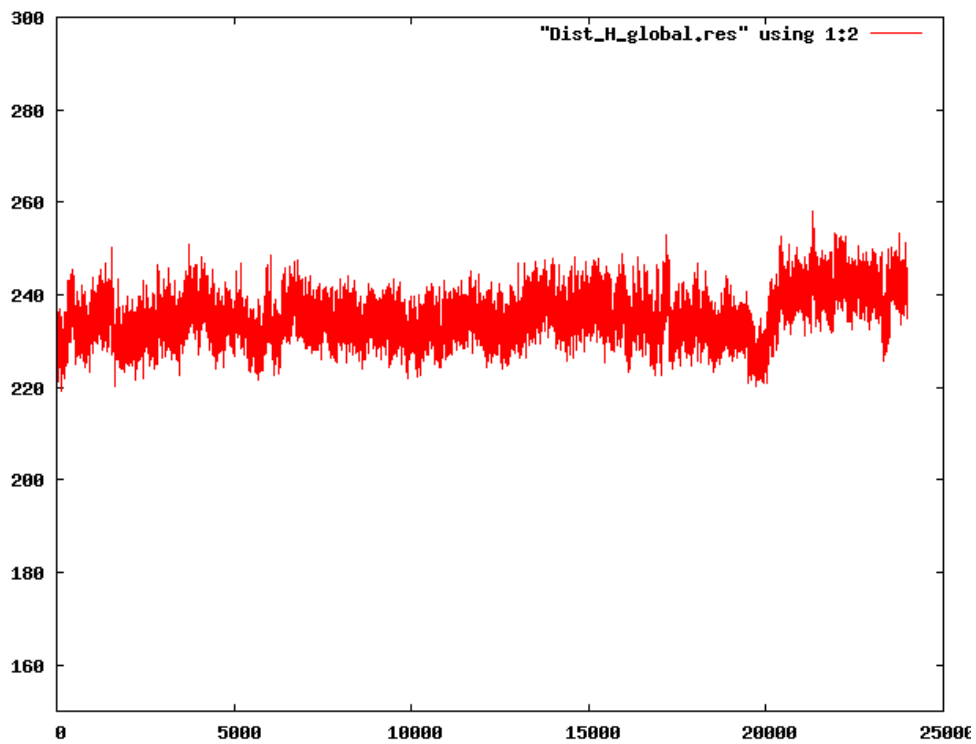
Annexe E 85 : M_GOF distance totale réplique I



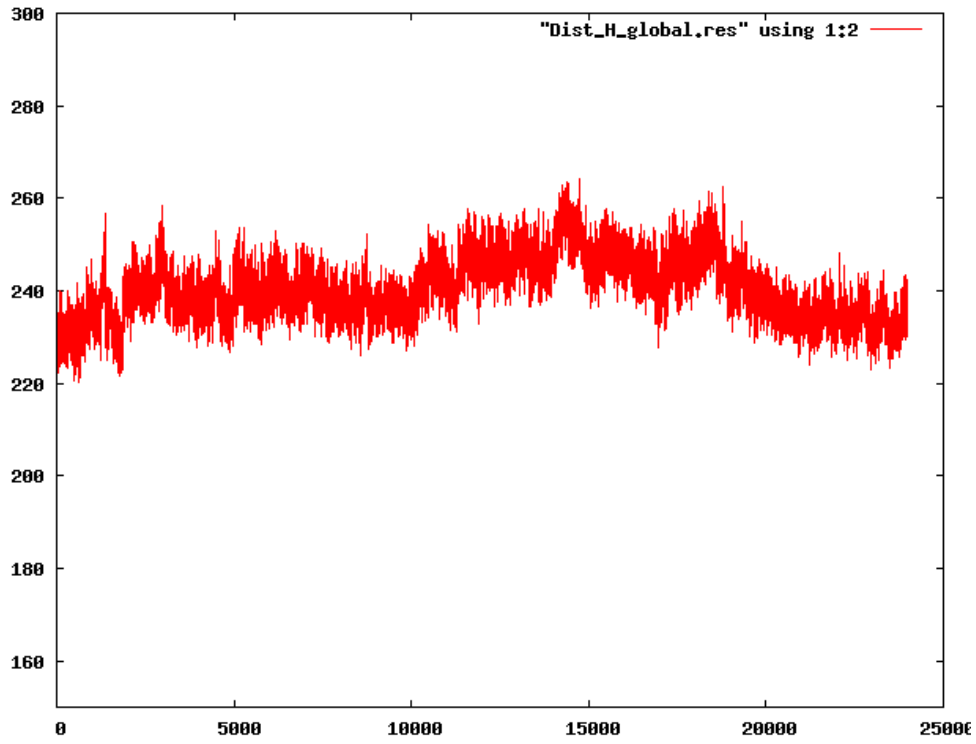
Annexe E 86 : M_GOF distance totale réplique II



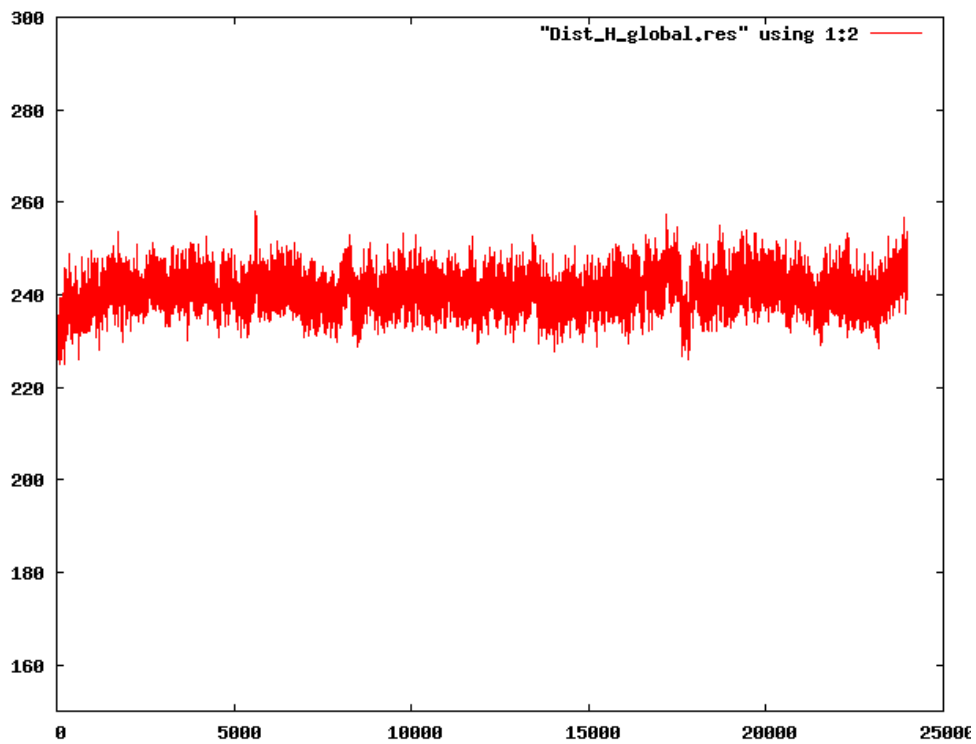
Annexe E 87 : M_GOF distance totale réplique III



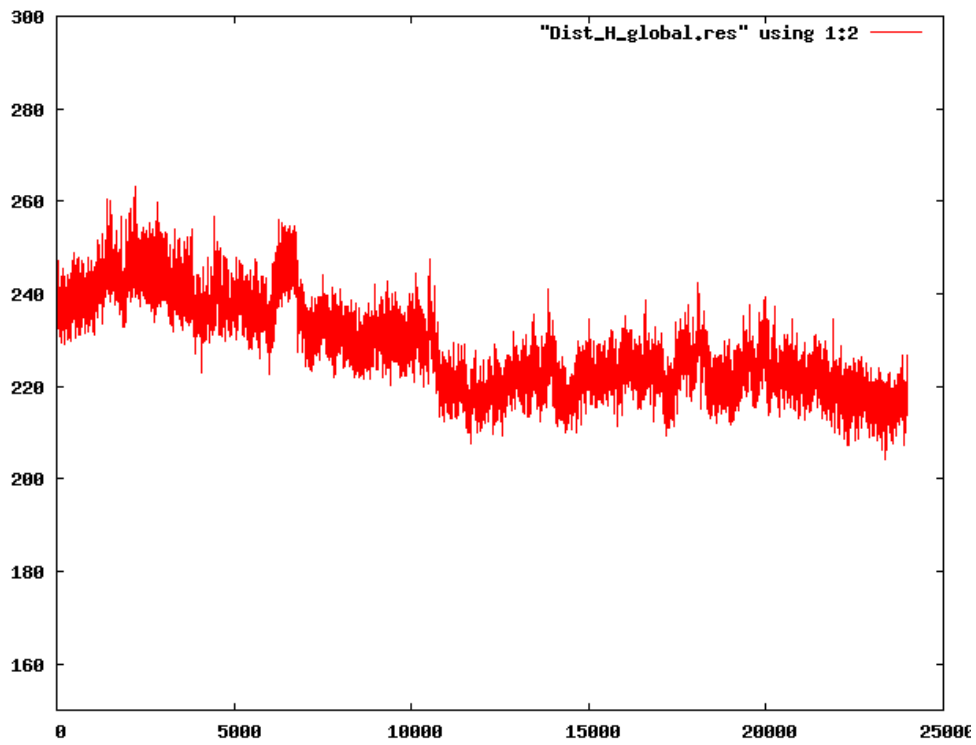
Annexe E 88 : M_NUaGAL distance totale réplique I



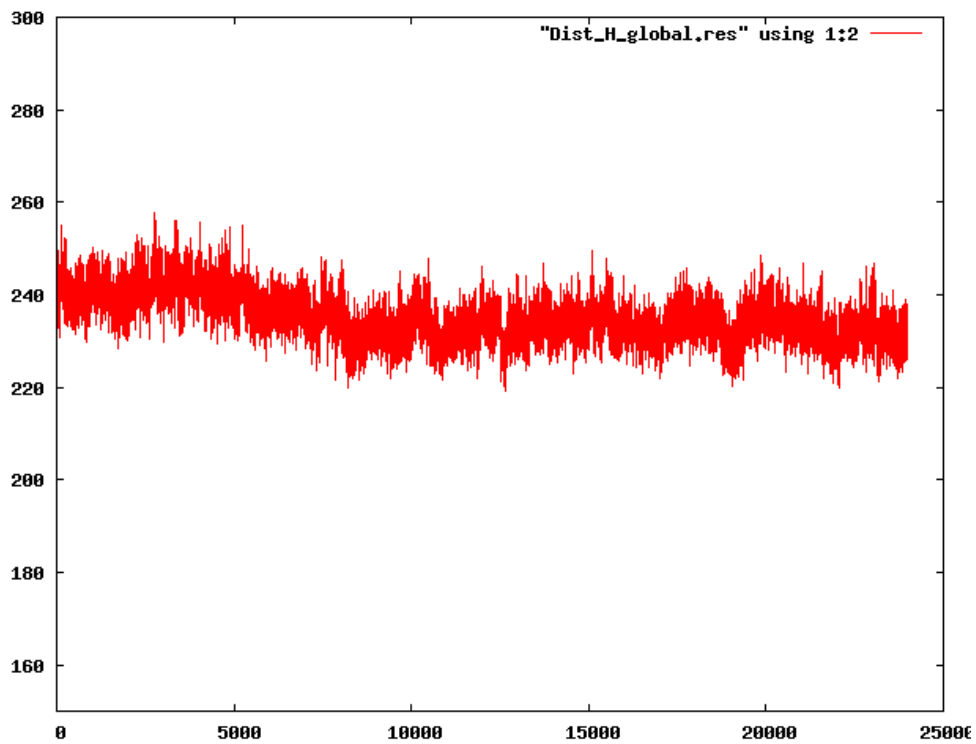
Annexe E 89 : M_NUaGAL distance totale réplique II



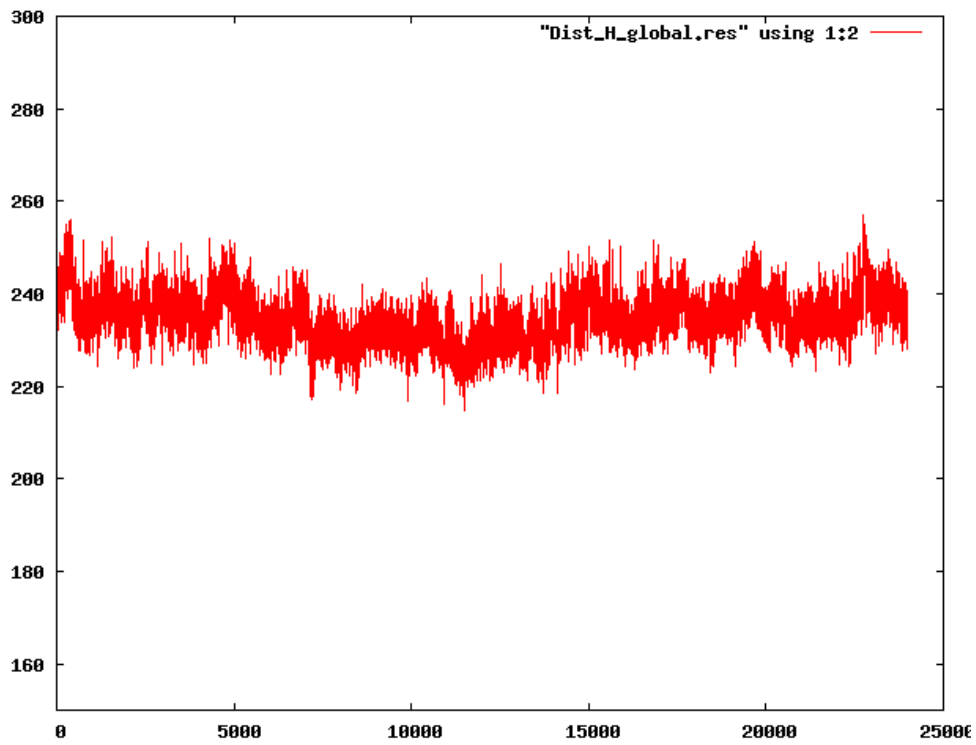
Annexe E 90 : M_NUaGAL distance totale réplique III



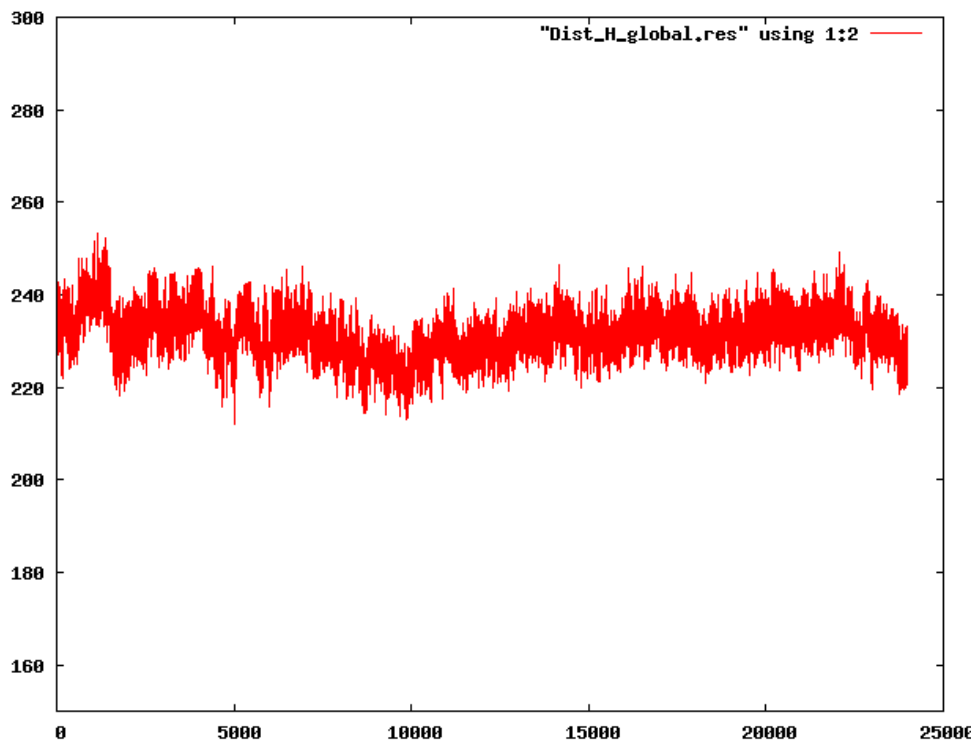
Annexe E 91 : M_OCH distance totale réplique I



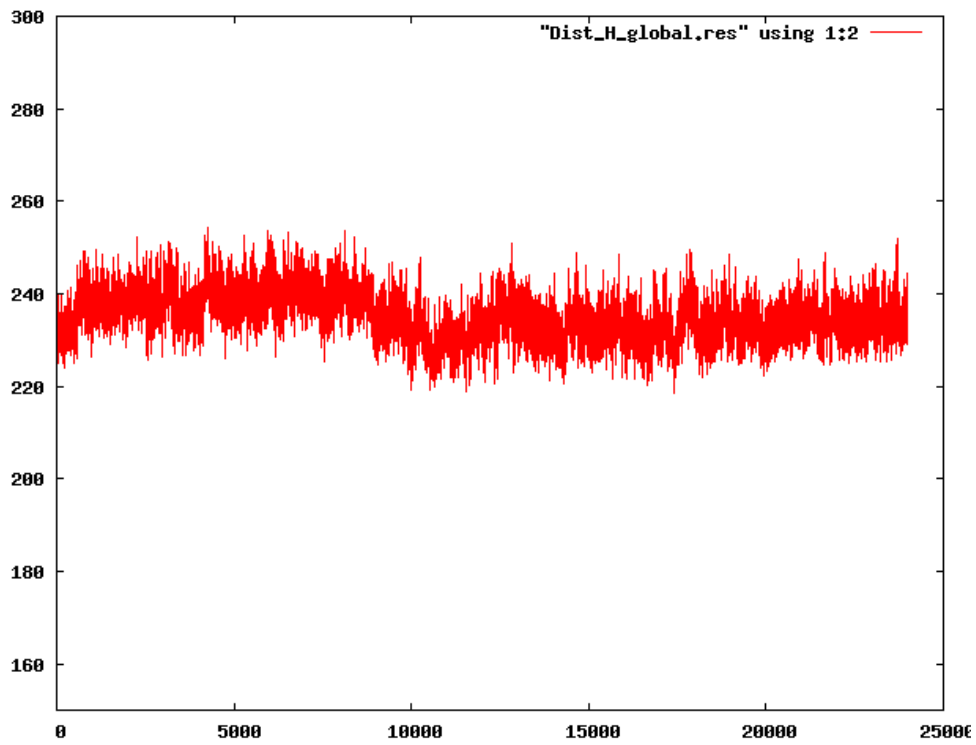
Annexe E 92 : M_OCH distance totale réplique II



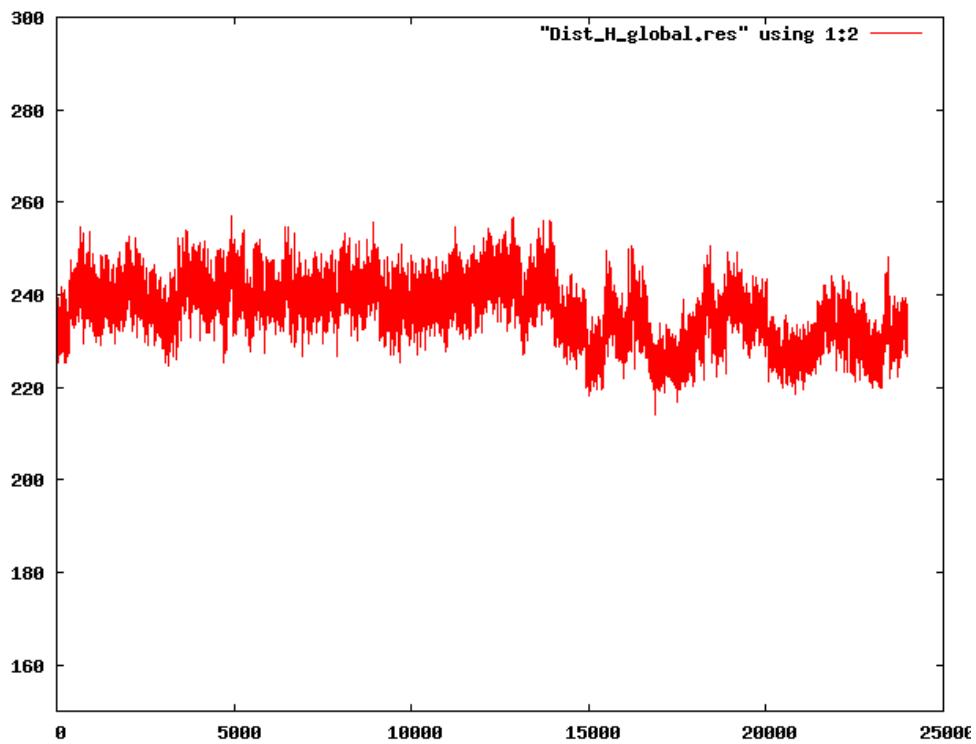
Annexe E 93 : M_OCH distance totale réplique III



Annexe E 94 : M_SaGAL distance totale réplique I



Annexe E 95 : M_SaGAL distance totale réplique II



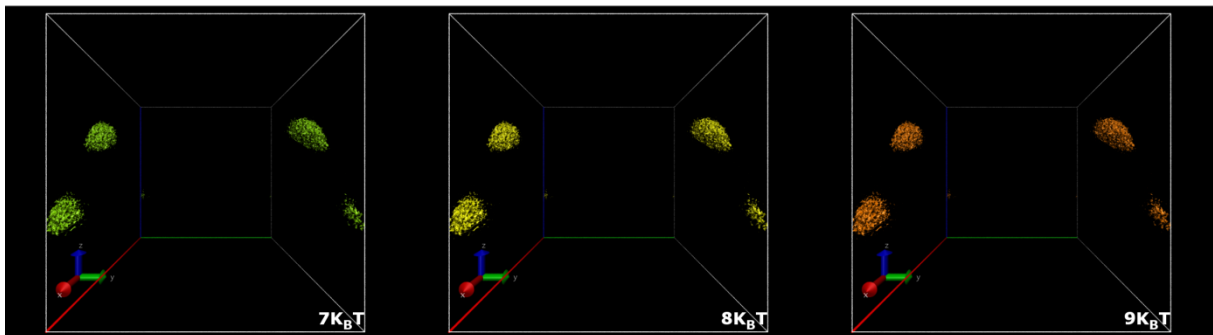
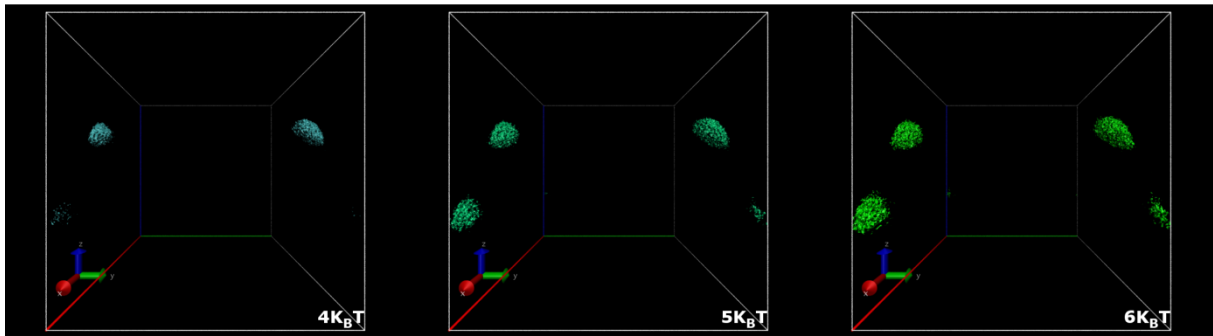
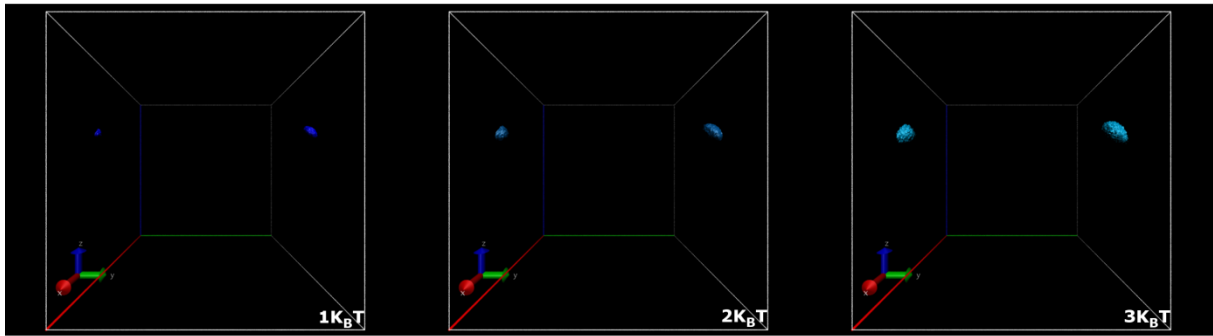
Annexe E 96 : M_SaGAL distance totale réplique III

Annexe F – FEL-3D

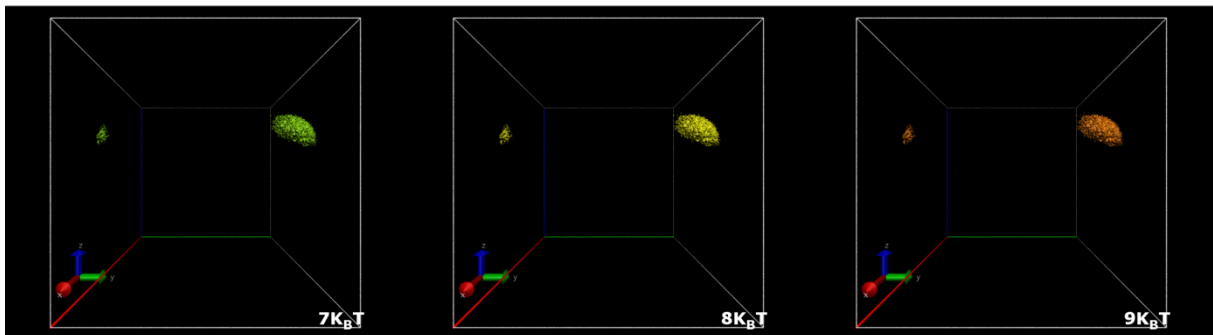
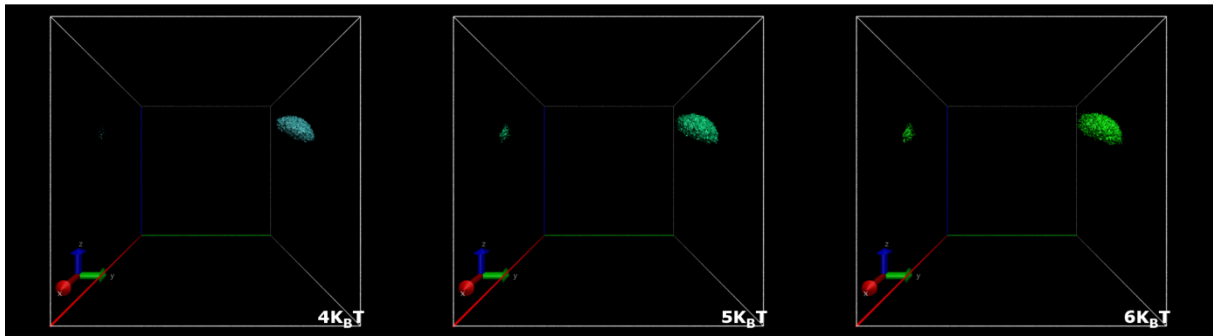
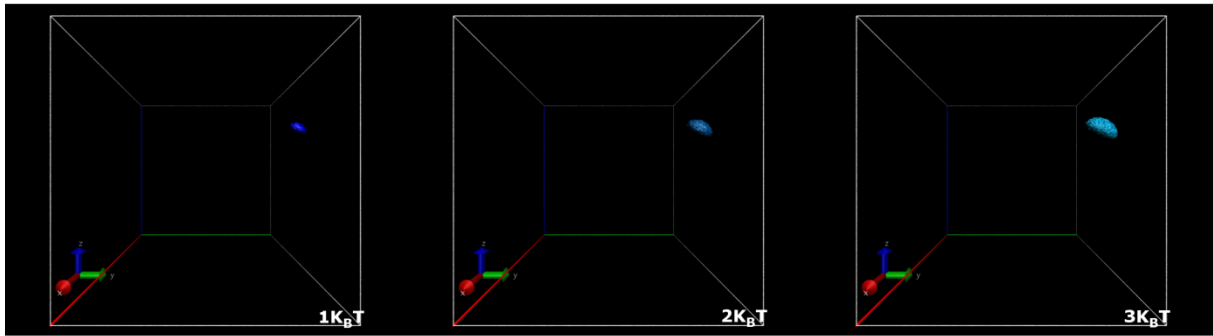
Dans tous les graphes, sont représentés les paysages énergétiques de 1 à 9 k_BT dans l'espace tridimensionnel défini par les trois angles dièdres (ϕ_x , ϕ_y , ϕ_z). Chaque angle est exprimé en degrés et vari entre -180° et 180°.

Annexe F 1 : H_7DW réplique I	274
Annexe F 2 : H_7DW réplique II	275
Annexe F 3 : H_7DW réplique III	276
Annexe F 4 : H_aGAL réplique I	277
Annexe F 5 : H_aGAL réplique II	278
Annexe F 6 : H_aGAL réplique III	279
Annexe F 7 : H_GOF réplique I	280
Annexe F 8 : H_GOF réplique II	281
Annexe F 9 : H_GOF réplique III	282
Annexe F 10 : H_NUaGAL réplique I	283
Annexe F 11 : H_NUaGAL réplique II	284
Annexe F 12 : H_NUaGAL réplique III	285
Annexe F 13 : H_OCH réplique I	286
Annexe F 14 : H_OCH réplique II	287
Annexe F 15 : H_OCH réplique III	288
Annexe F 16 : H_OCH9 réplique I	289
Annexe F 17 : H_OCH9 réplique II	290
Annexe F 18 : H_OCH9 réplique III	291
Annexe F 19 : H_SaGAL réplique I	292
Annexe F 20 : H_SaGAL réplique II	293
Annexe F 21 : H_SaGAL réplique III	294
Annexe F 22 : M_7DW réplique I	295
Annexe F 23 : M_7DW réplique II	296
Annexe F 24 : M_7DW réplique III	297
Annexe F 25 : M_aGAL réplique I	298
Annexe F 26 : M_aGAL réplique II	299
Annexe F 27 : M_aGAL réplique III	300
Annexe F 28 : M_AZOL réplique I	301

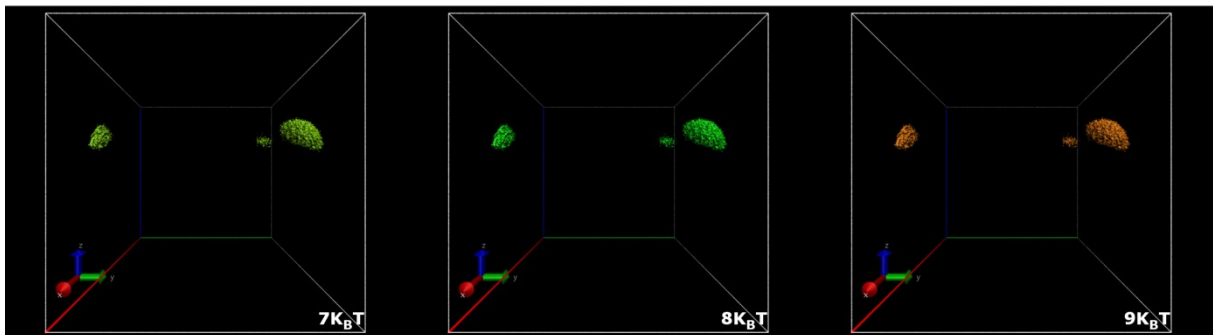
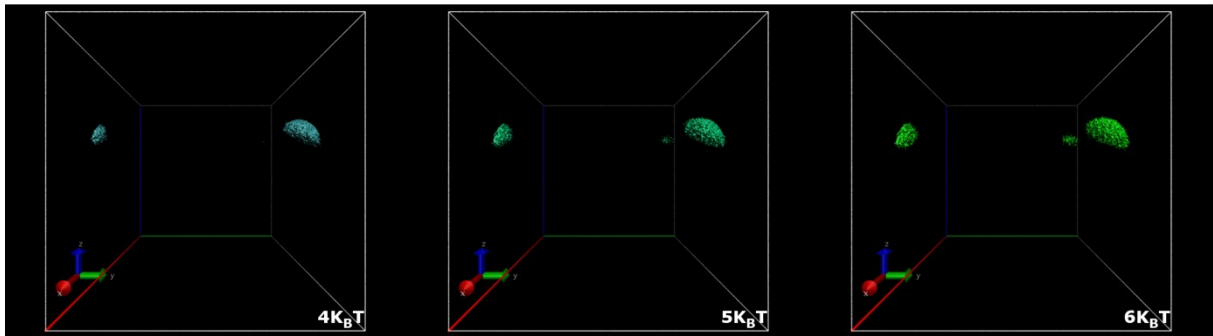
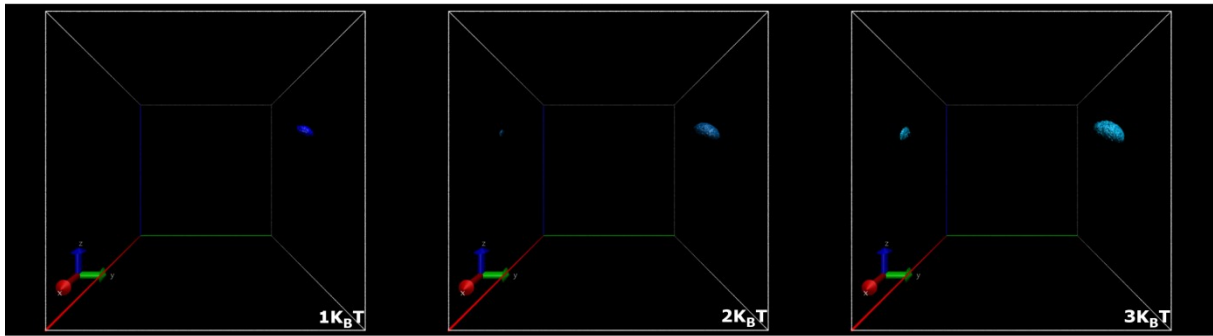
Annexe F 29 : M_AZOL réplique II	302
Annexe F 30 : M_AZOL réplique III	303
Annexe F 31 : M_GOF réplique I	304
Annexe F 32 : M_GOF réplique II	305
Annexe F 33 : M_GOF réplique III	306
Annexe F 34 : M_NUaGAL réplique I	307
Annexe F 35 : M_NUaGAL réplique II	308
Annexe F 36 : M_NUaGAL réplique III	309
Annexe F 37 : M_OCH réplique I	310
Annexe F 38 : M_OCH réplique II	311
Annexe F 39 : M_OCH réplique III	312
Annexe F 40 : M_SaGAL réplique I	313
Annexe F 41 : M_SaGAL réplique II	314
Annexe F 42 : M_SaGAL réplique III	315



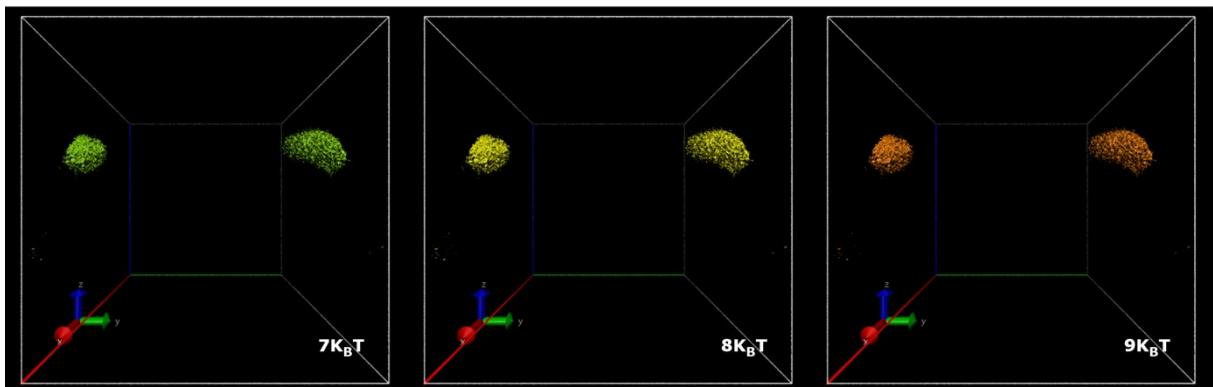
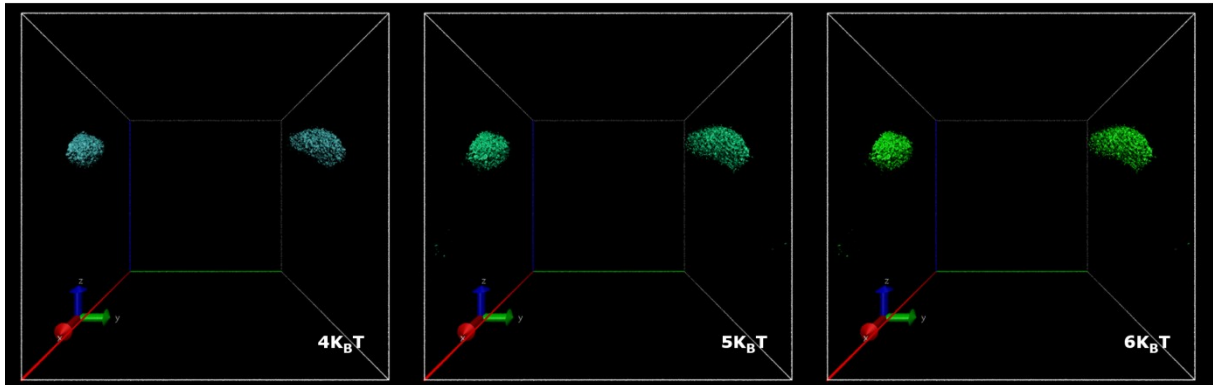
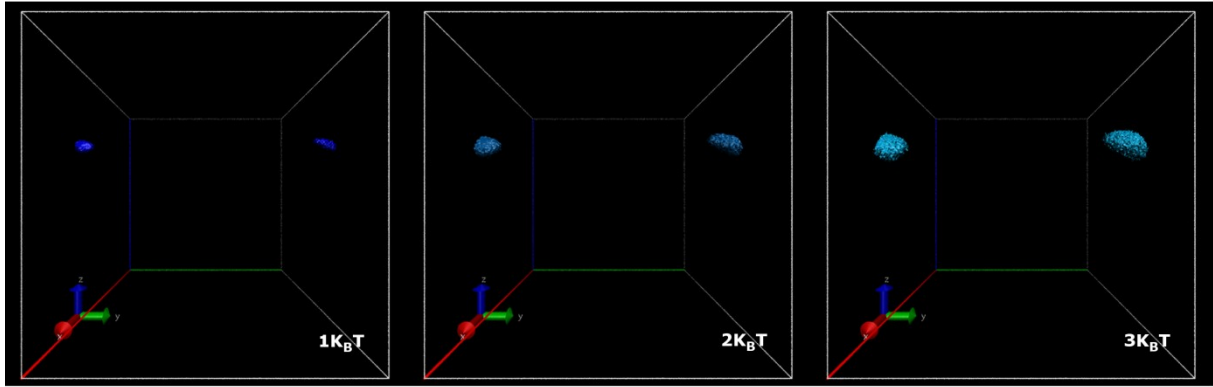
Annexe F 1 : H_7DW réplique I



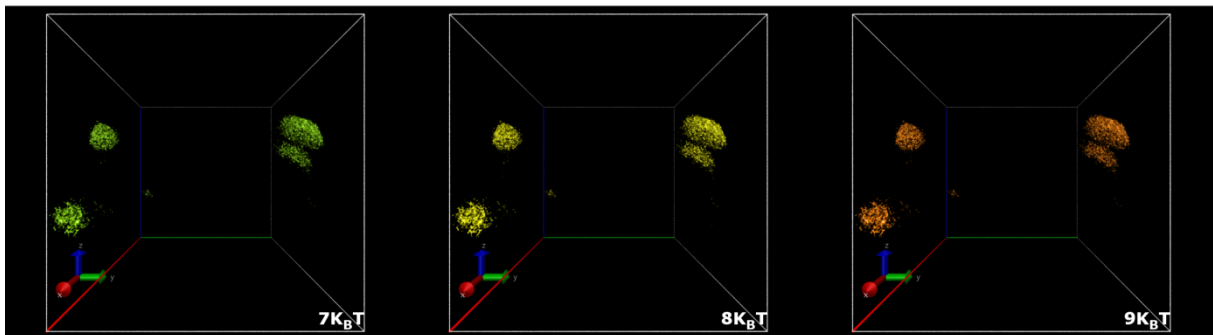
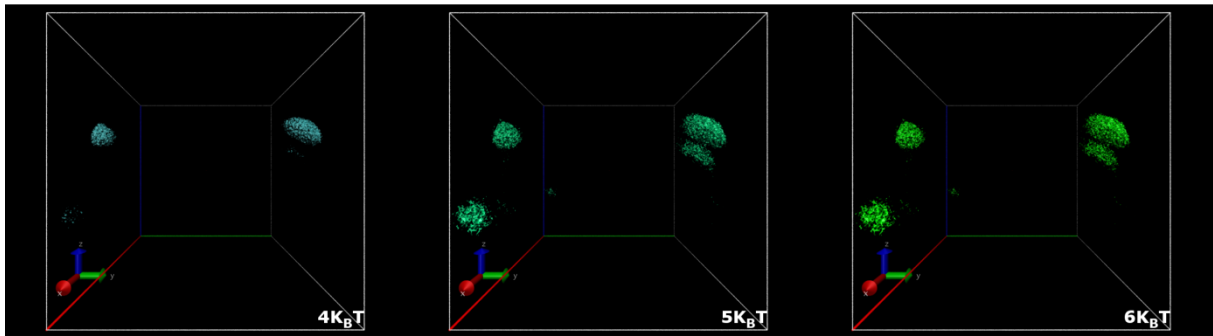
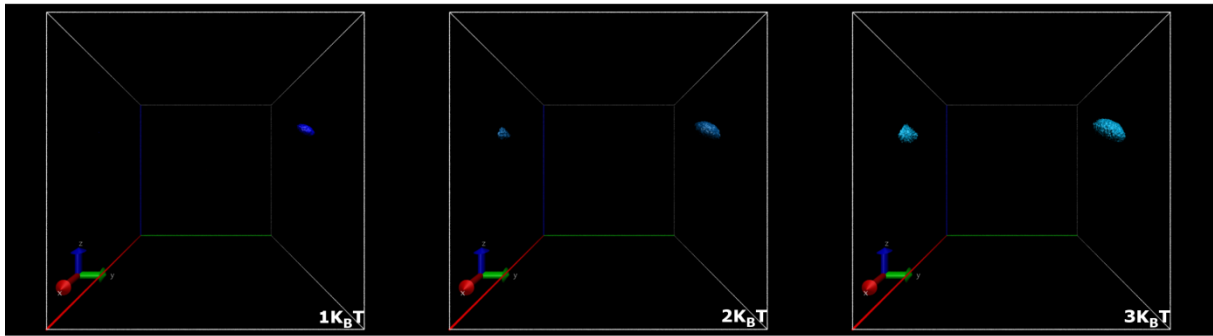
Annexe F 2 : H_7DW réplique II



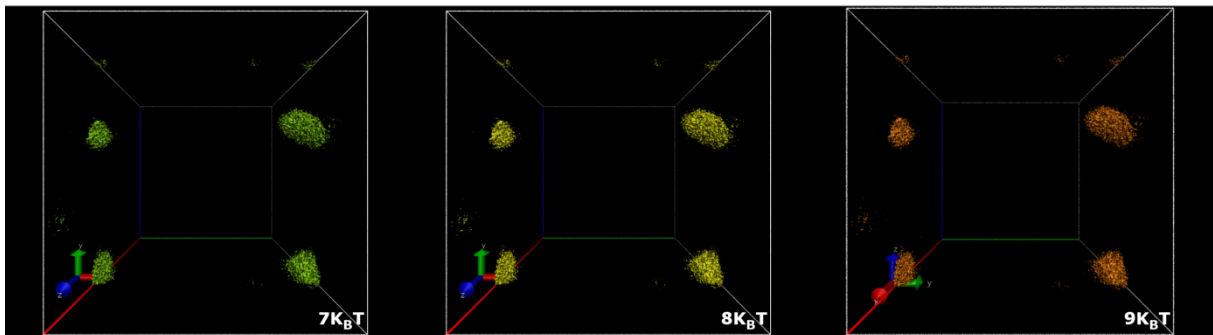
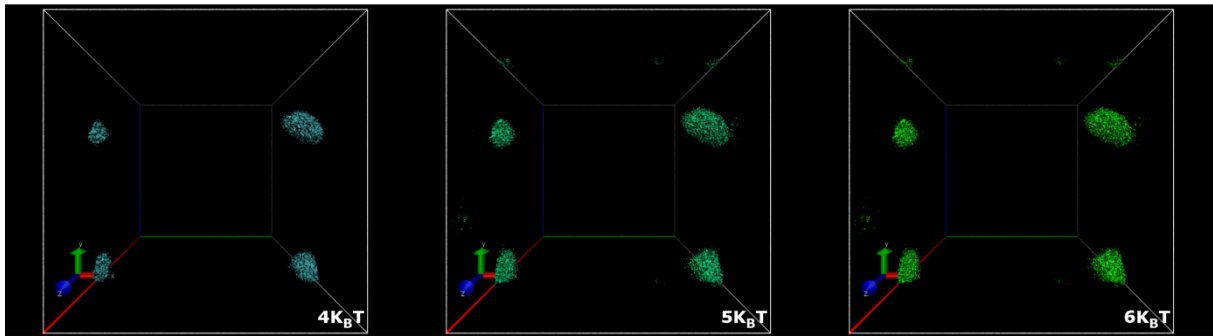
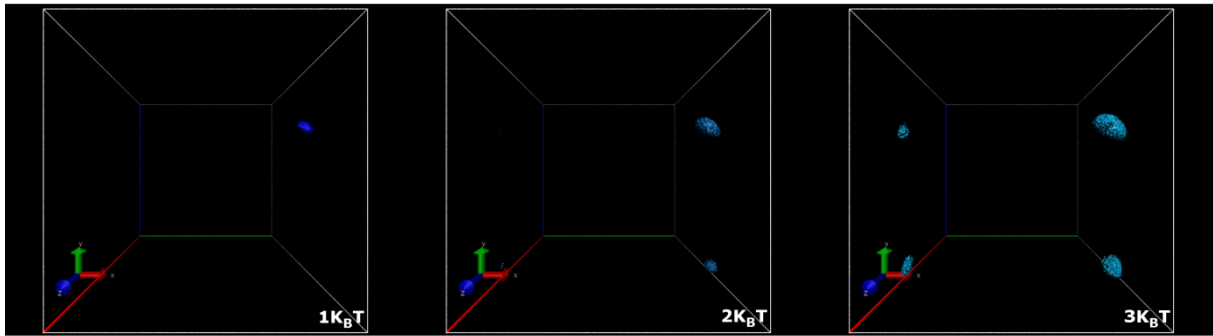
Annexe F 3 : H_7DW réplique III



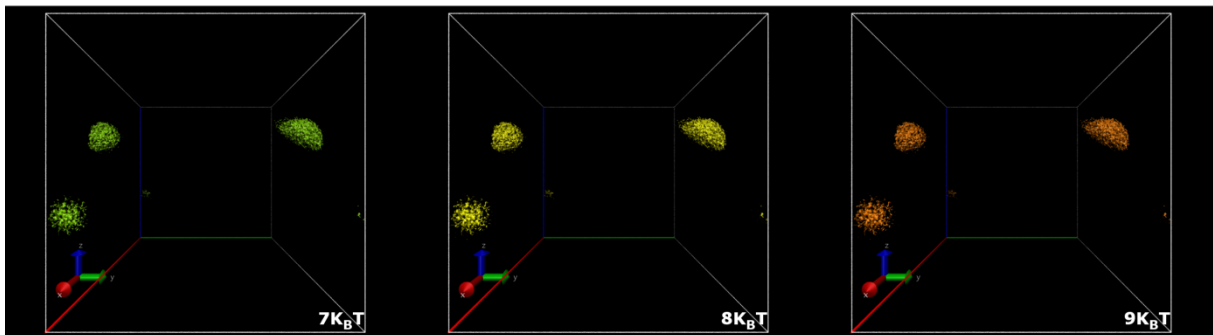
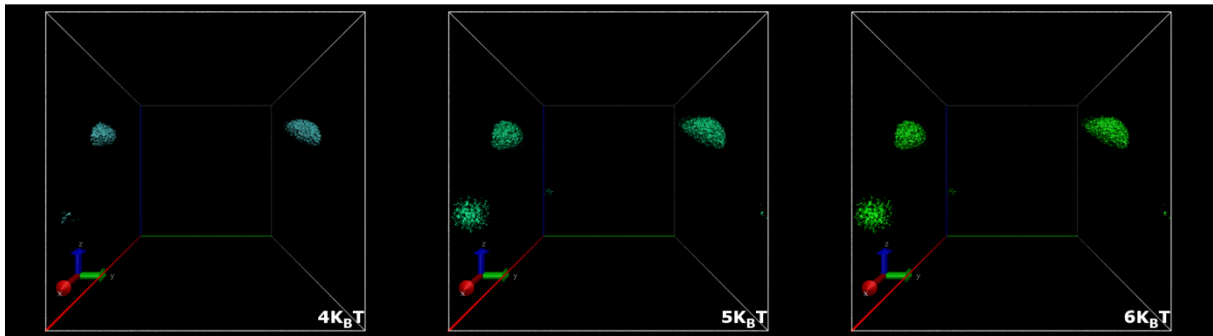
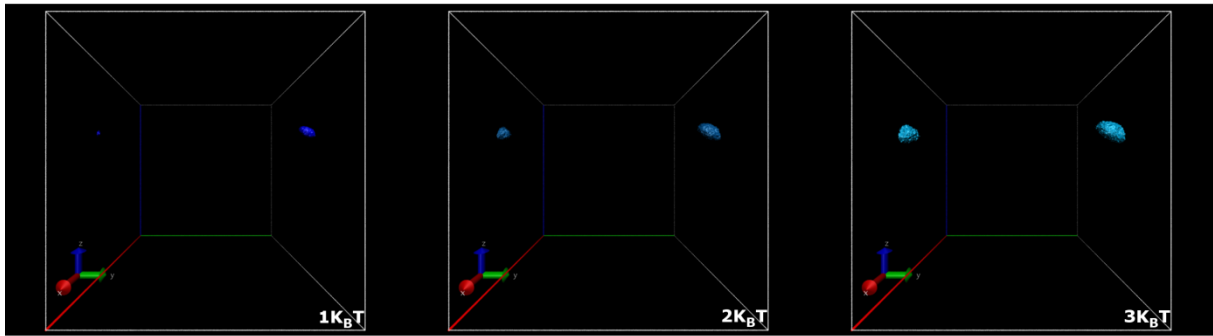
Annexe F 4 : H_aGAL réplique I



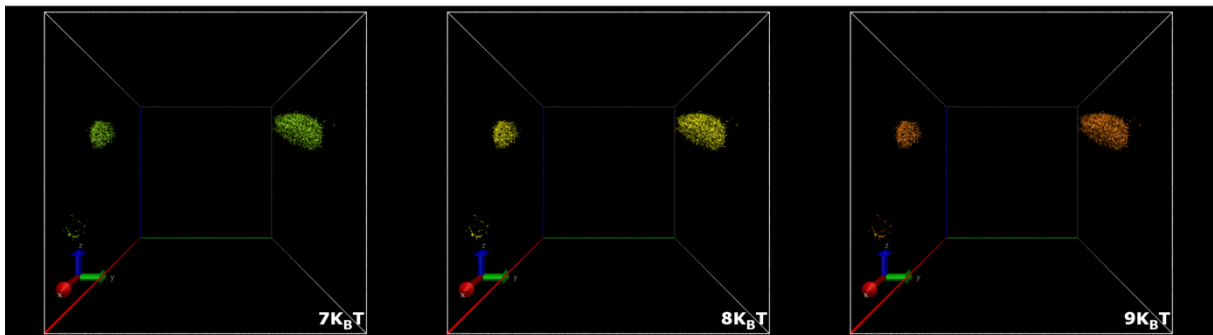
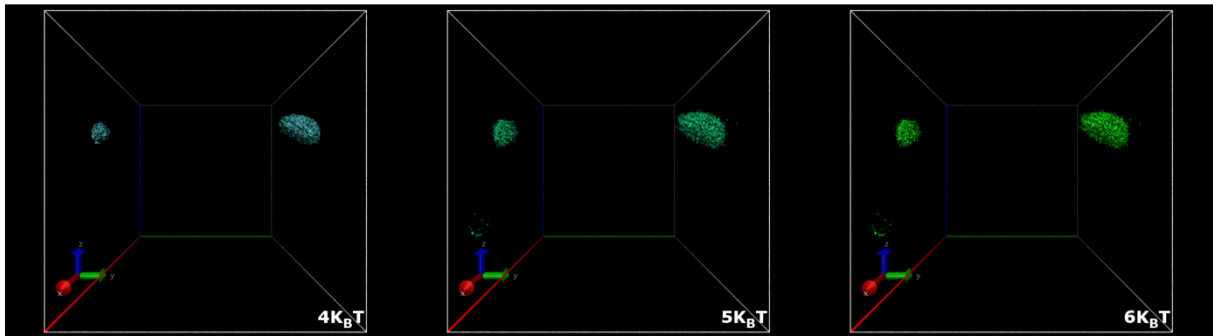
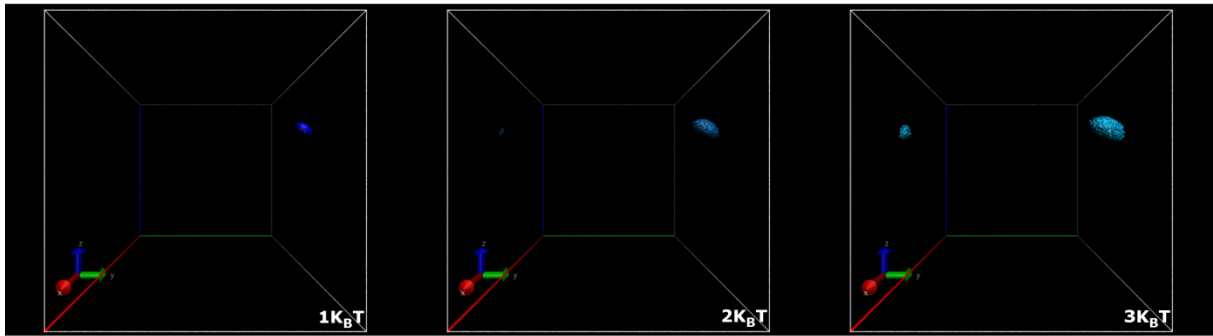
Annexe F 5 : H_aGAL réplique II



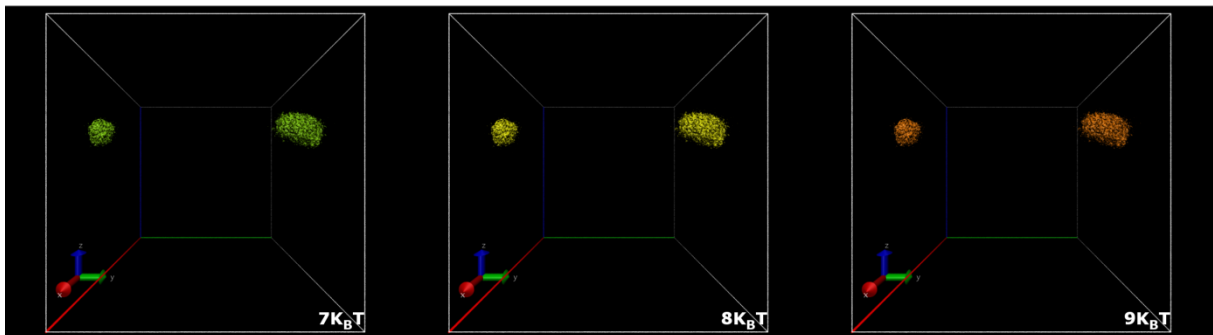
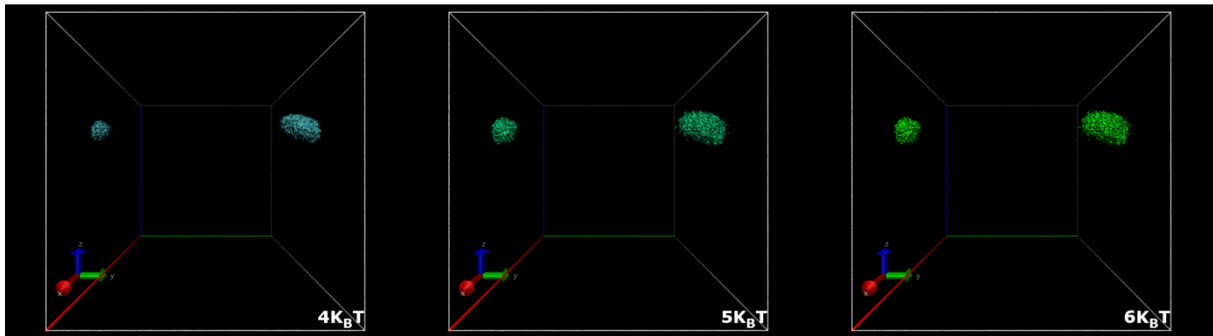
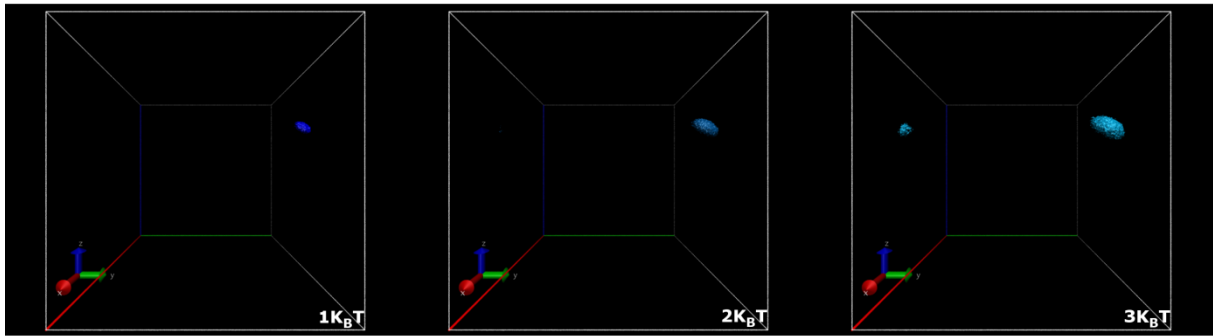
Annexe F 6 : H_aGAL réplique III



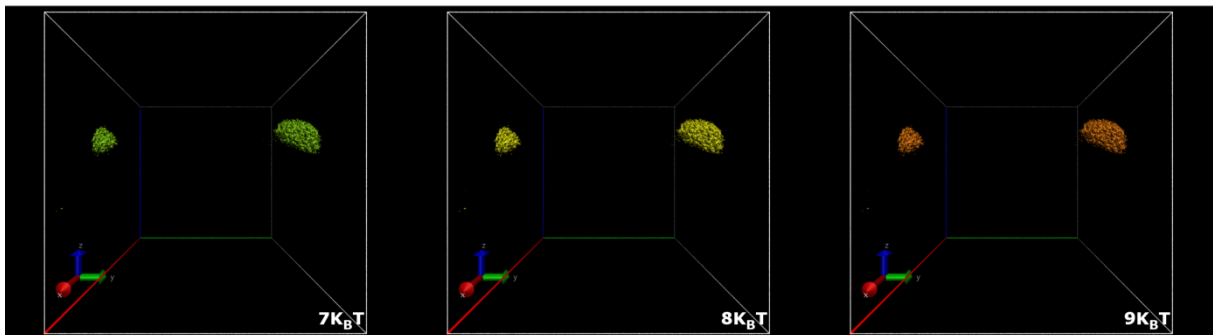
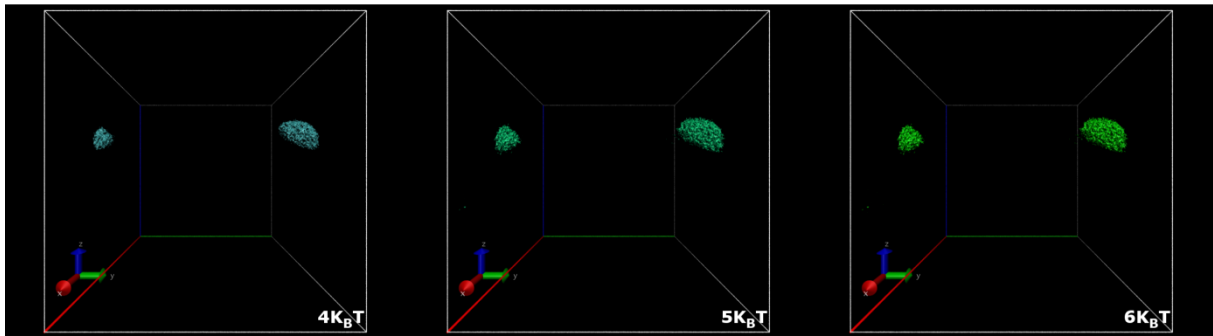
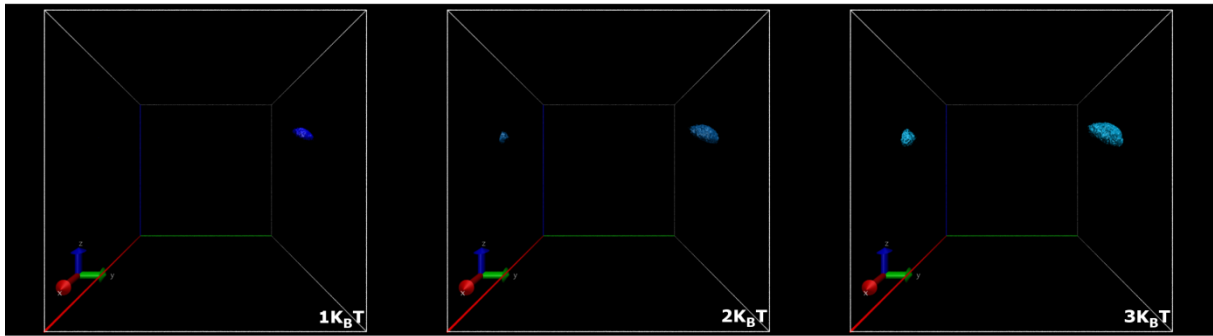
Annexe F 7 : H_GOF réplique I



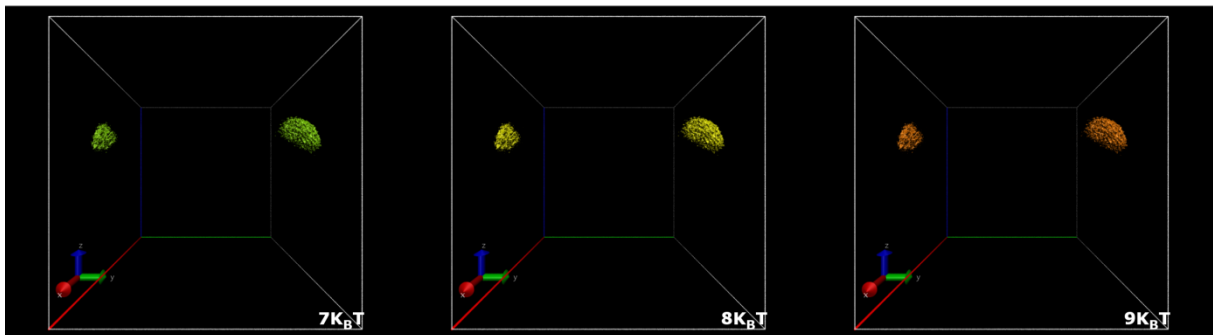
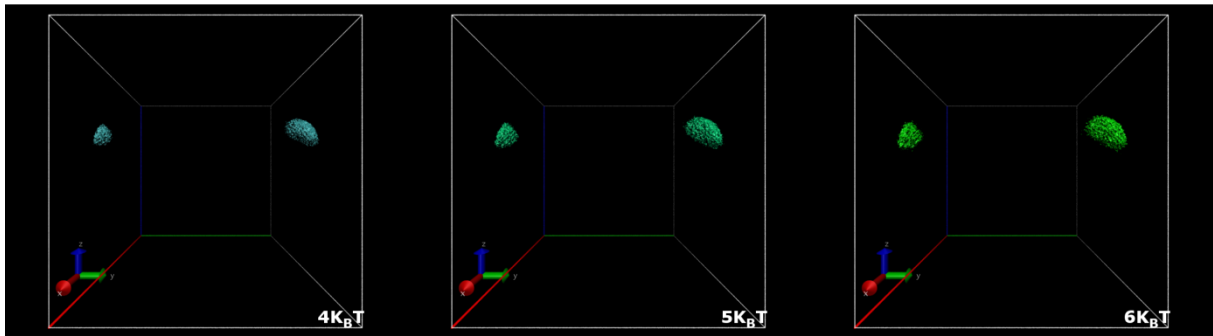
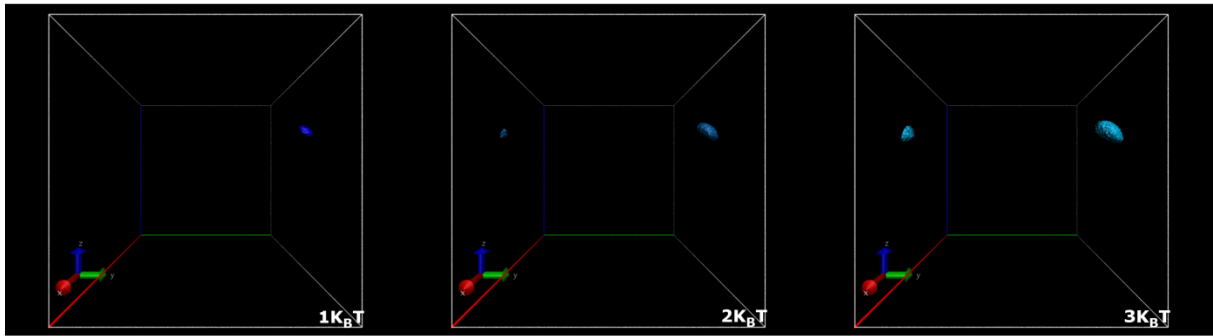
Annexe F 8 : H_GOF réplique II



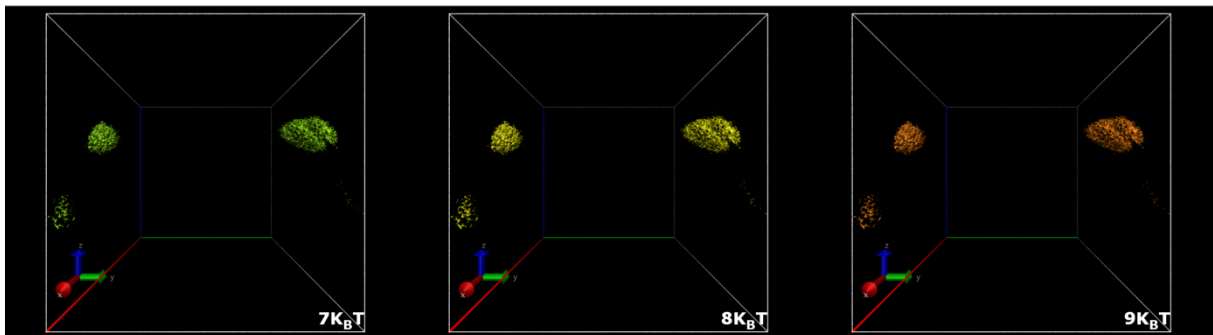
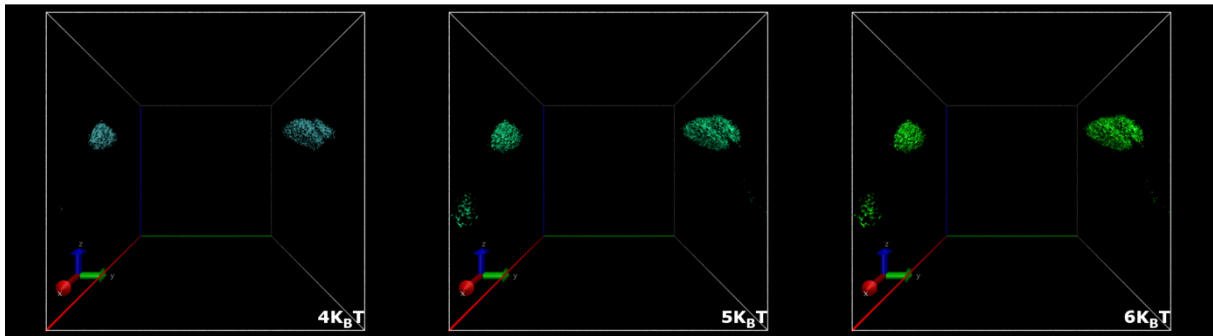
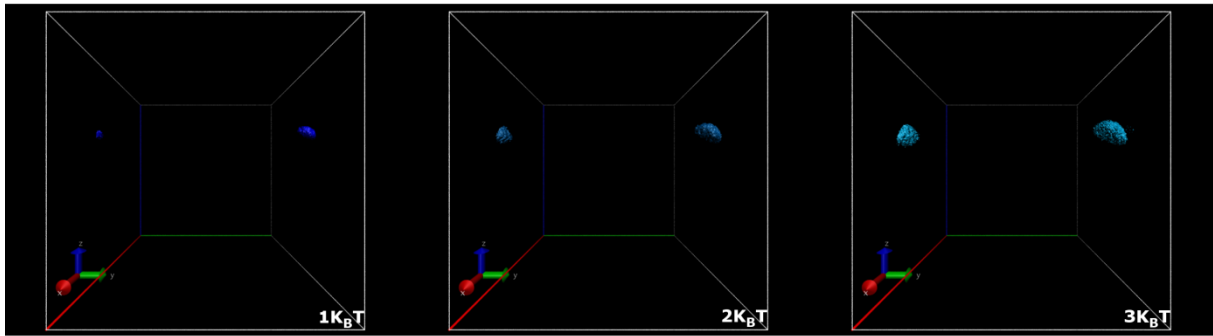
Annexe F 9 : H_GOF réplique III



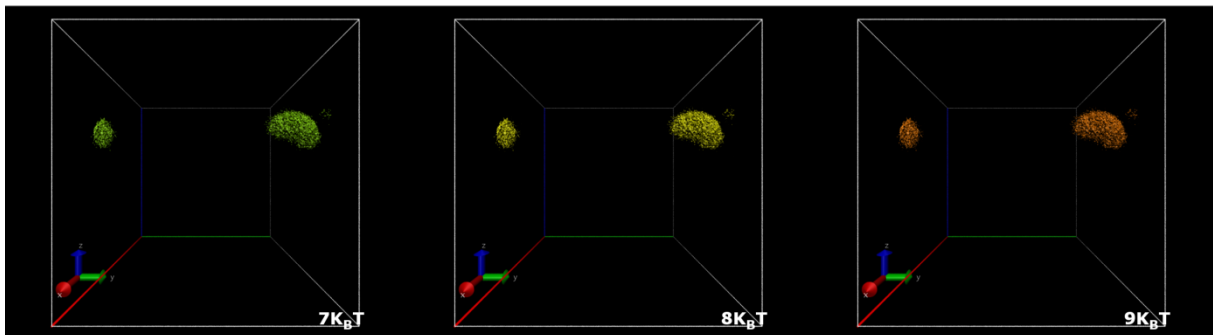
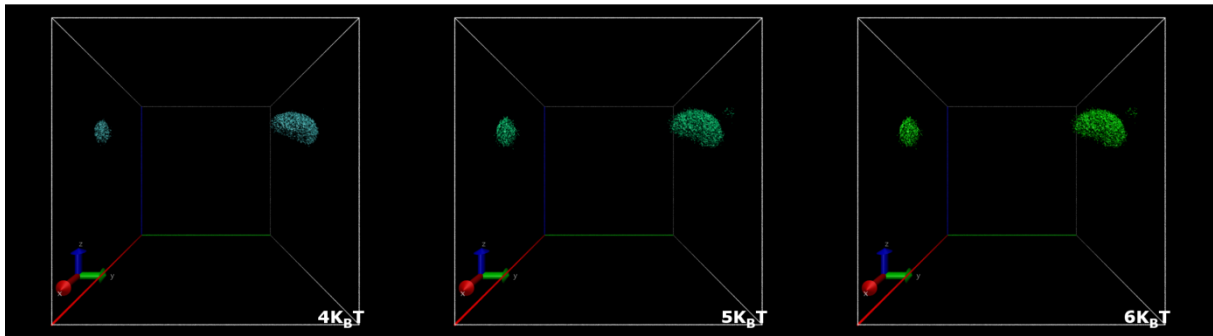
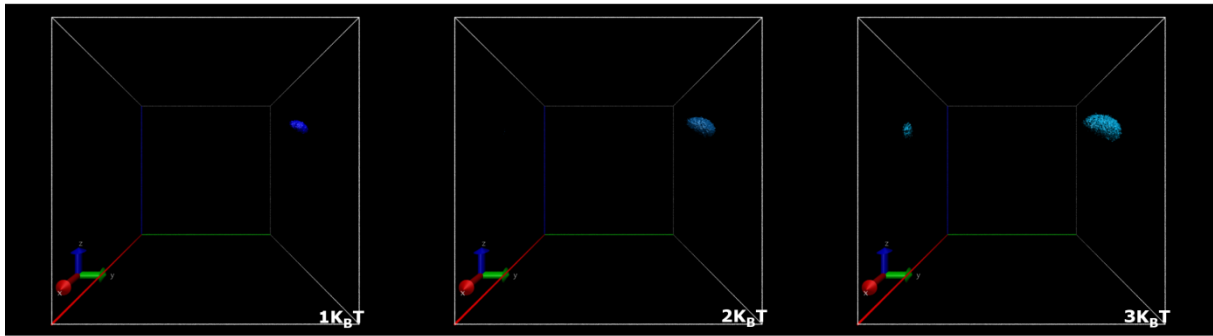
Annexe F 10 : H_NUaGAL réplique I



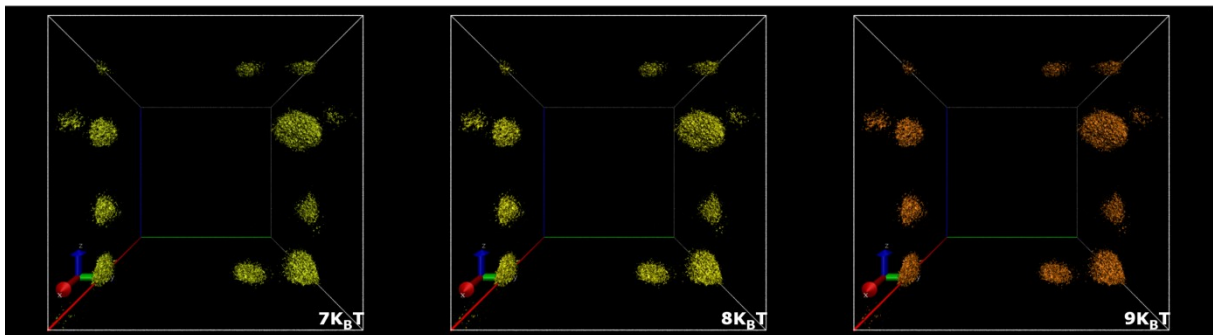
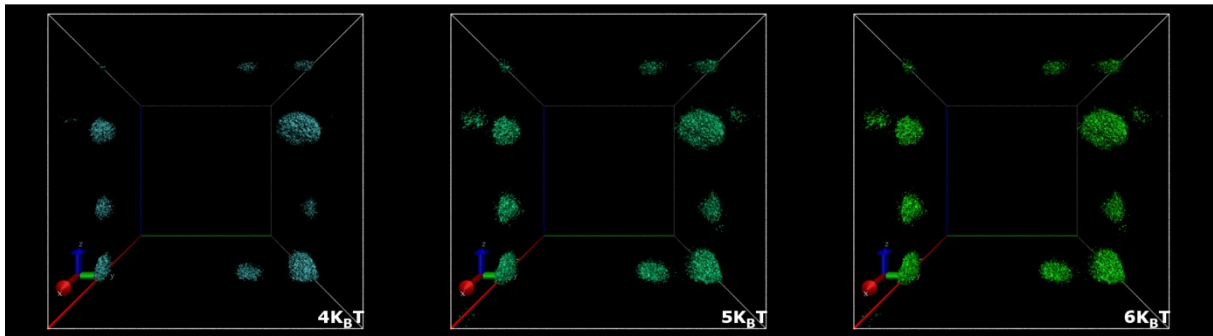
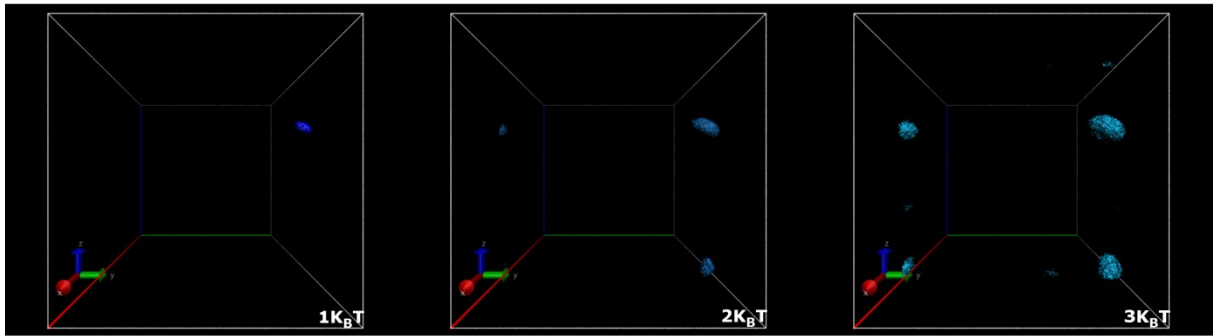
Annexe F 11 : H_NUaGAL réplique II



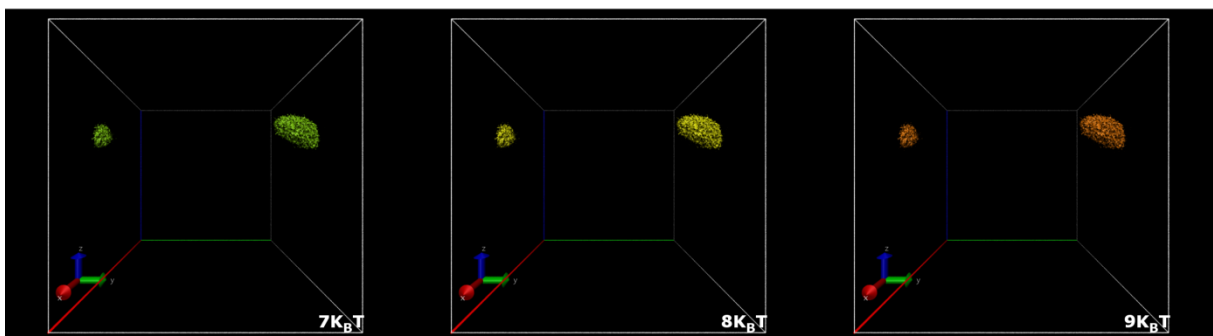
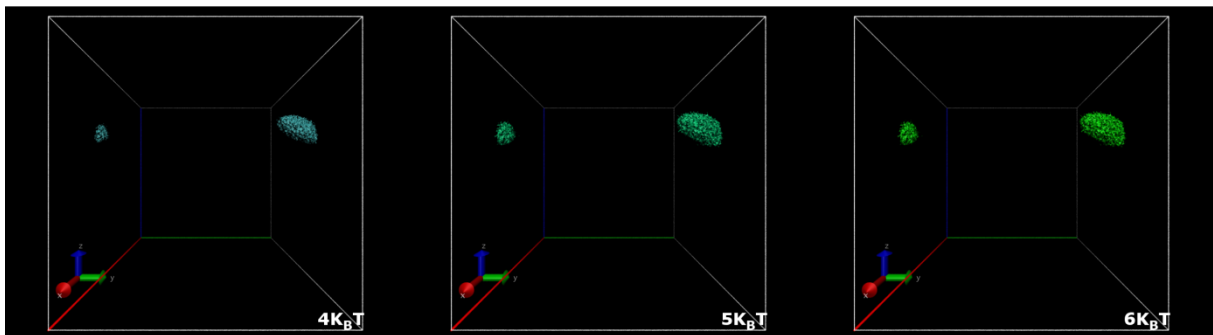
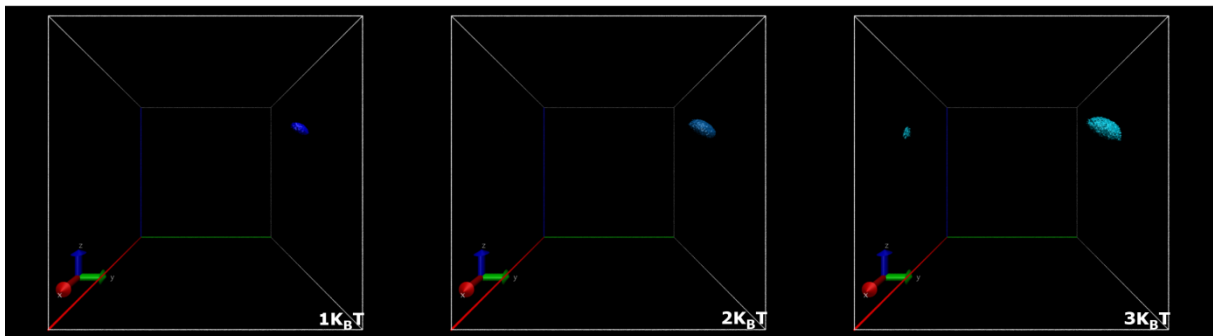
Annexe F 12 : H_NUaGAL réplique III



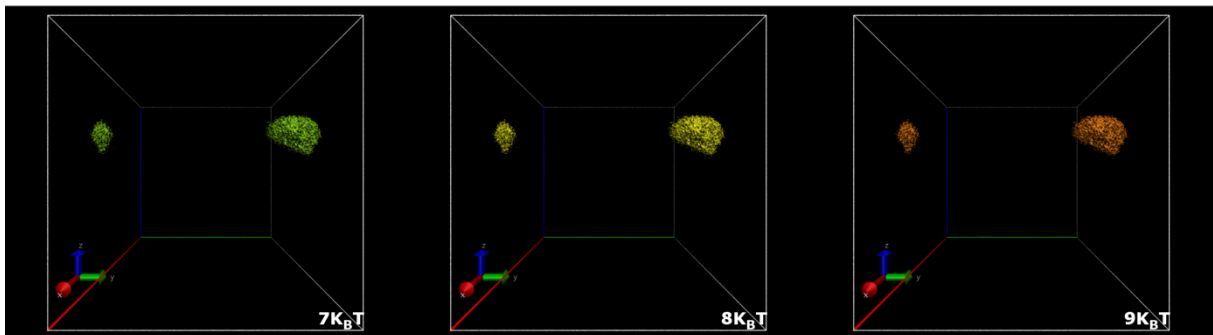
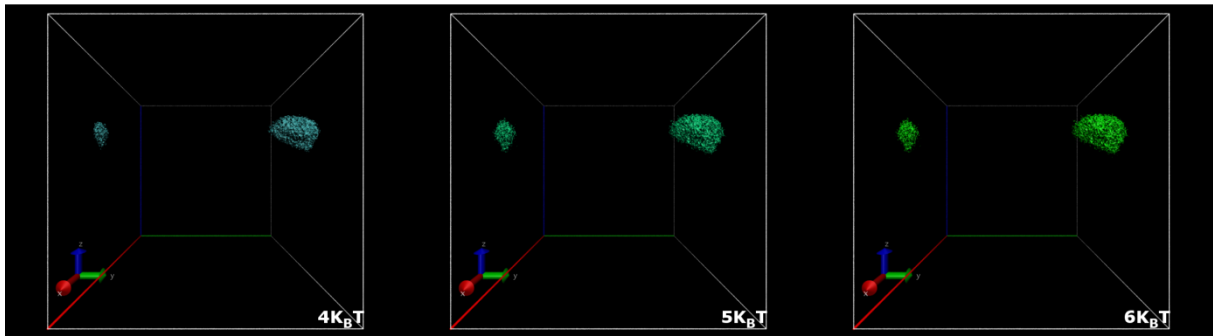
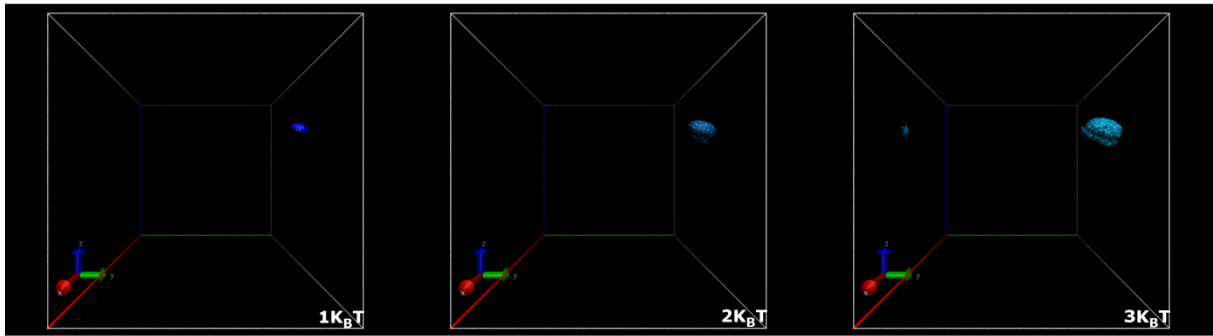
Annexe F 13 : H₂OCH réplique I



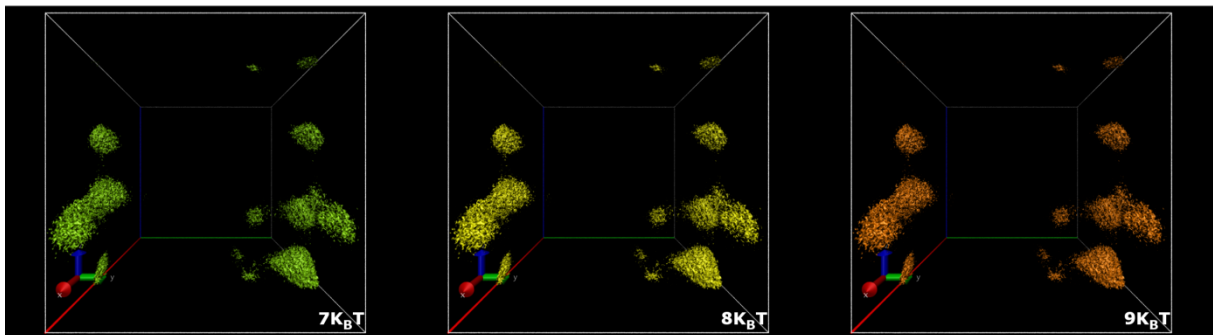
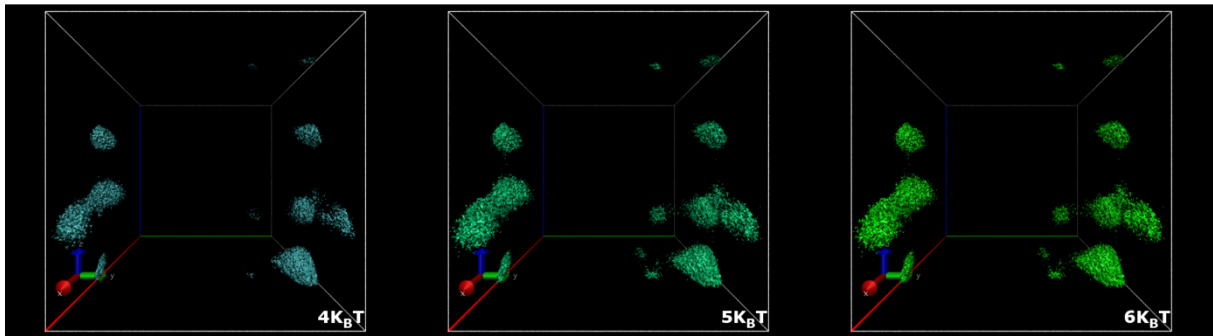
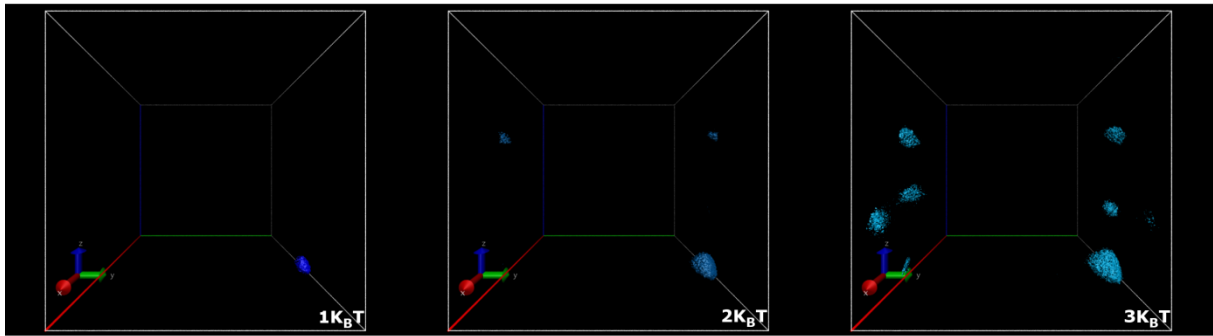
Annexe F 14 : H₂OCH réplique II



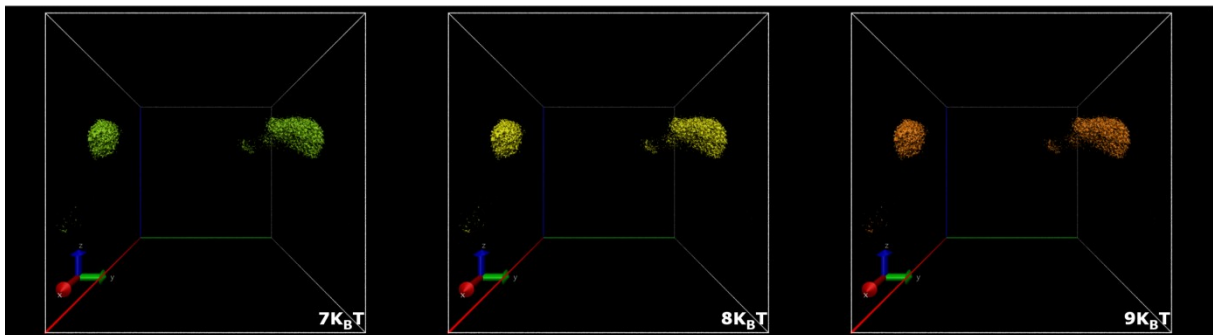
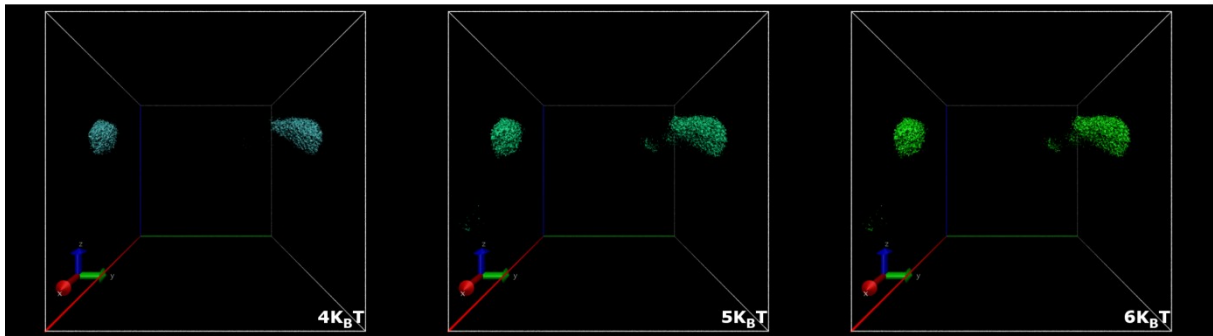
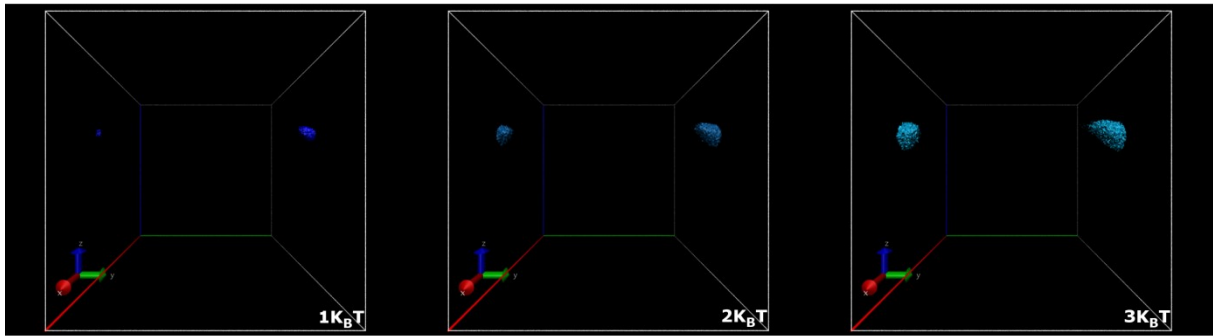
Annexe F 15 : H₂OCH réplique III



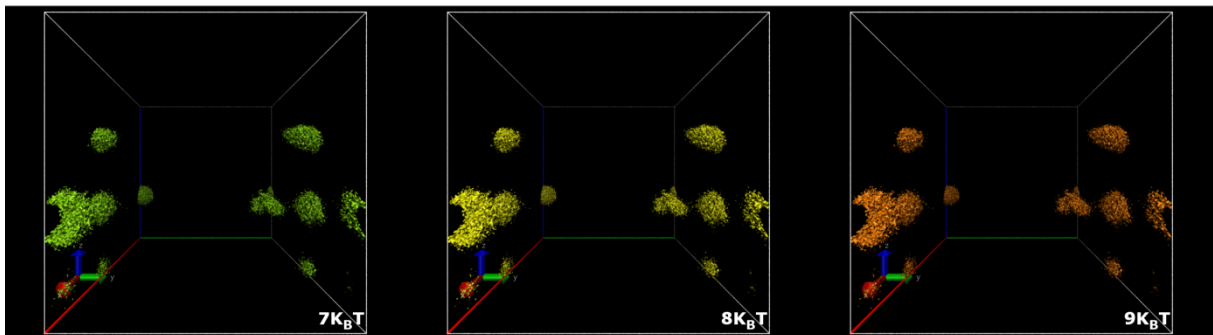
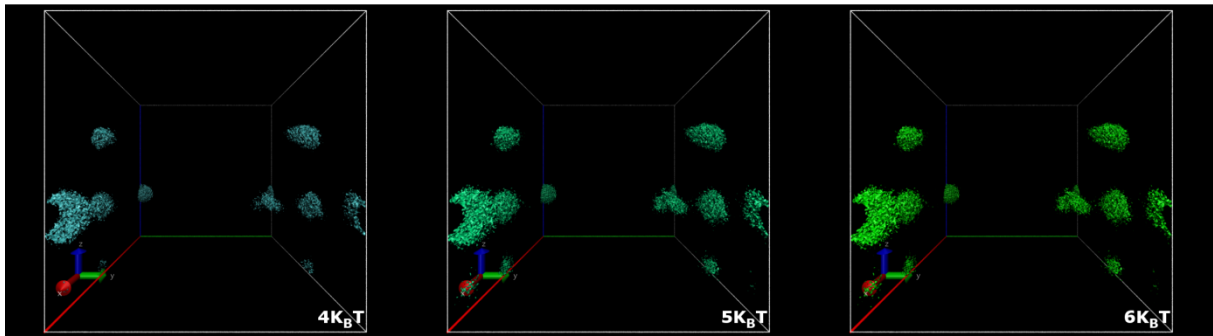
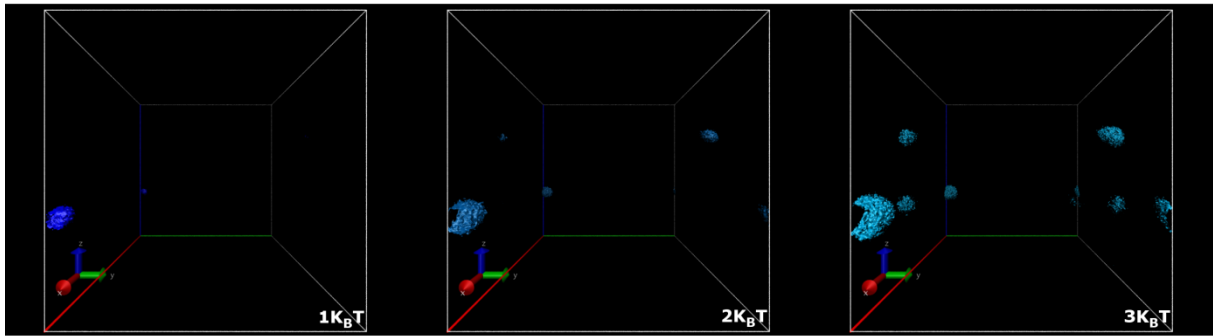
Annexe F 16 : H_OCH9 réplique I



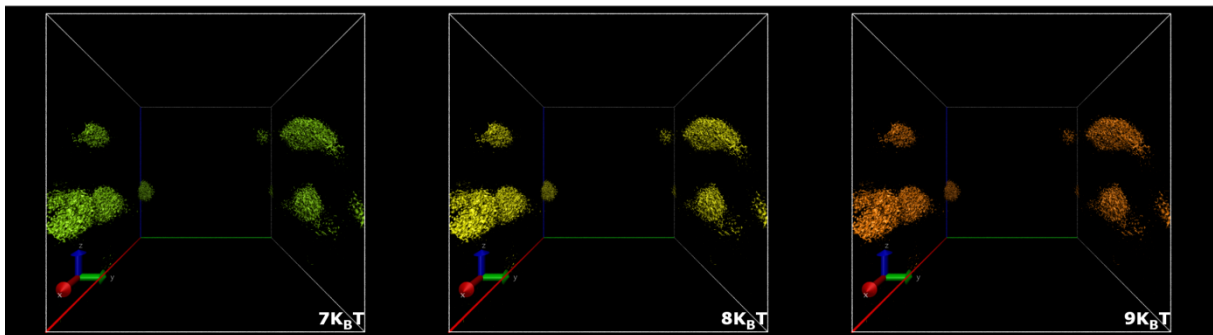
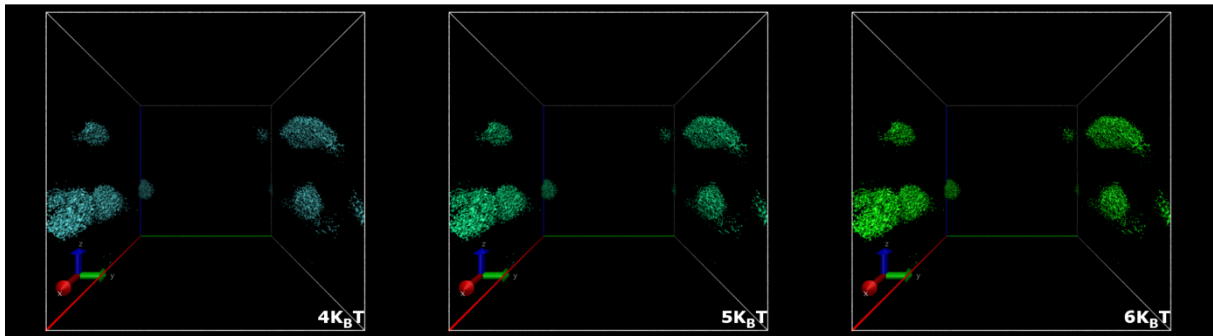
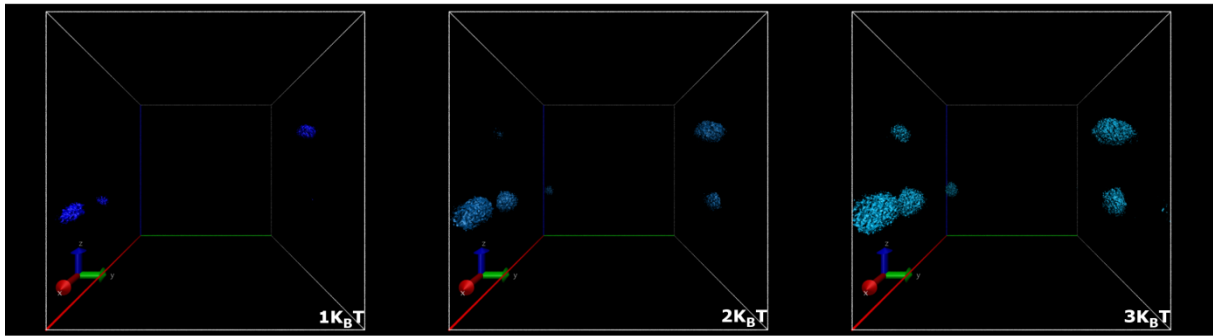
Annexe F 17 : H_OCH9 réplique II



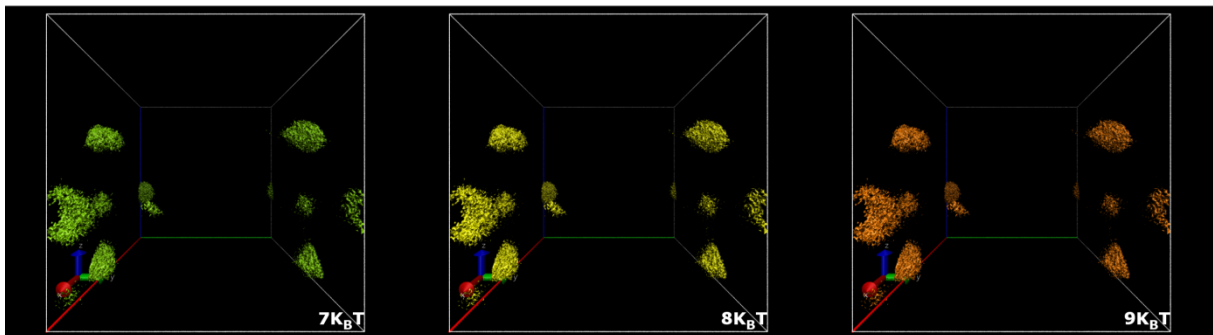
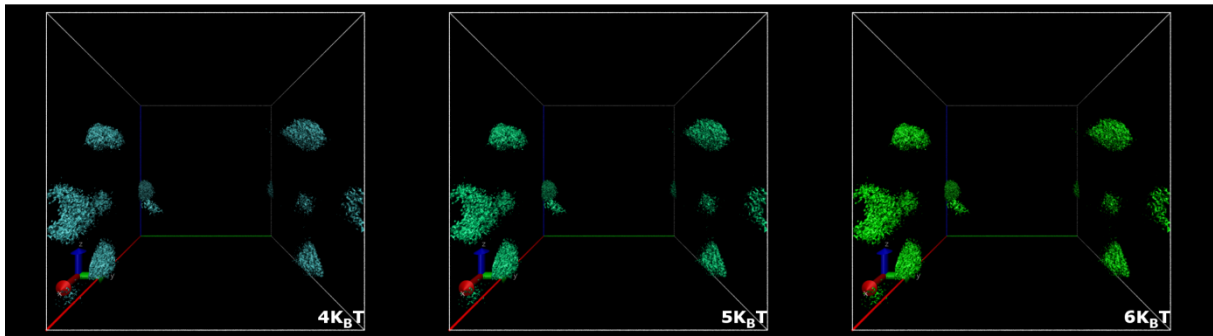
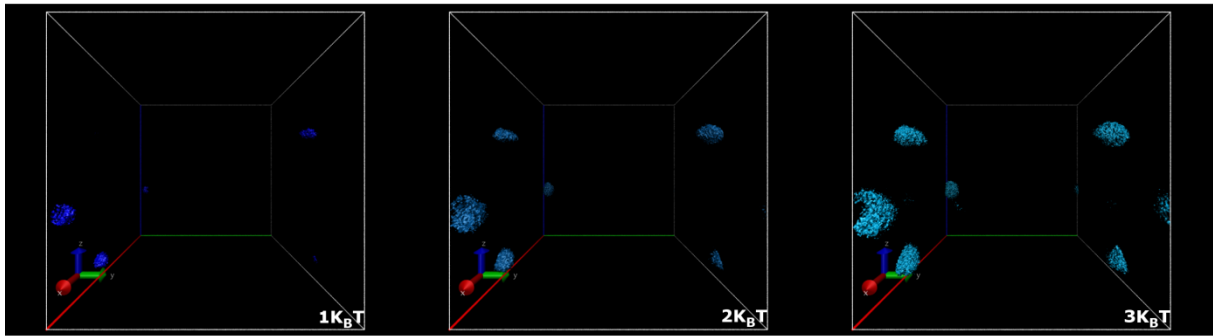
Annexe F 18 : H_OCH9 réplique III



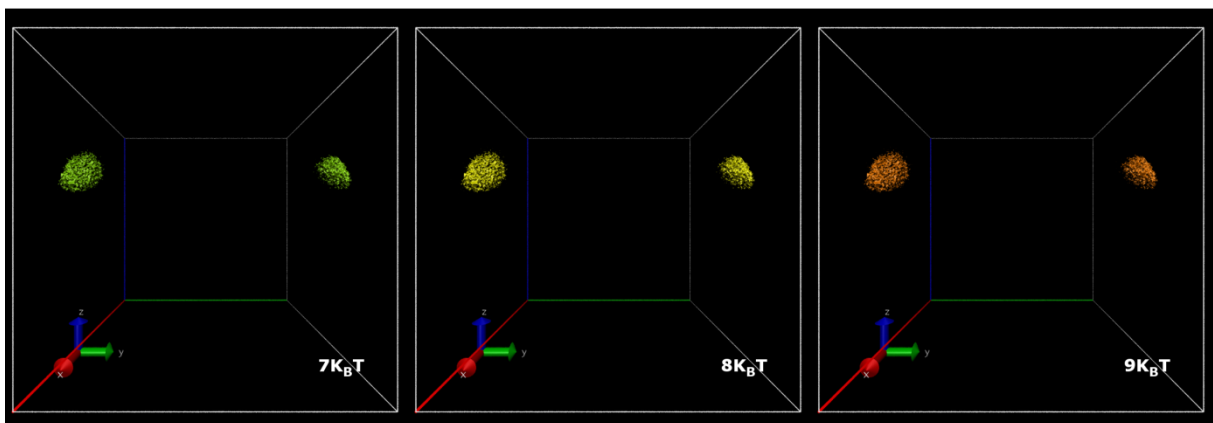
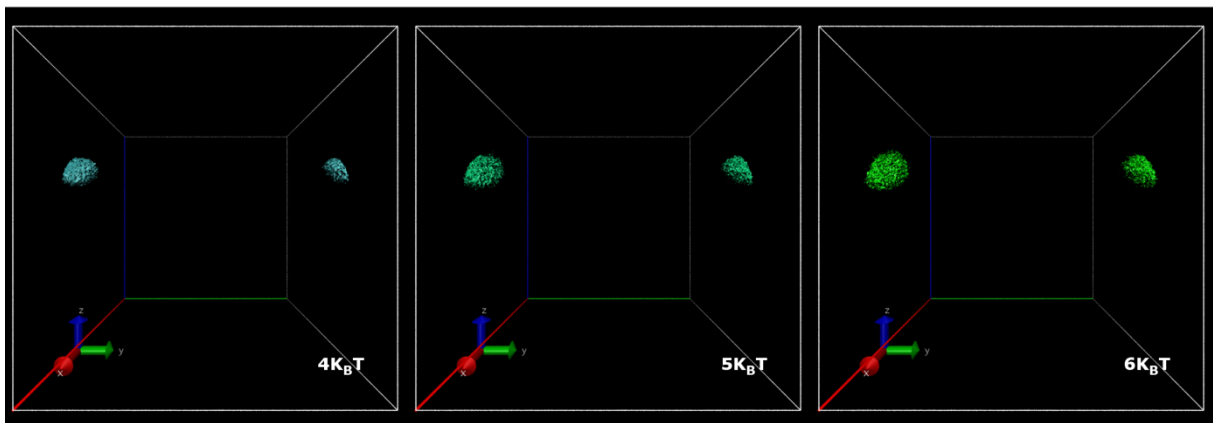
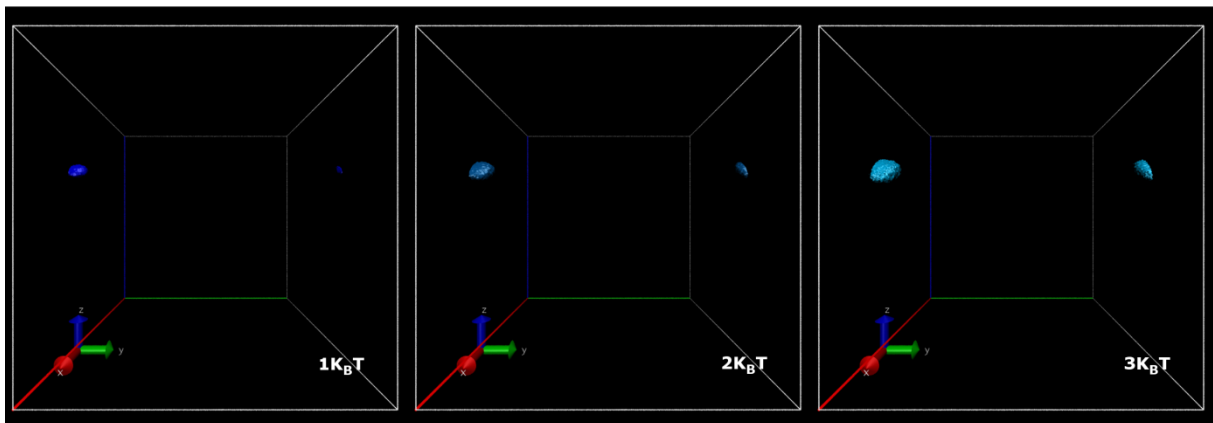
Annexe F 19 : H_SaGAL réplique I



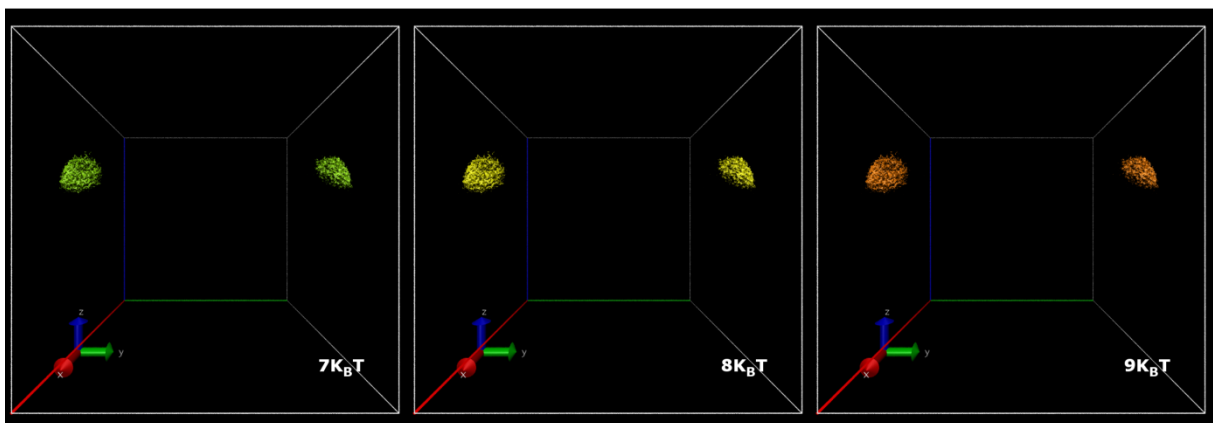
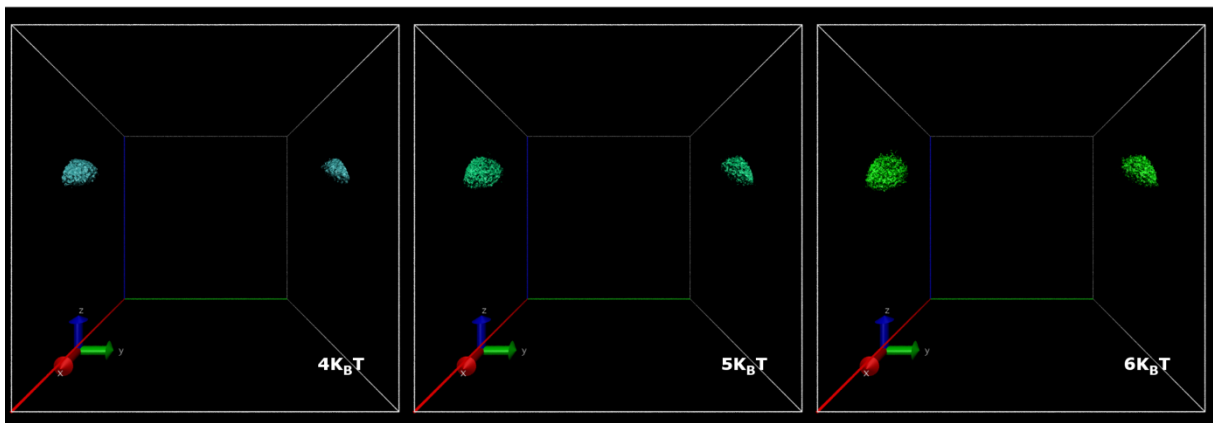
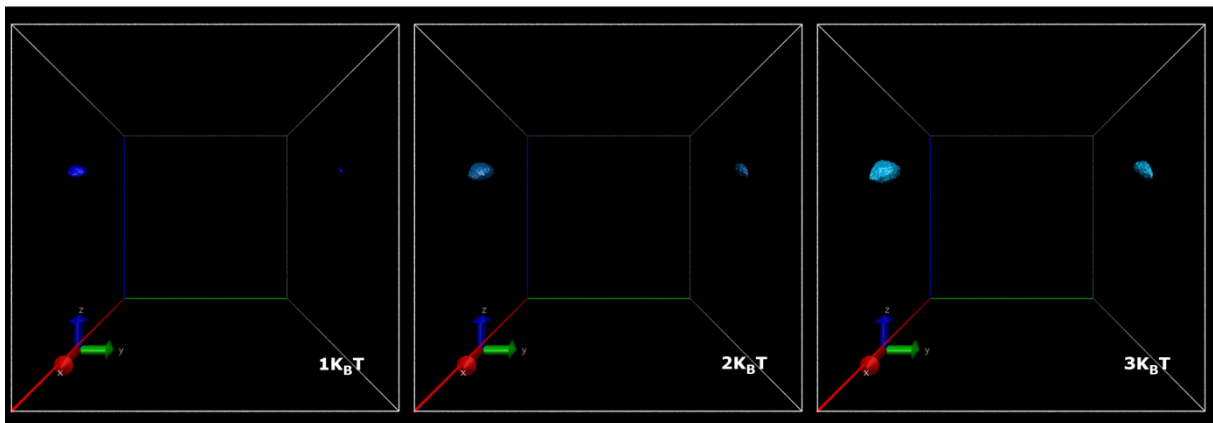
Annexe F 20 : H_SaGAL réplique II



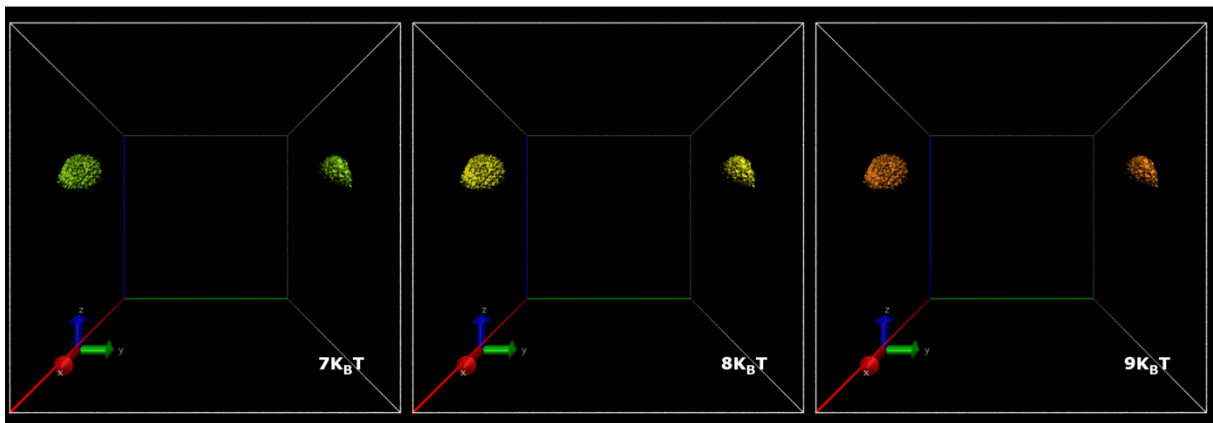
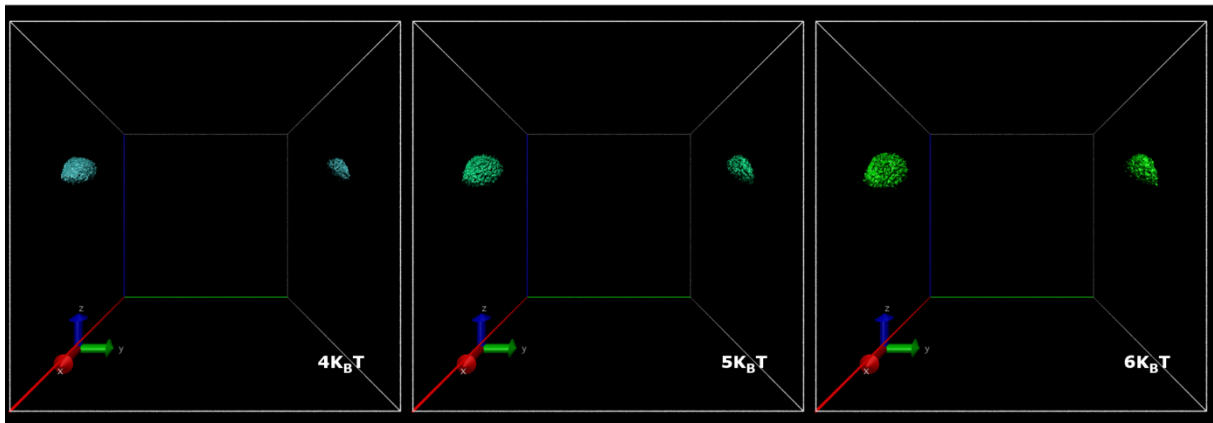
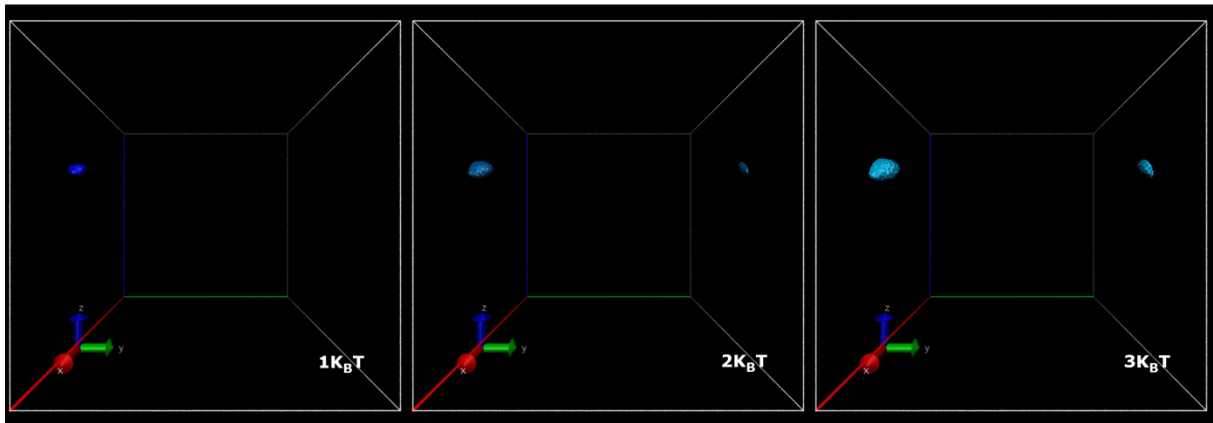
Annexe F 21 : H_SaGAL réplique III



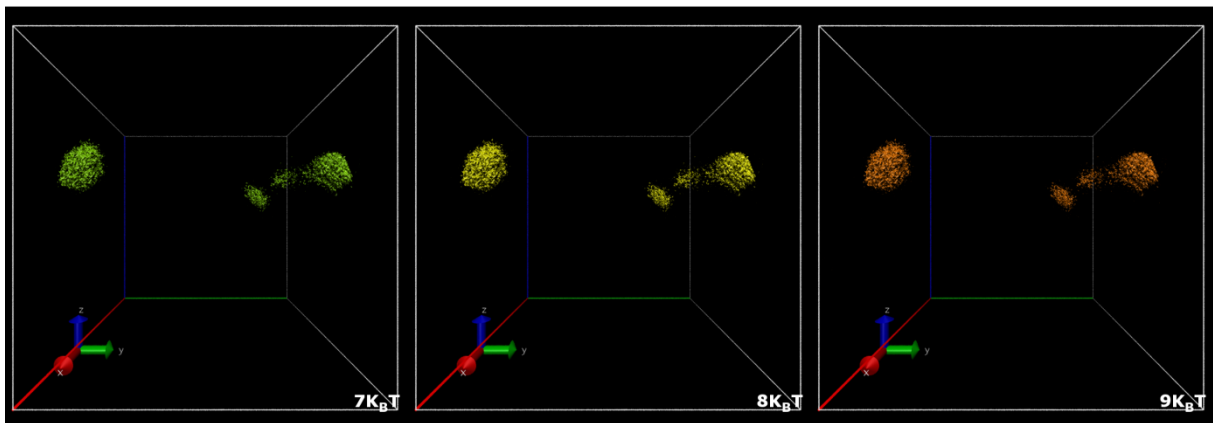
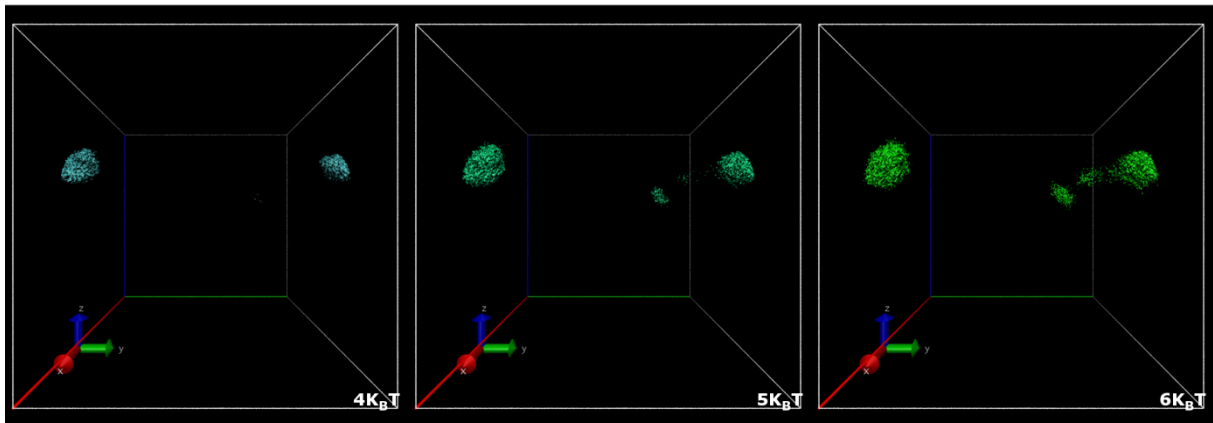
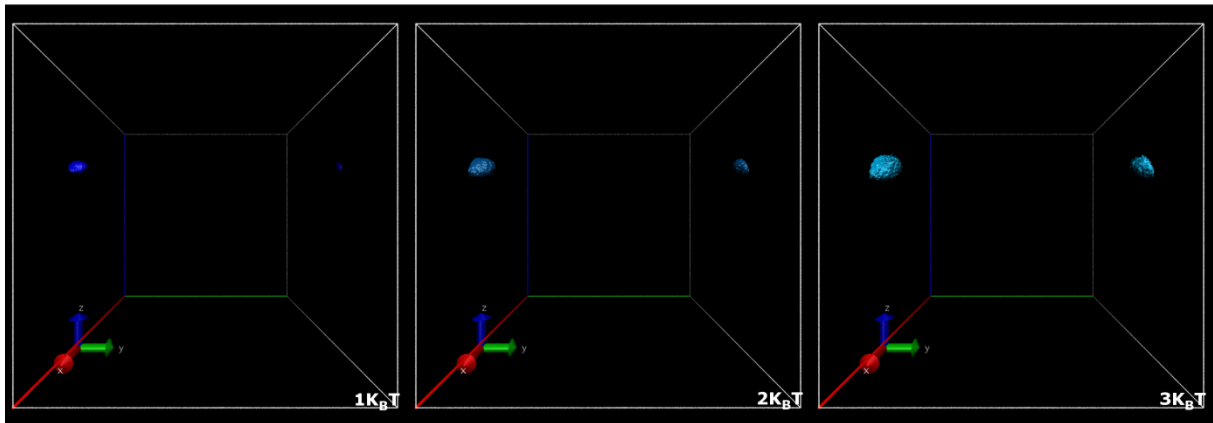
Annexe F 22 : M_7DW réplique I



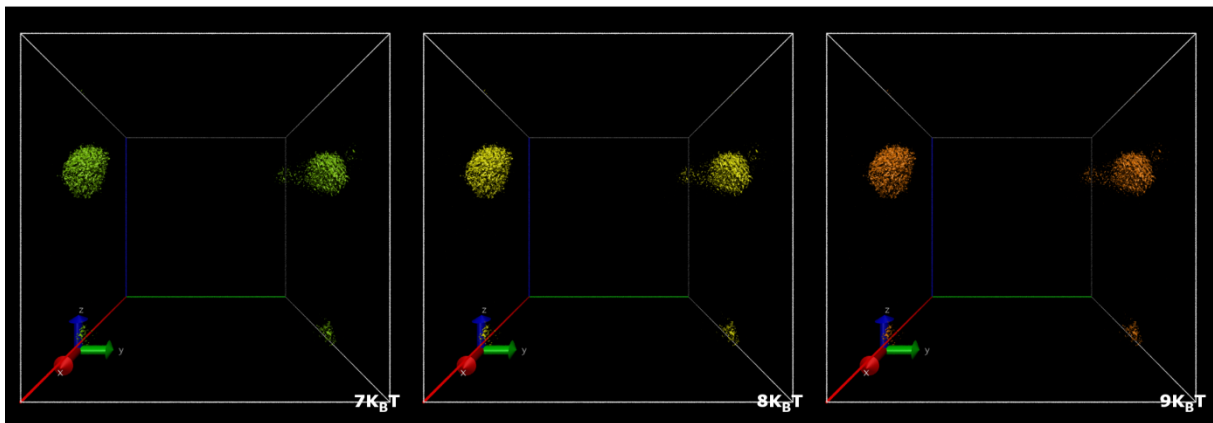
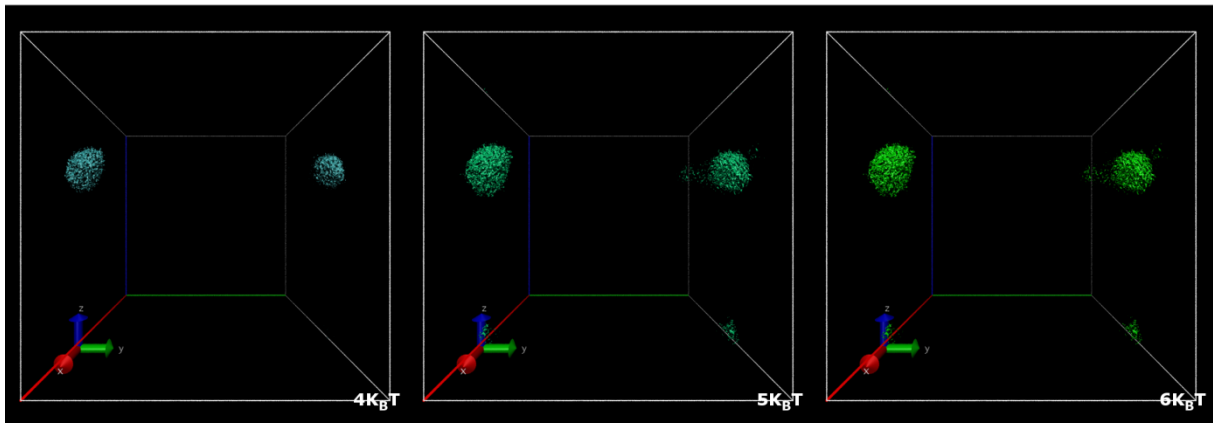
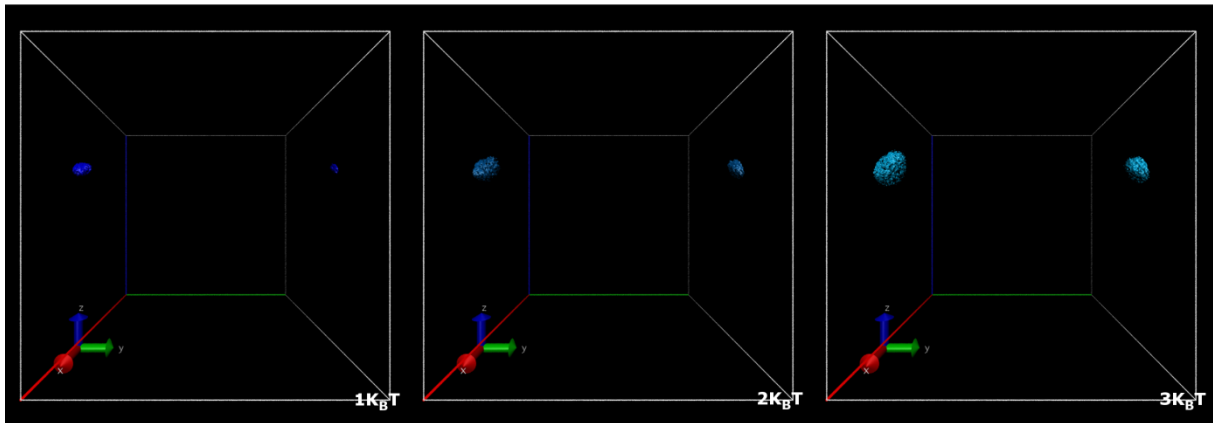
Annexe F 23 : M_7DW réplique II



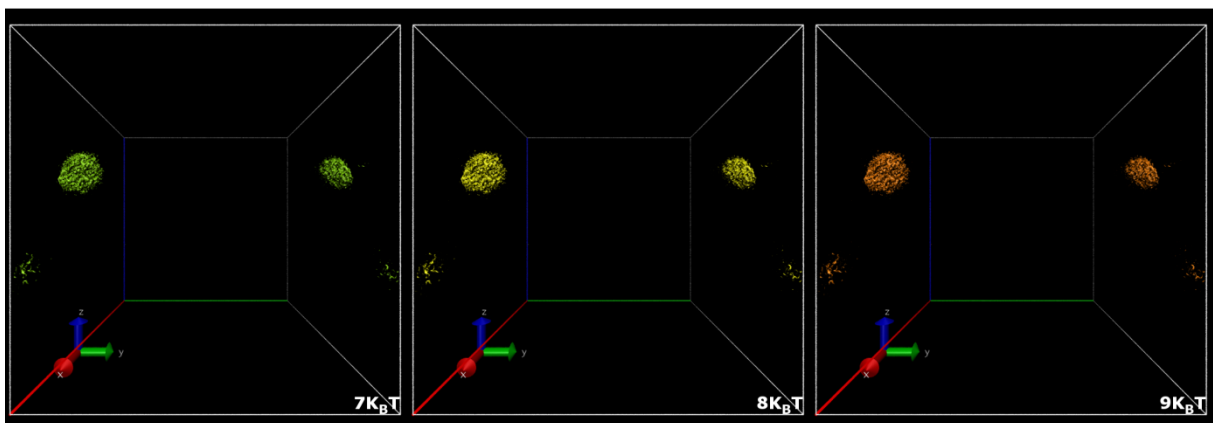
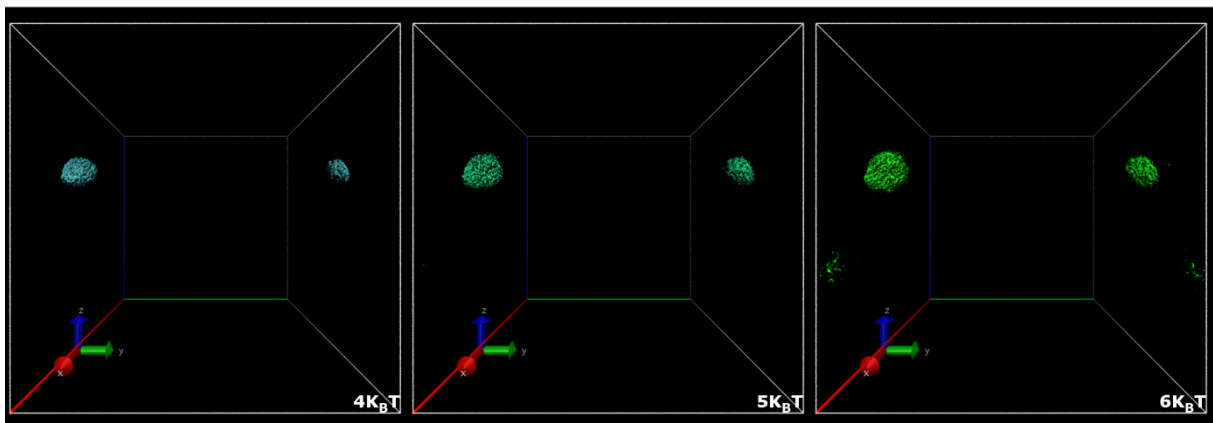
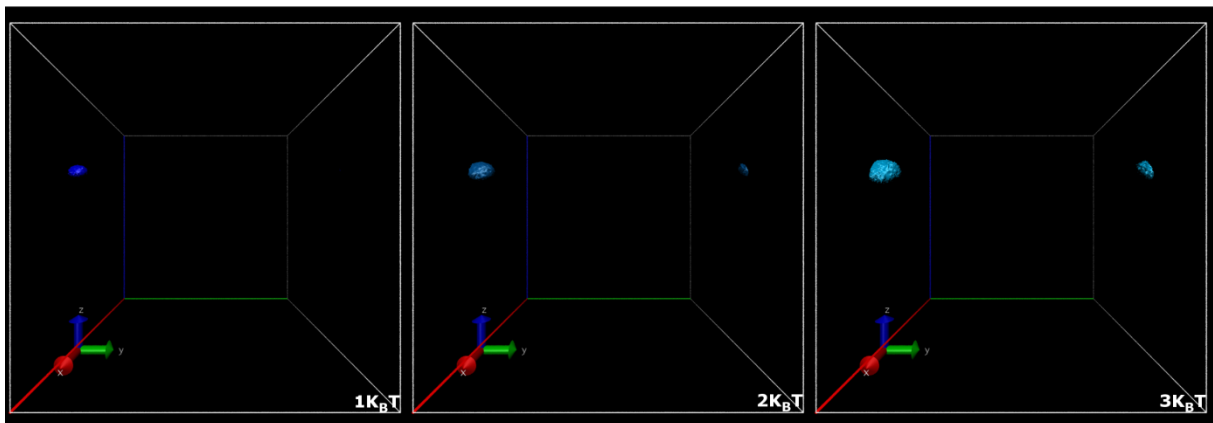
Annexe F 24 : M_7DW réplique III



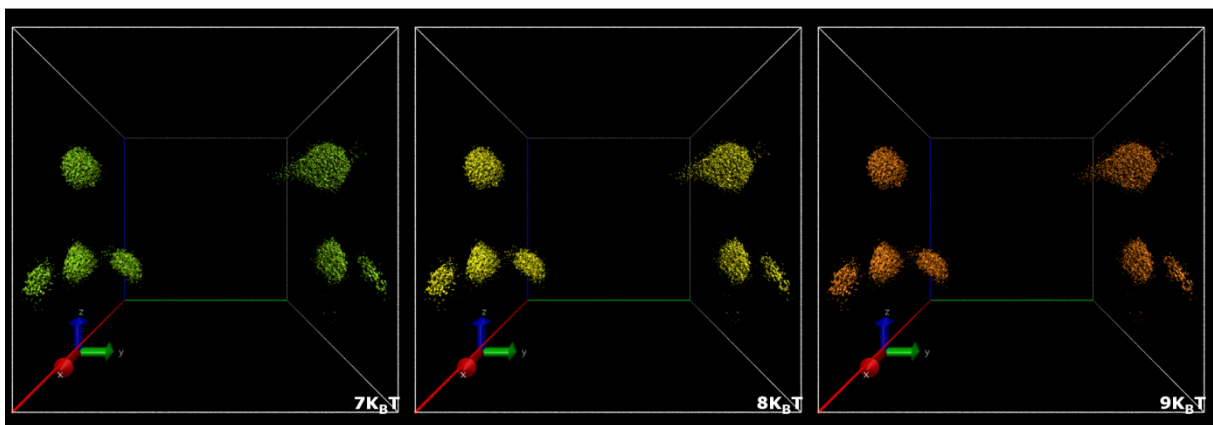
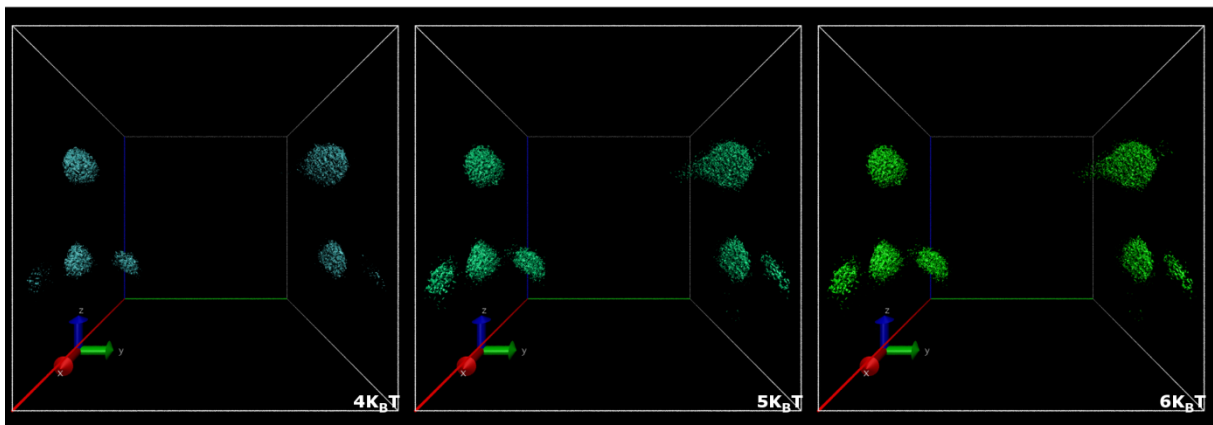
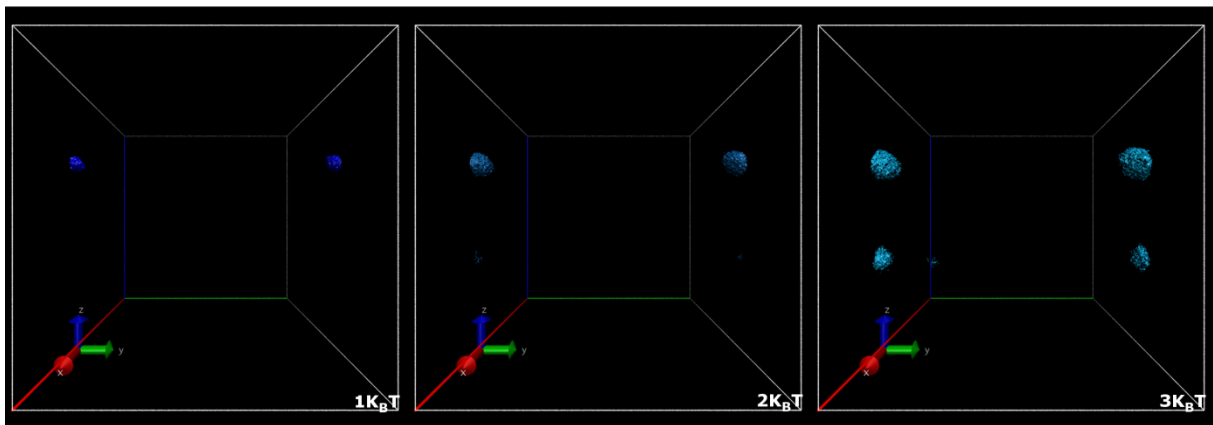
Annexe F 25 : M_aGAL réplique I



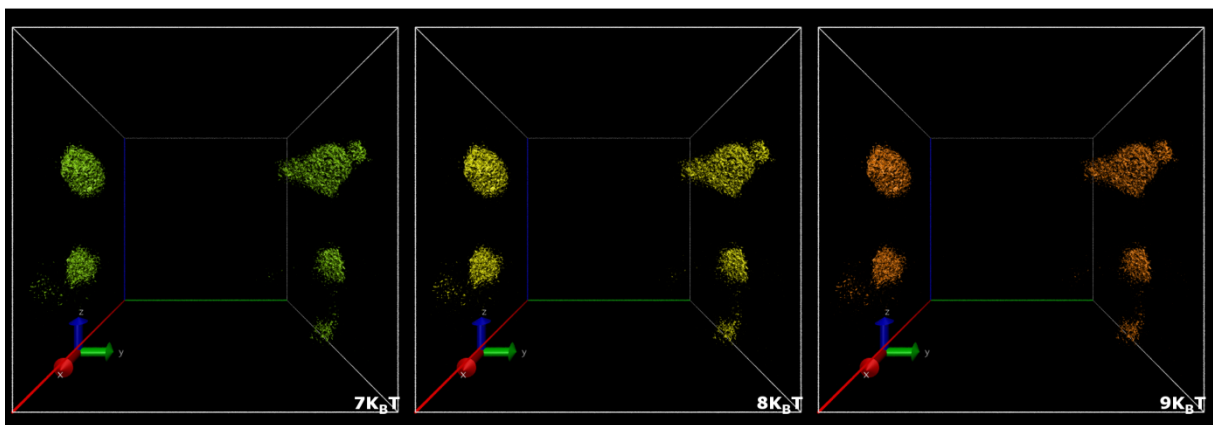
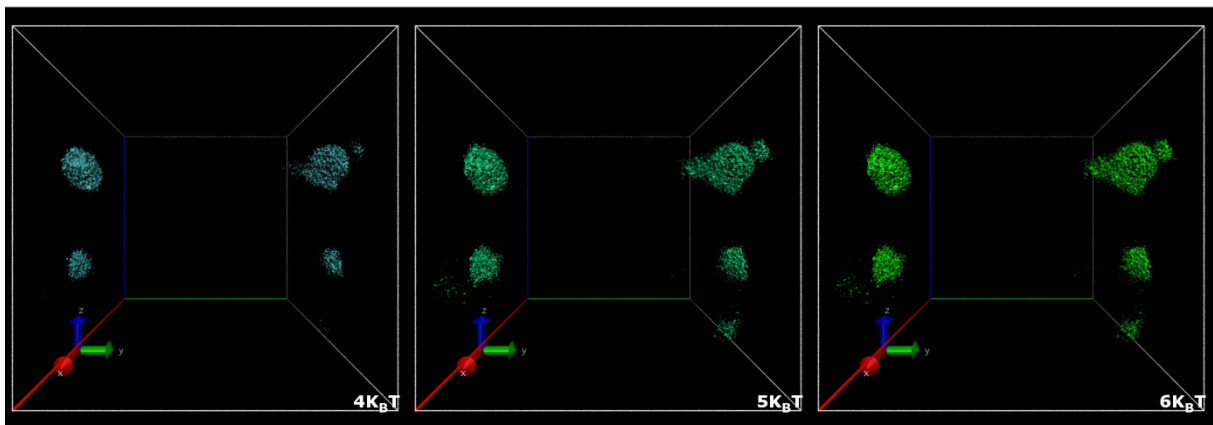
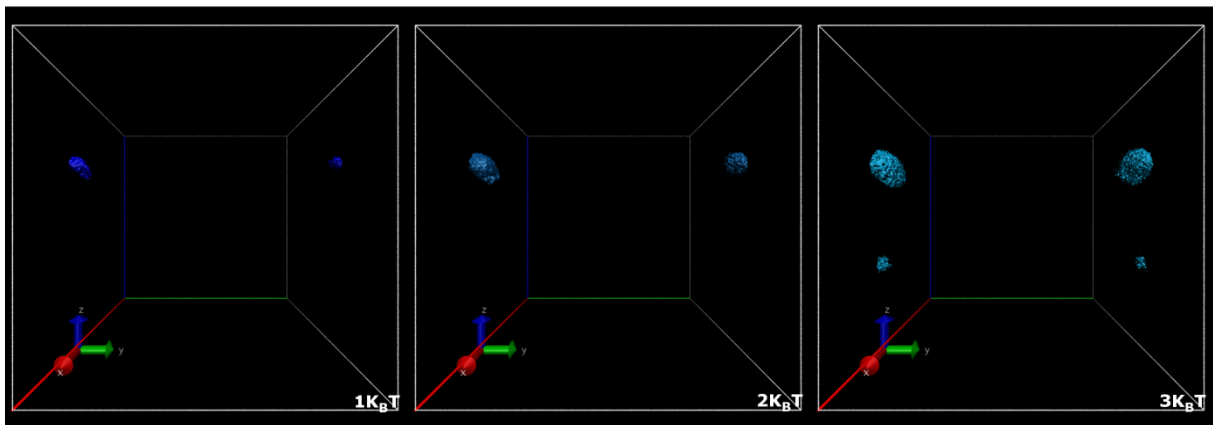
Annexe F 26 : M_aGAL réplique II



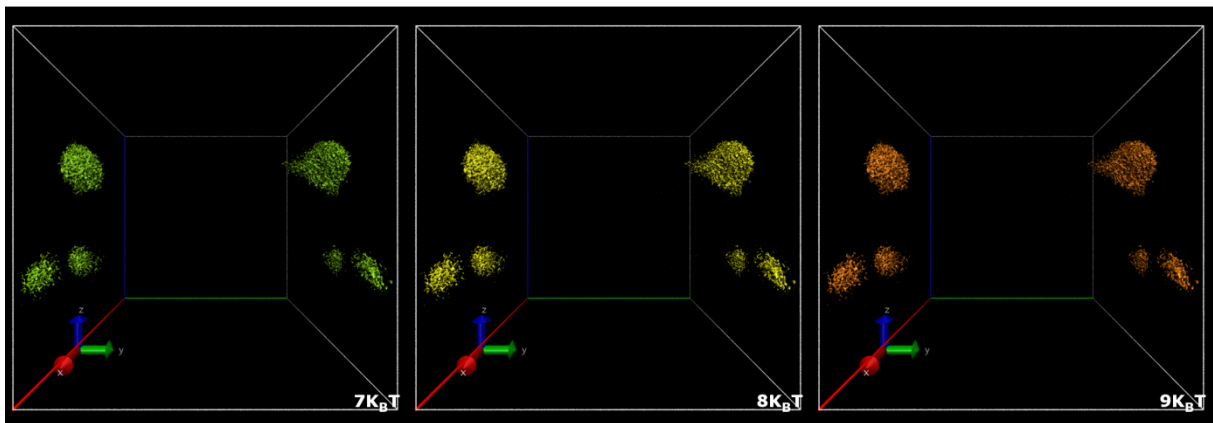
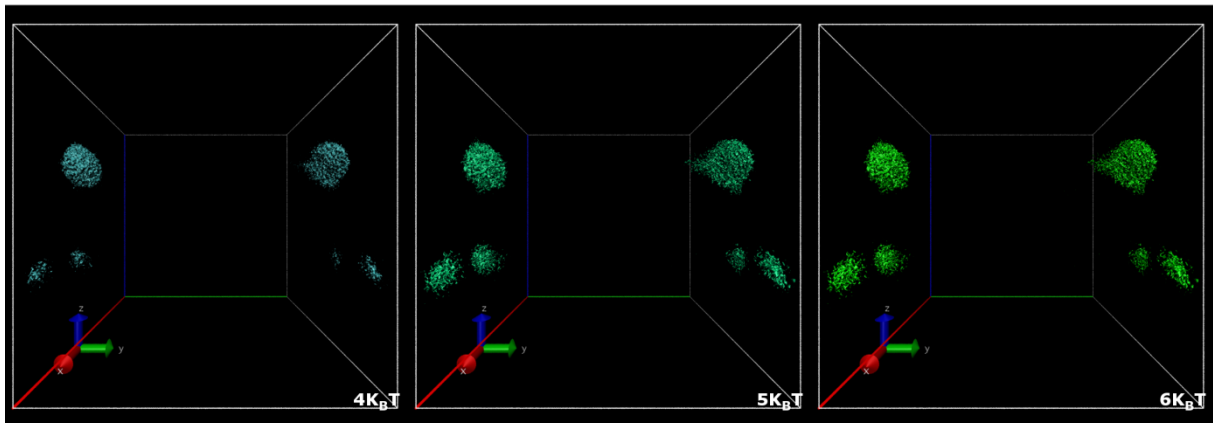
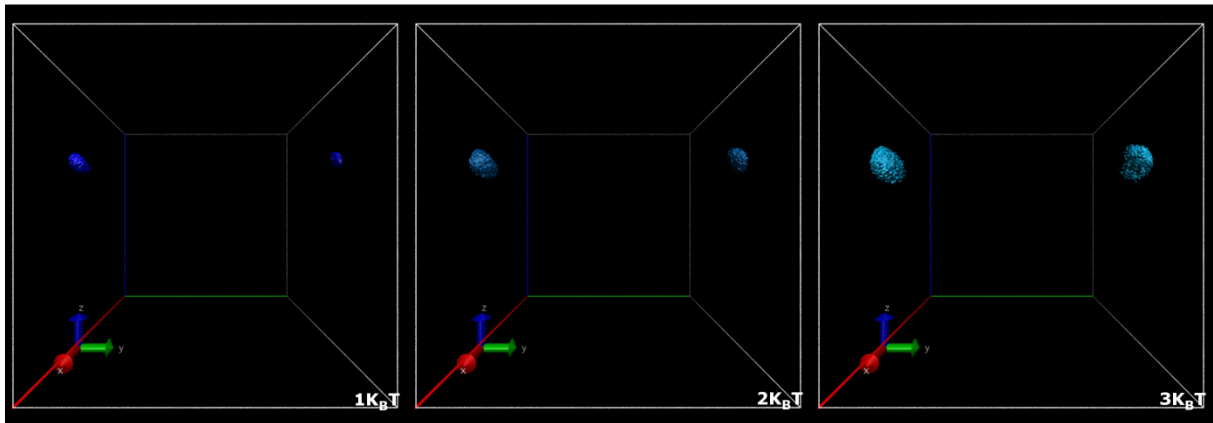
Annexe F 27 : M_aGAL réplique III



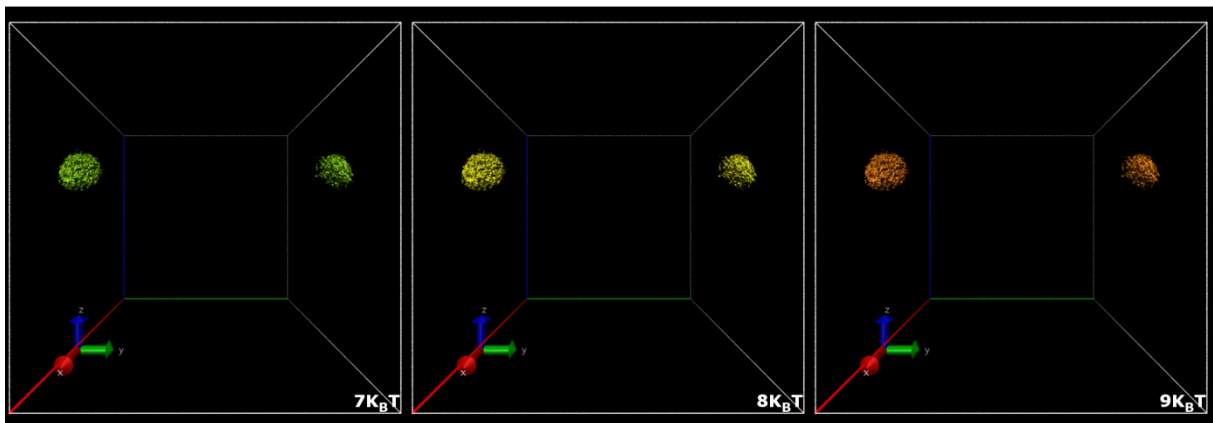
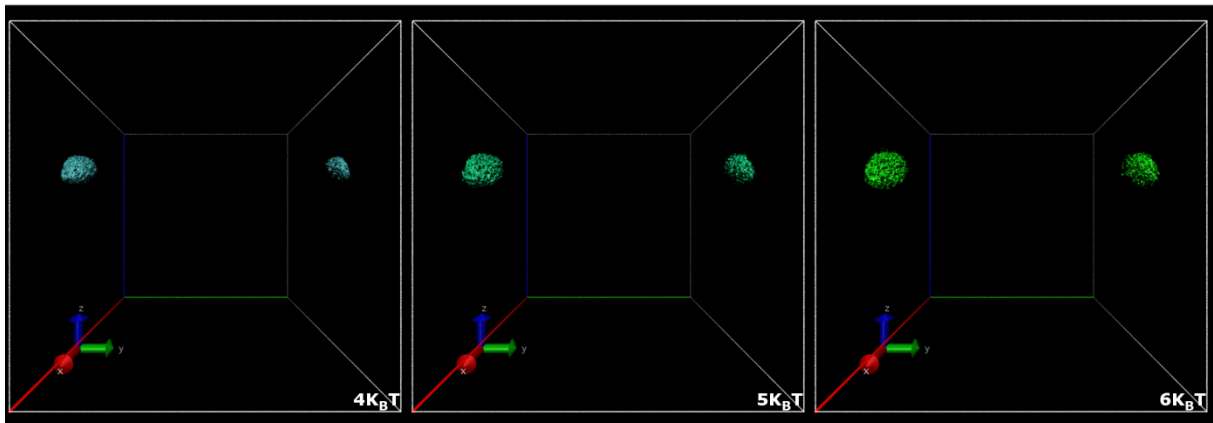
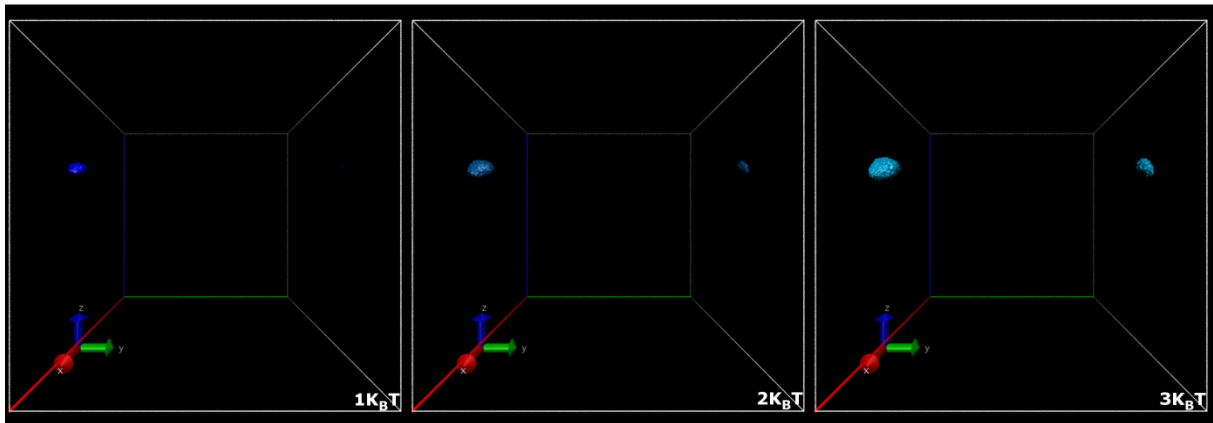
Annexe F 28 : M_AZOL réplique I



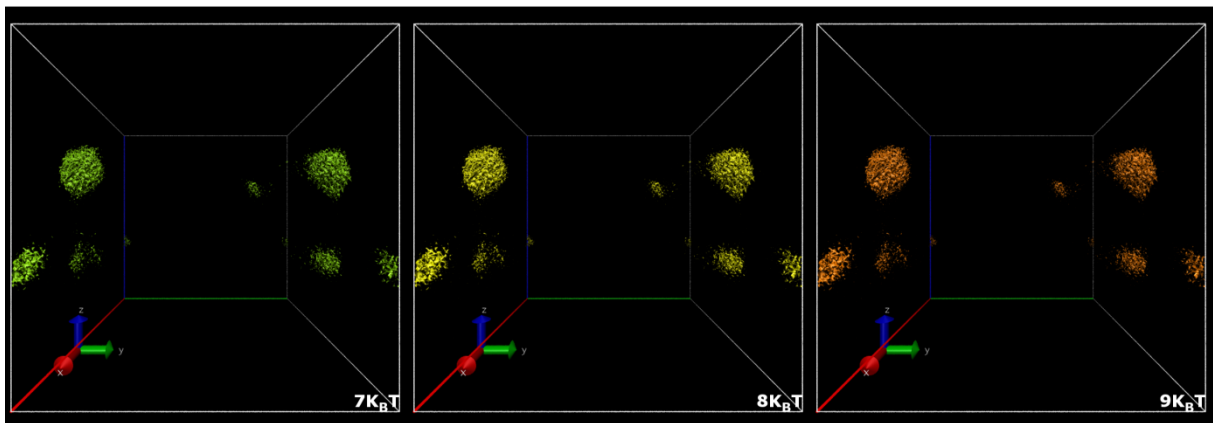
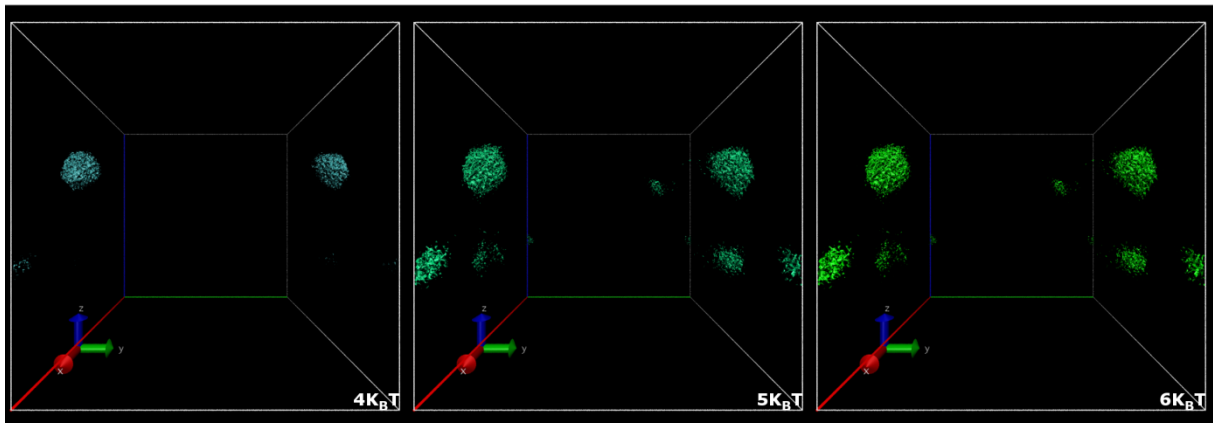
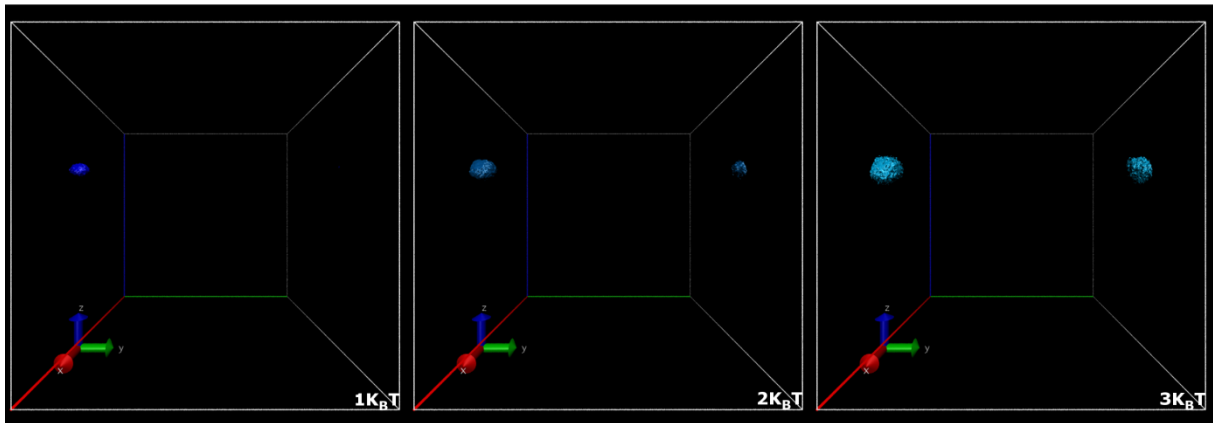
Annexe F 29 : M_AZOL réplique II



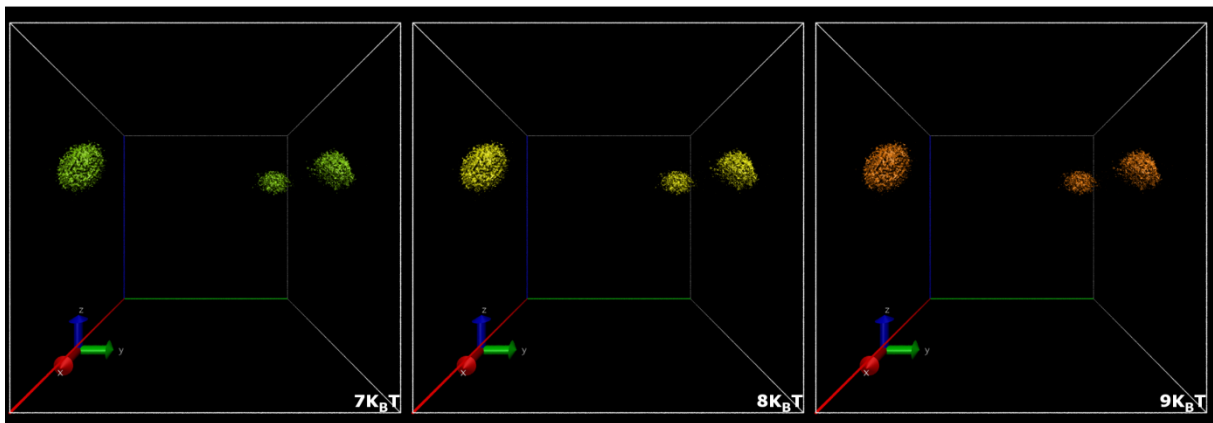
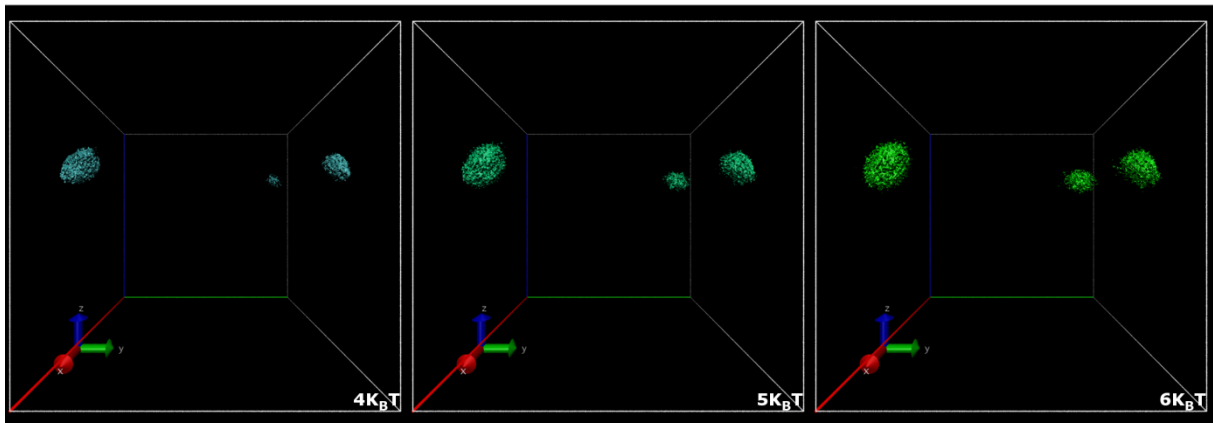
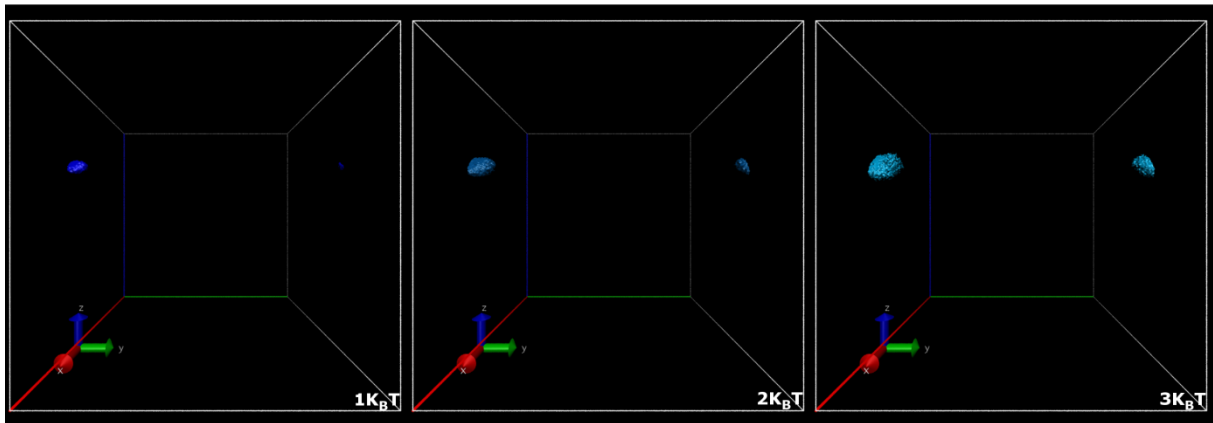
Annexe F 30 : M_AZOL réplique III



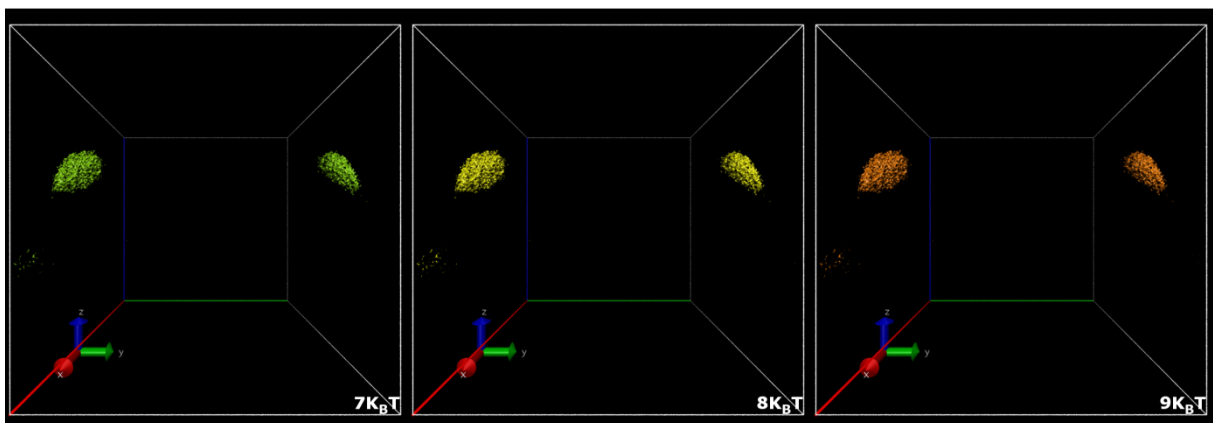
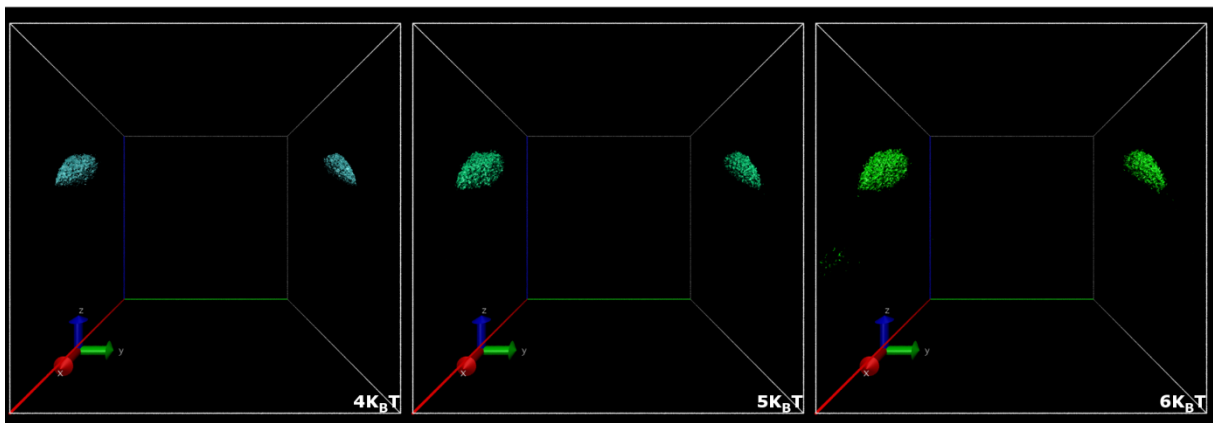
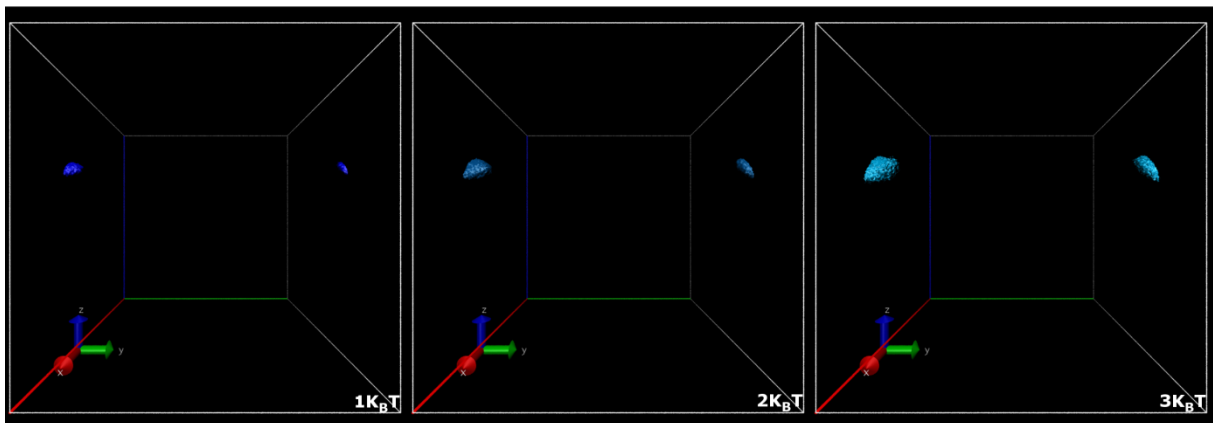
Annexe F 31 : M_GOF réplique I



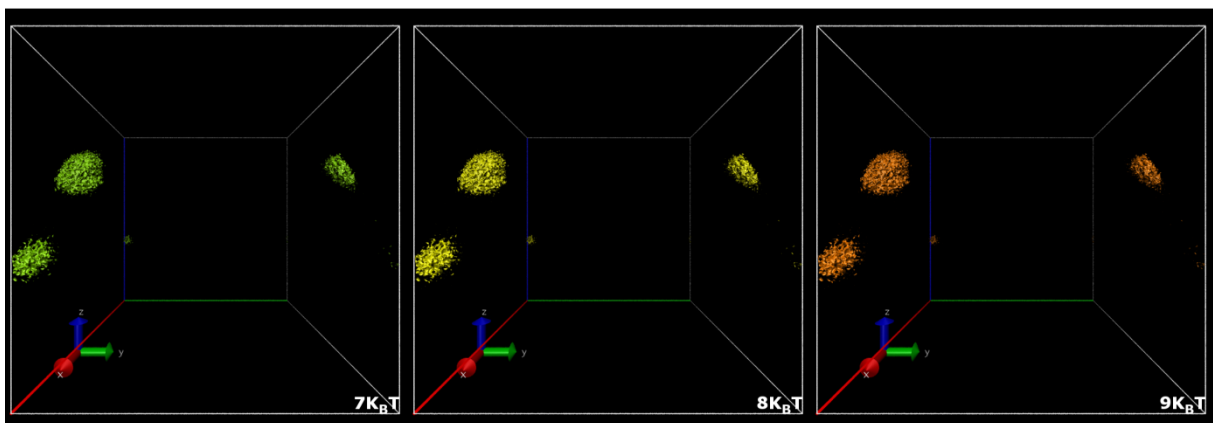
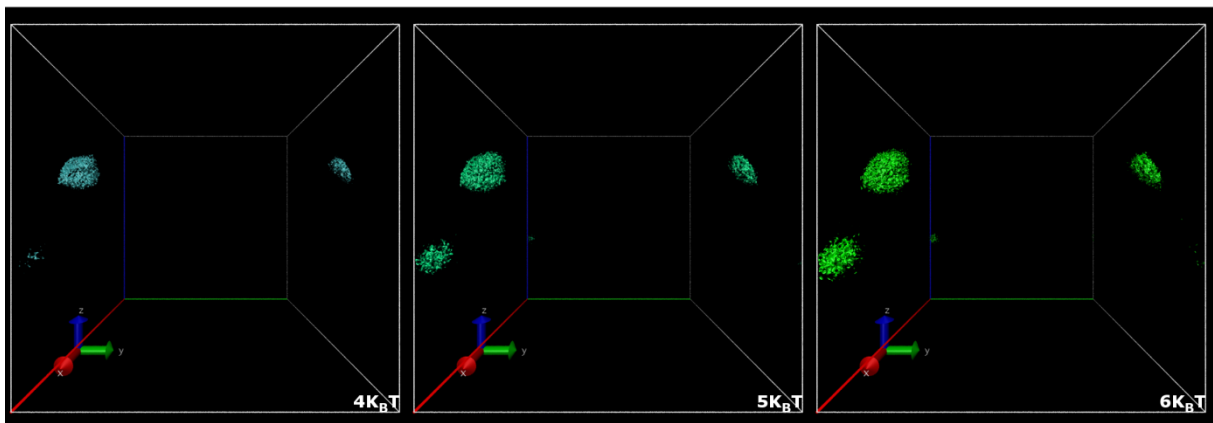
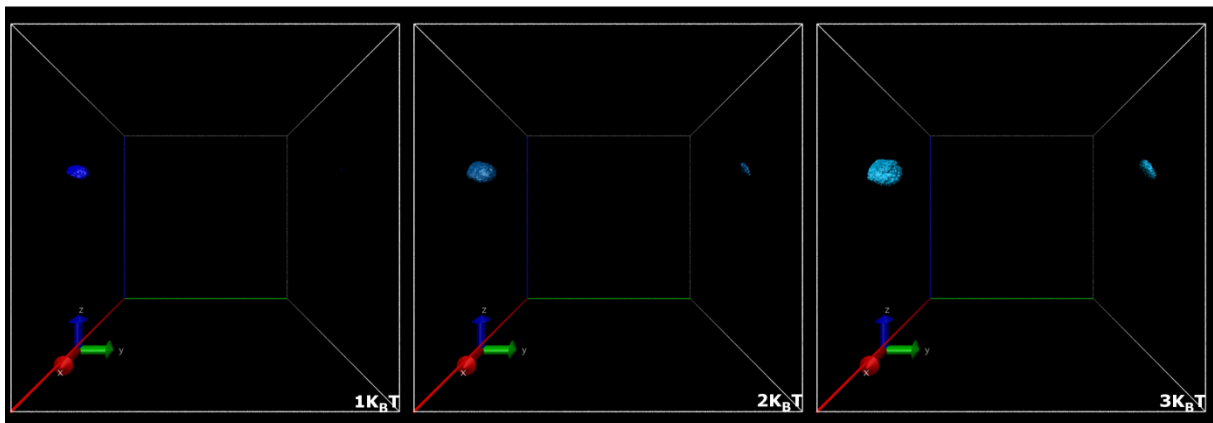
Annexe F 32 : M_GOF réplique II



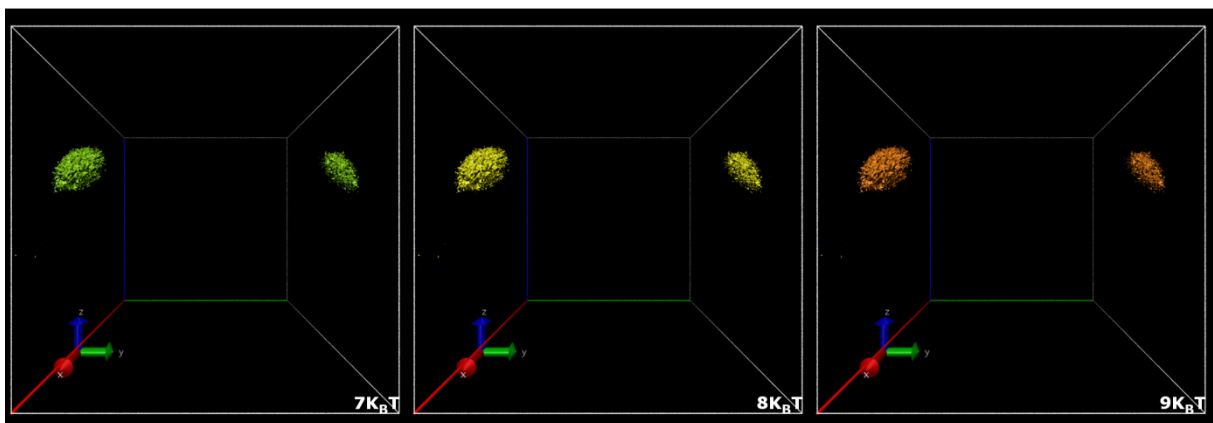
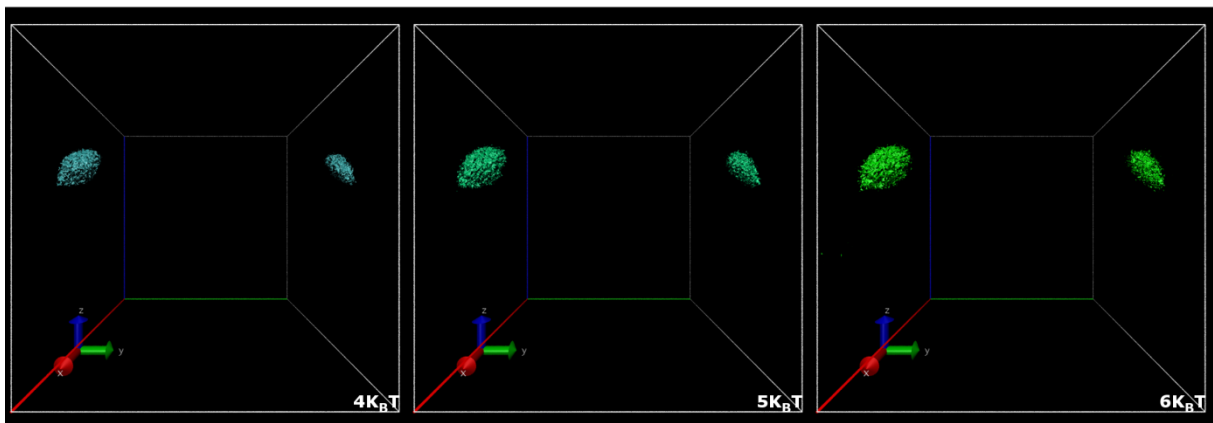
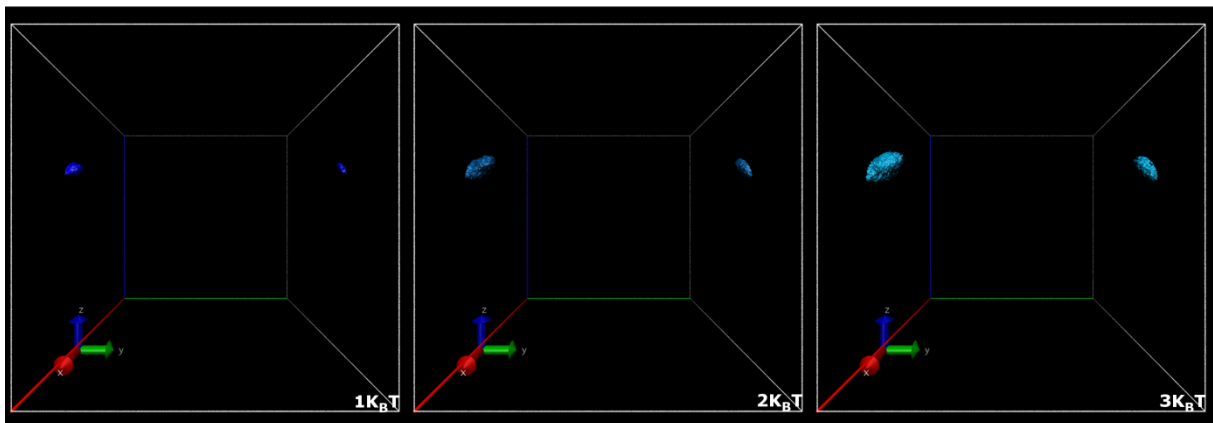
Annexe F 33 : M_GOF réplique III



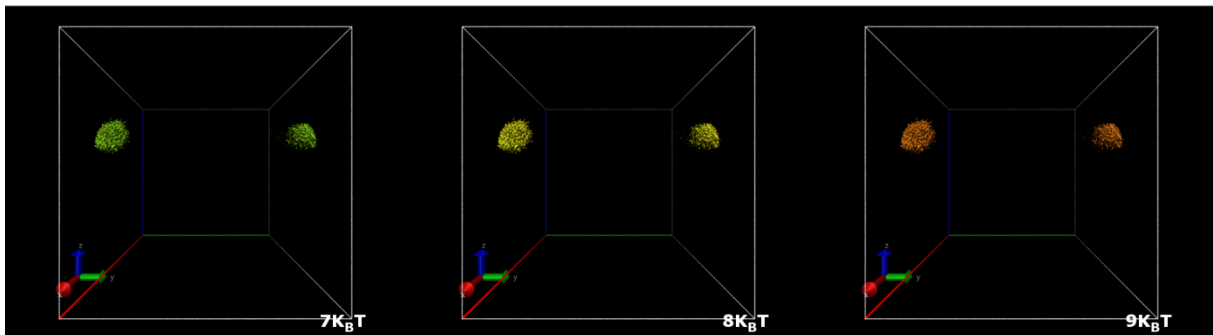
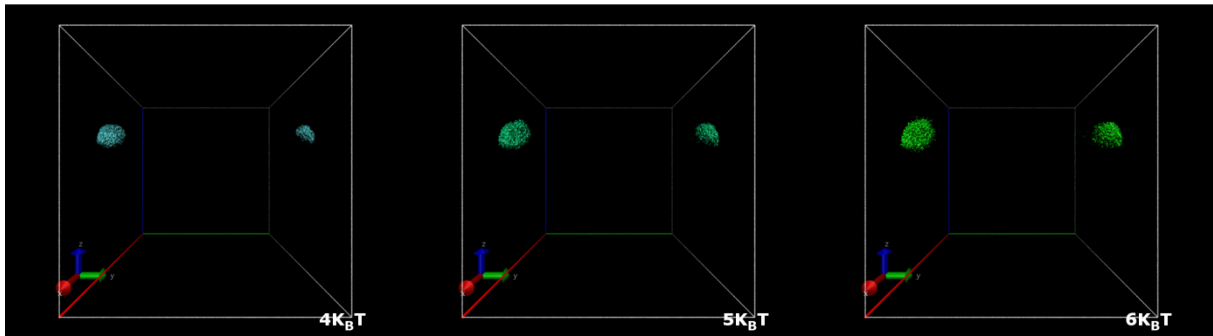
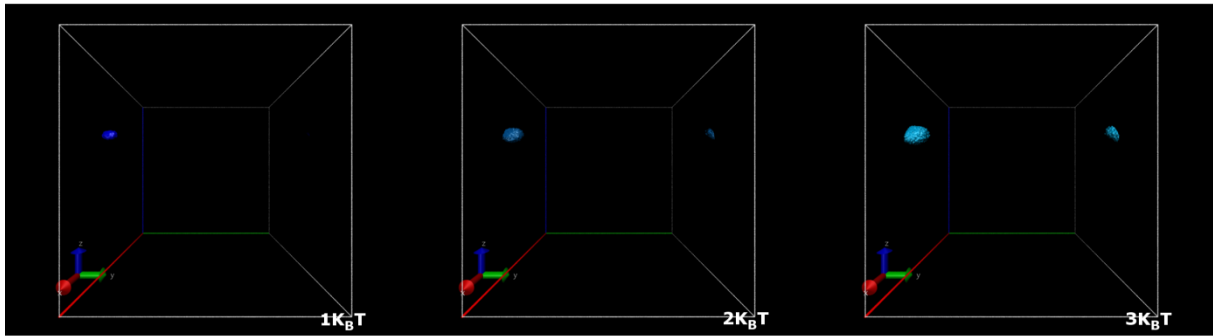
Annexe F 34 : M_NUaGAL réplique I



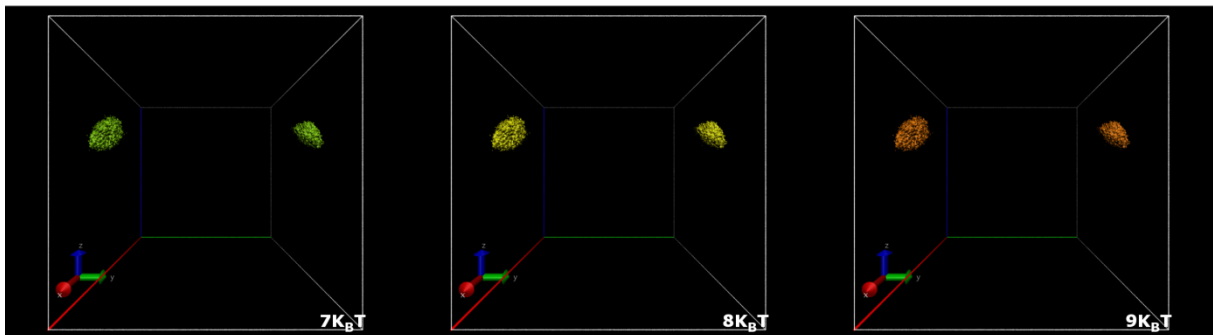
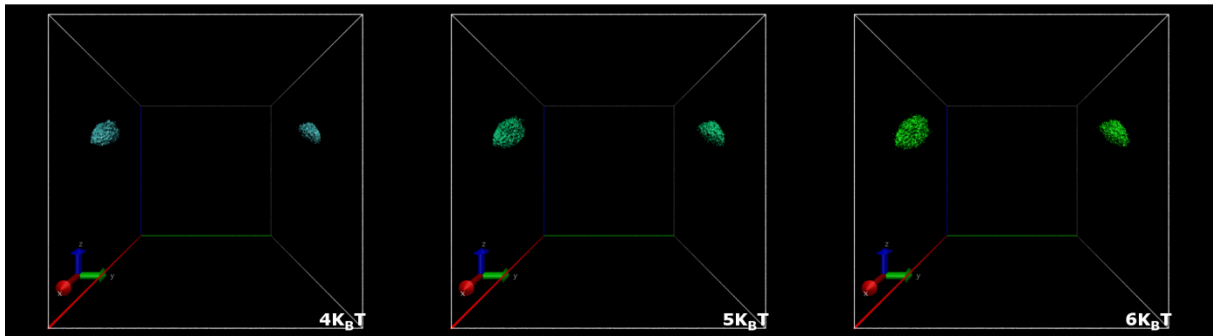
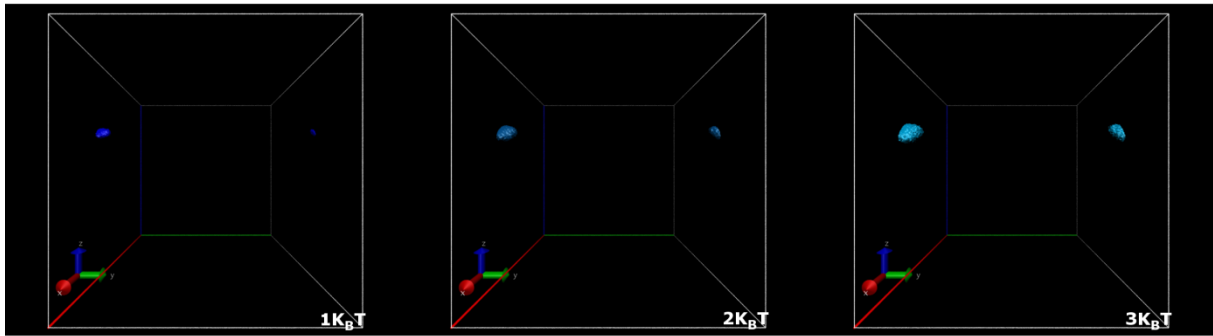
Annexe F 35 : M_NUaGAL réplique II



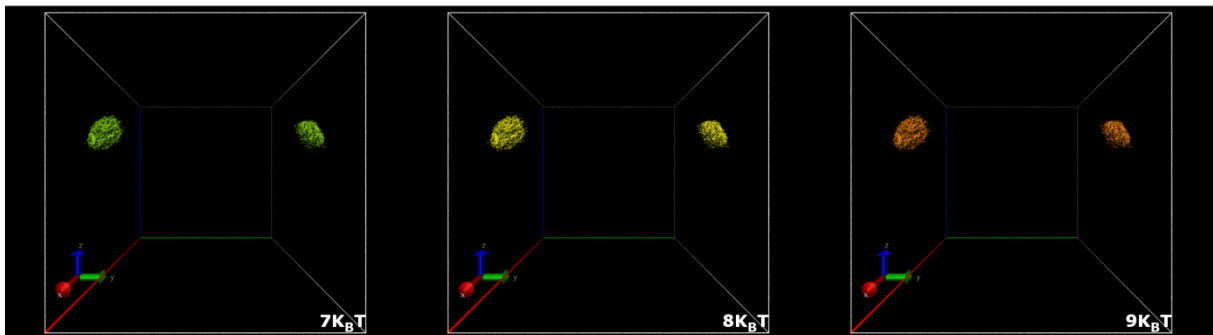
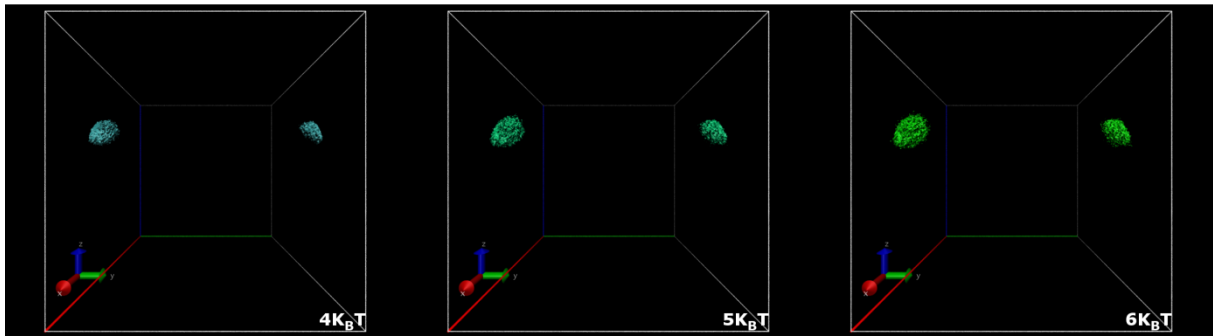
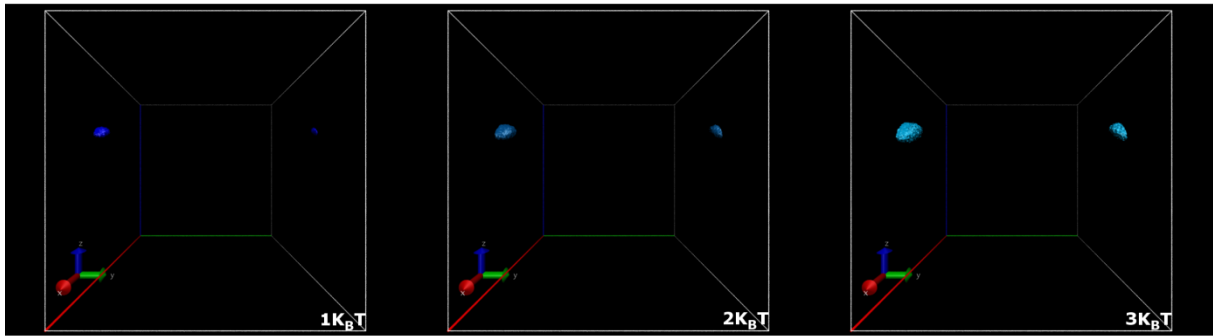
Annexe F 36 : M_NUaGAL réplique III



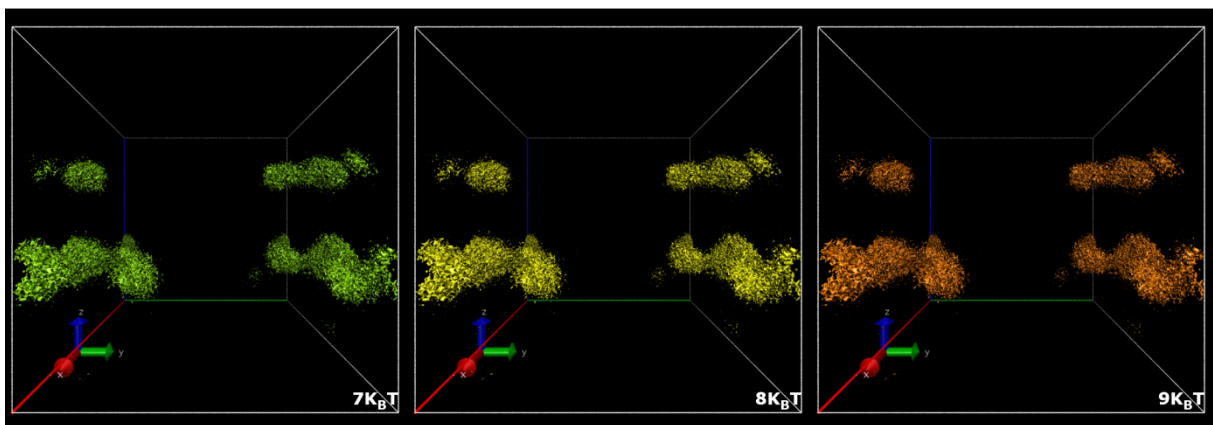
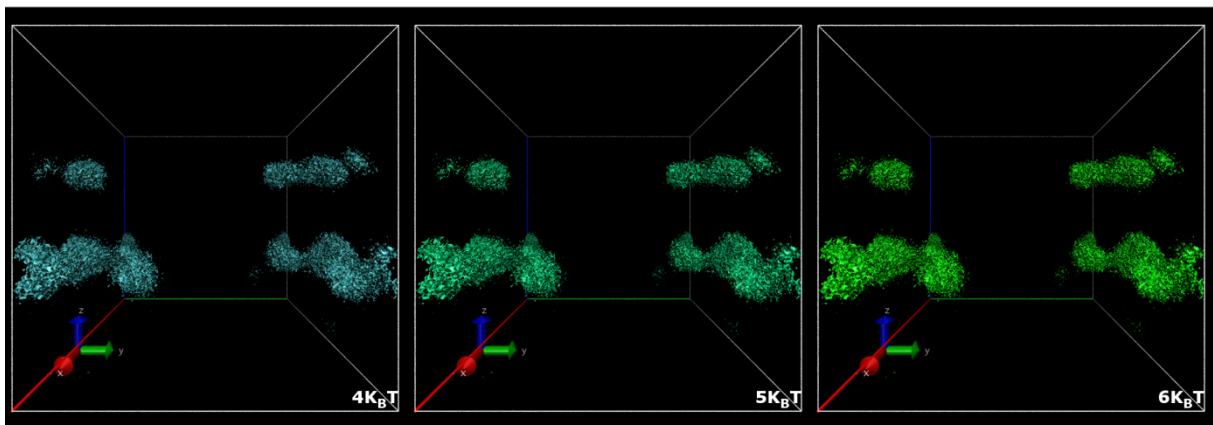
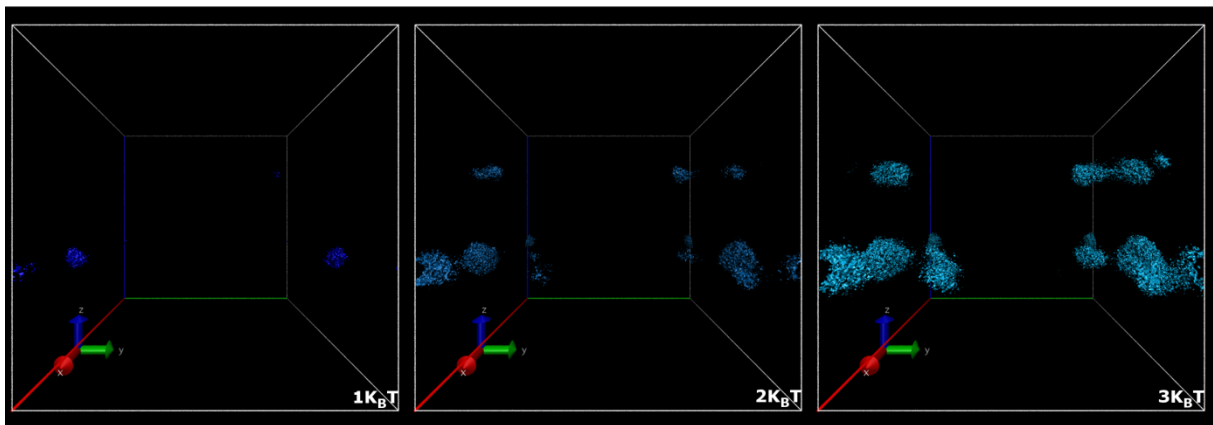
Annexe F 37 : M_{OCH} réplique I



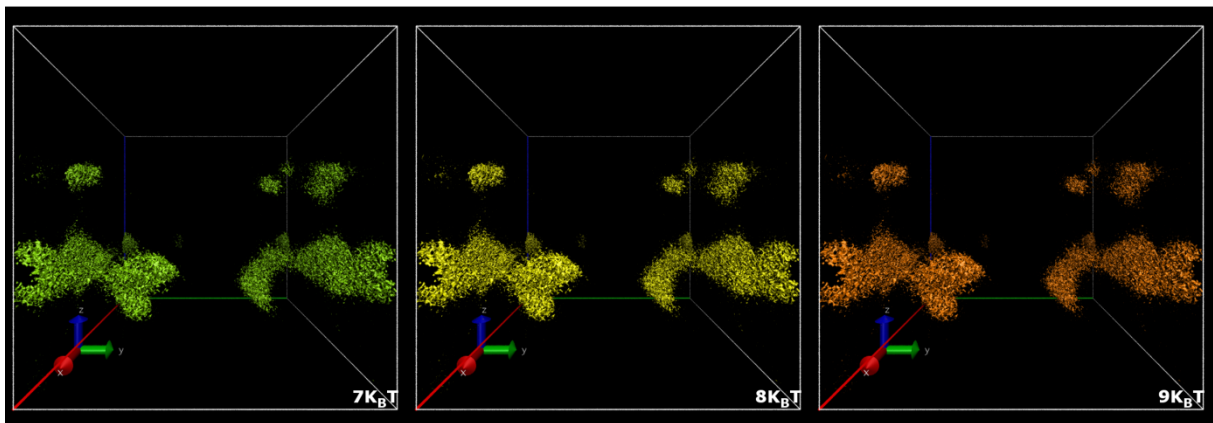
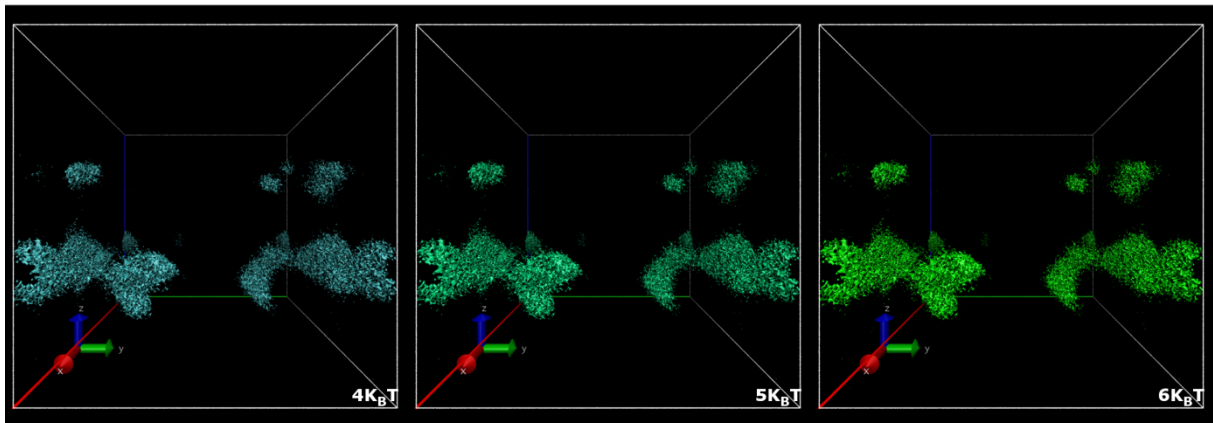
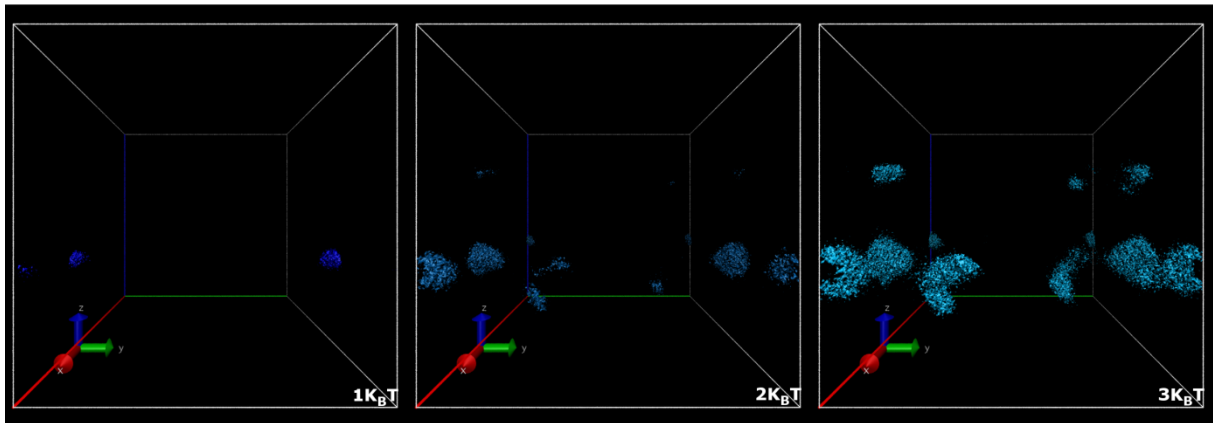
Annexe F 38 : M_OCH réplique II



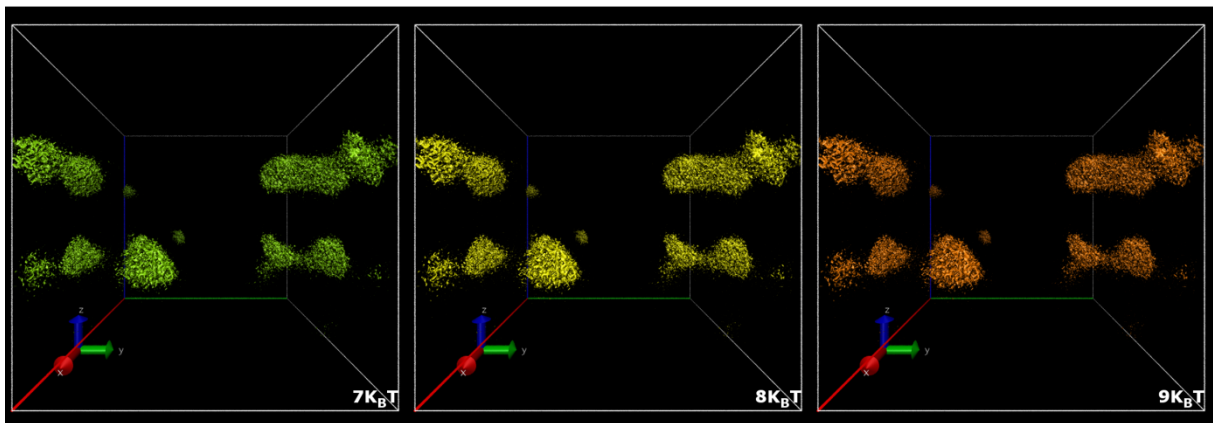
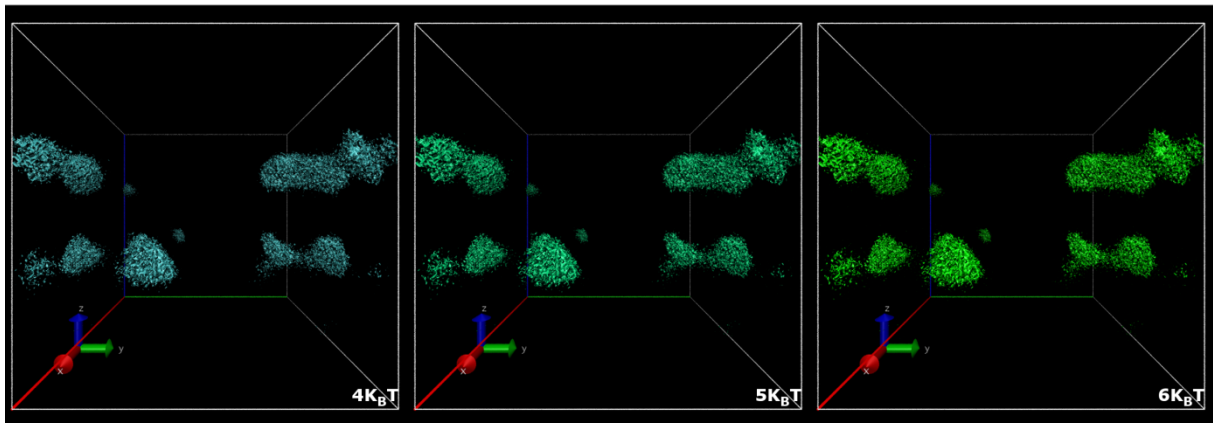
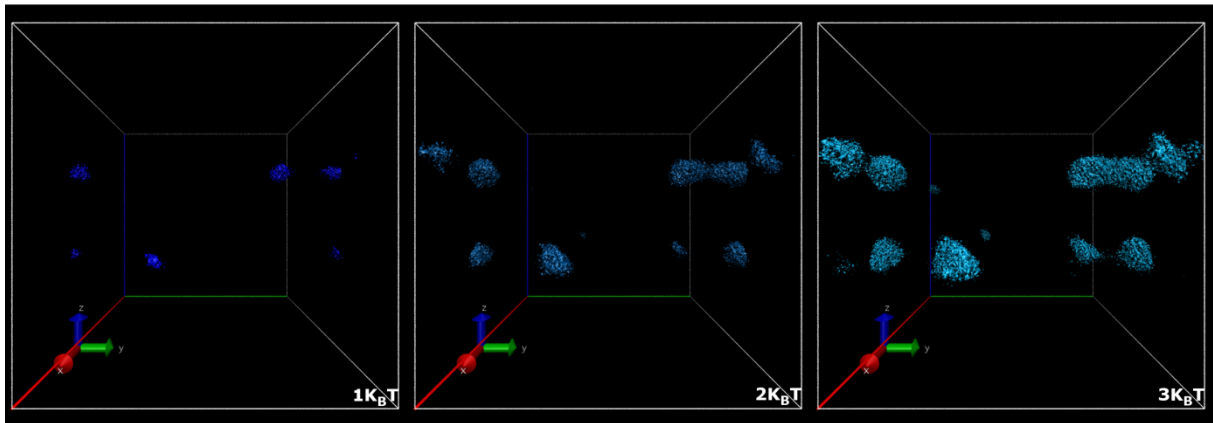
Annexe F 39 : M_OCH réplique III



Annexe F 40 : M_SaGAL réplique I



Annexe F 41 : M_SaGAL réplique II



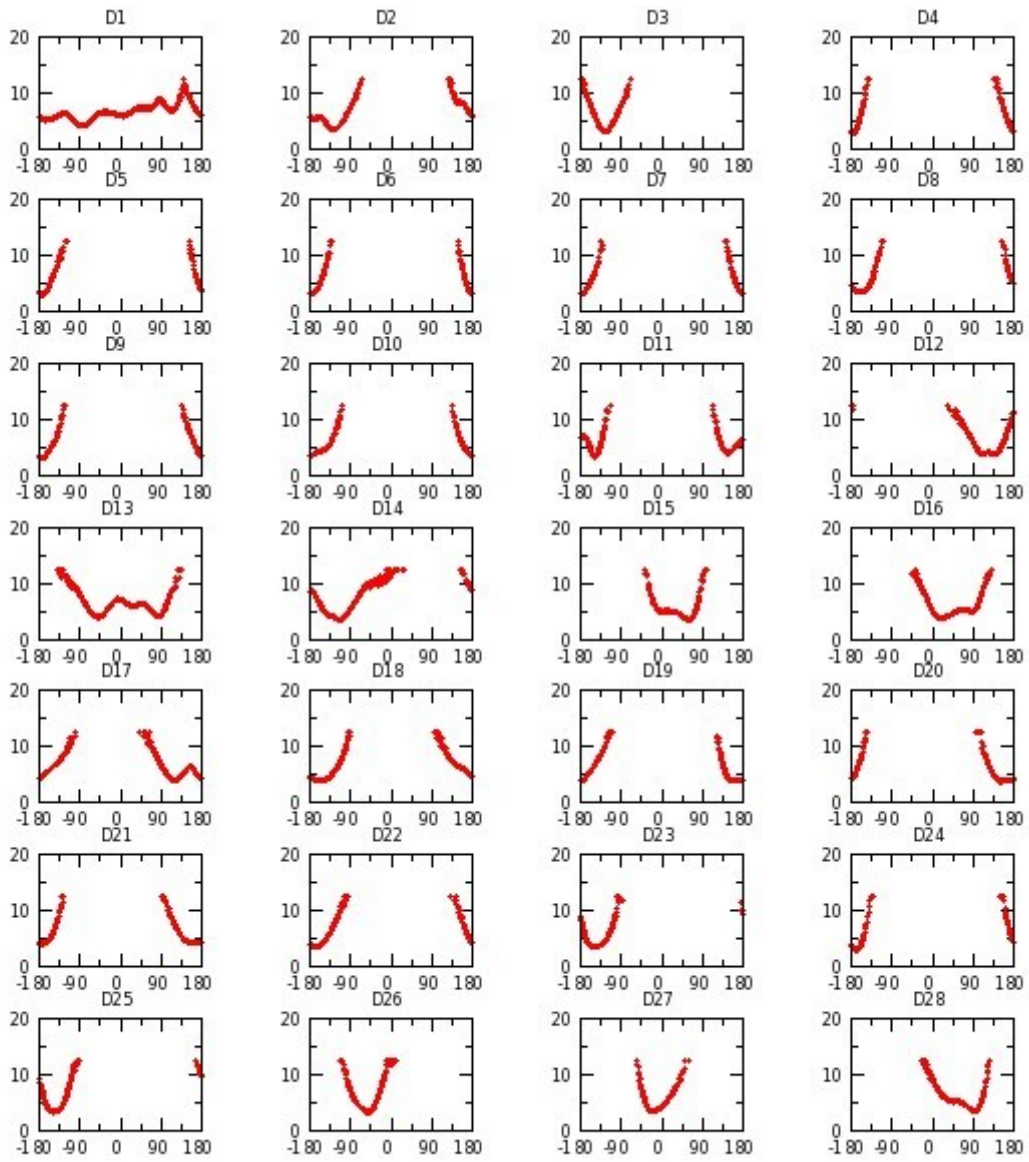
Annexe F 42 : M_SaGAL réplique III

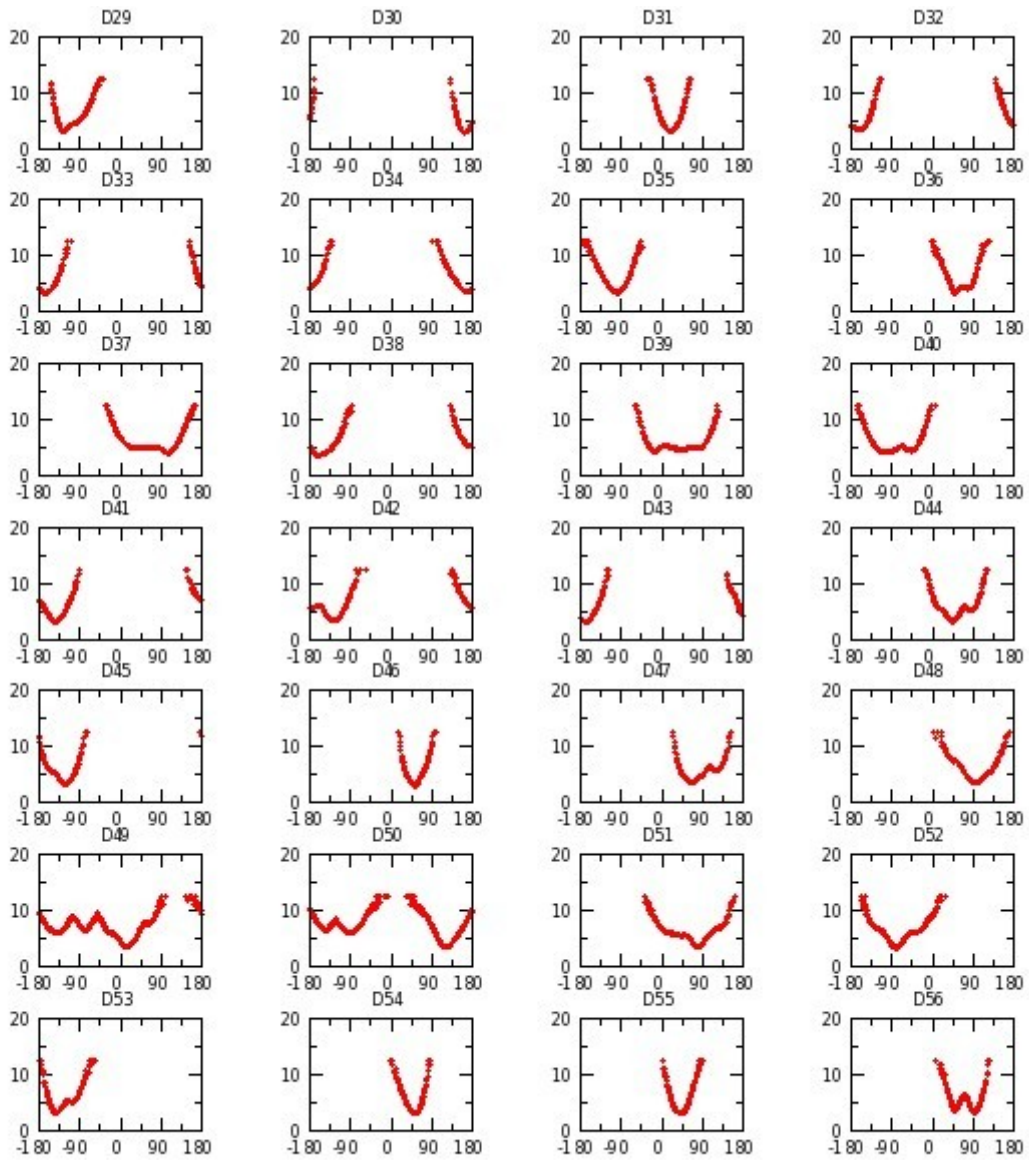
Annexe G – FEL-1D

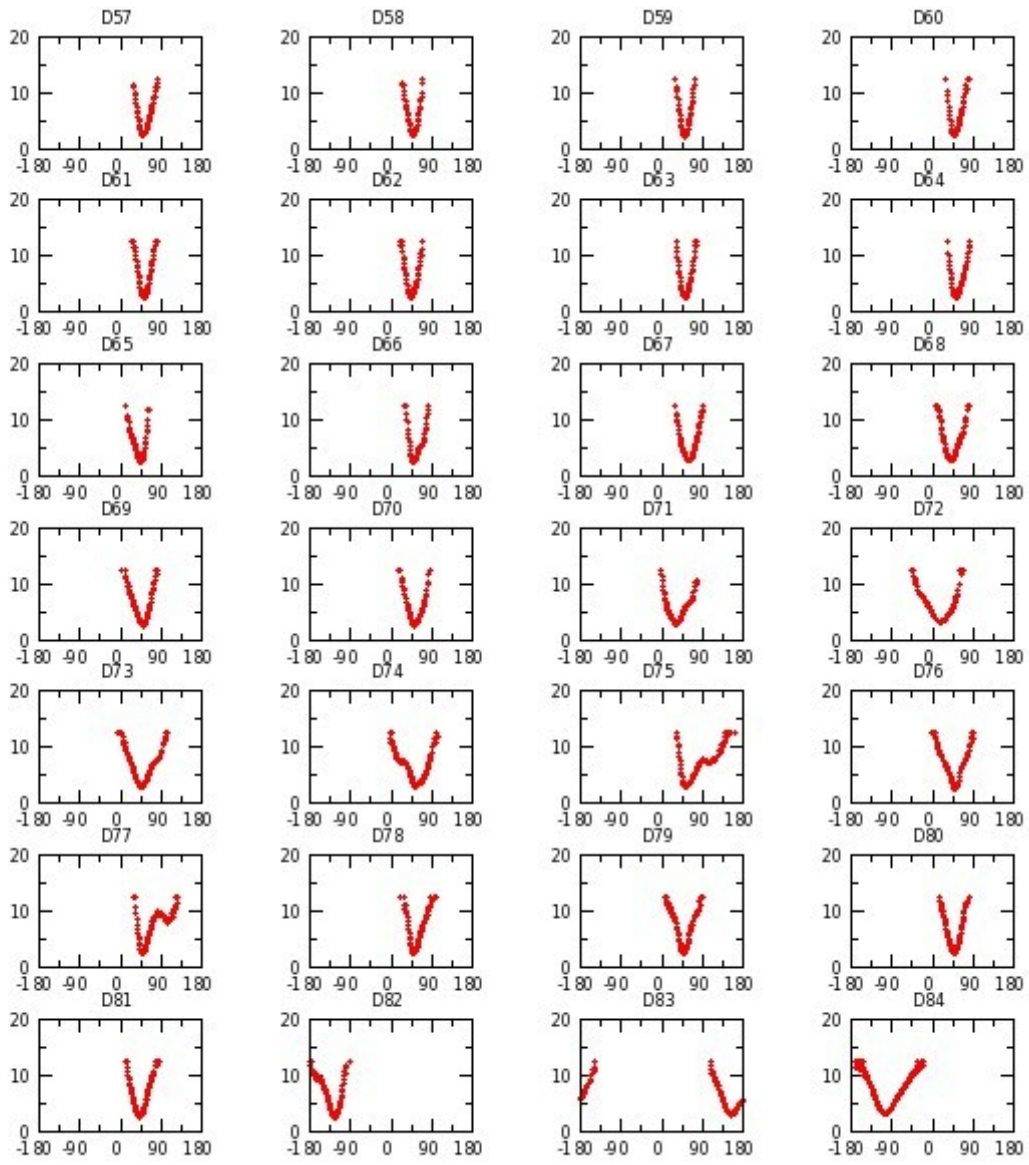
Dans tous les graphes, sont représentés les paysages énergétiques 1D associés à chaque angle dièdre noté D. En abscisse on trouve la valeur de l'angle en degrés et en ordonnée l'énergie associée en $k_B T$.

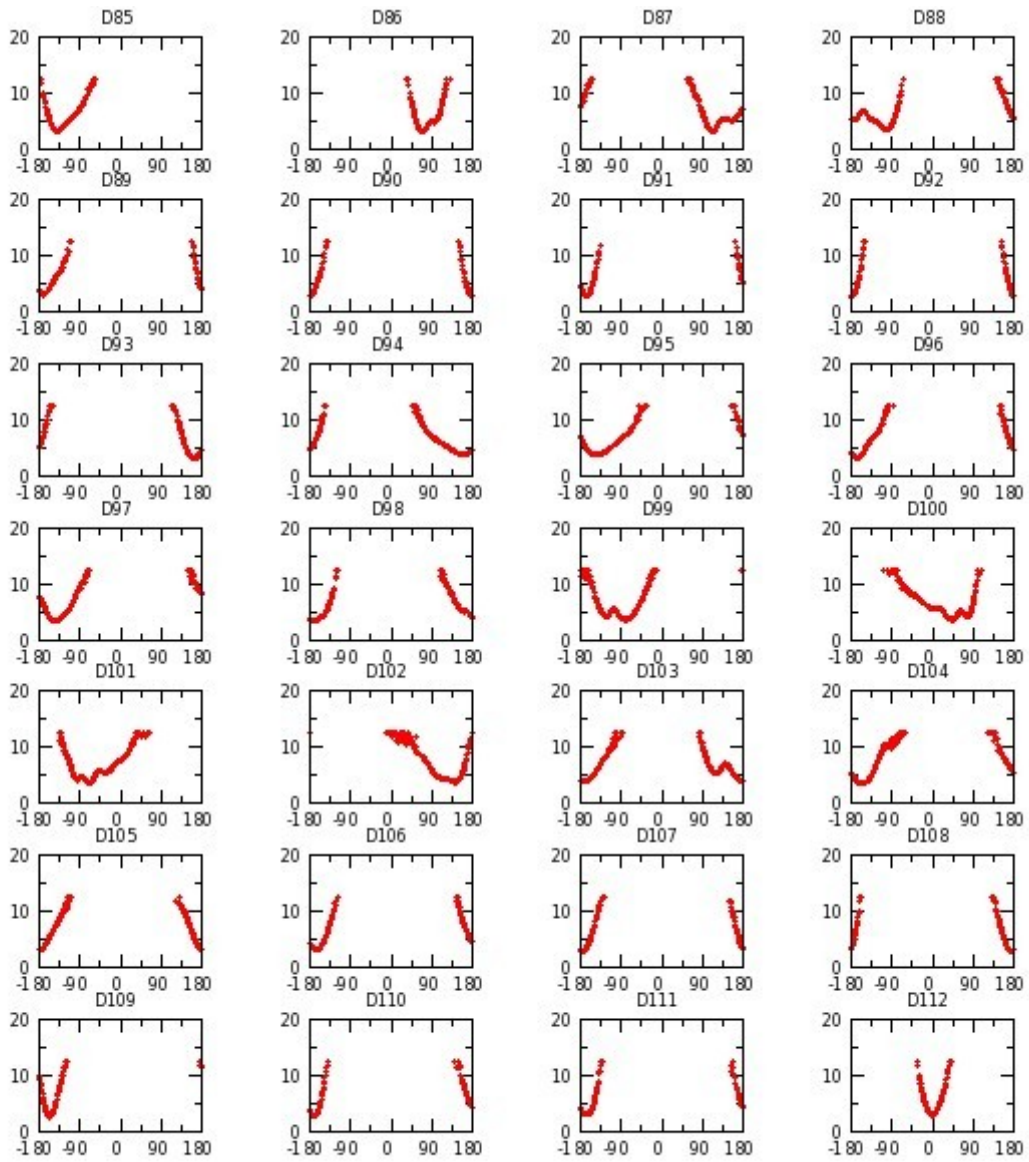
Annexe G 1 : H_7DW réplique I	331
Annexe G 2 : H_7DW réplique II	345
Annexe G 3 : H_7DW réplique III	359
Annexe G 4 : H_aGAL réplique I	373
Annexe G 5 : H_aGAL réplique II	387
Annexe G 6 : H_aGAL réplique III	401
Annexe G 7 : H_CD1d réplique I	415
Annexe G 8 : H_CD1d réplique II	429
Annexe G 9 : H_CD1d réplique III	443
Annexe G 10 : H_GOF réplique I	457
Annexe G 11 : H_GOF réplique II	471
Annexe G 12 : H_GOF réplique III	485
Annexe G 13 : H_LIP réplique I	499
Annexe G 14 : H_LIP réplique II	513
Annexe G 15 : H_LIP réplique III	527
Annexe G 16 : H_NUaGAL réplique I	541
Annexe G 17 : H_NUaGAL réplique II	555
Annexe G 18 : H_NUaGAL réplique III	569
Annexe G 19 : H_OCH réplique I	583
Annexe G 20 : H_OCH réplique II	597
Annexe G 21 : H_OCH réplique III	611
Annexe G 22 : H_OCH9 réplique I	625
Annexe G 23 : H_OCH9 réplique II	639
Annexe G 24 : H_OCH9 réplique III	653
Annexe G 25 : H_SaGAL réplique I	667
Annexe G 26 : H_SaGAL réplique II	681
Annexe G 27 : H_SaGAL réplique III	695
Annexe G 28 : M_7DW réplique I	709

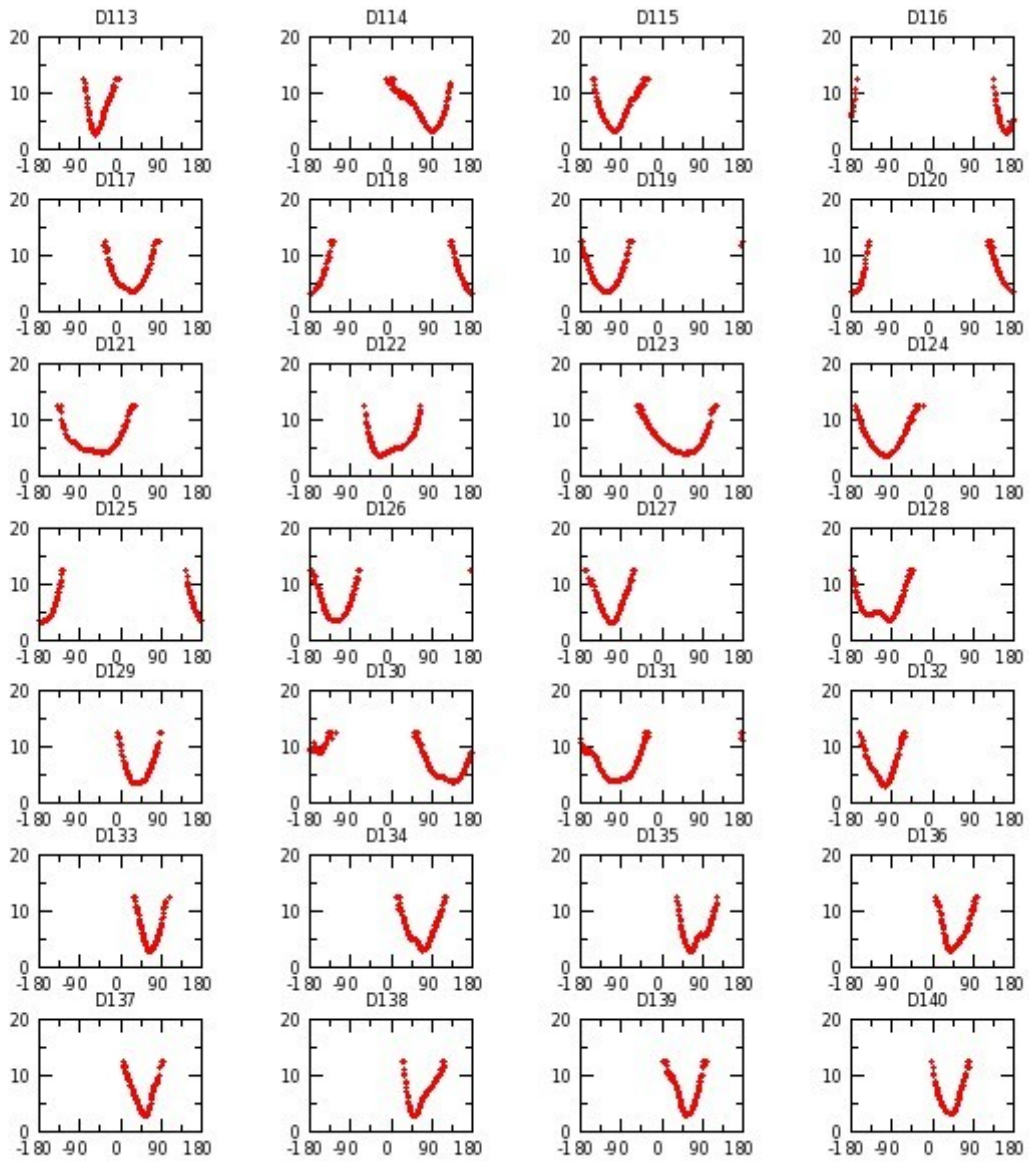
Annexe G 29 : M_7DW réplique II	723
Annexe G 30 : M_7DW réplique III	737
Annexe G 31 : M_aGAL réplique I	751
Annexe G 32 : M_aGAL réplique II	765
Annexe G 33 : M_aGAL réplique III	779
Annexe G 34 : M_AZOL réplique I	793
Annexe G 35 : M_AZOL réplique II	807
Annexe G 36 : M_AZOL réplique III	821
Annexe G 37 : M_GOF réplique I	835
Annexe G 38 : M_GOF réplique II	849
Annexe G 39 : M_GOF réplique III	863
Annexe G 40 : M_NUaGAL réplique I	877
Annexe G 41 : M_NUaGAL réplique II	891
Annexe G 42 : M_NUaGAL réplique III	905
Annexe G 43 : M_OCH réplique I	919
Annexe G 44 : M_OCH réplique II	933
Annexe G 45 : M_OCH réplique III	947
Annexe G 46 : M_SaGAL réplique I	961
Annexe G 47 : M_SaGAL réplique II	975
Annexe G 48 : M_SaGAL réplique III	989

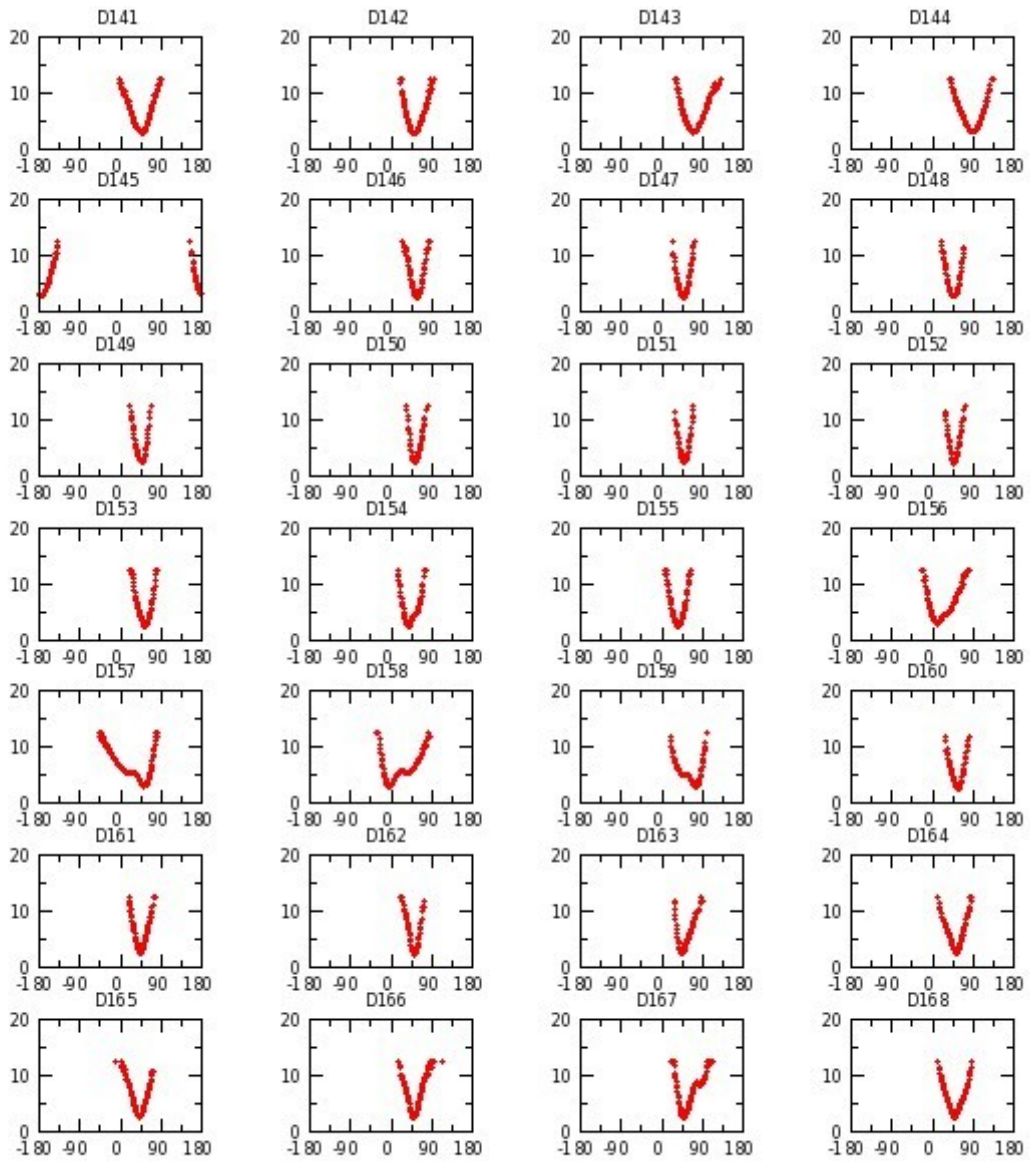


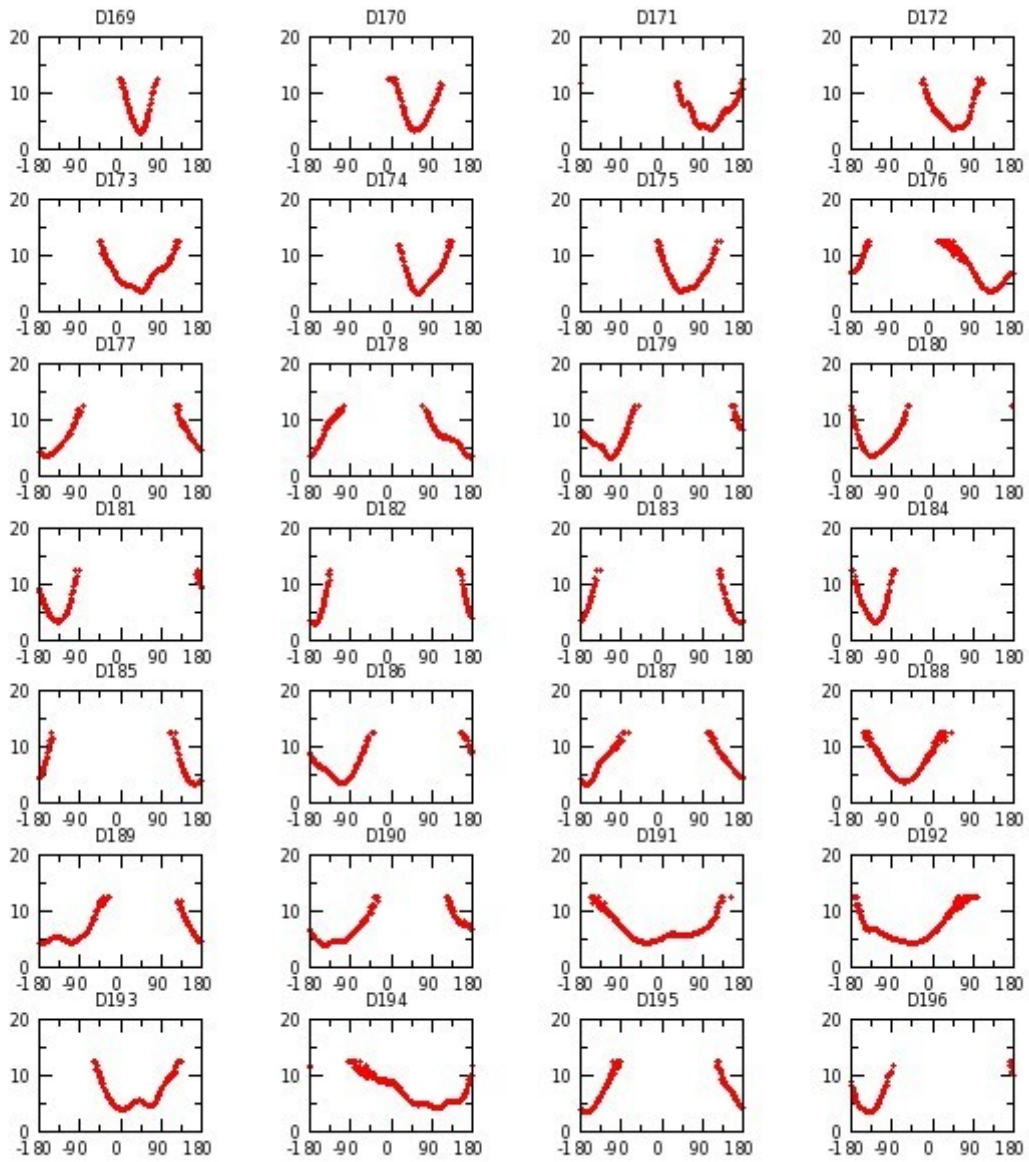


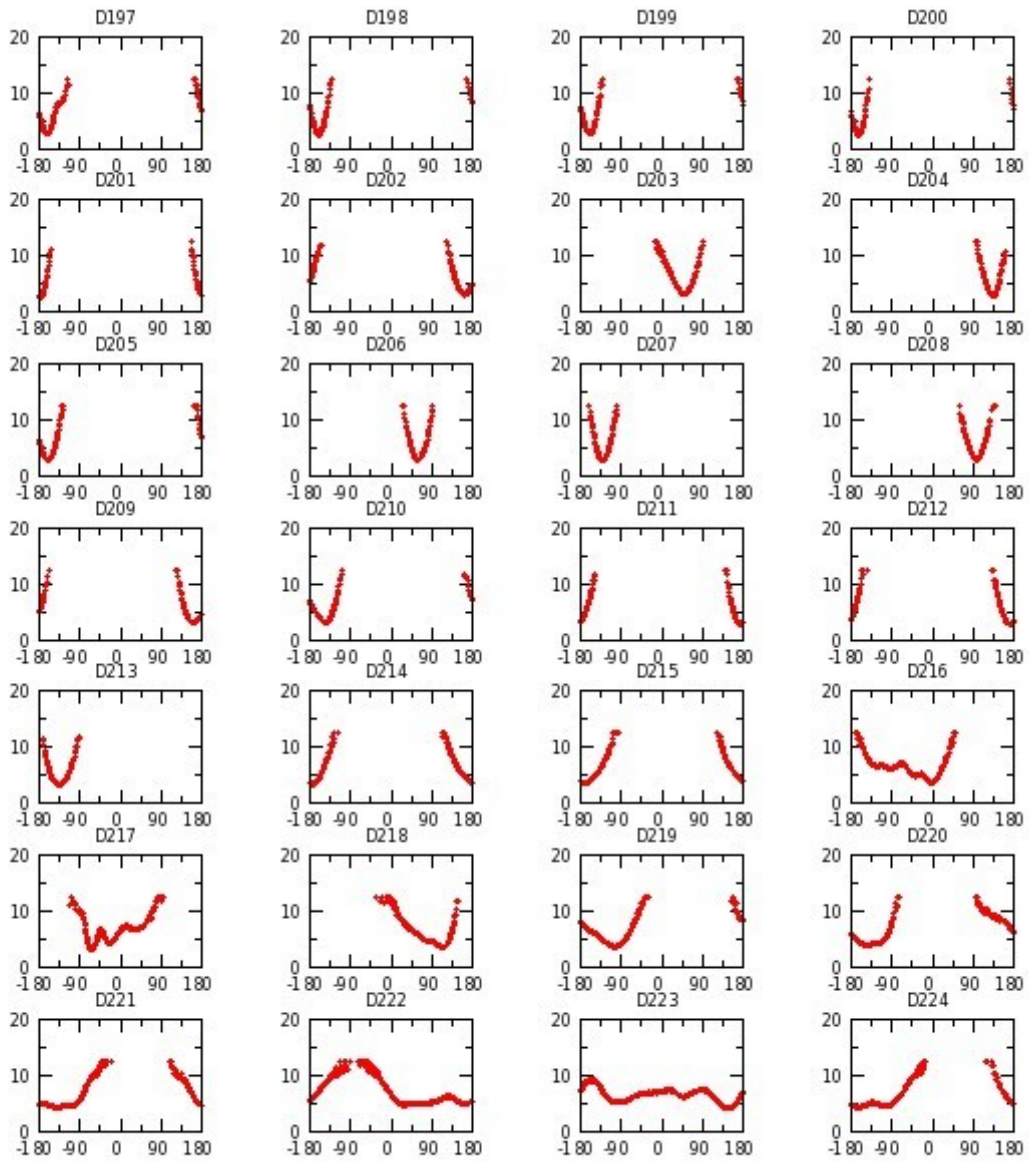


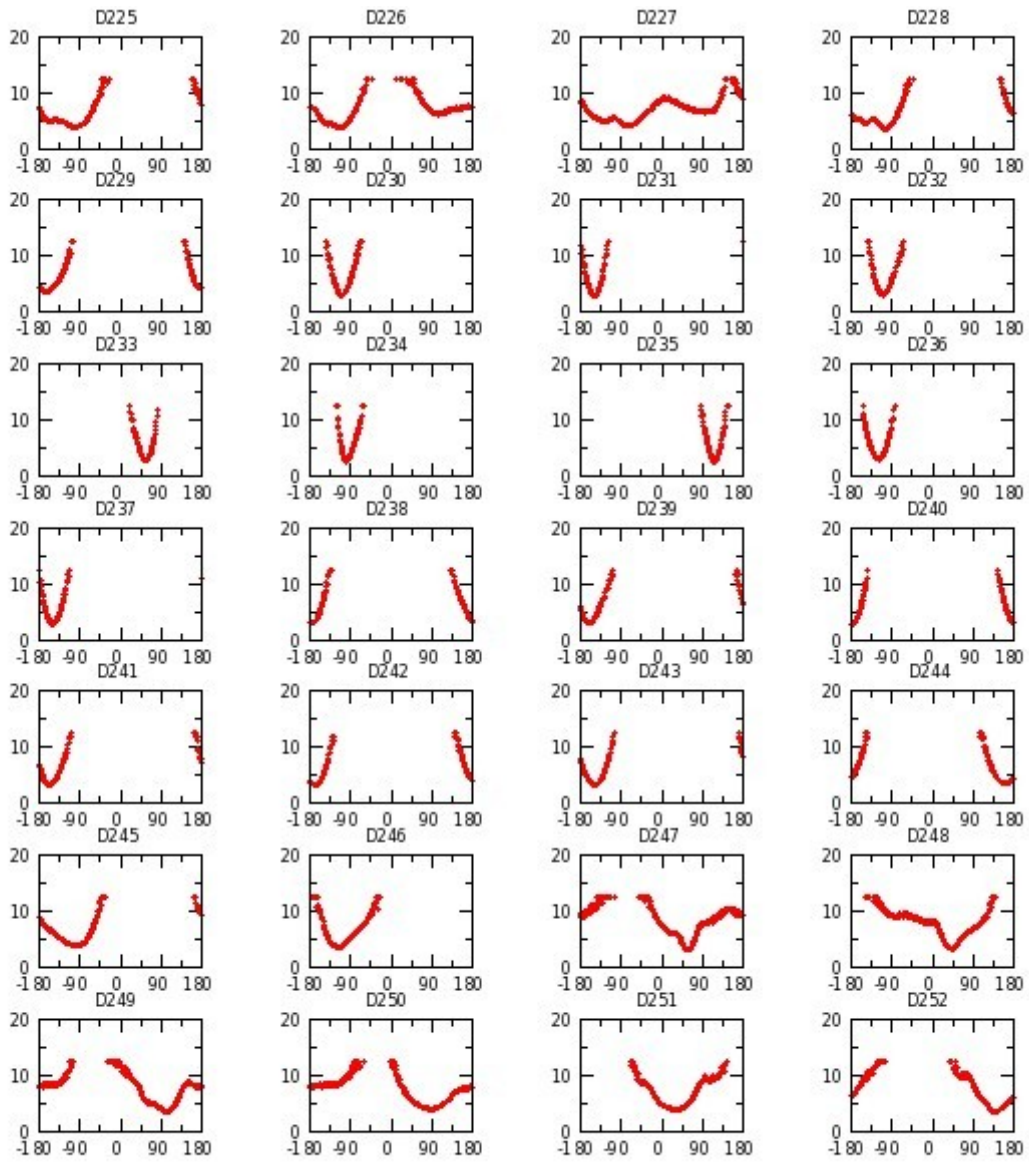


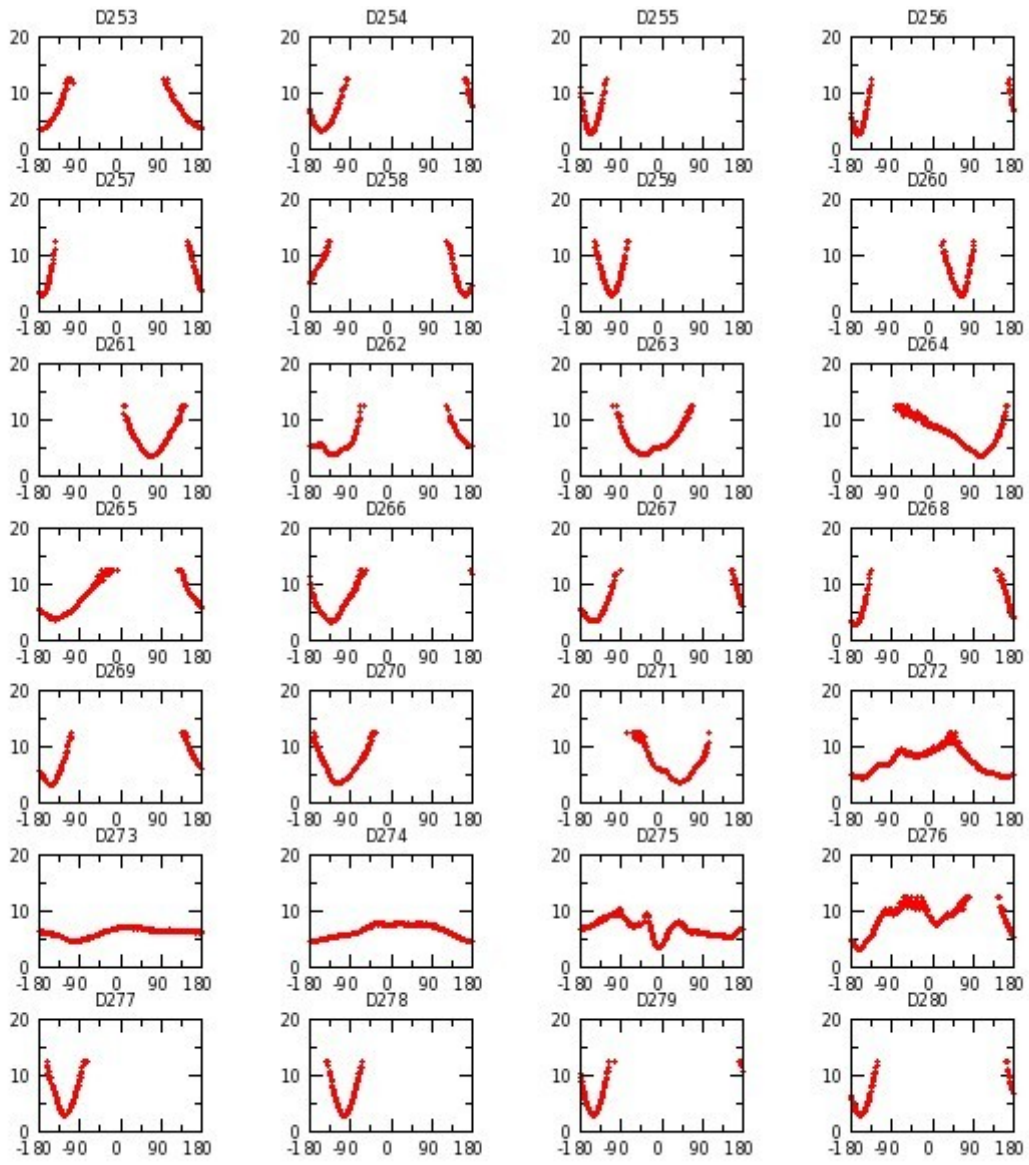


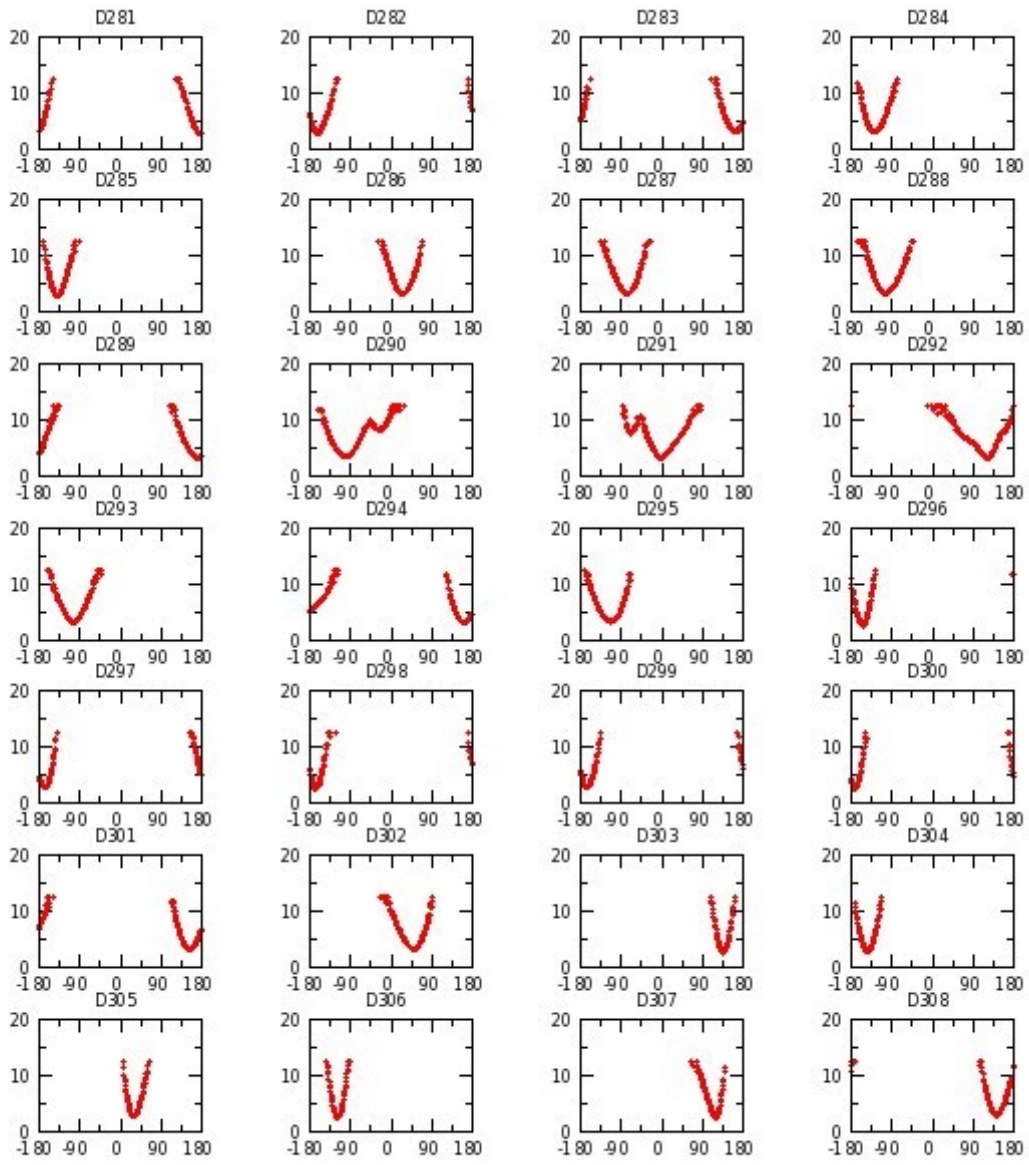


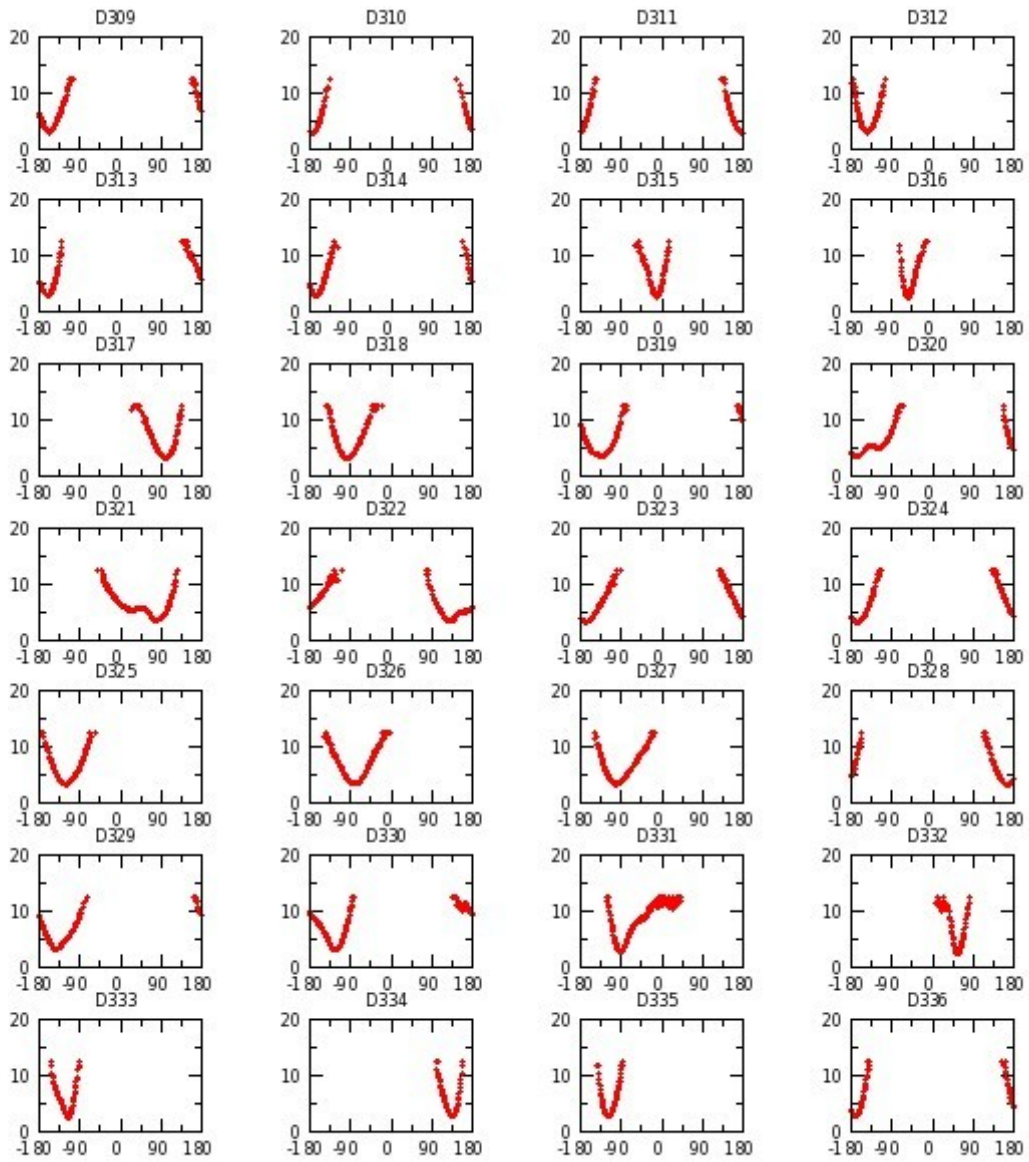


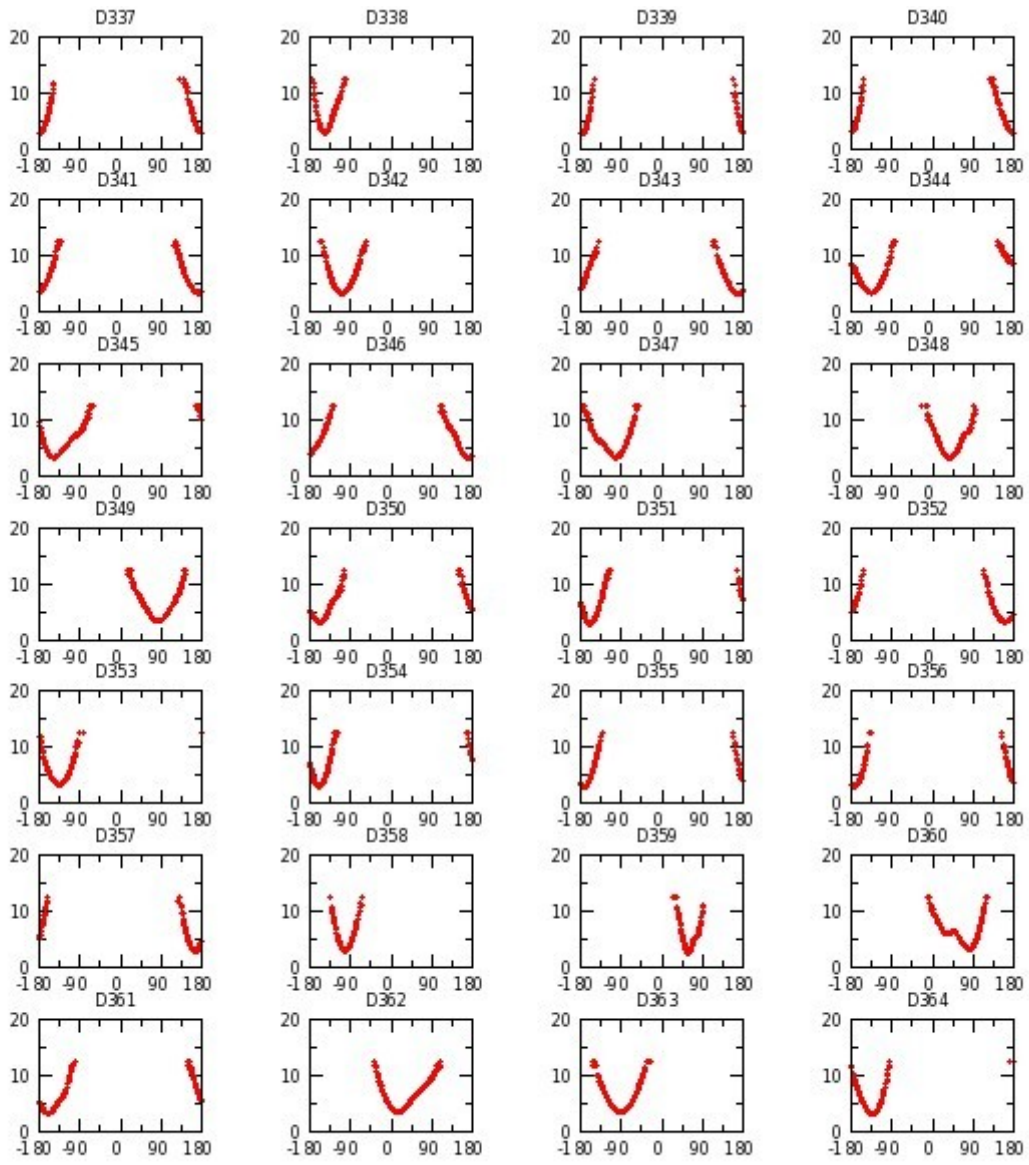


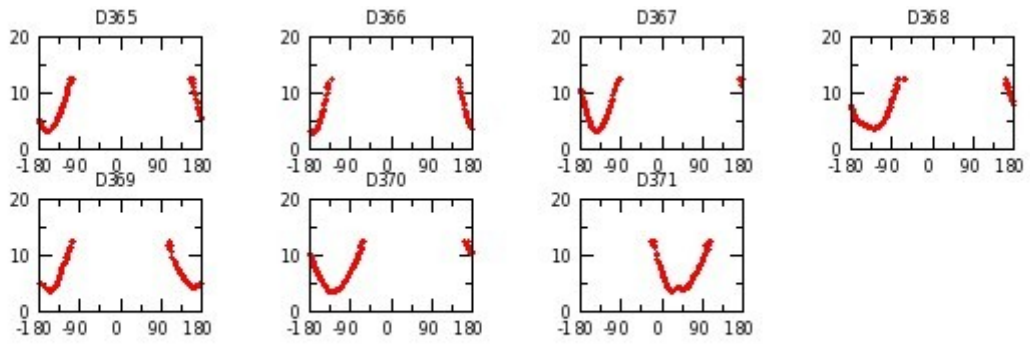




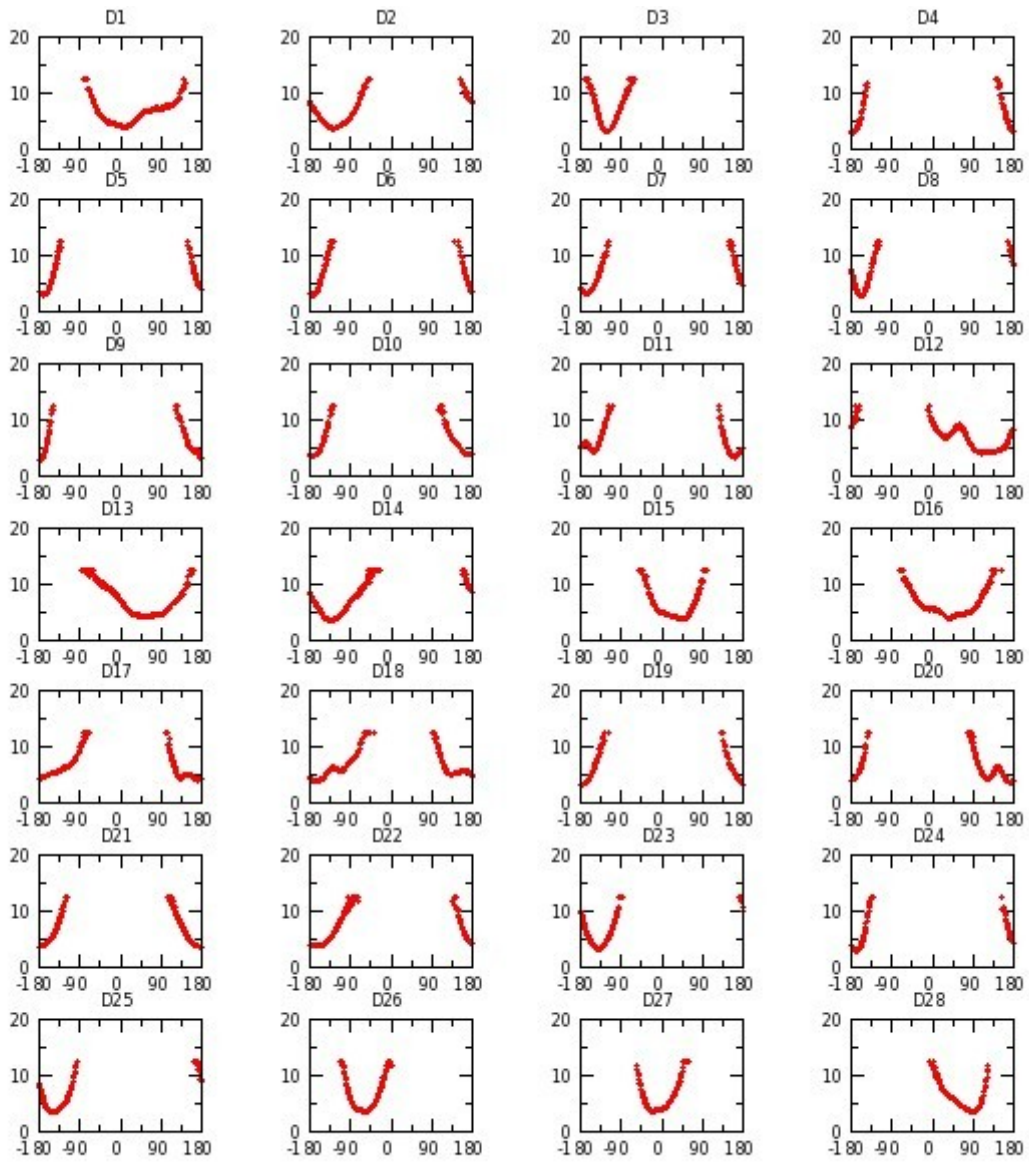


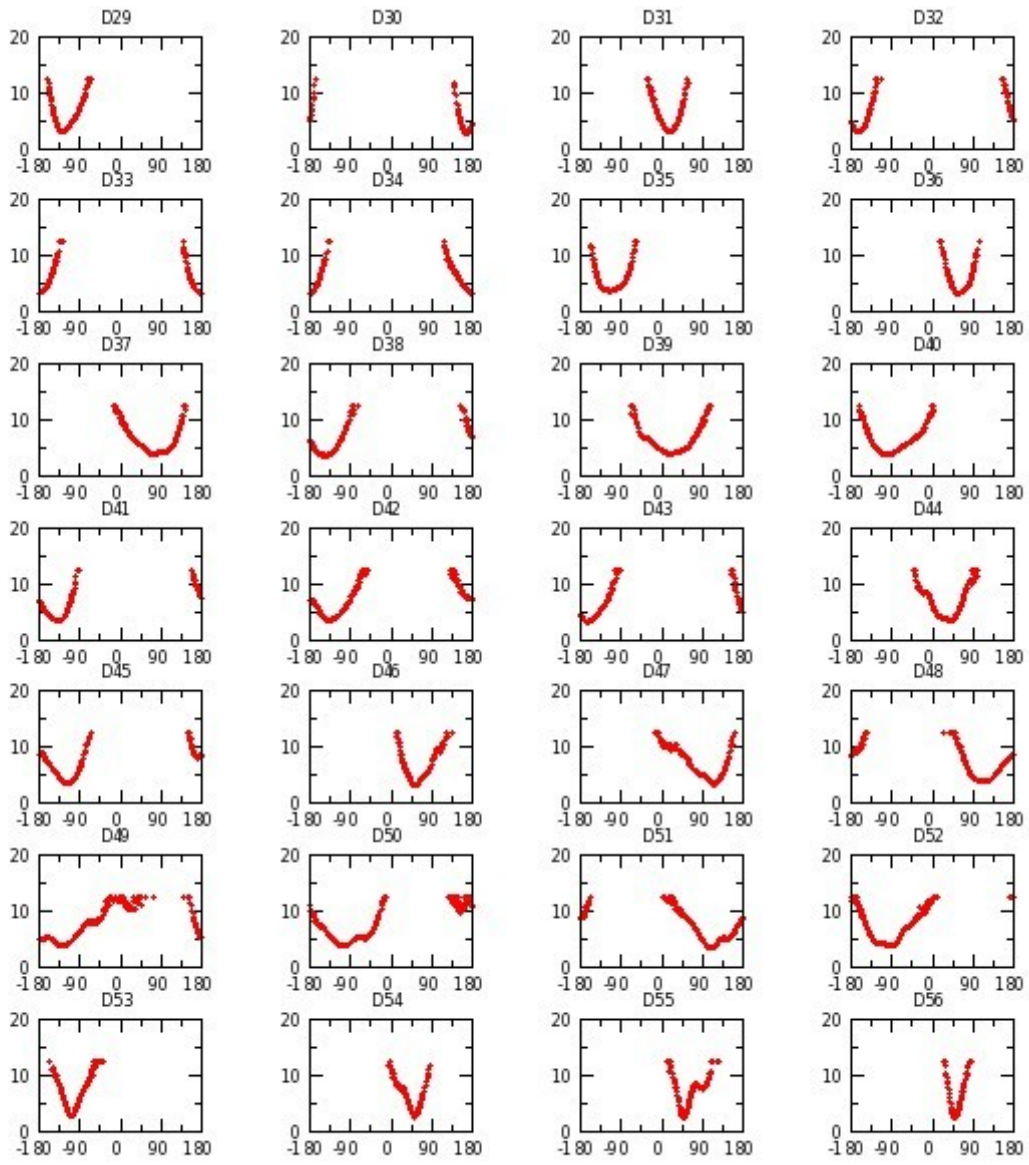


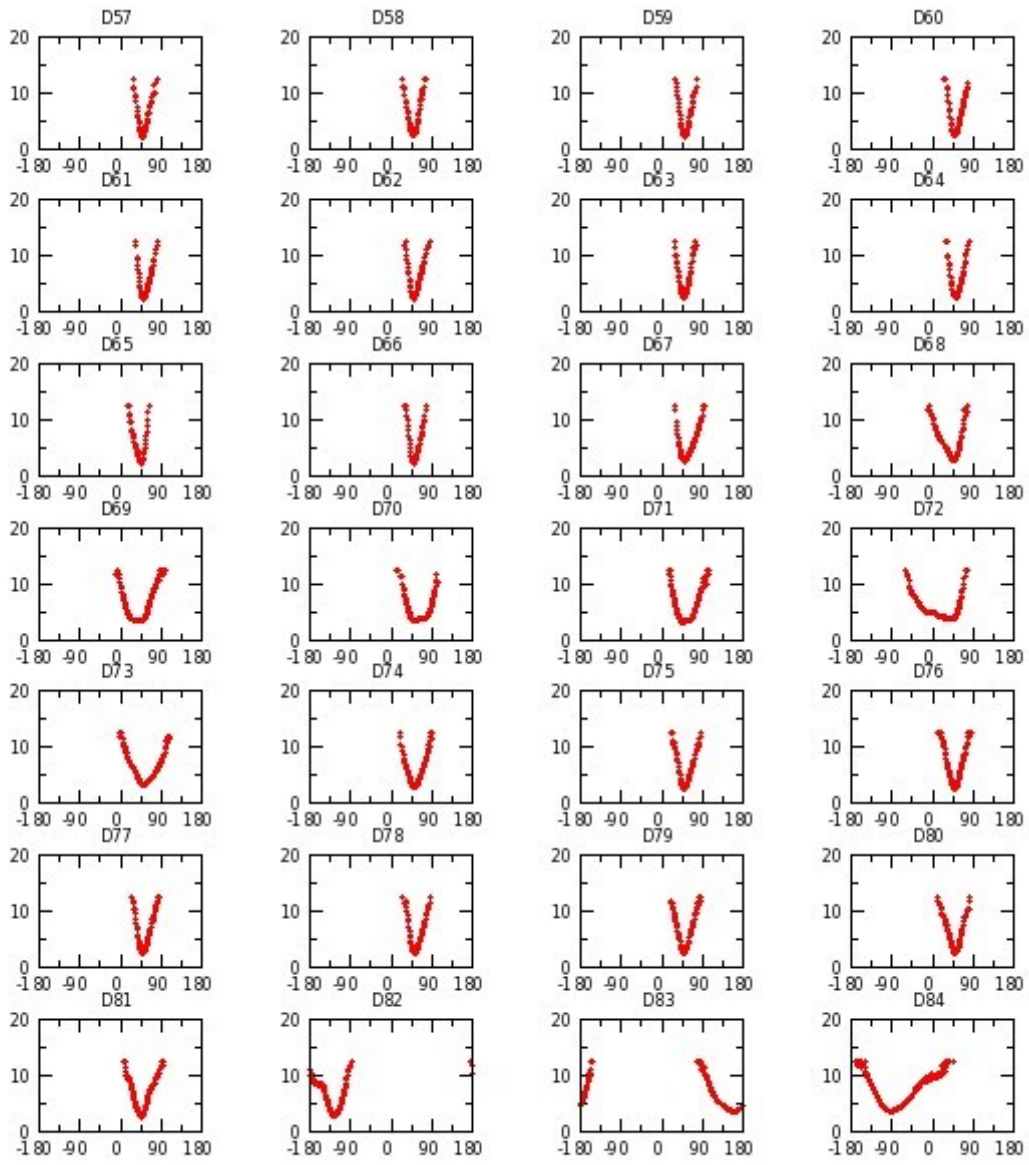


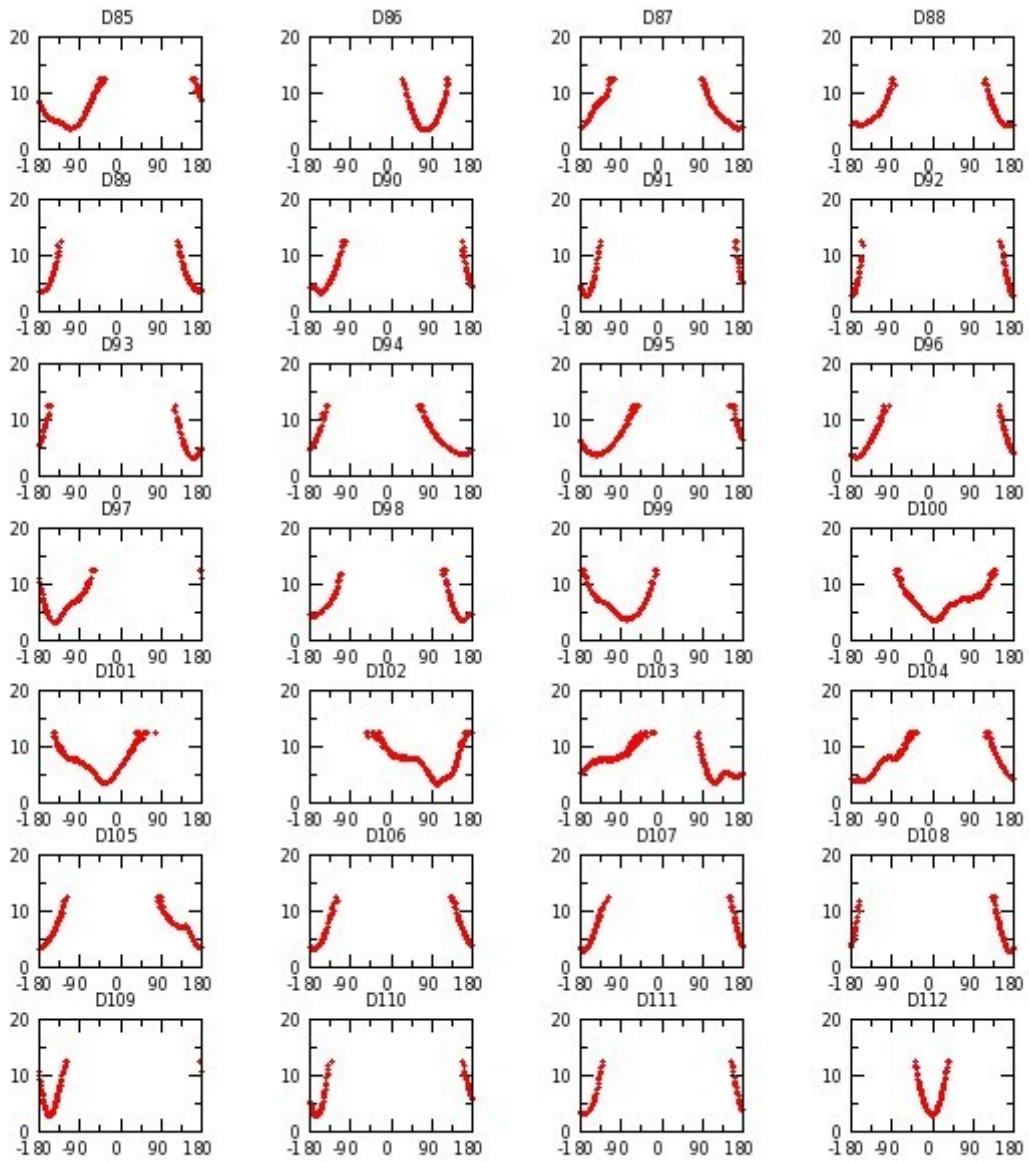


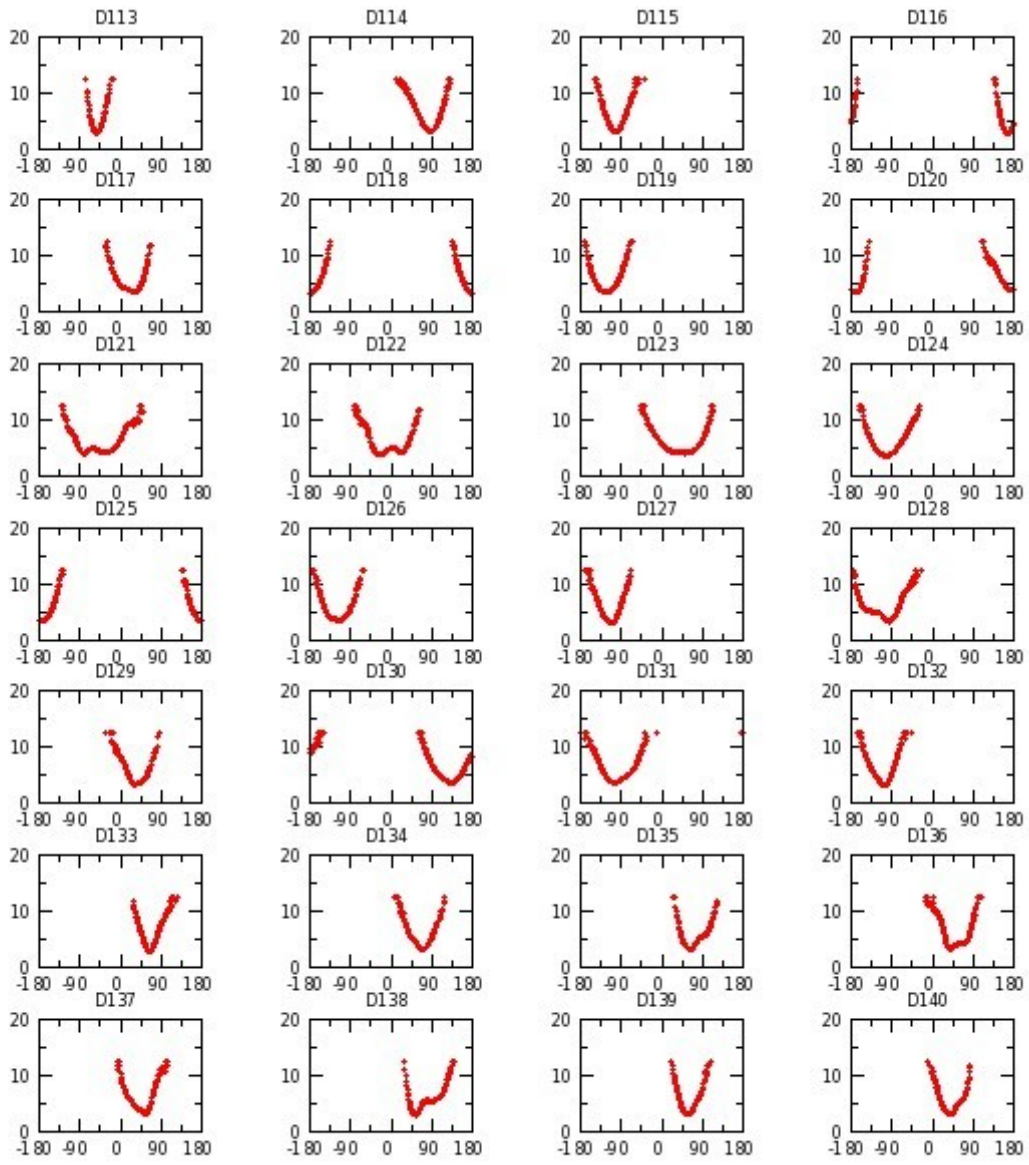
Annexe G 1 : H_7DW réplique I

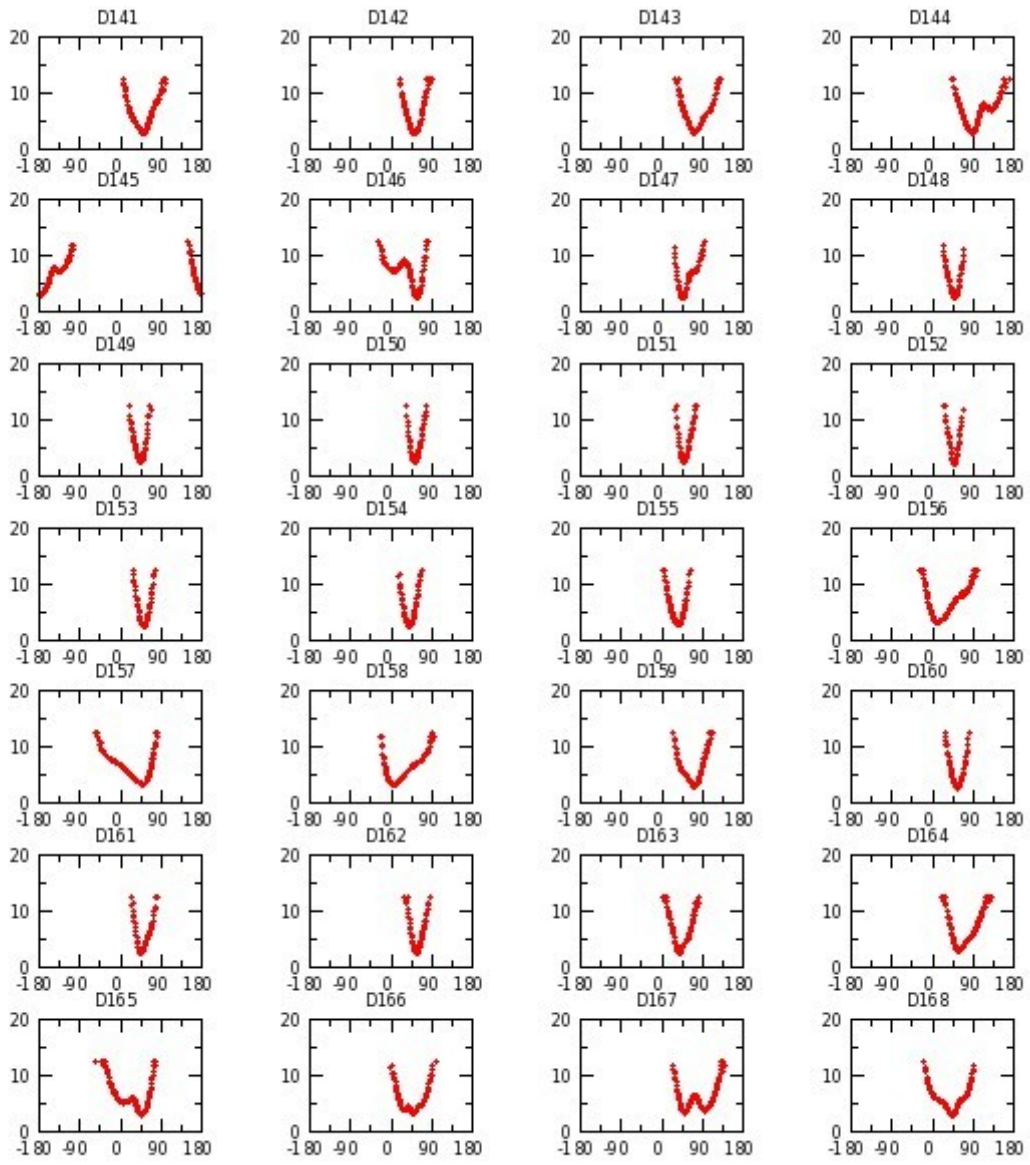


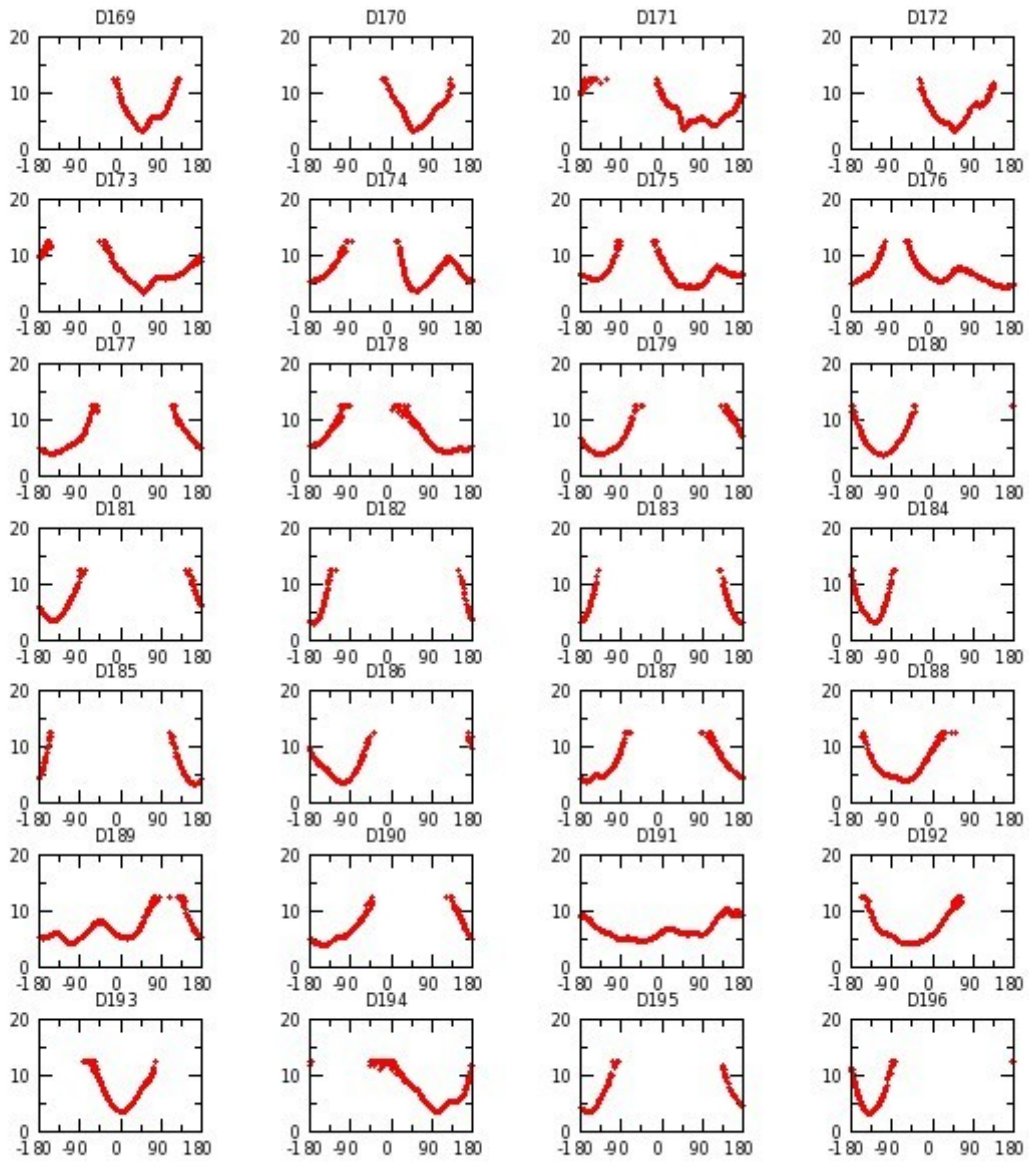


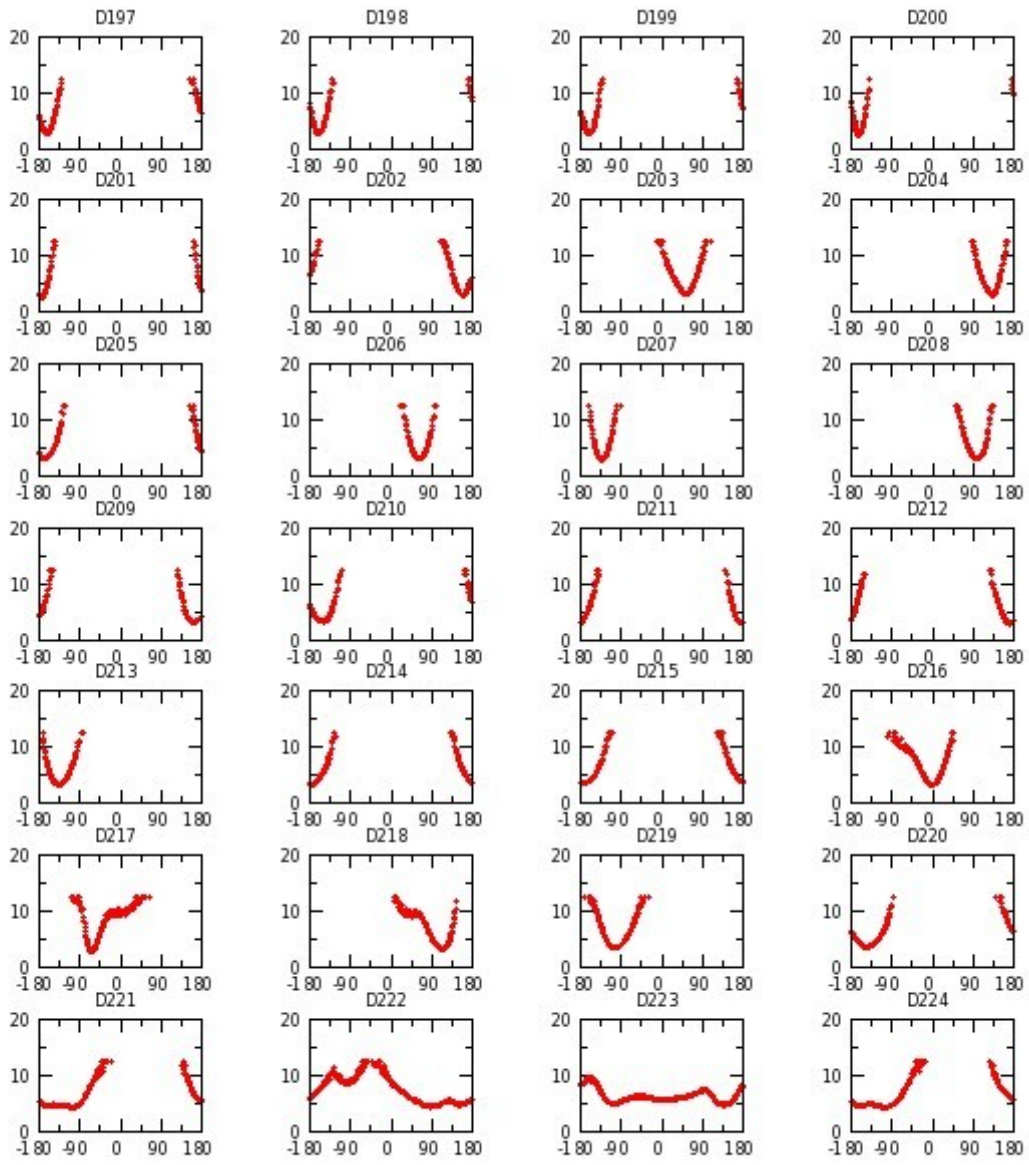


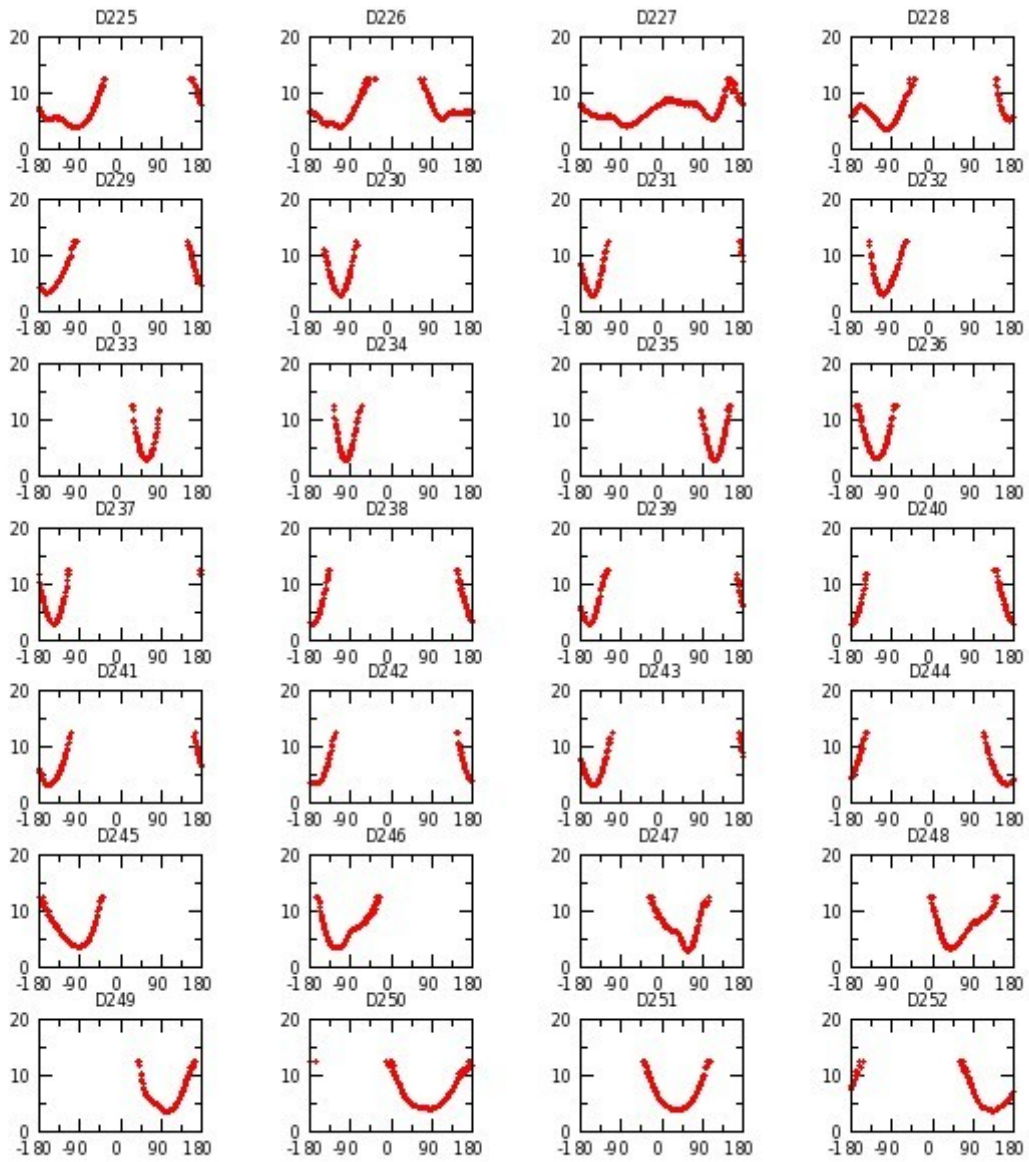


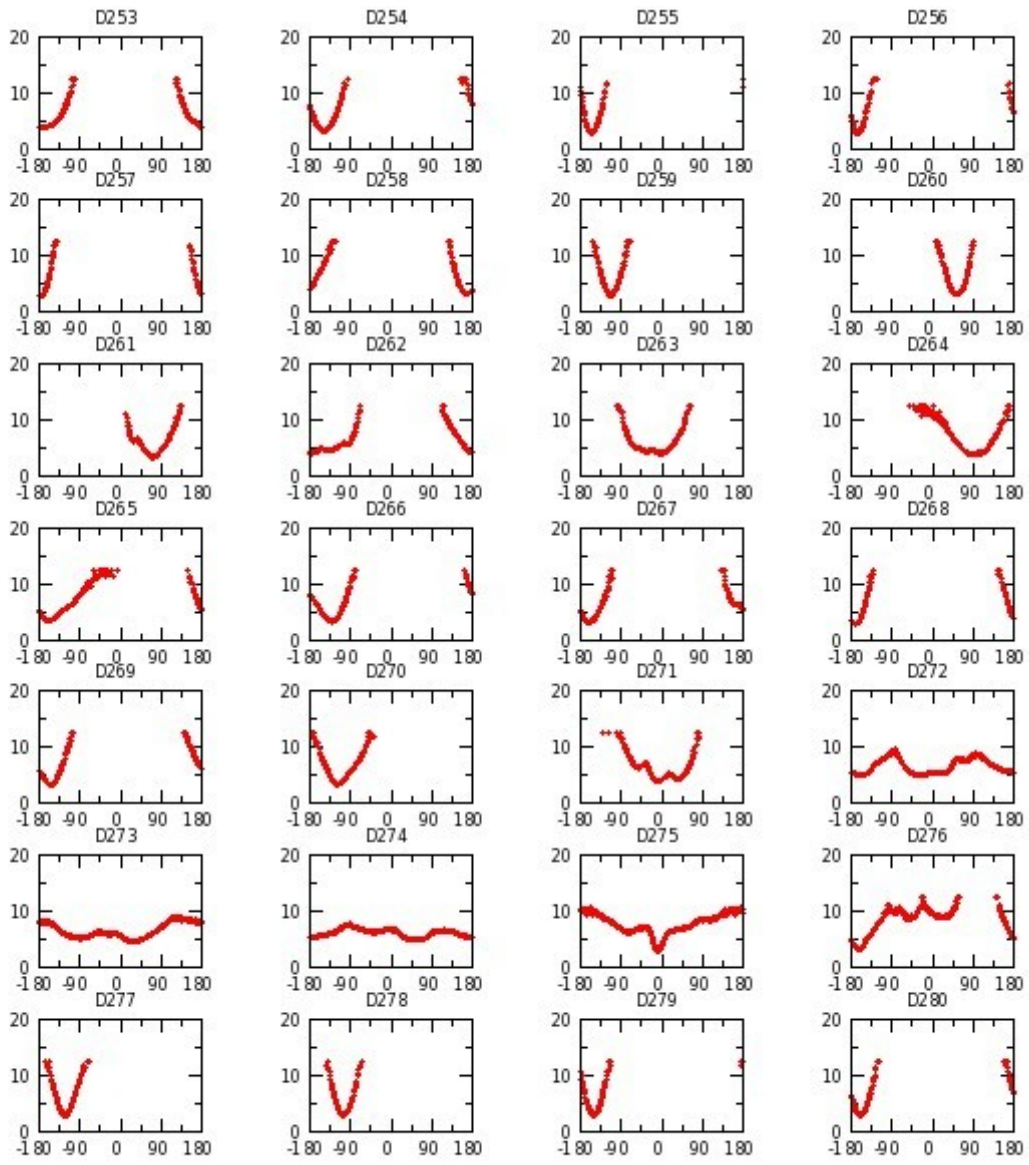


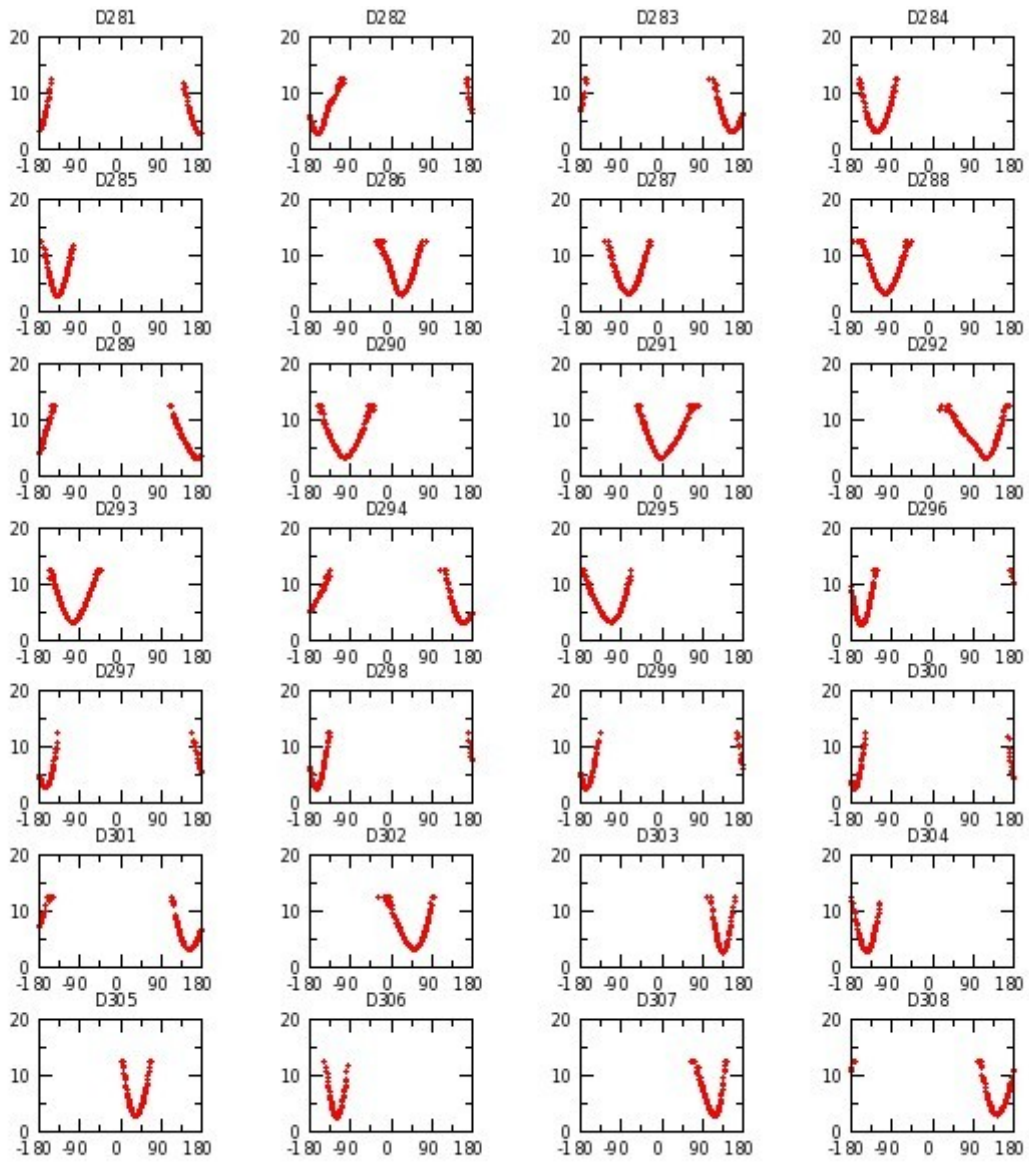


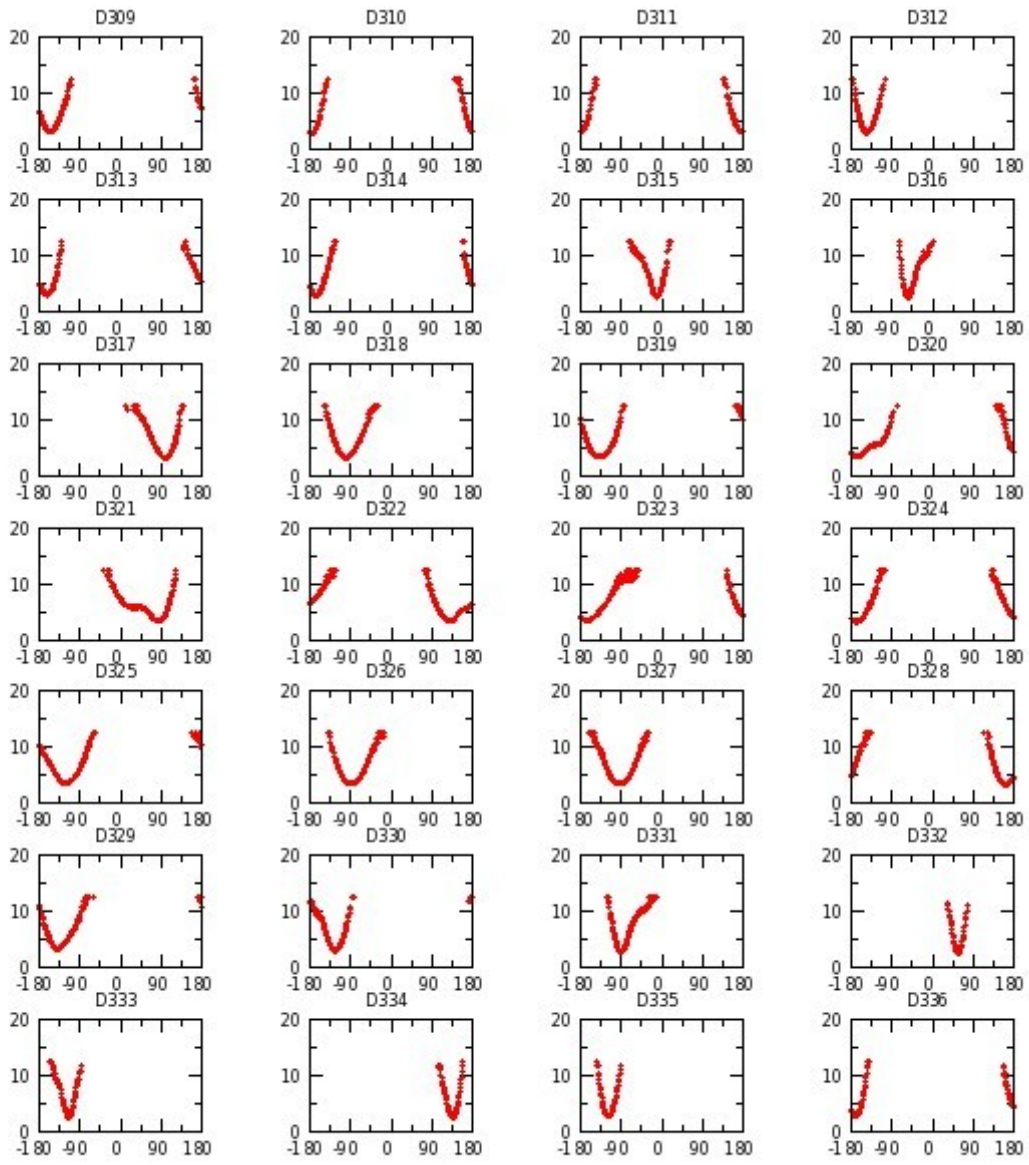


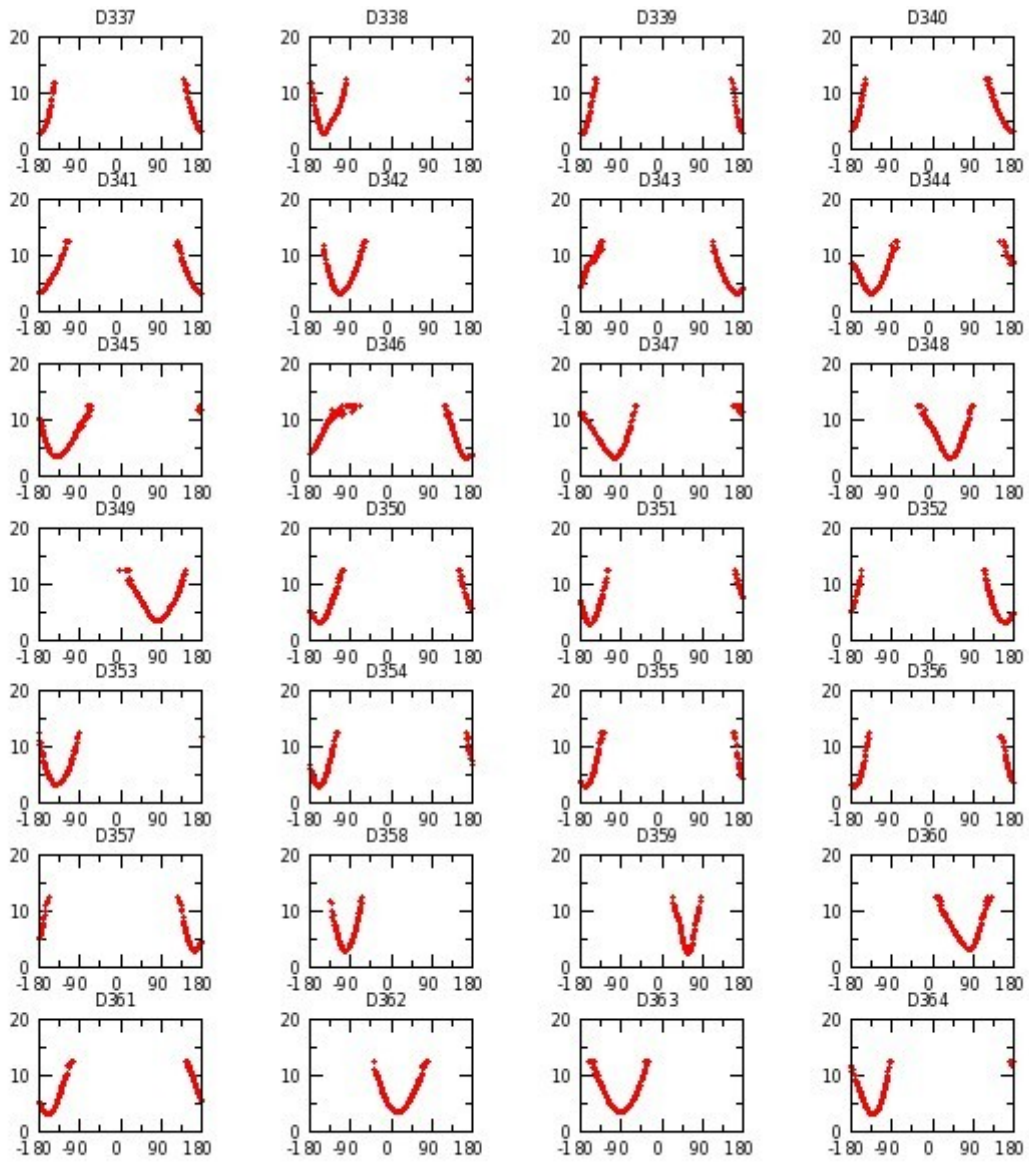


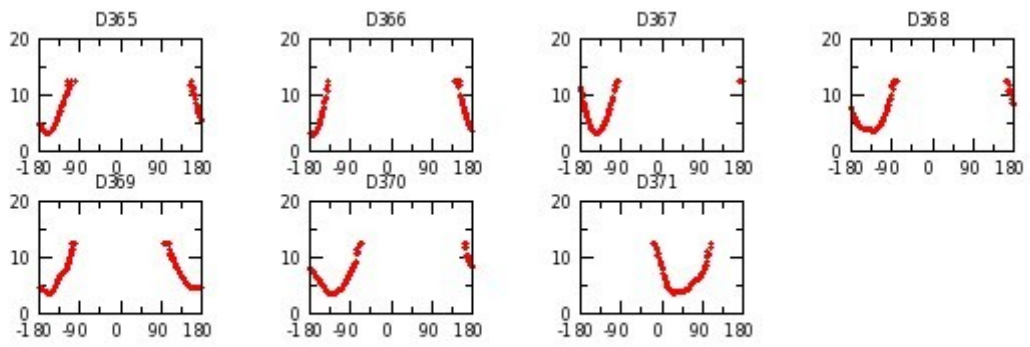




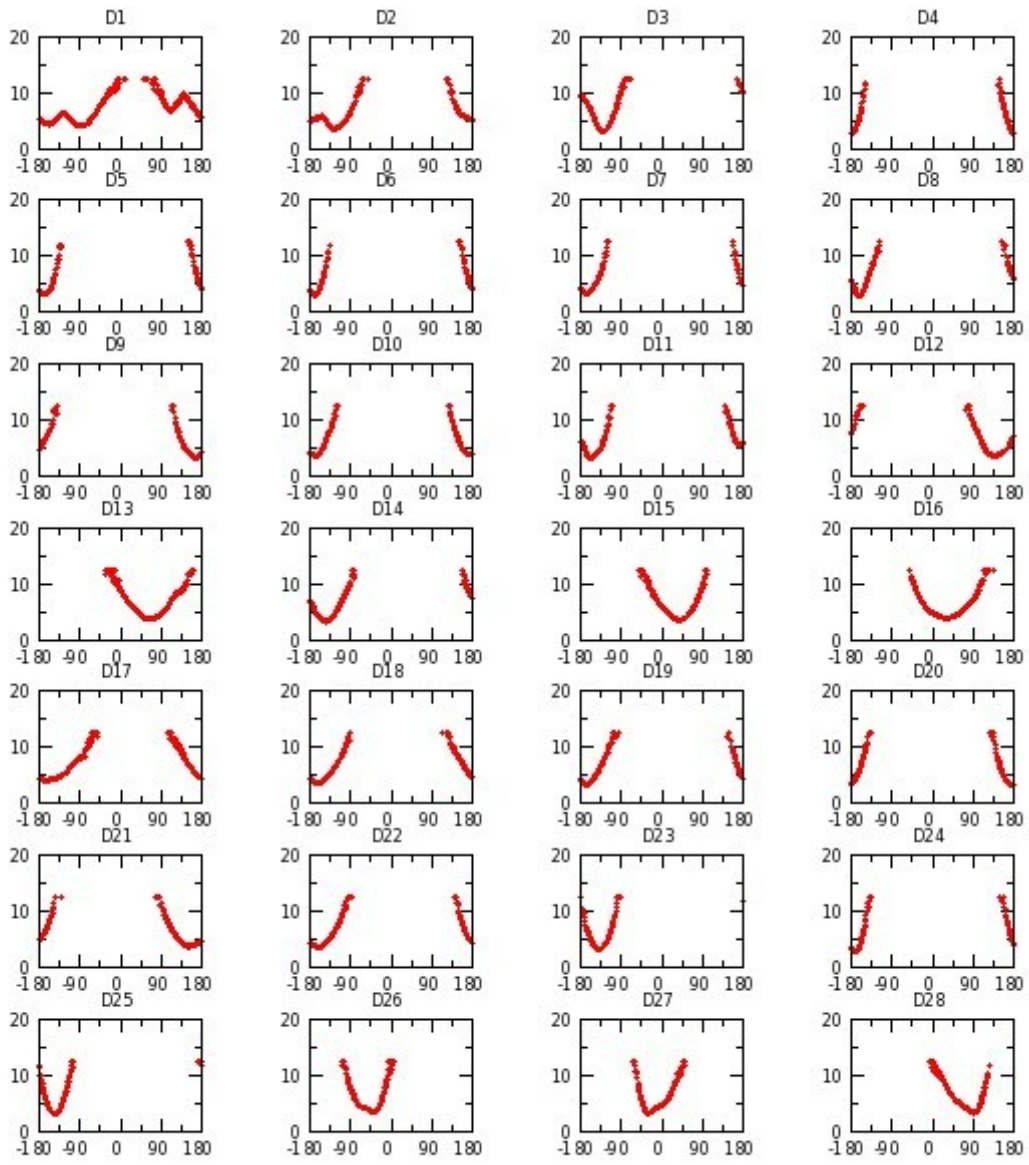


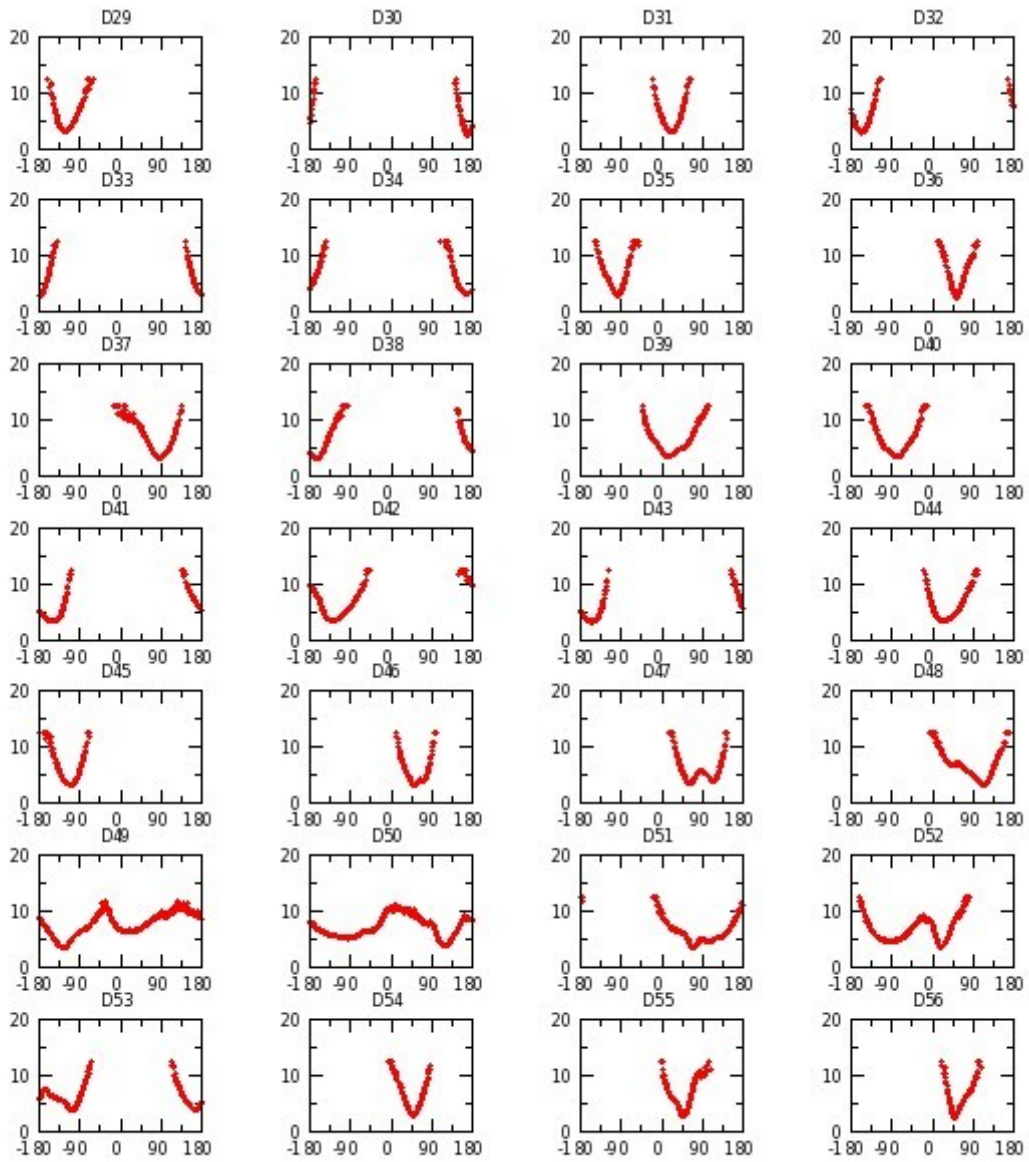


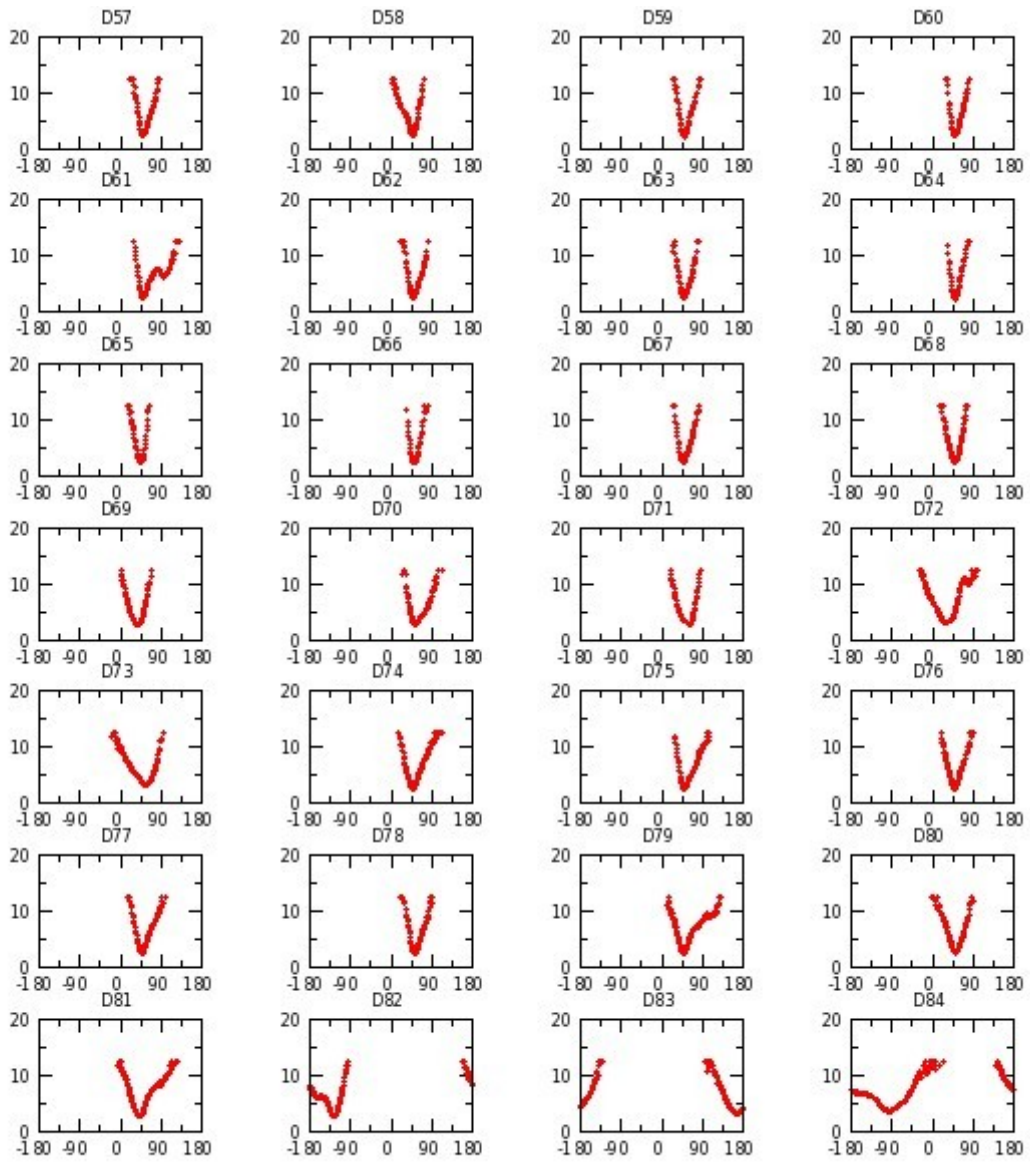


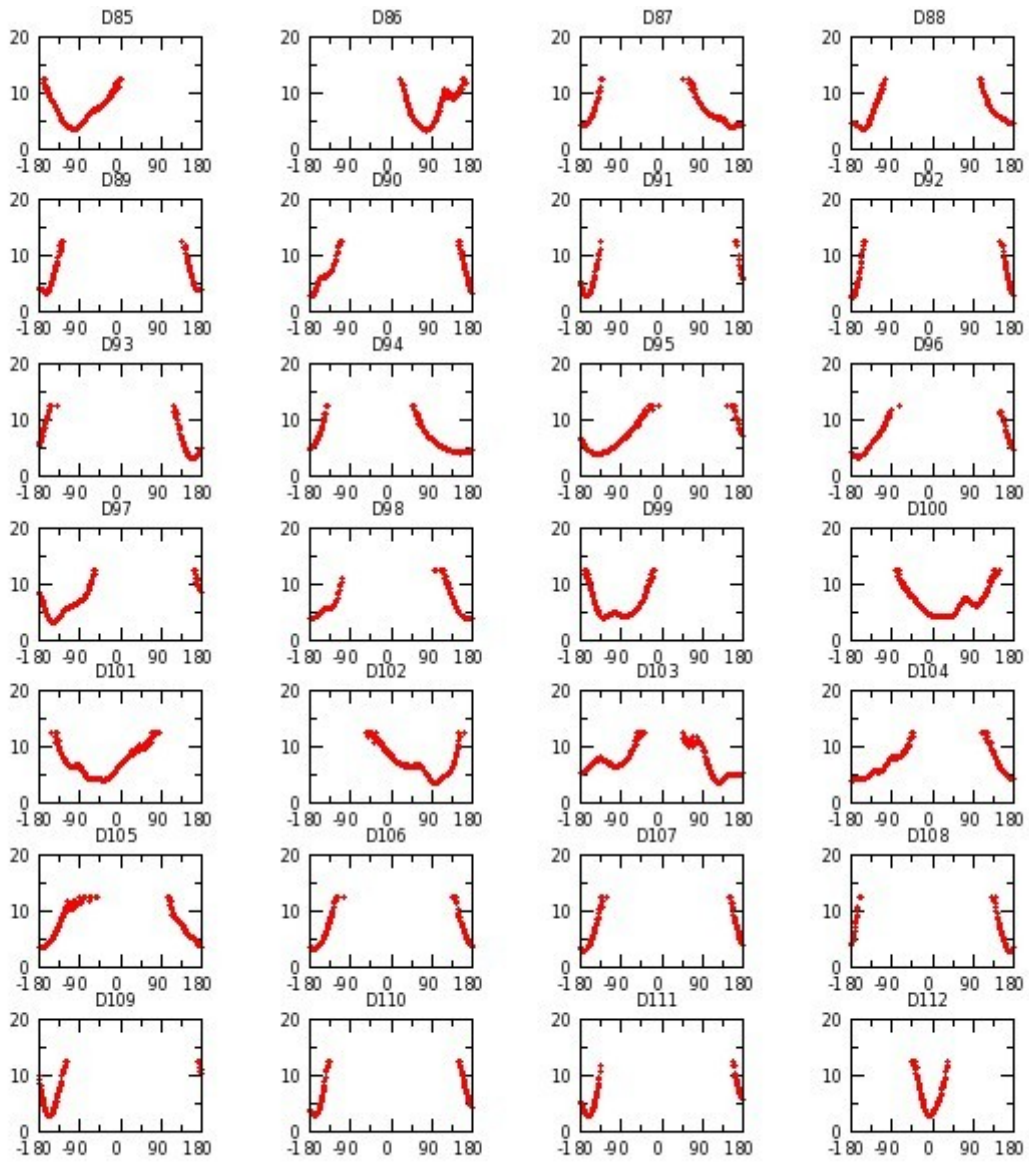


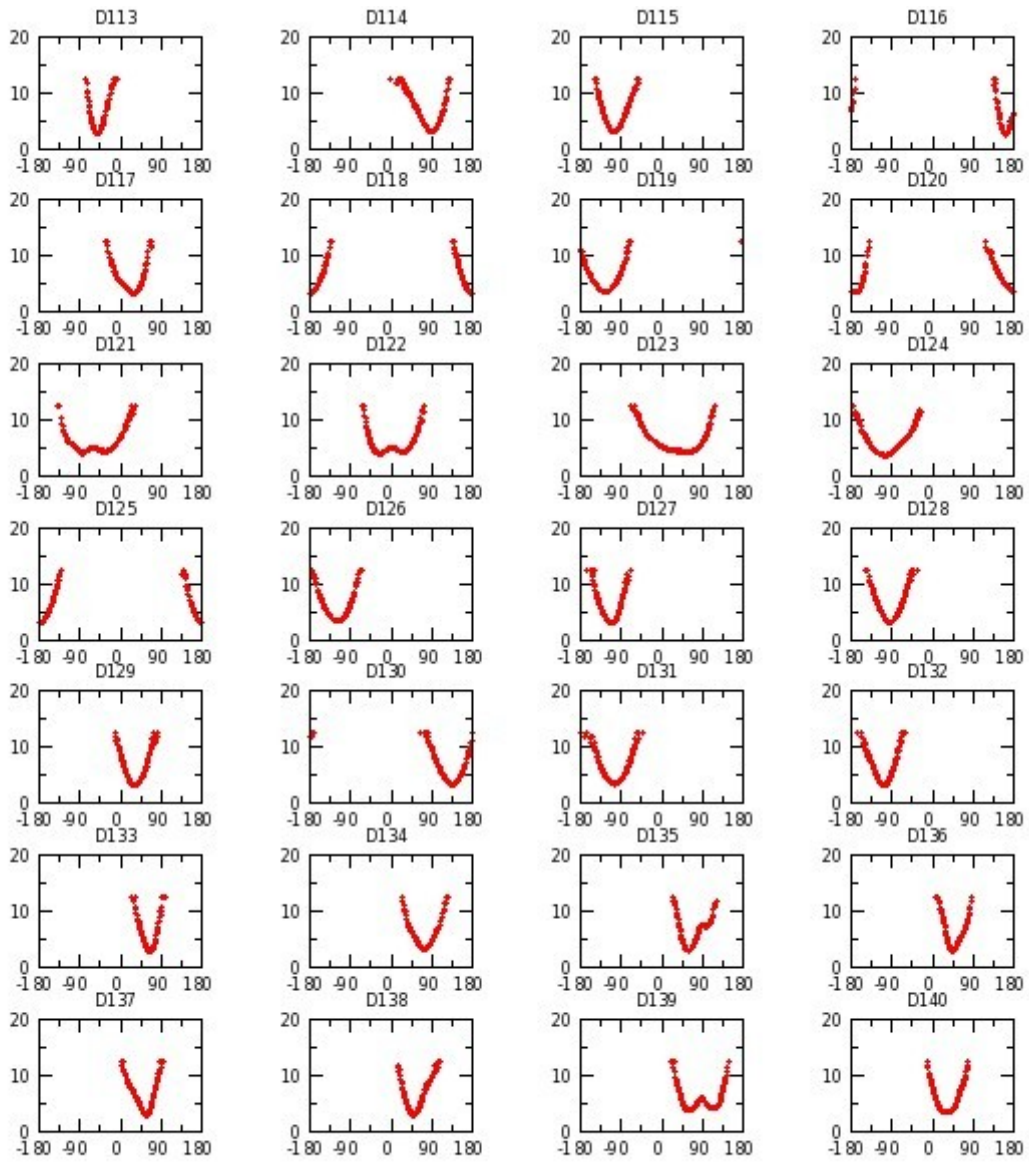
Annexe G 2 : H_7DW réplique II

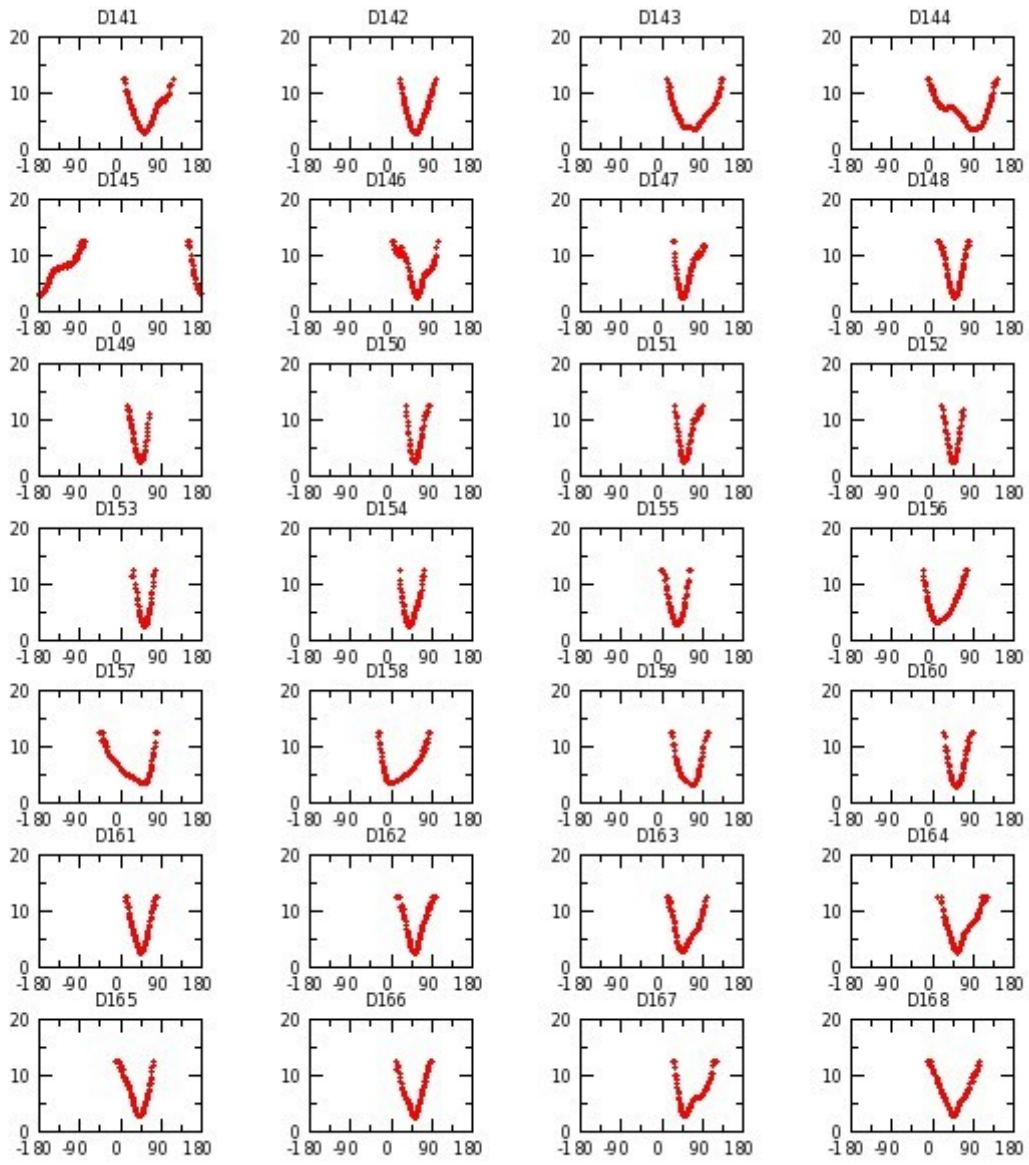


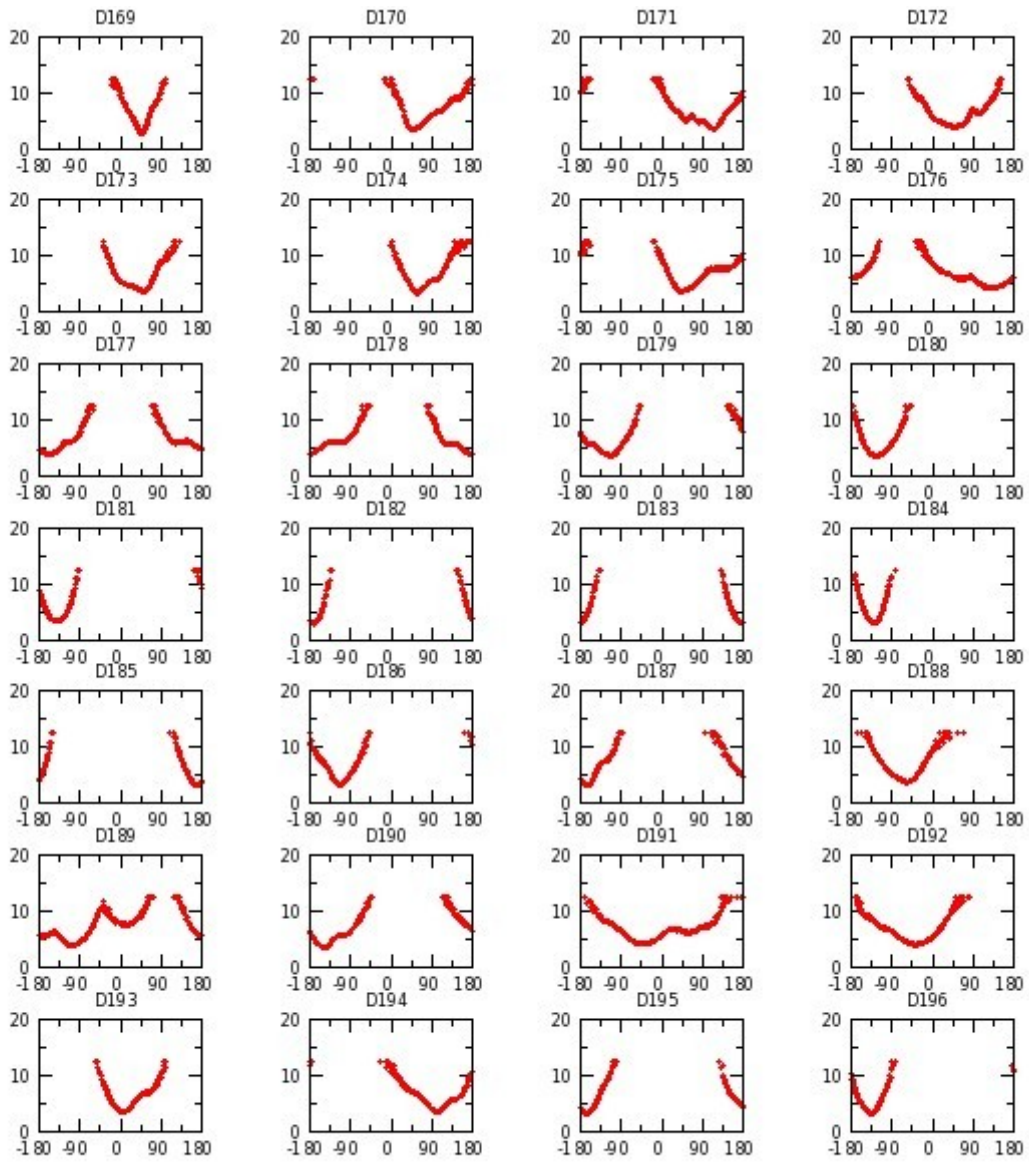


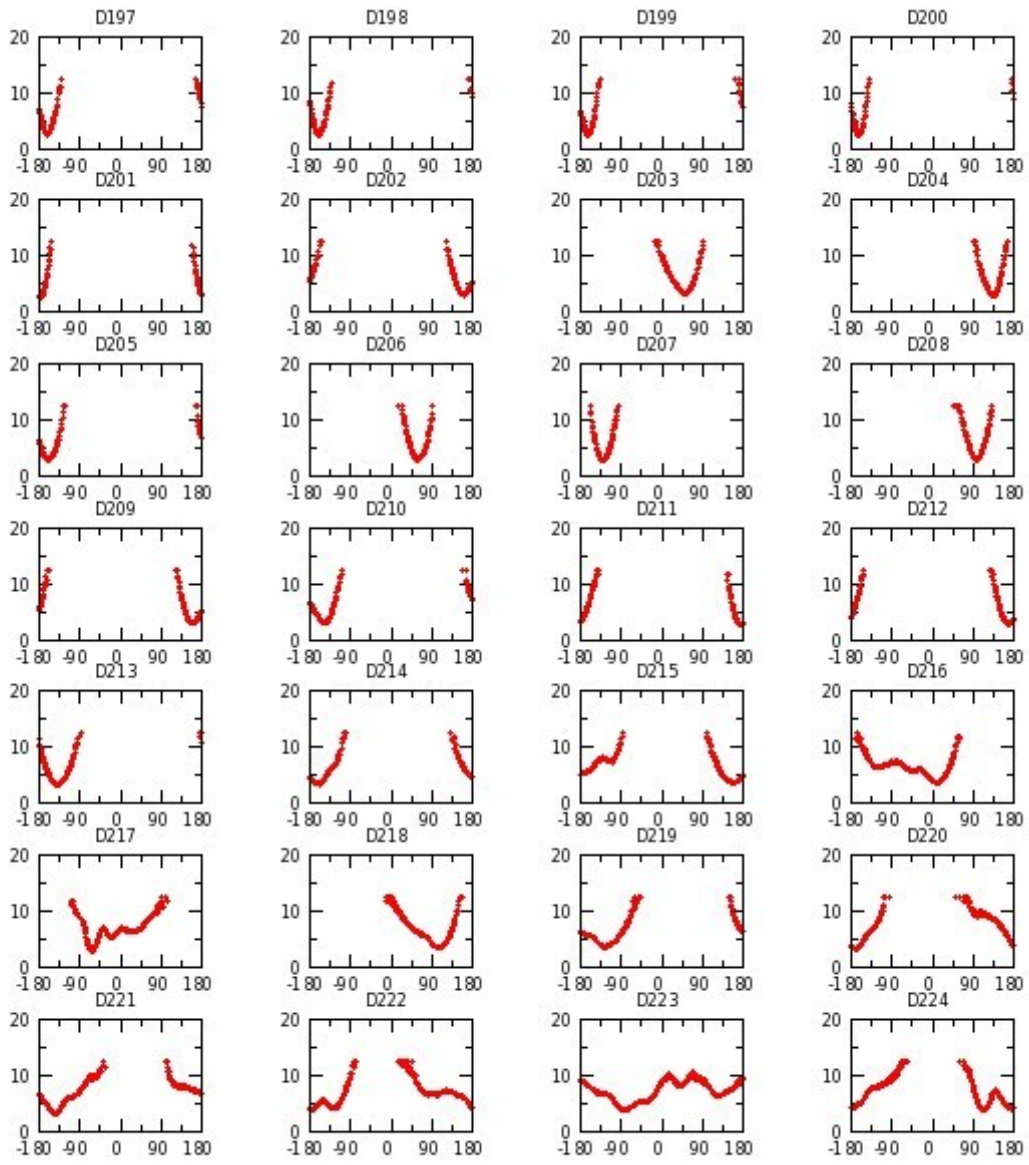


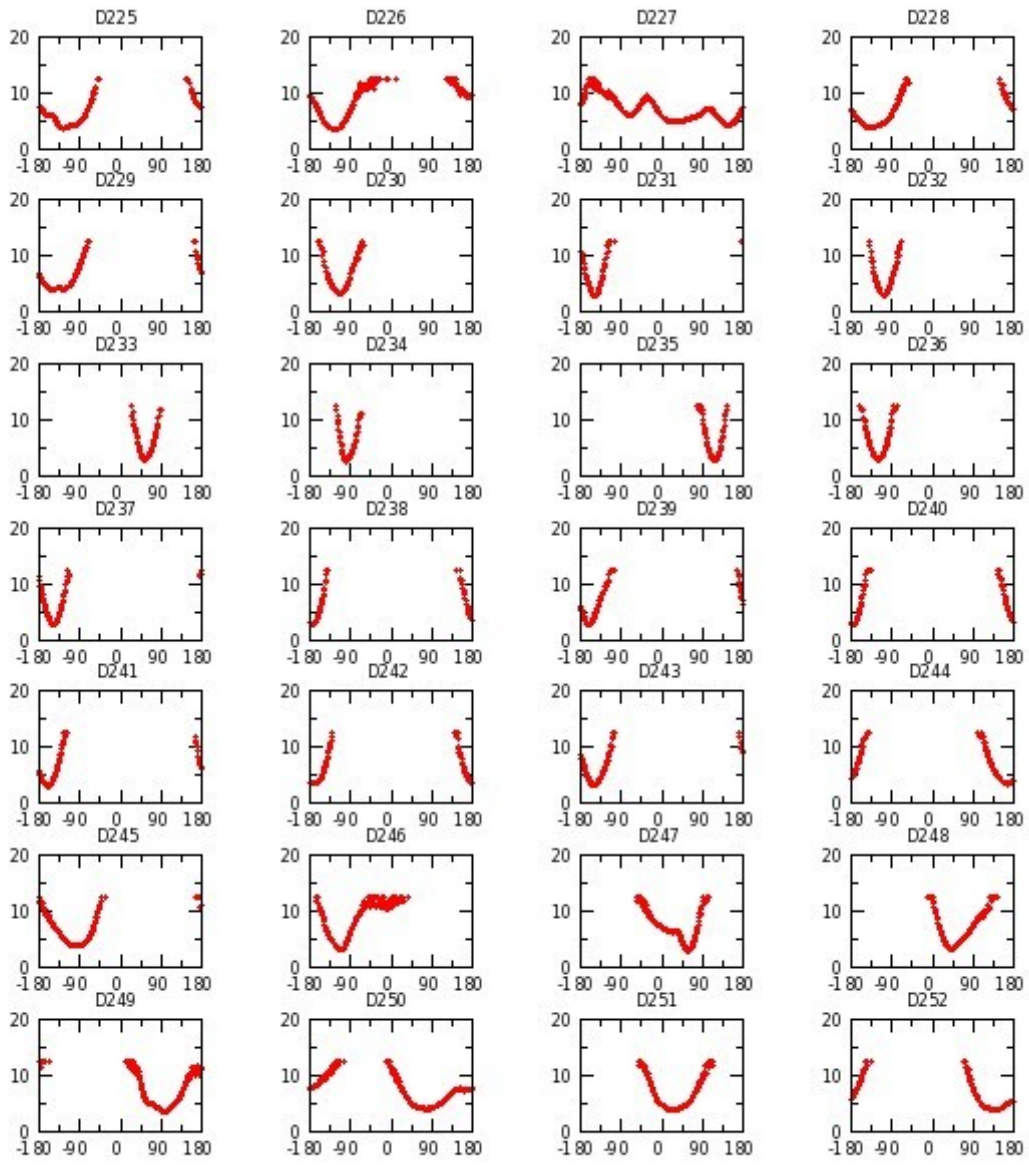


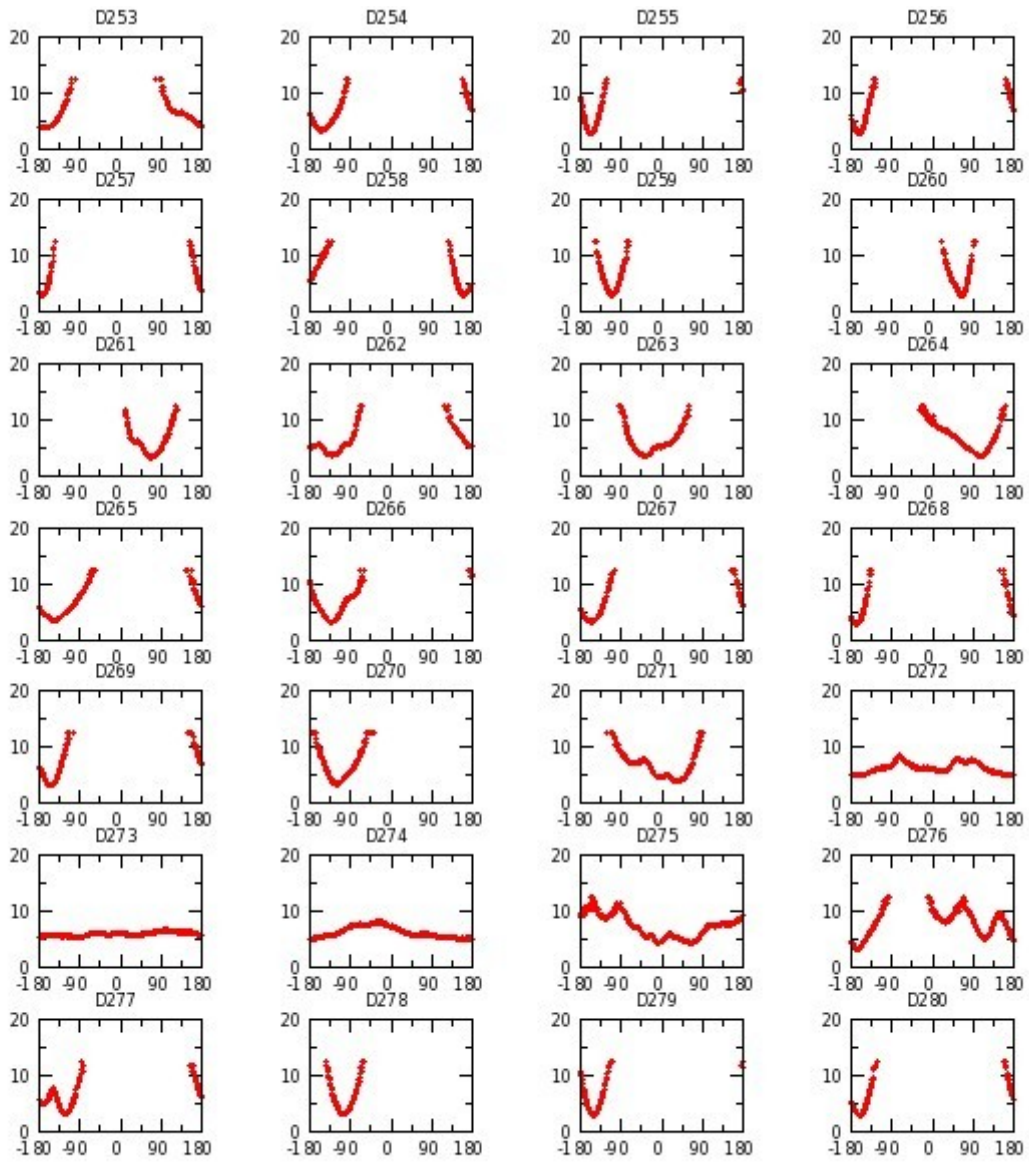


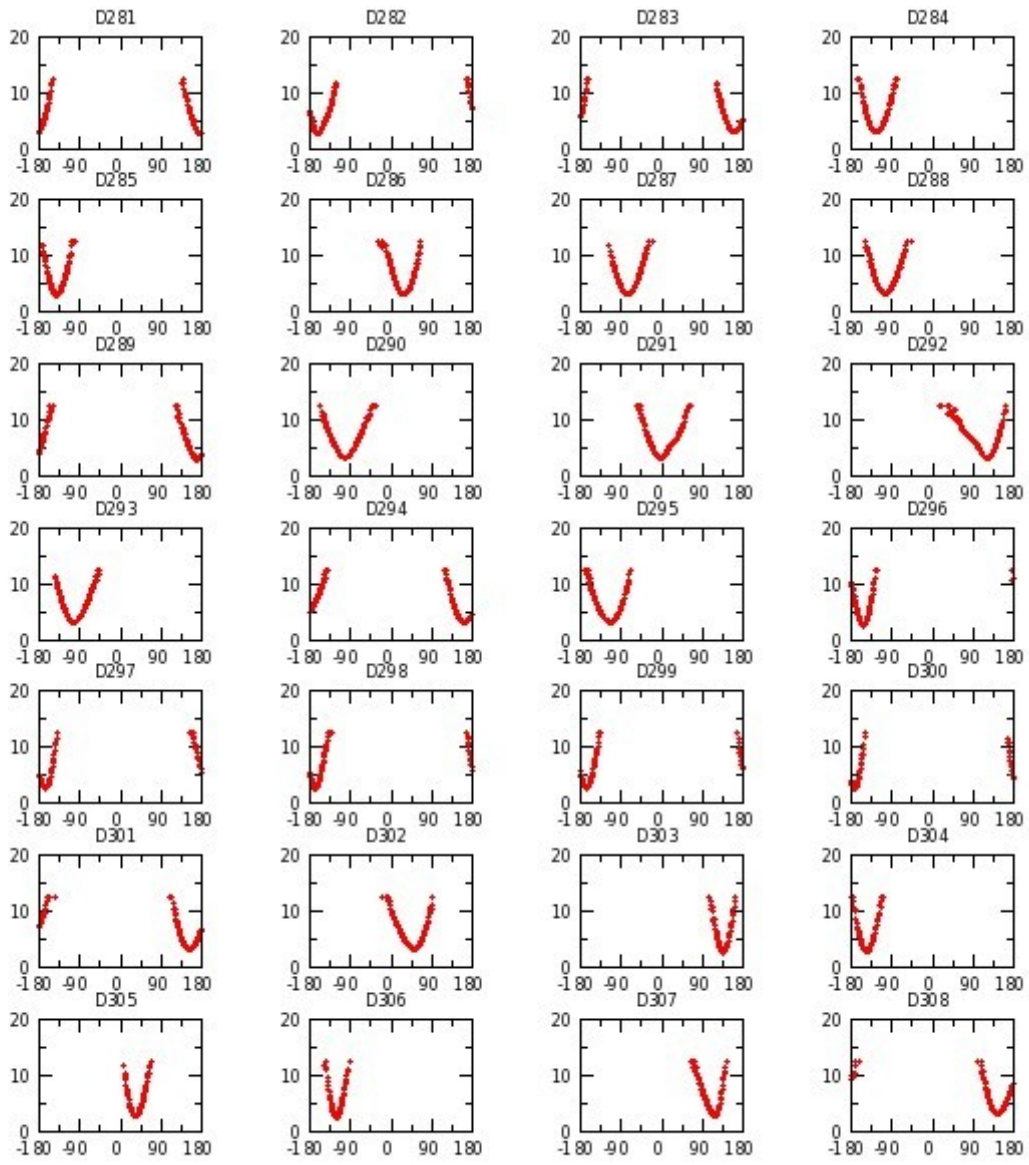


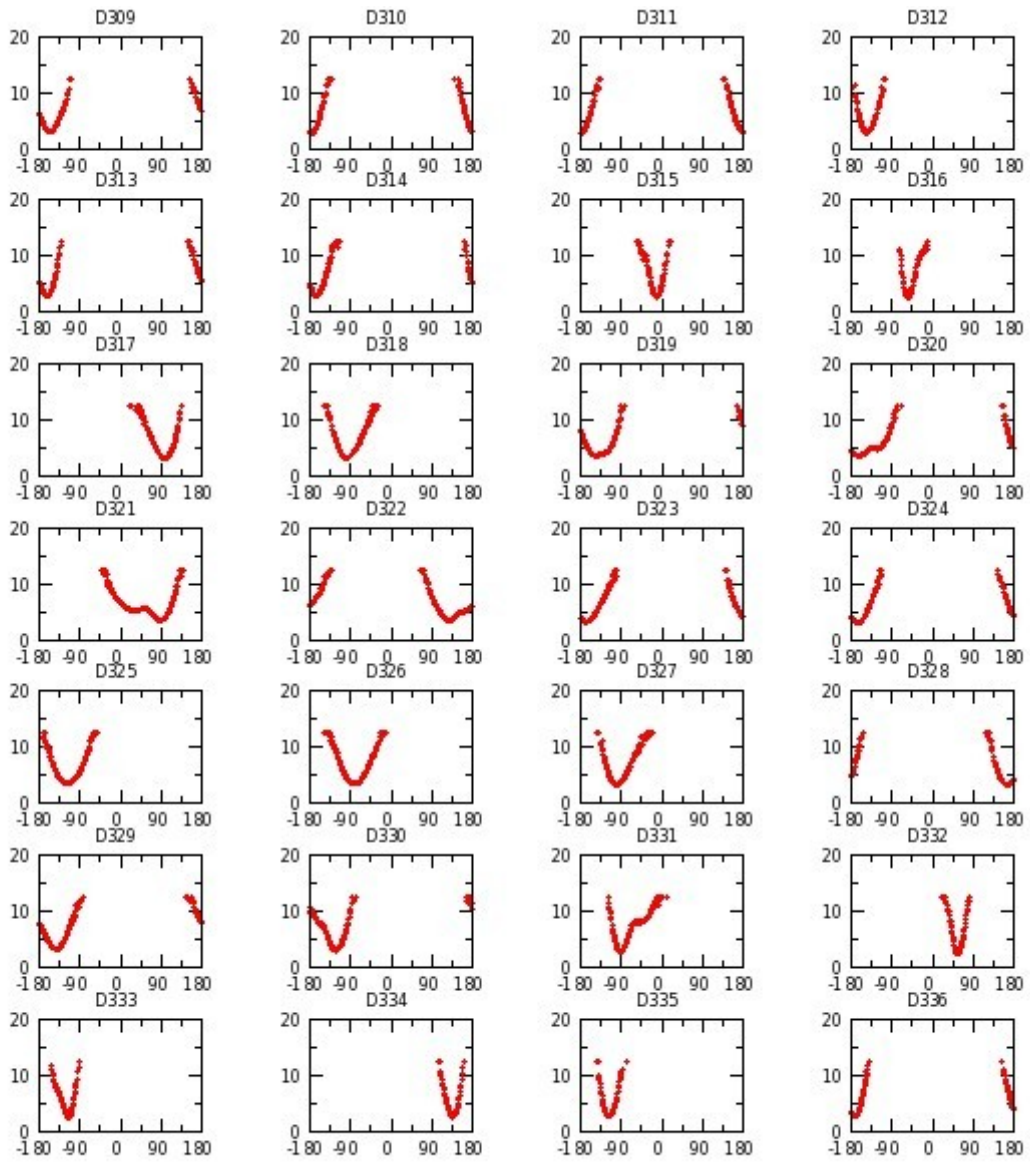


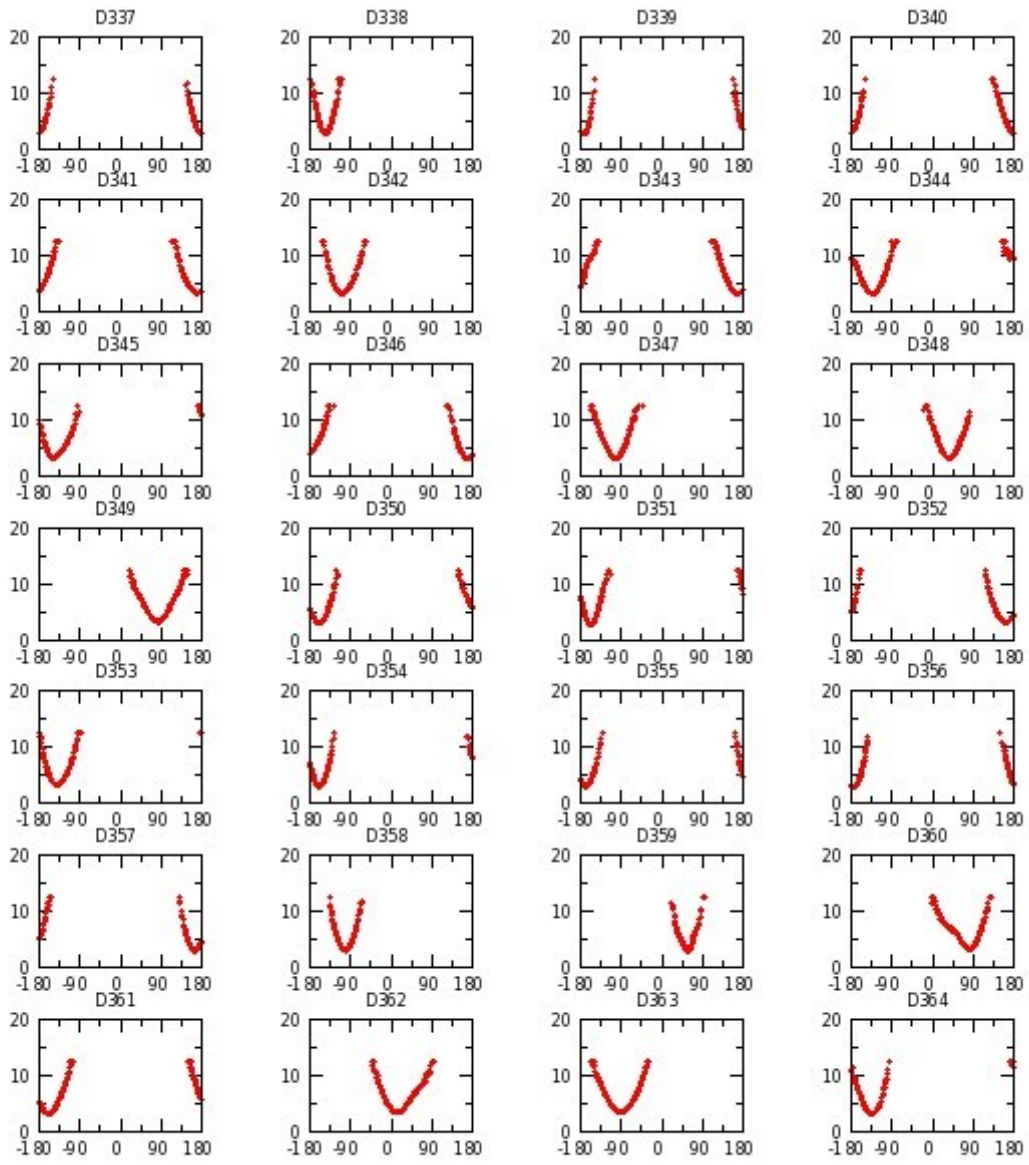


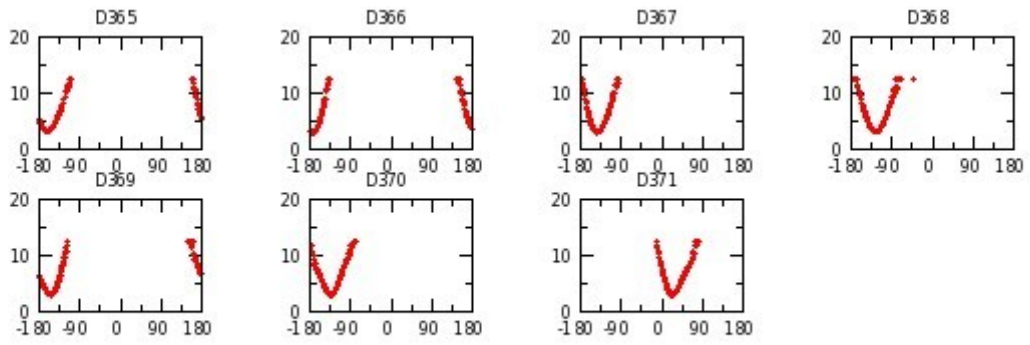




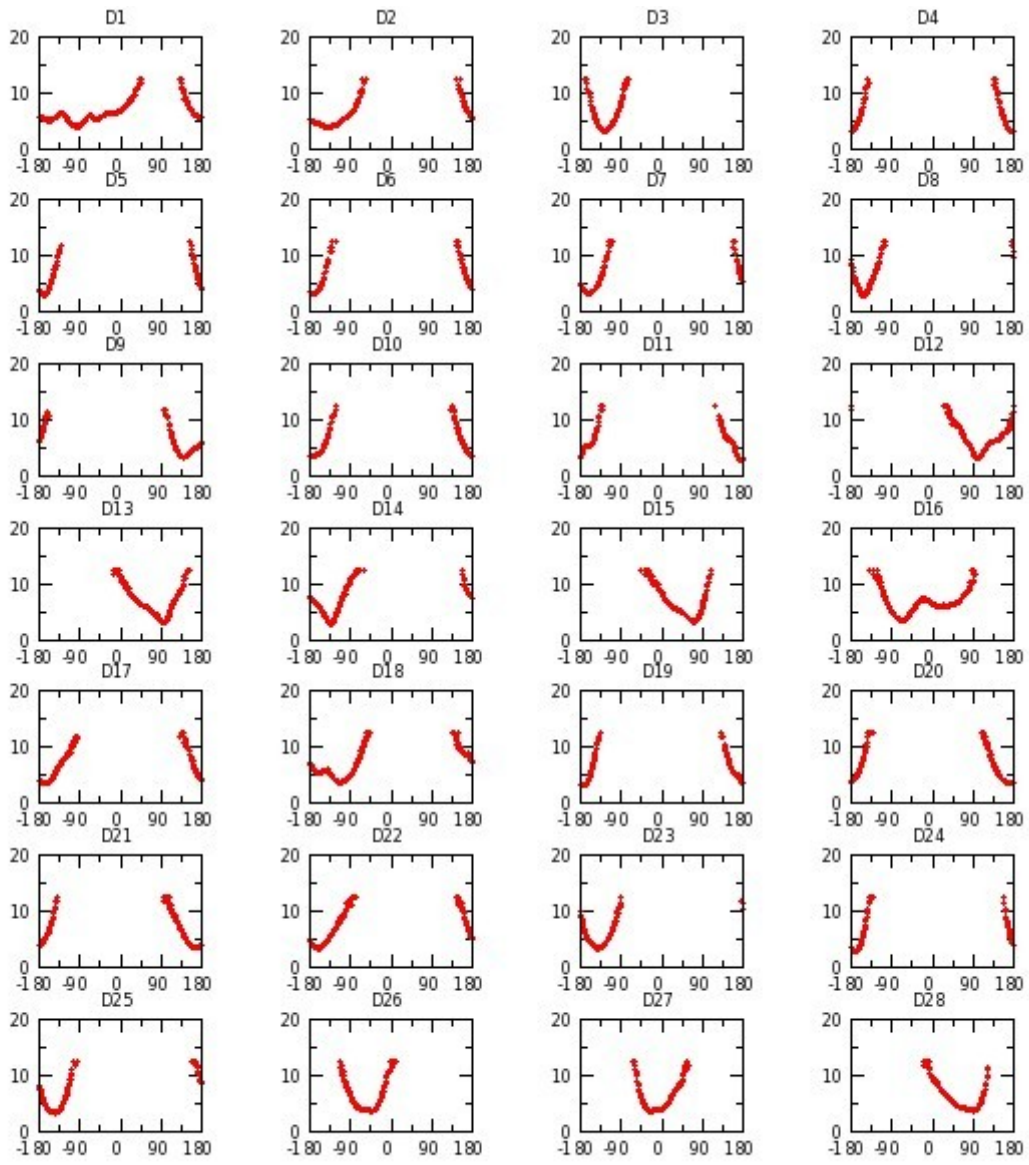


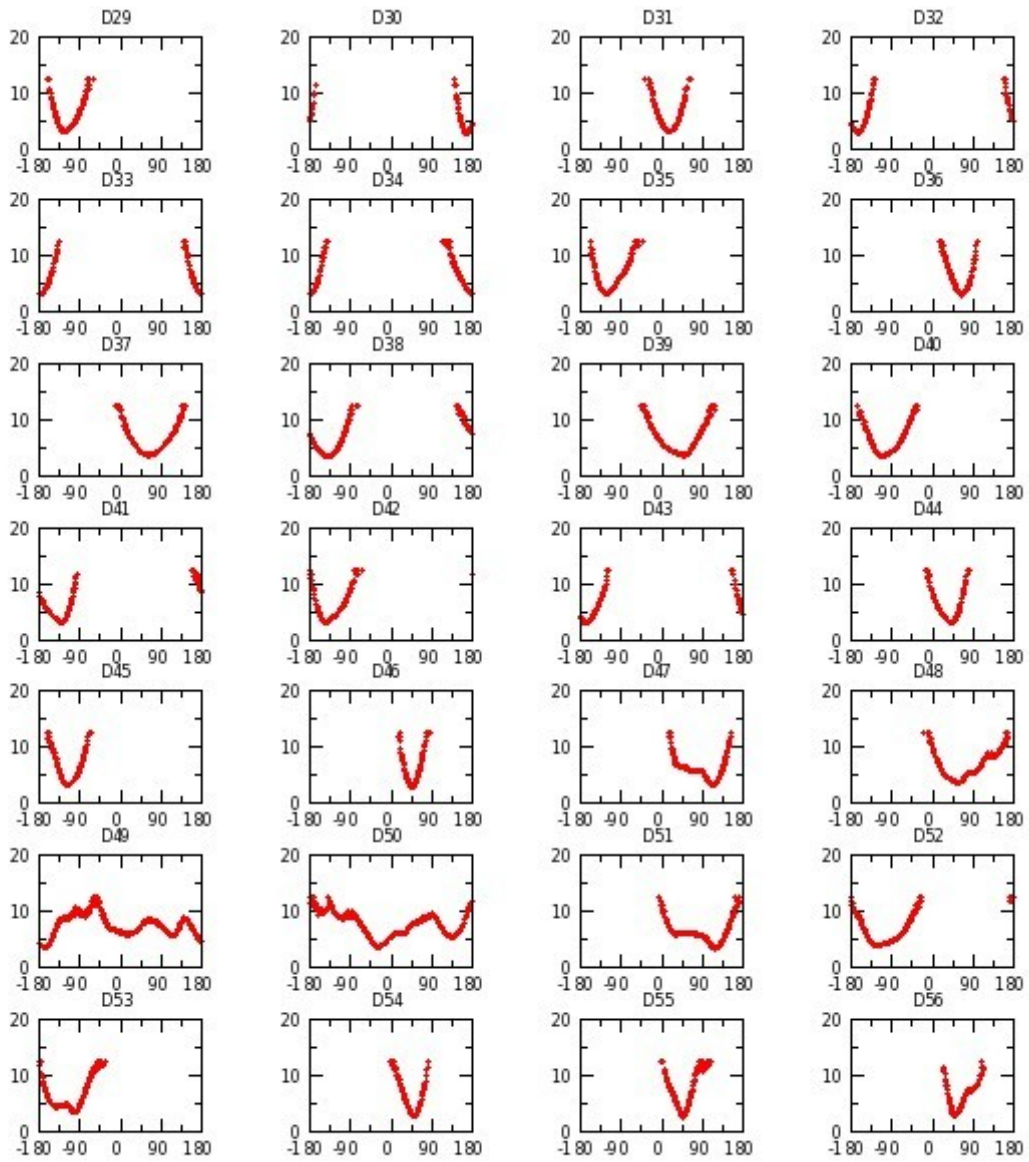


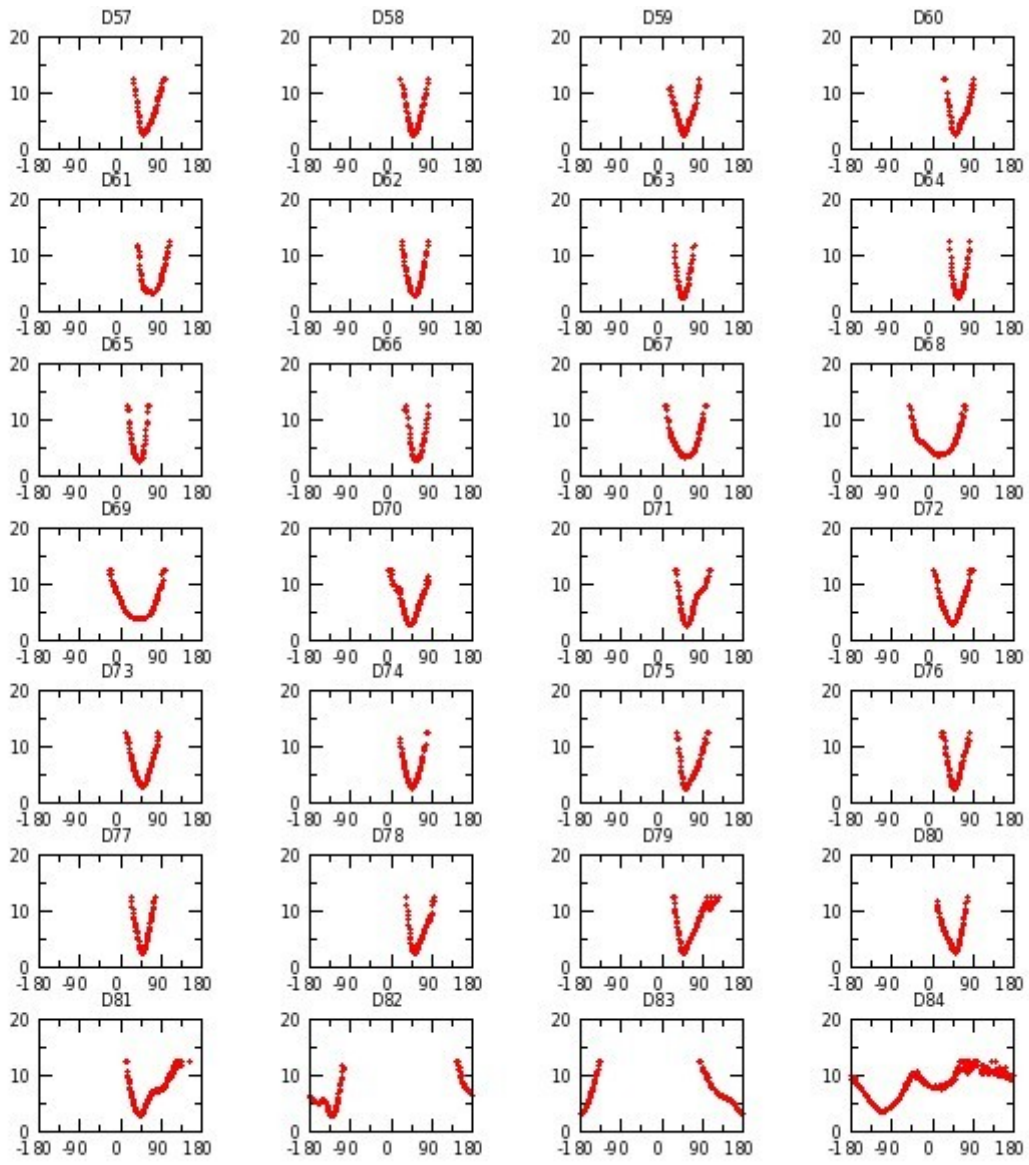


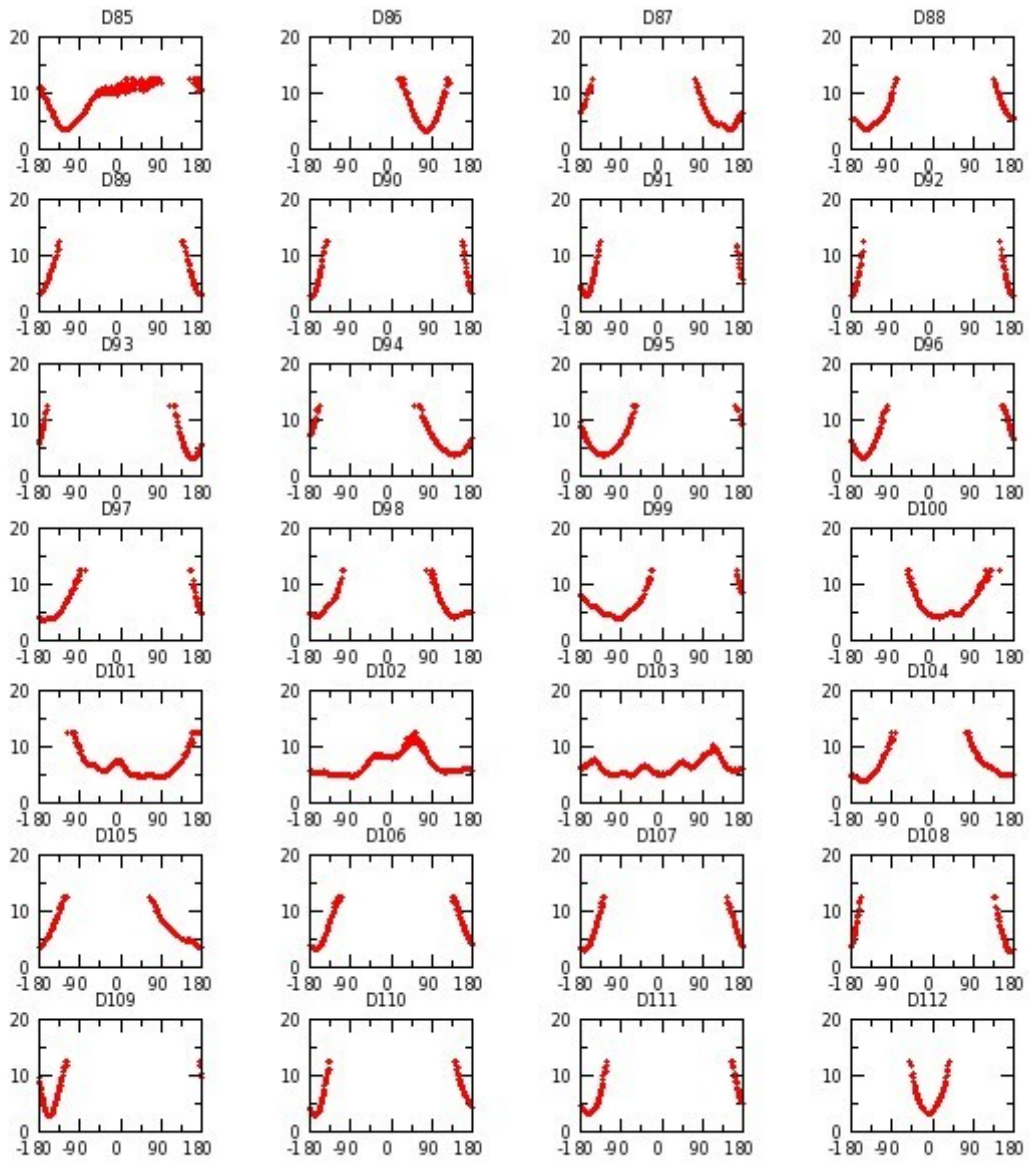


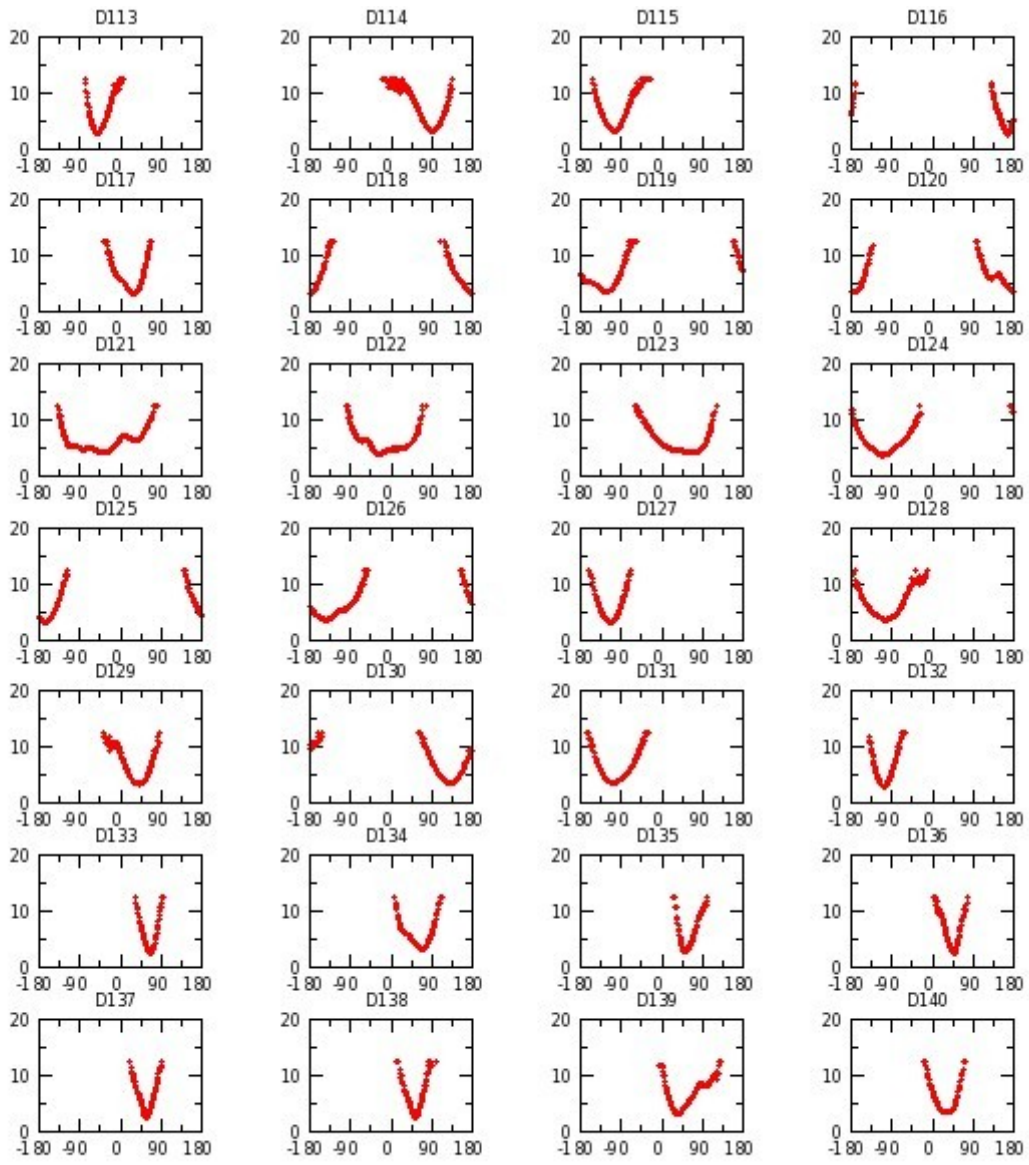
Annexe G 3 : H_7DW réplique III

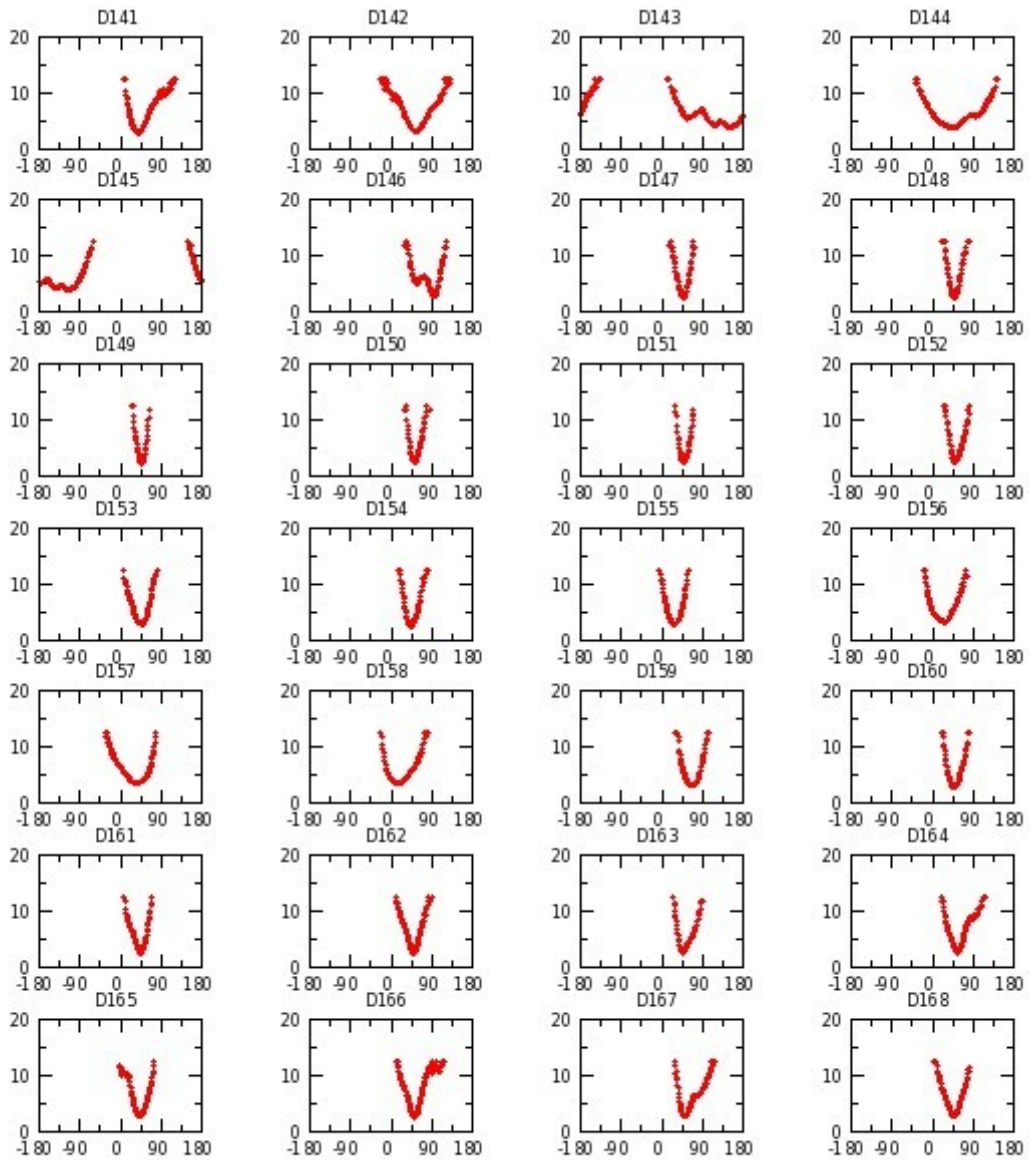


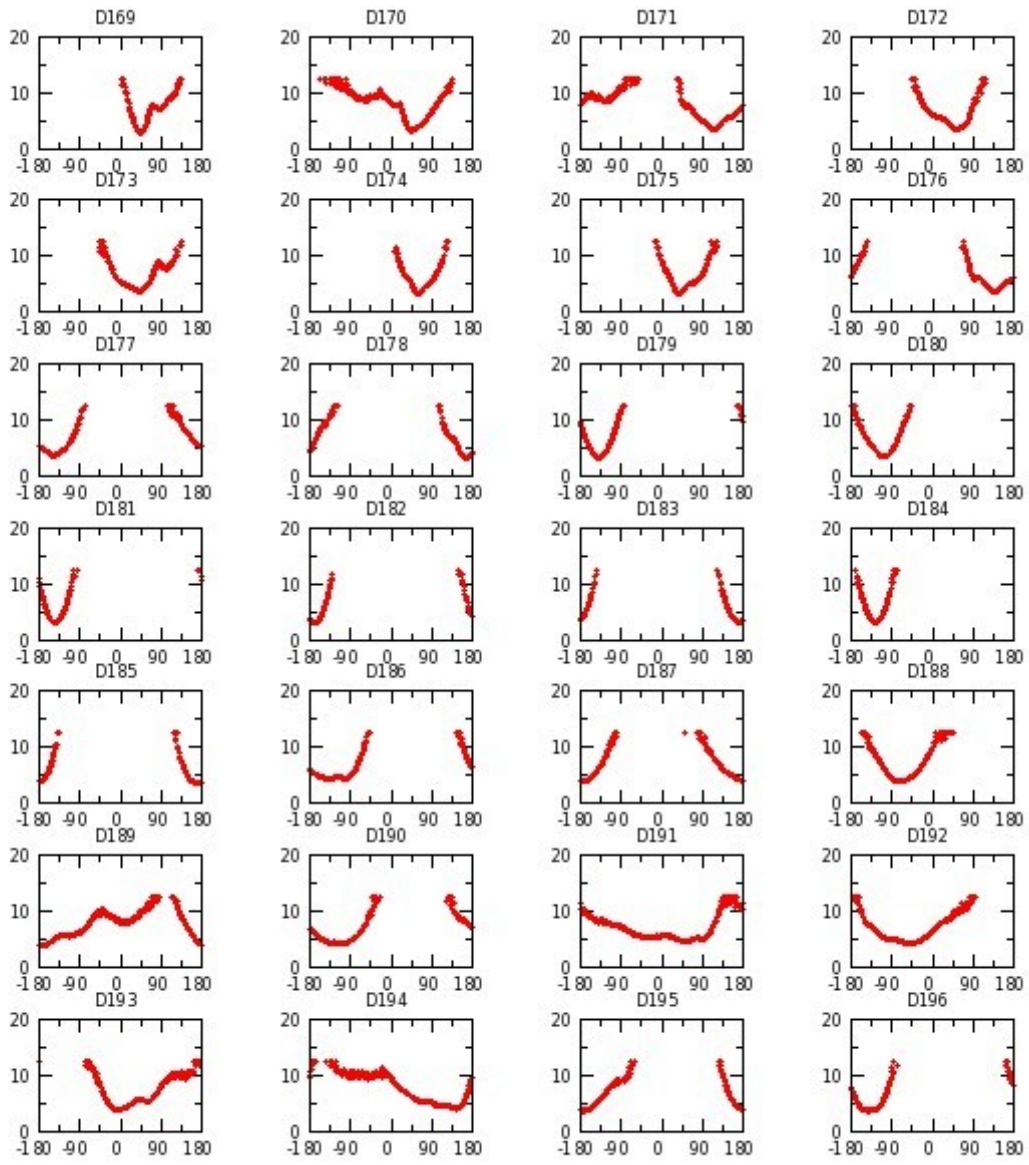


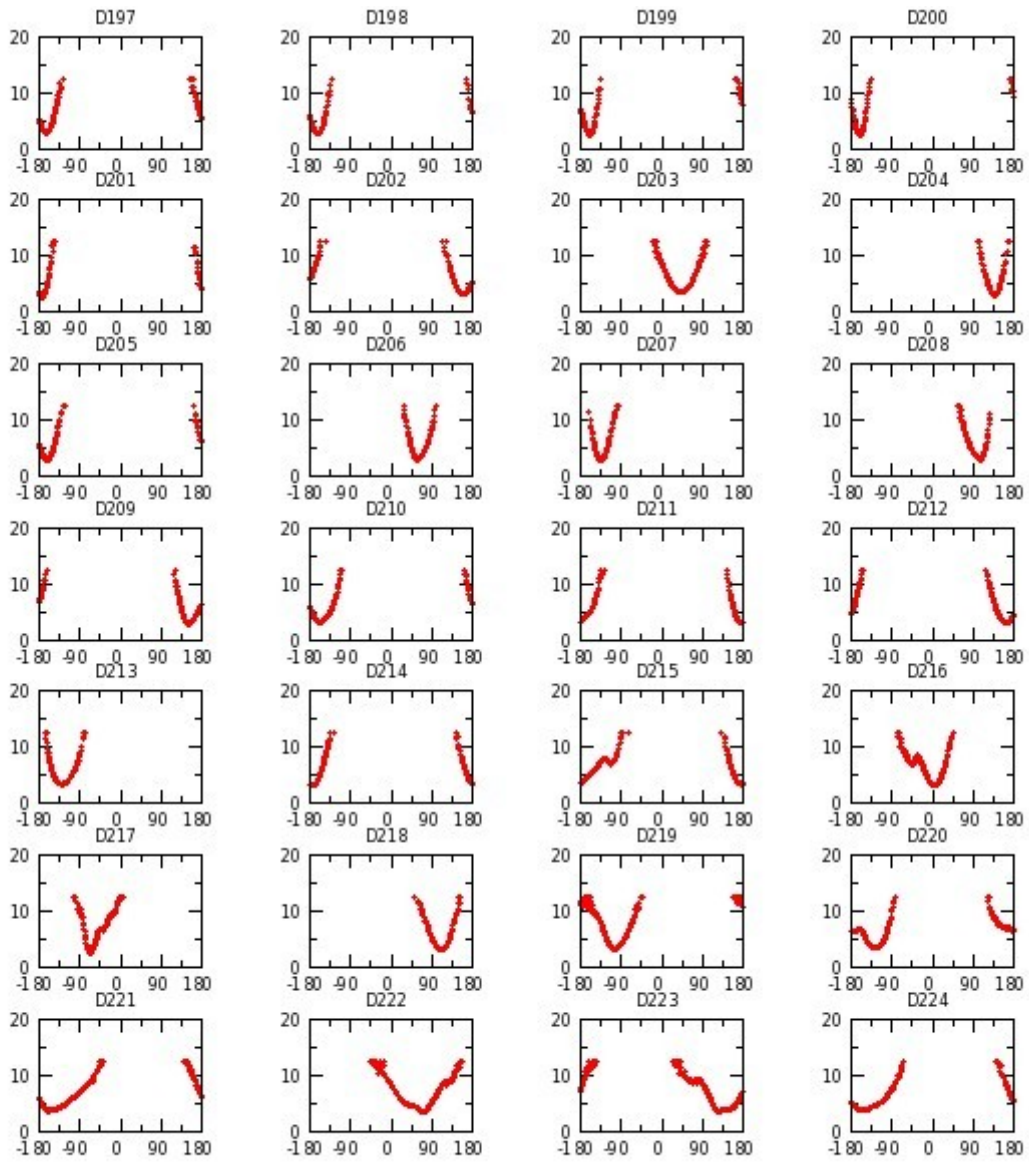


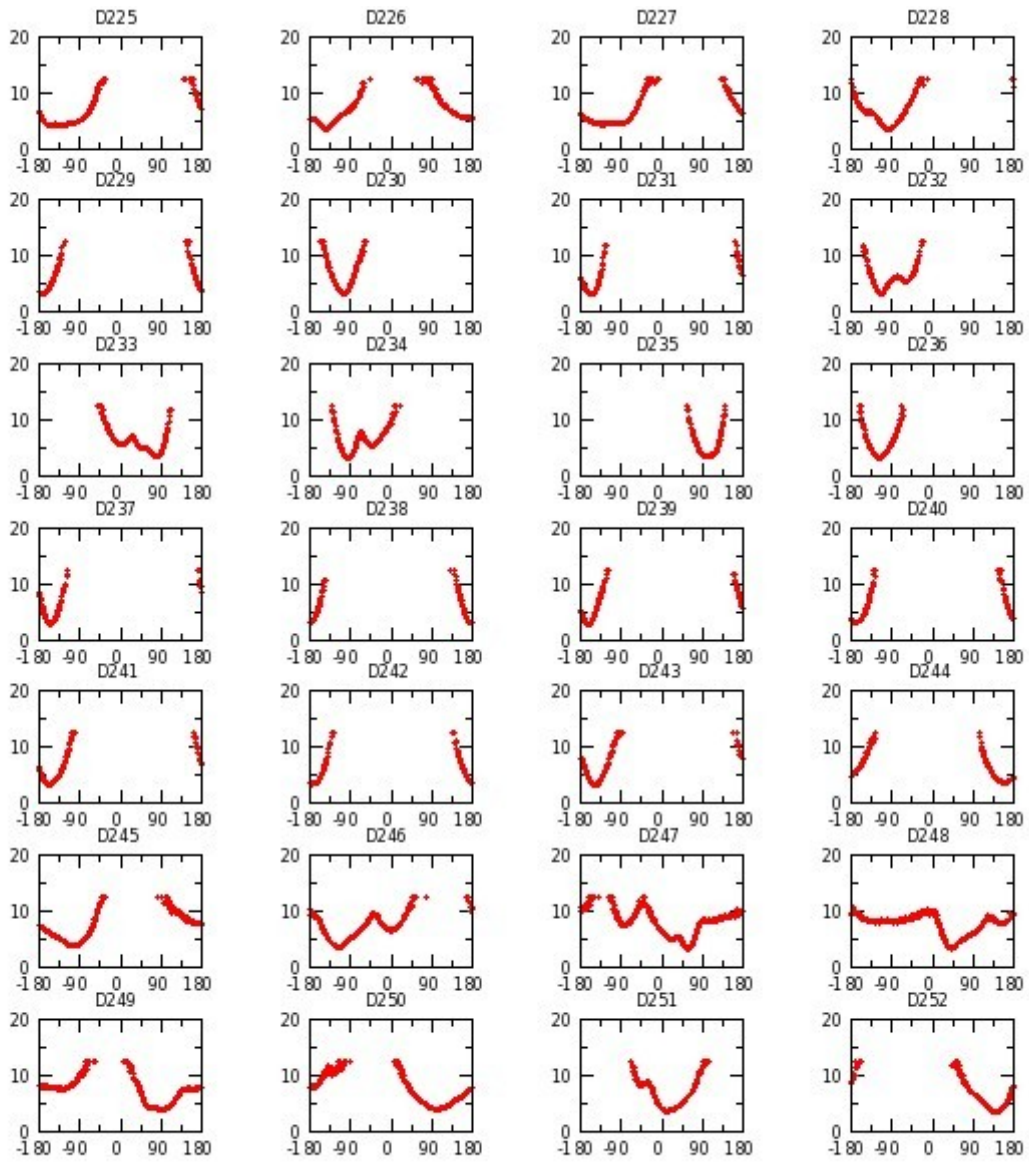


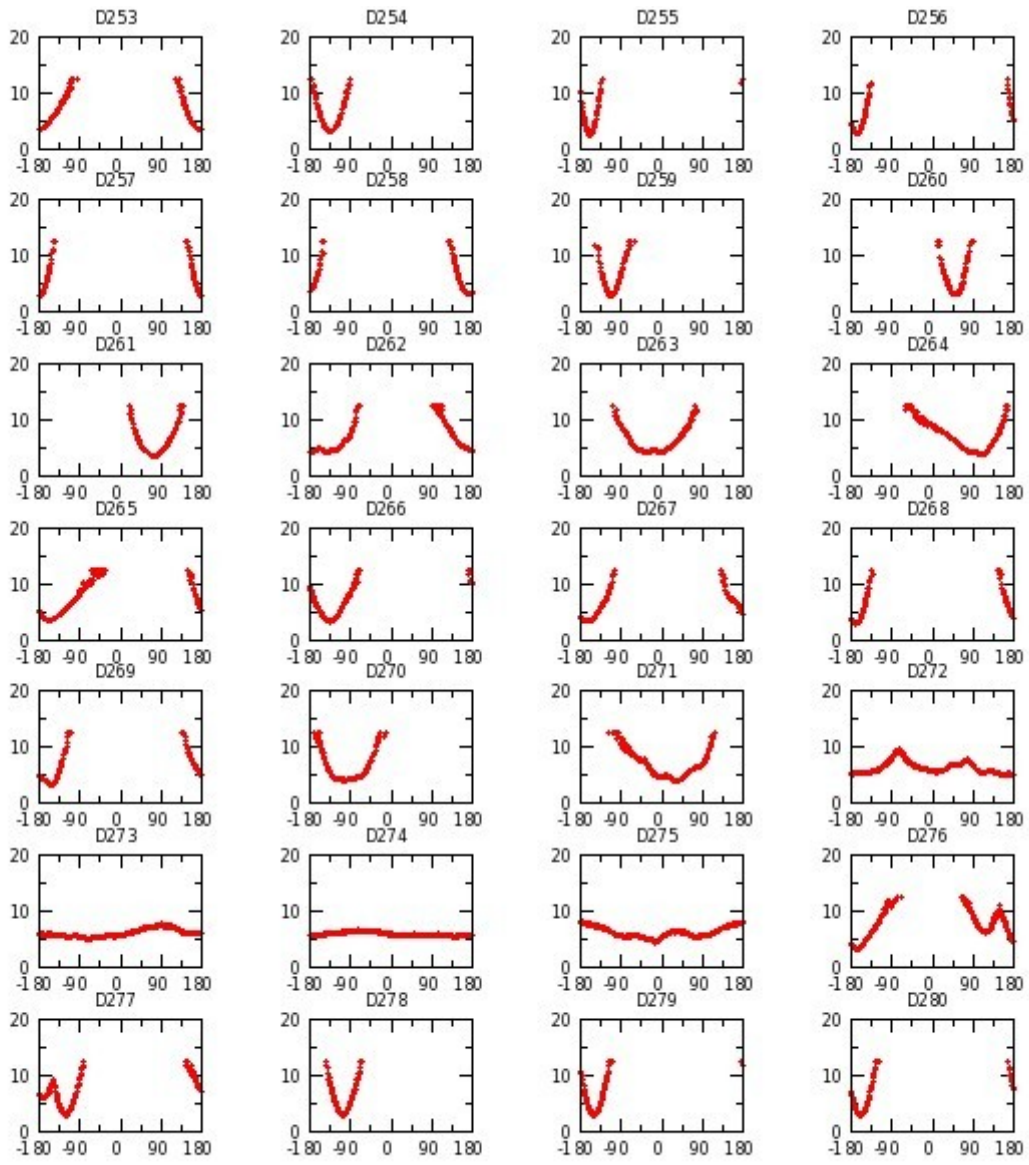


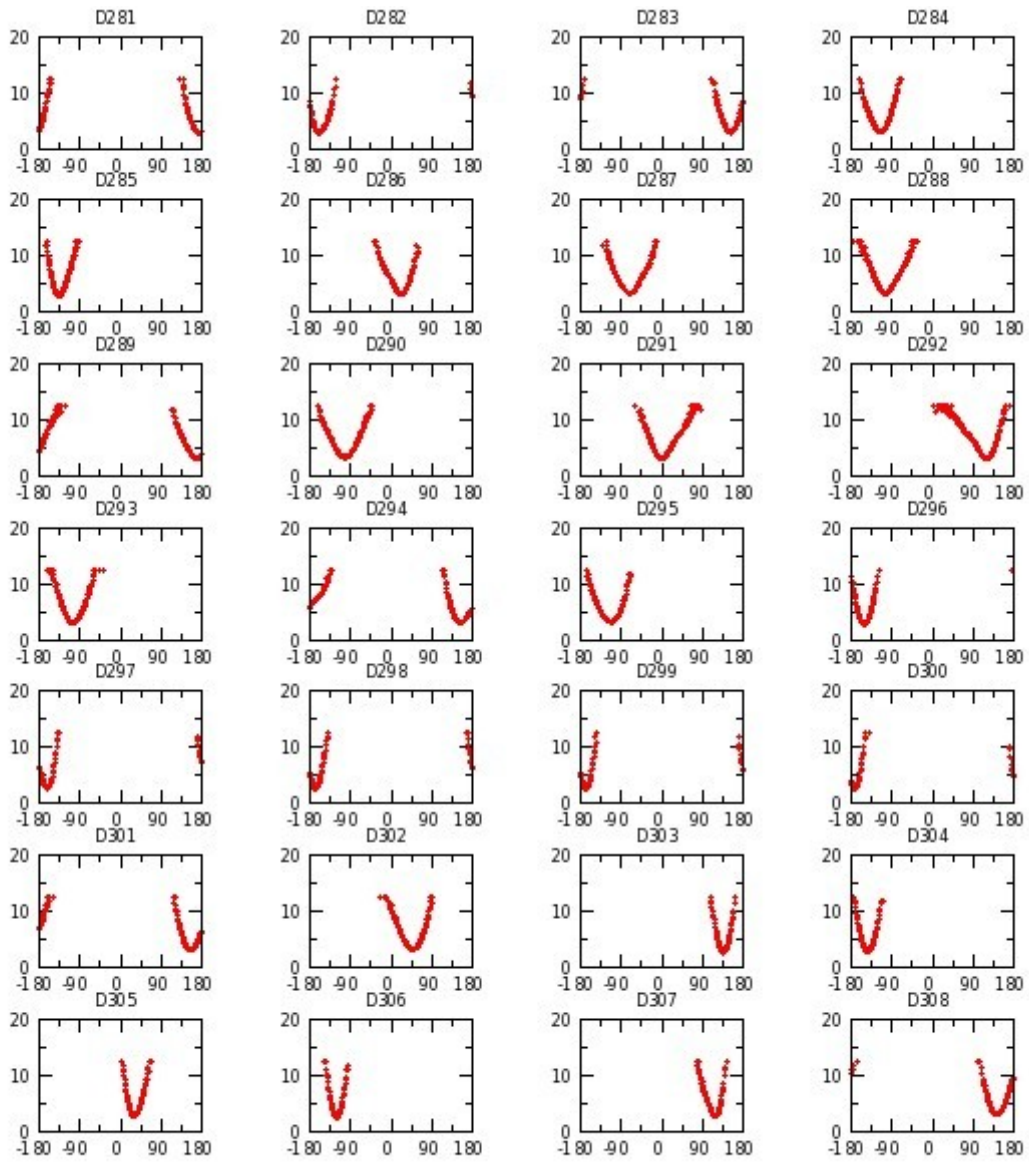


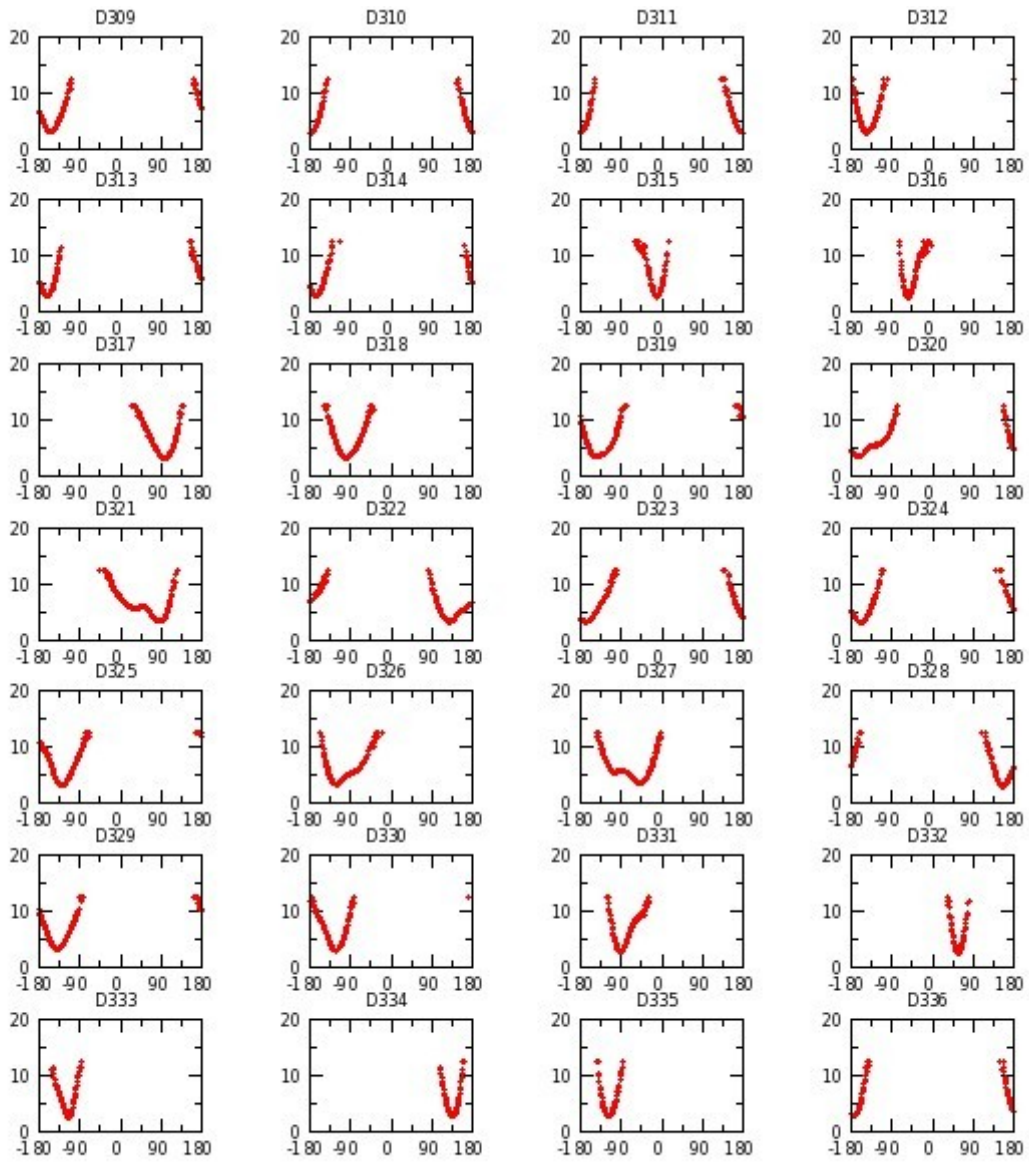


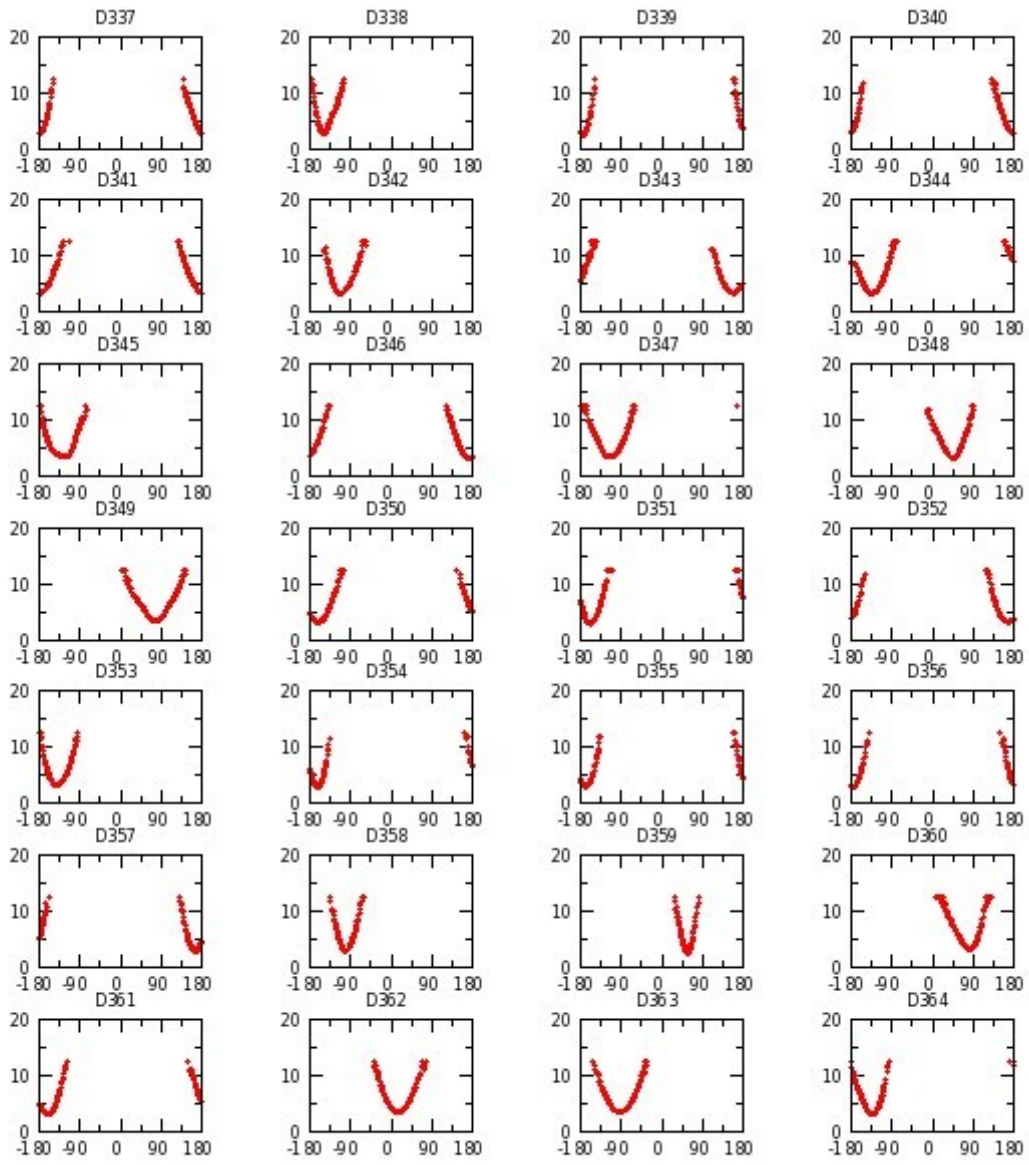


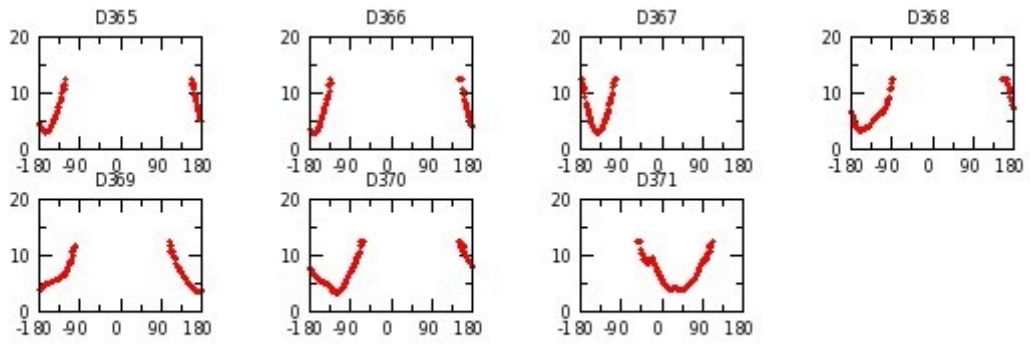




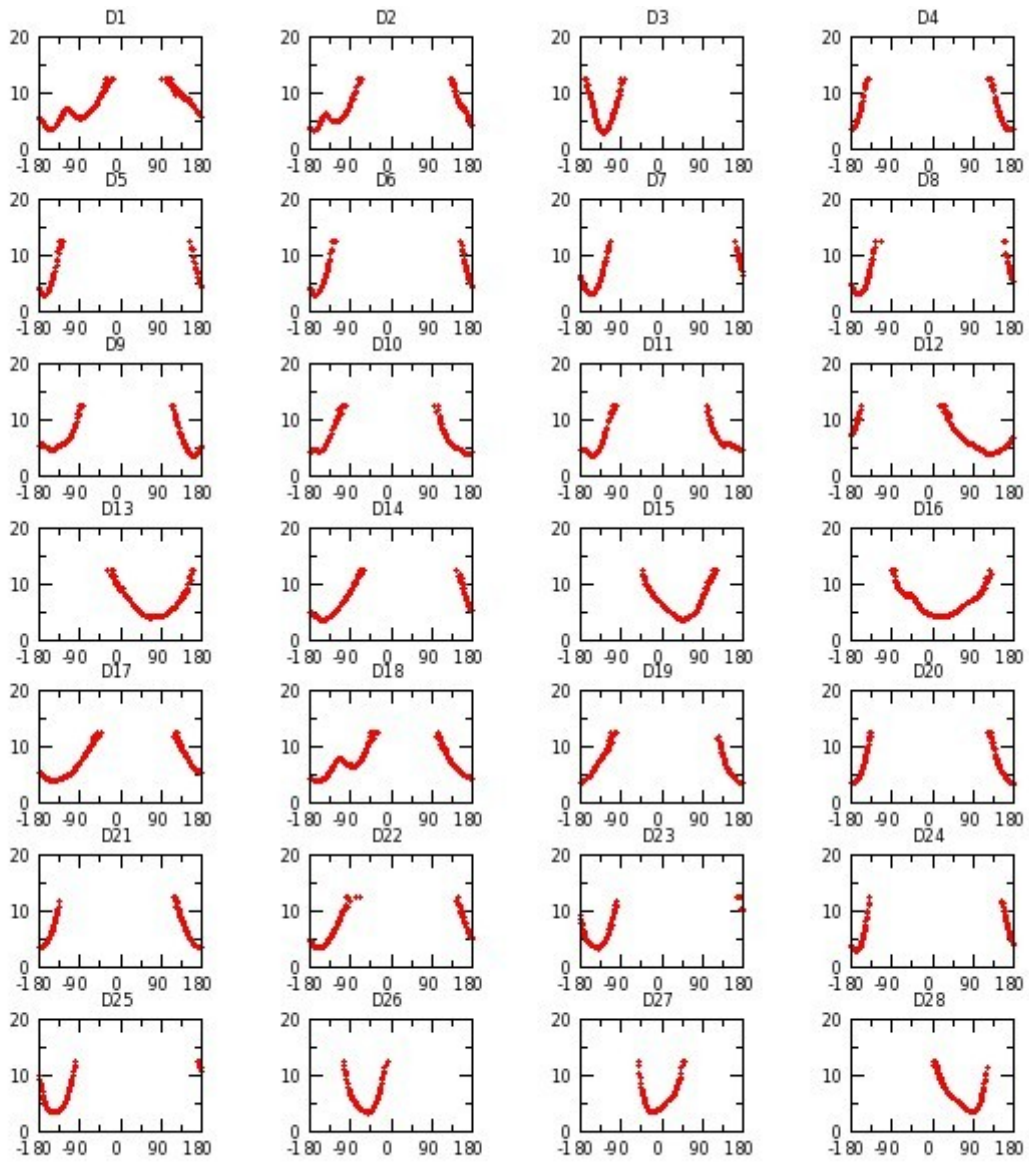


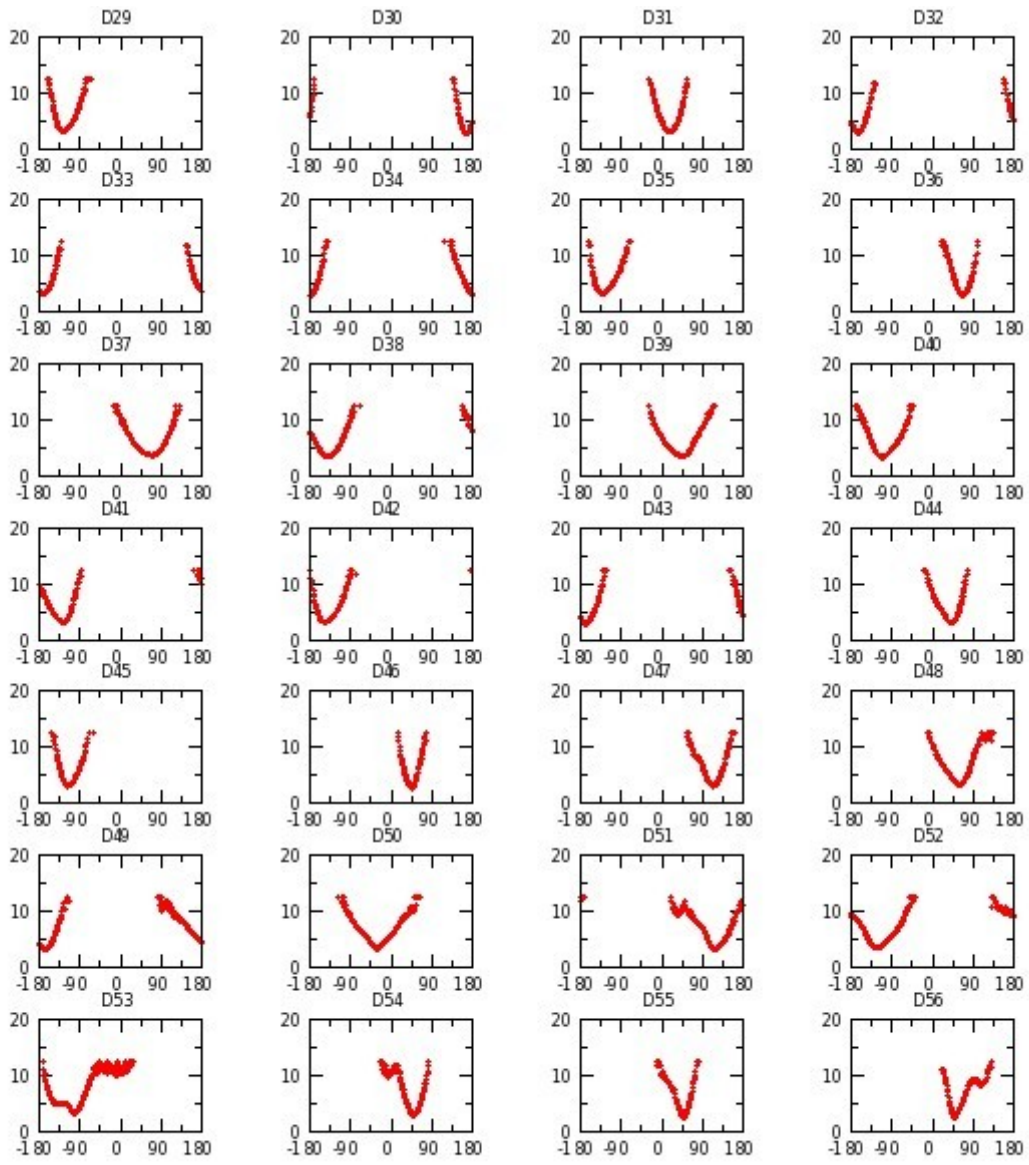


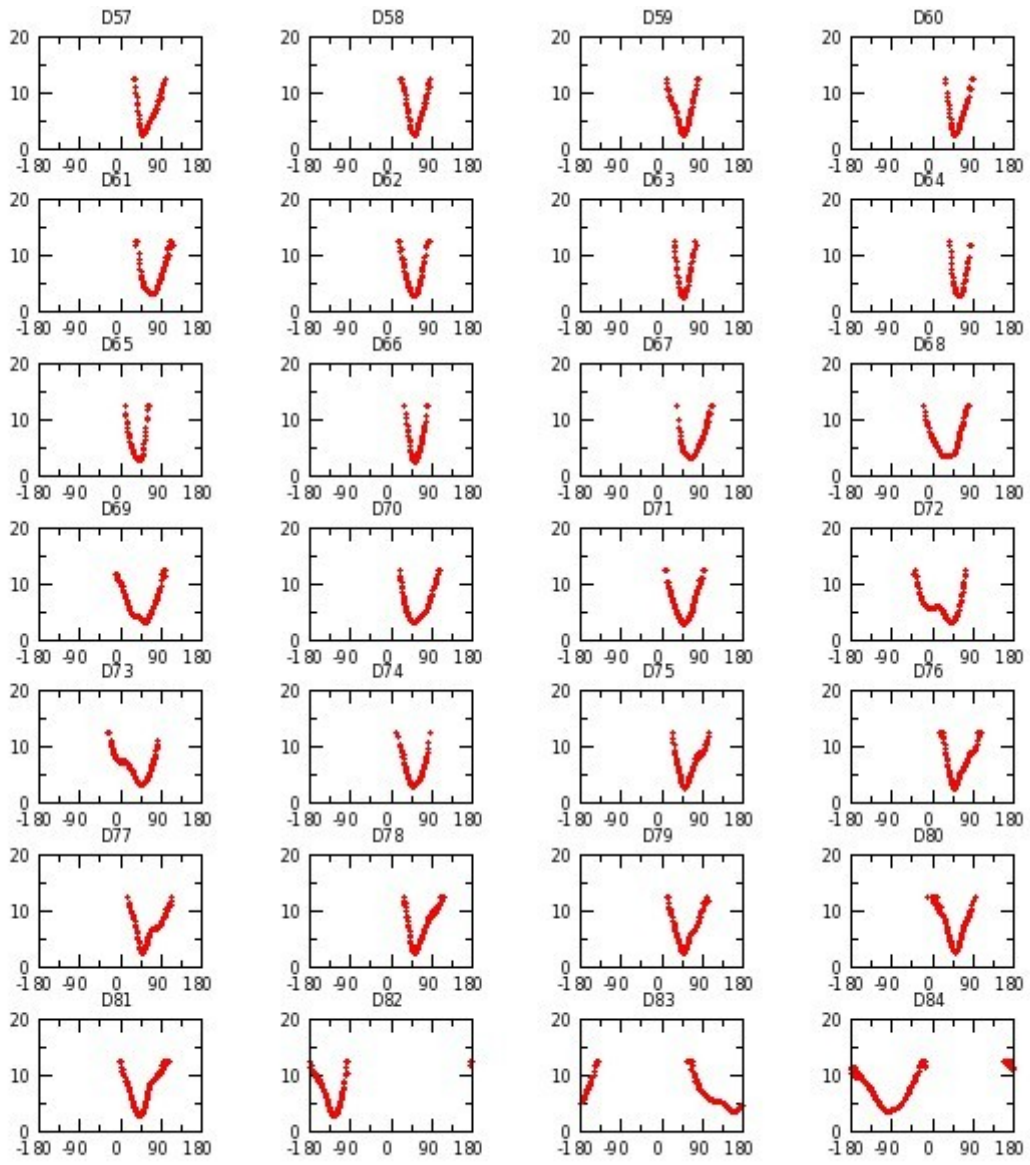


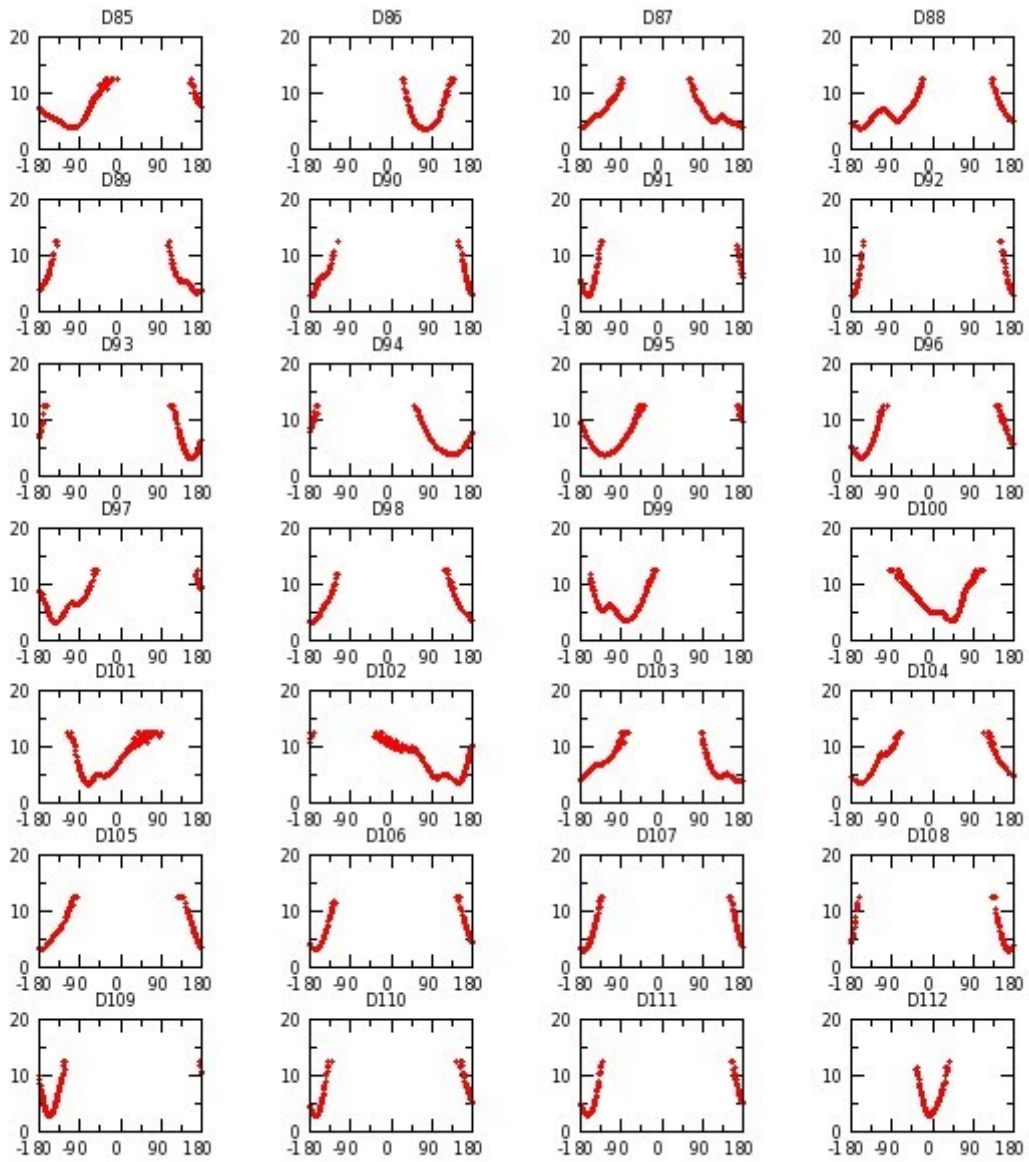


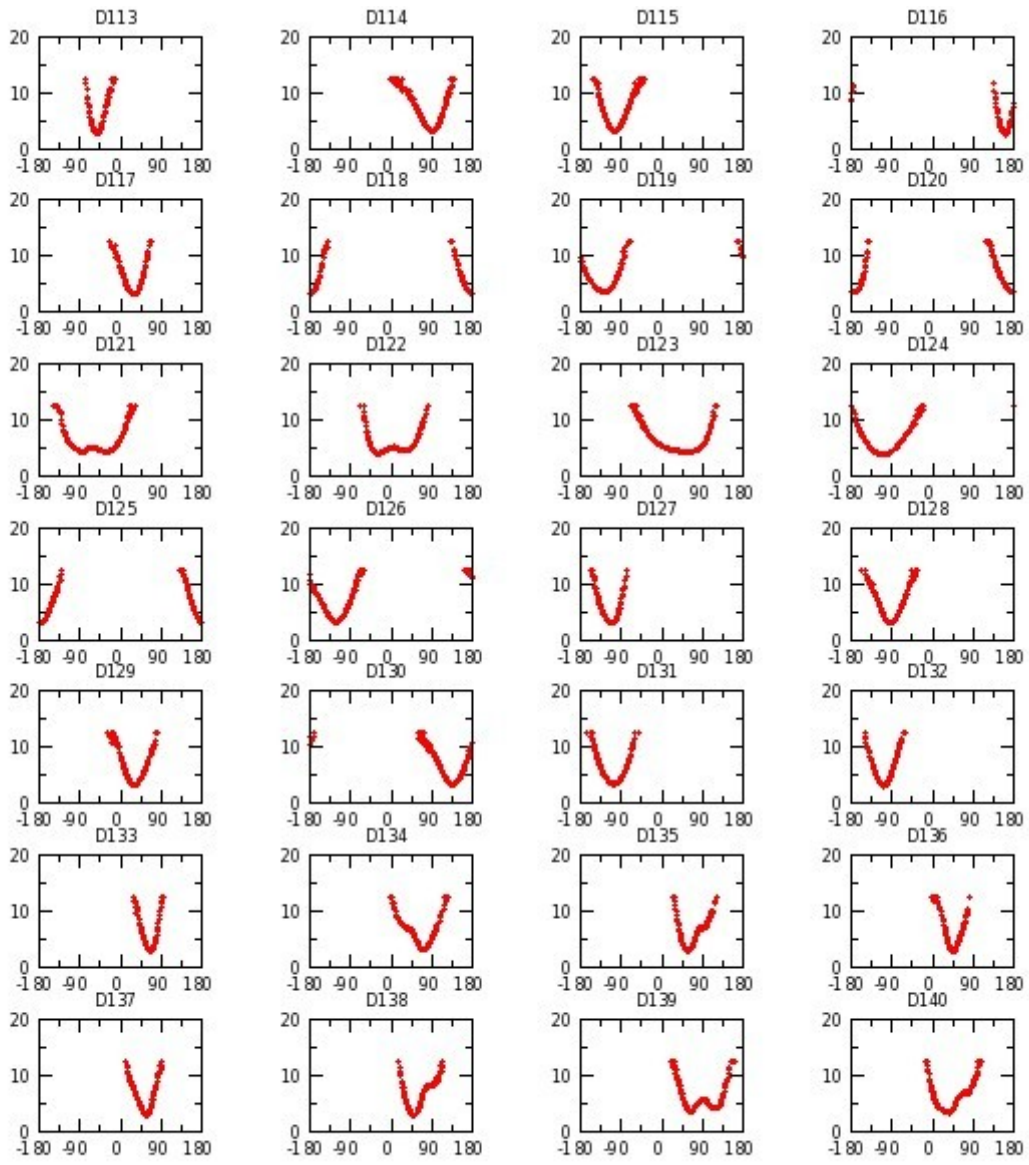
Annexe G 4 : H_aGAL réplique I

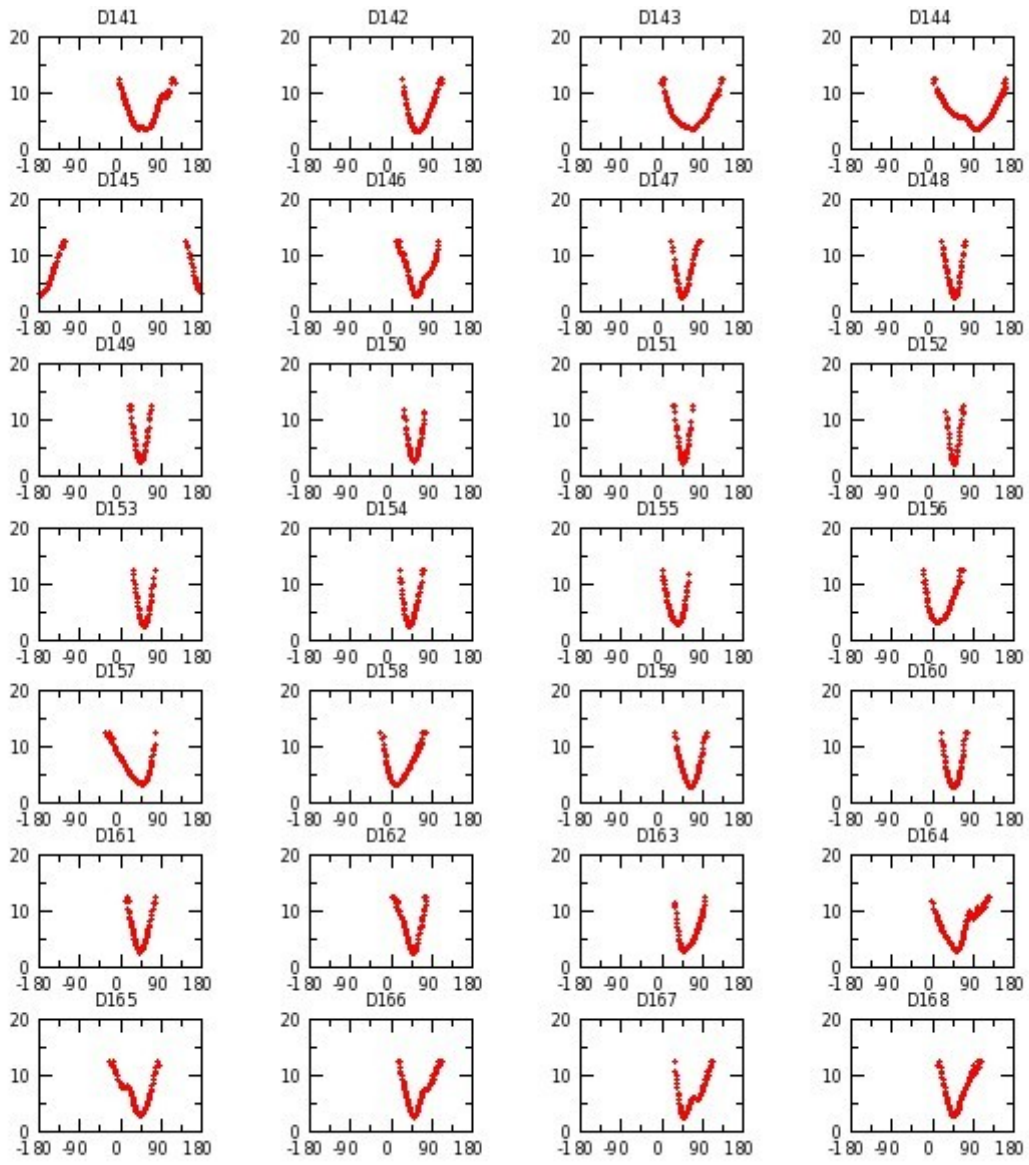


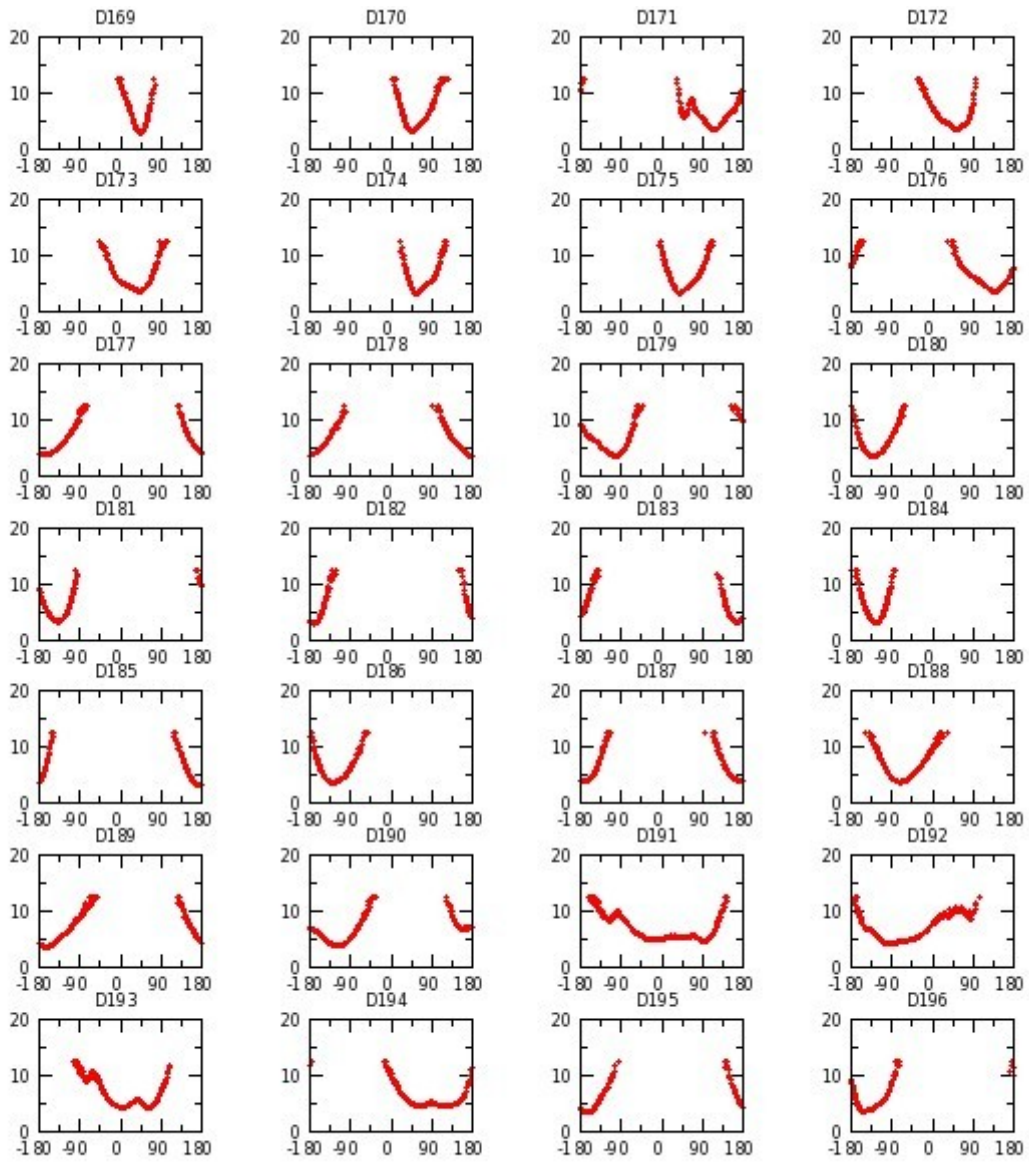


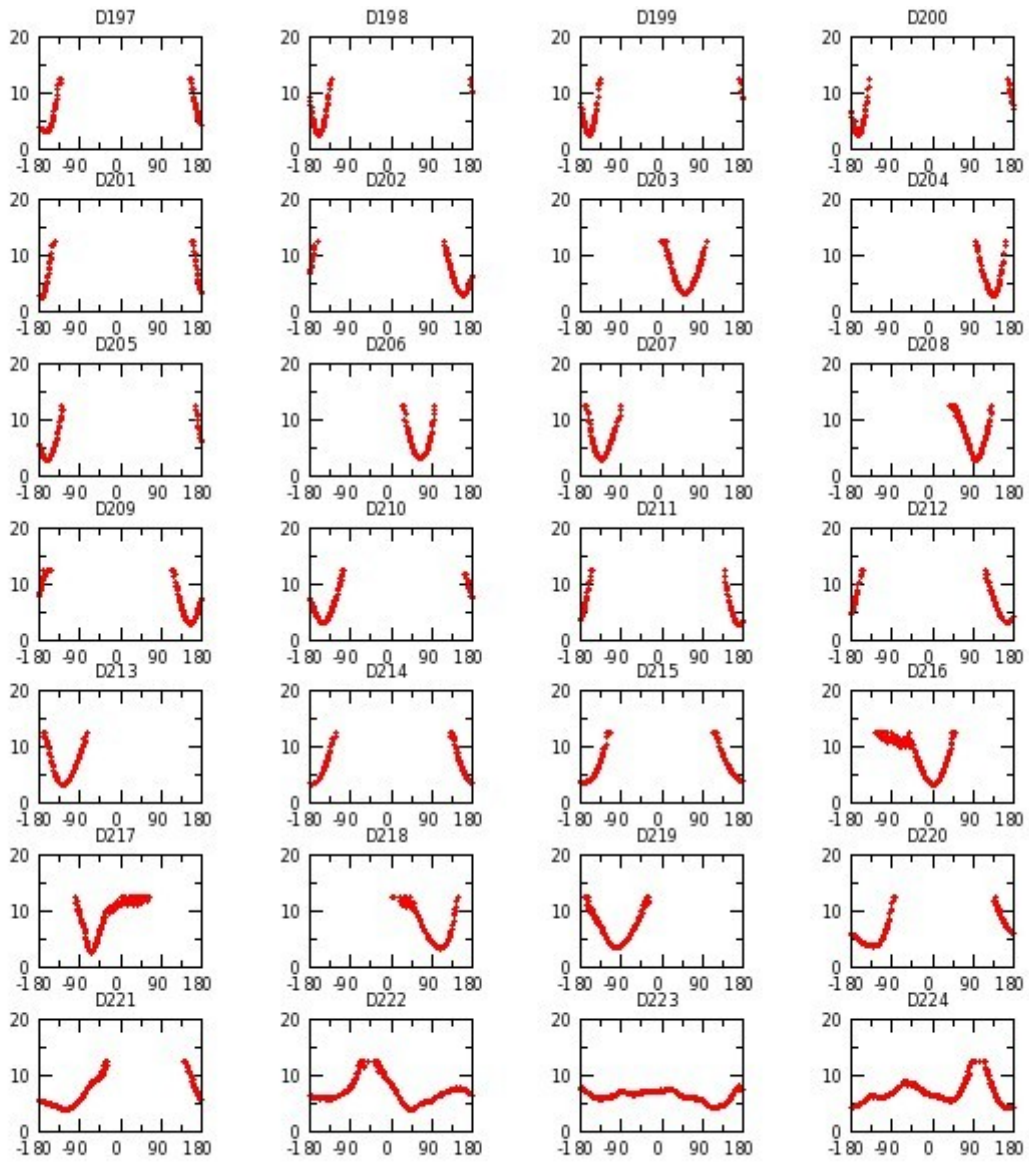


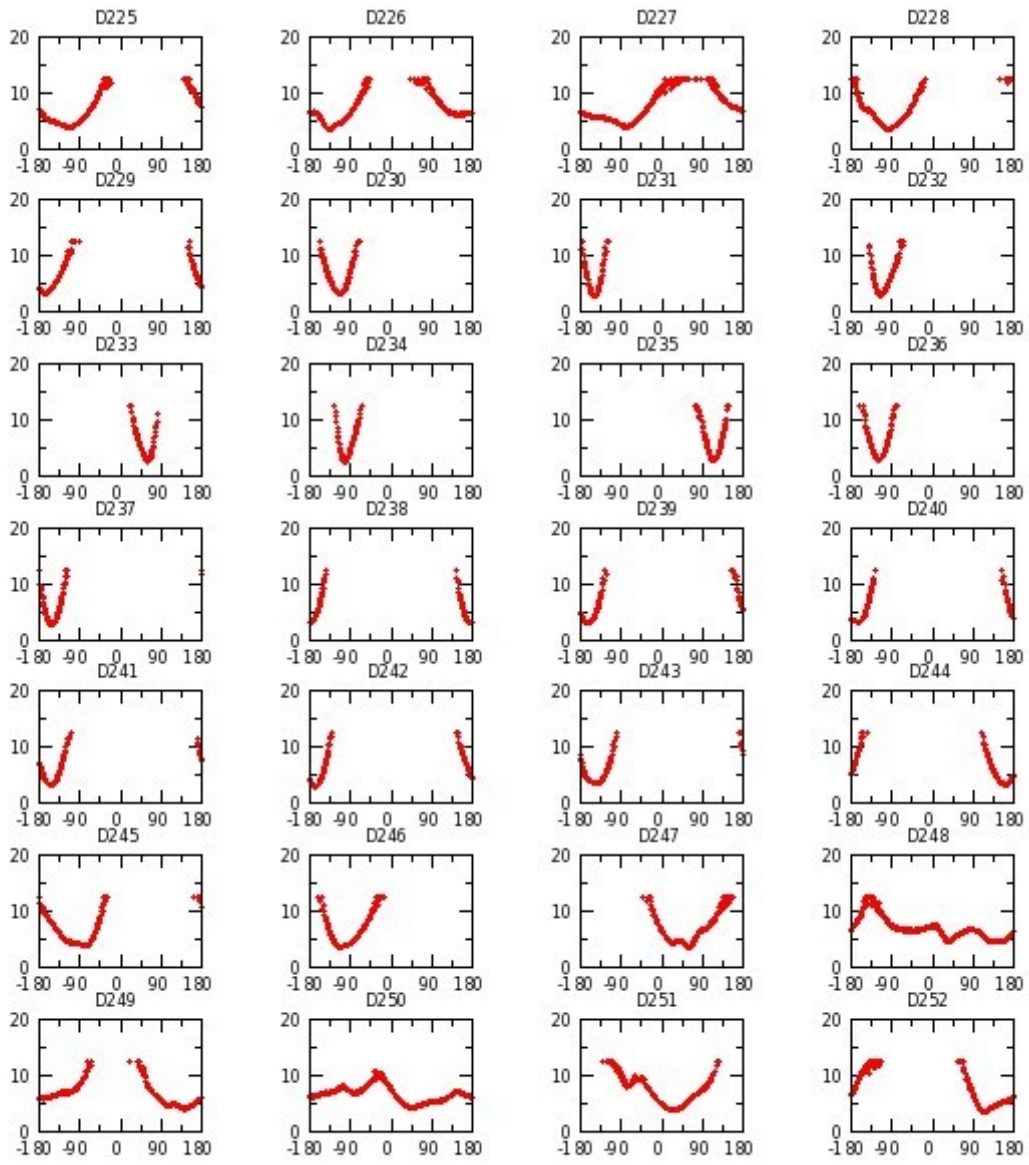


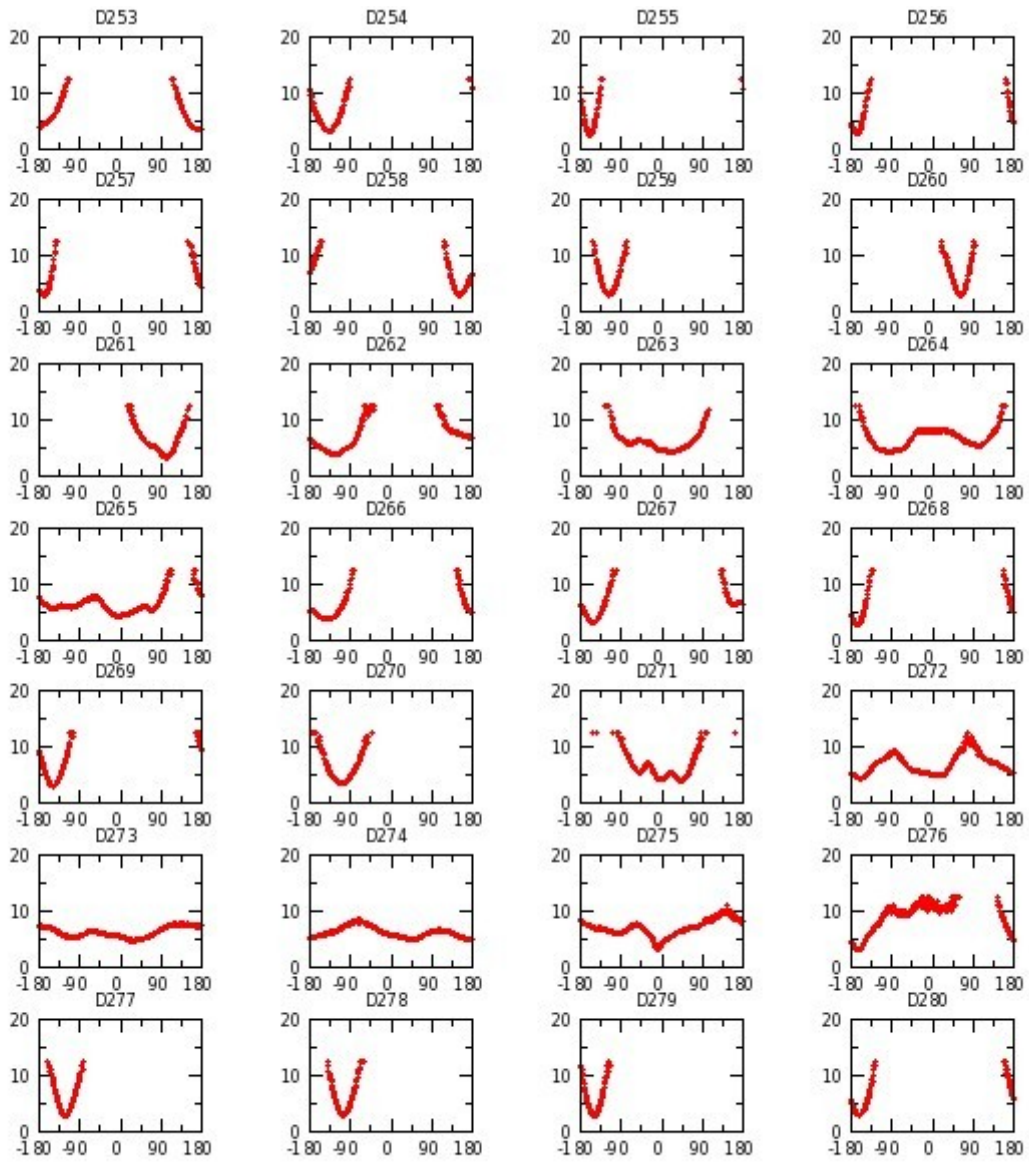


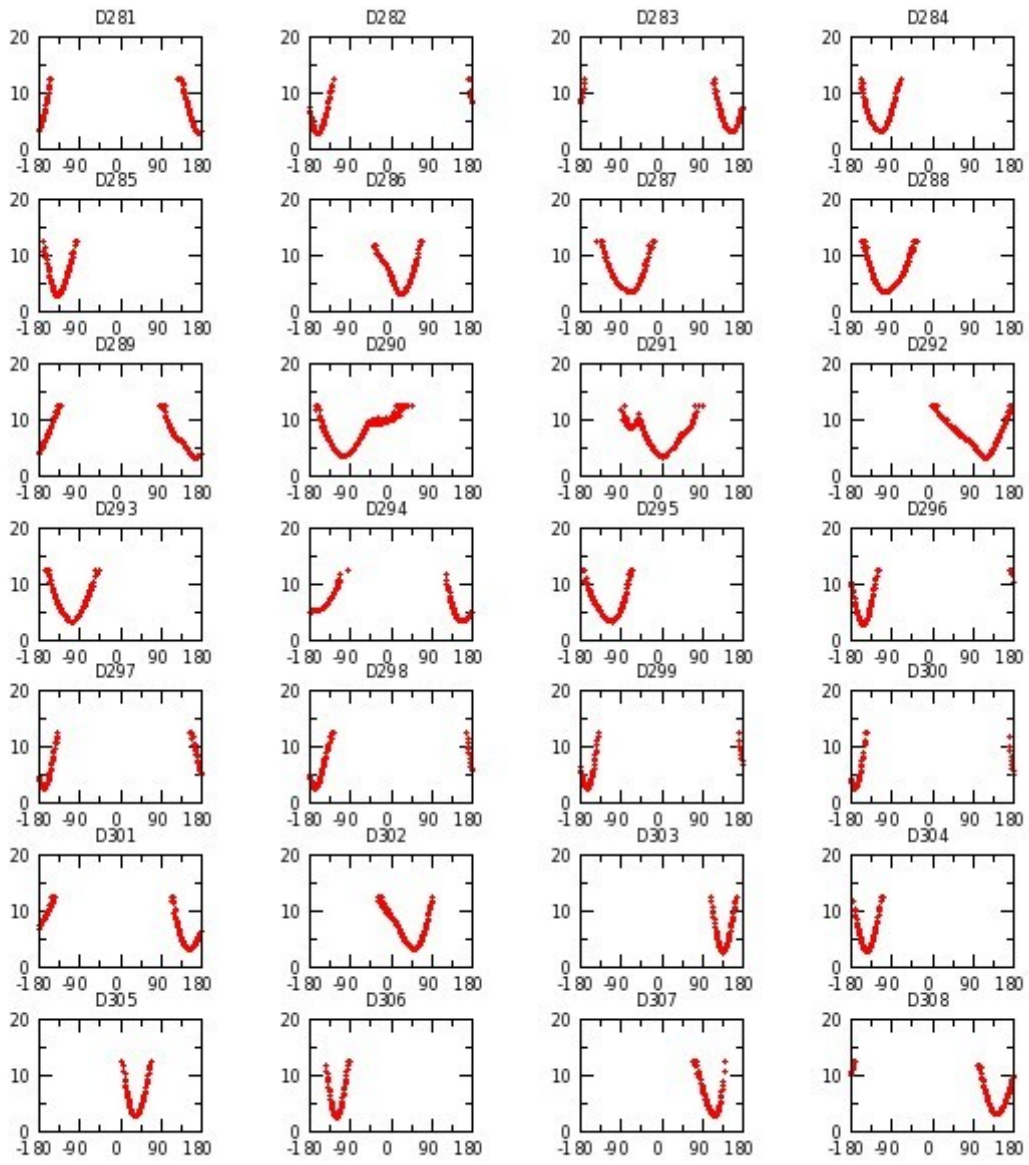


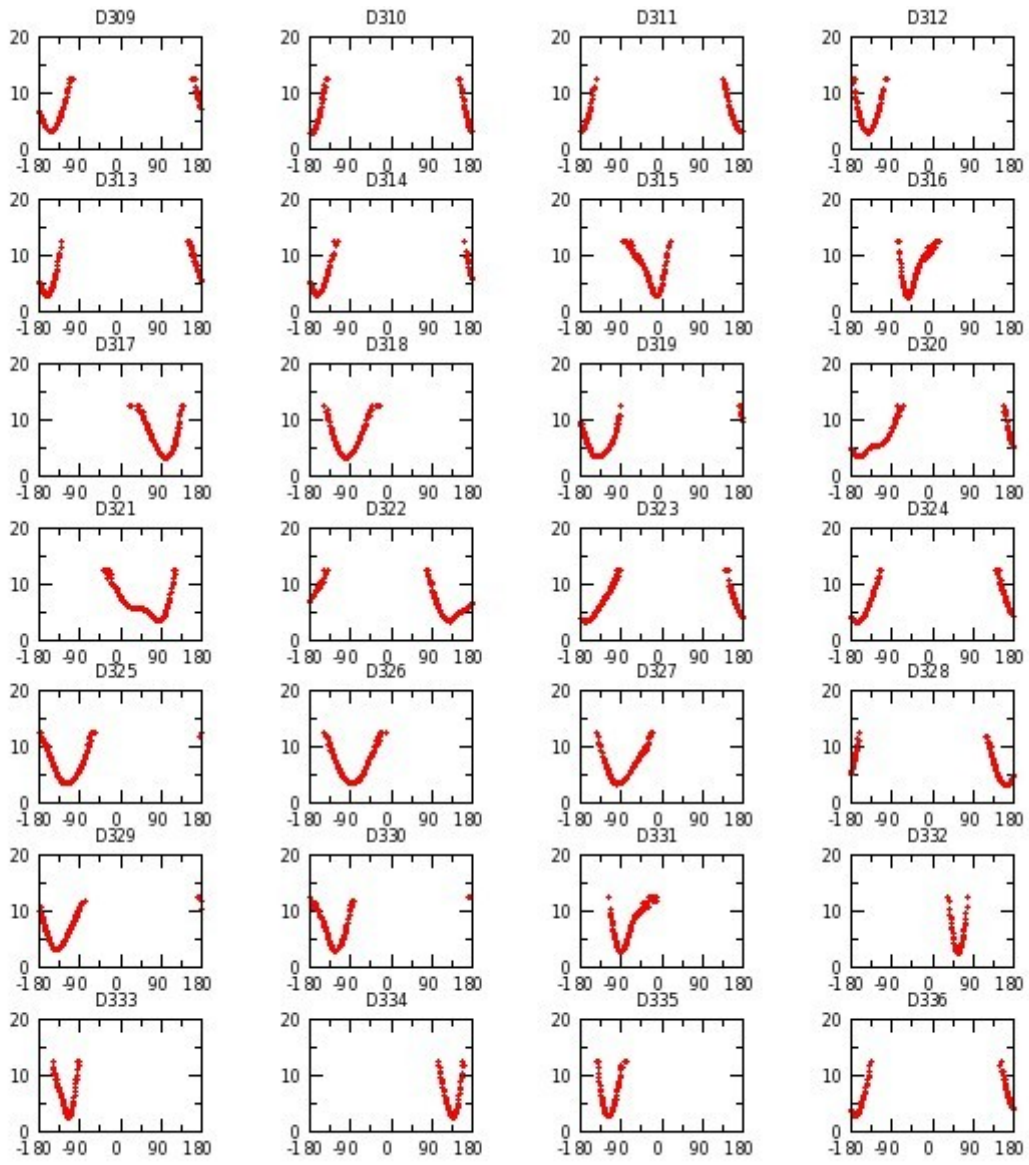


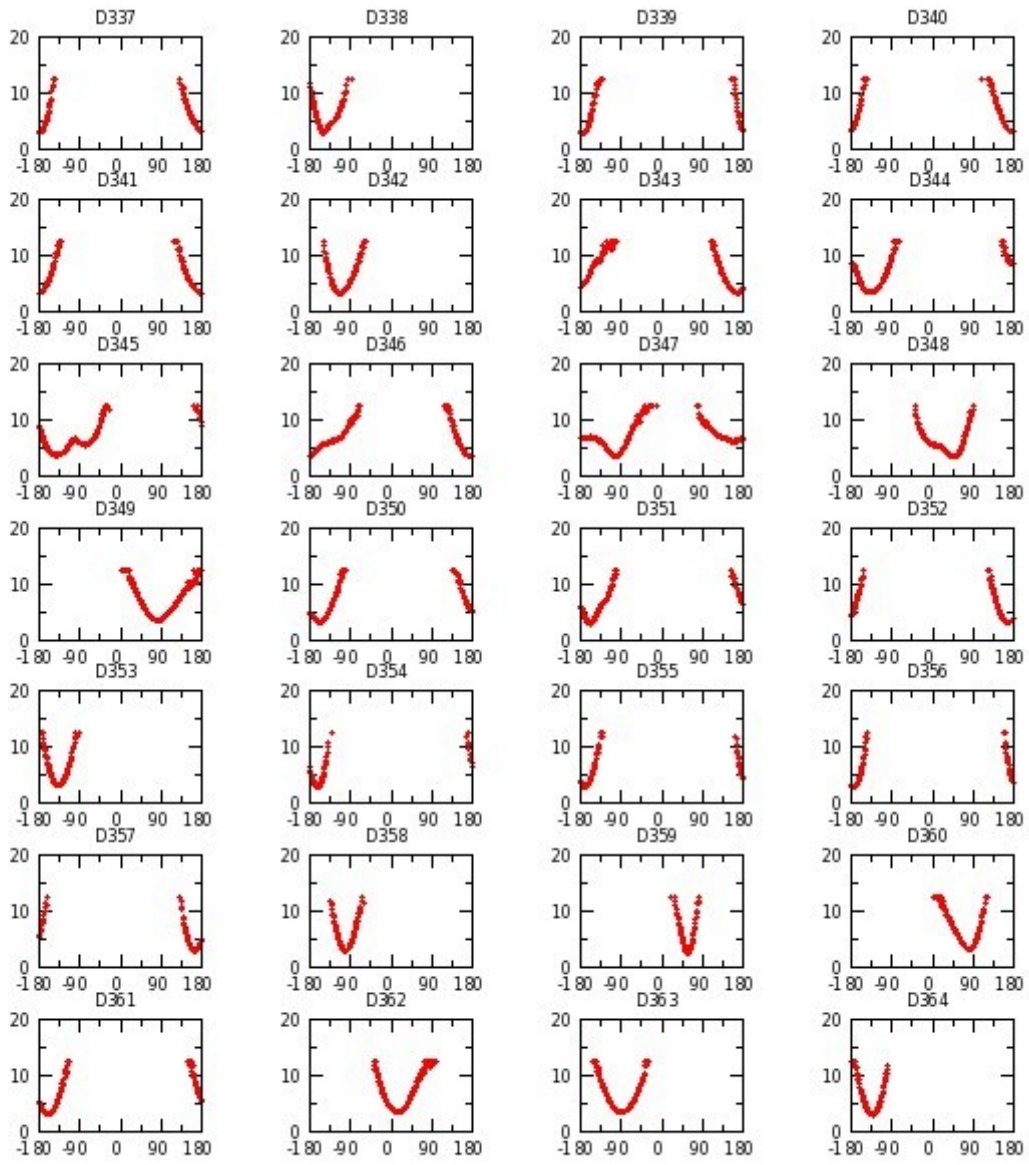


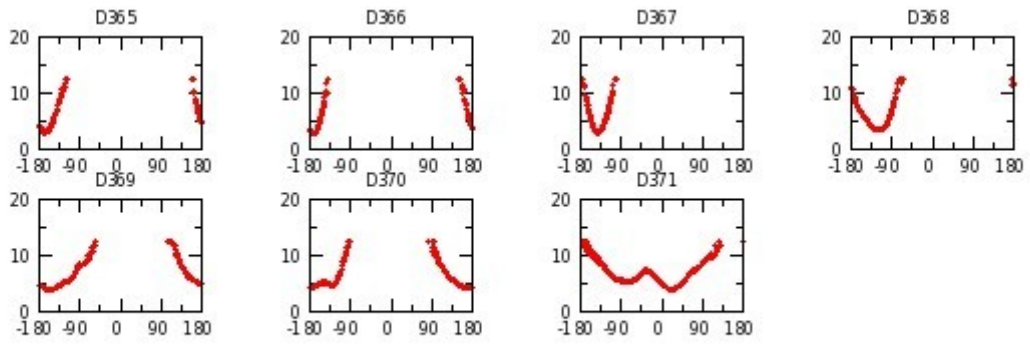




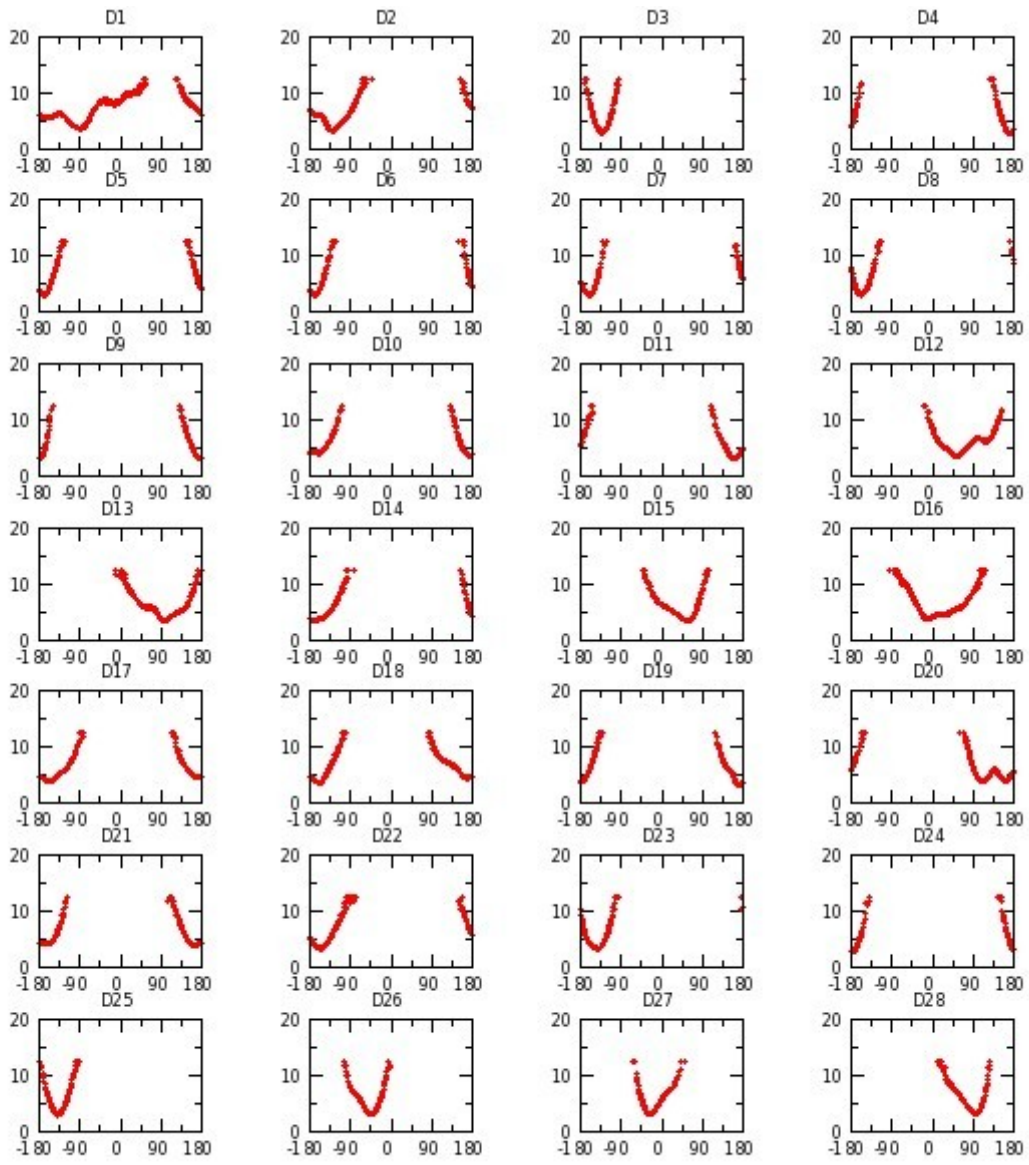


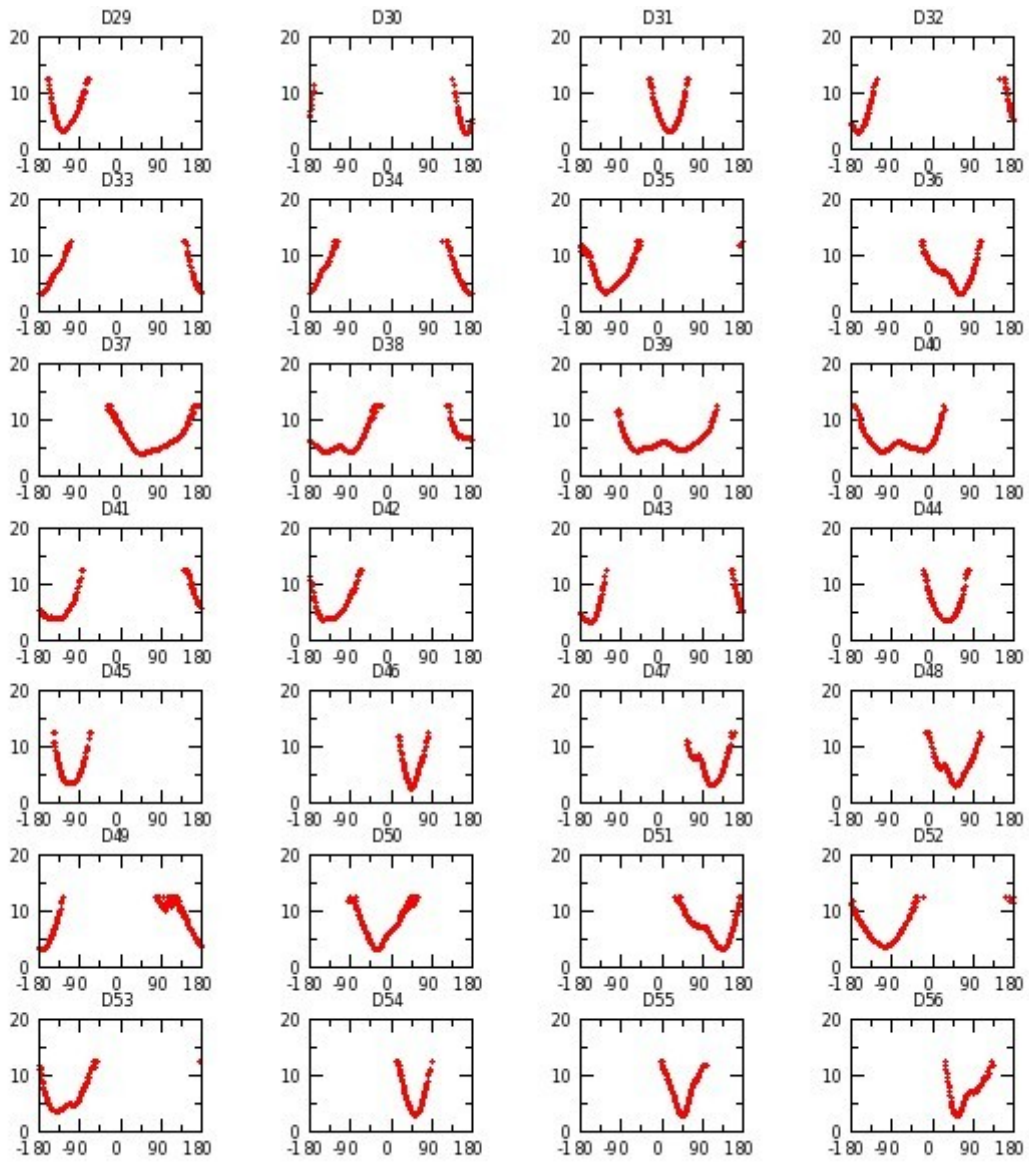


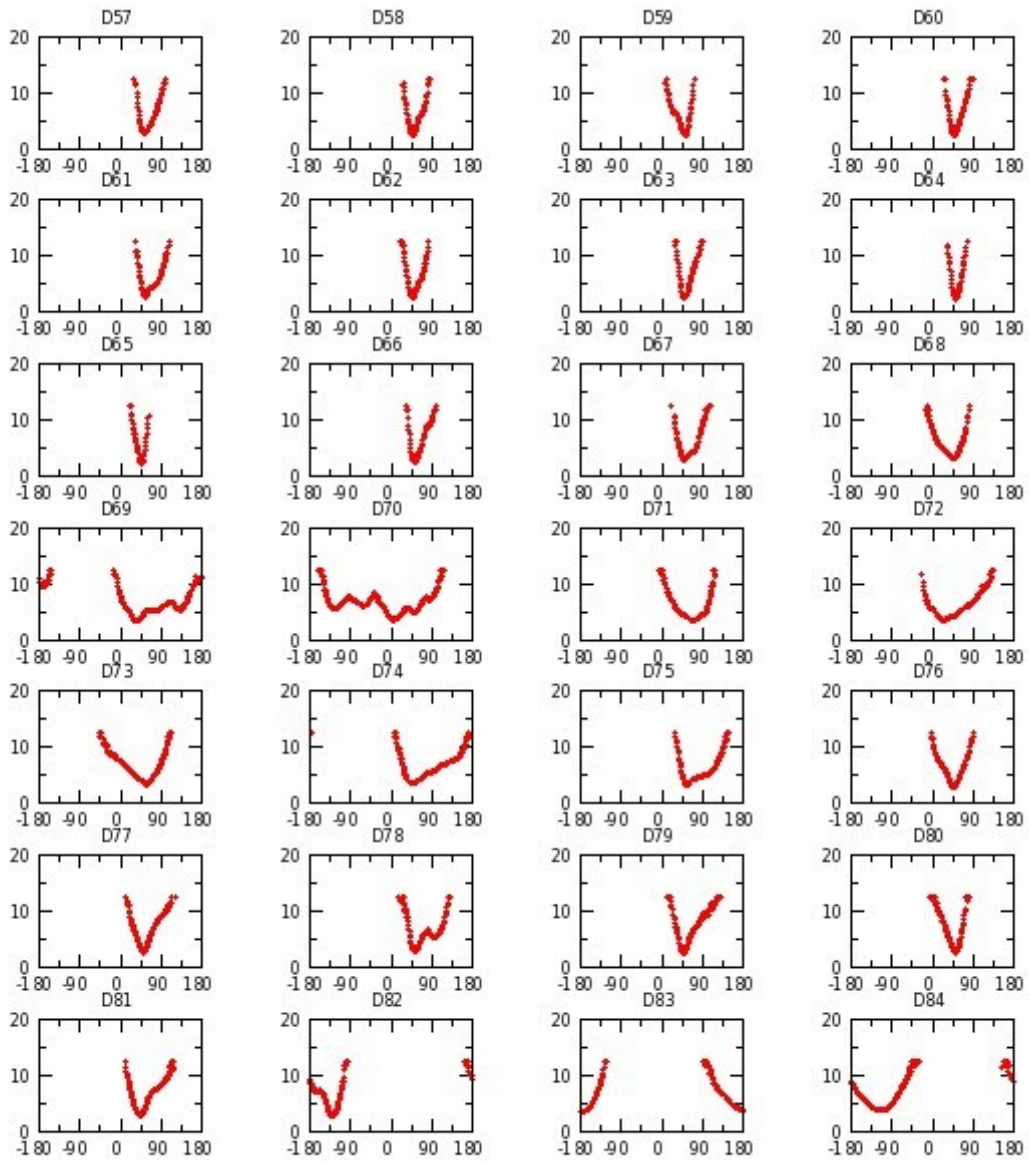


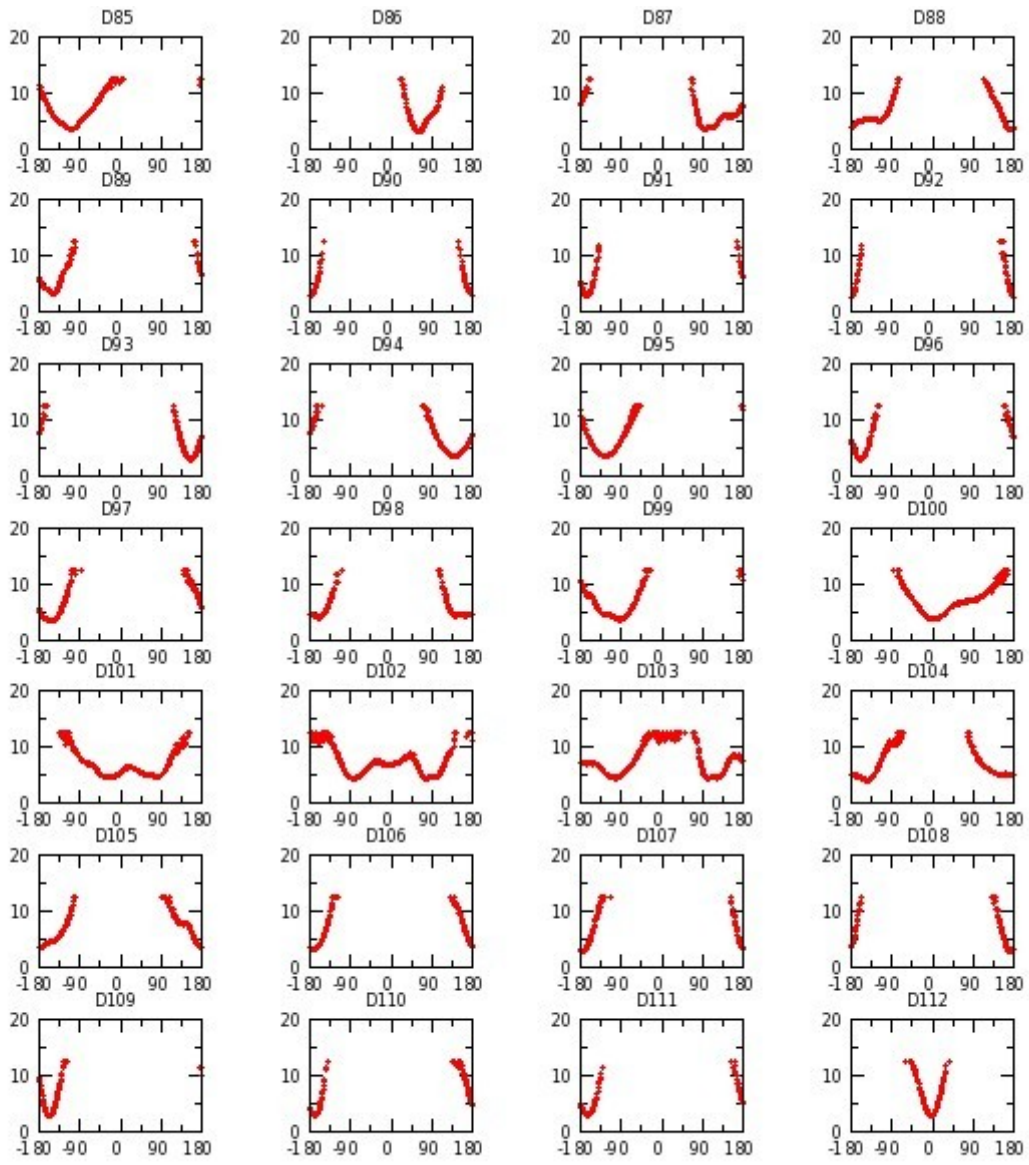


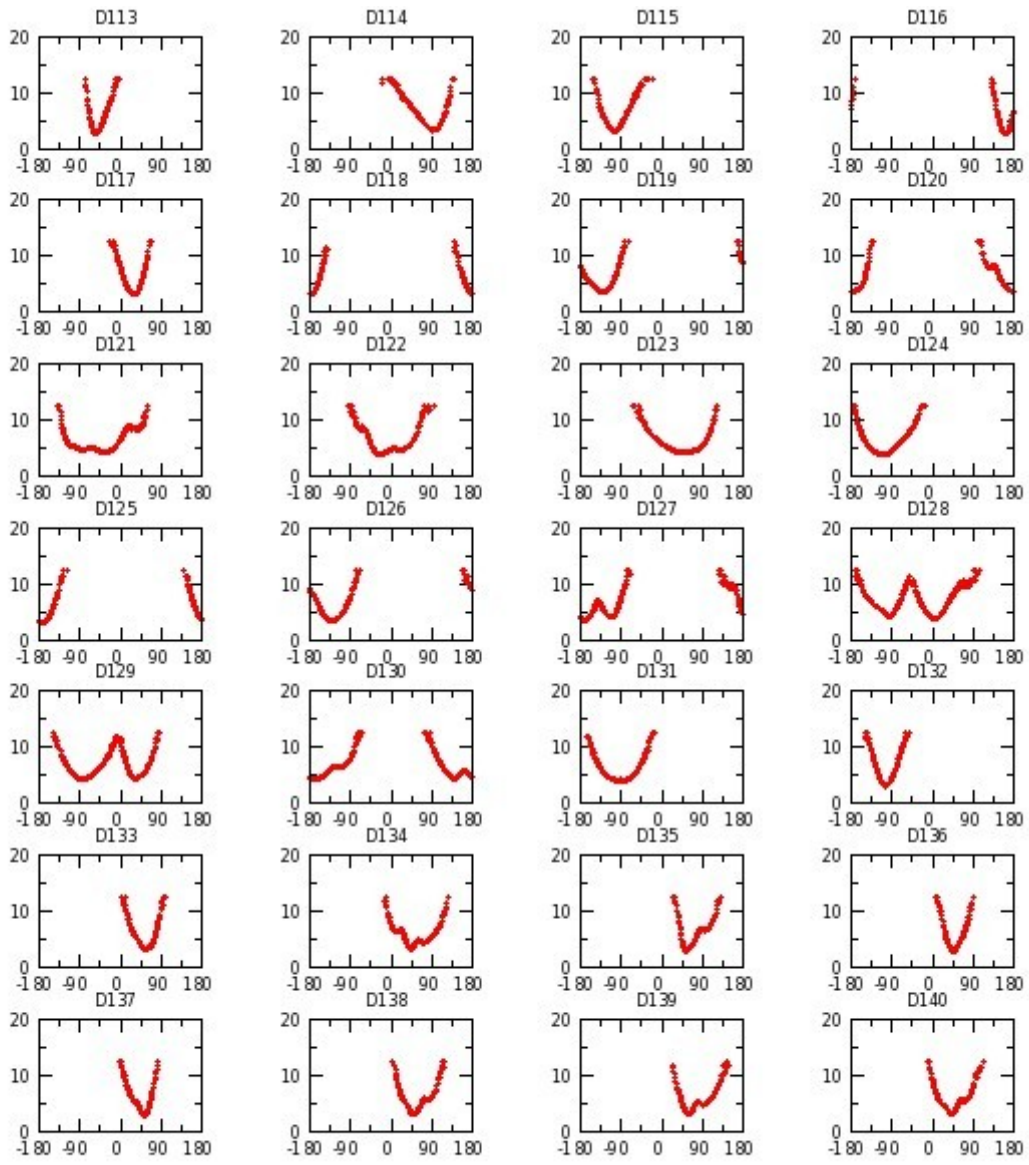
Annexe G 5 : H_aGAL réplique II

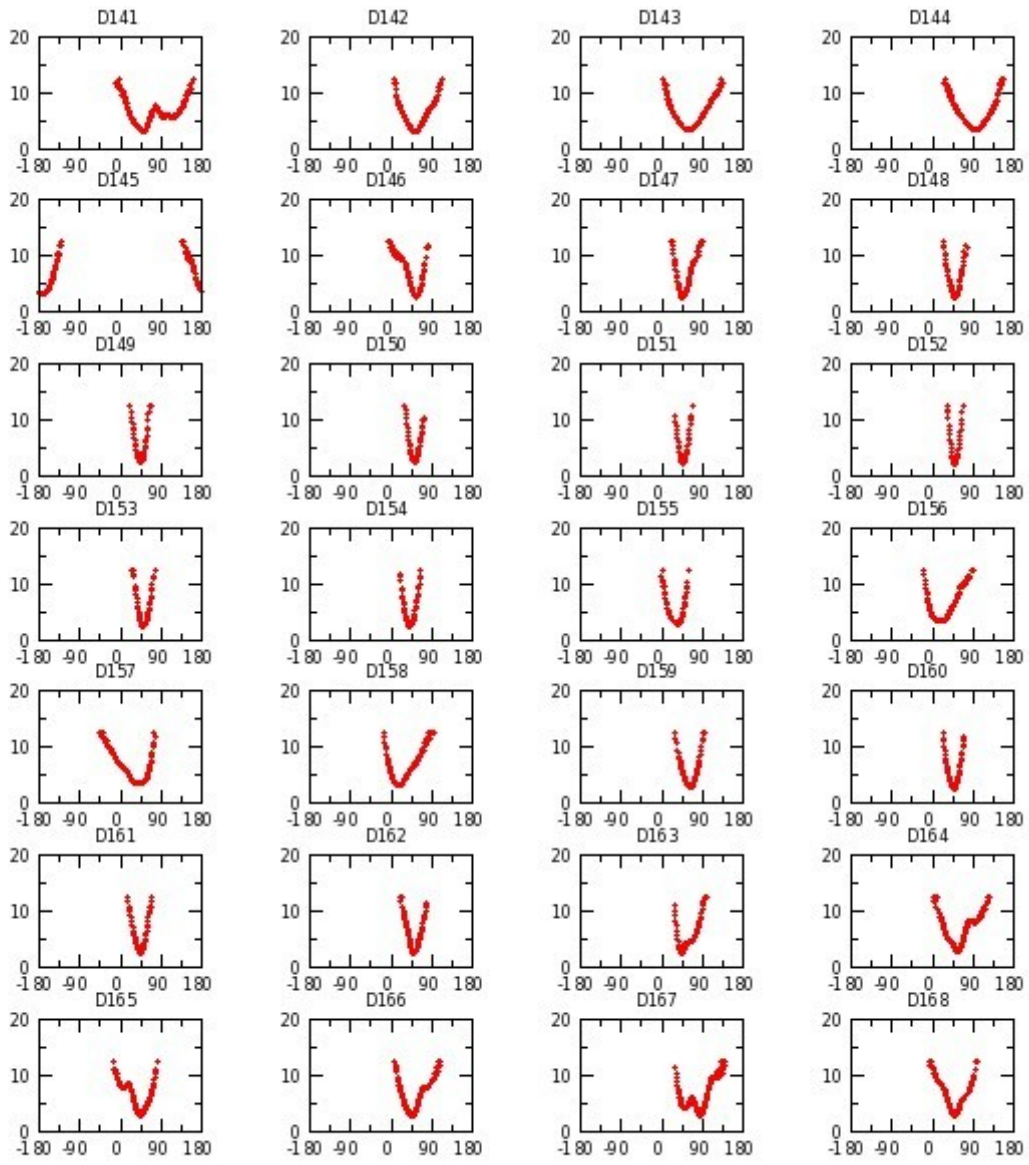


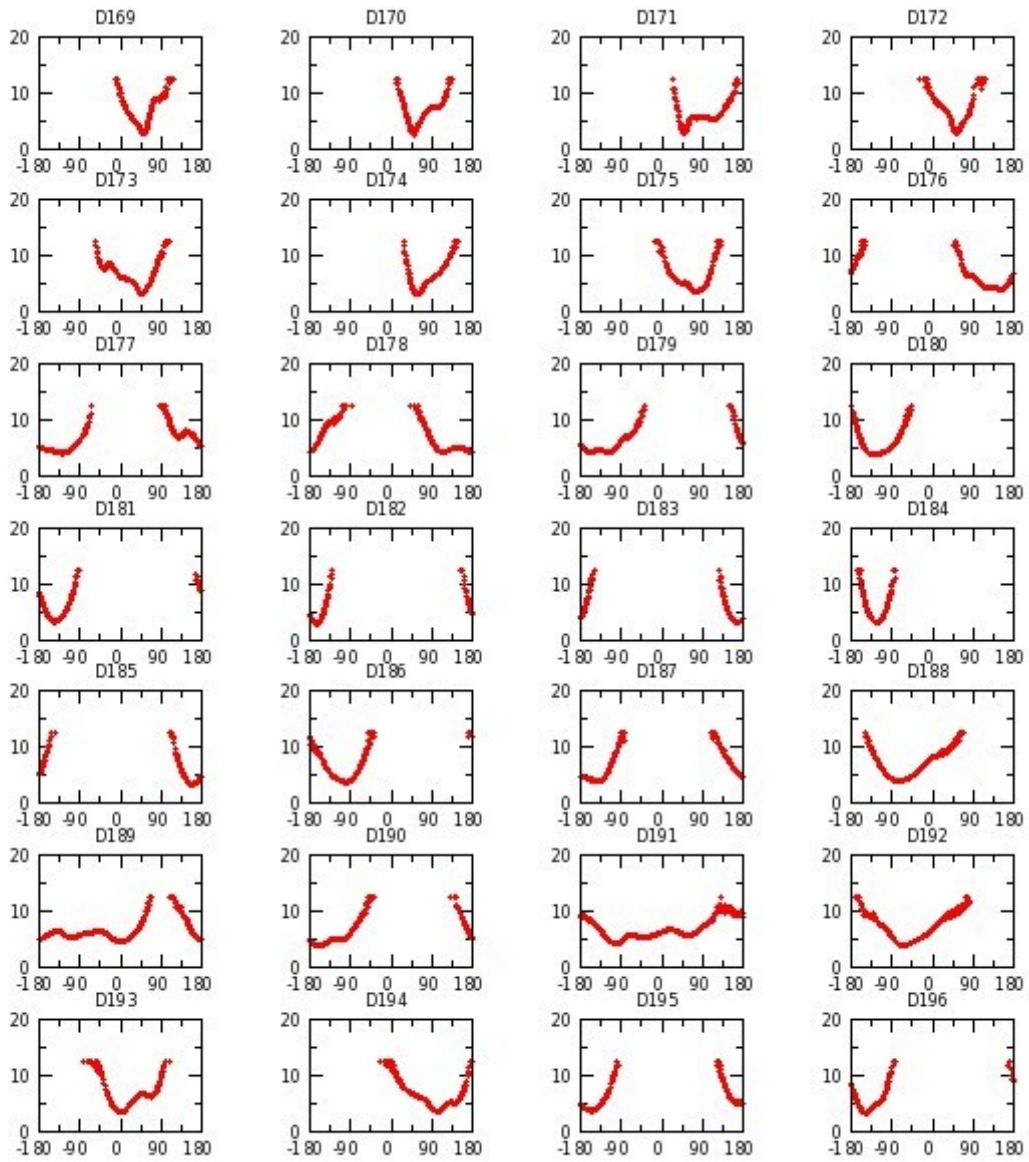


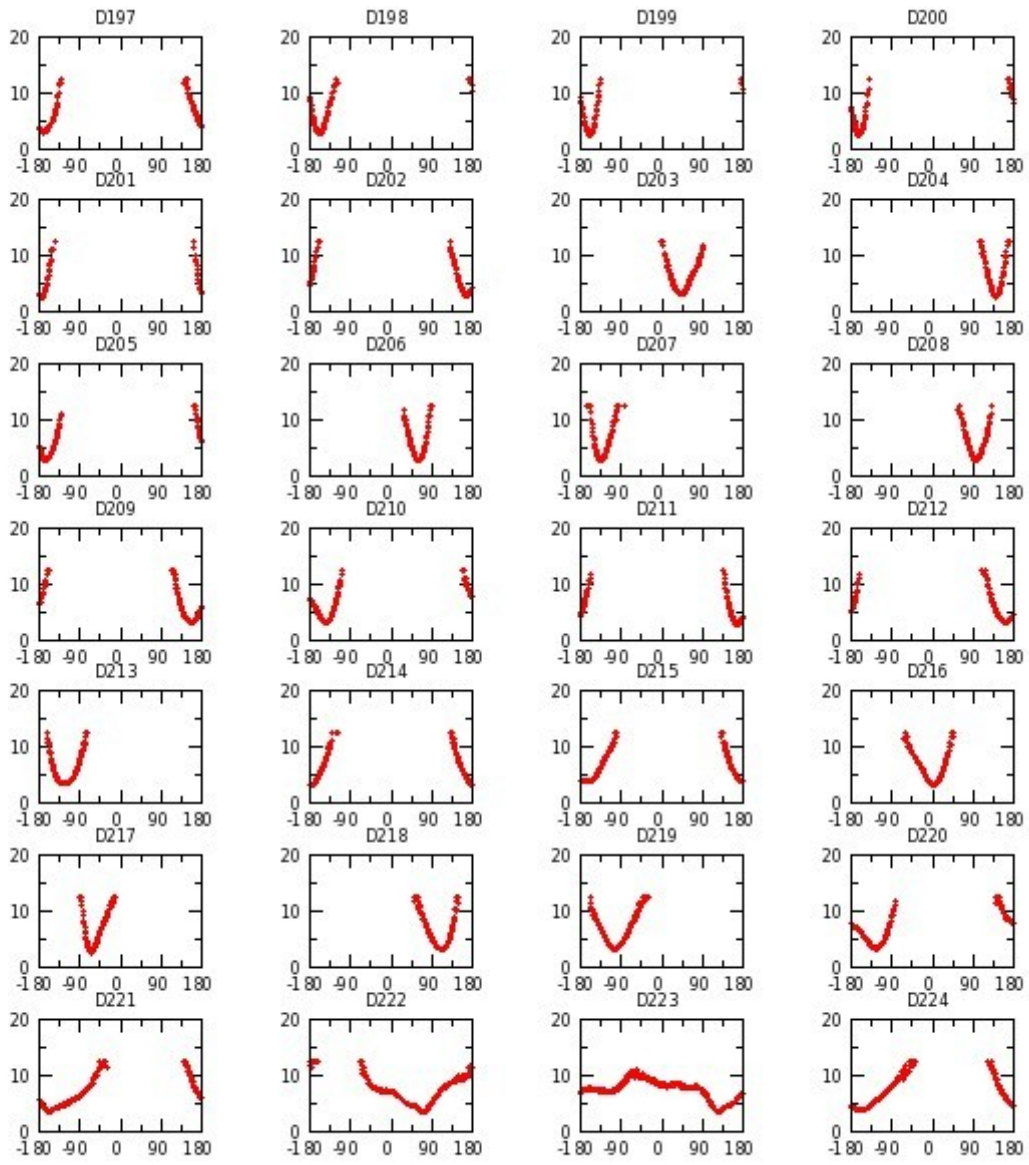


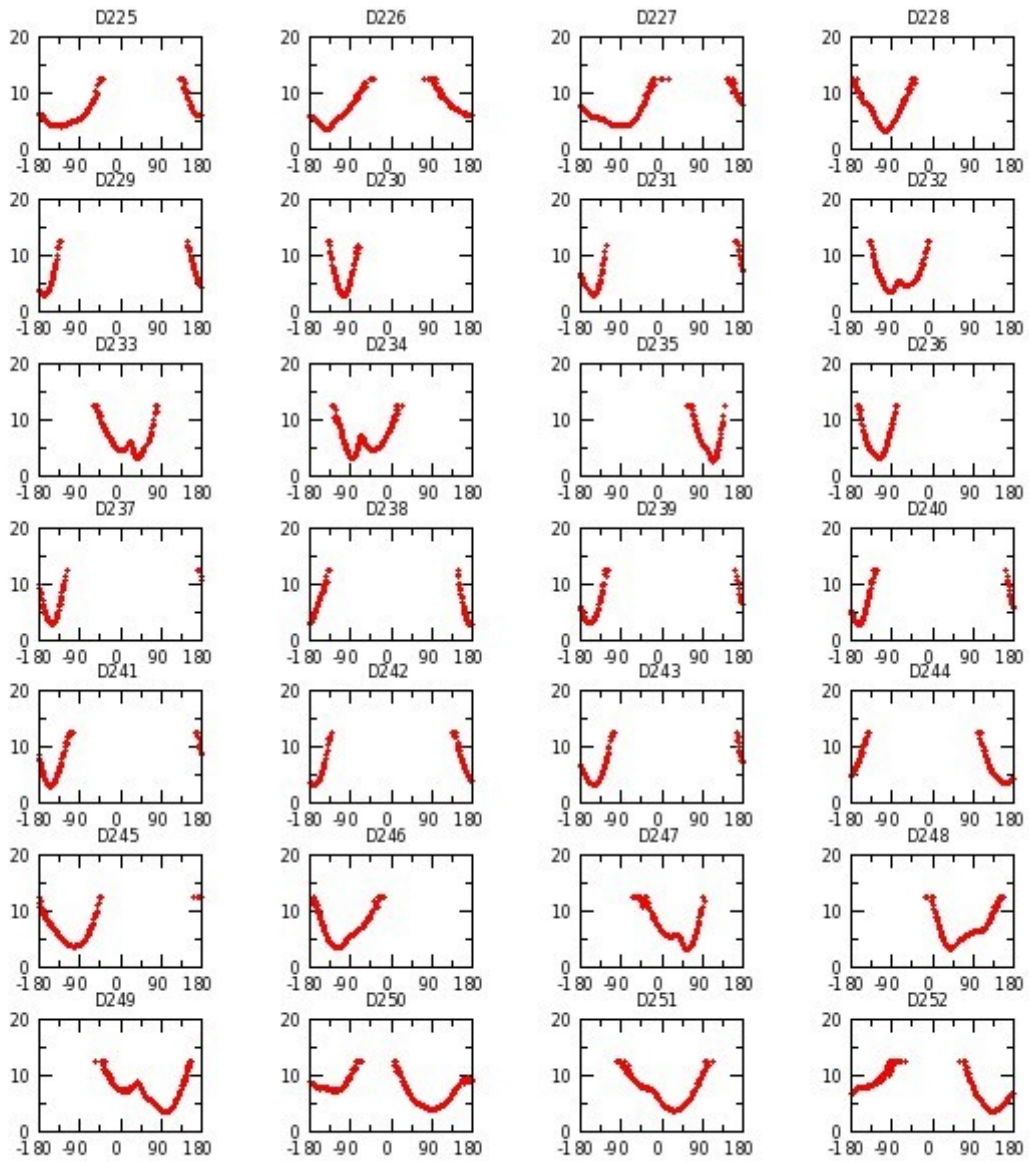


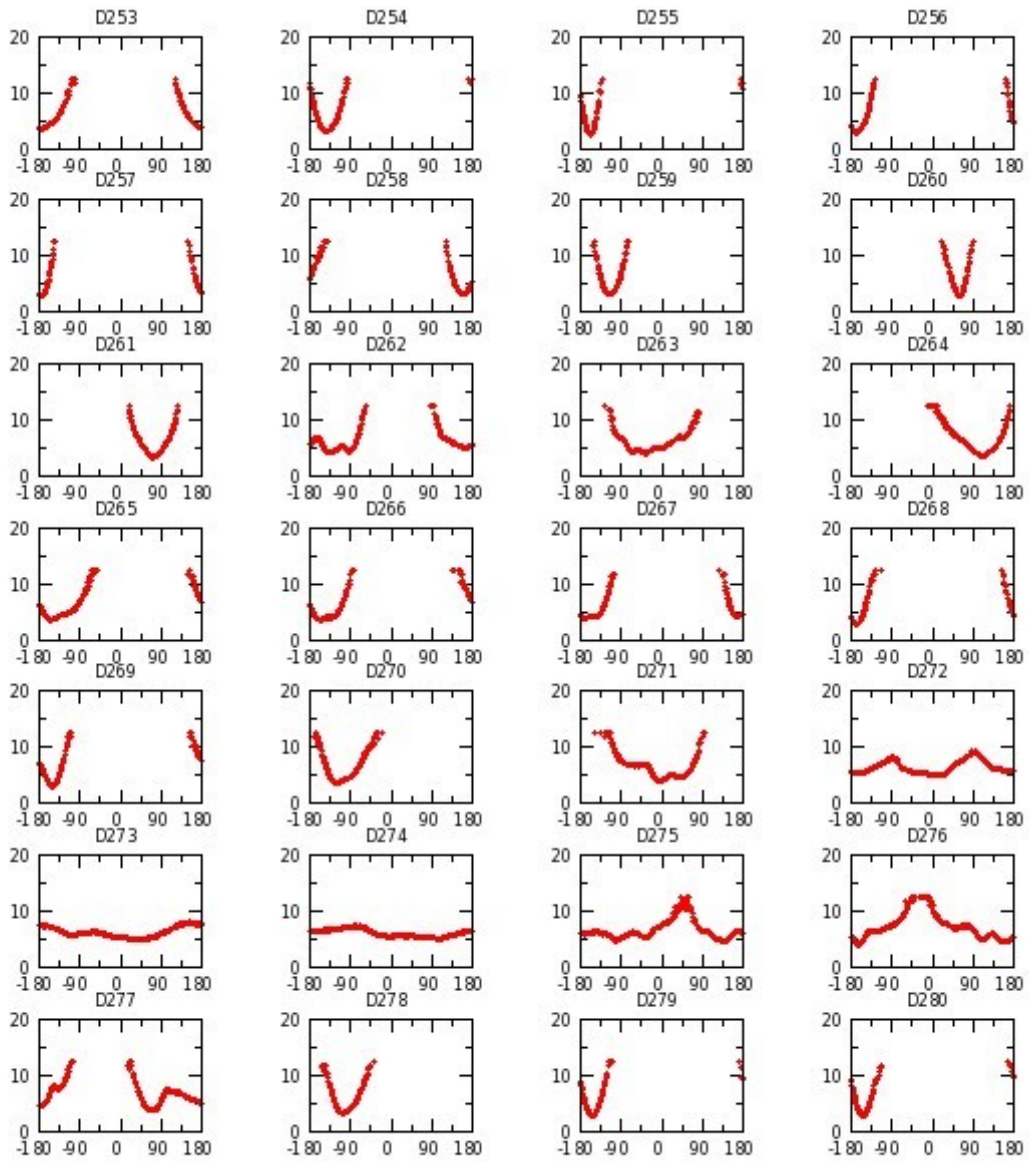


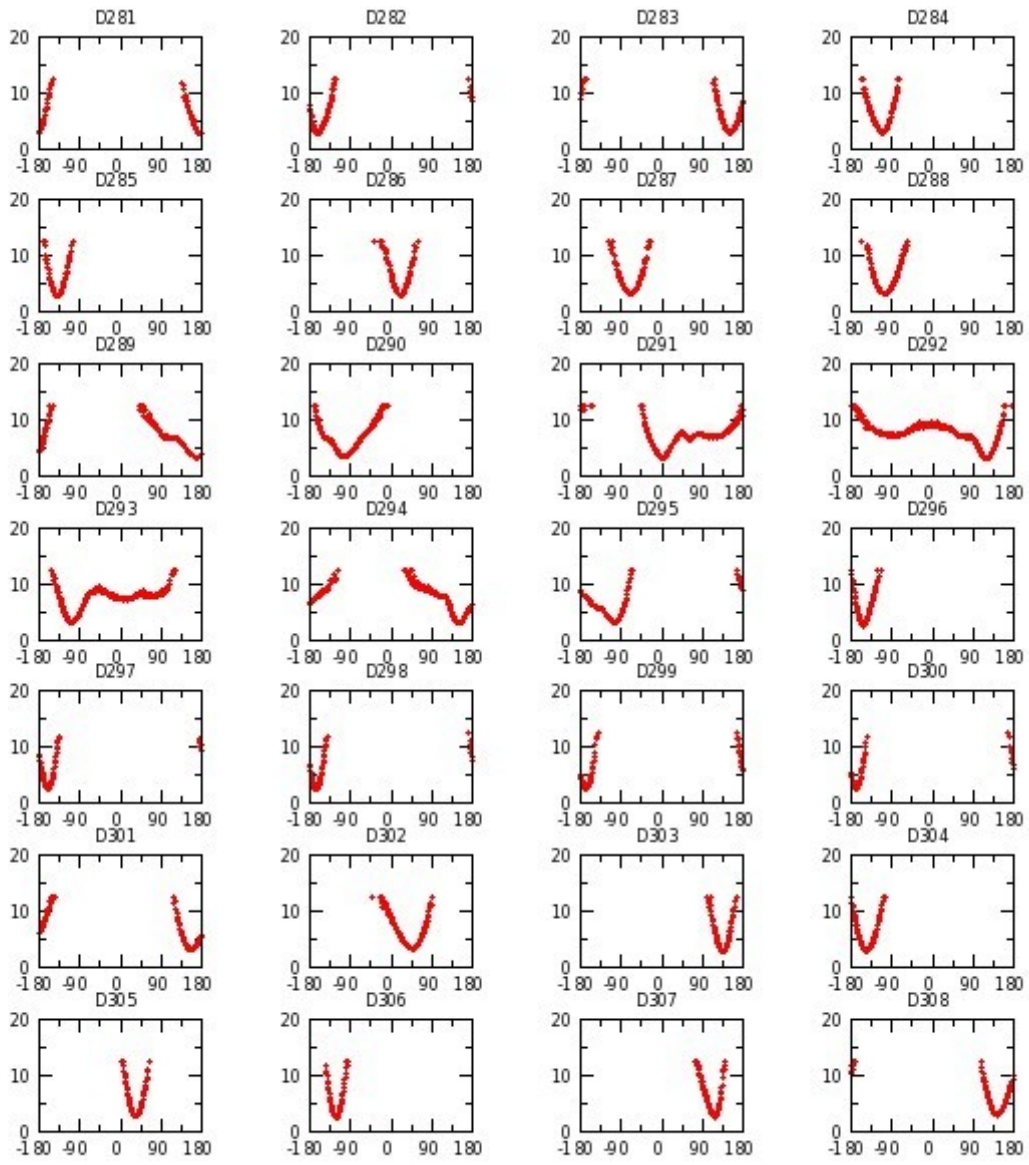


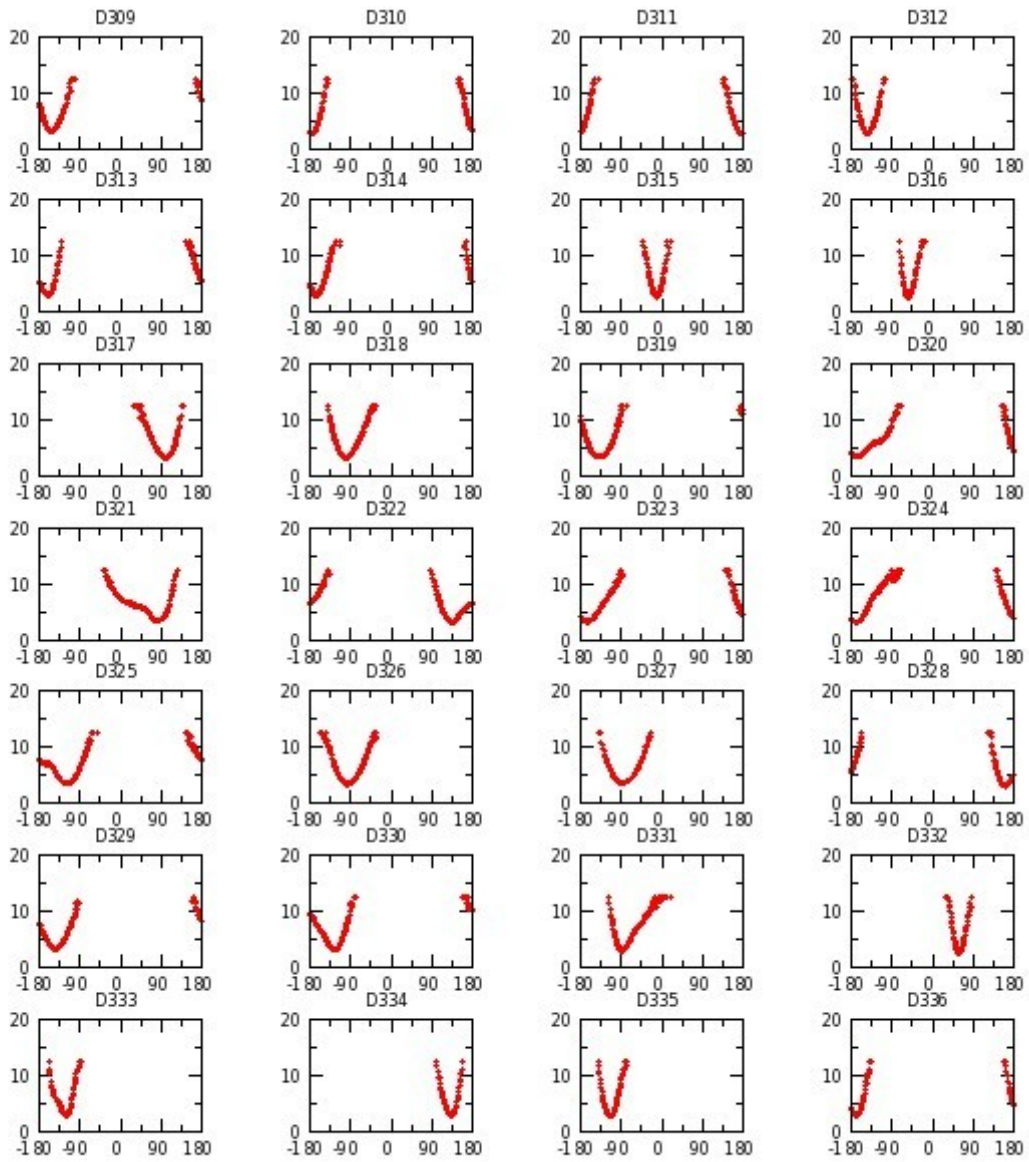


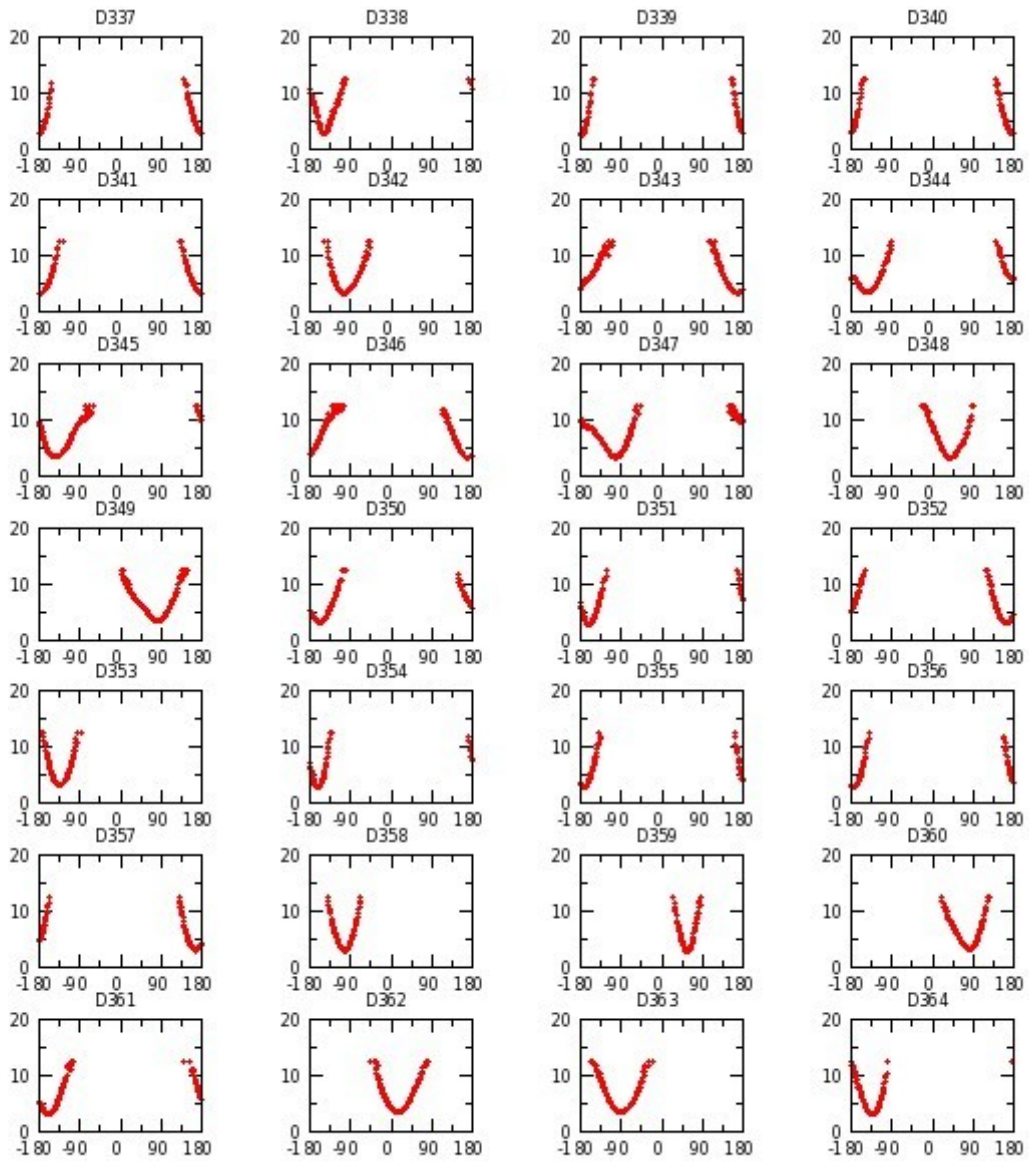


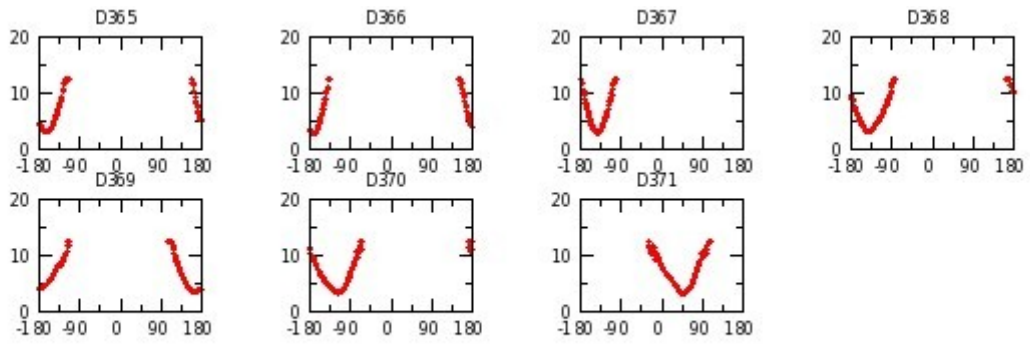




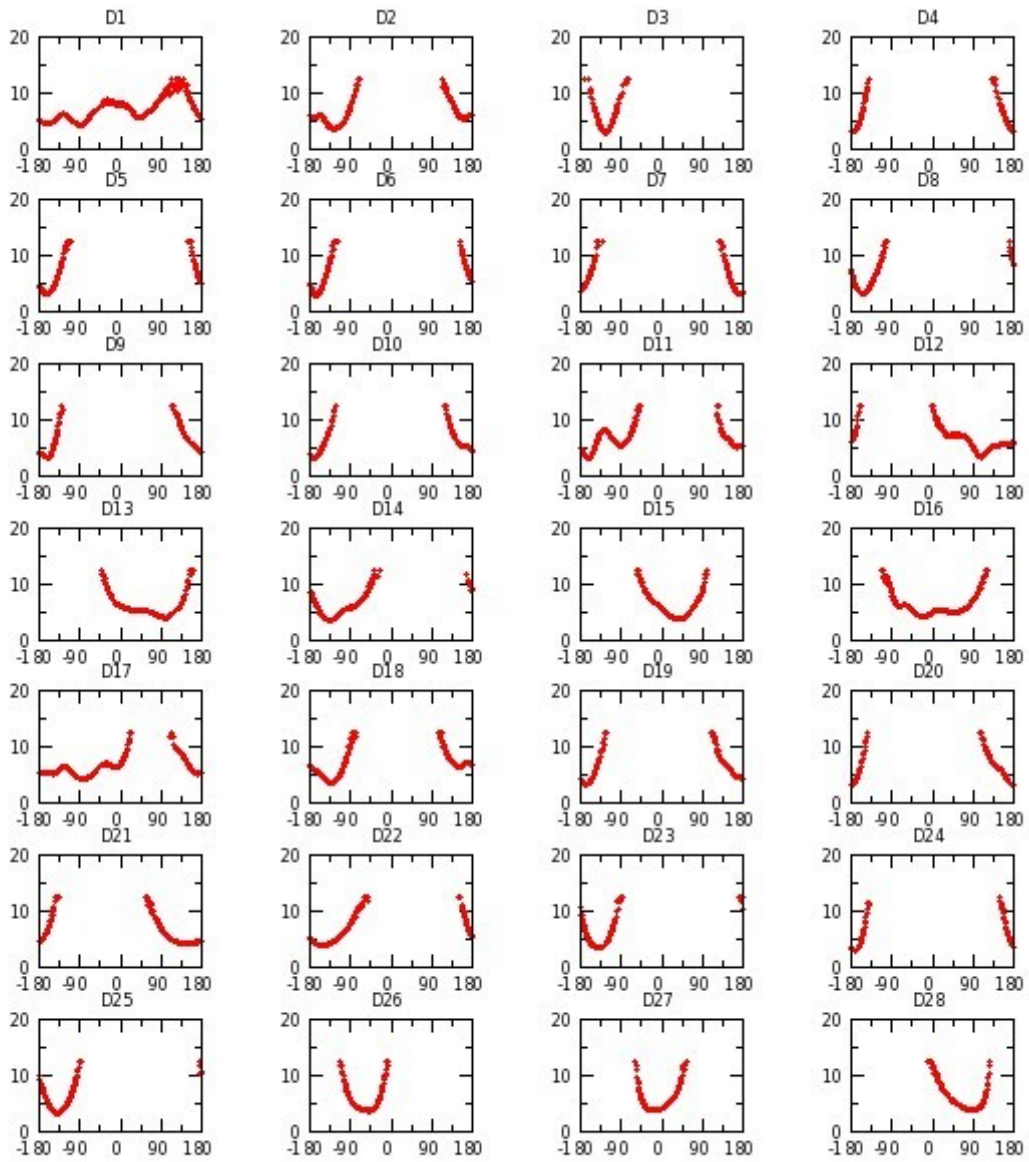


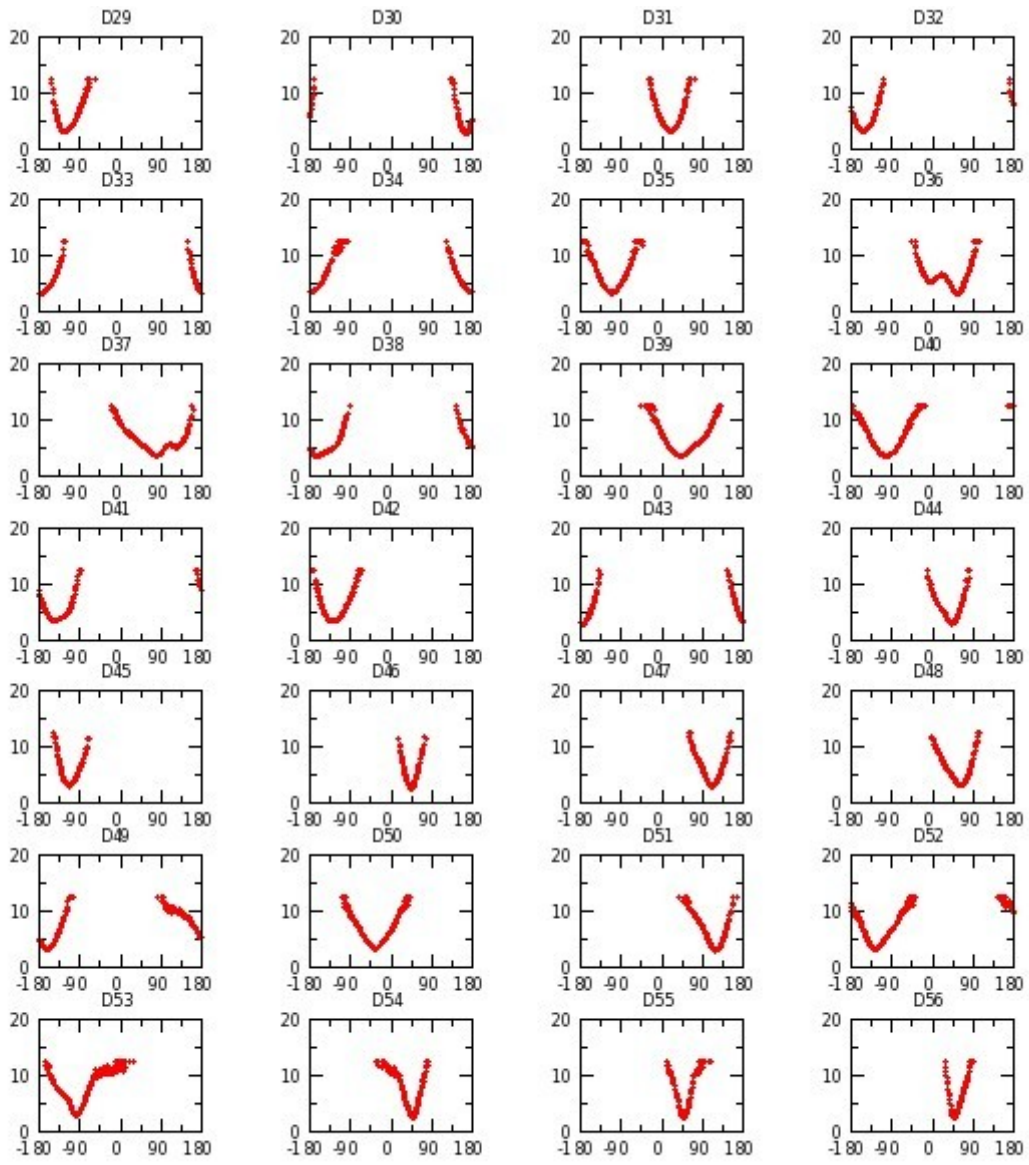


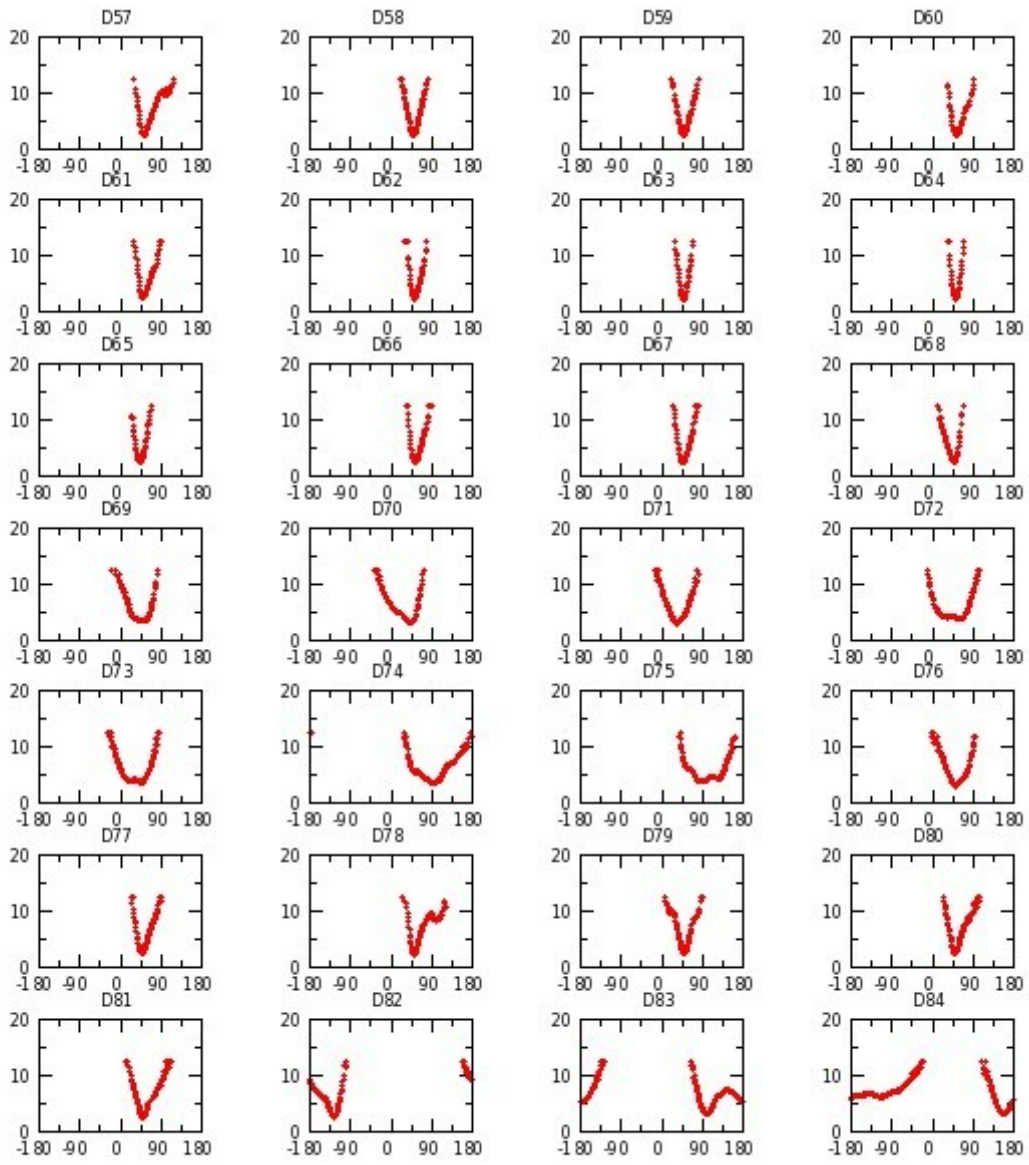


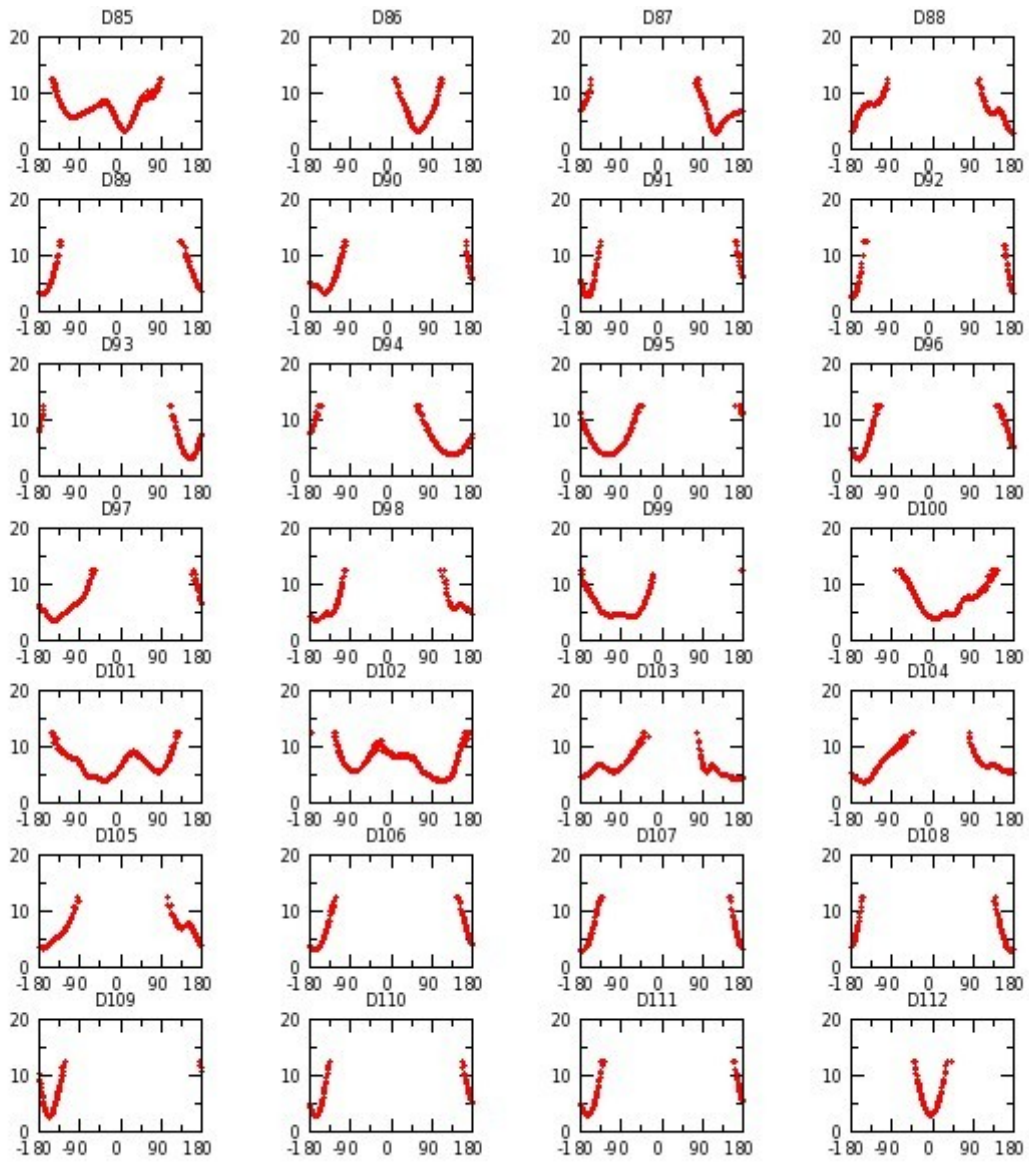


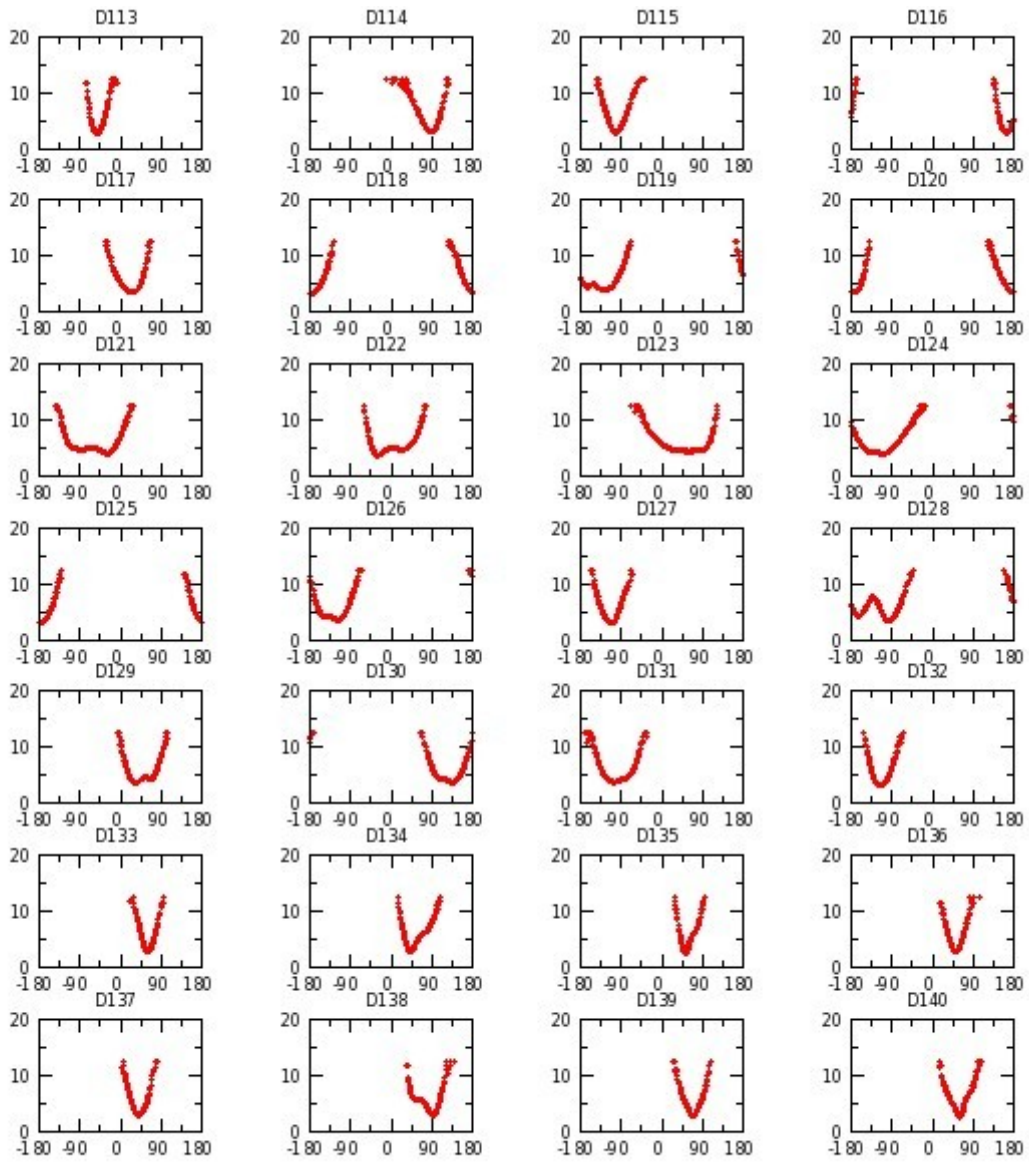
Annexe G 6 : H_aGAL réplique III

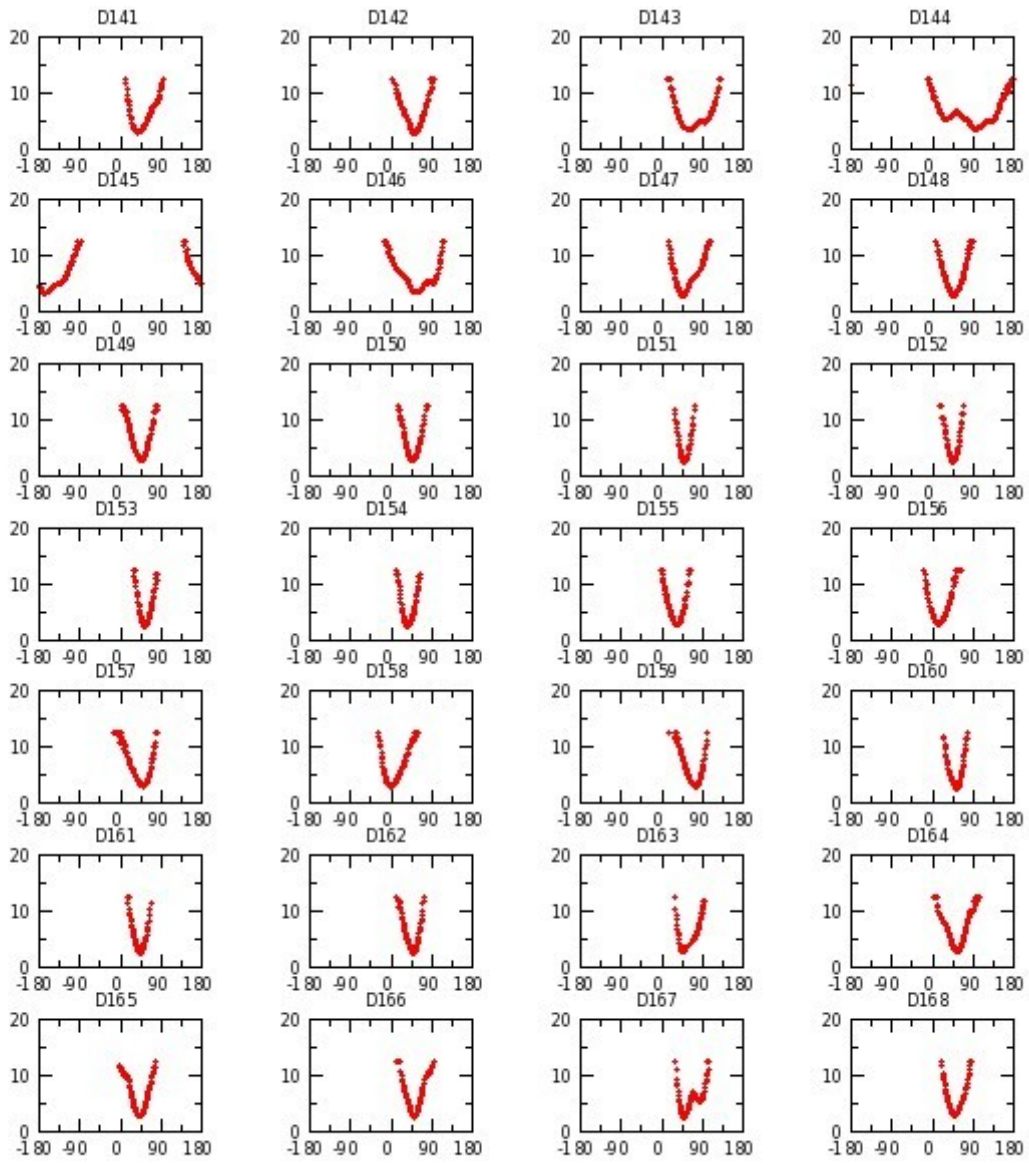


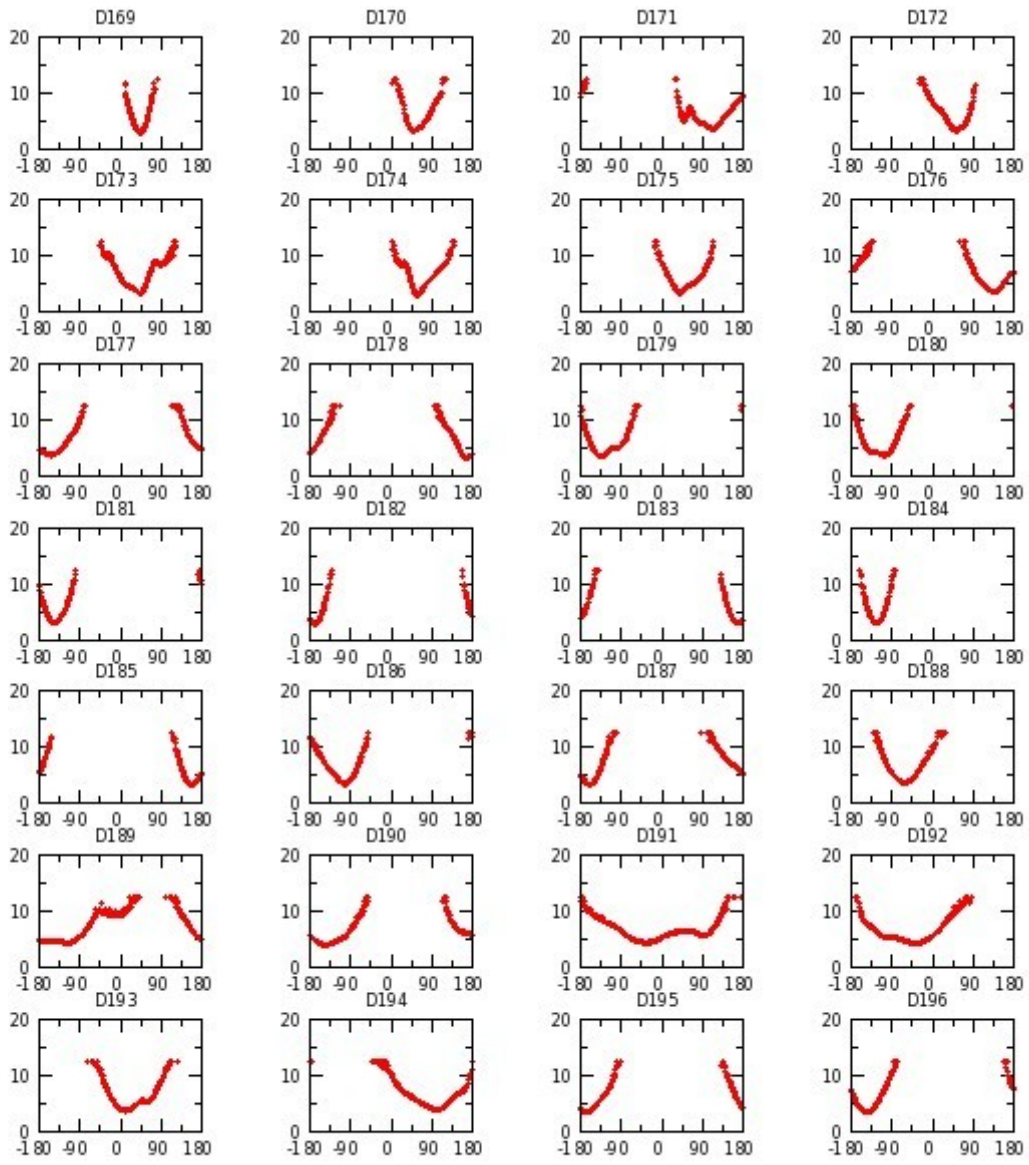


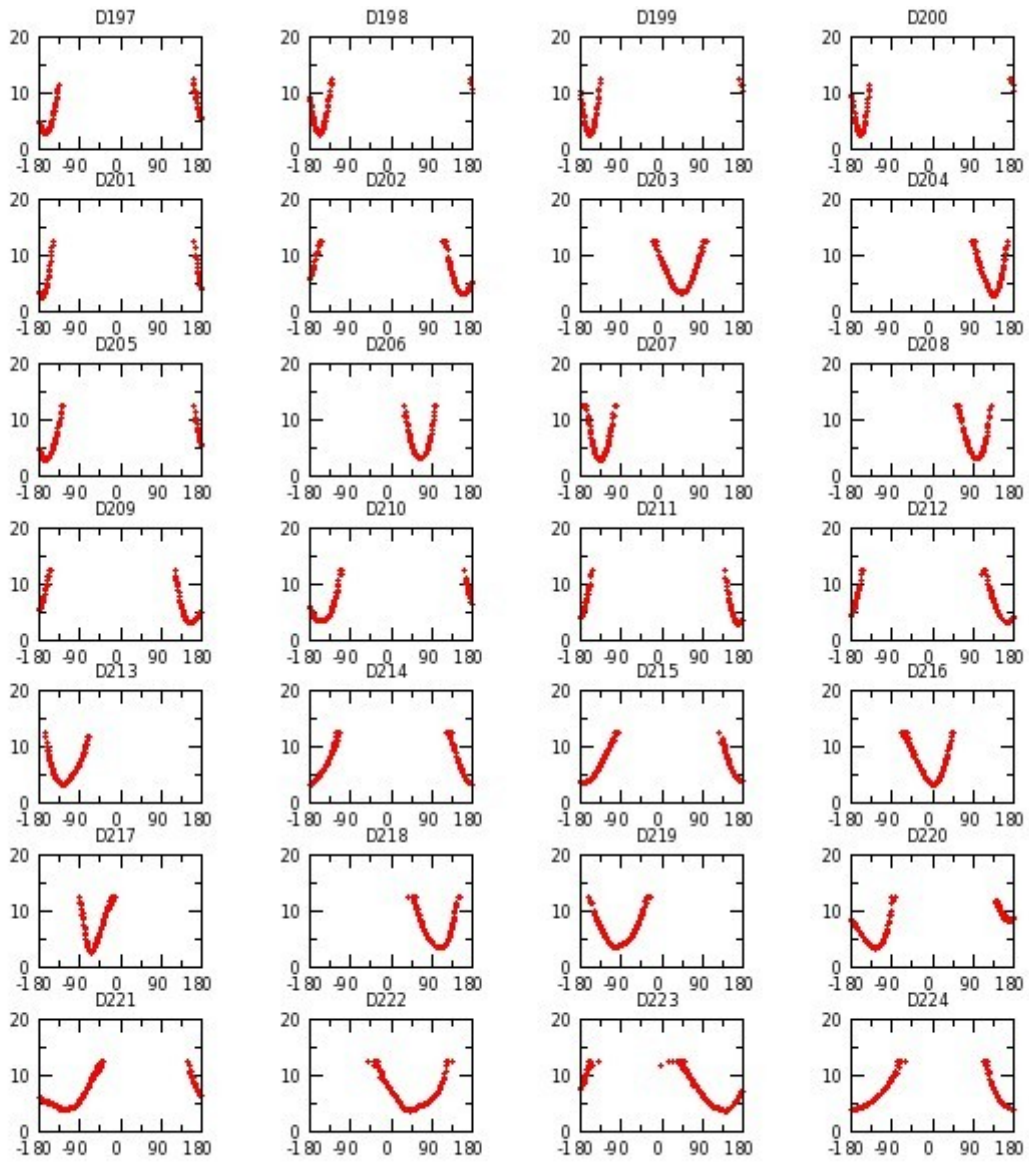


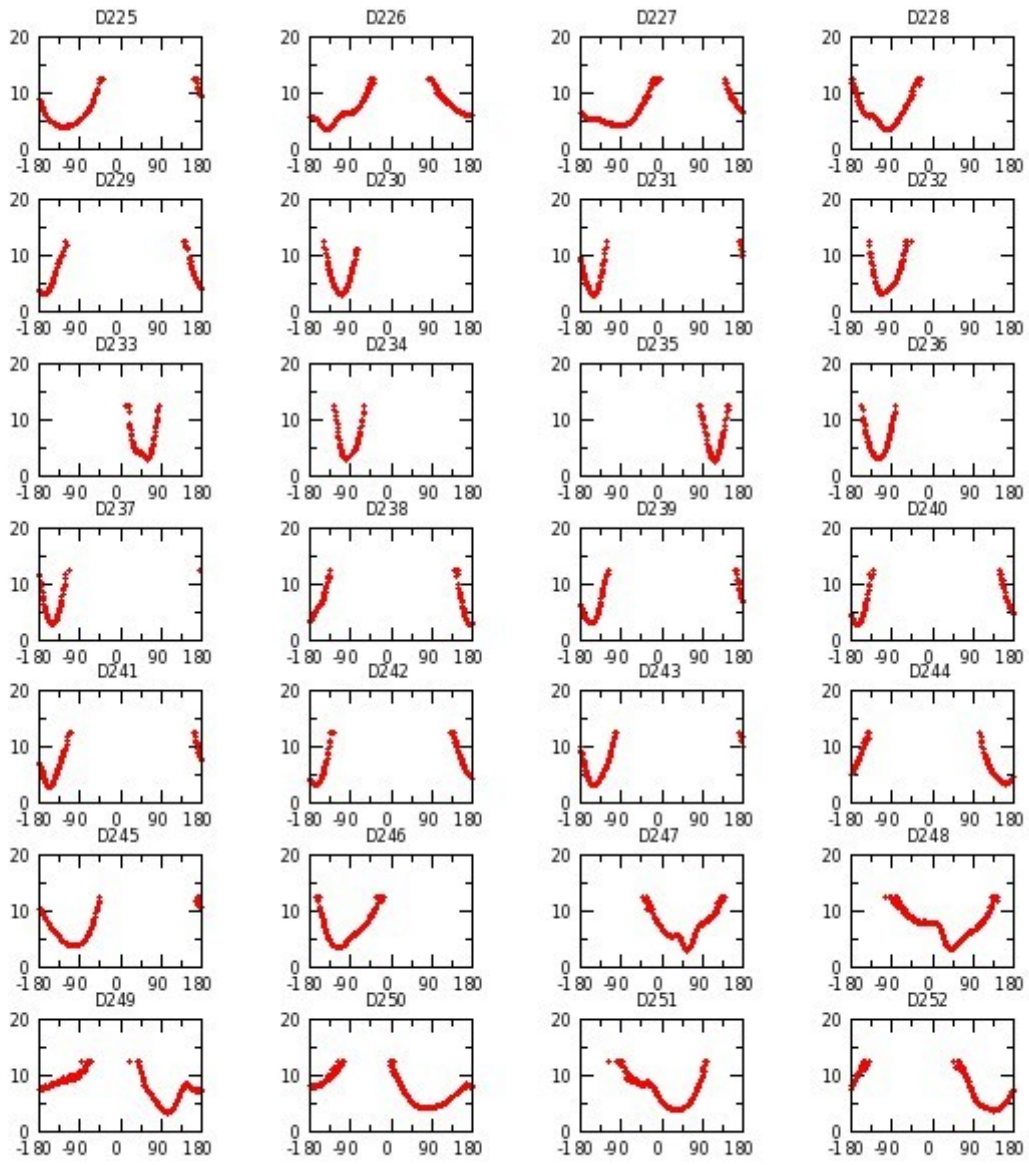


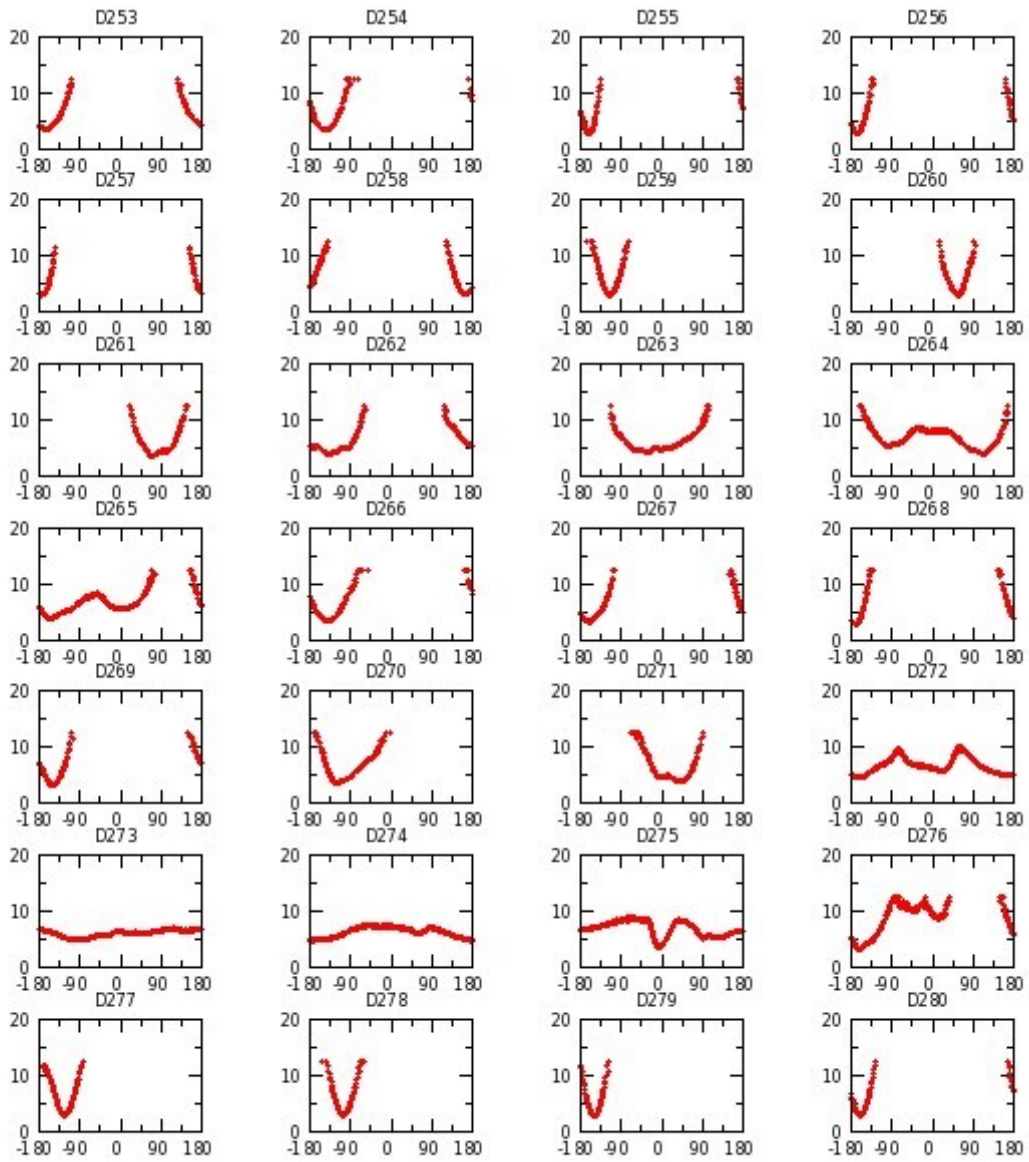


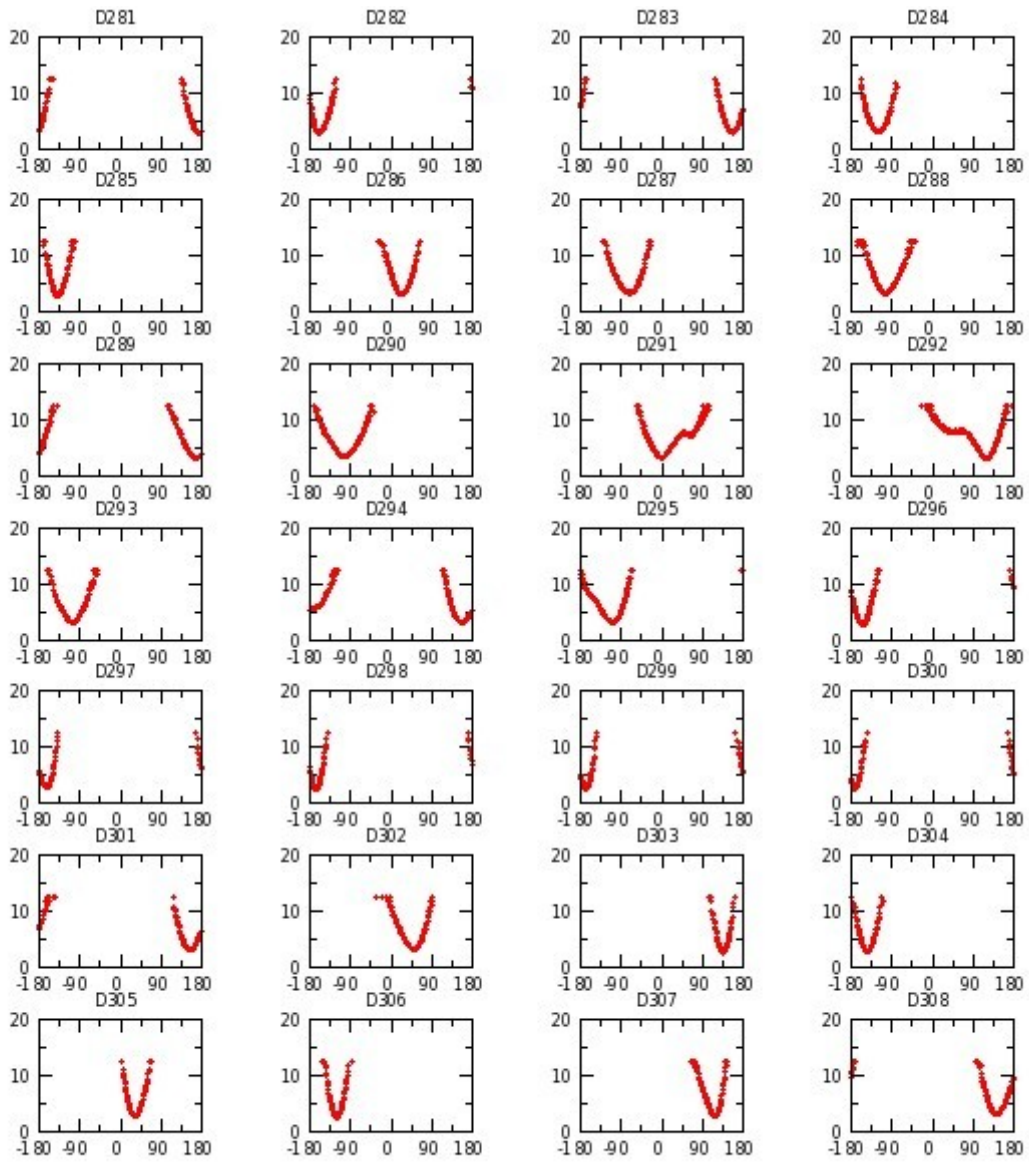


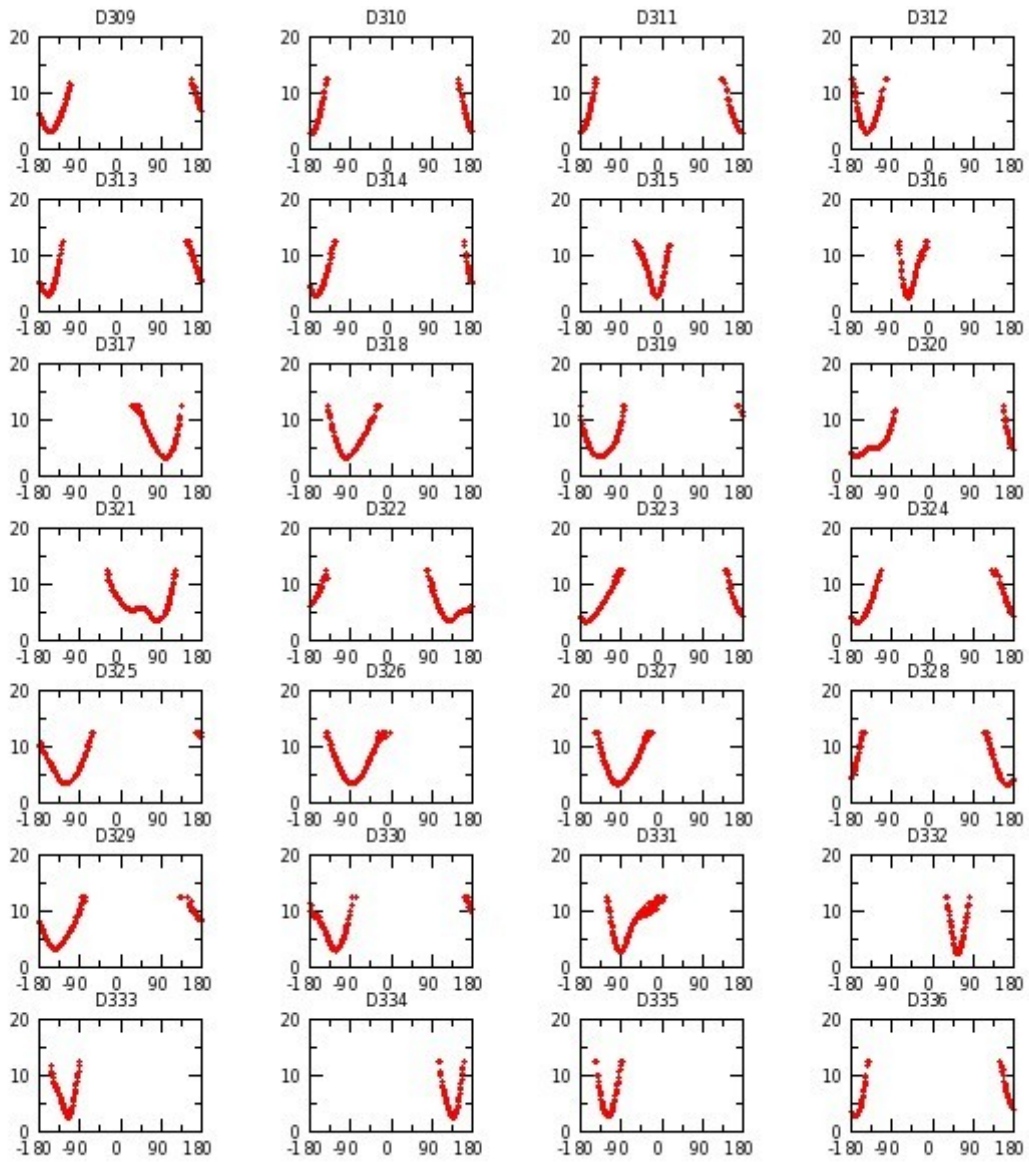


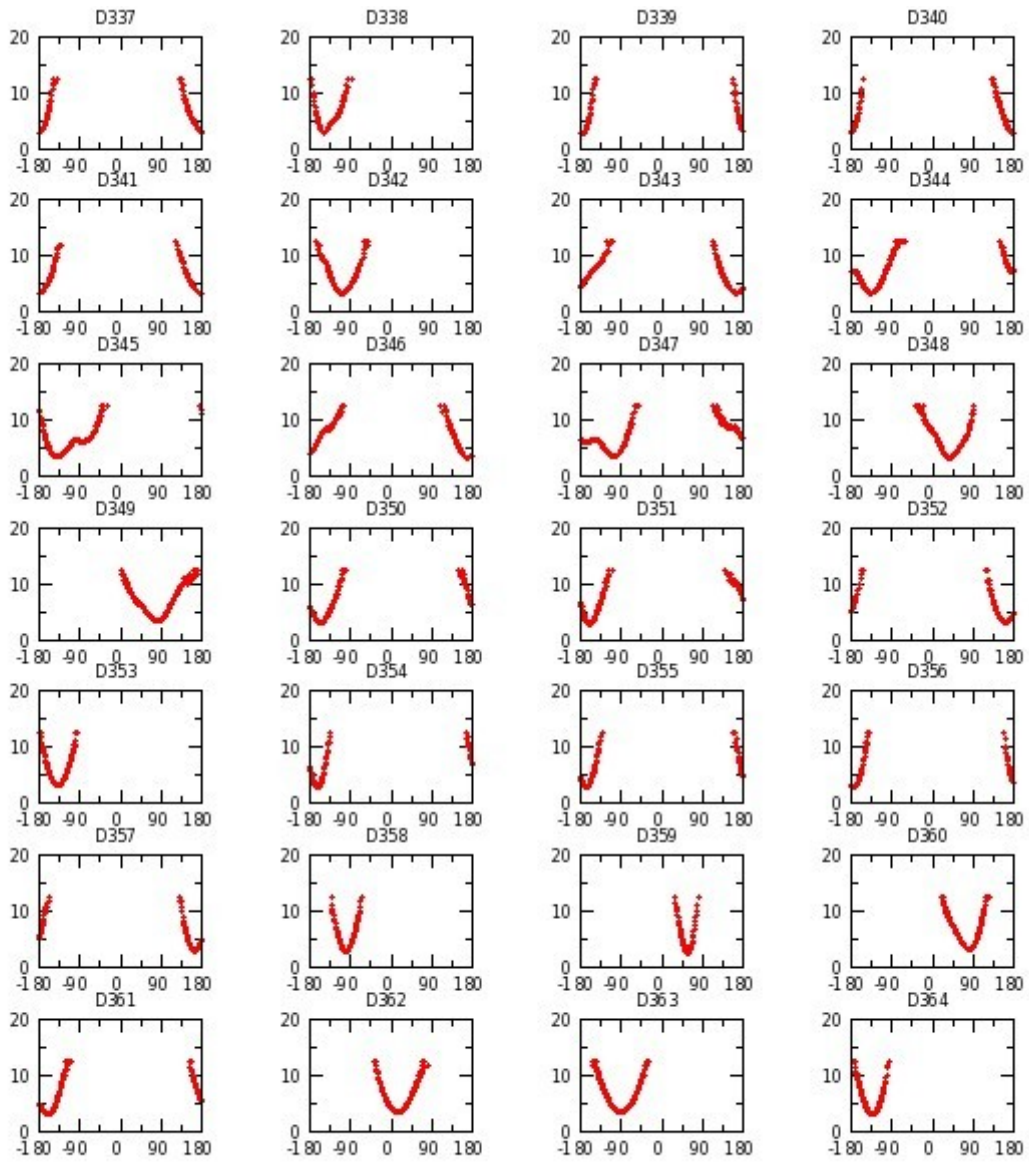


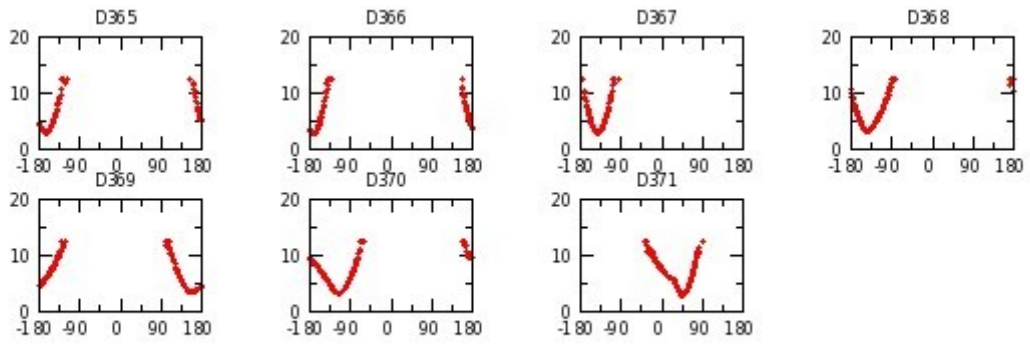




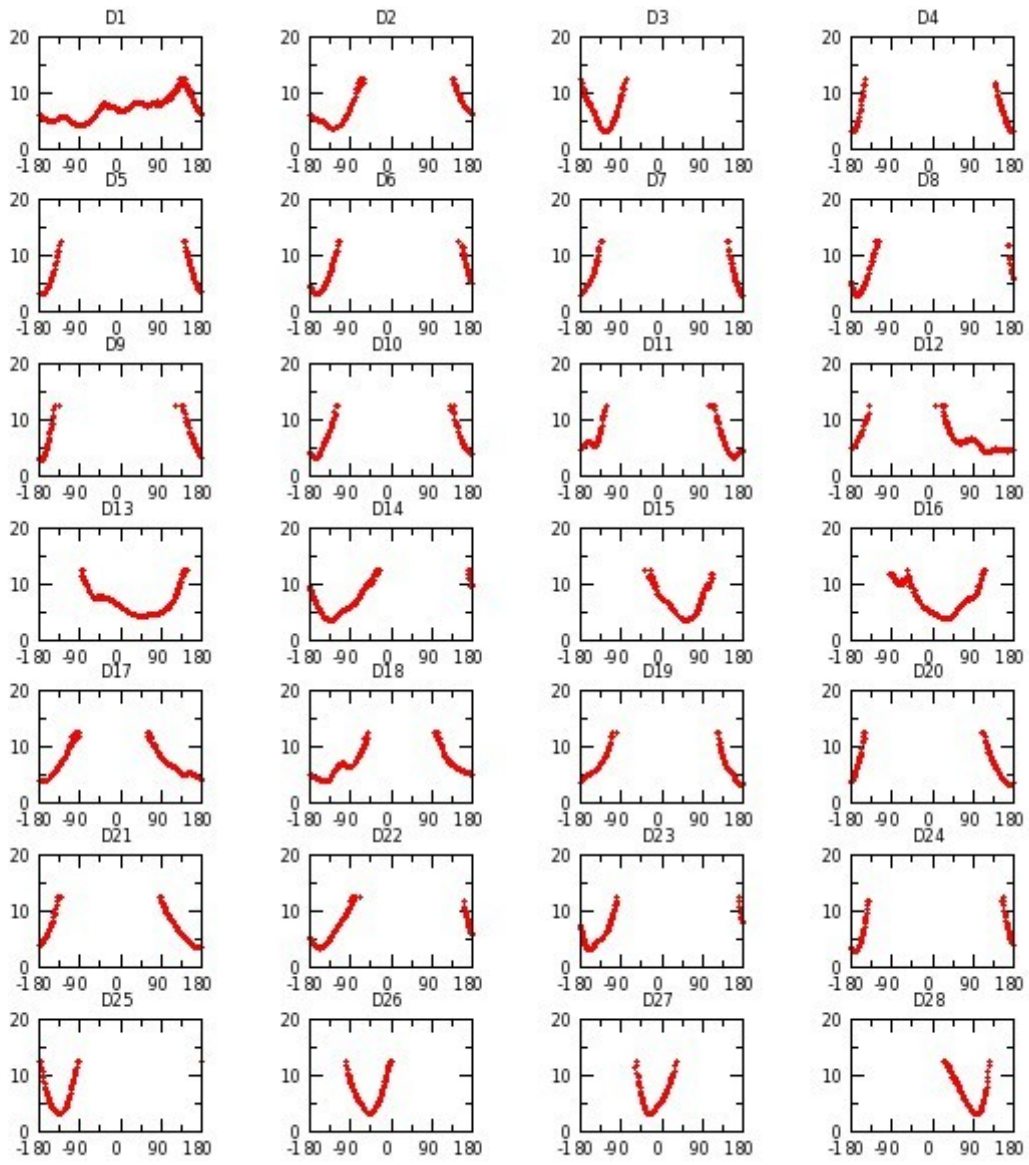


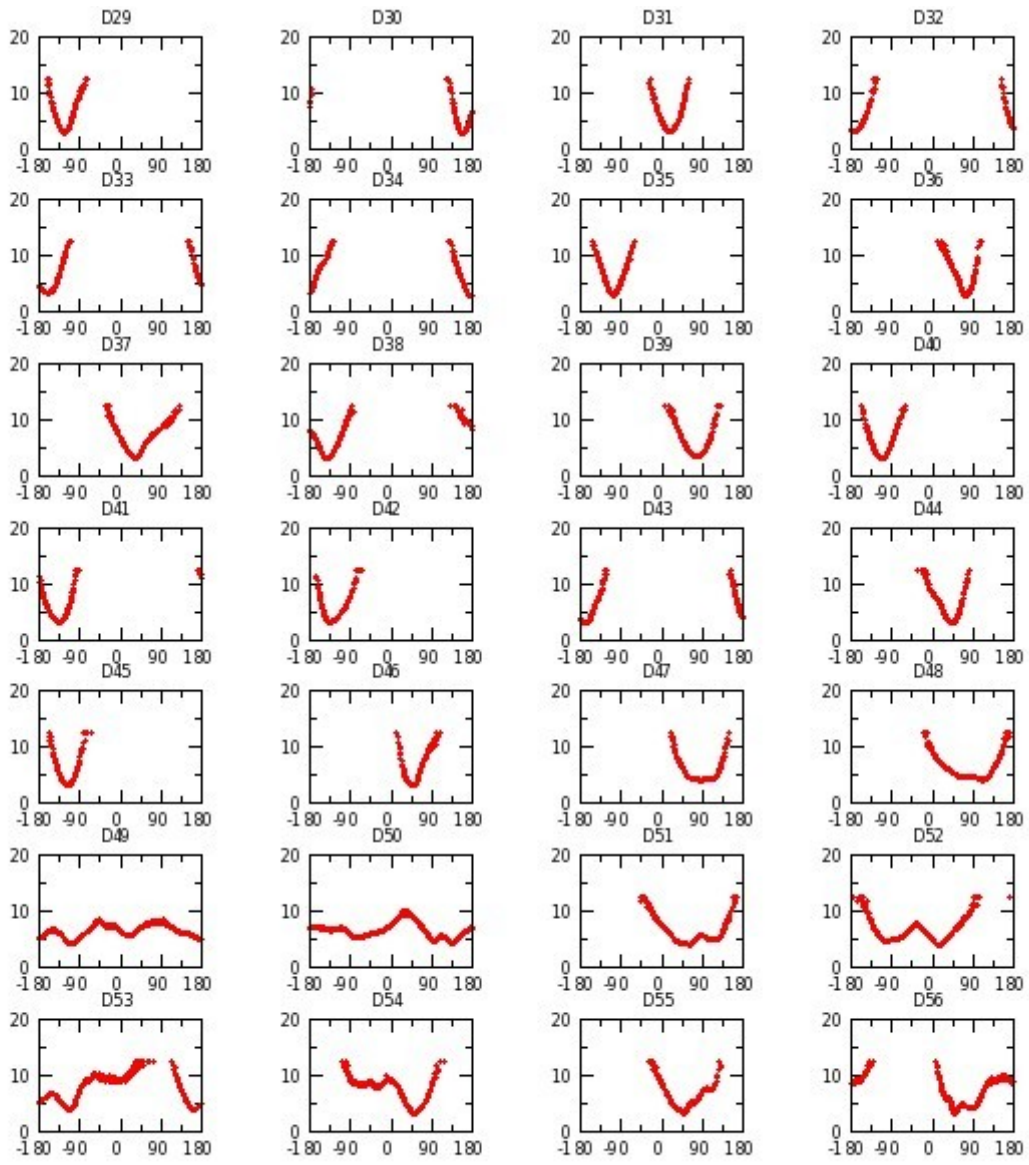


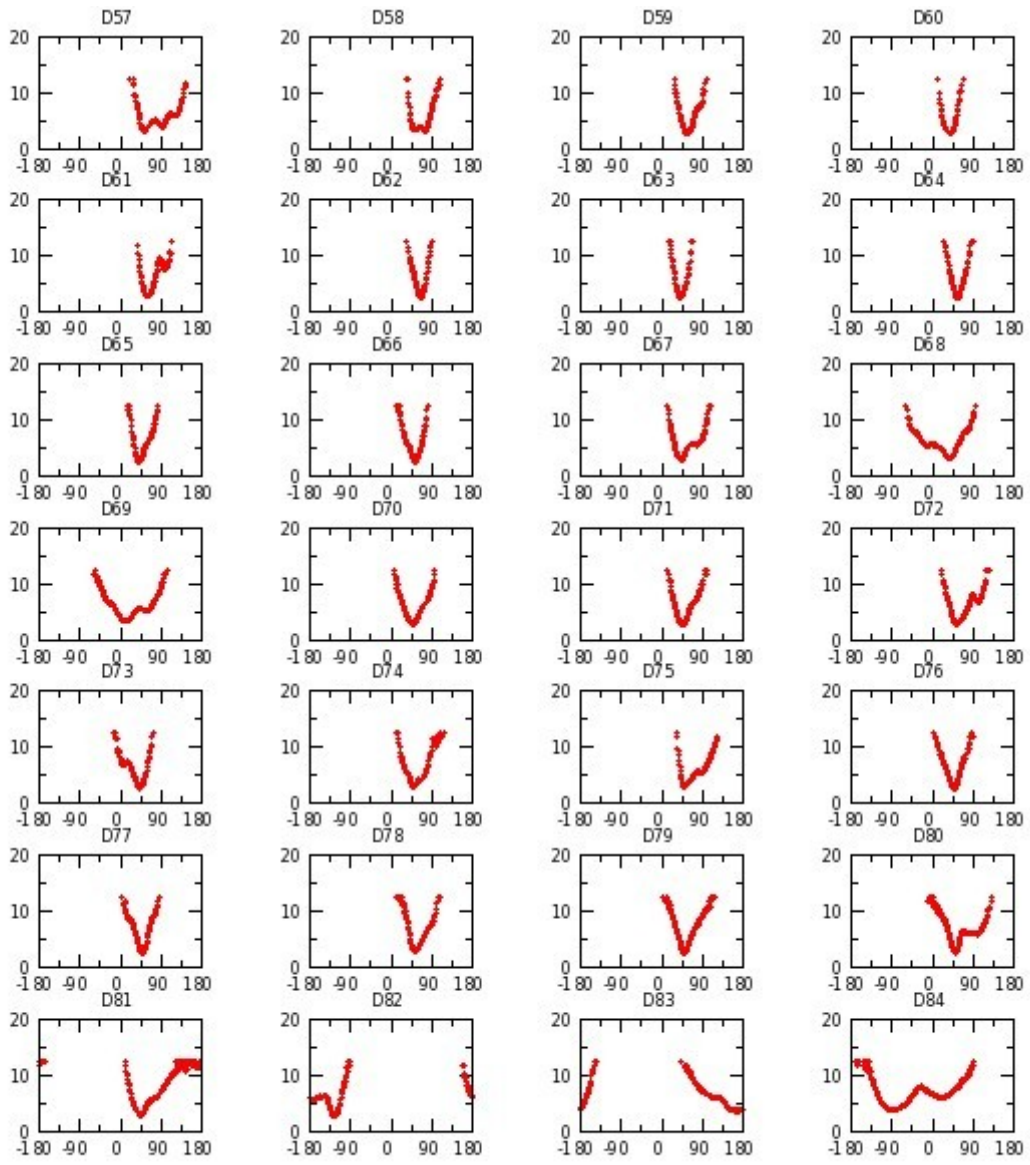


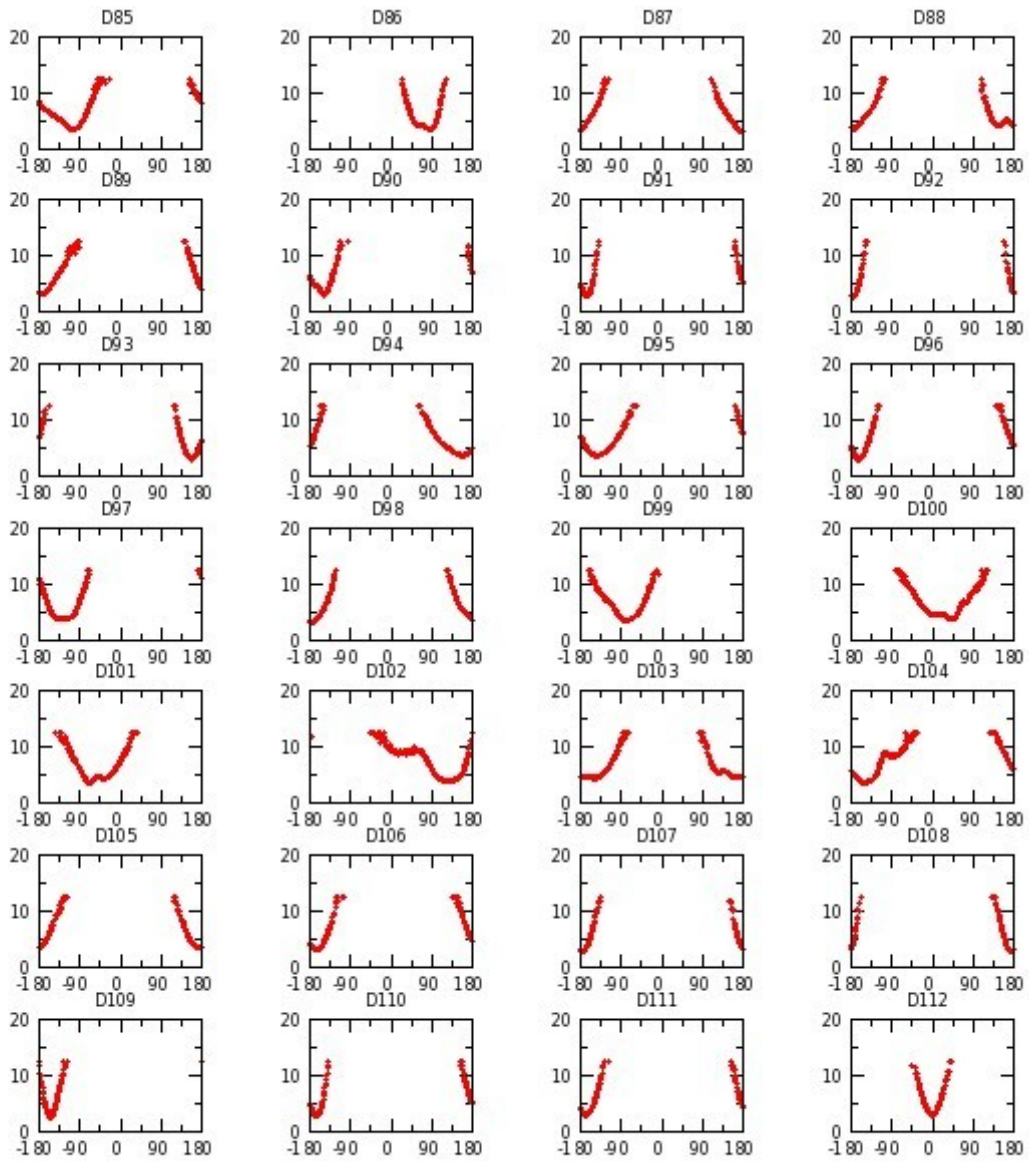


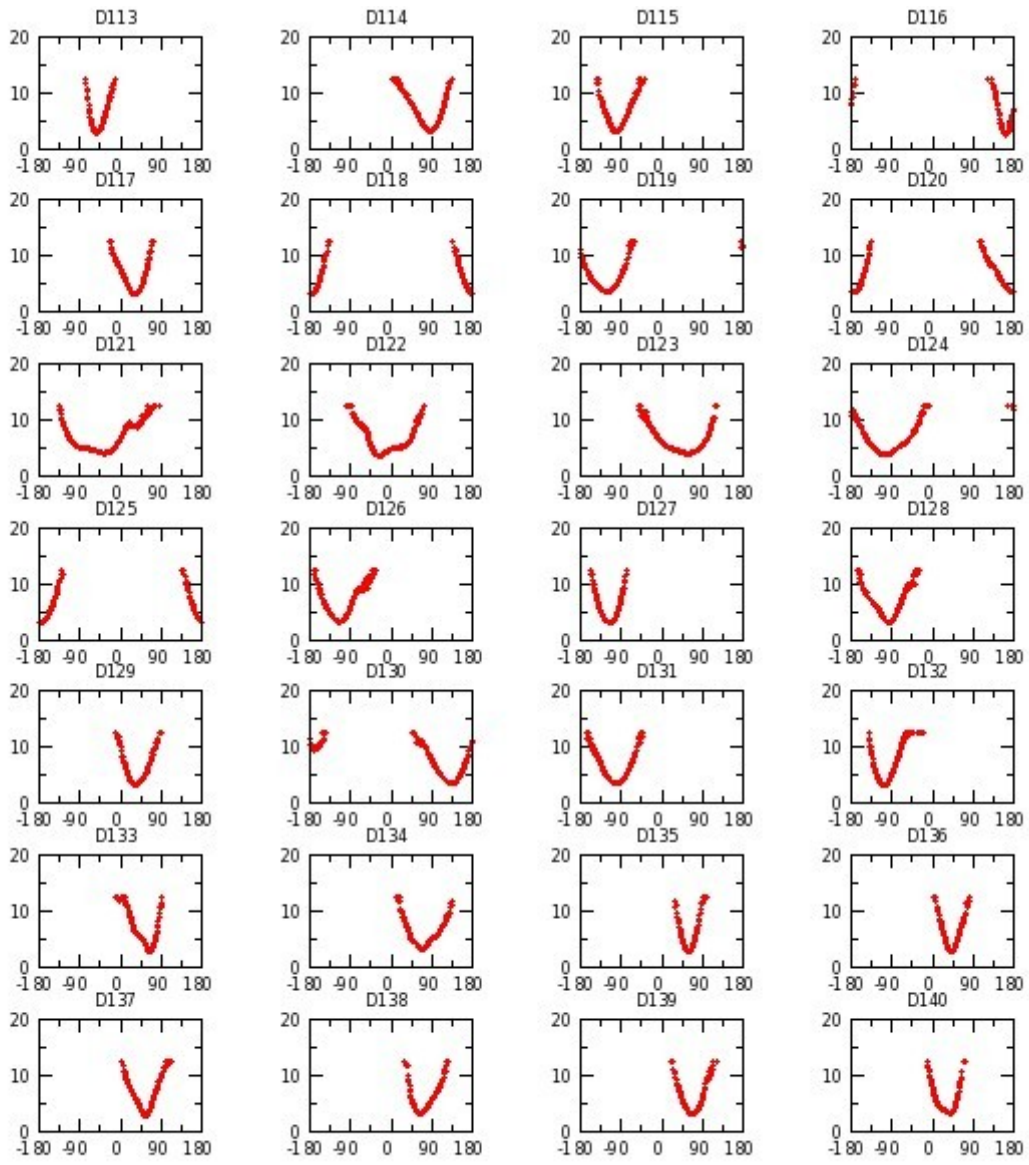
Annexe G 7 : H_CD1d réplique I

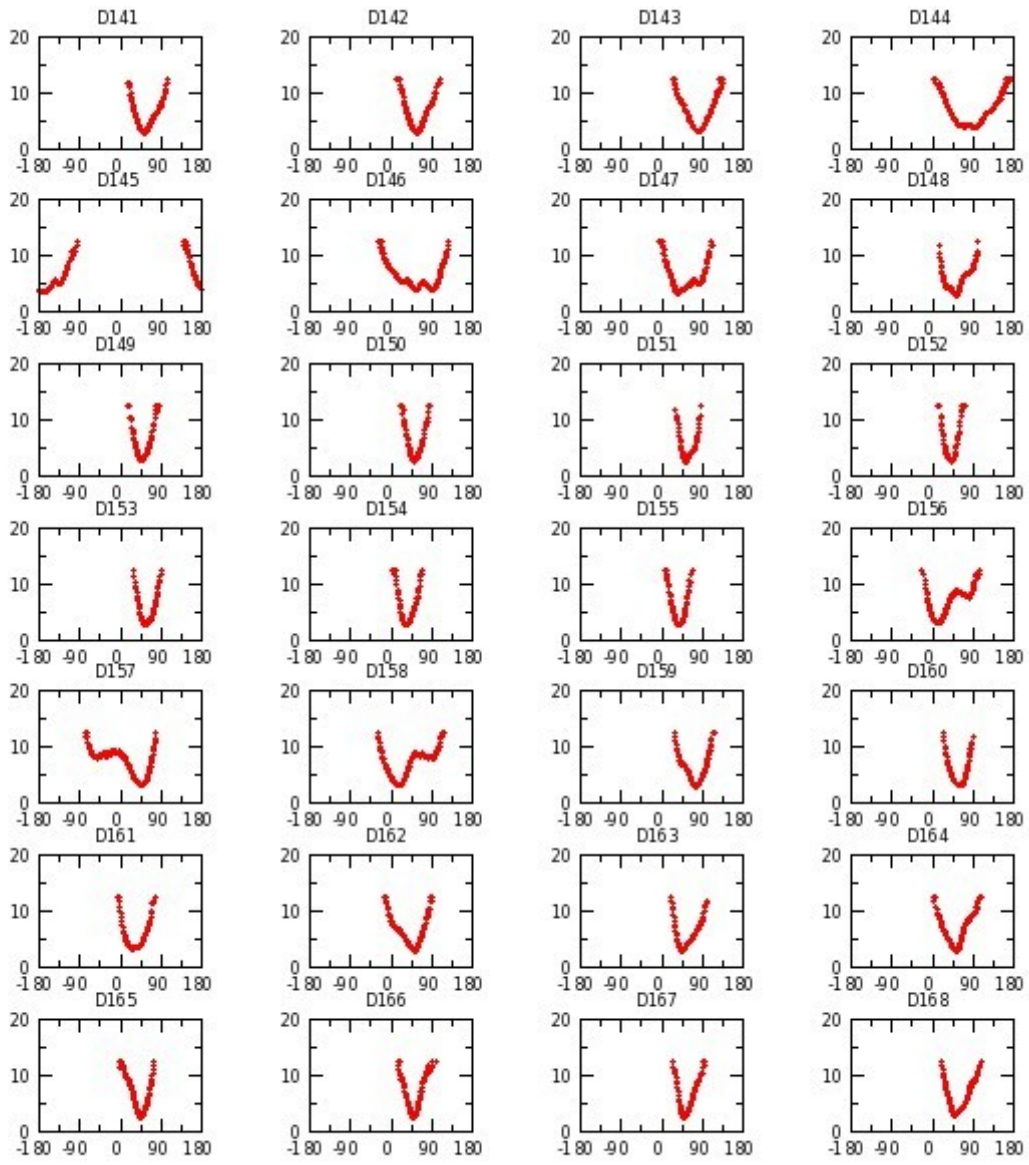


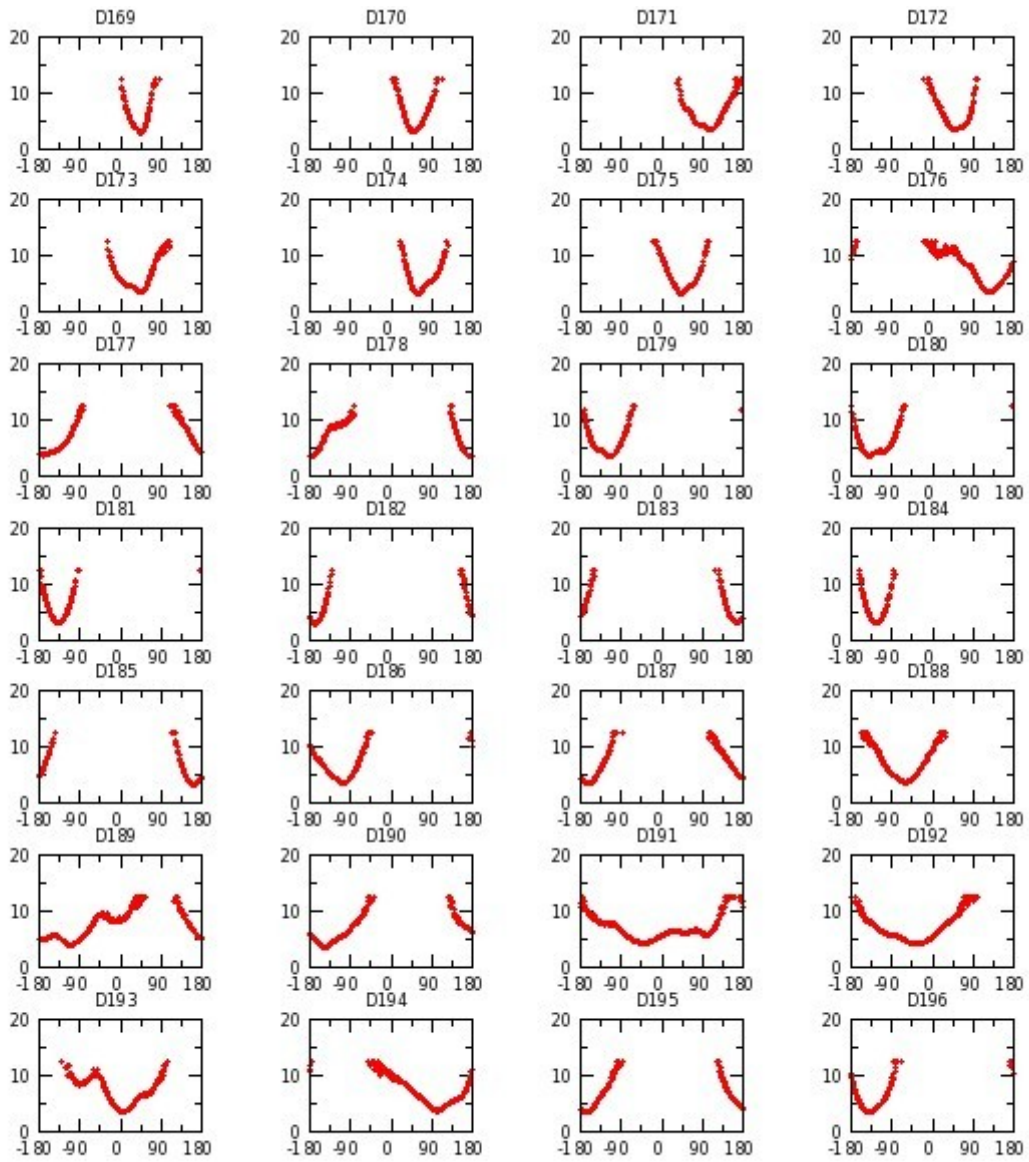


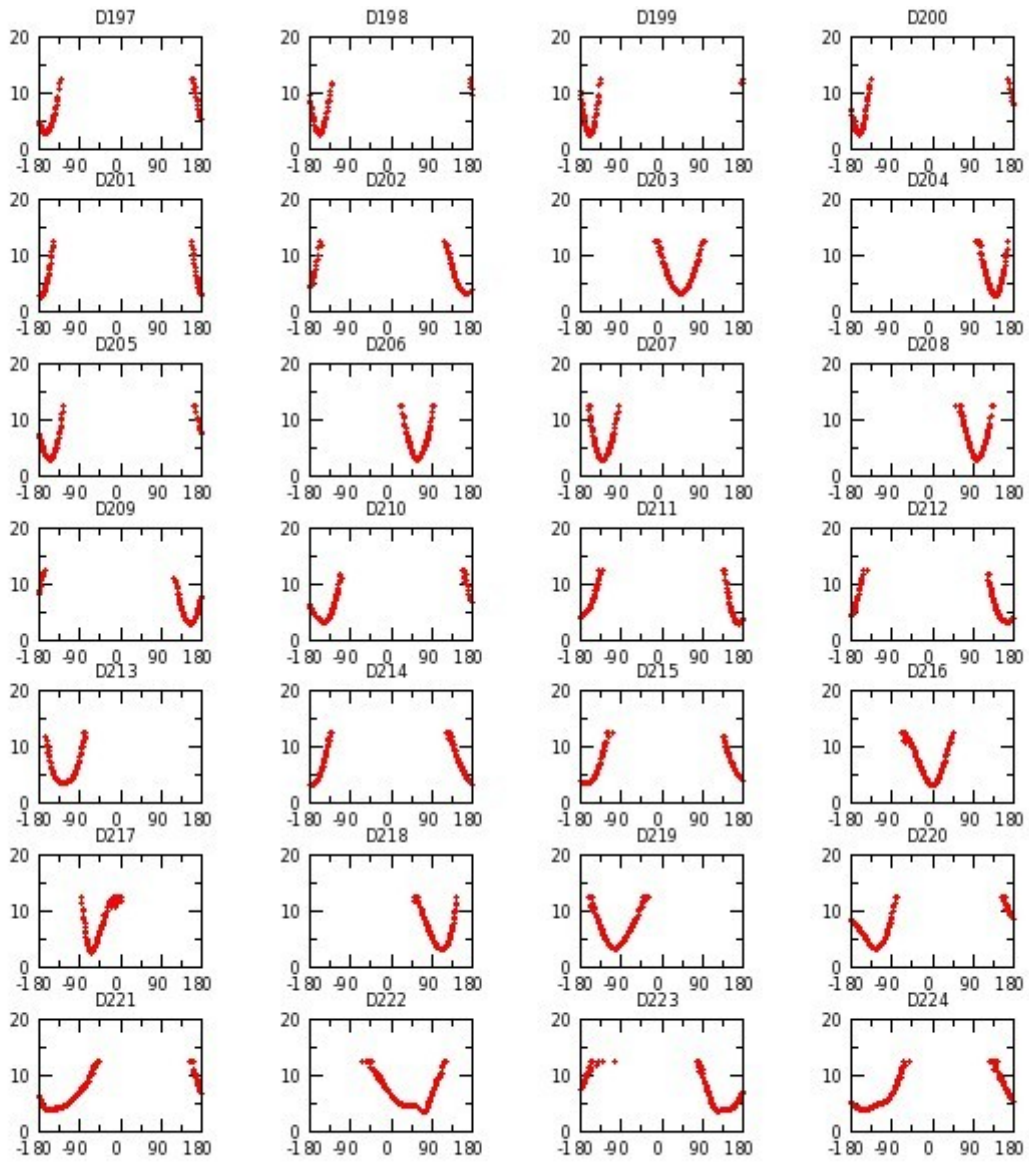


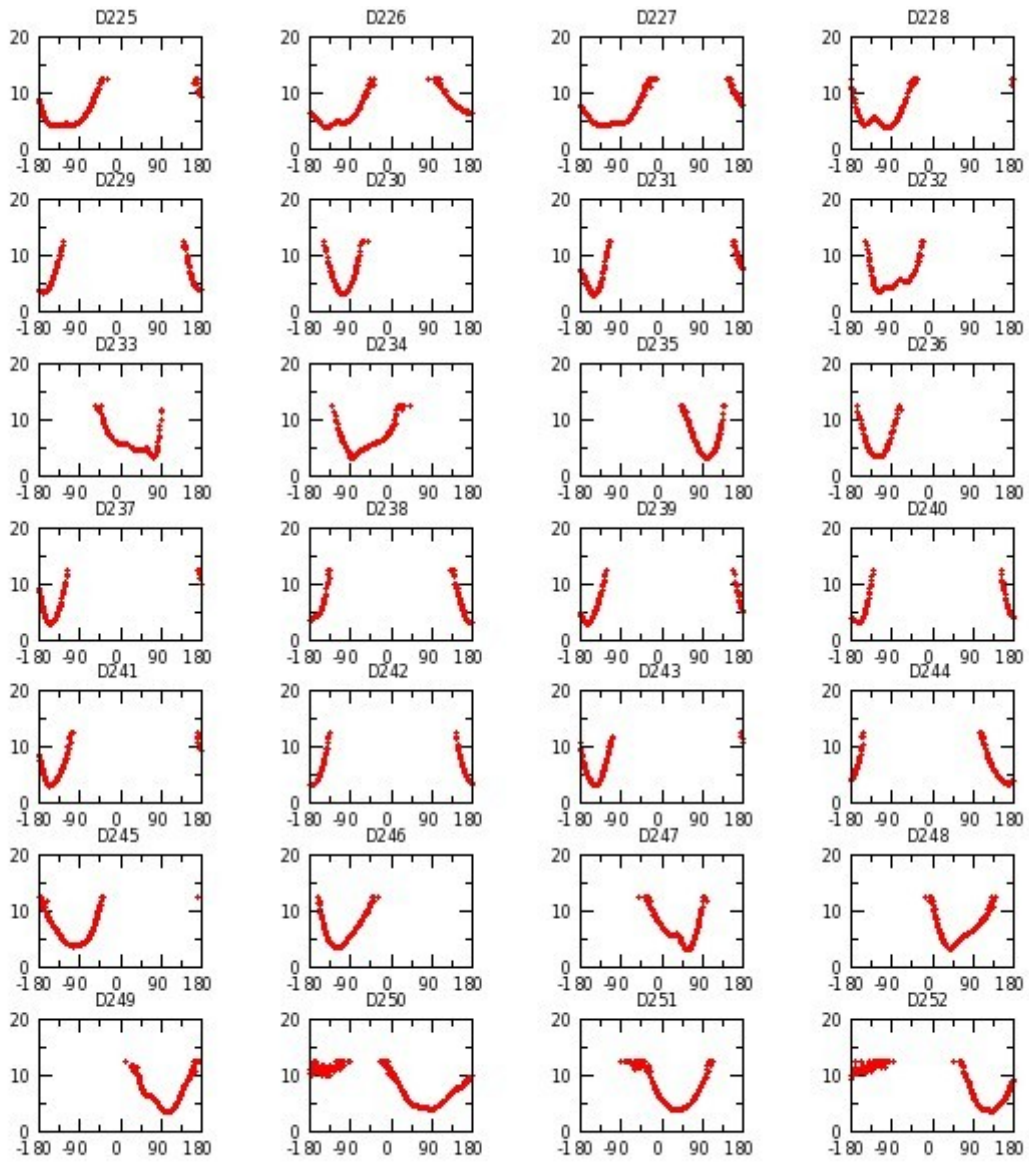


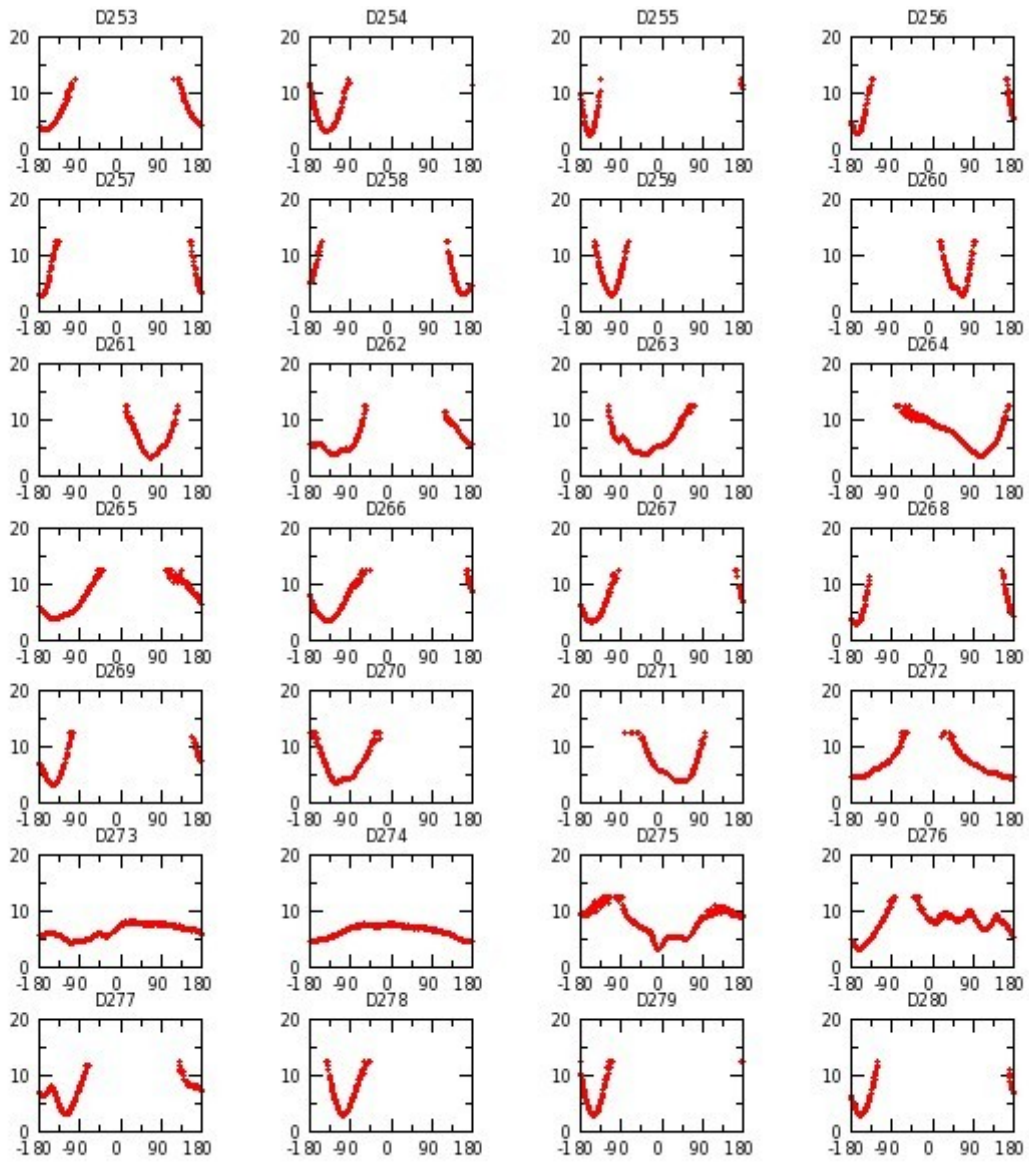


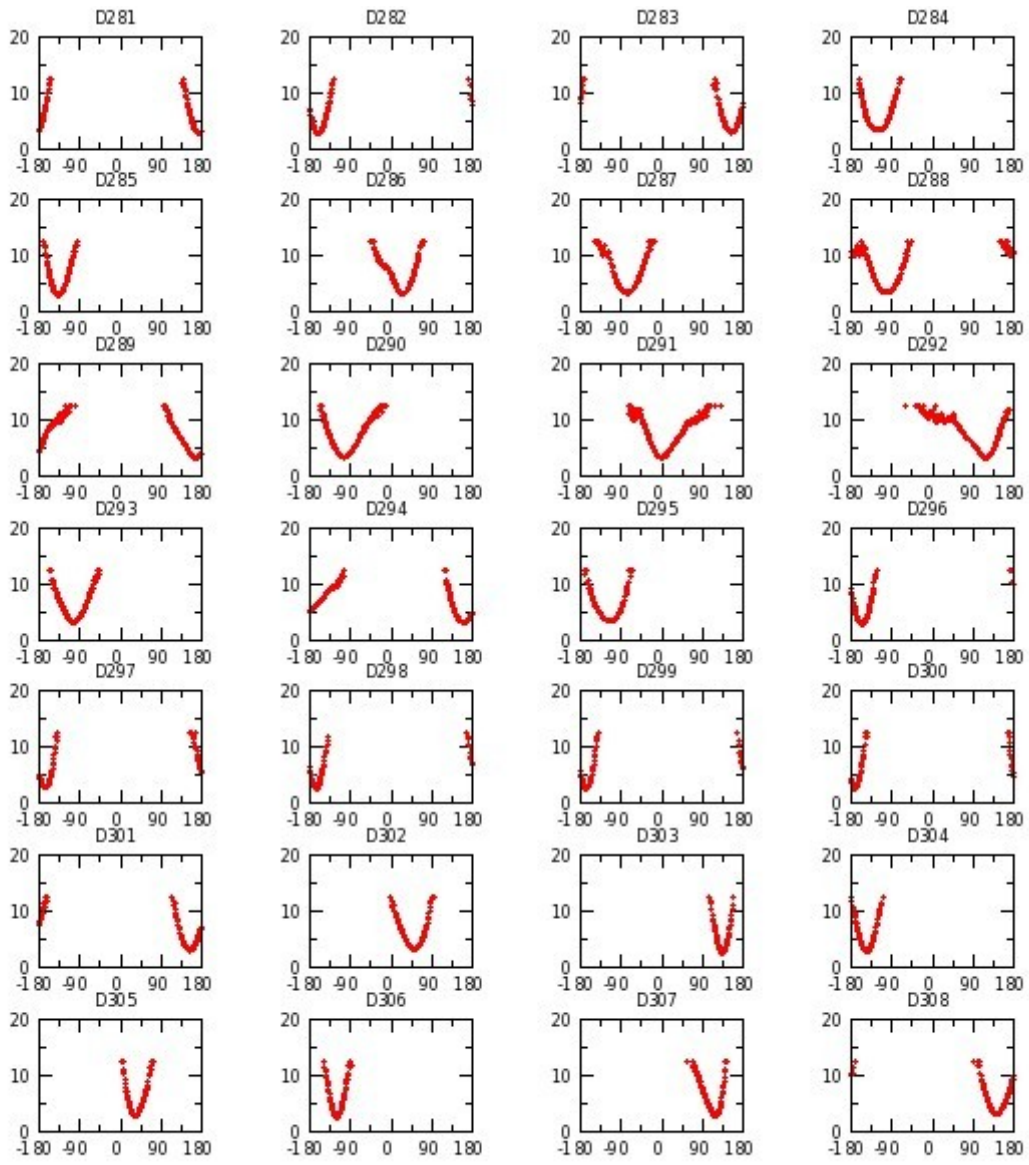


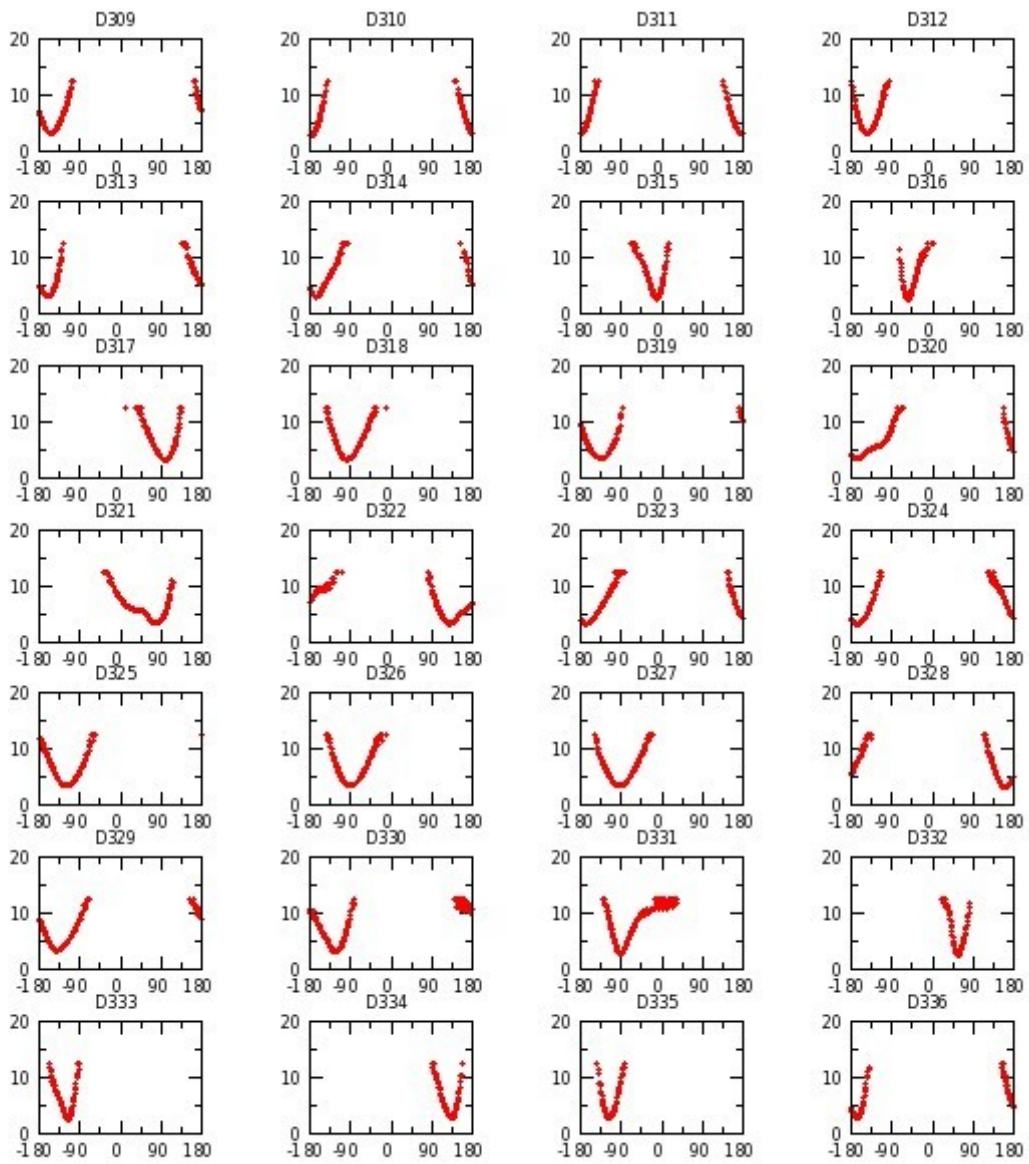


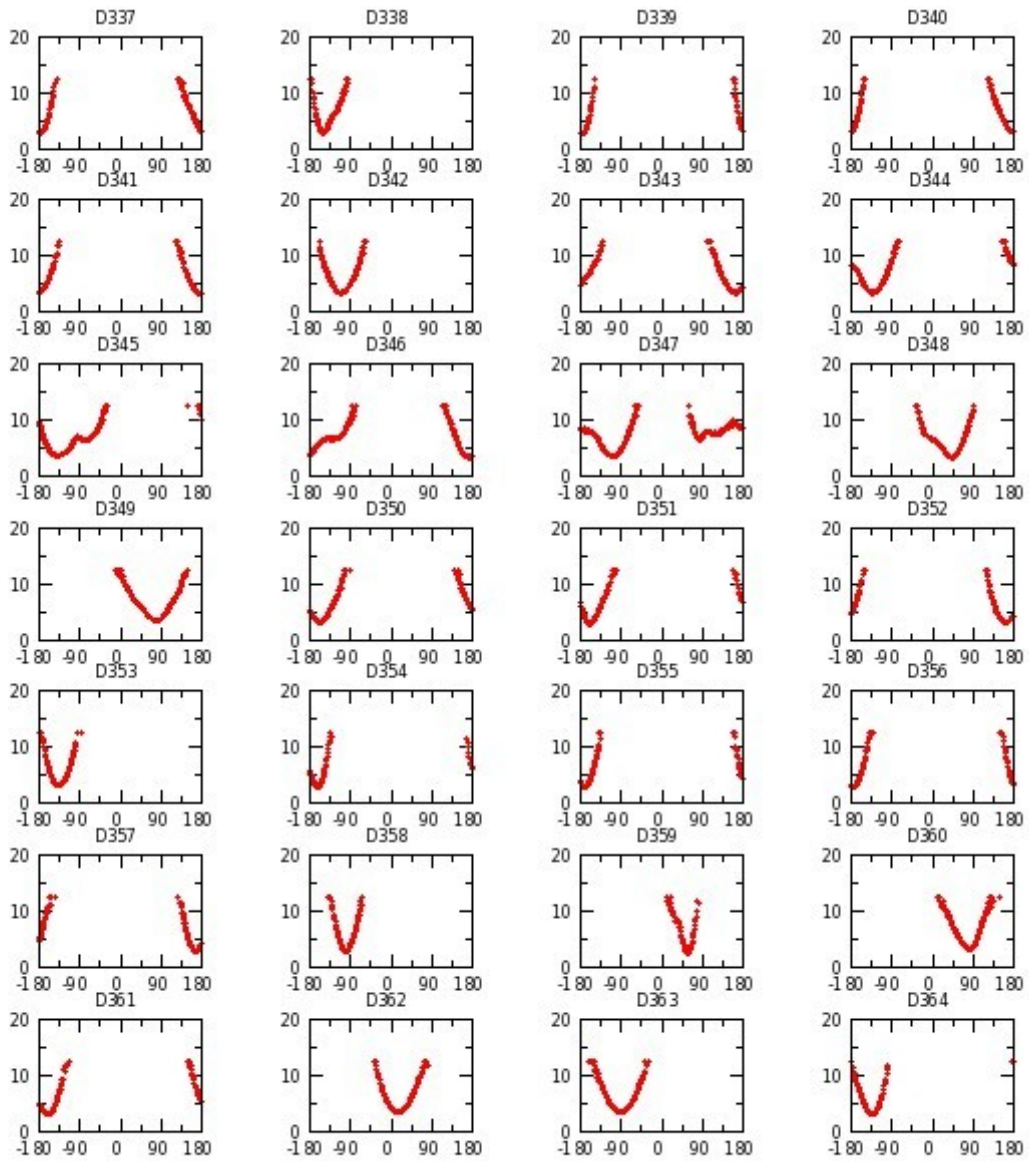


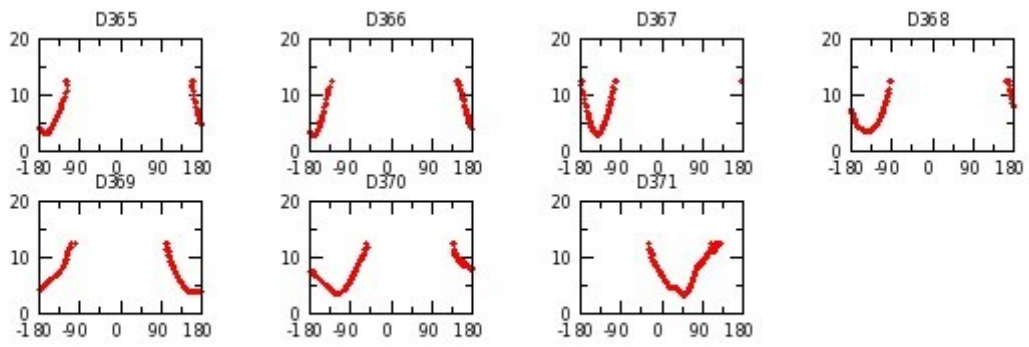




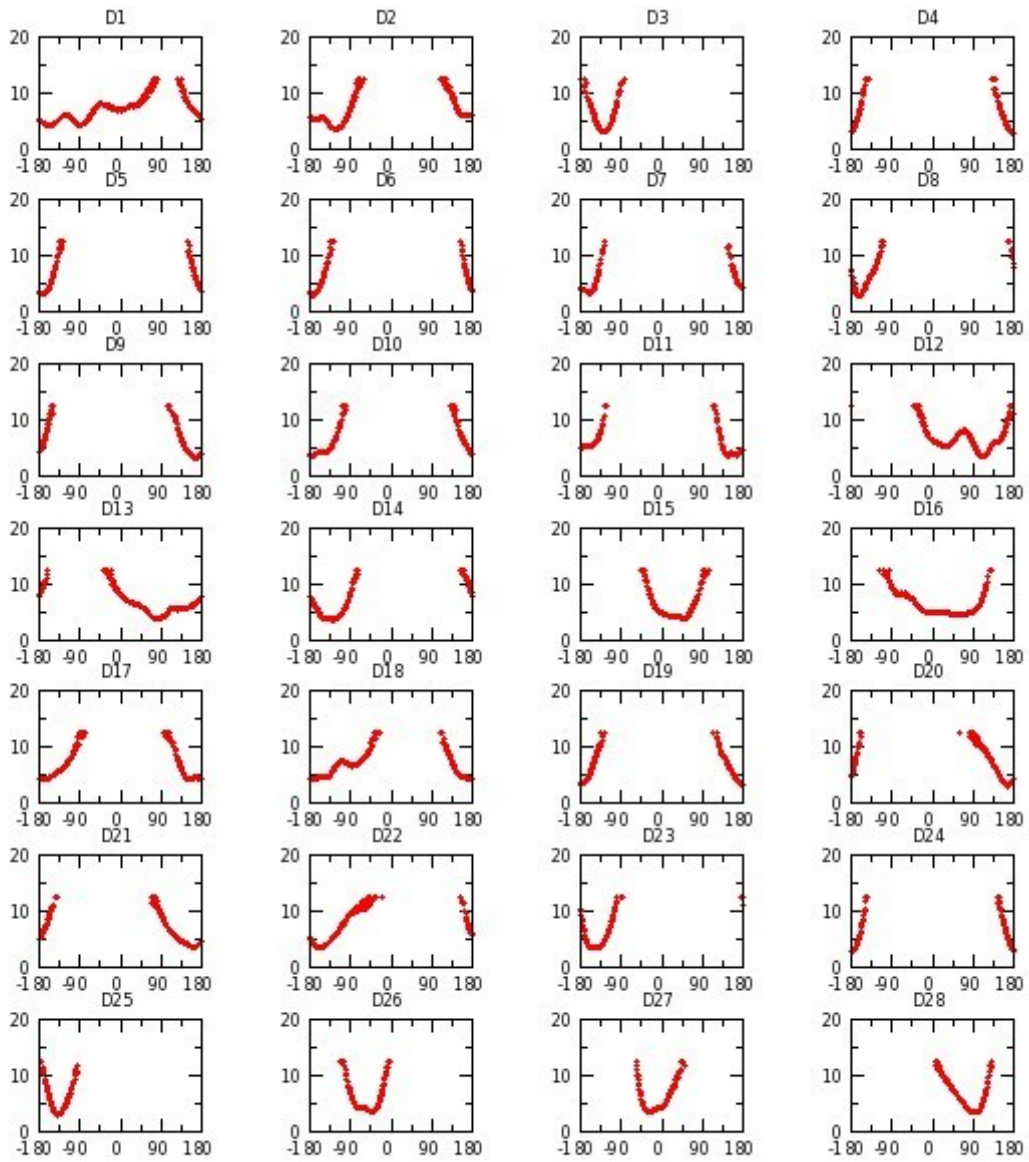


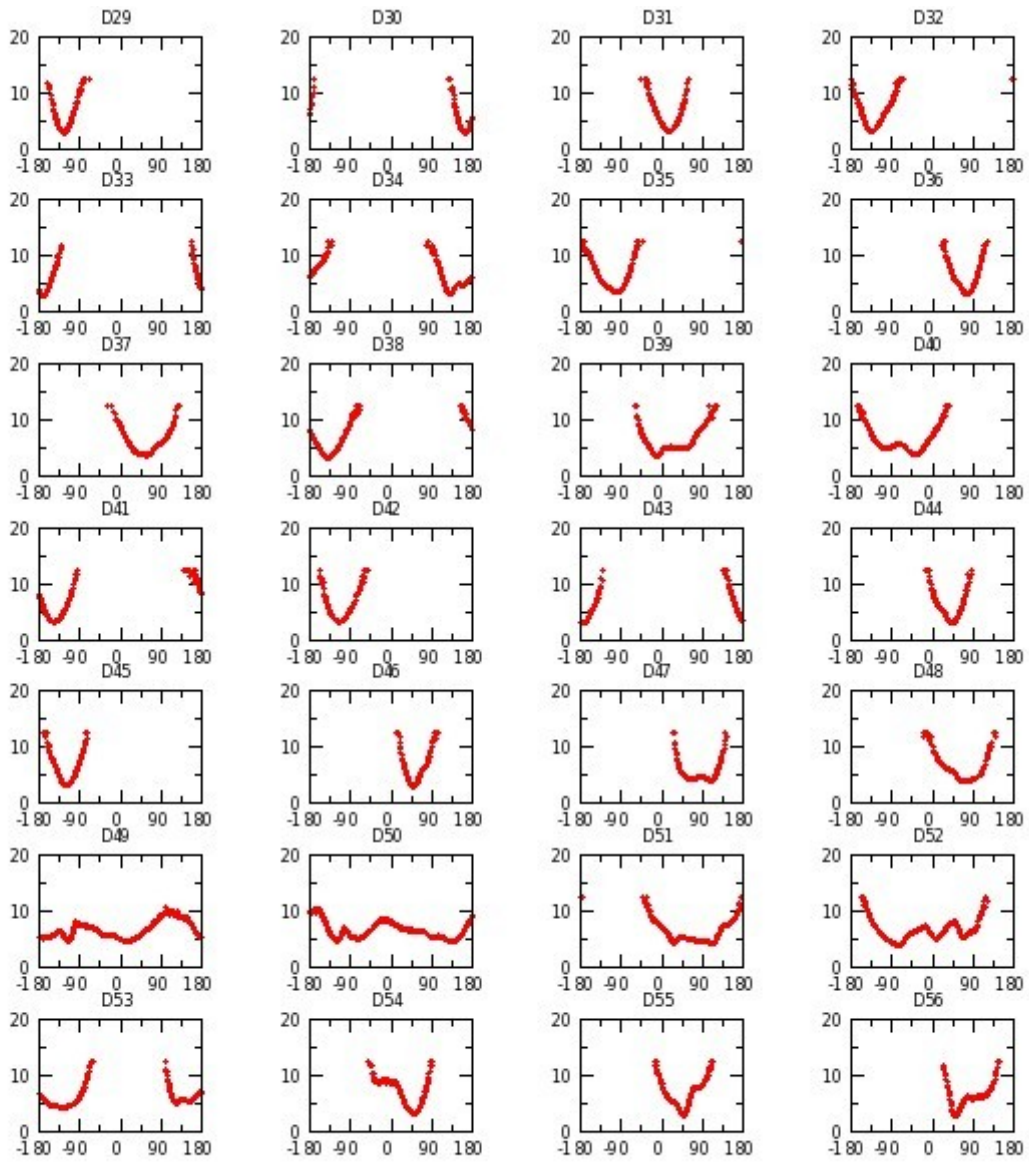


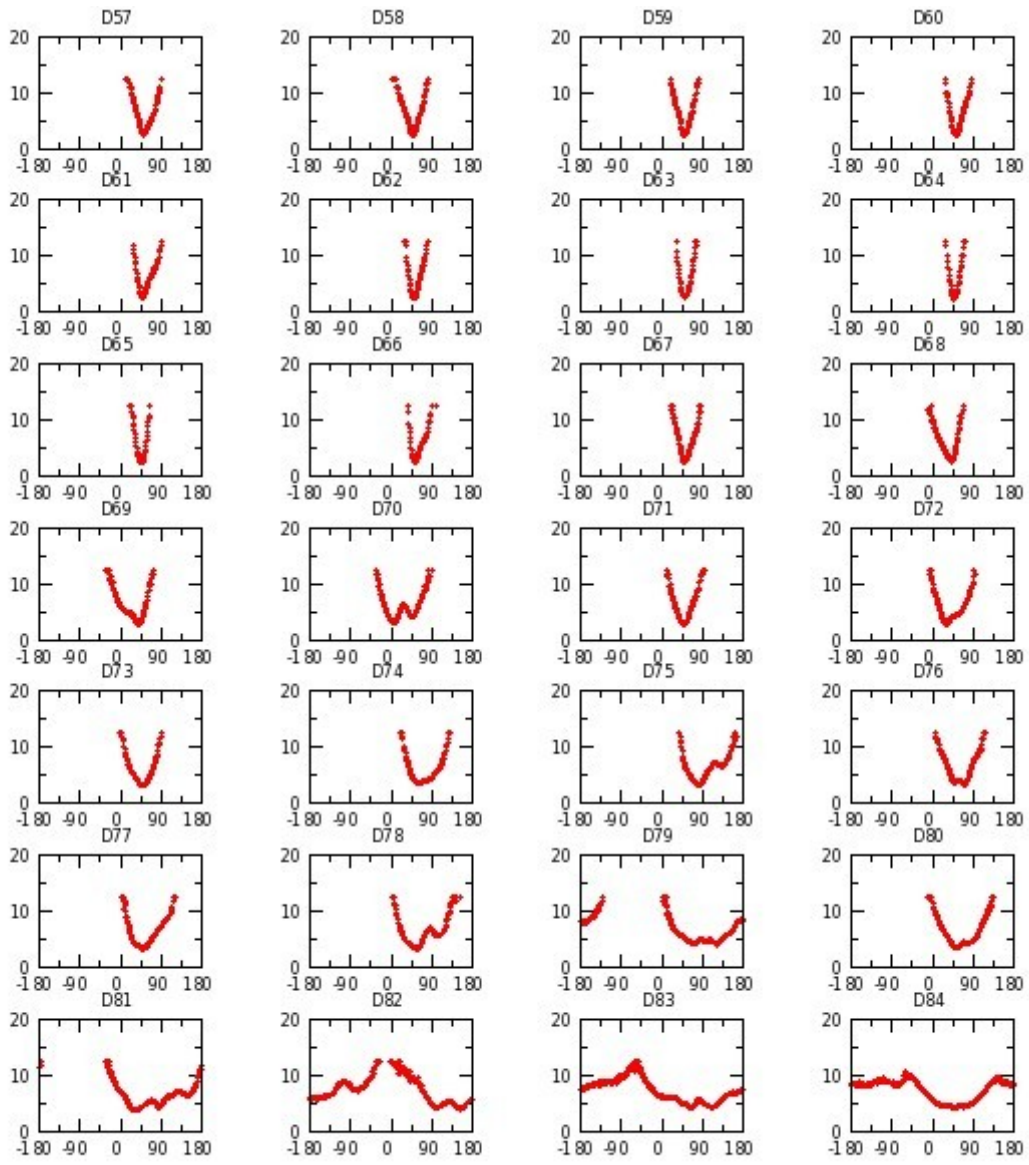


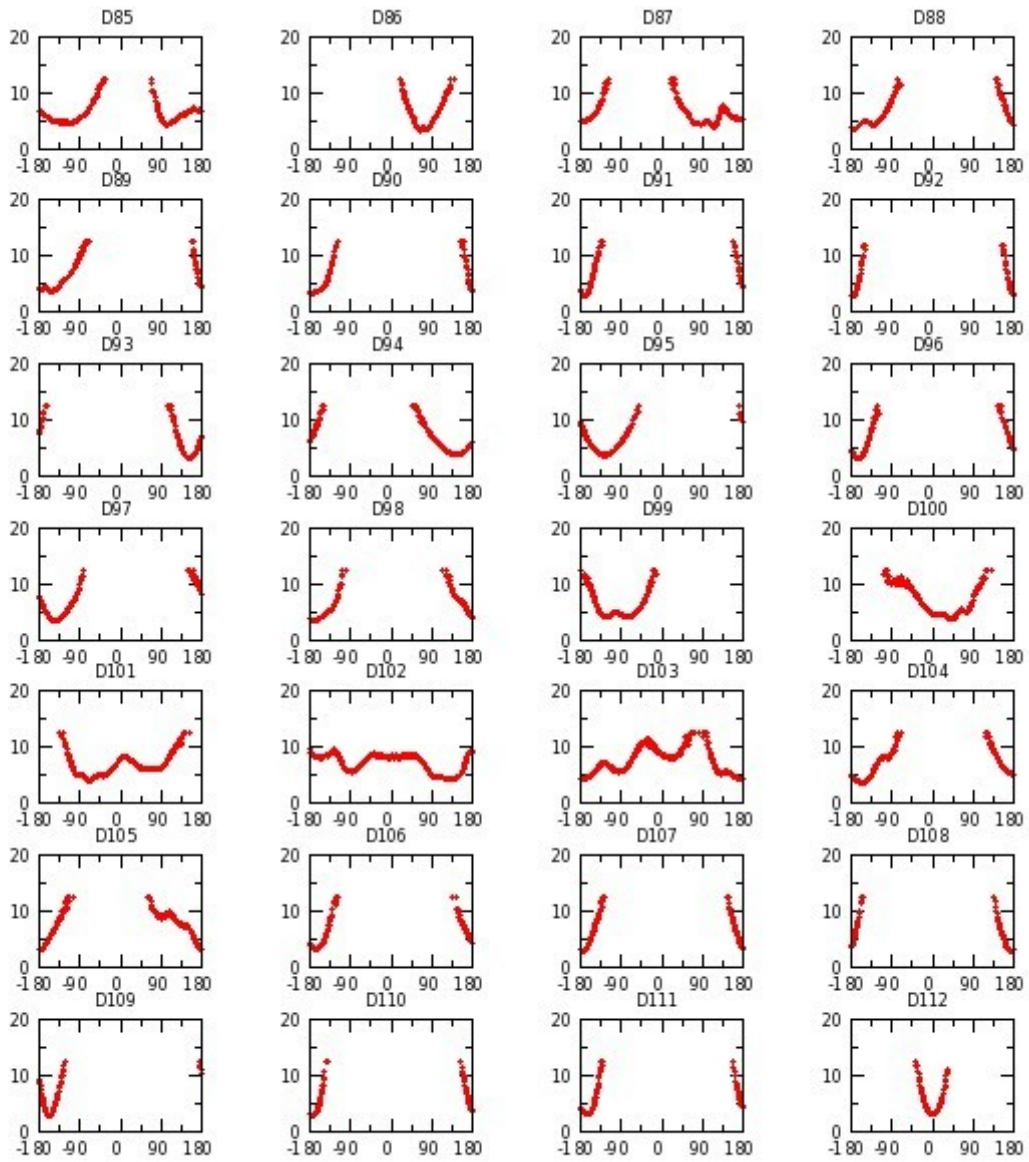


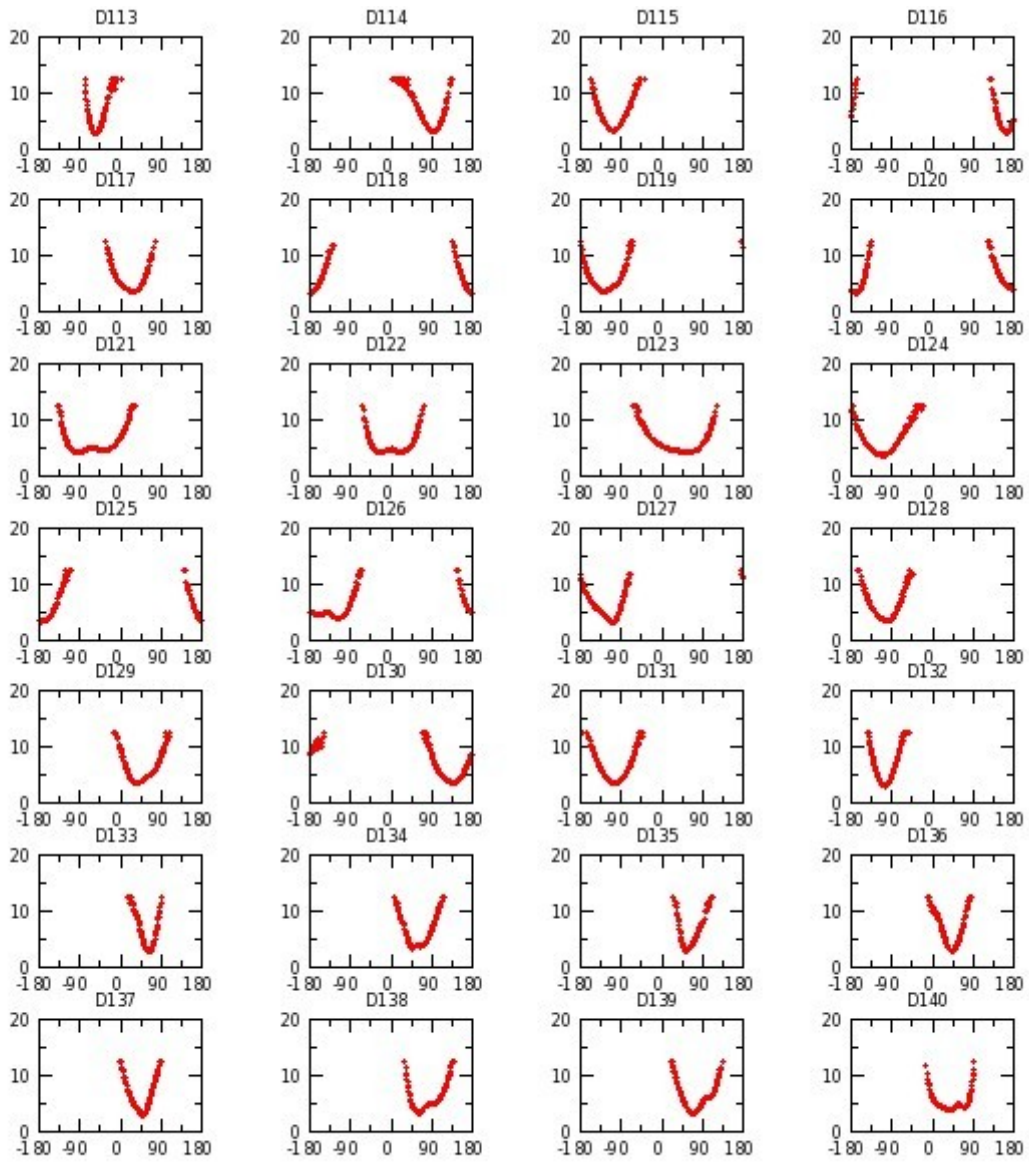
Annexe G 8 : H_CD1d réplique II

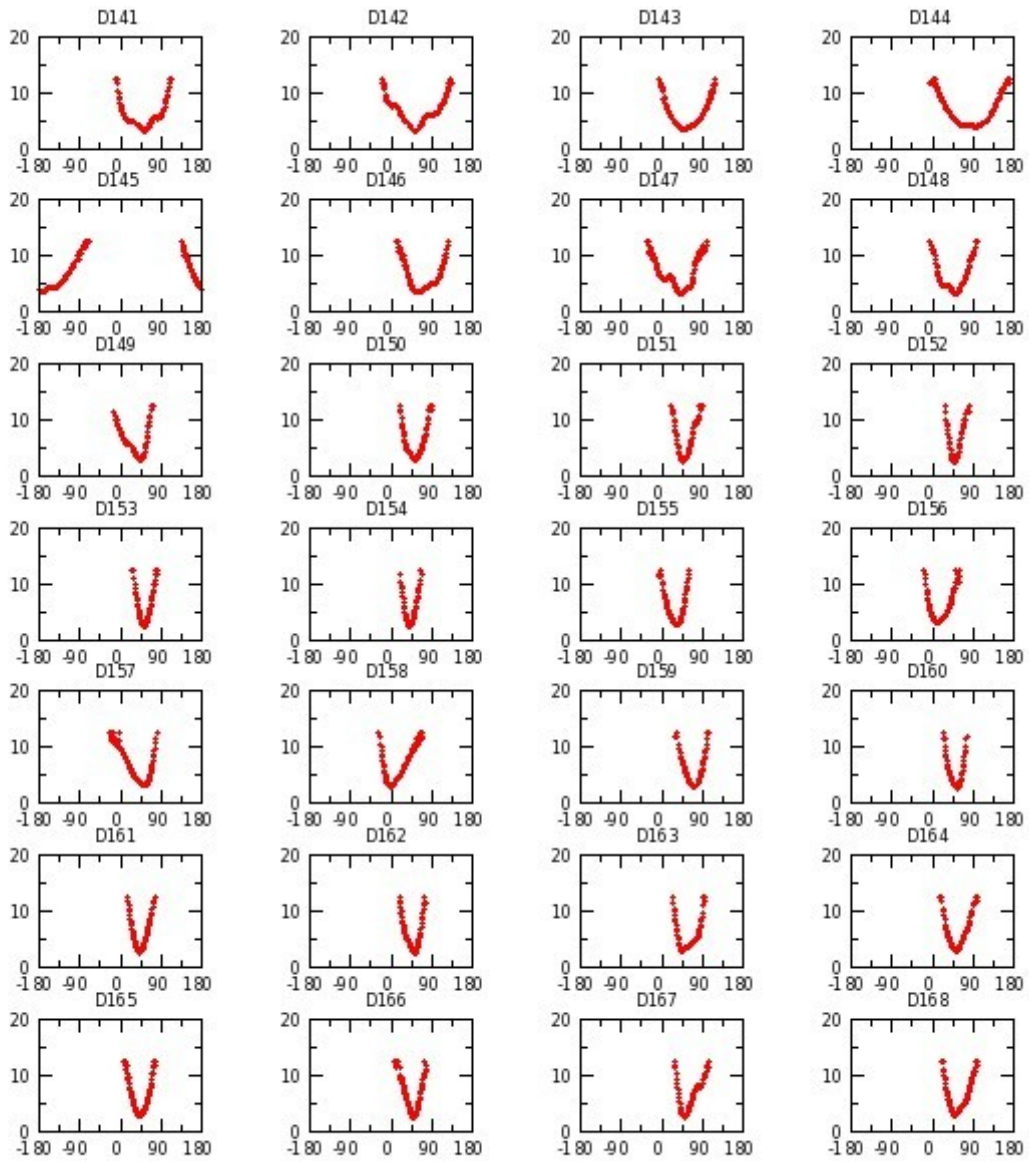


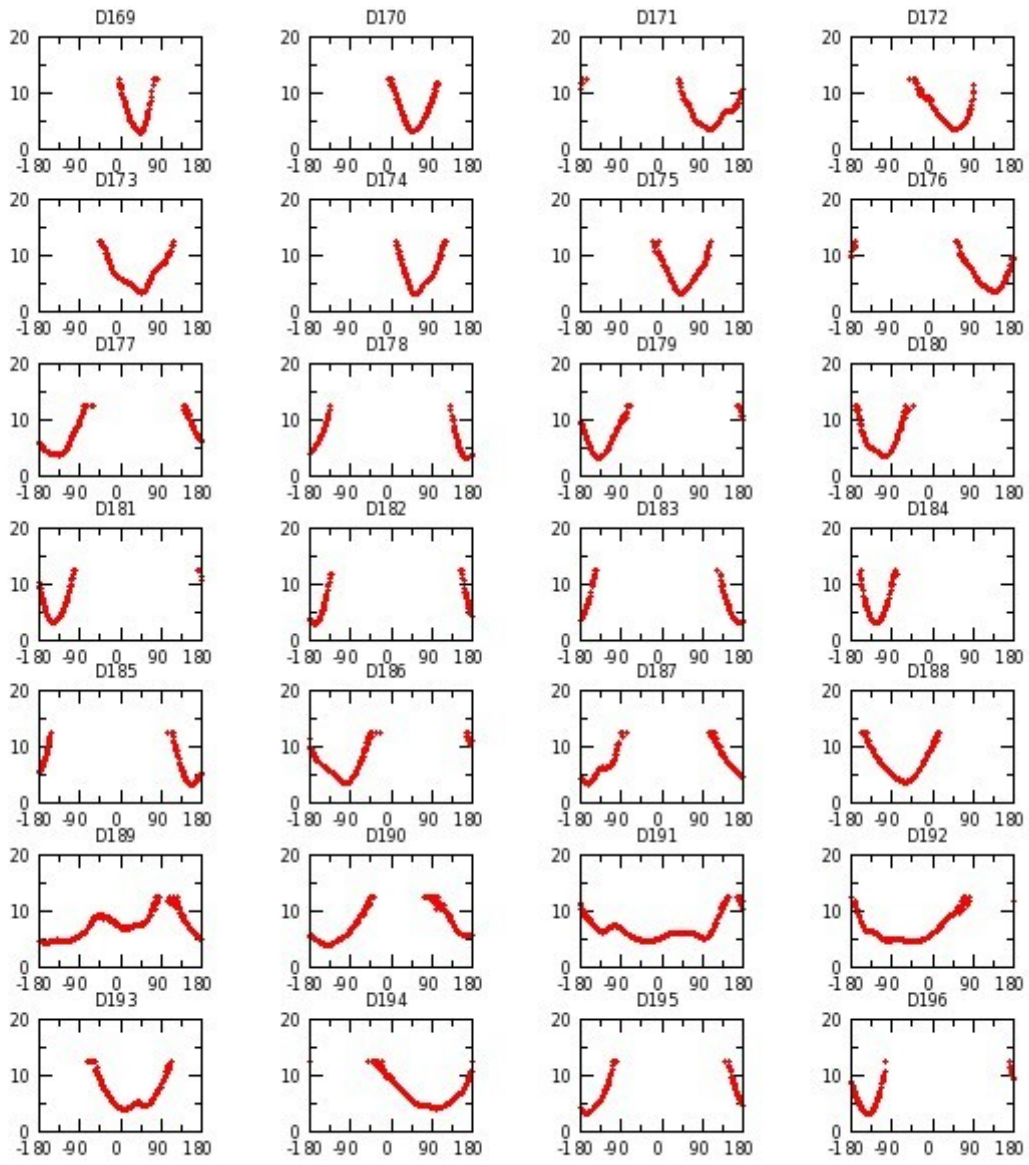


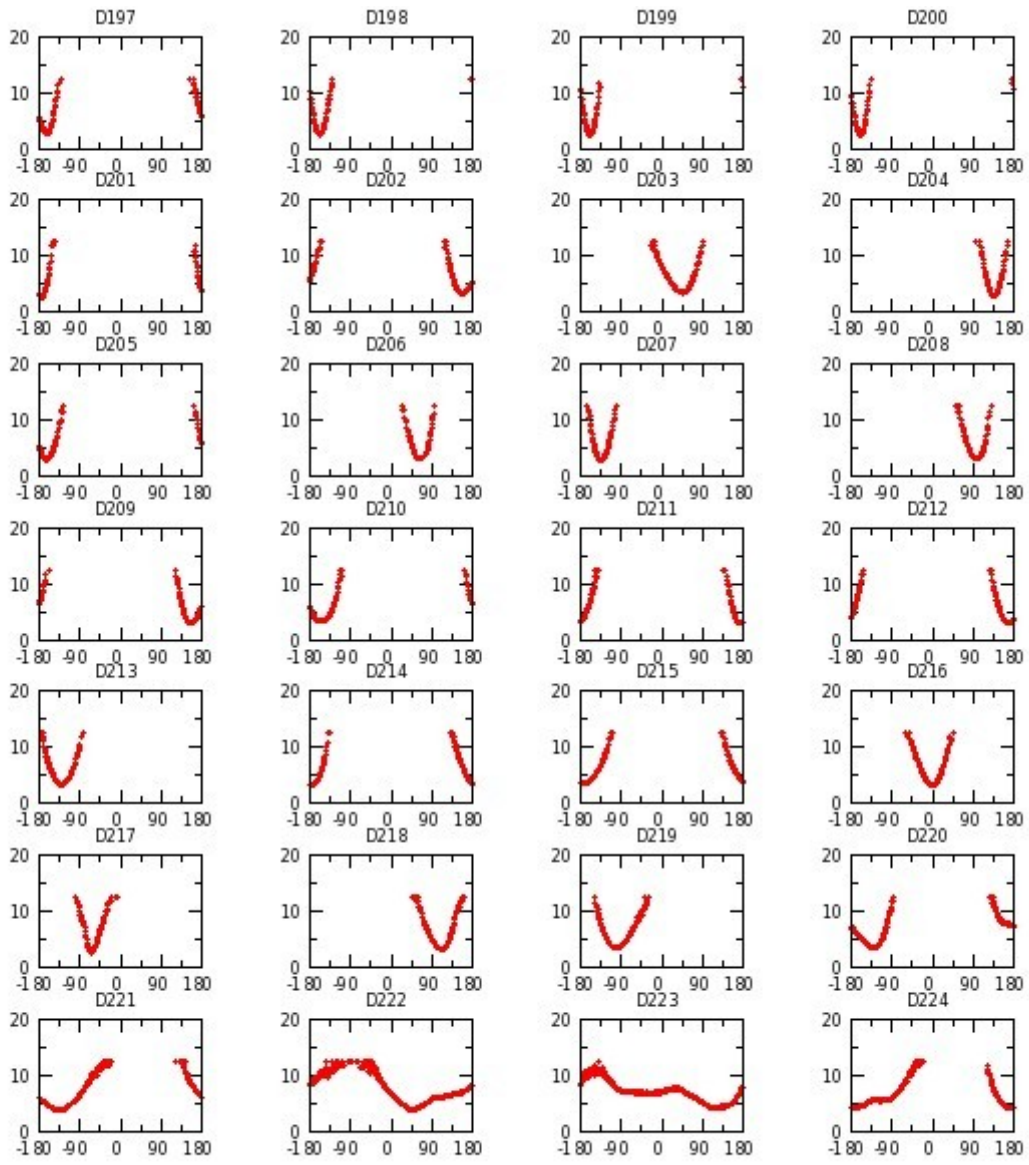


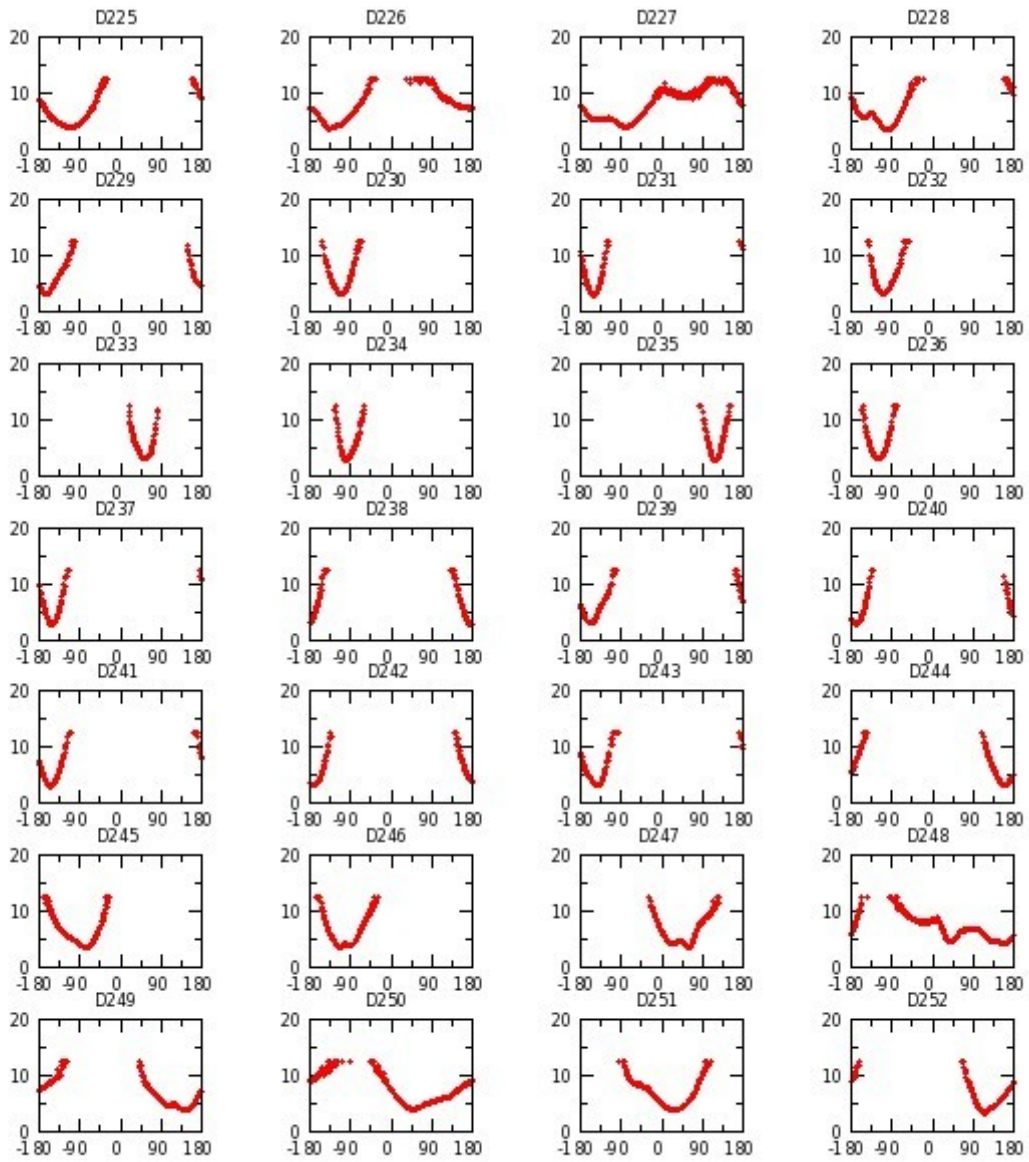


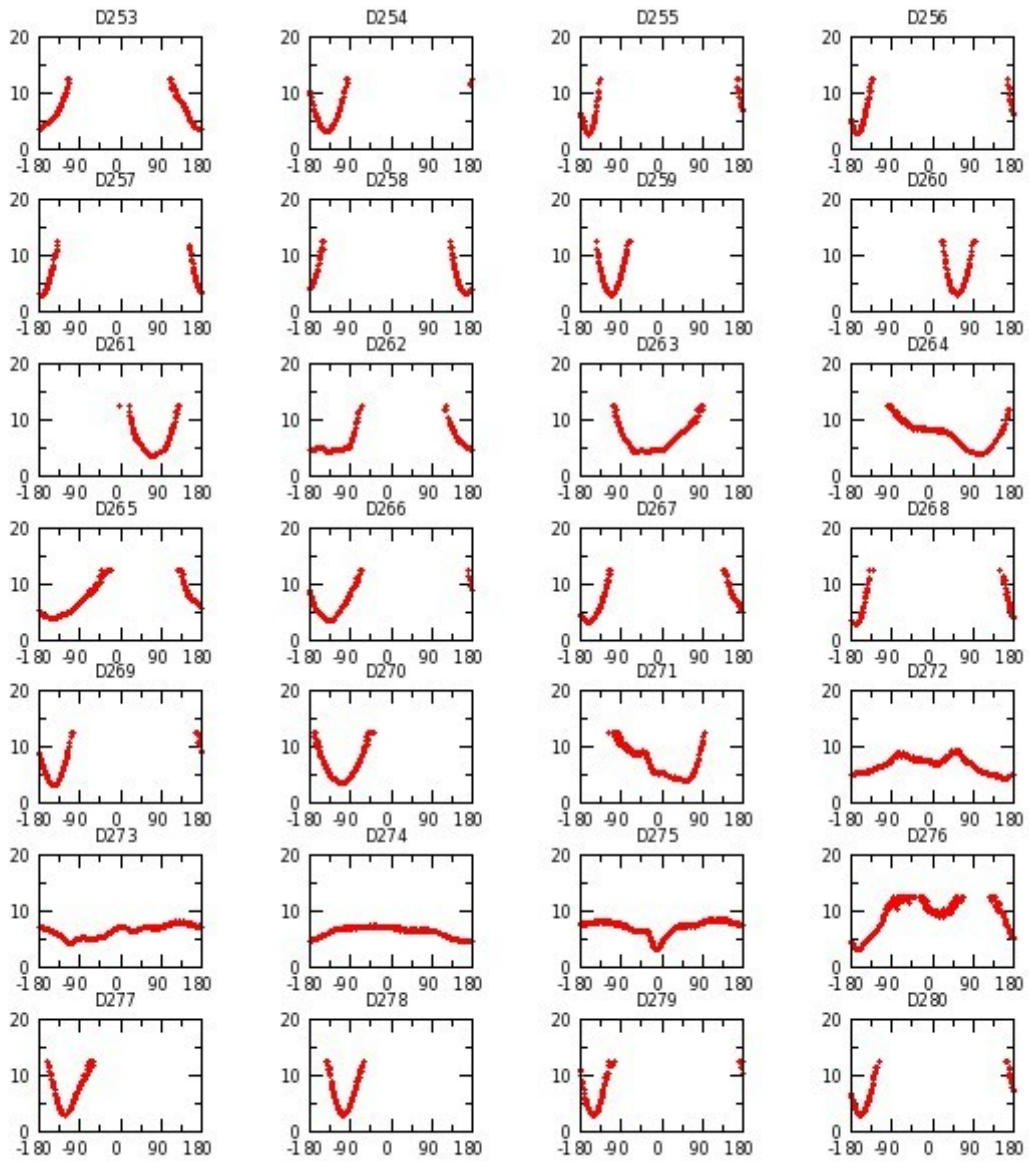


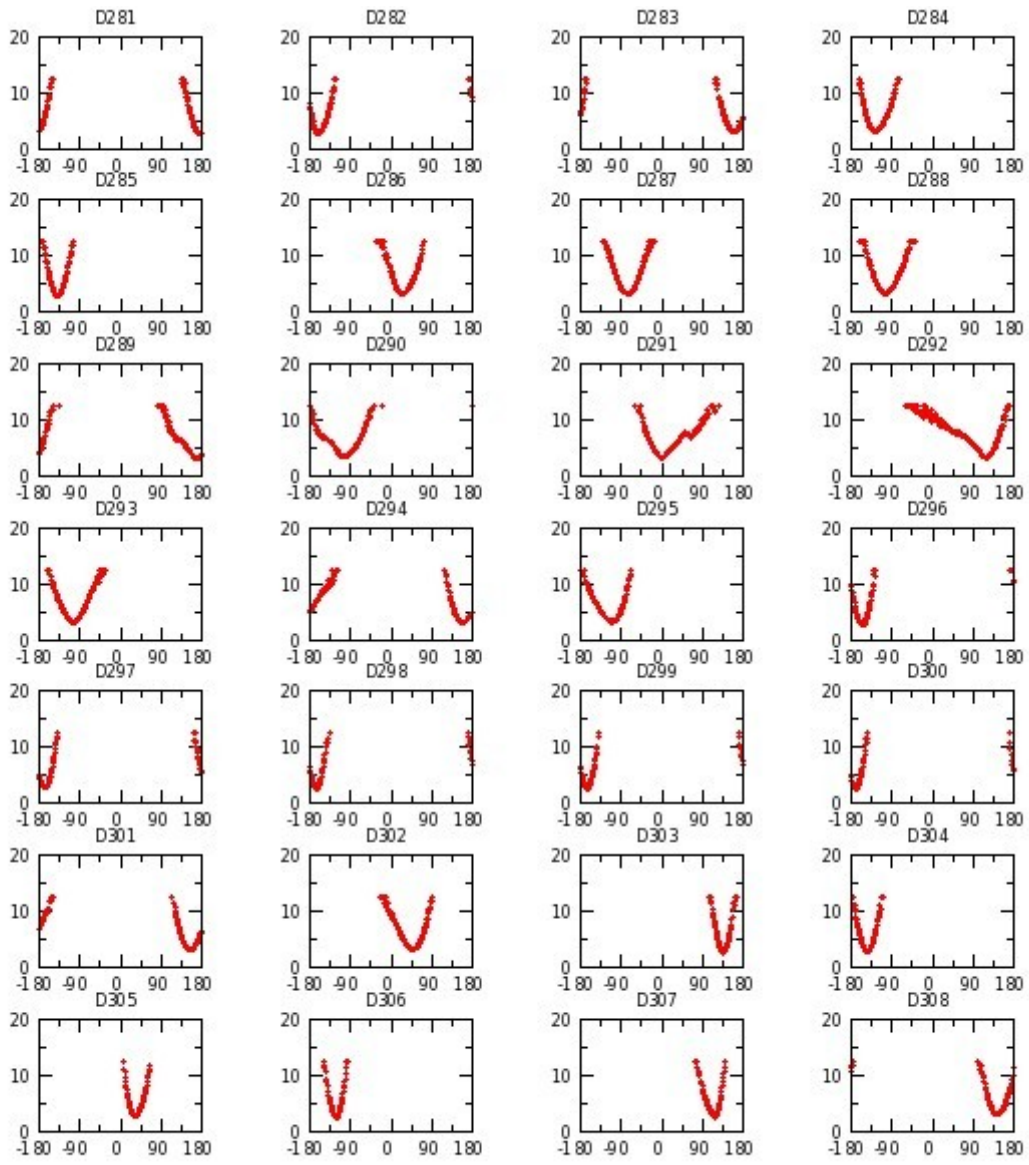


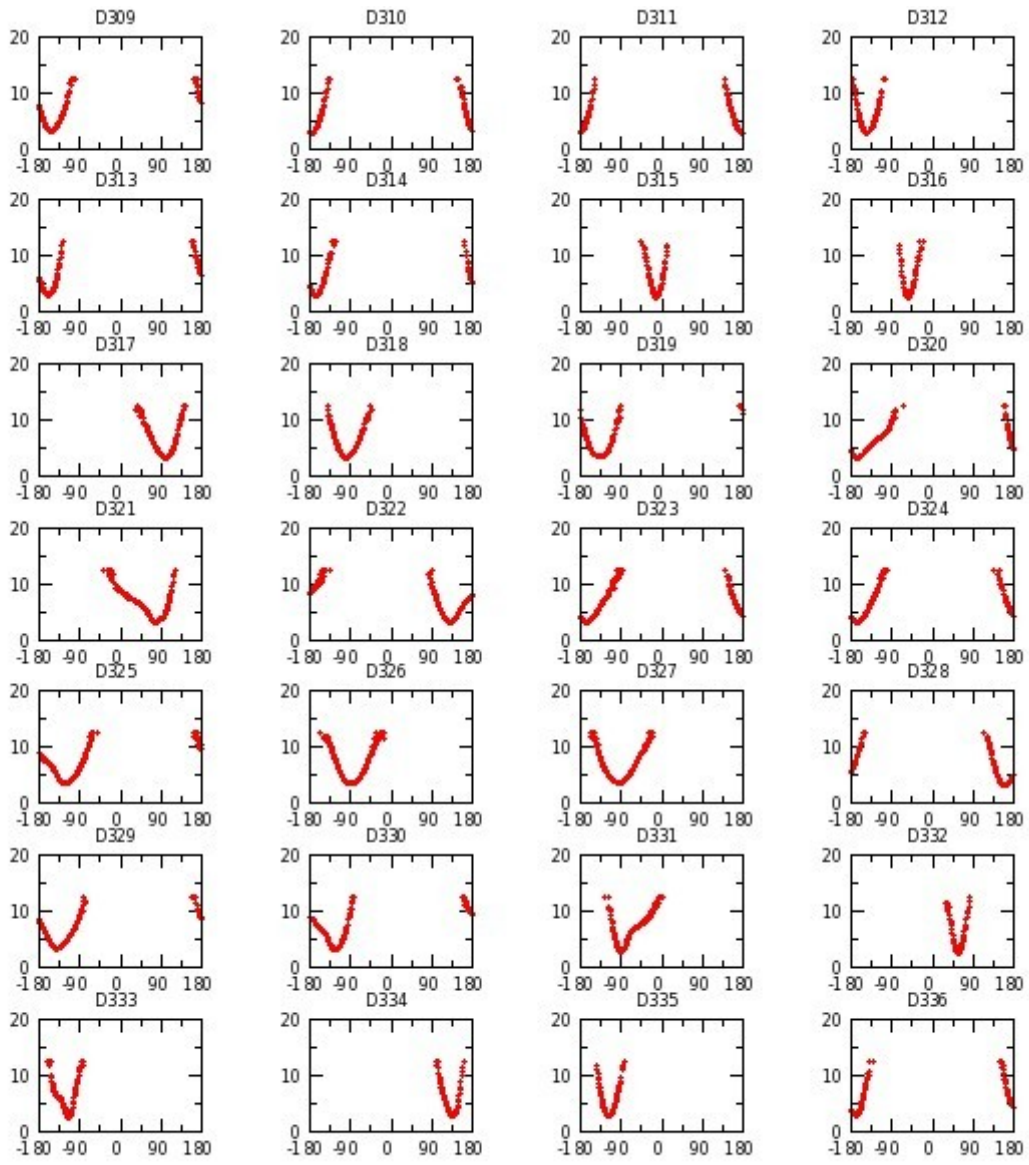


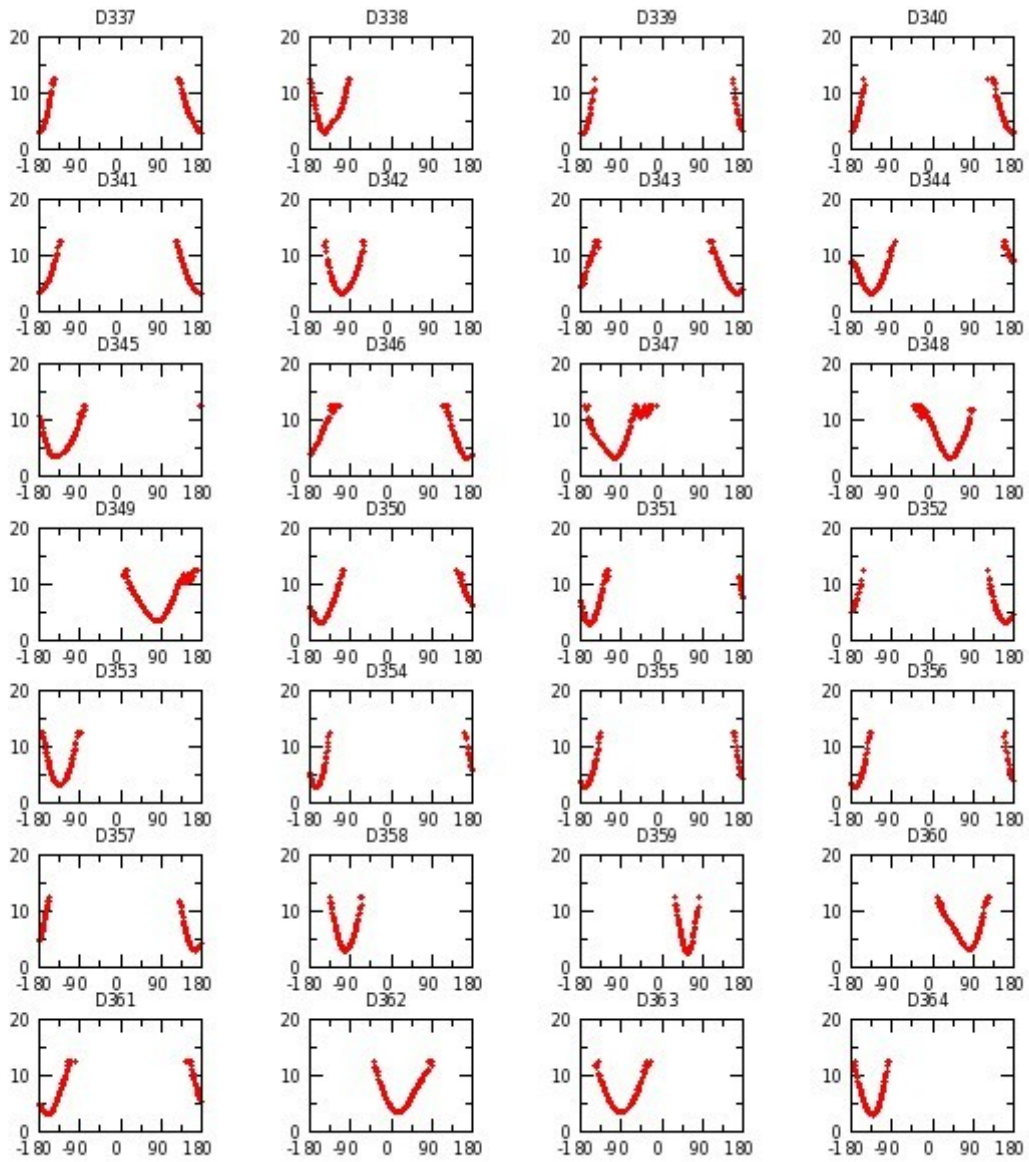


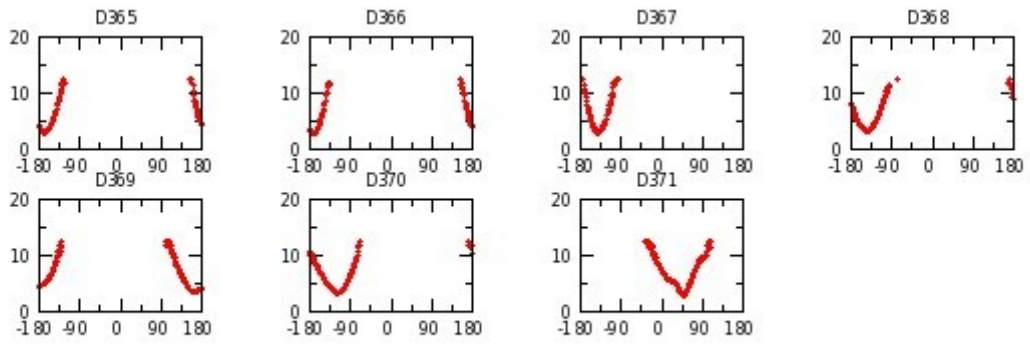




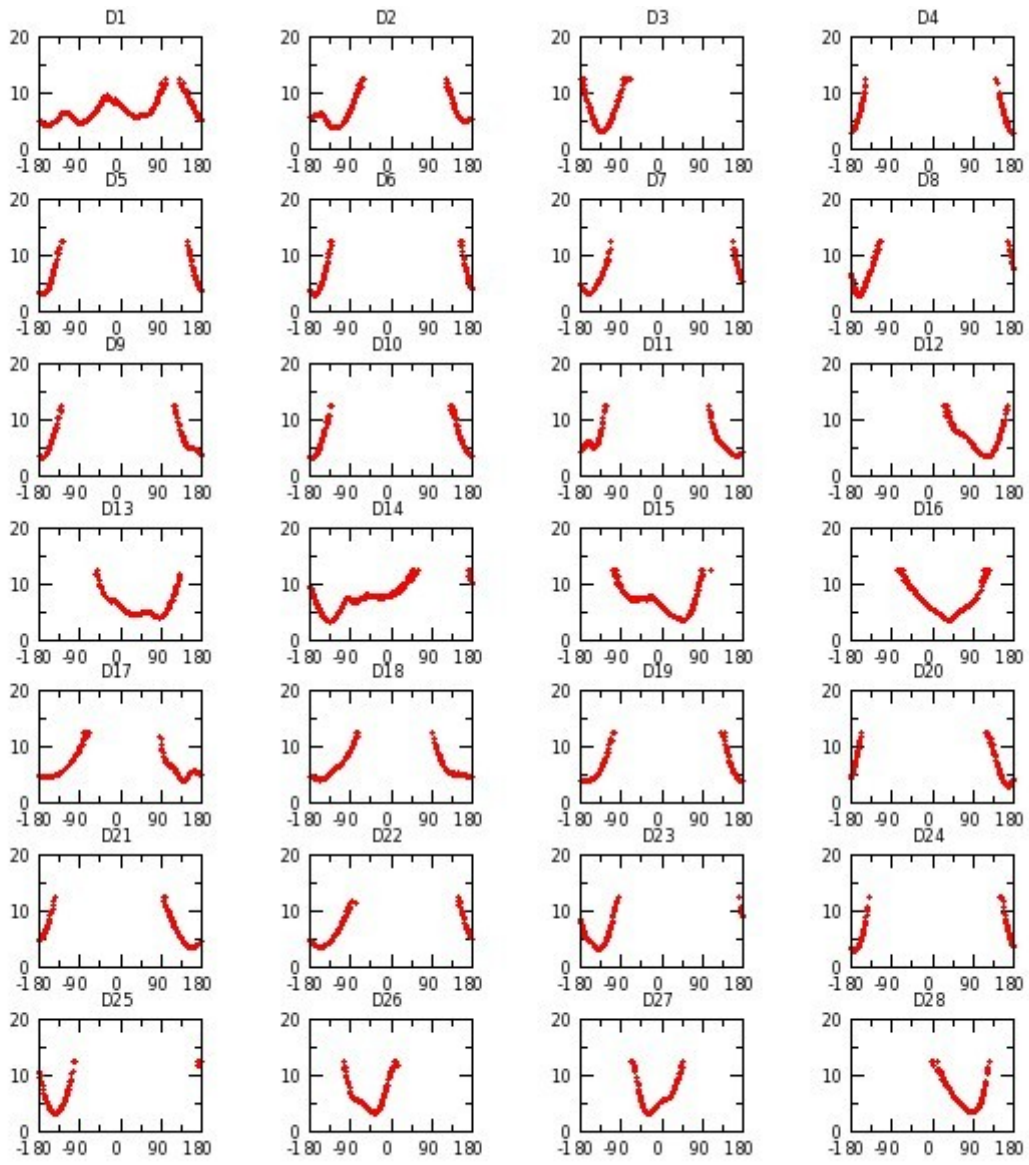


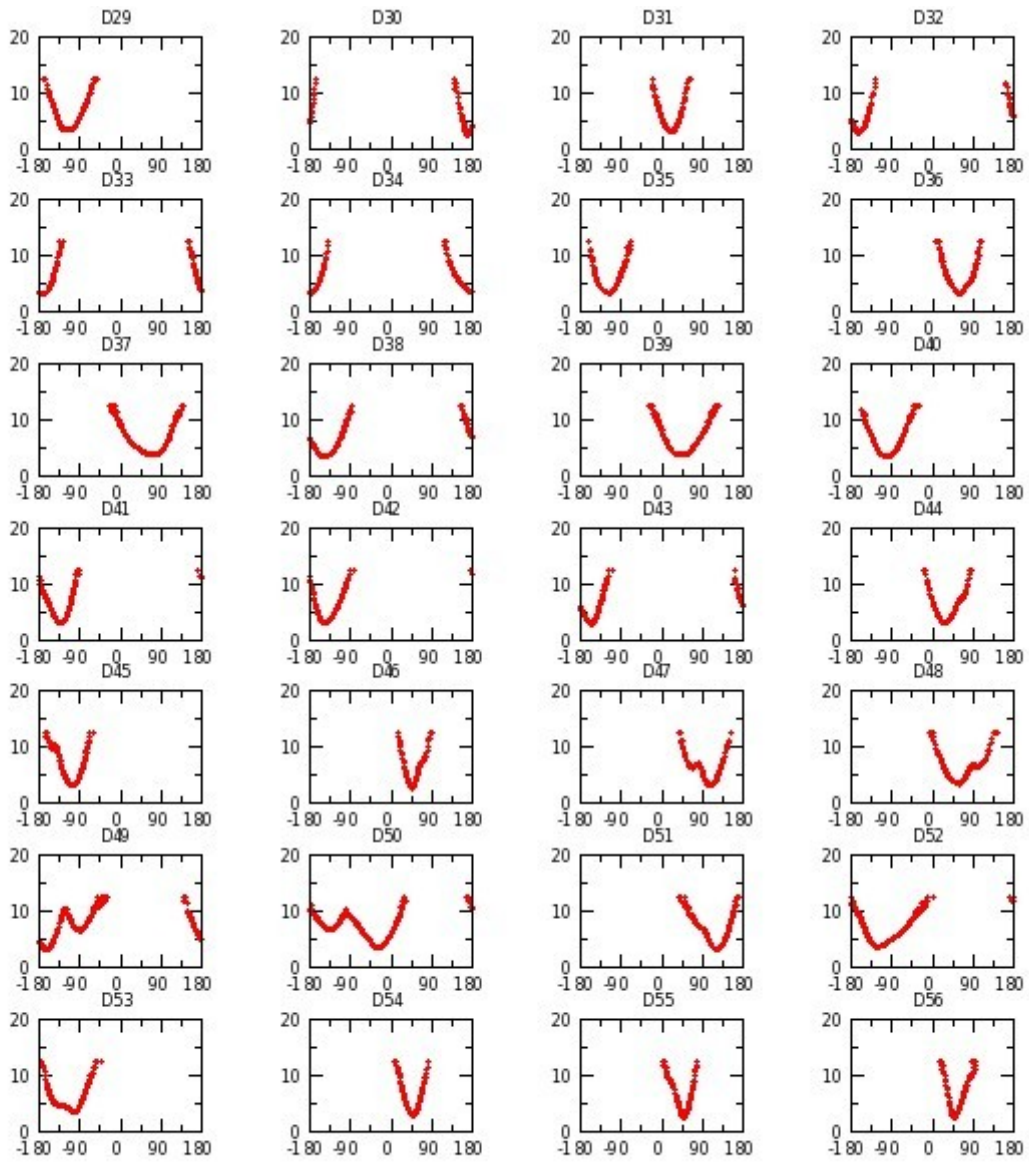


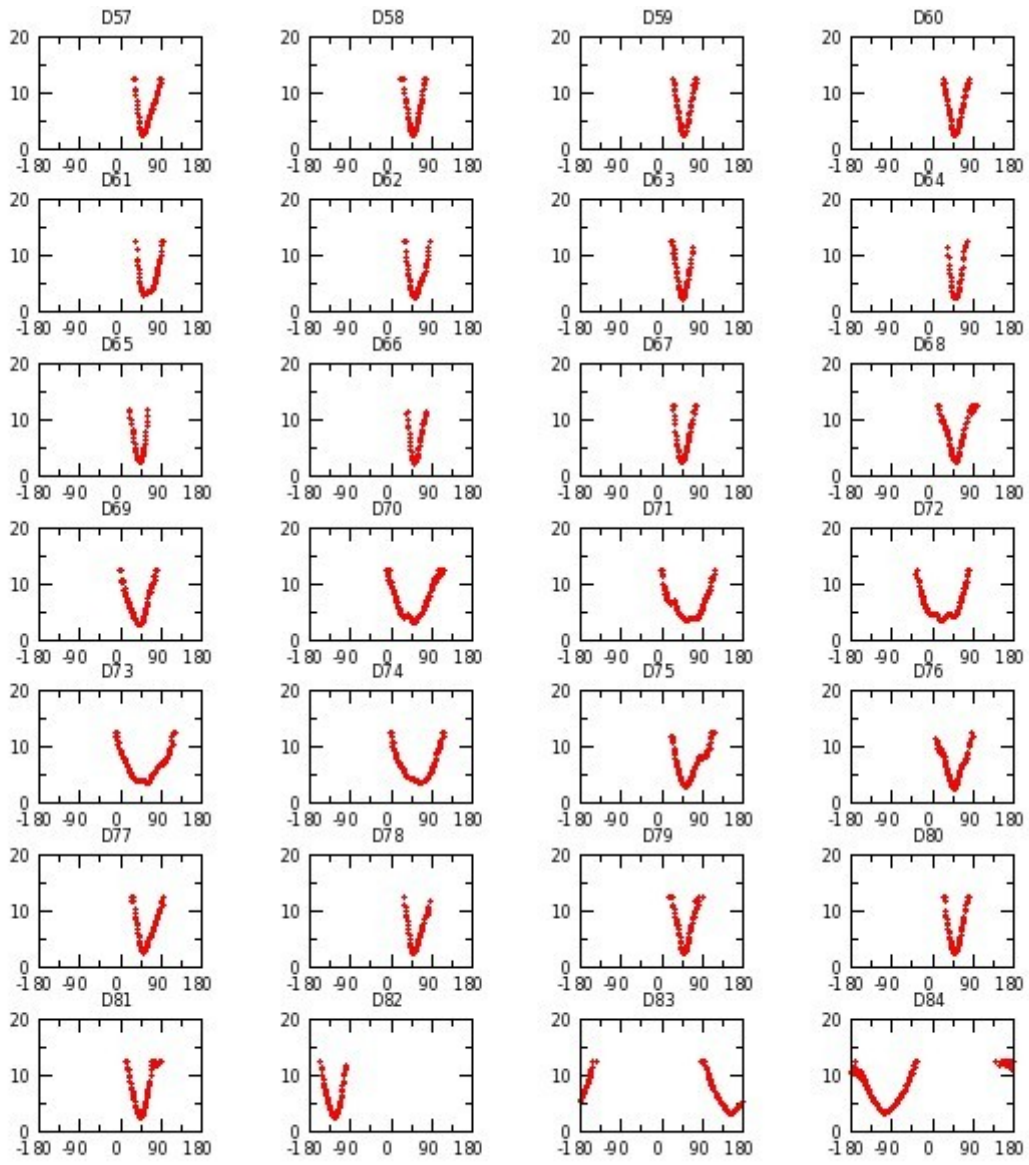


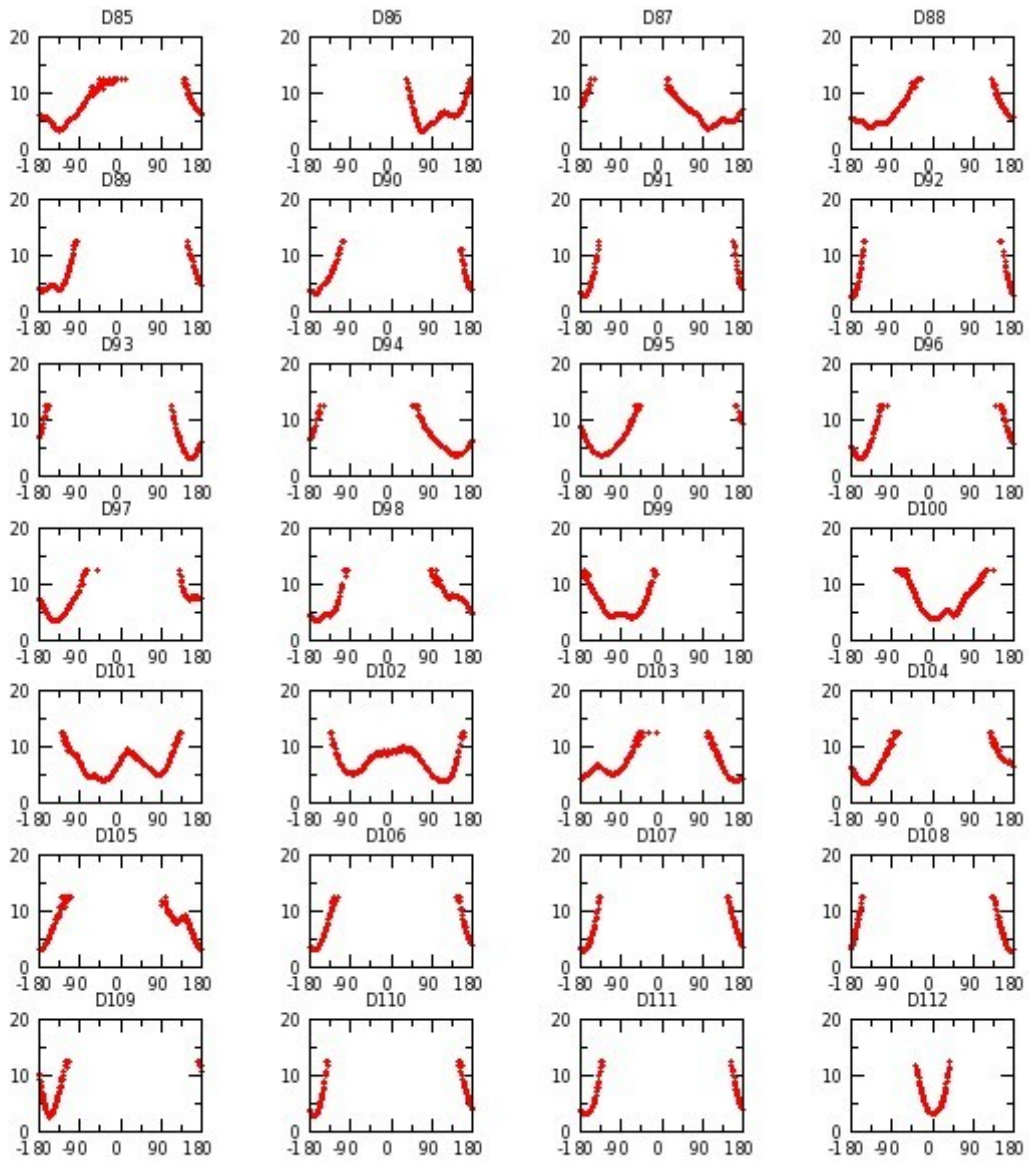


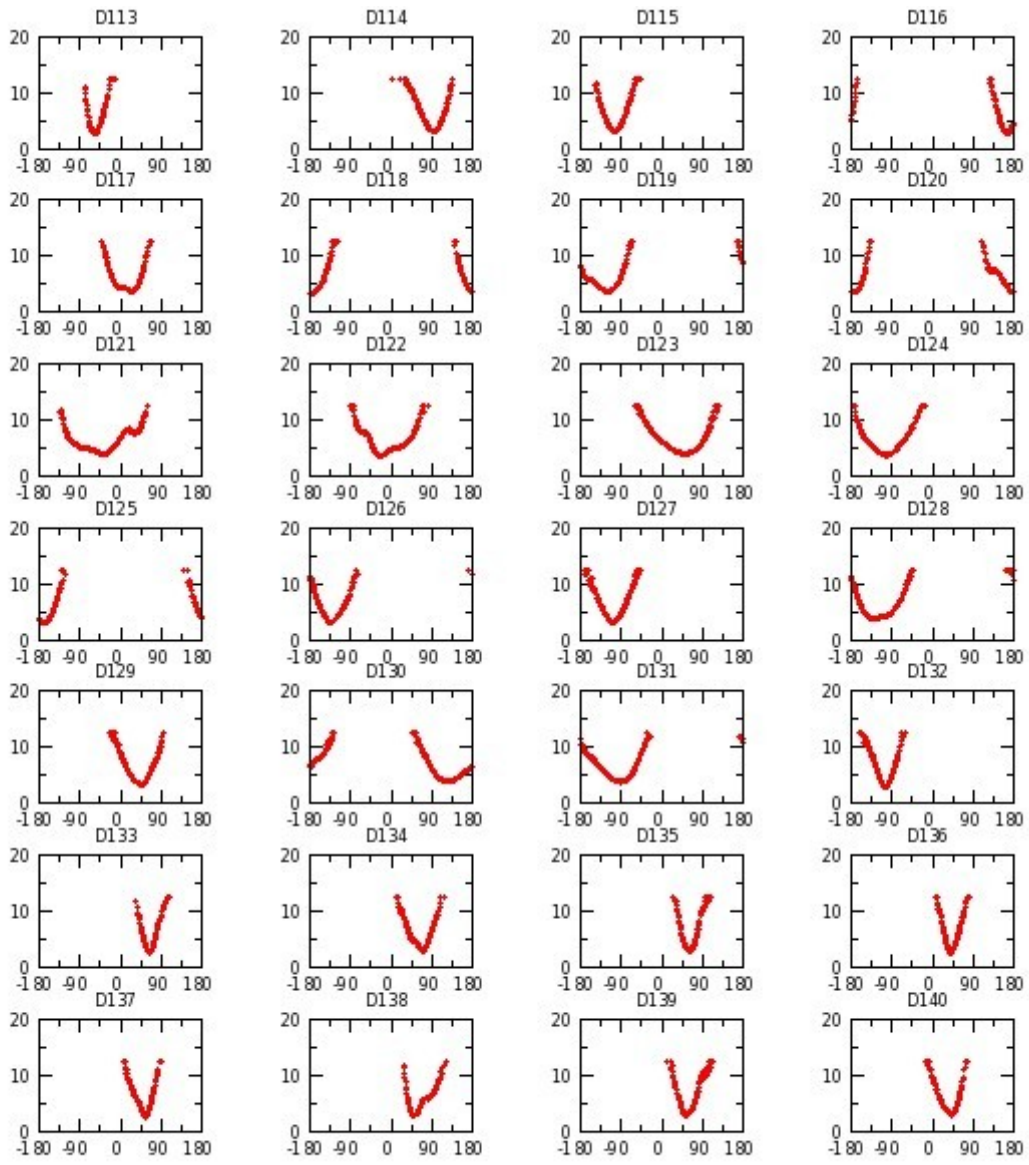
Annexe G 9 : H_CD1d réplique III

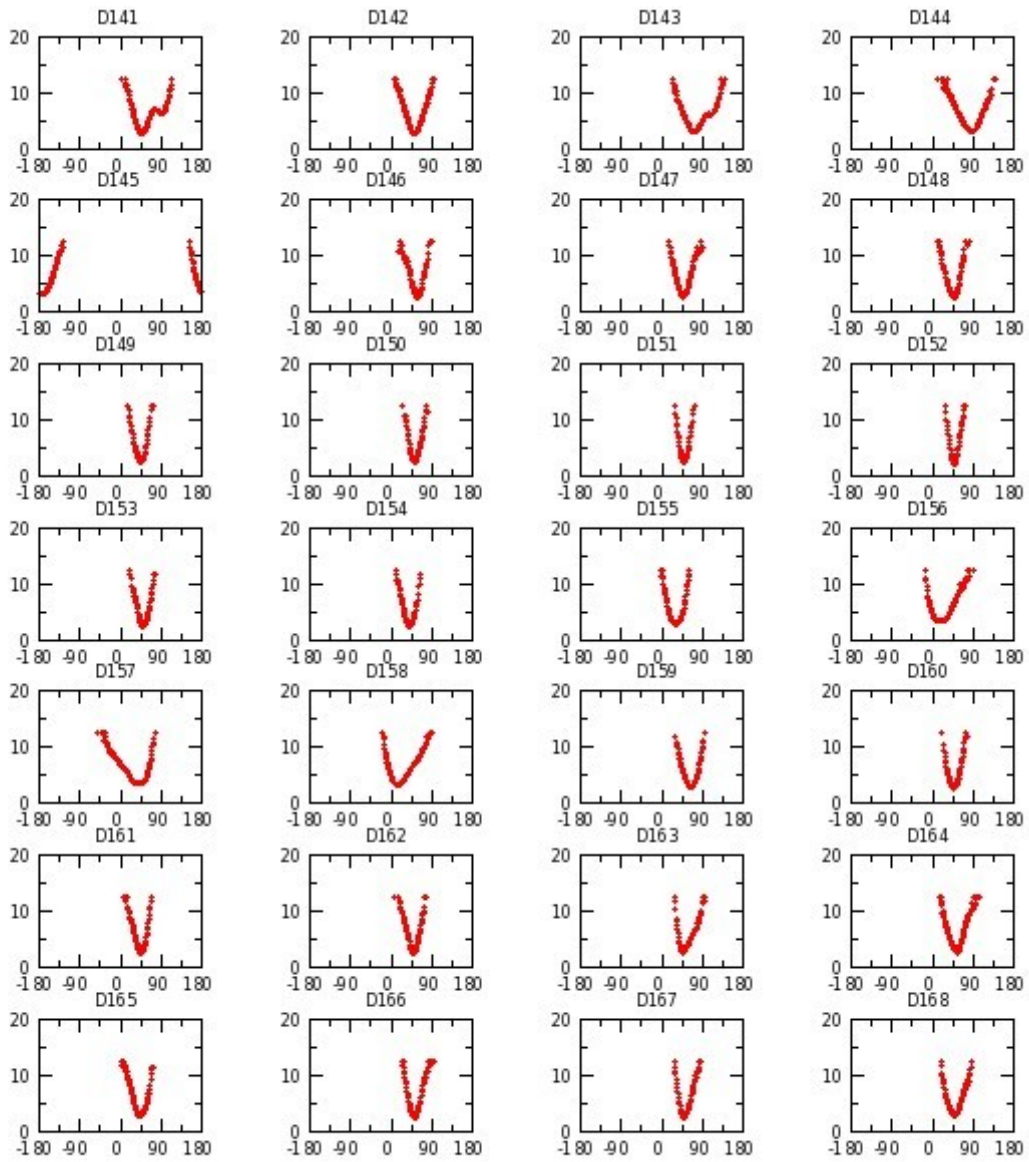


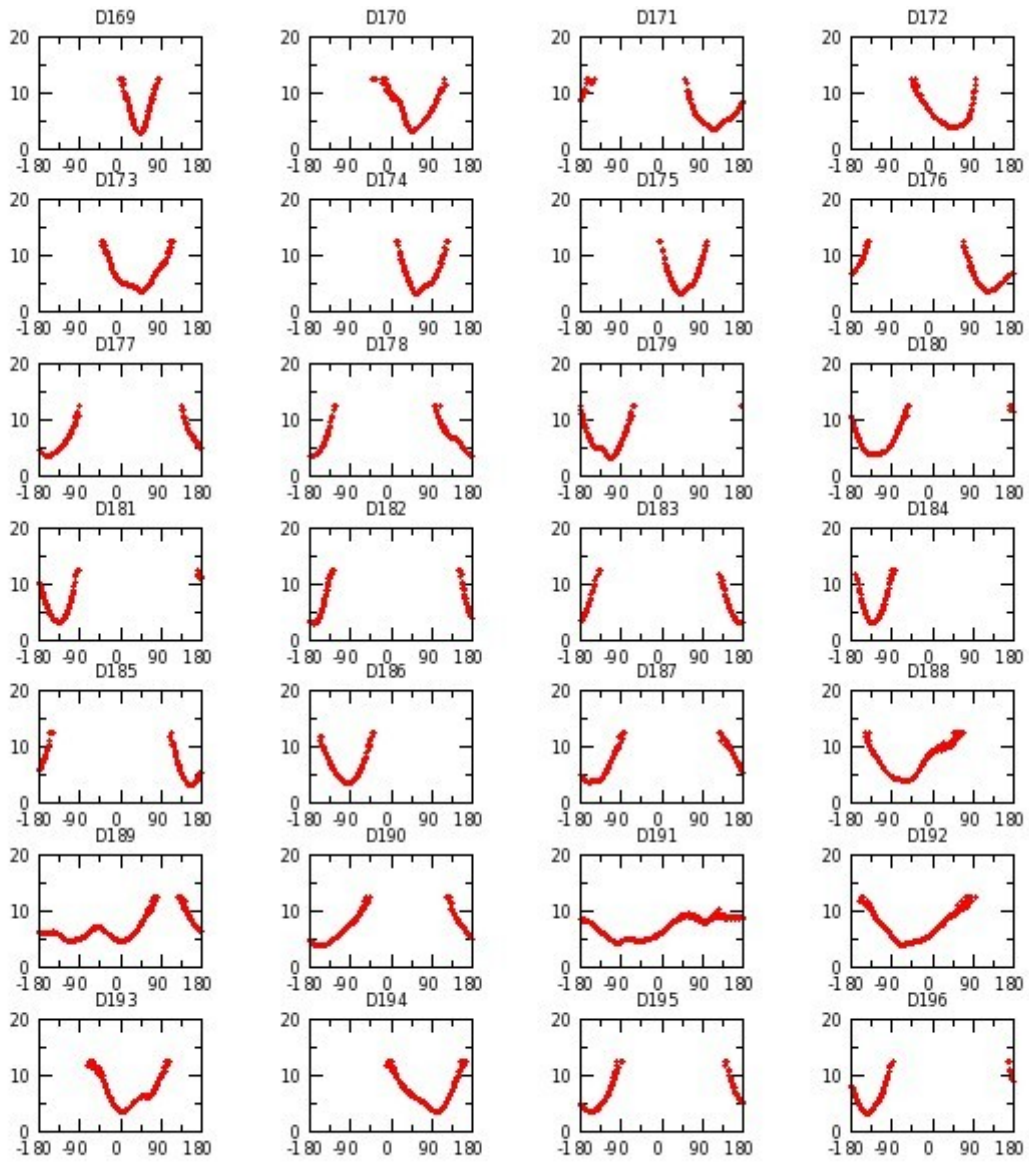


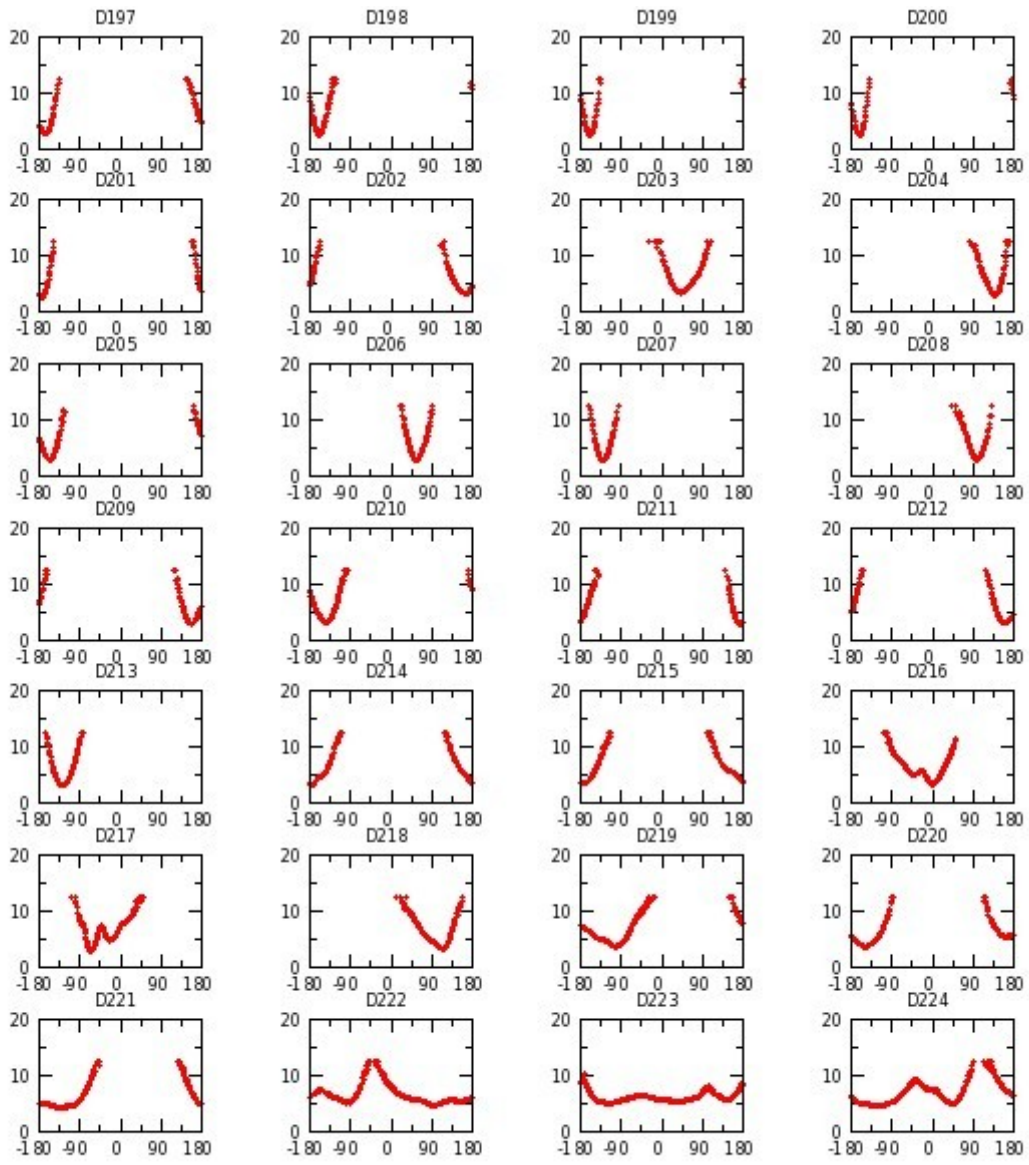


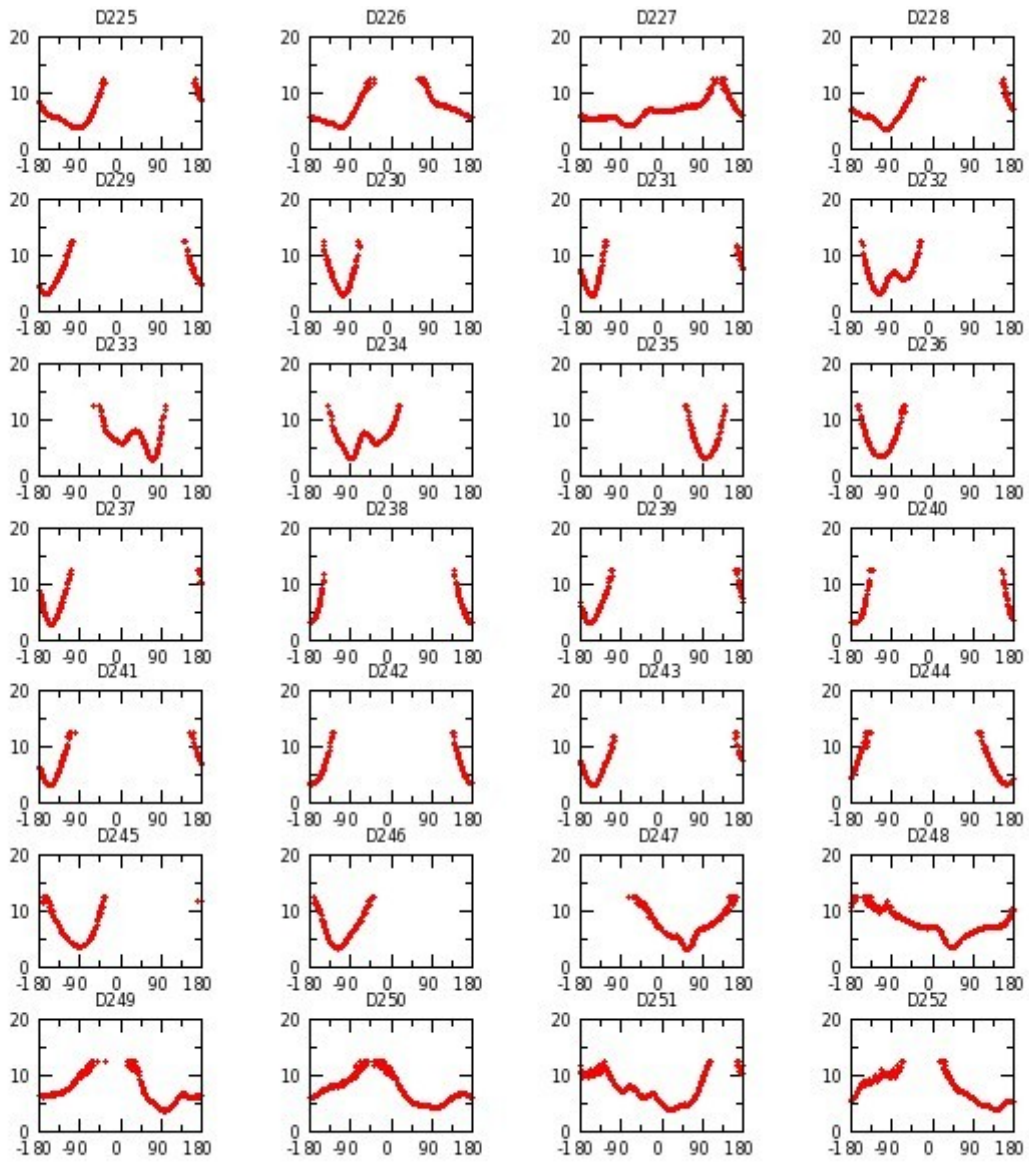


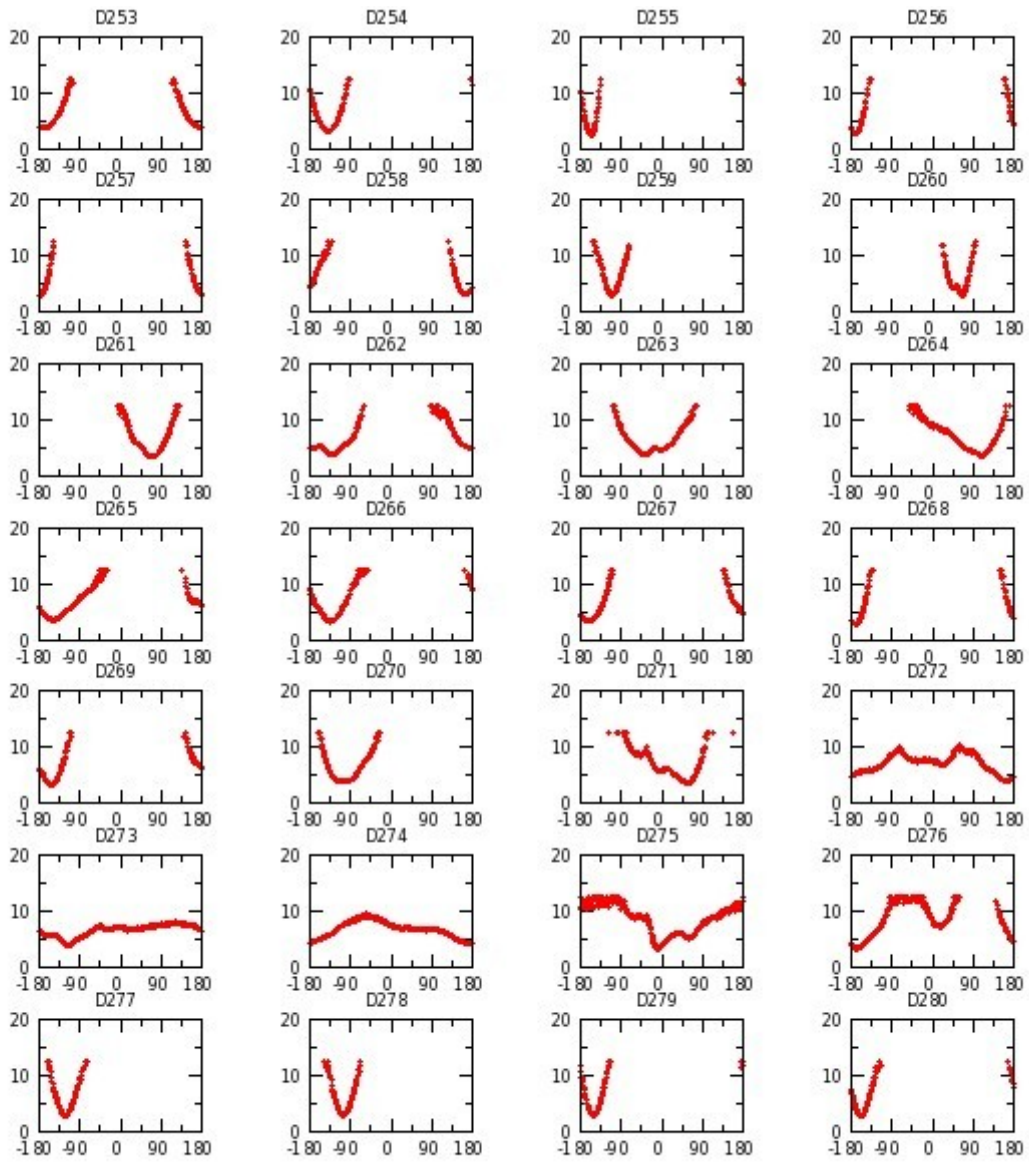


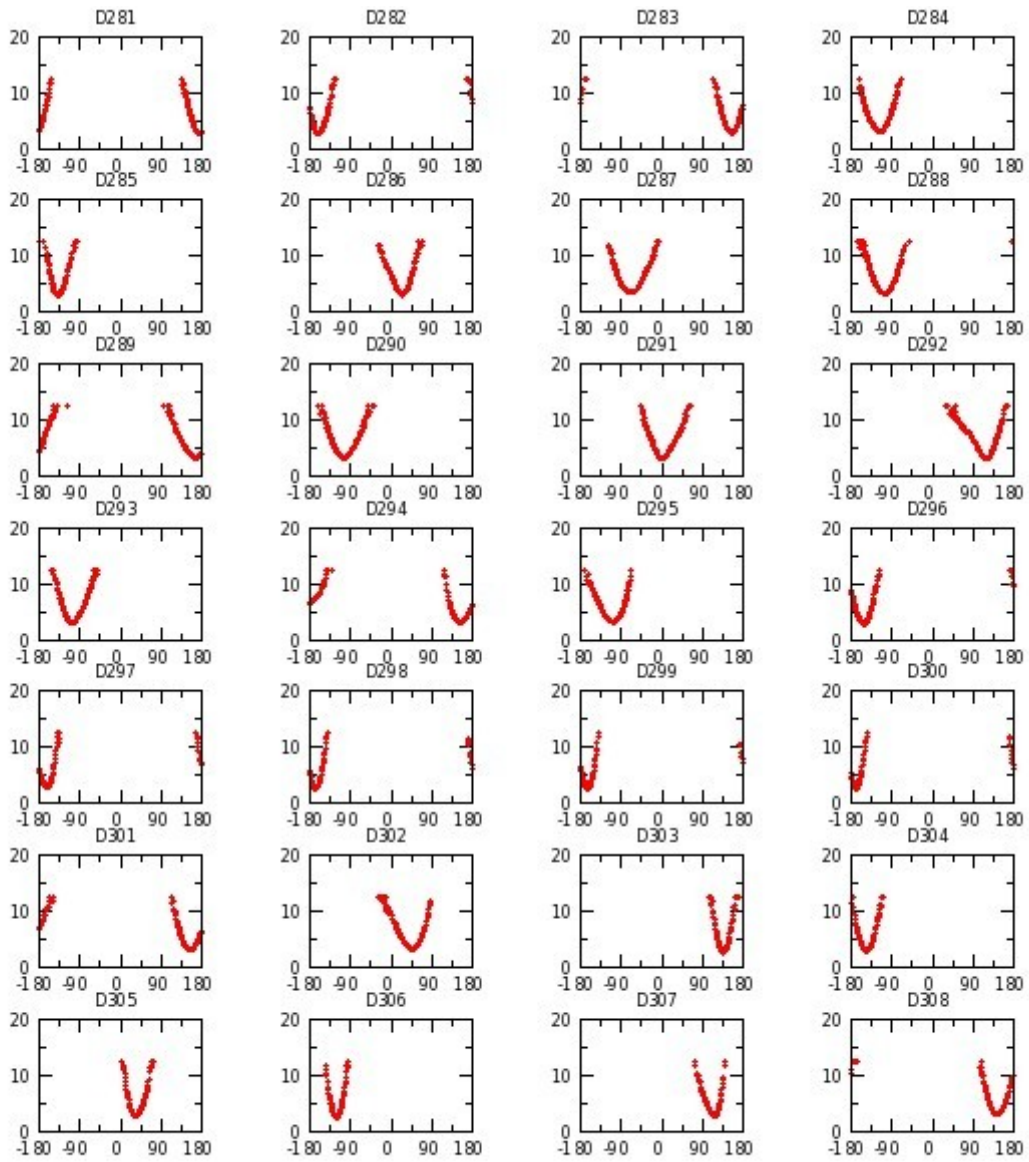


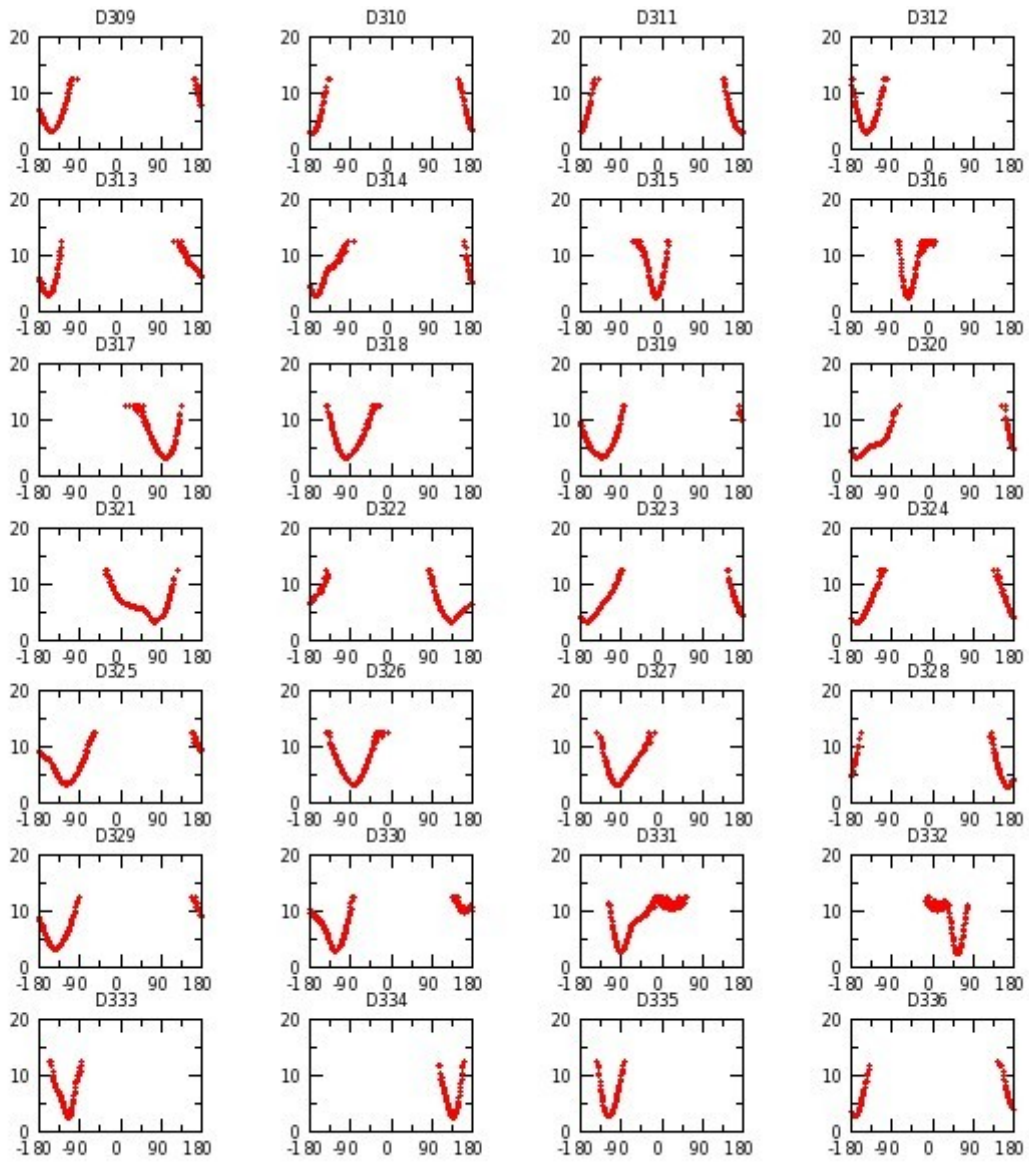


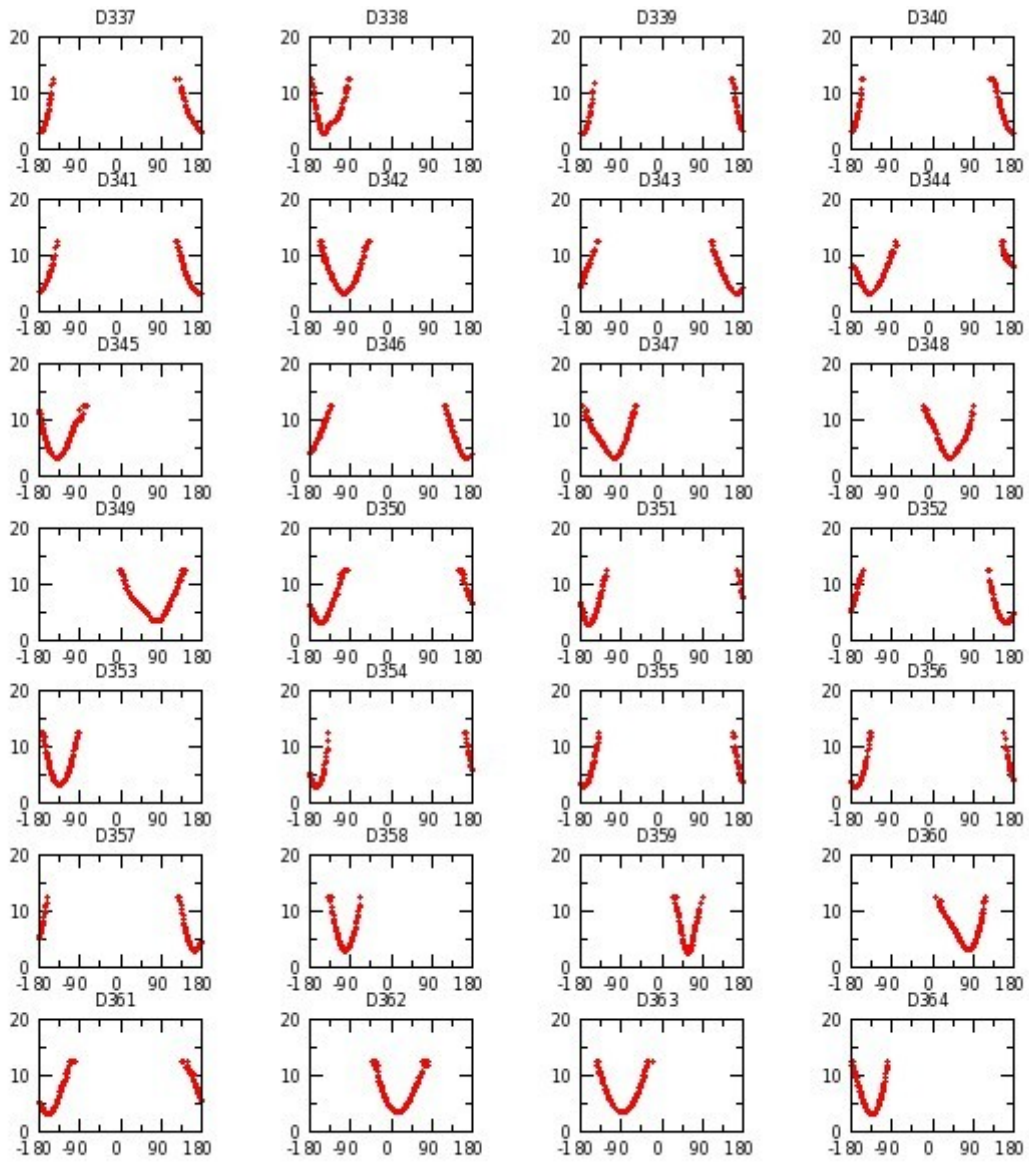


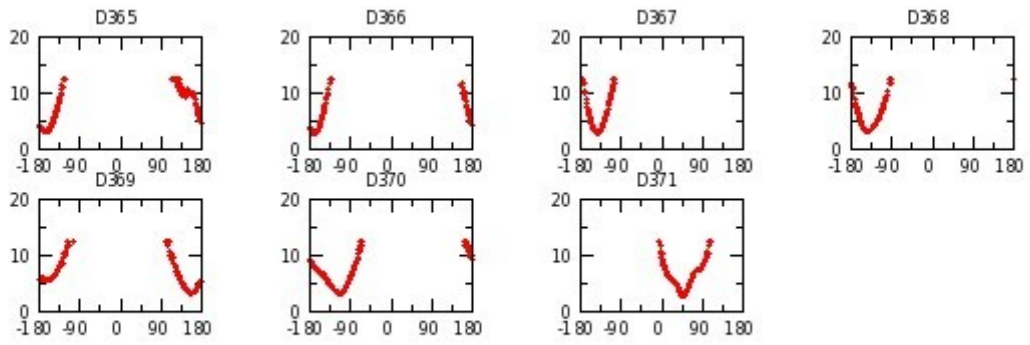




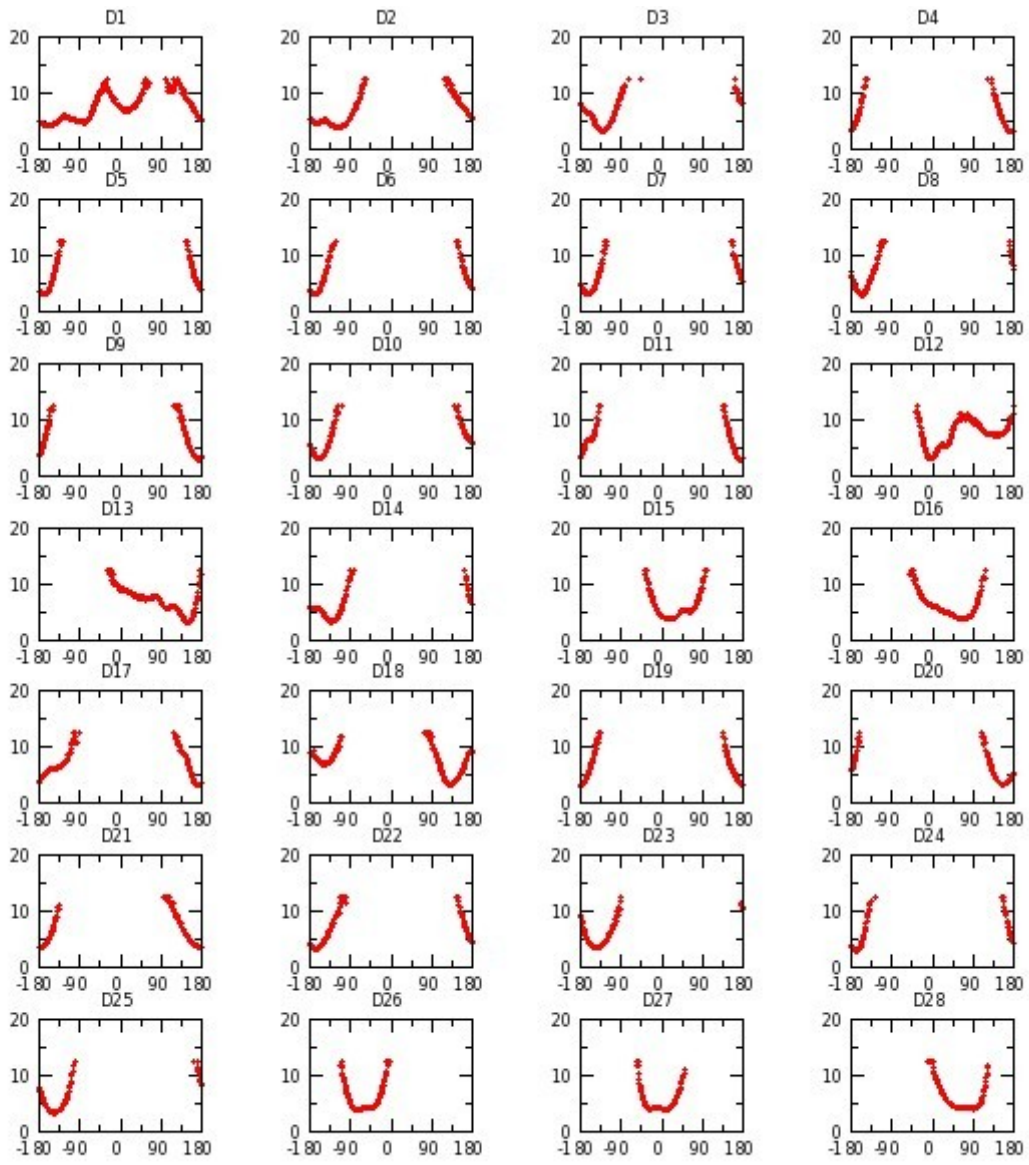


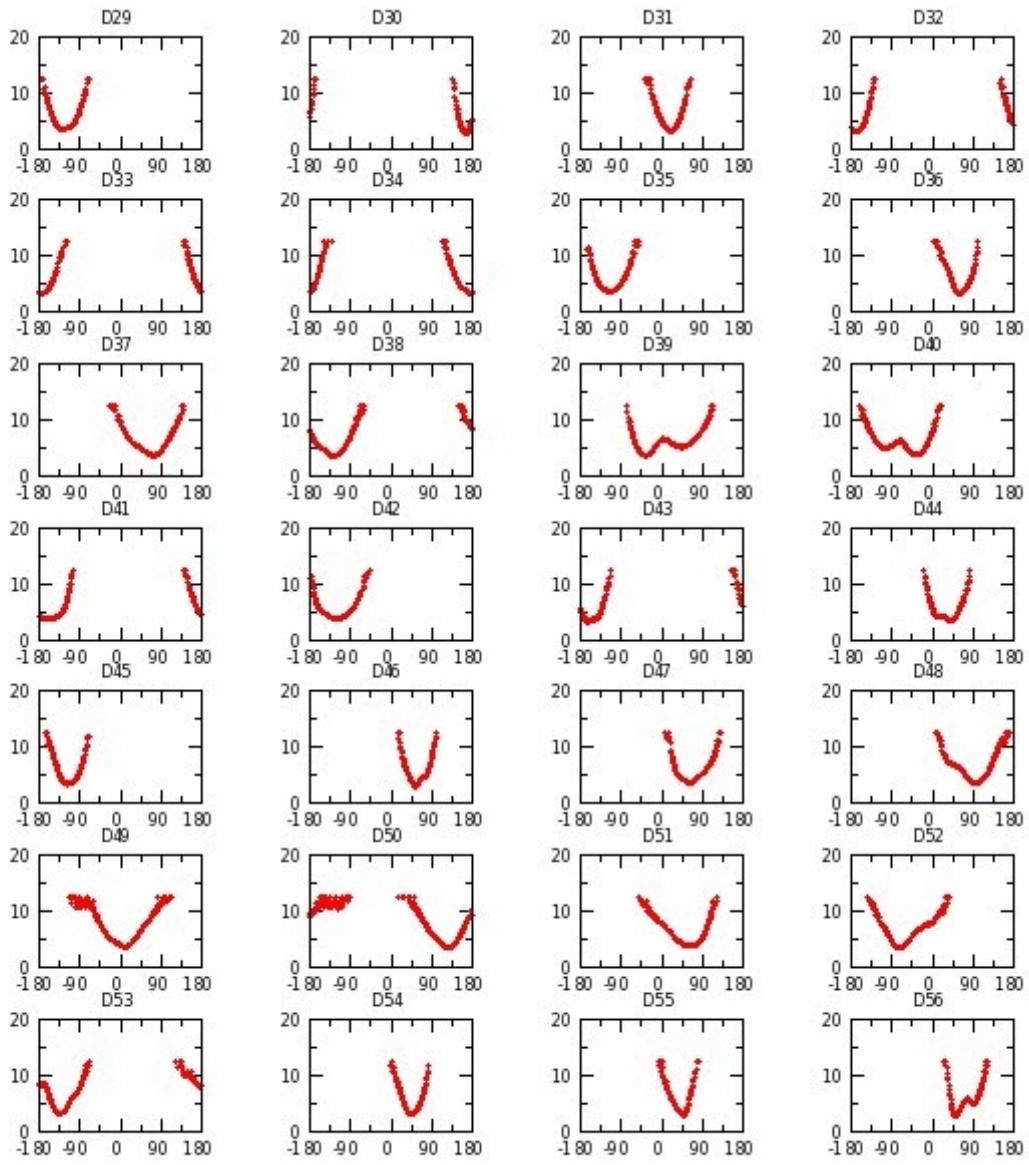


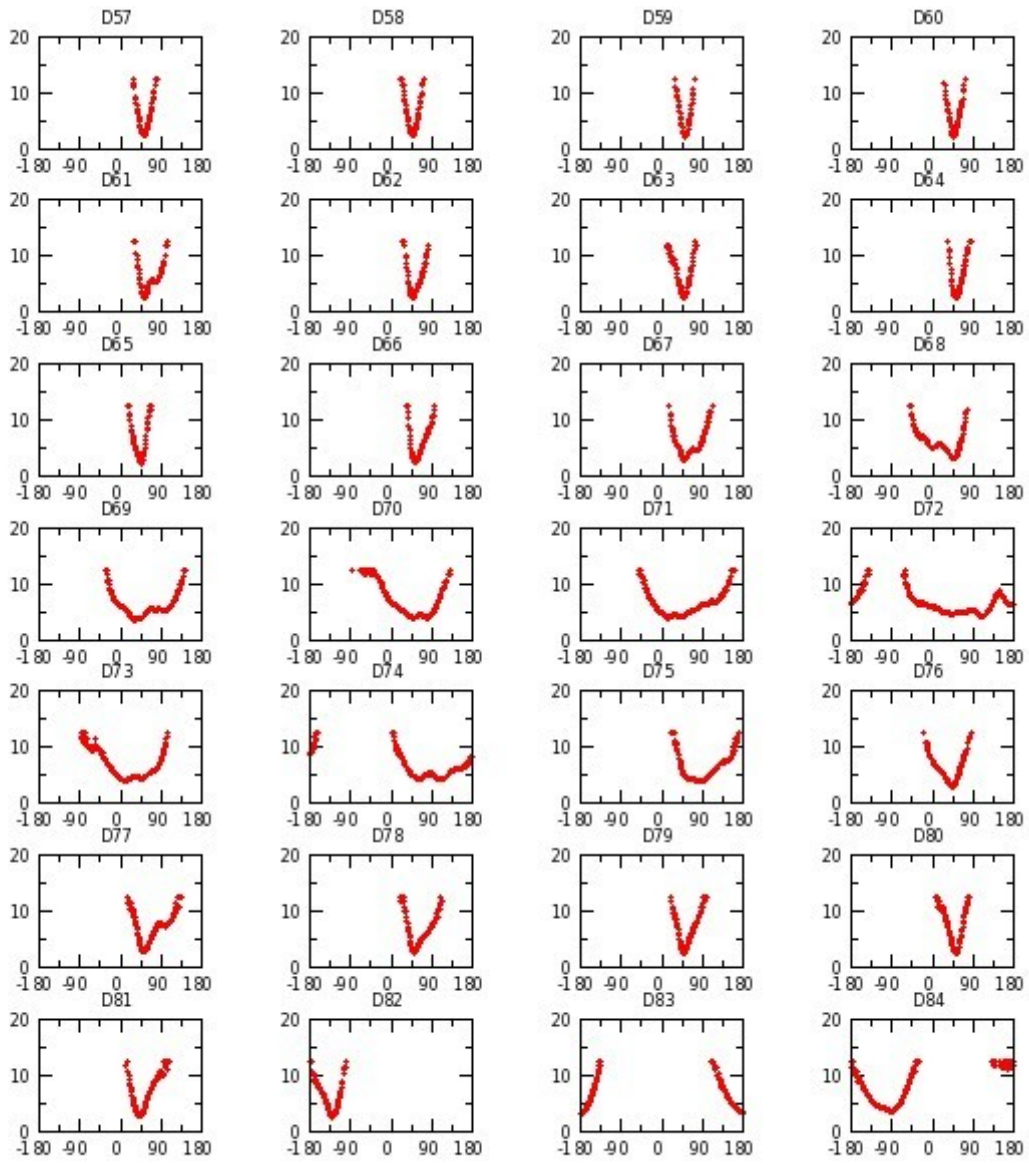


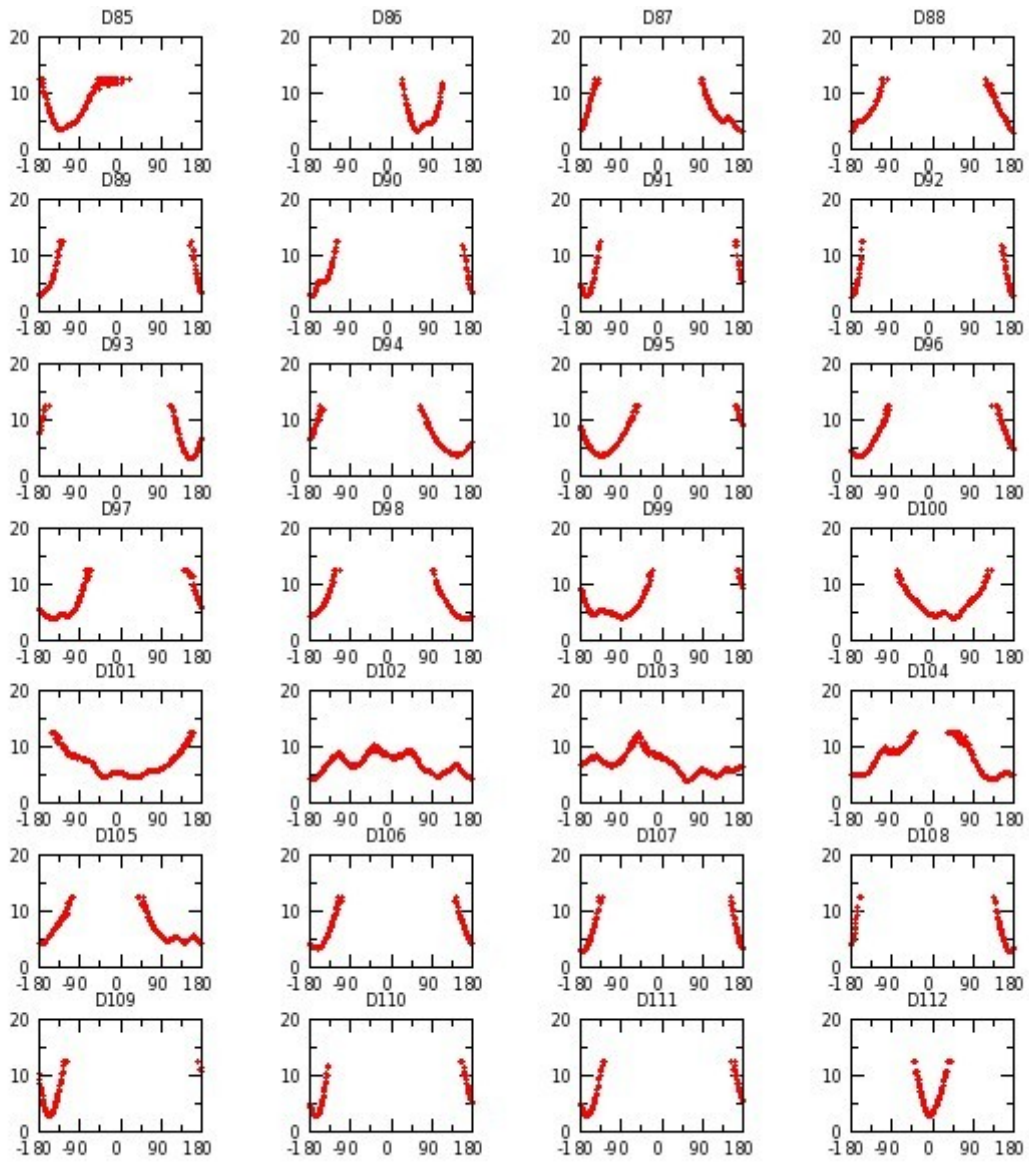


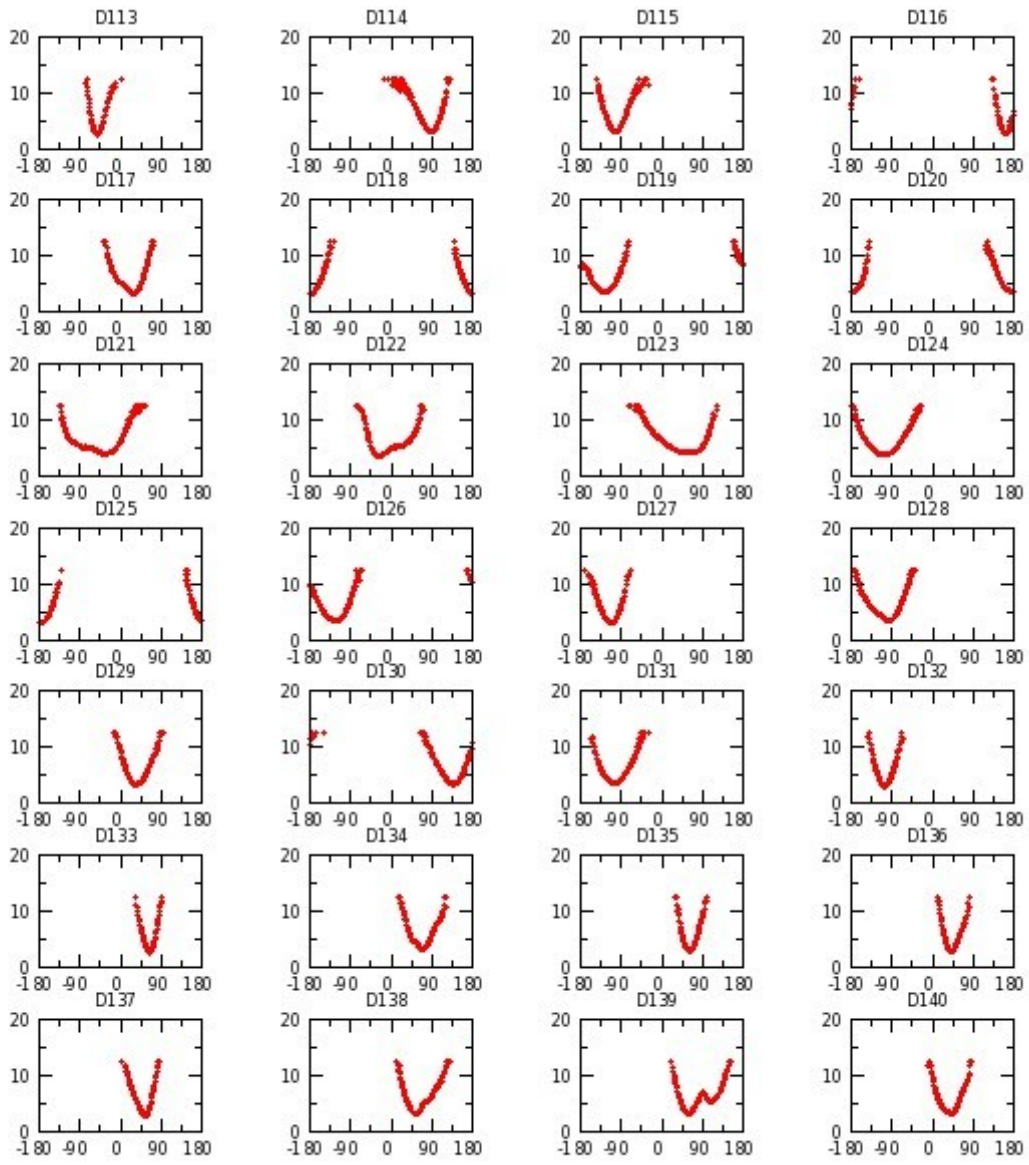
Annexe G 10 : H_GOF réplique I

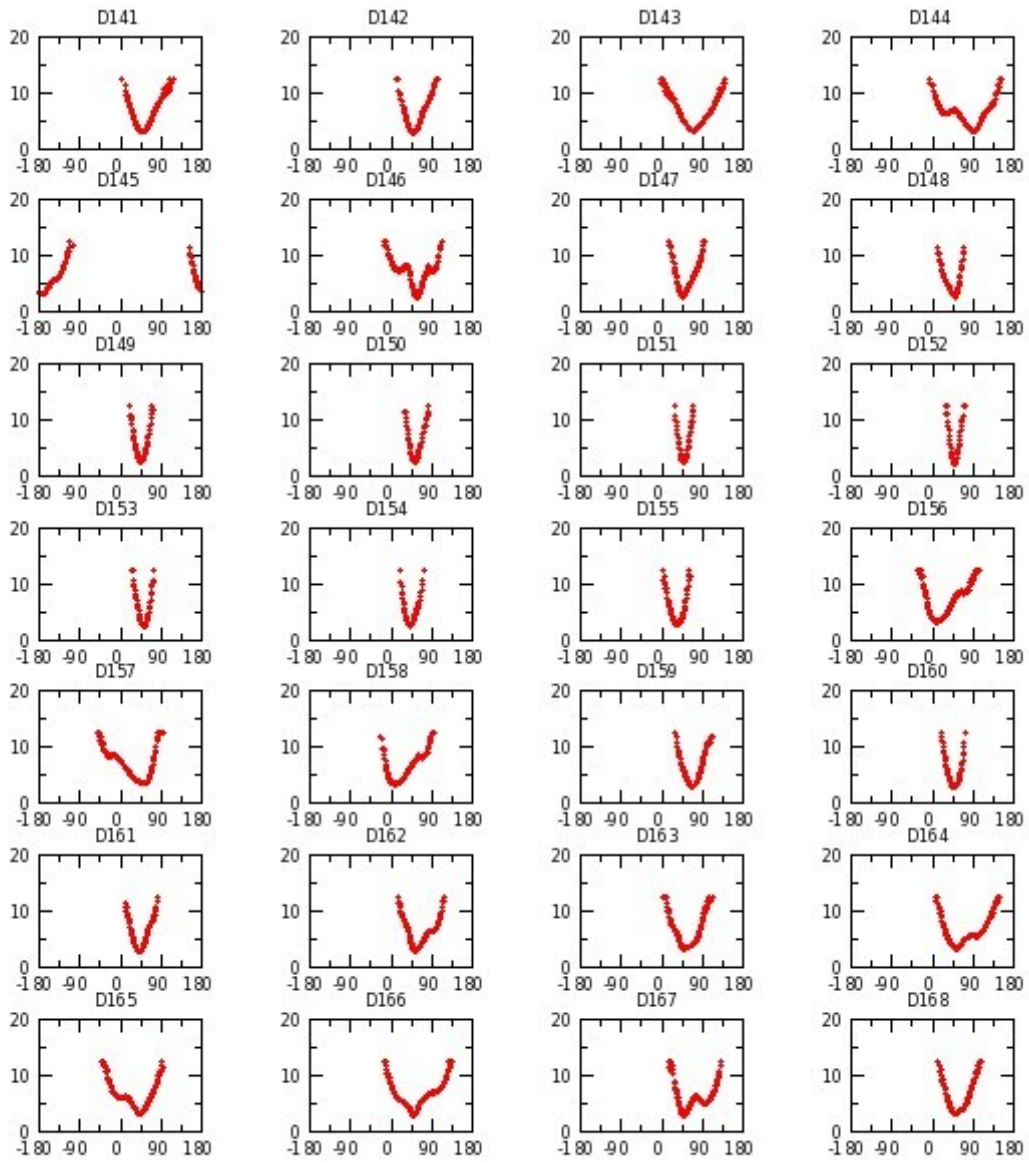


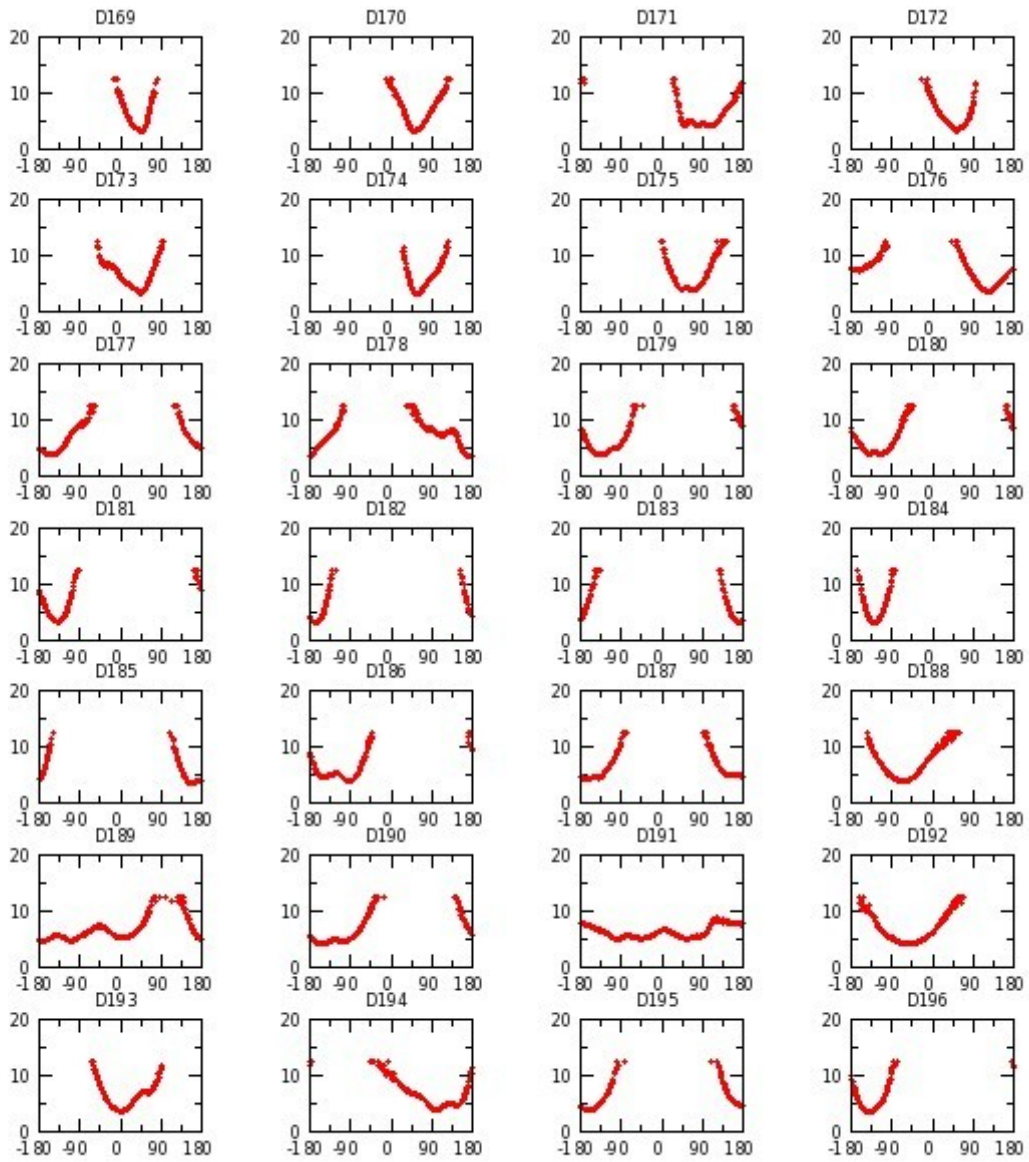


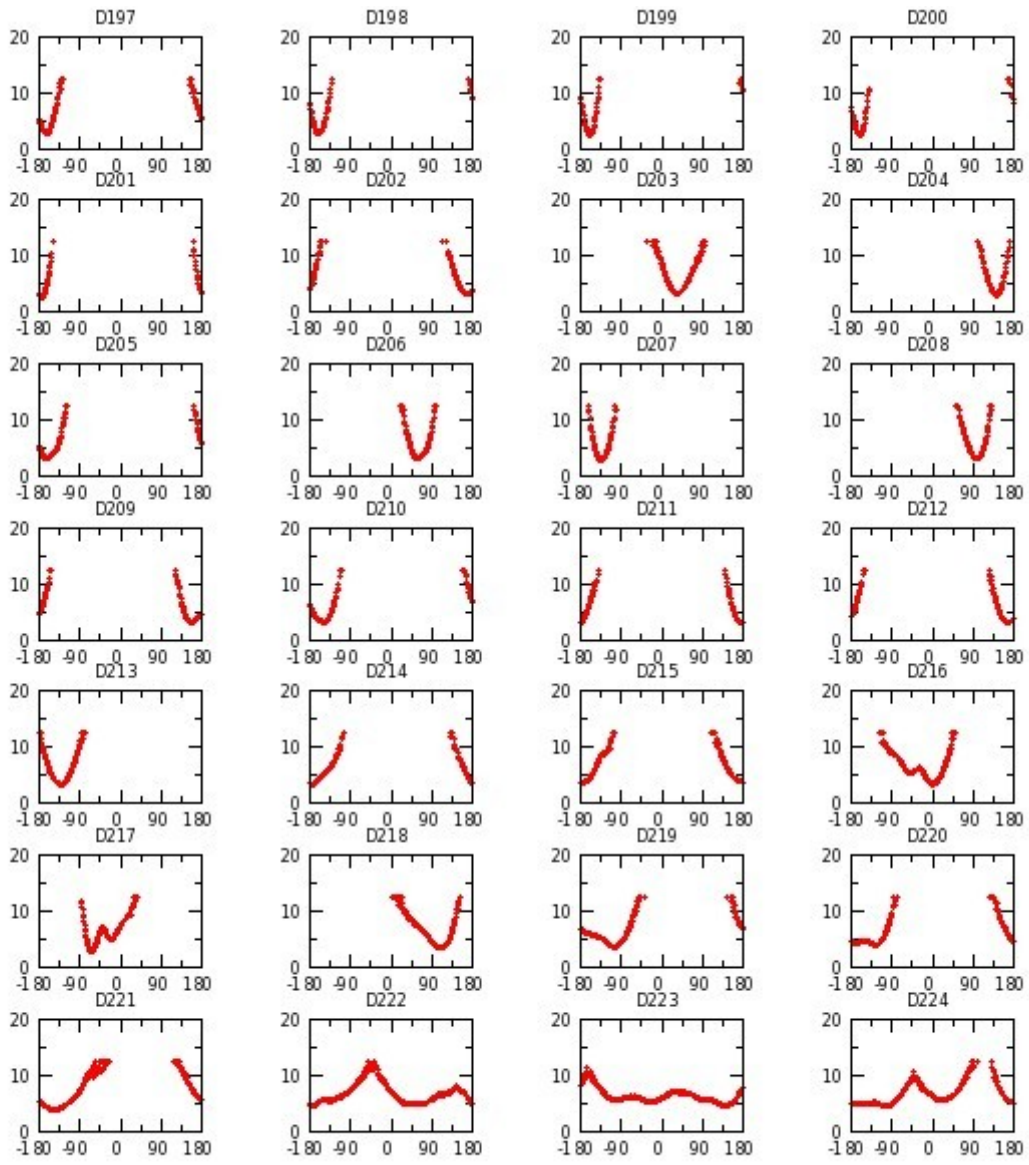


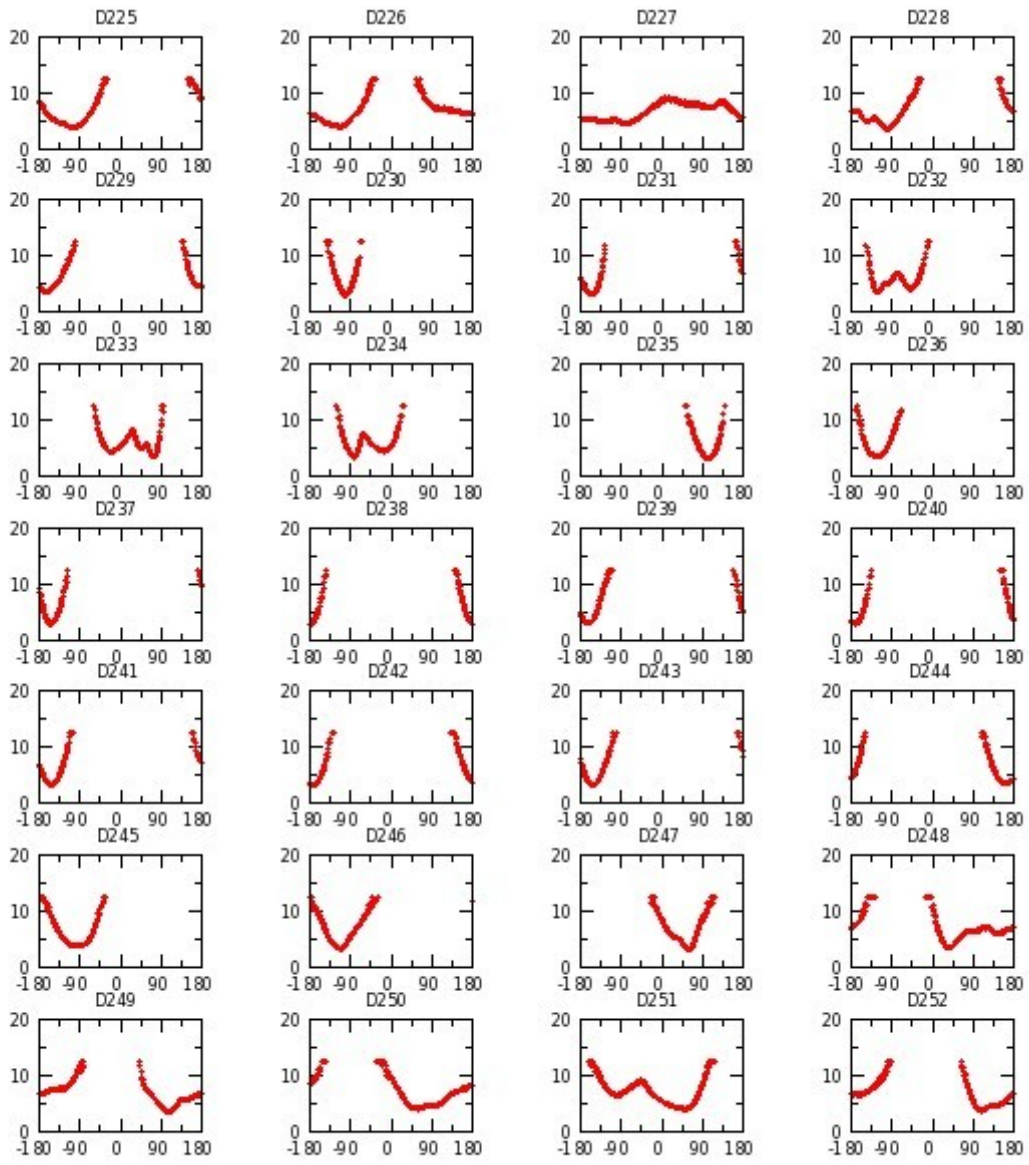


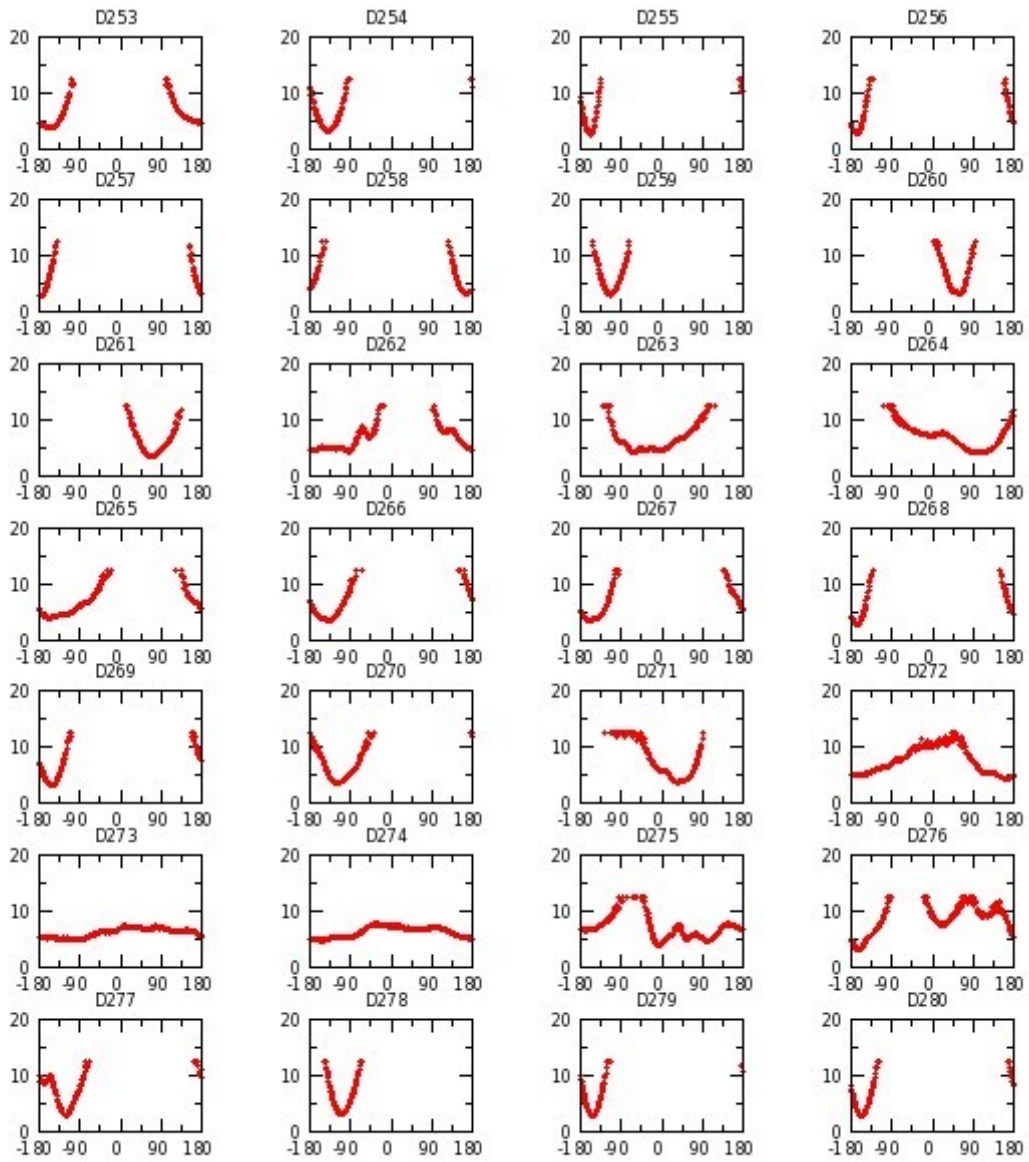


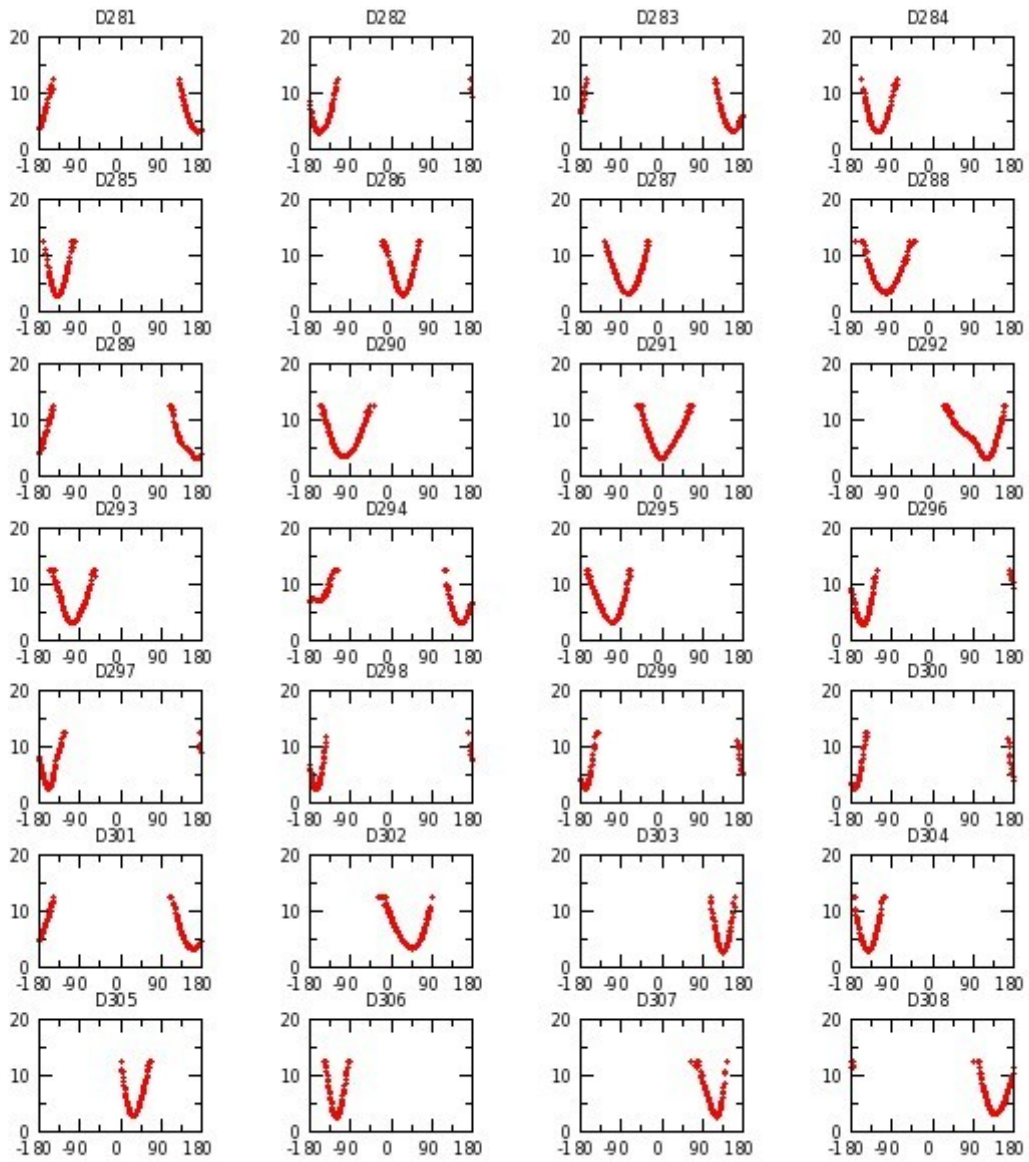


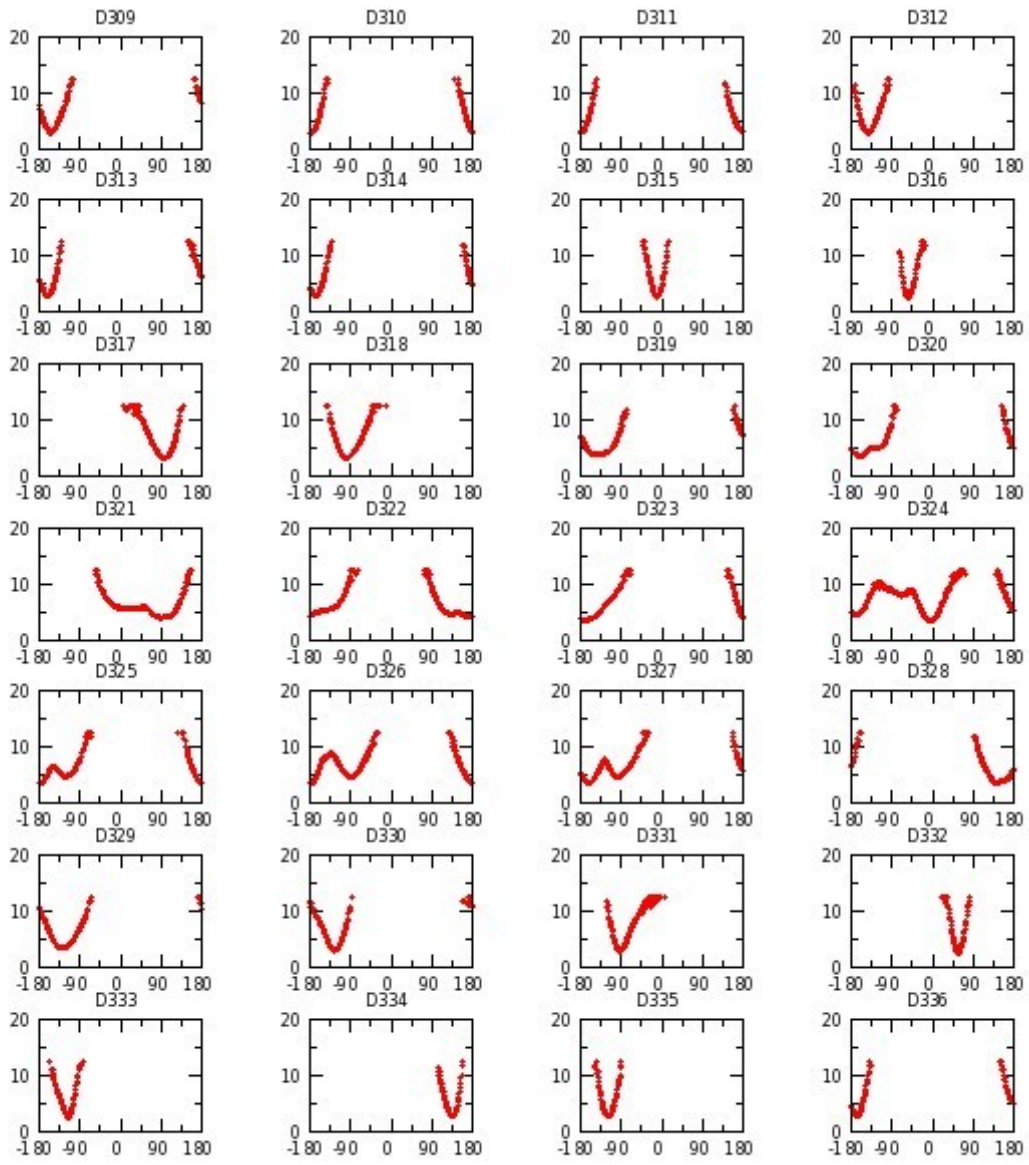


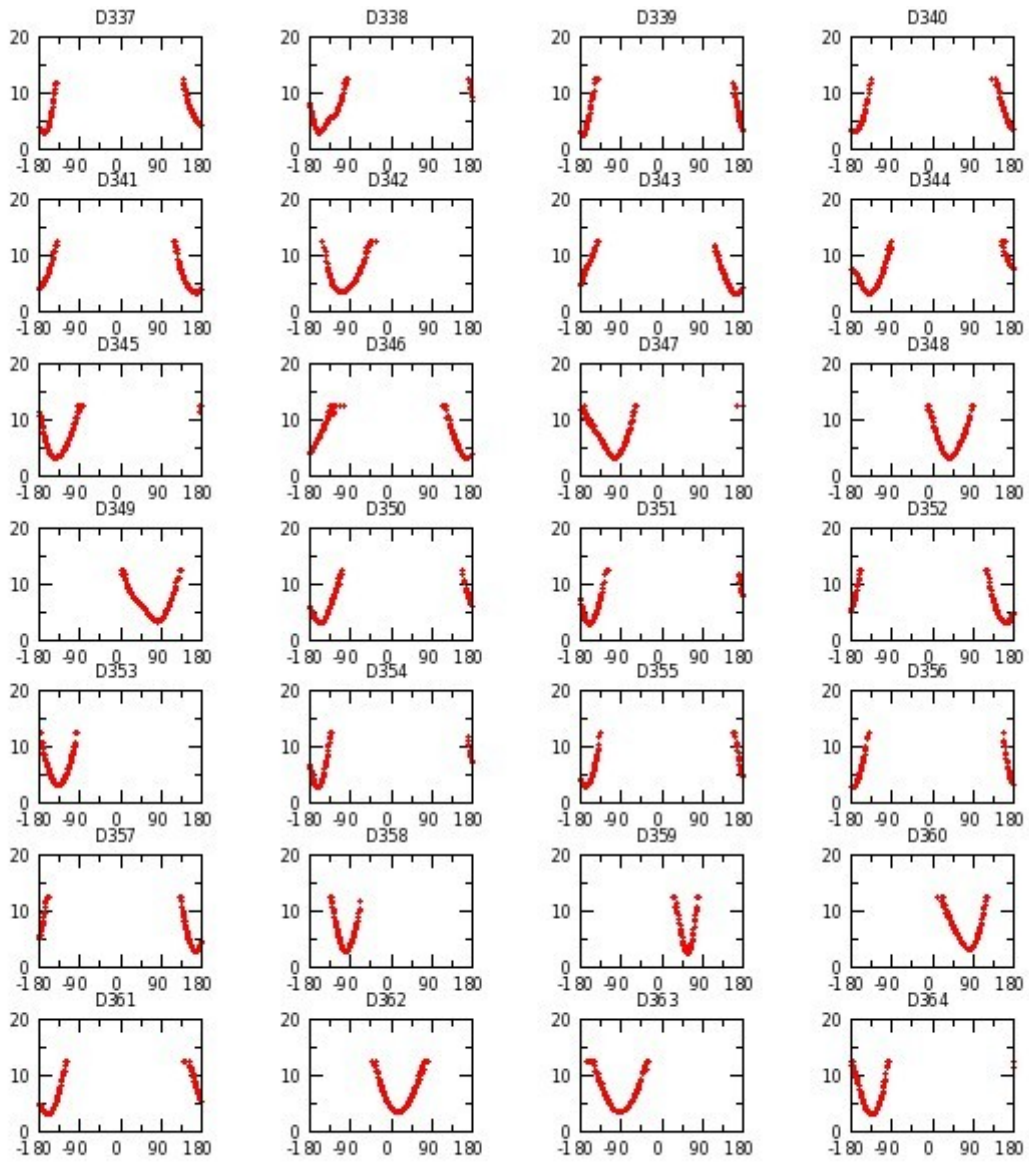


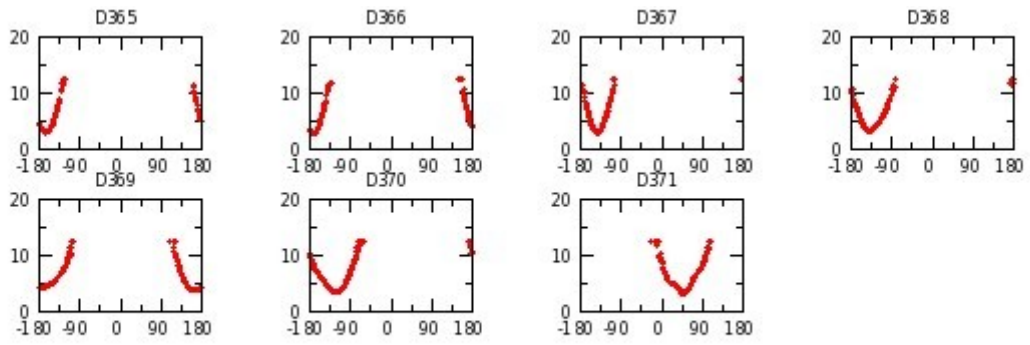




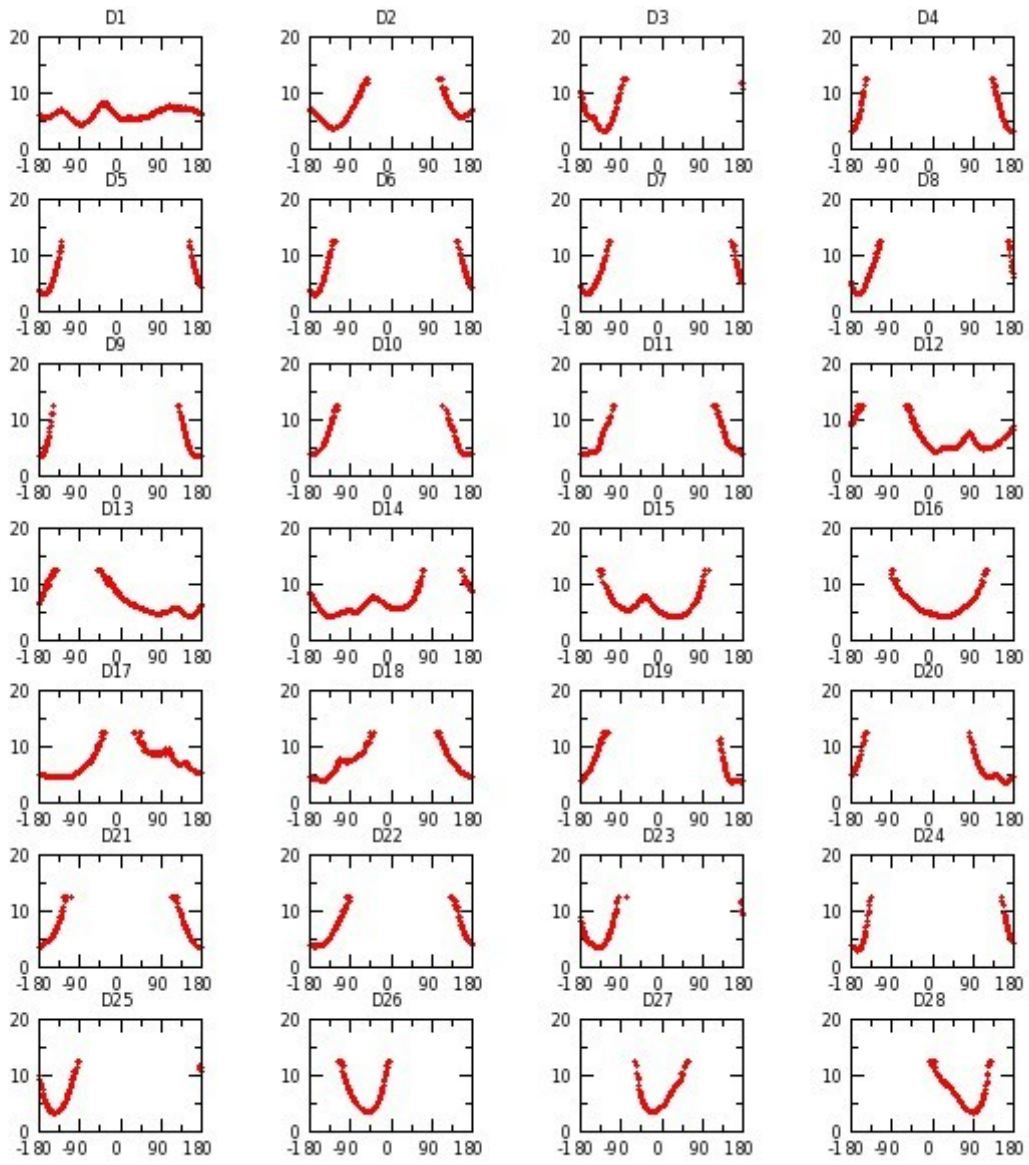


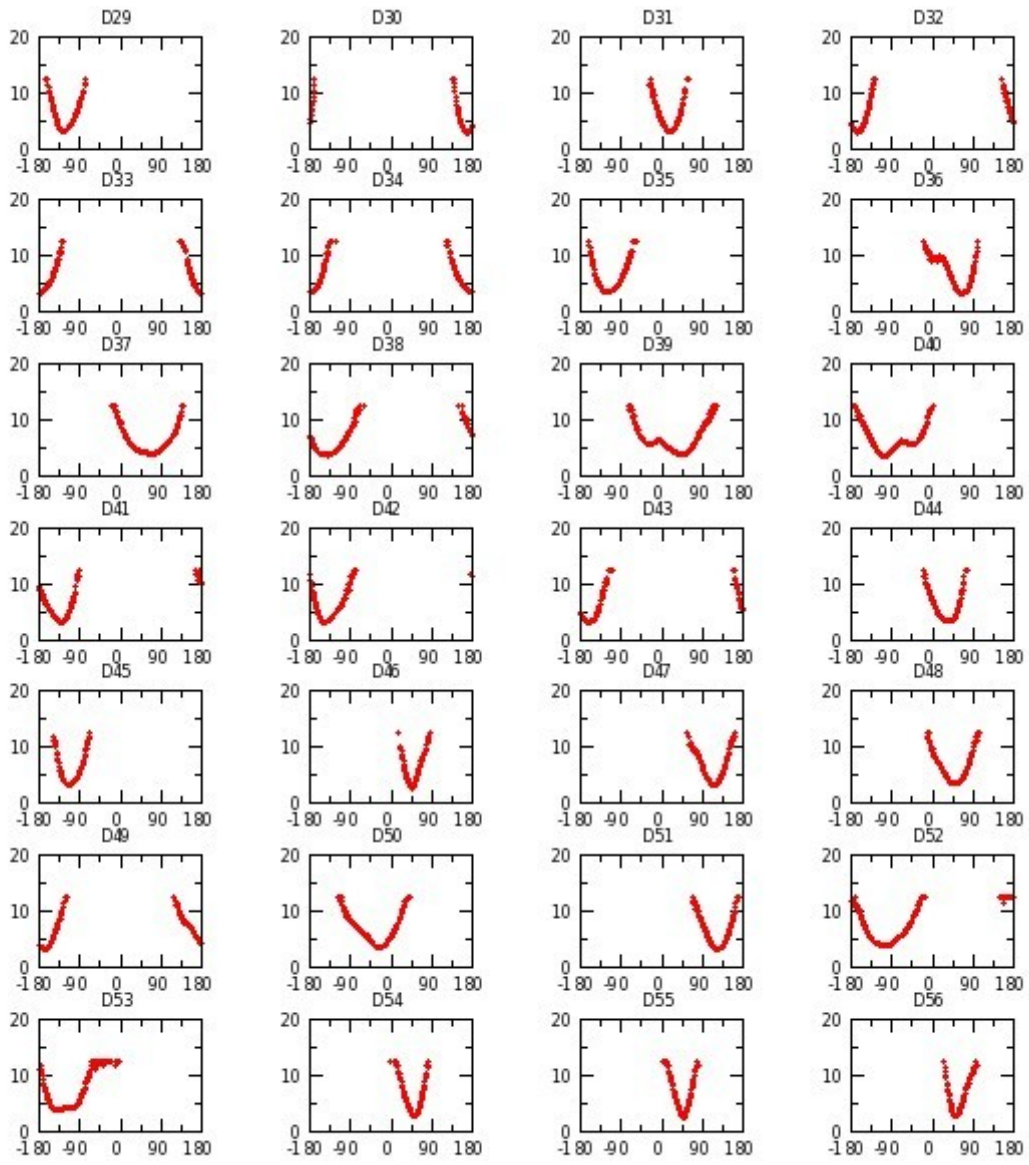


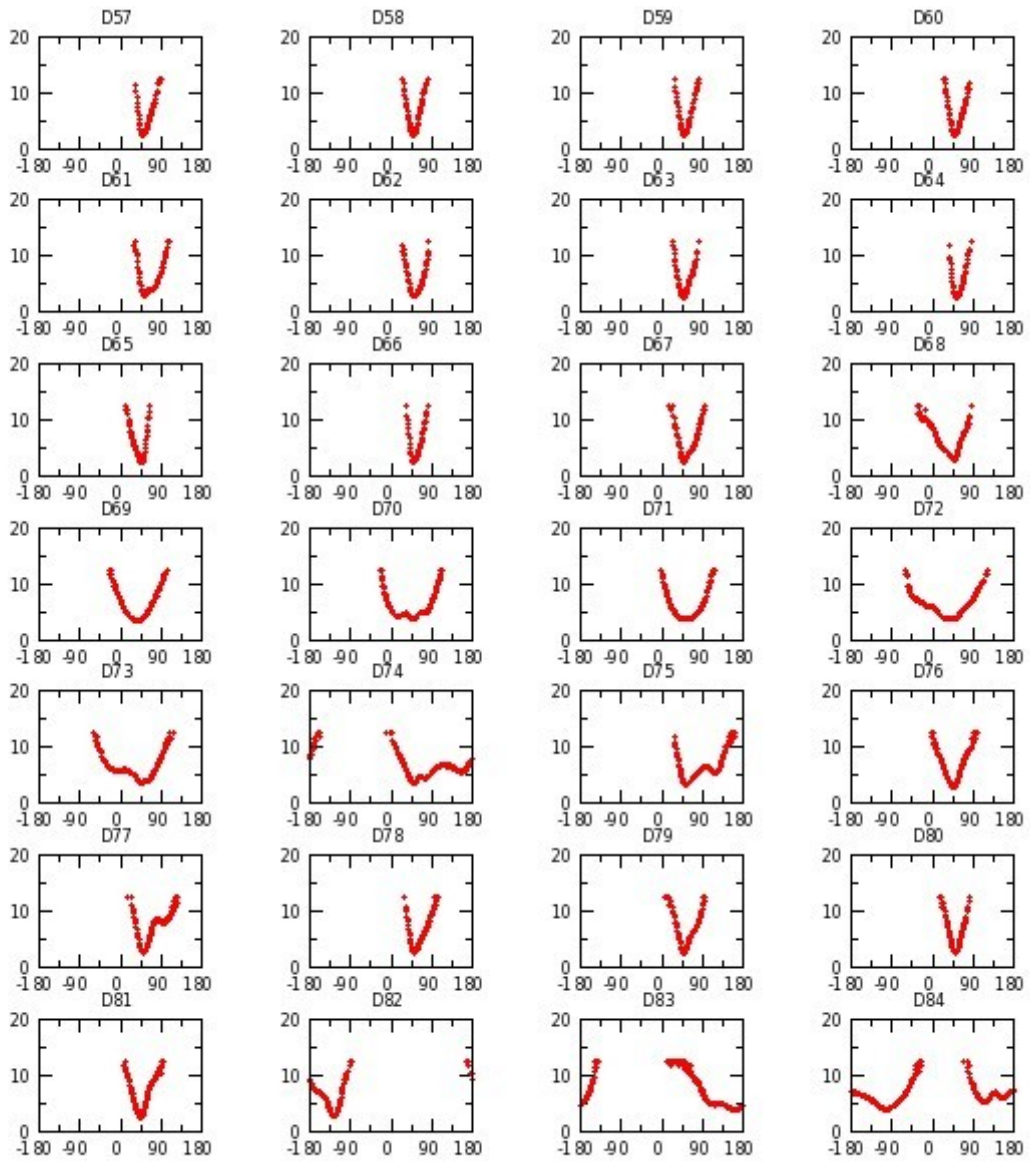


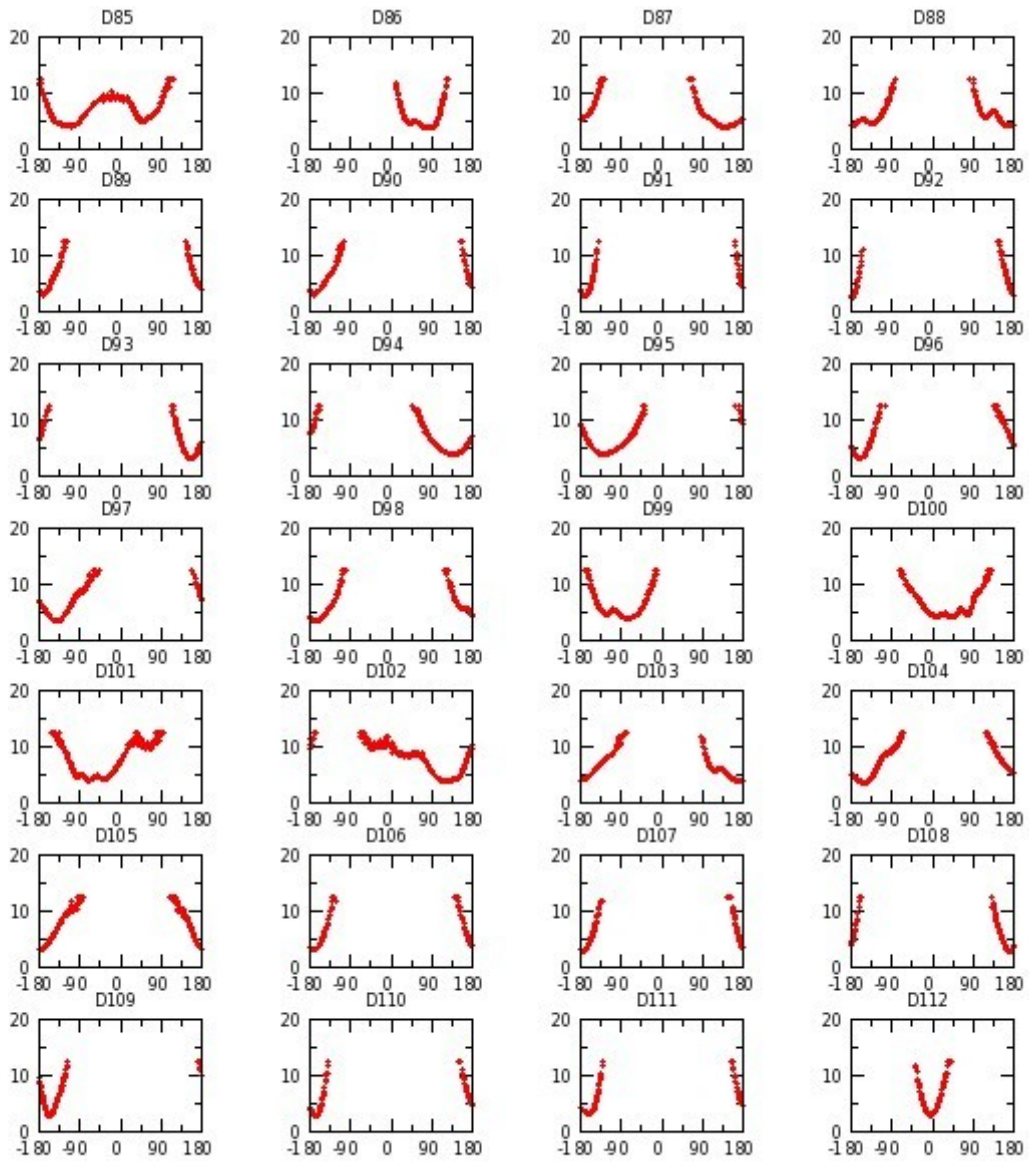


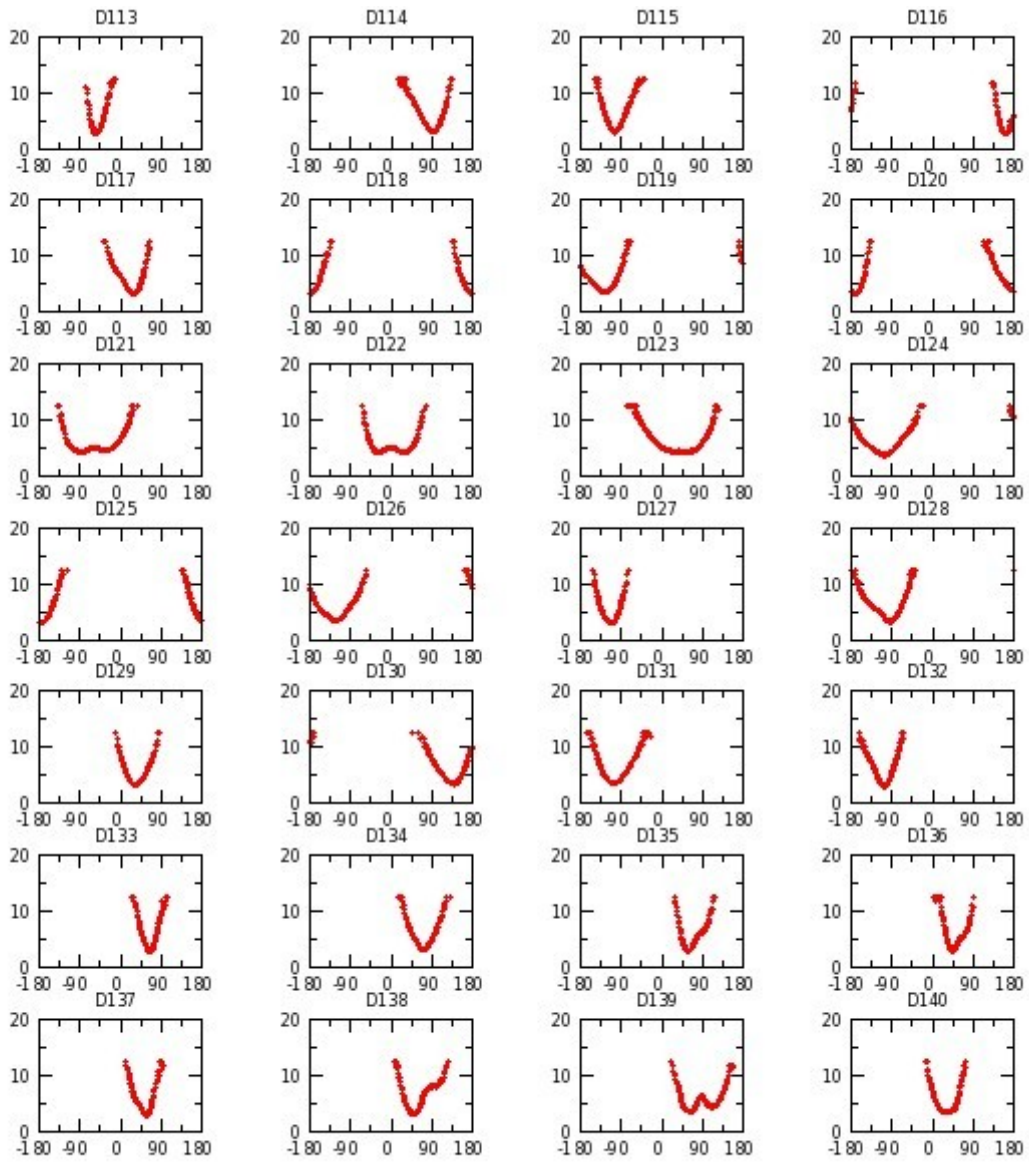
Annexe G 11 : H_GOF réplique II

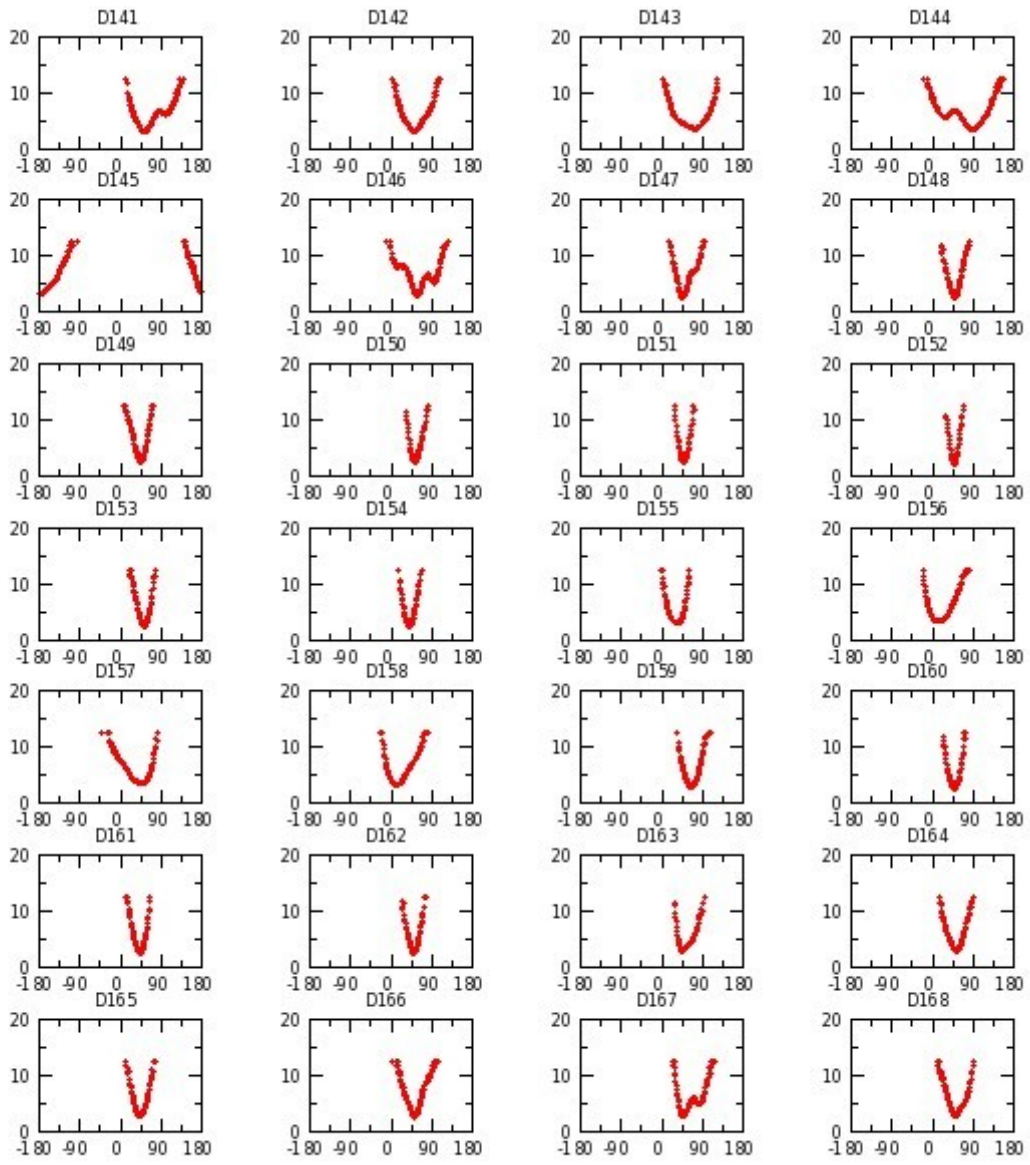


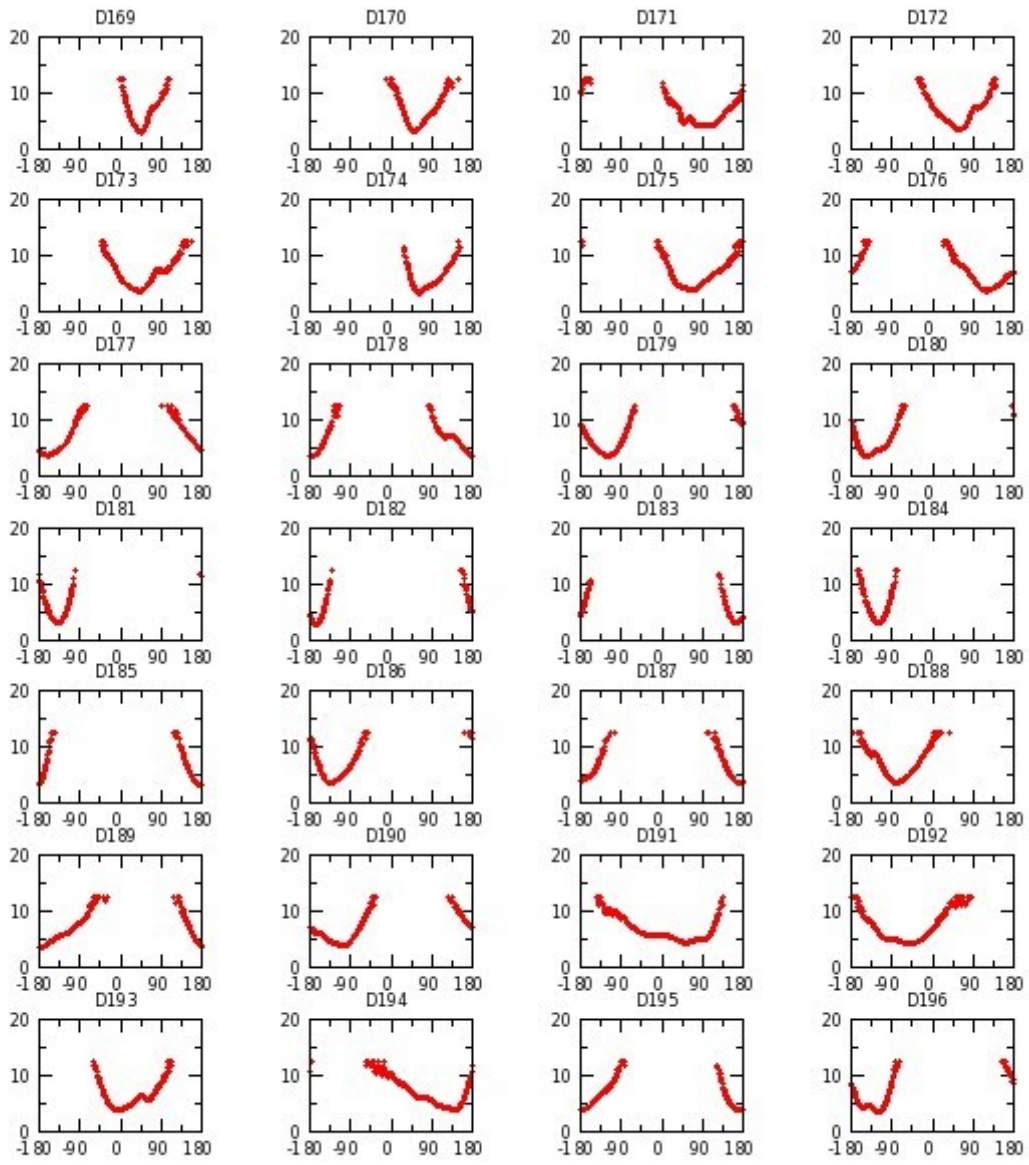


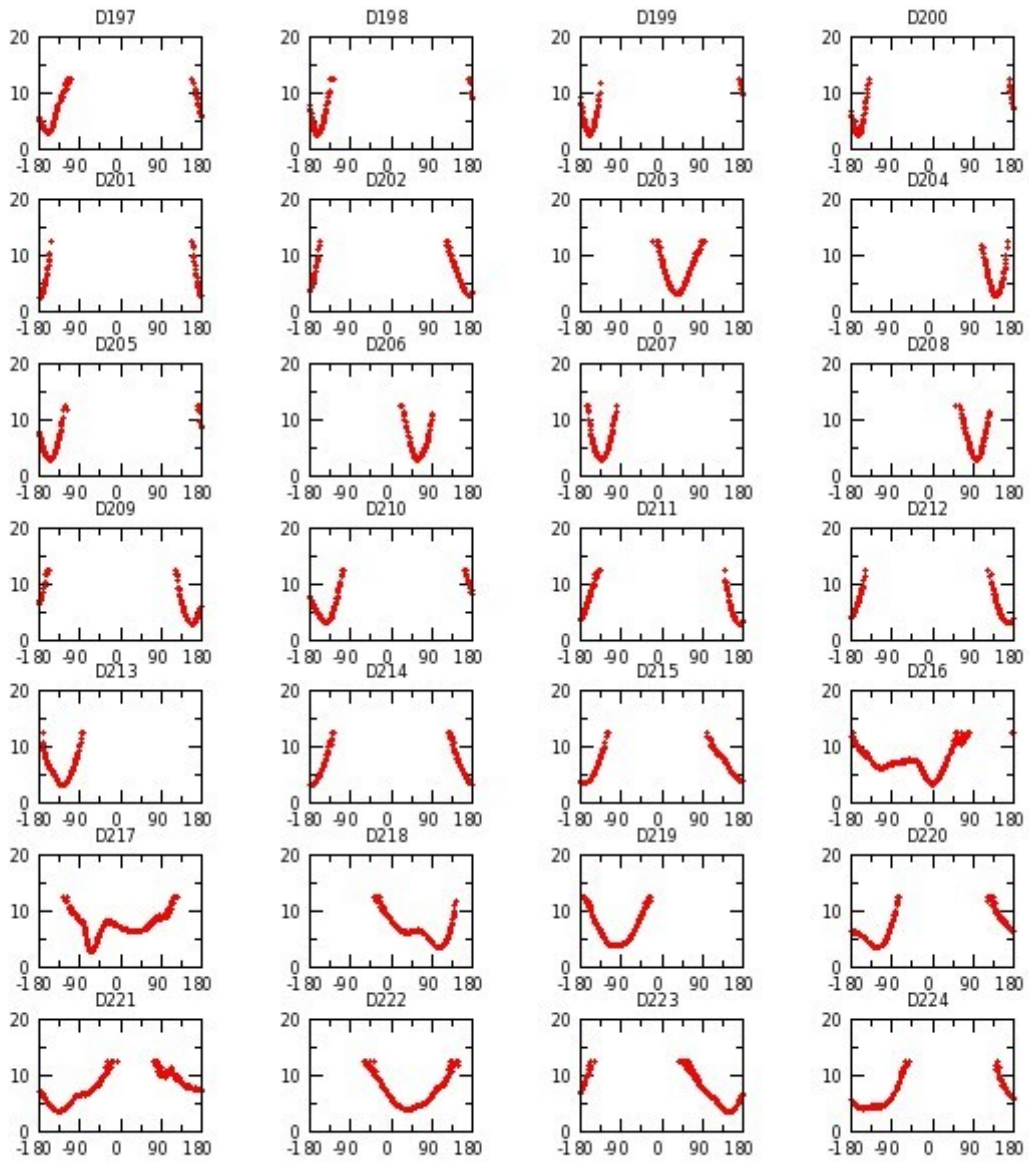


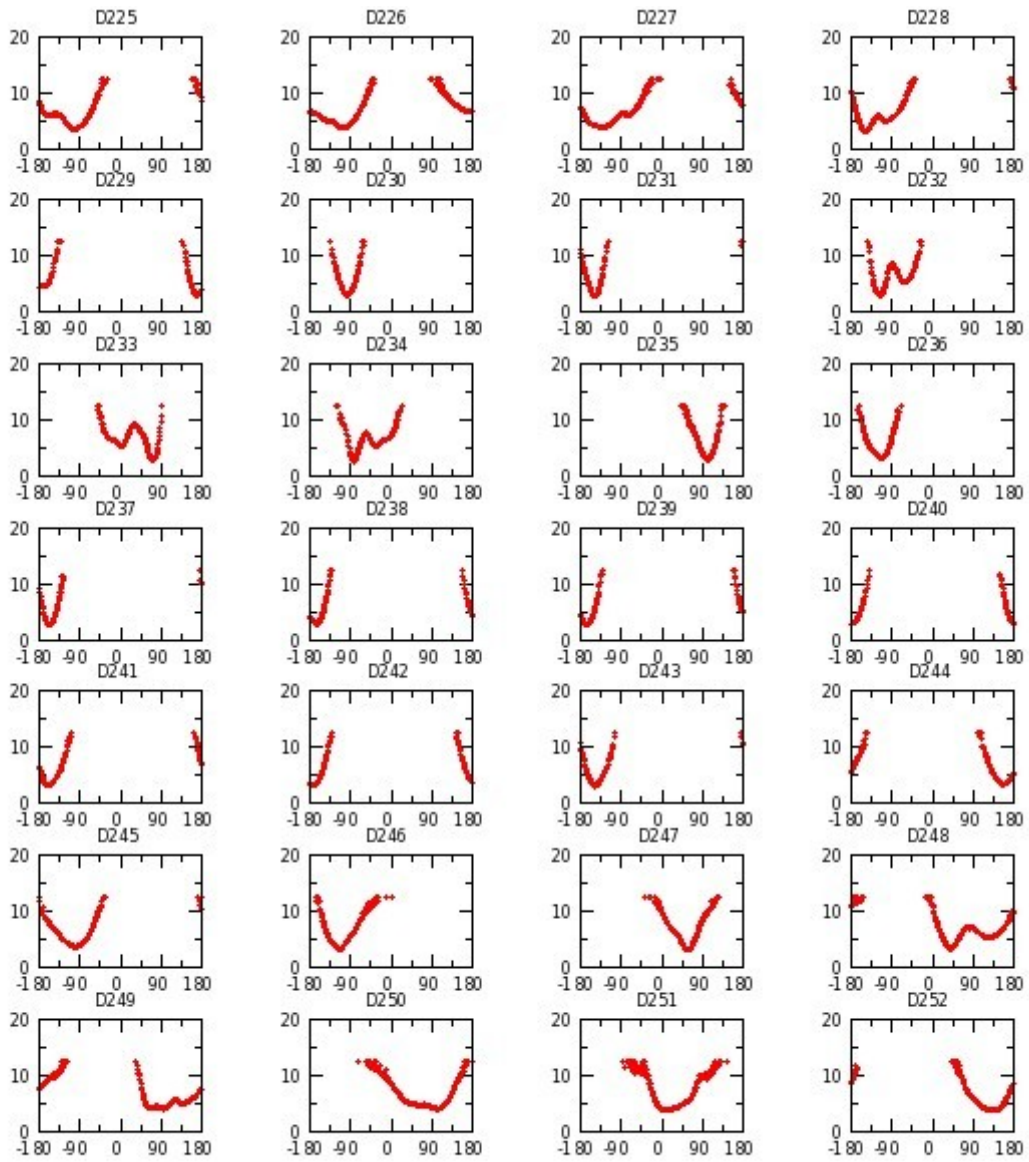


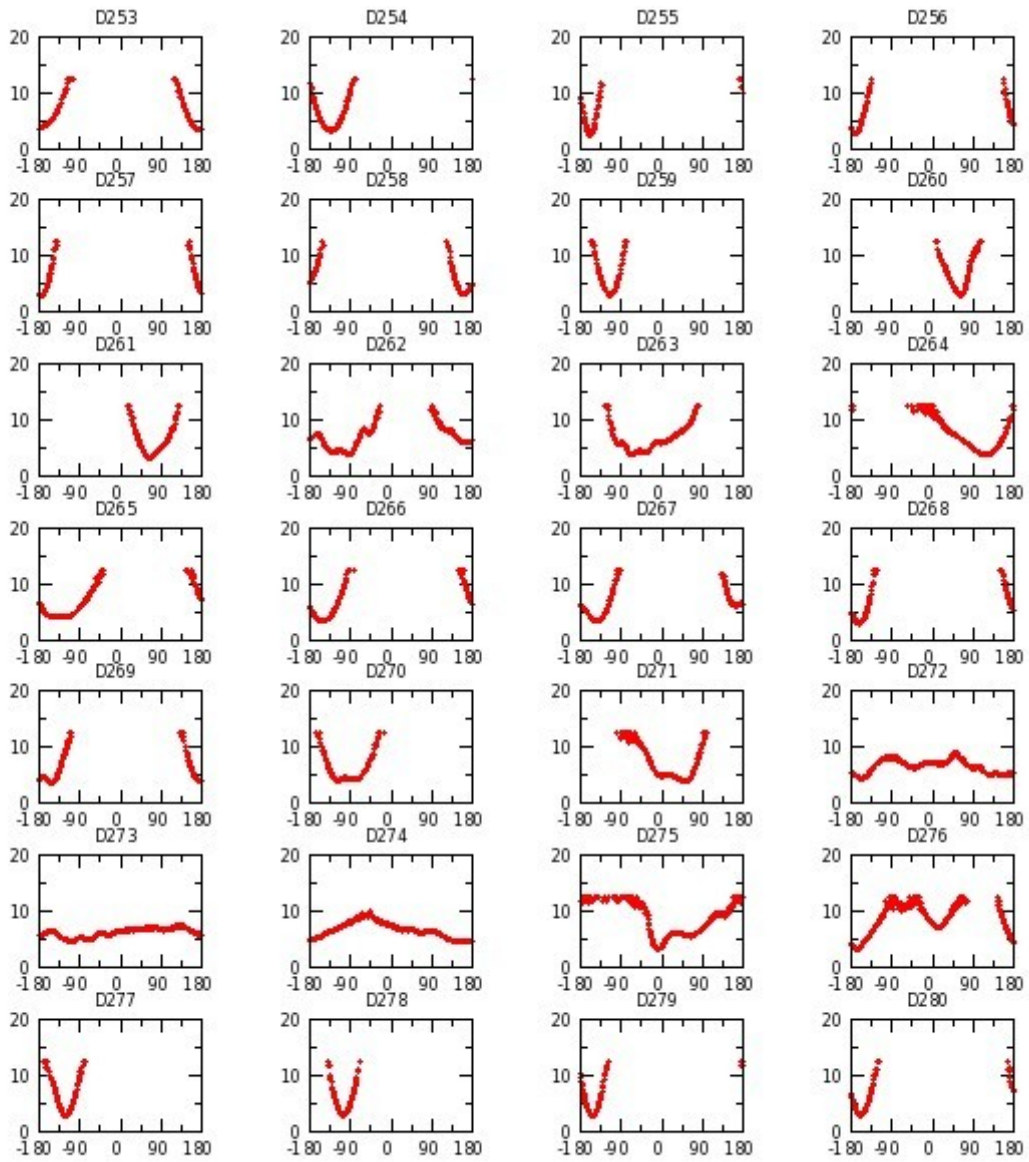


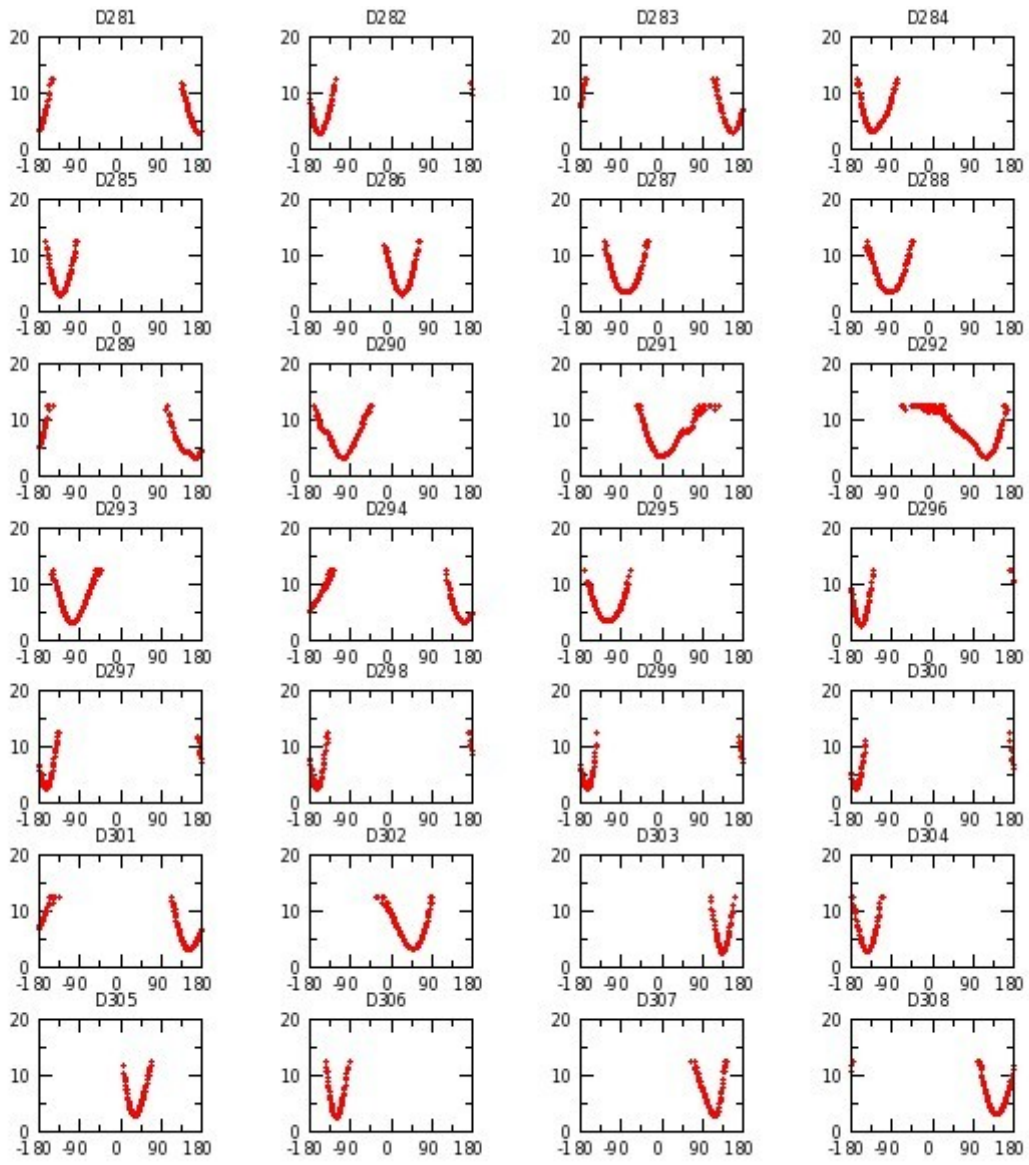


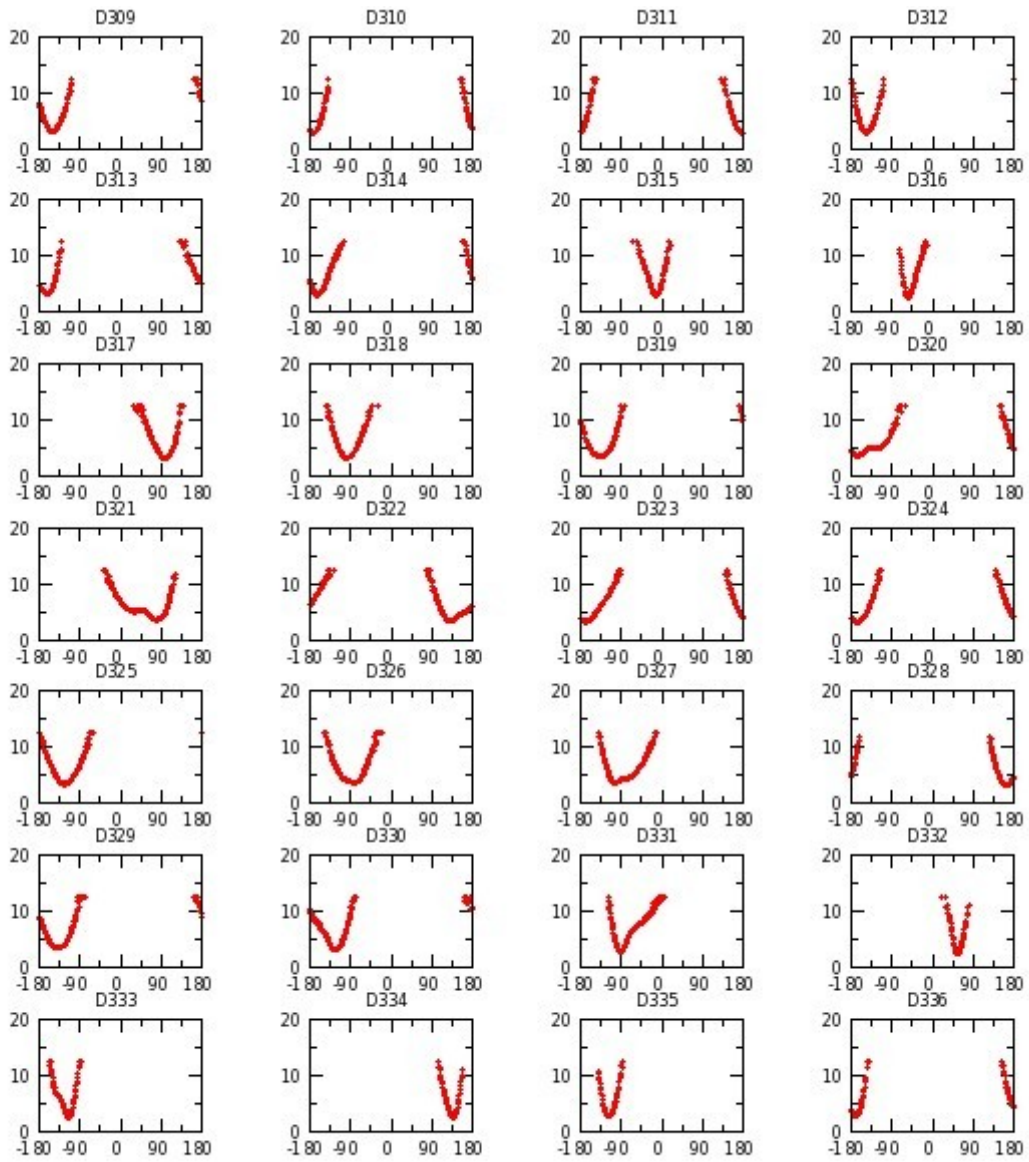


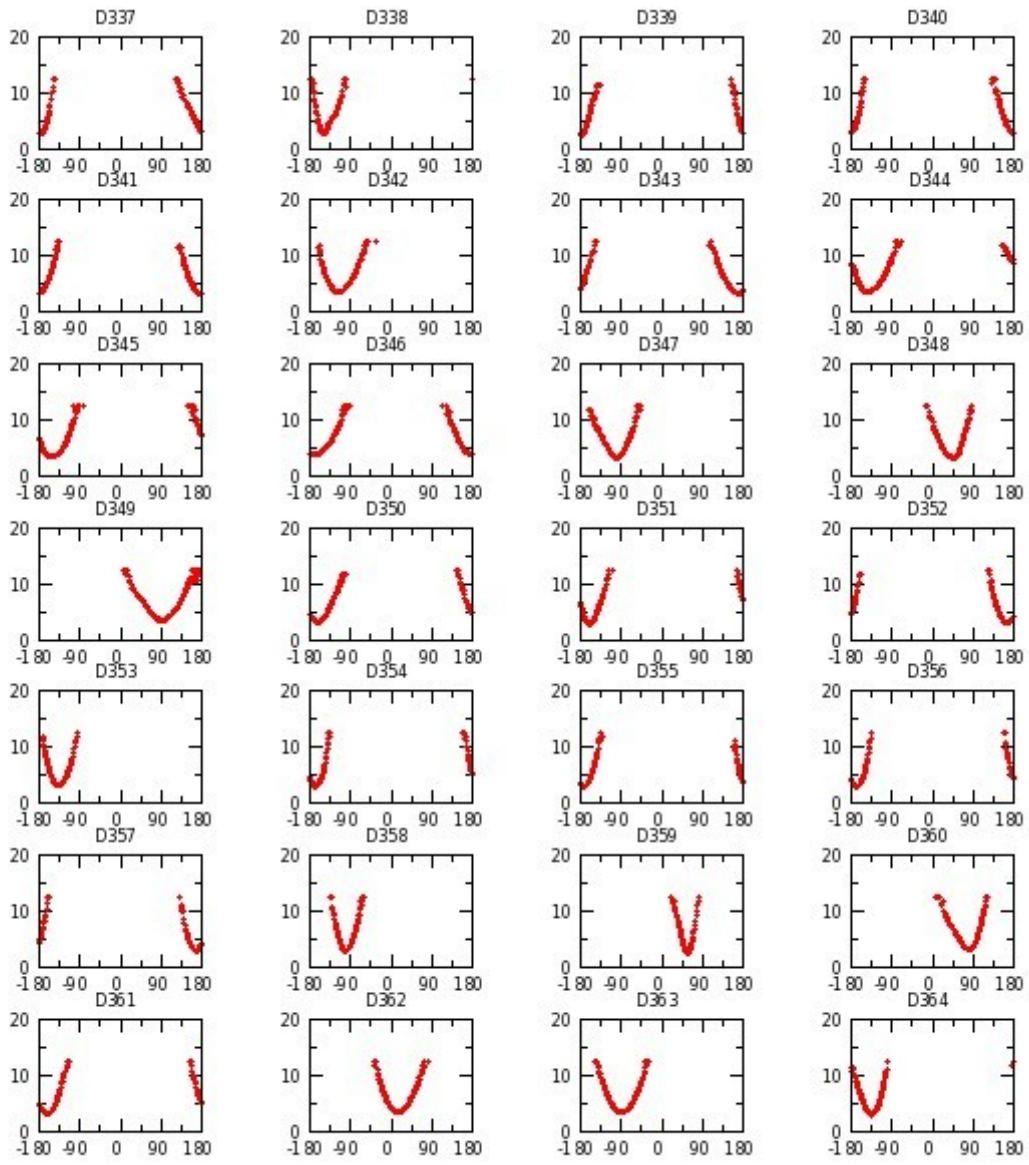


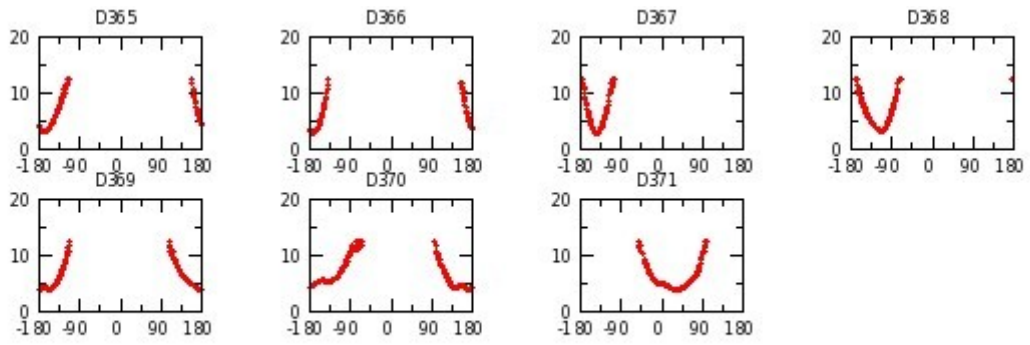




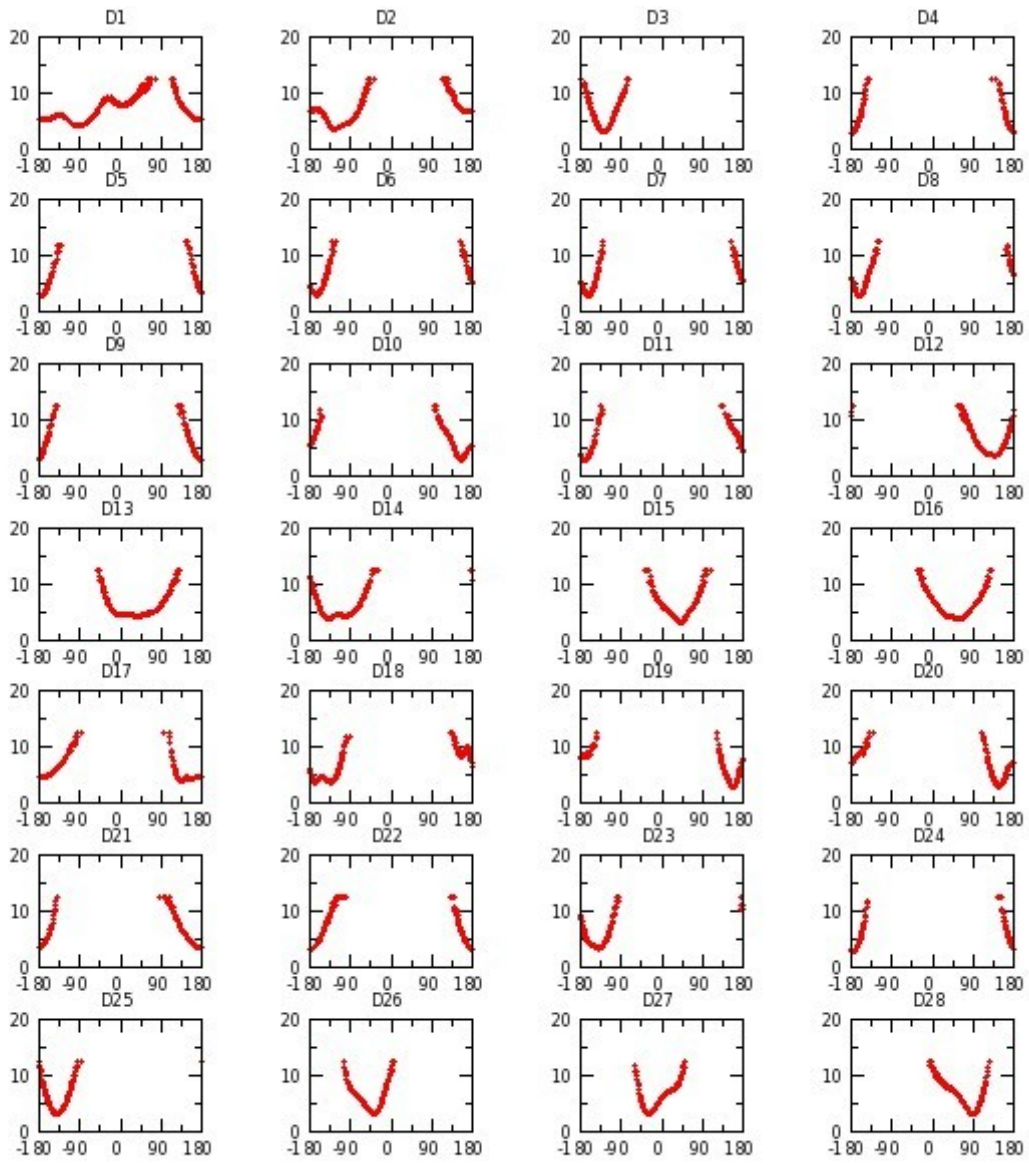


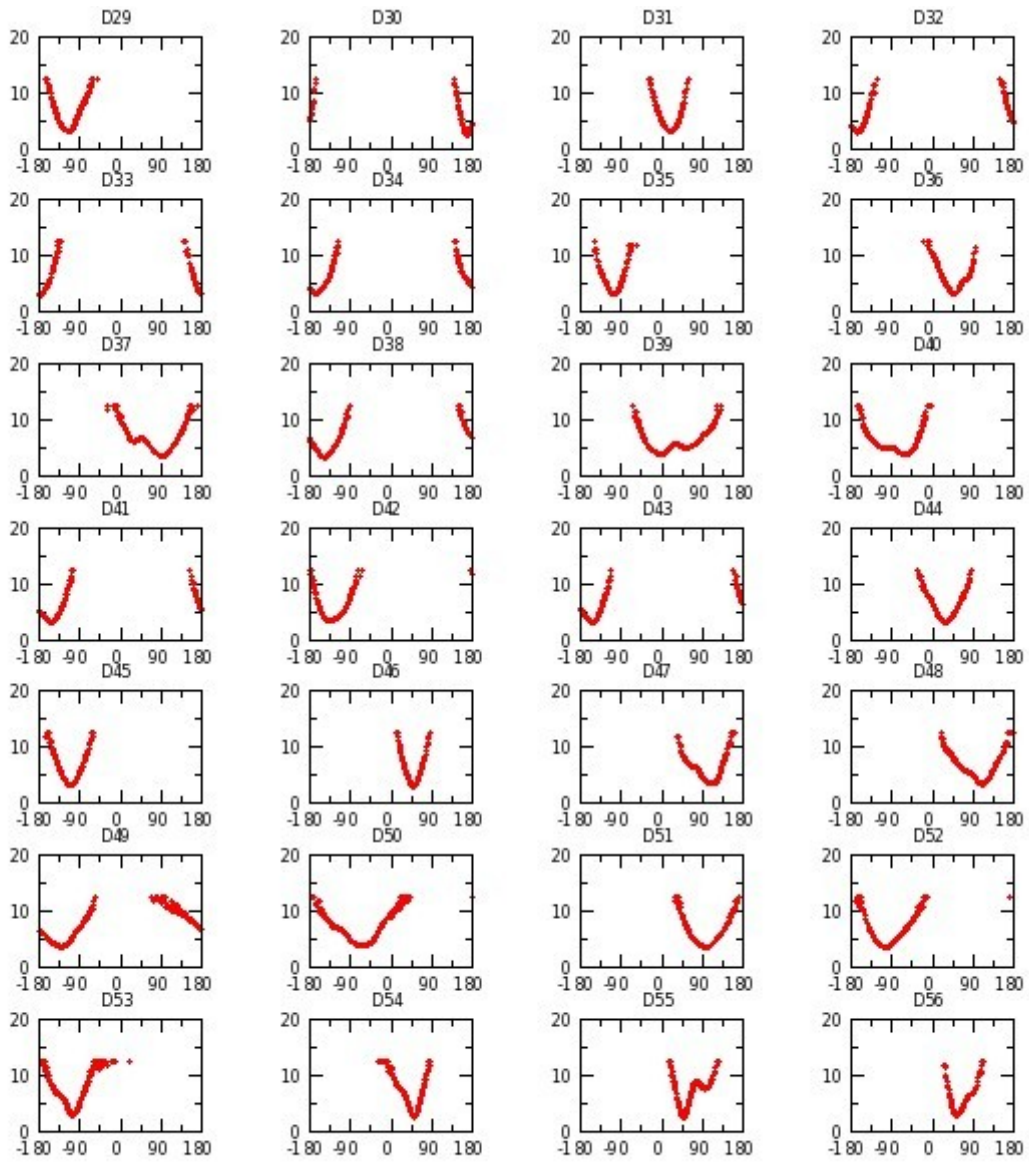


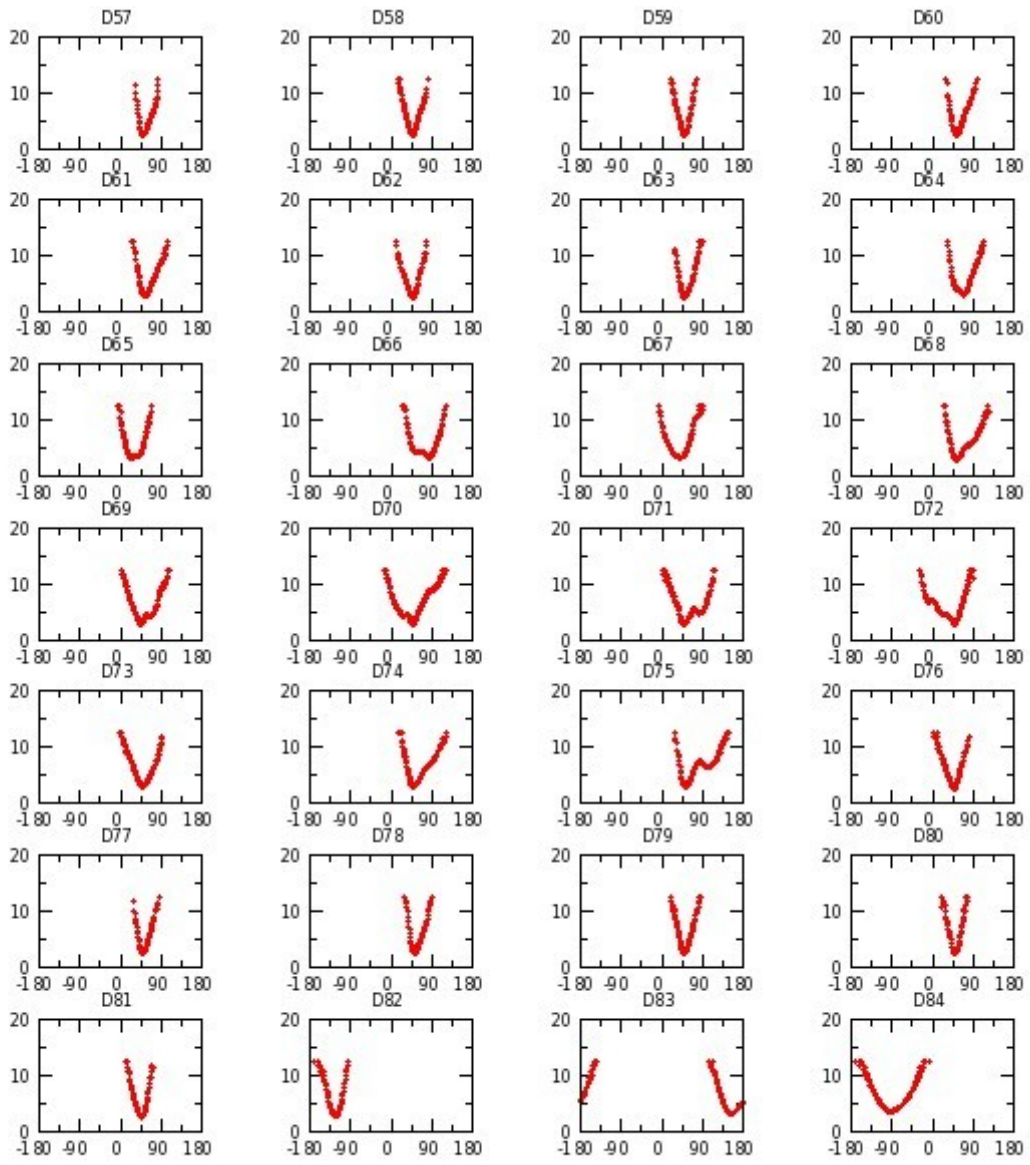


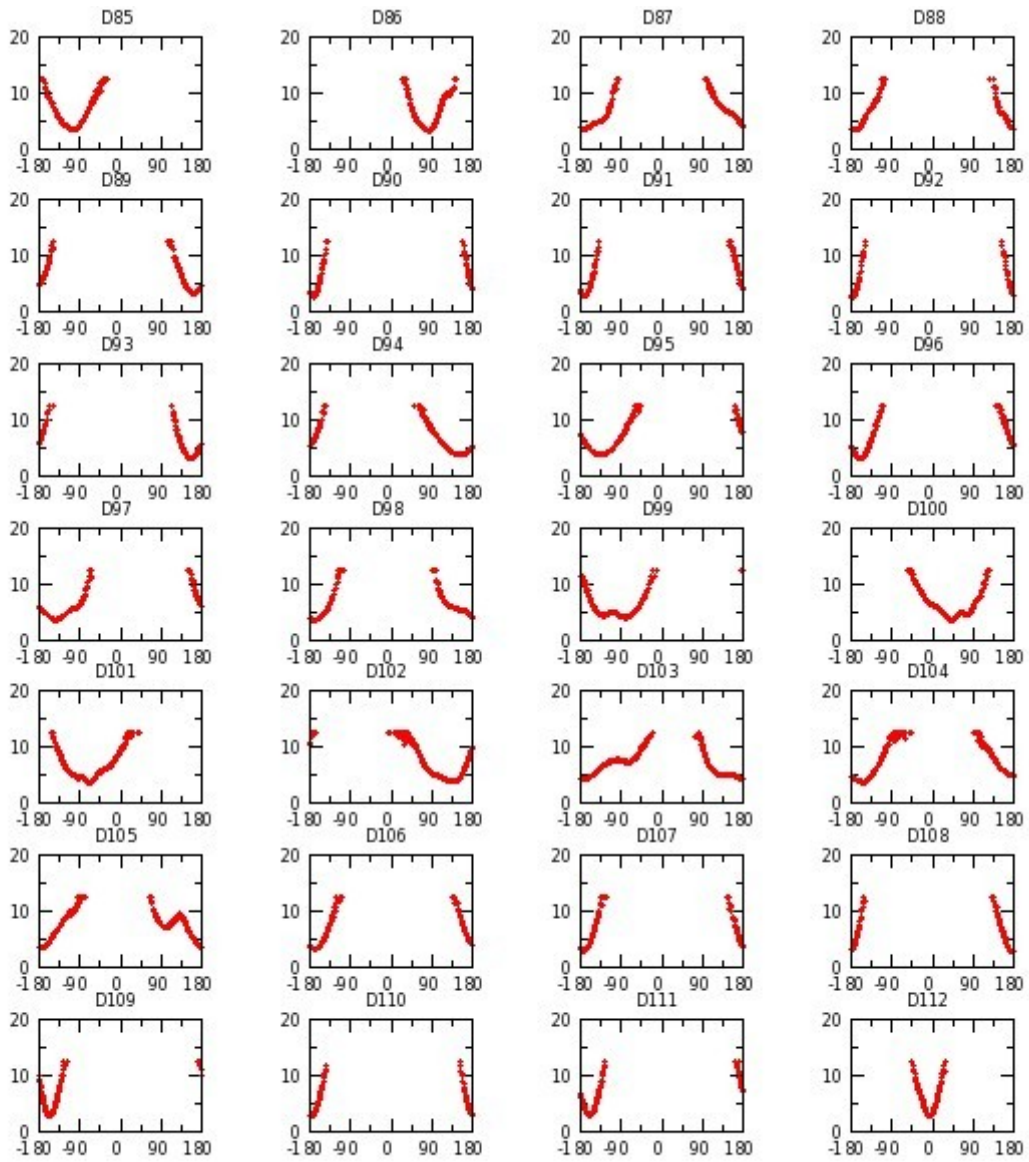


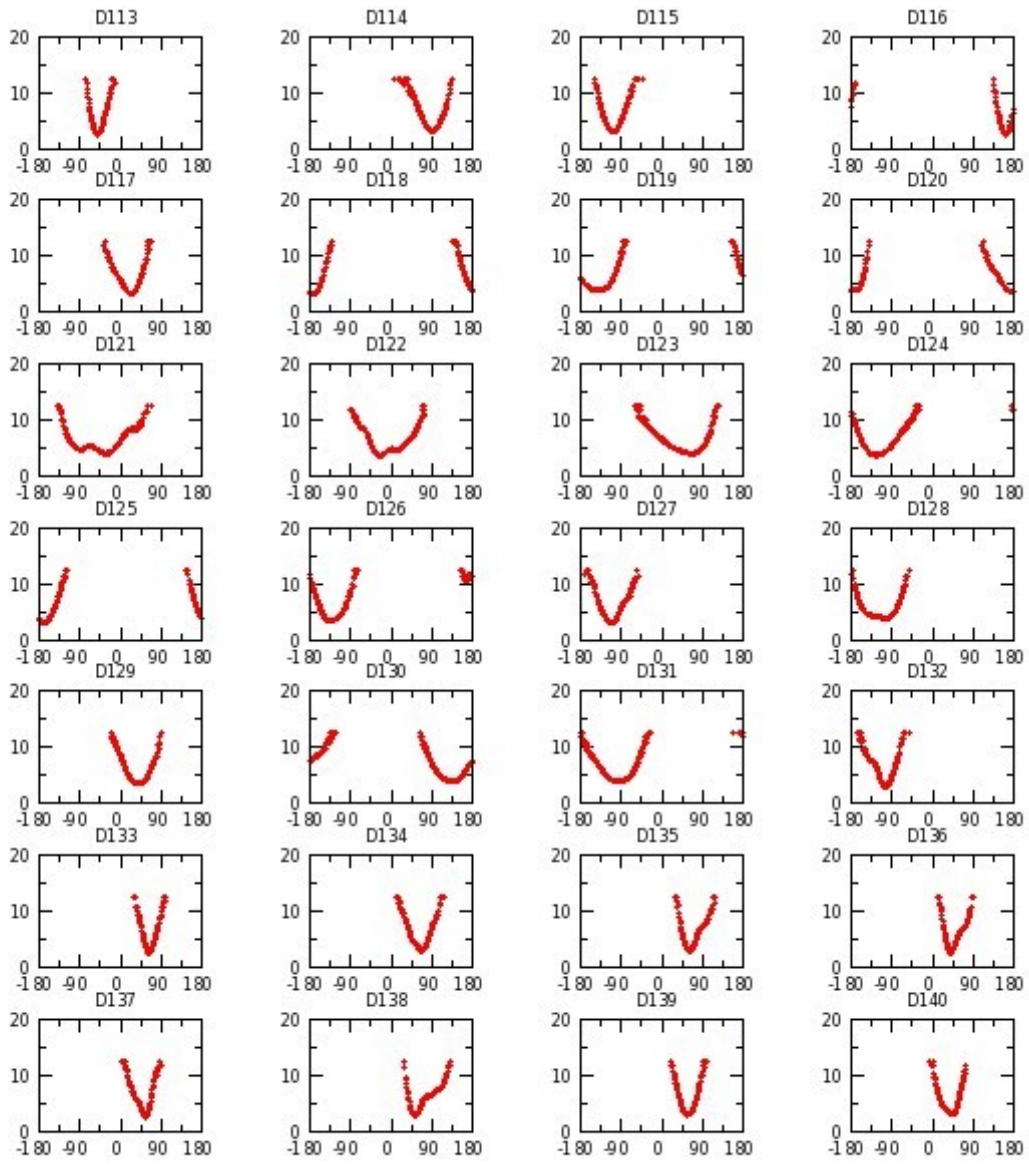
Annexe G 12 : H_GOF réplique III

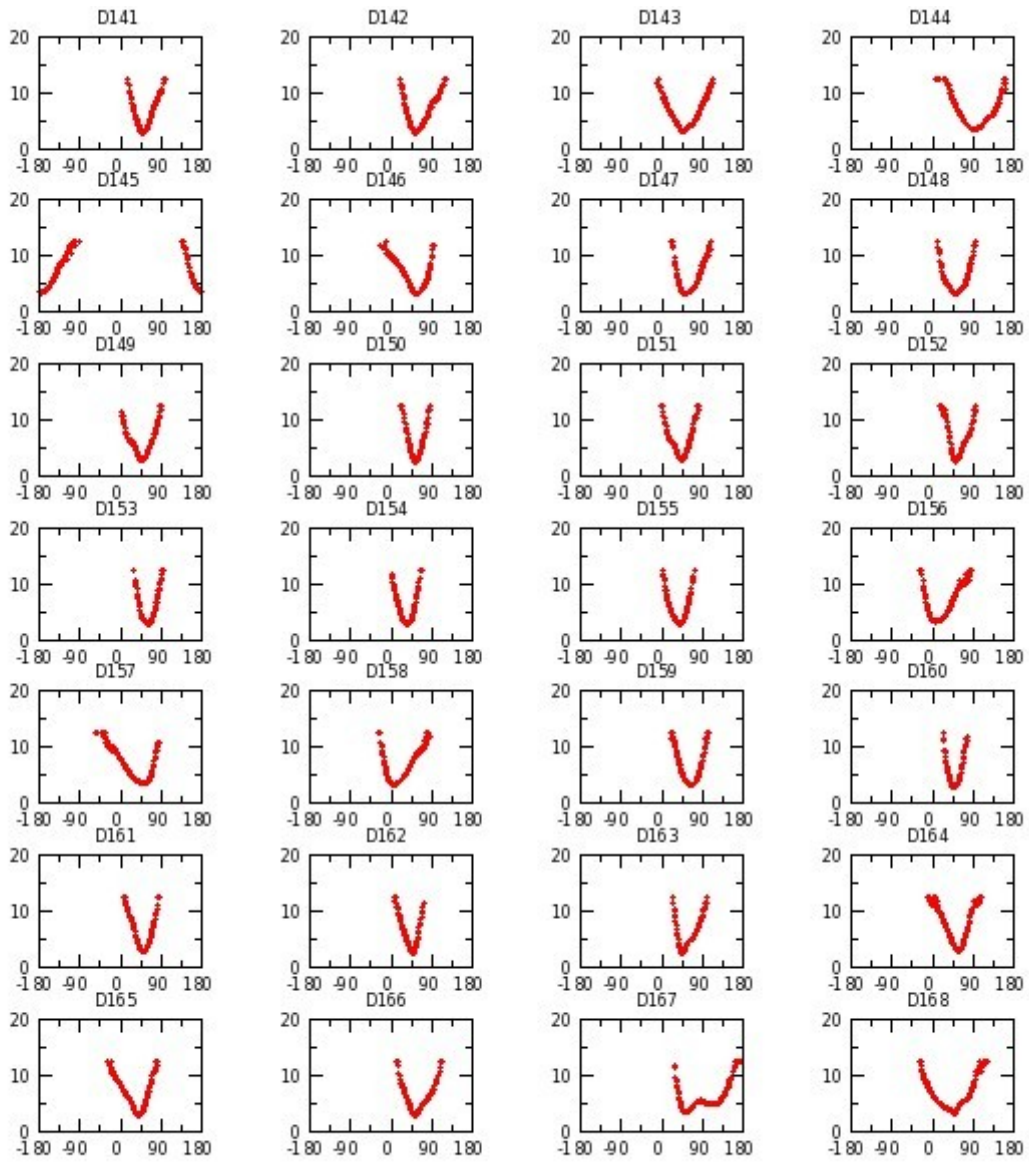


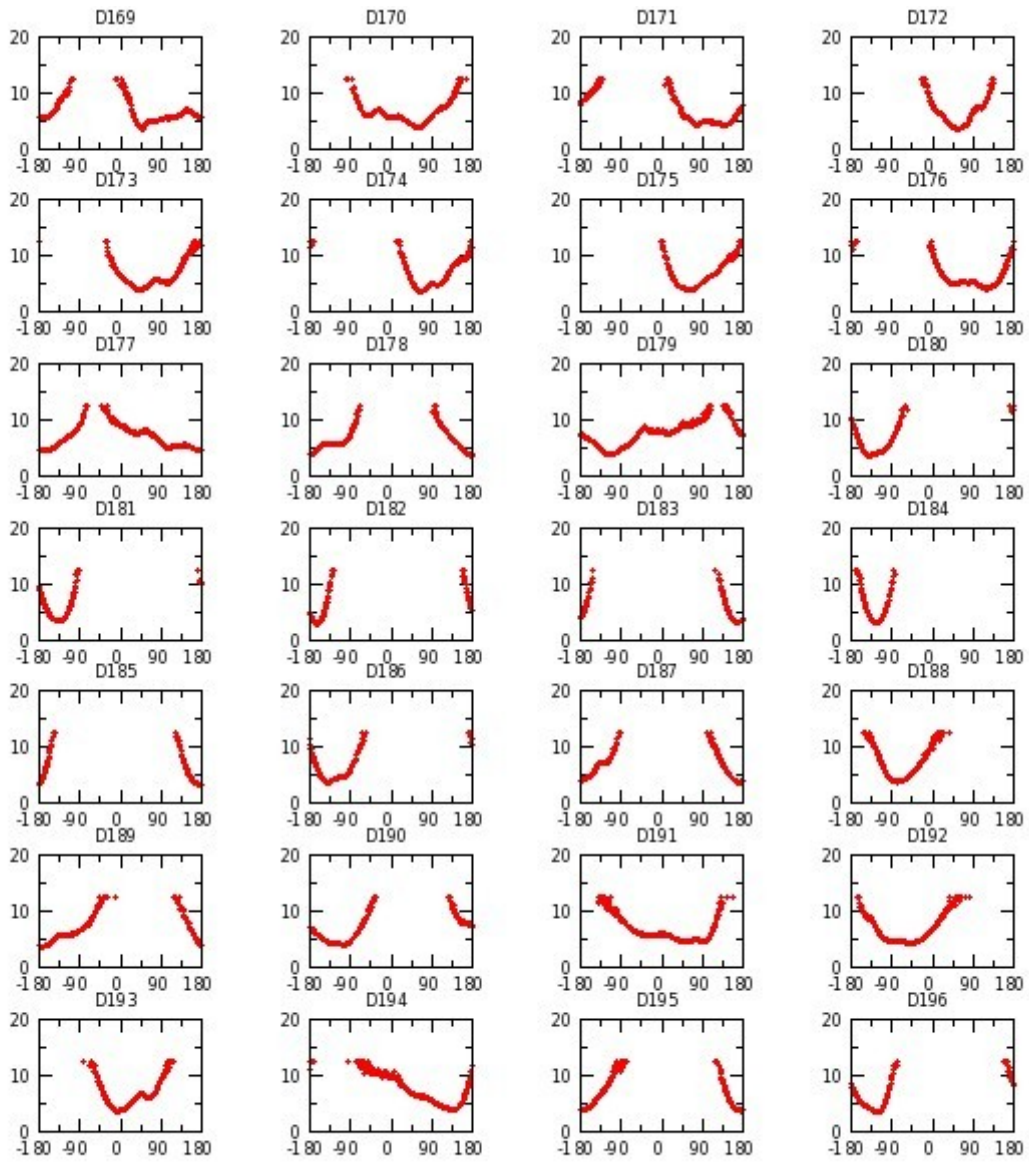


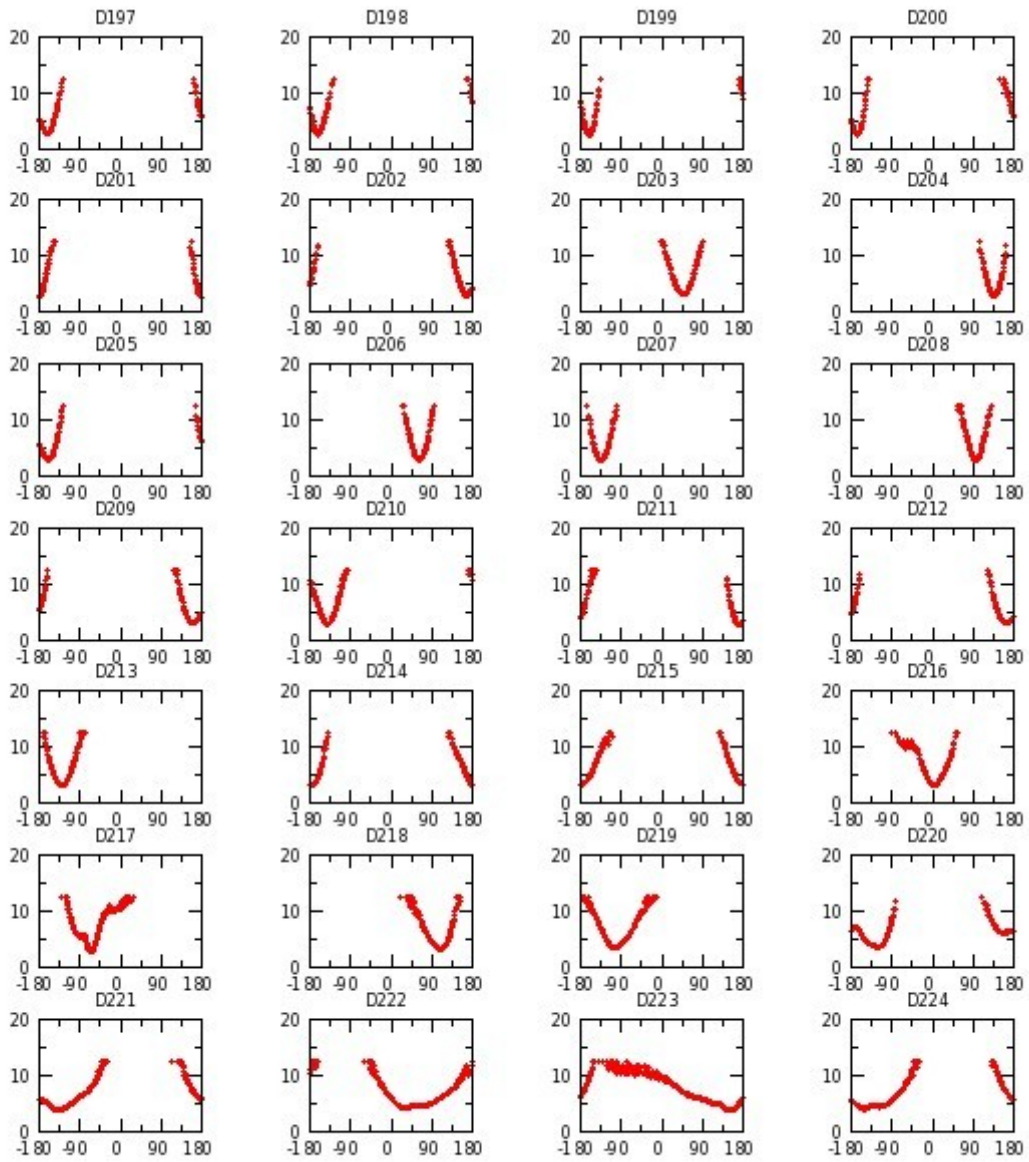


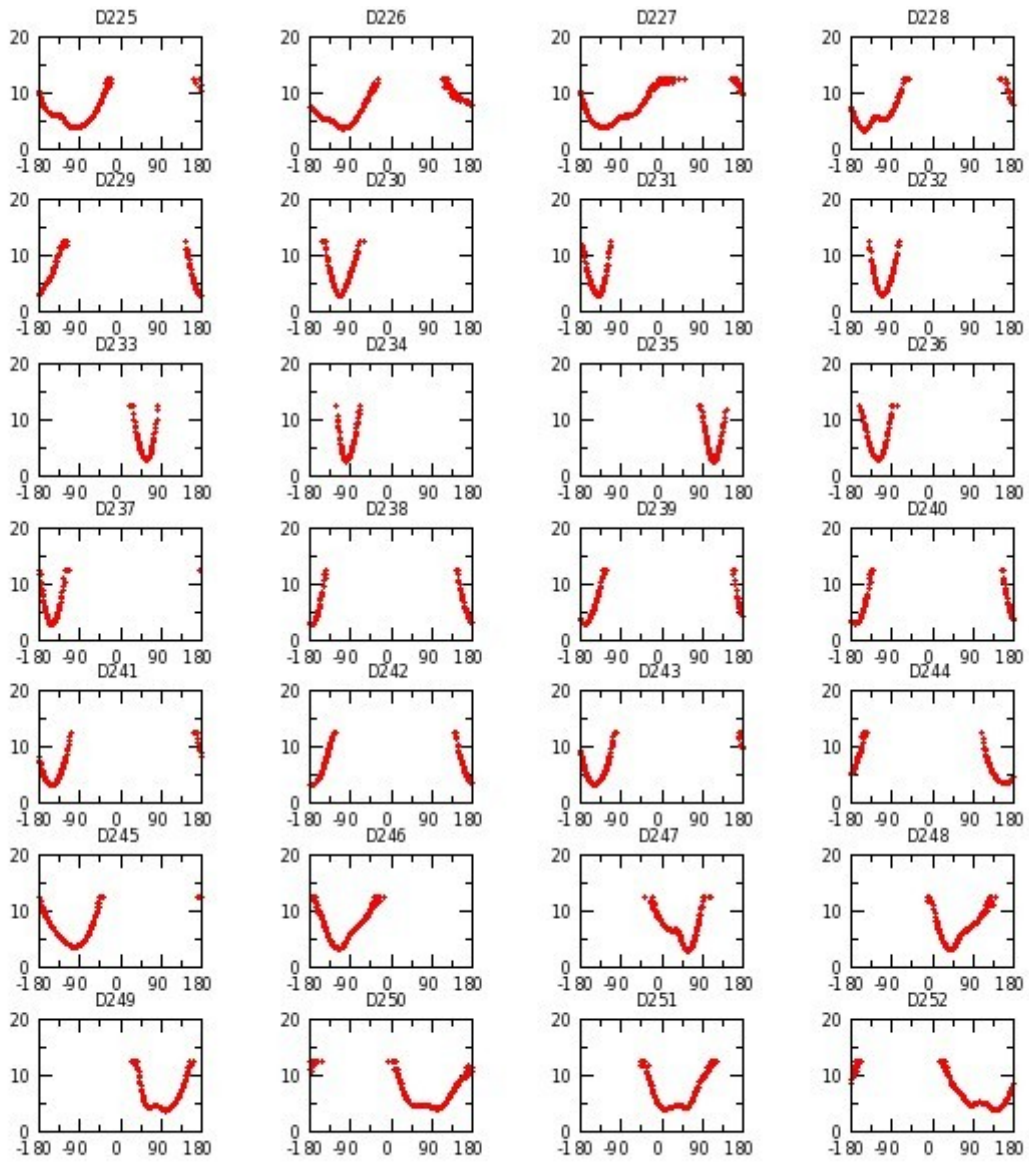


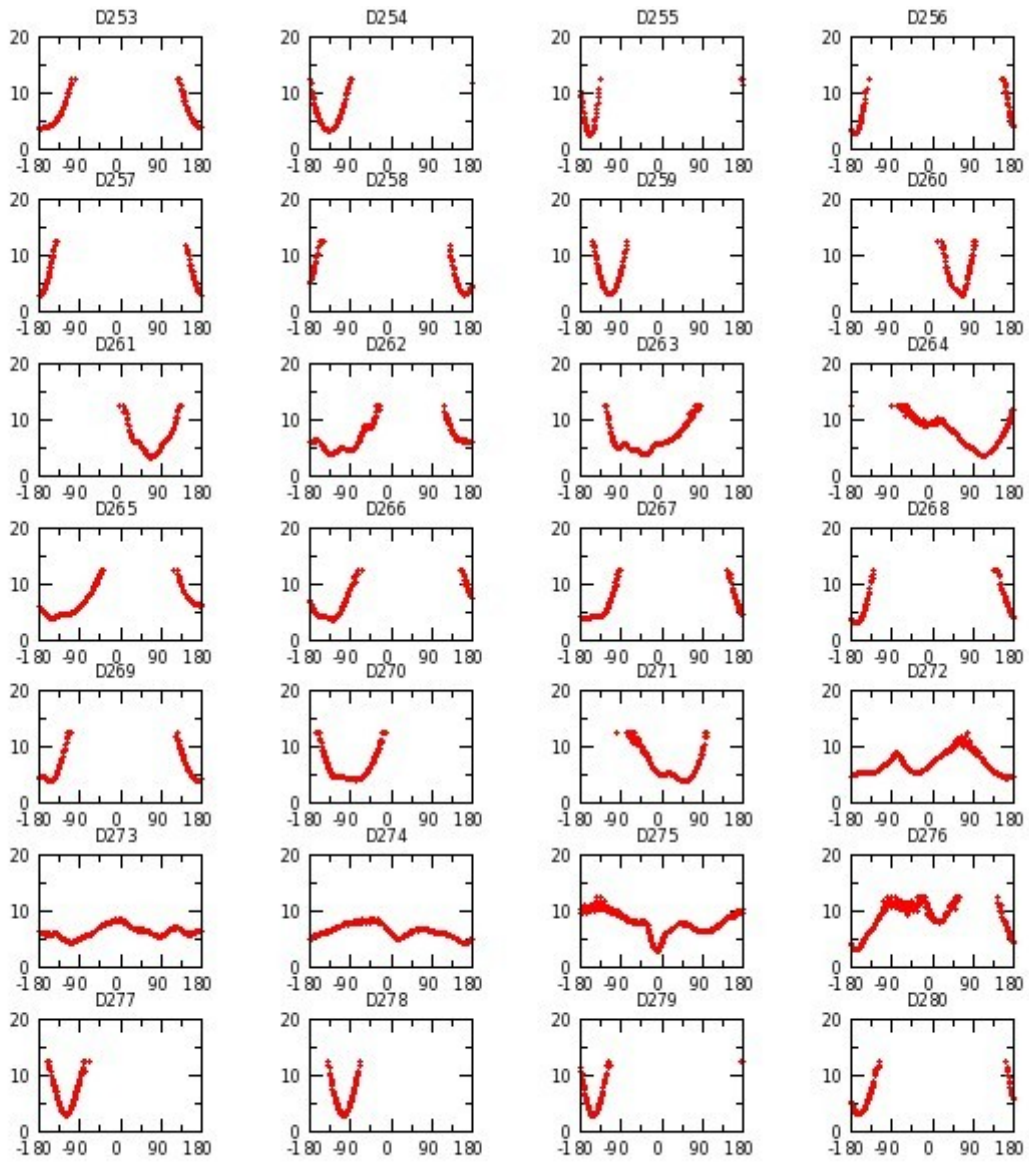


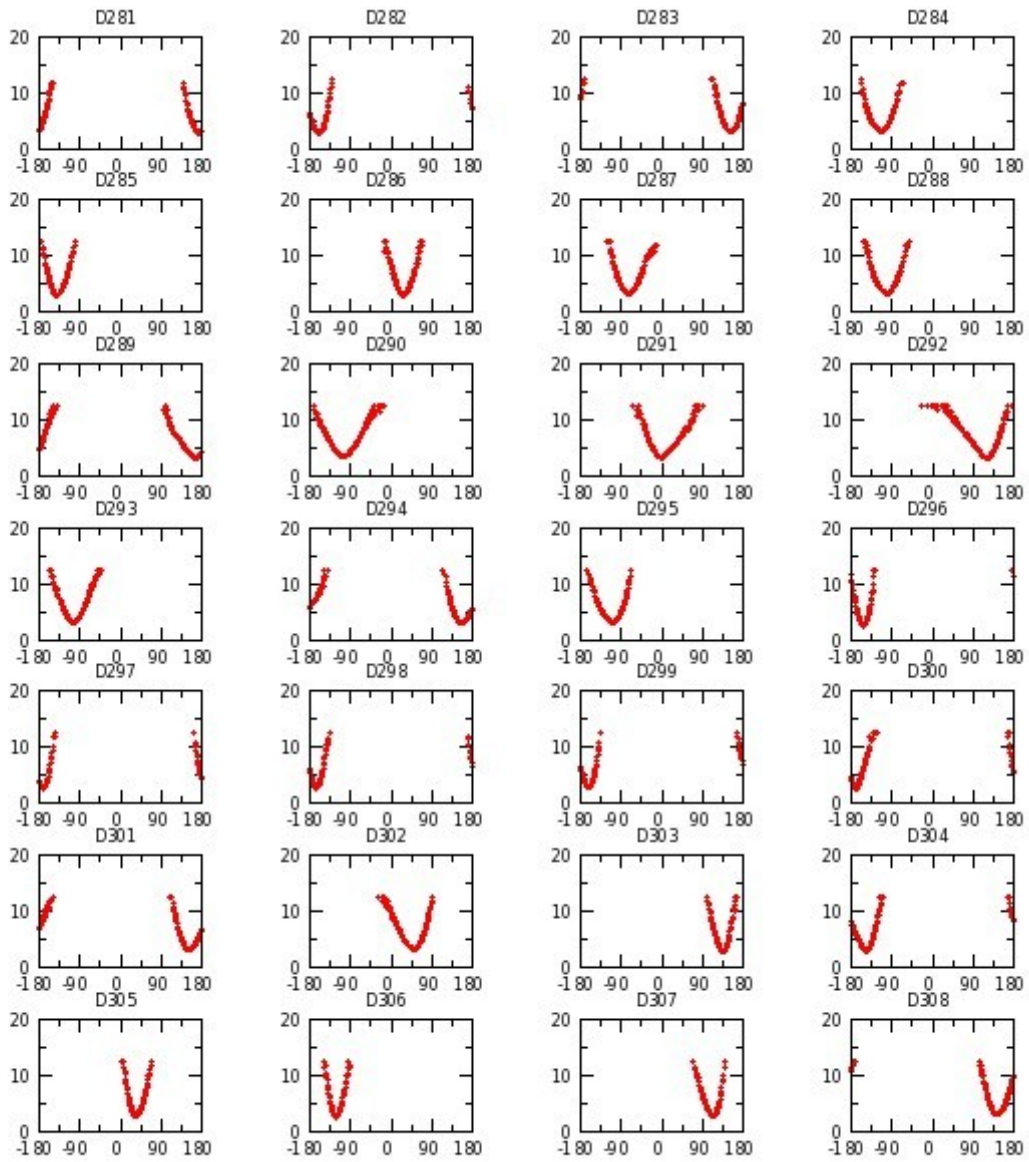


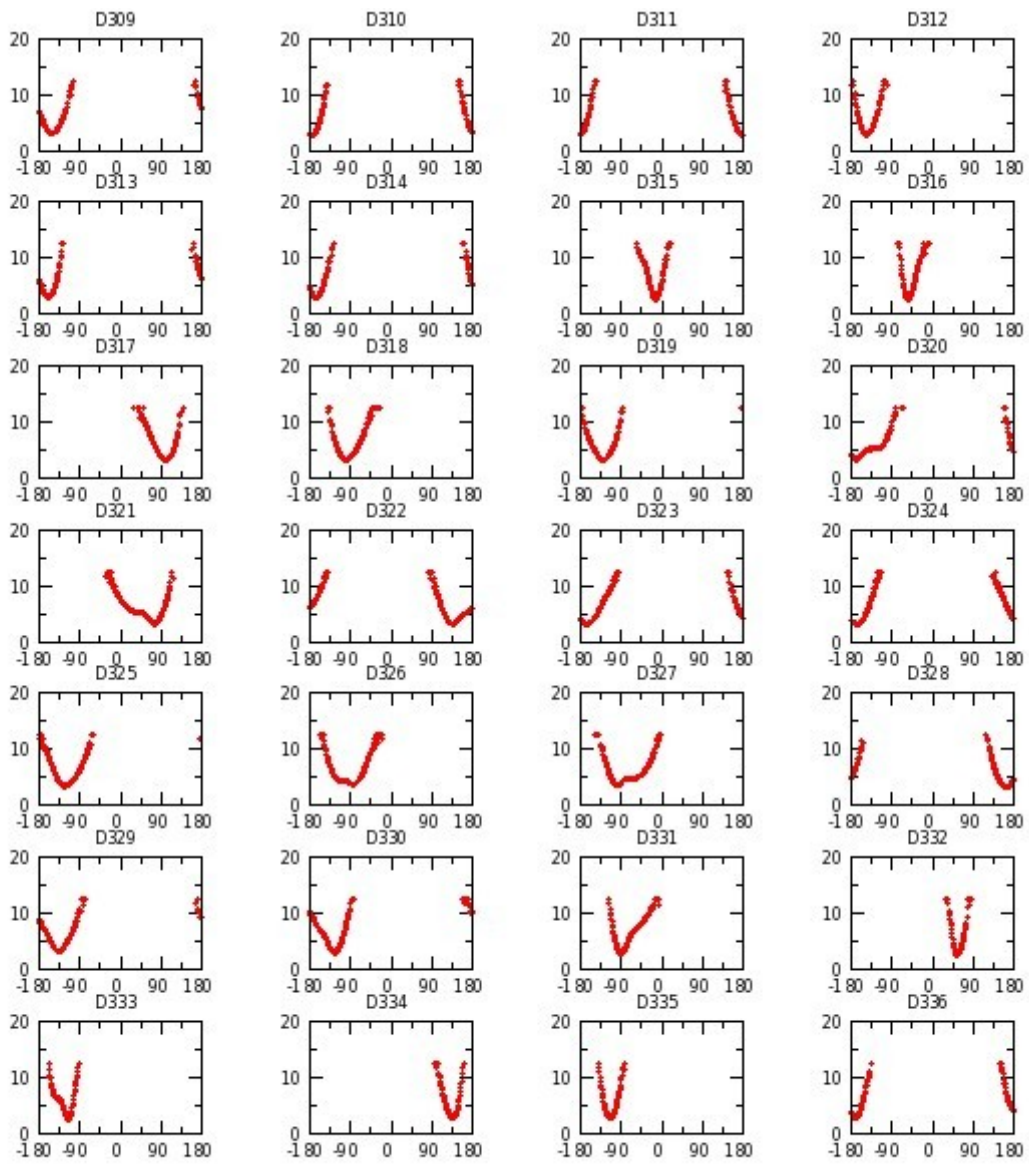


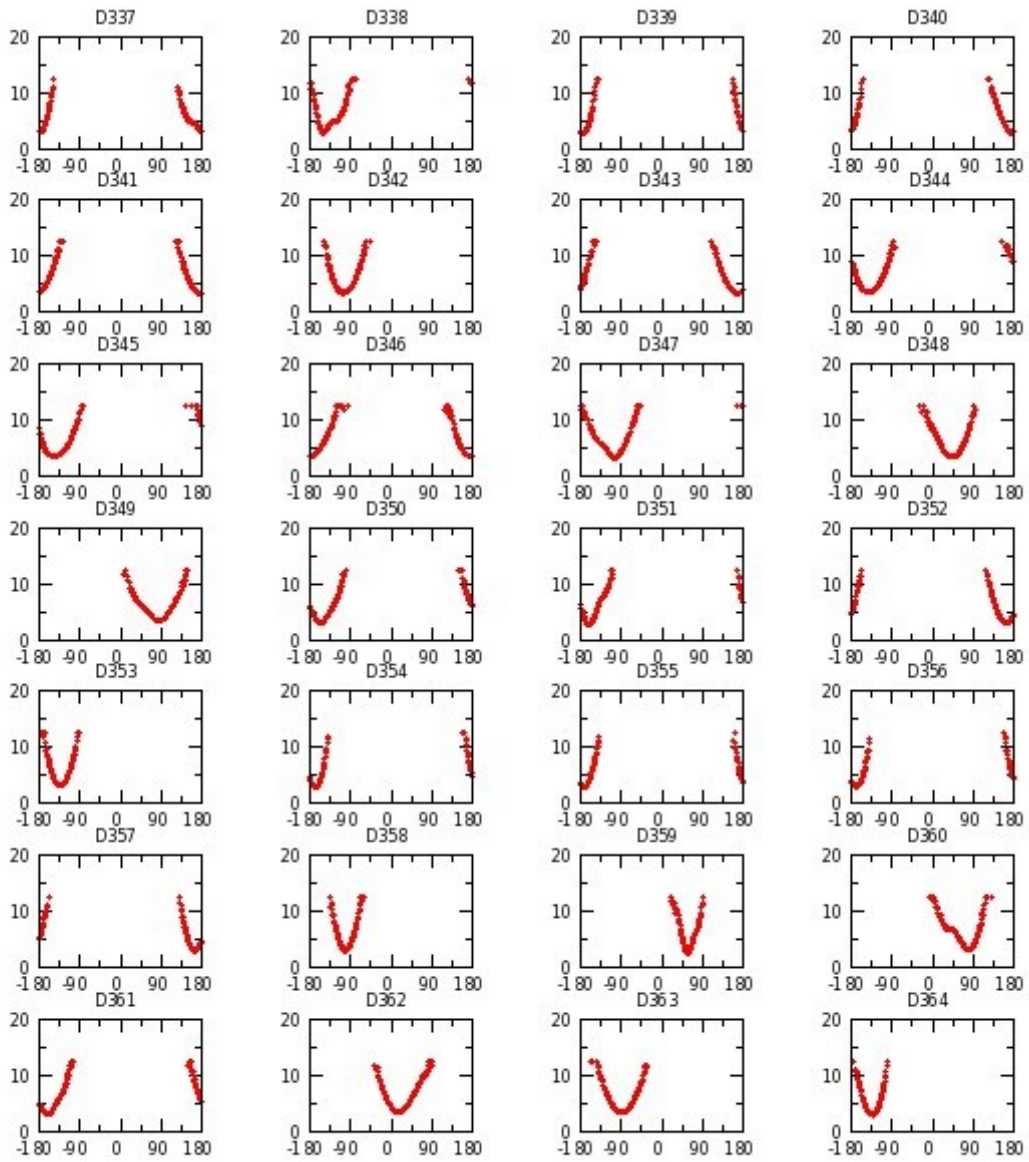


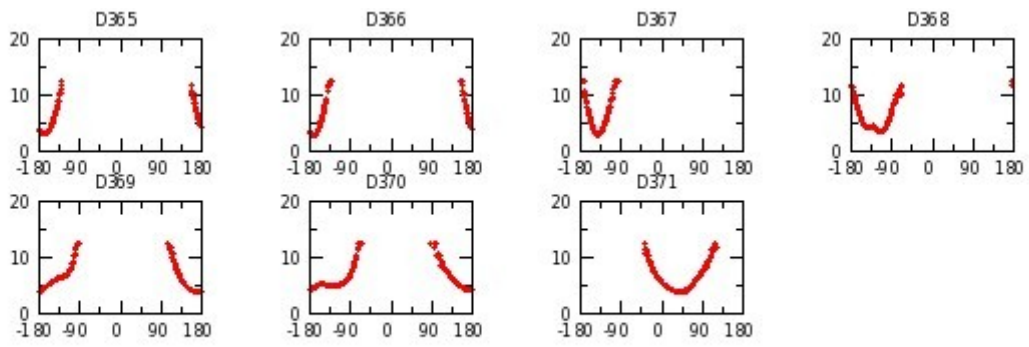




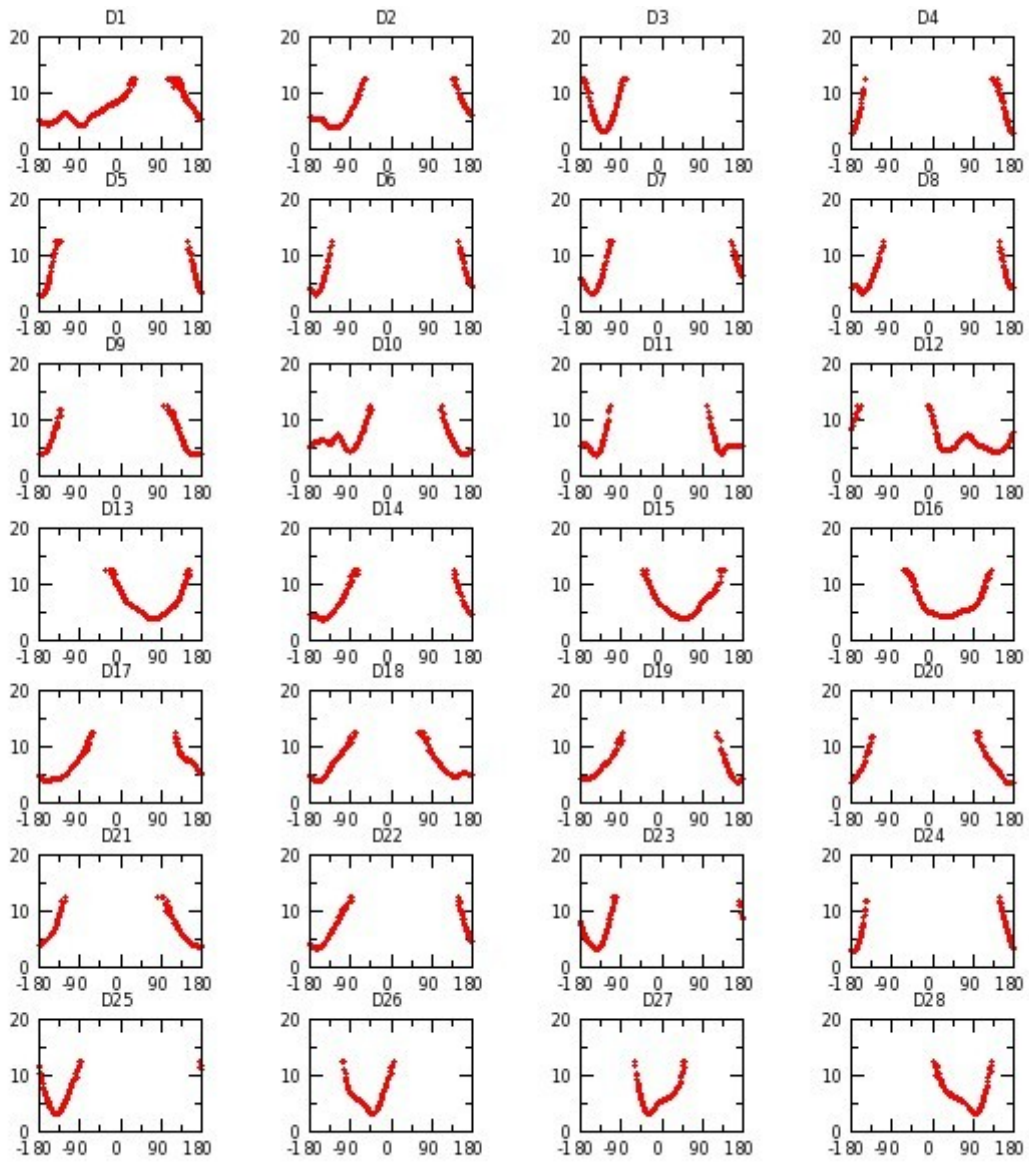


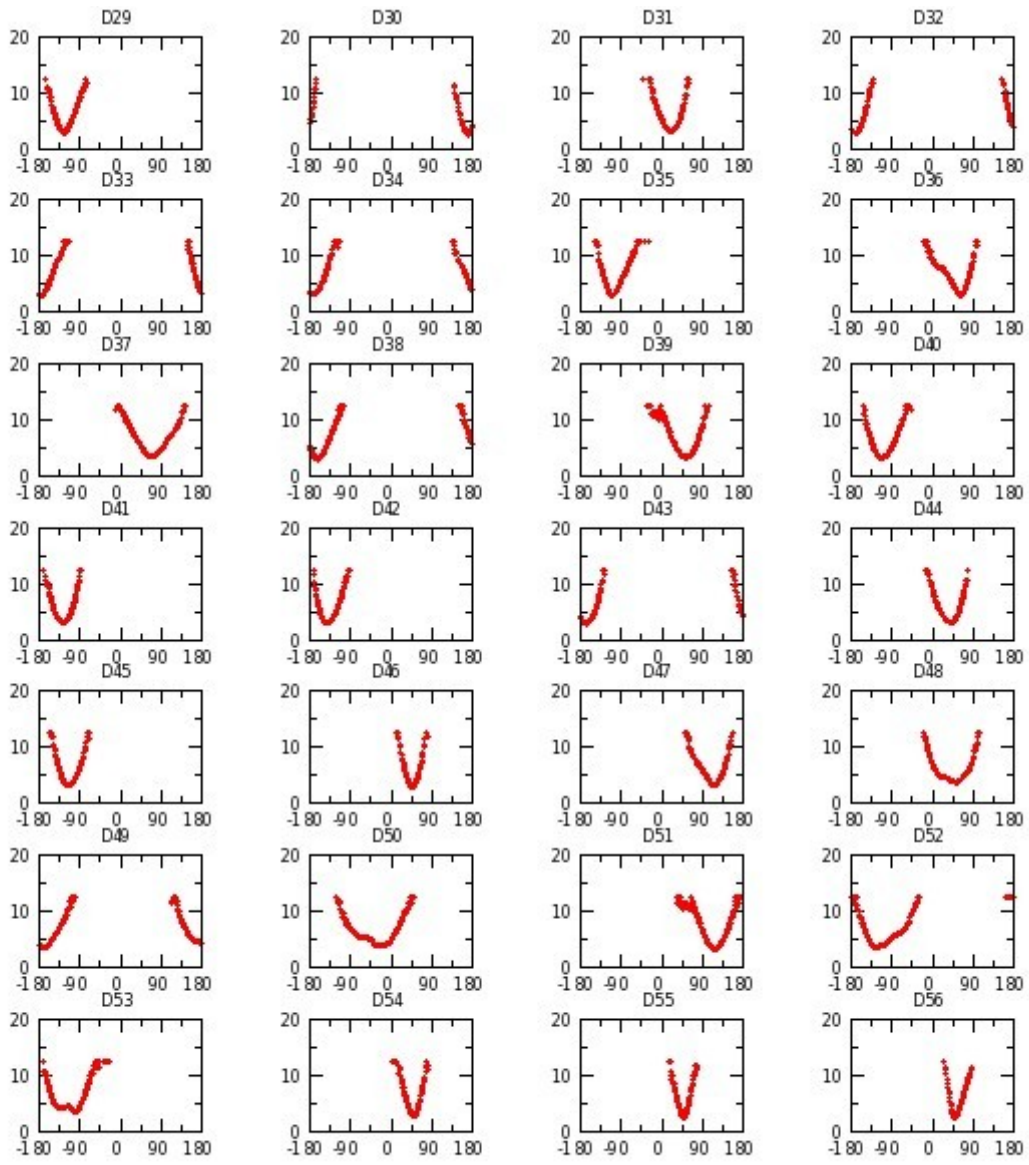


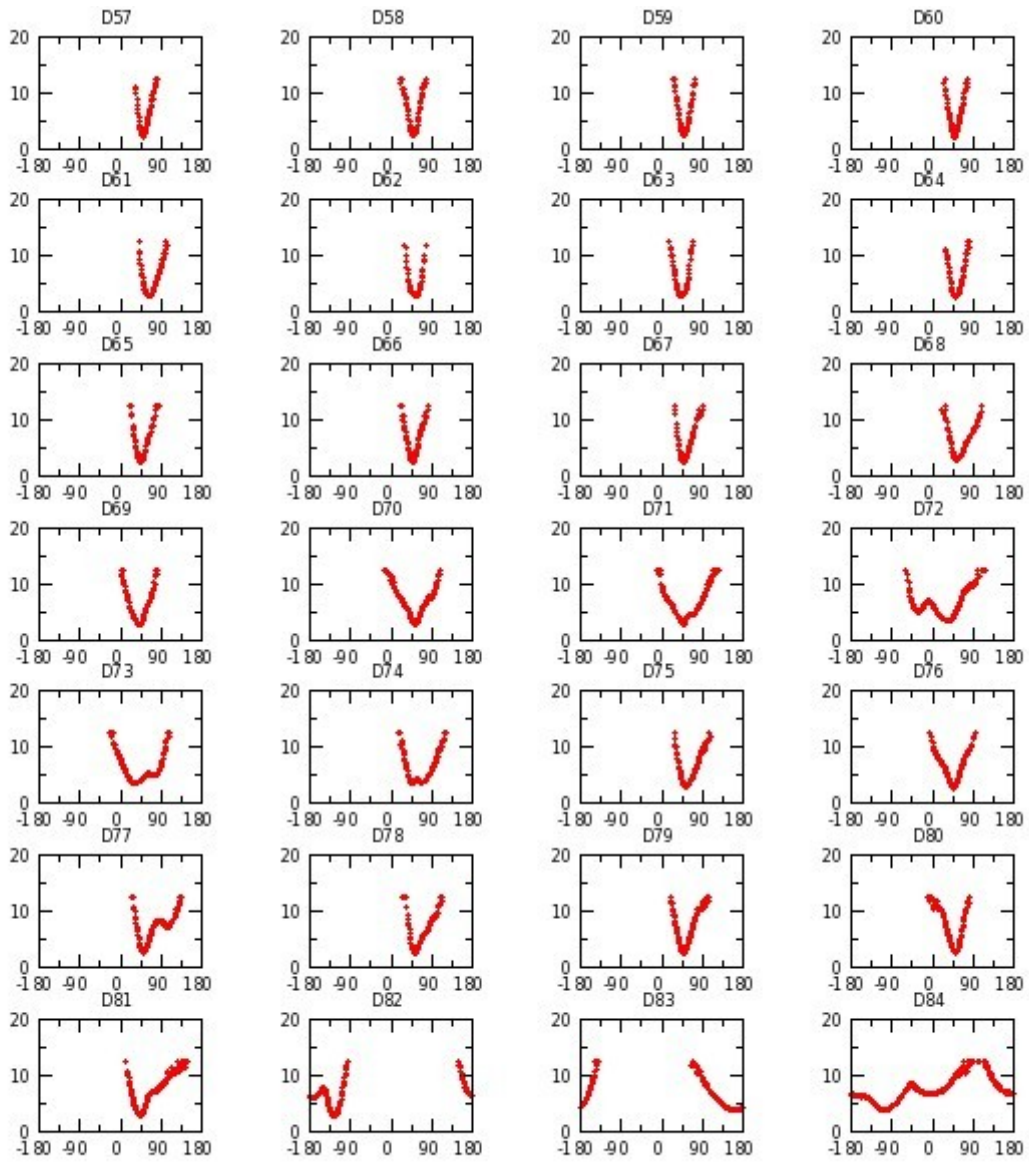


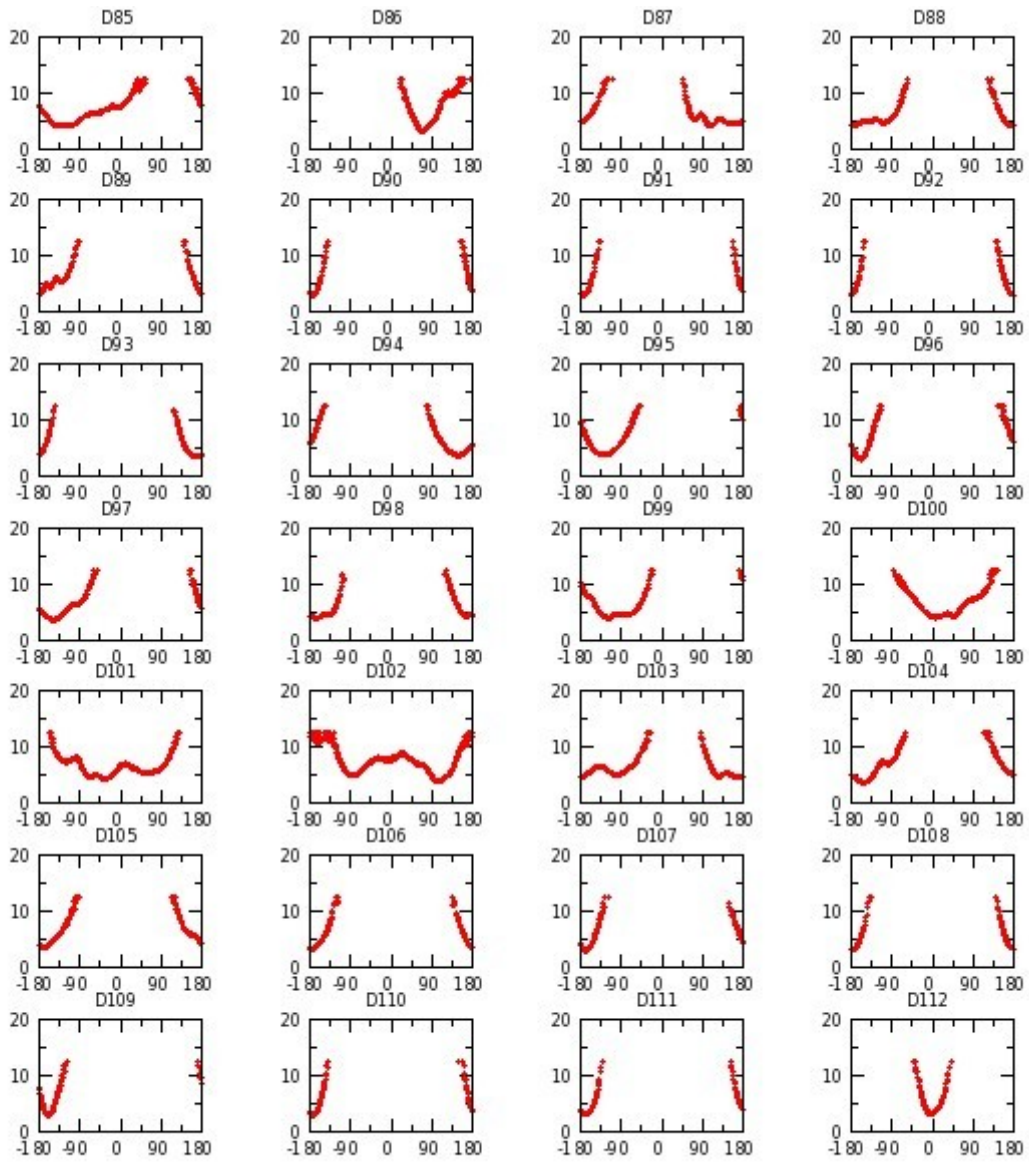


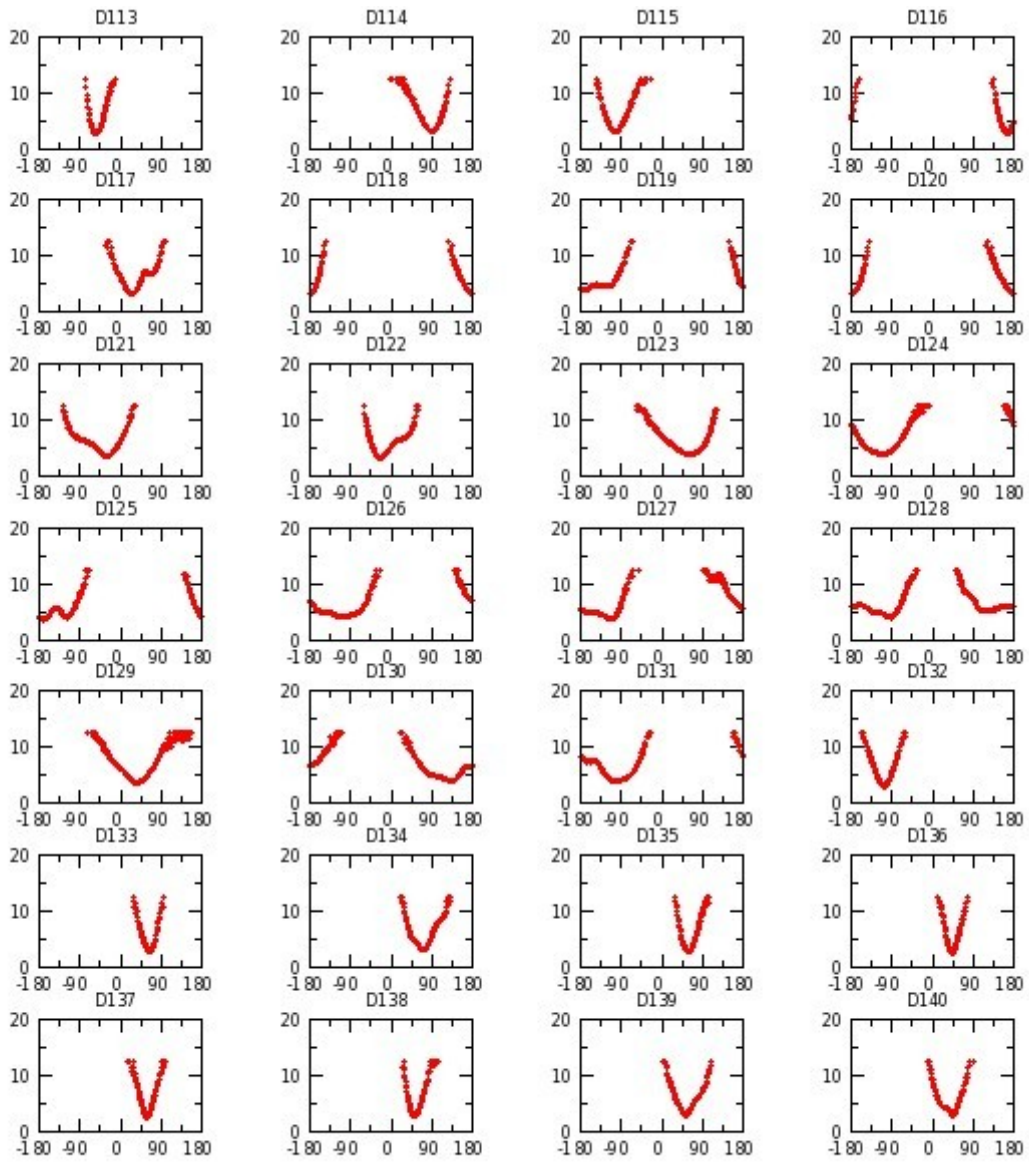
Annexe G 13 : H_LIP réplique I

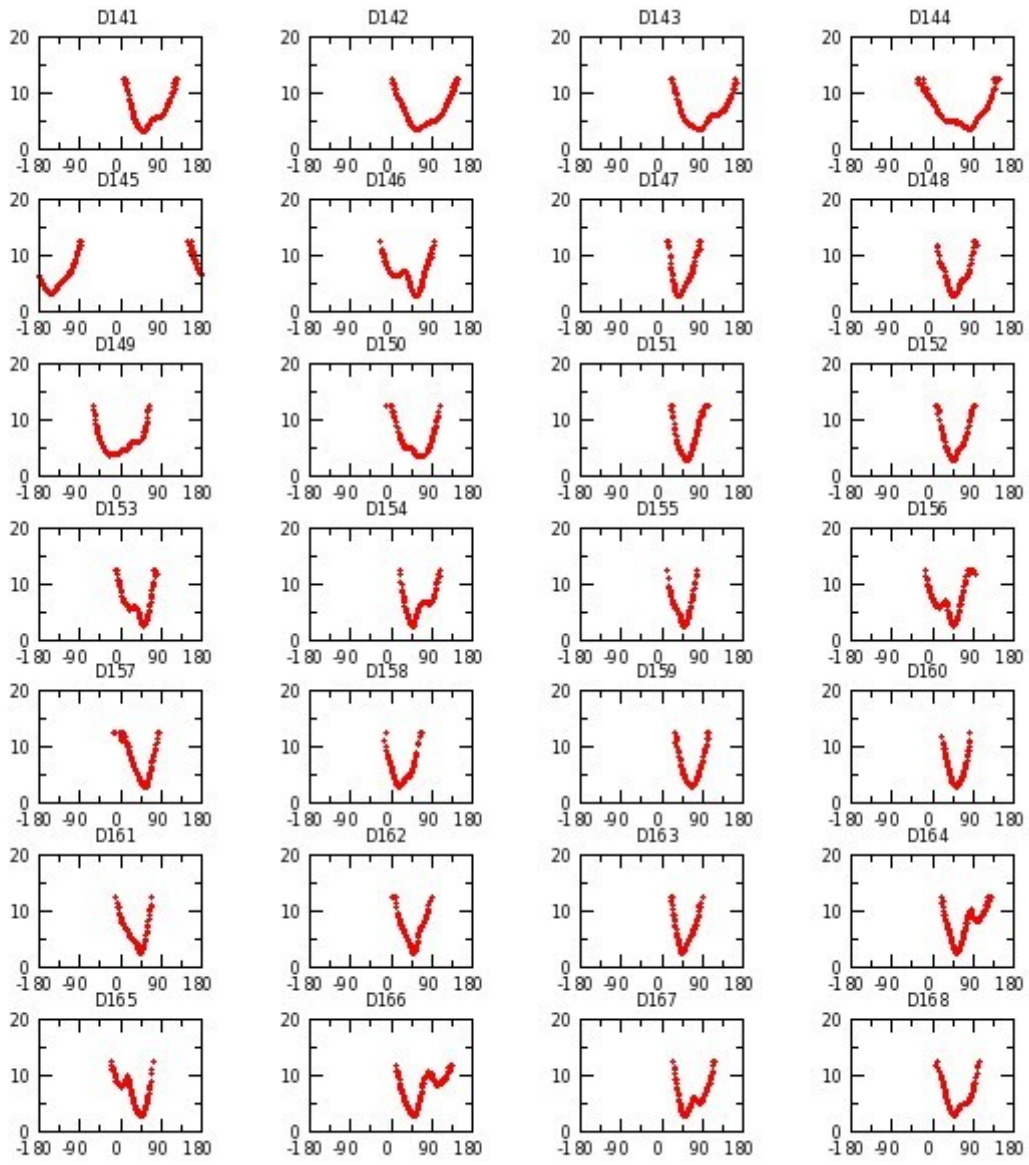


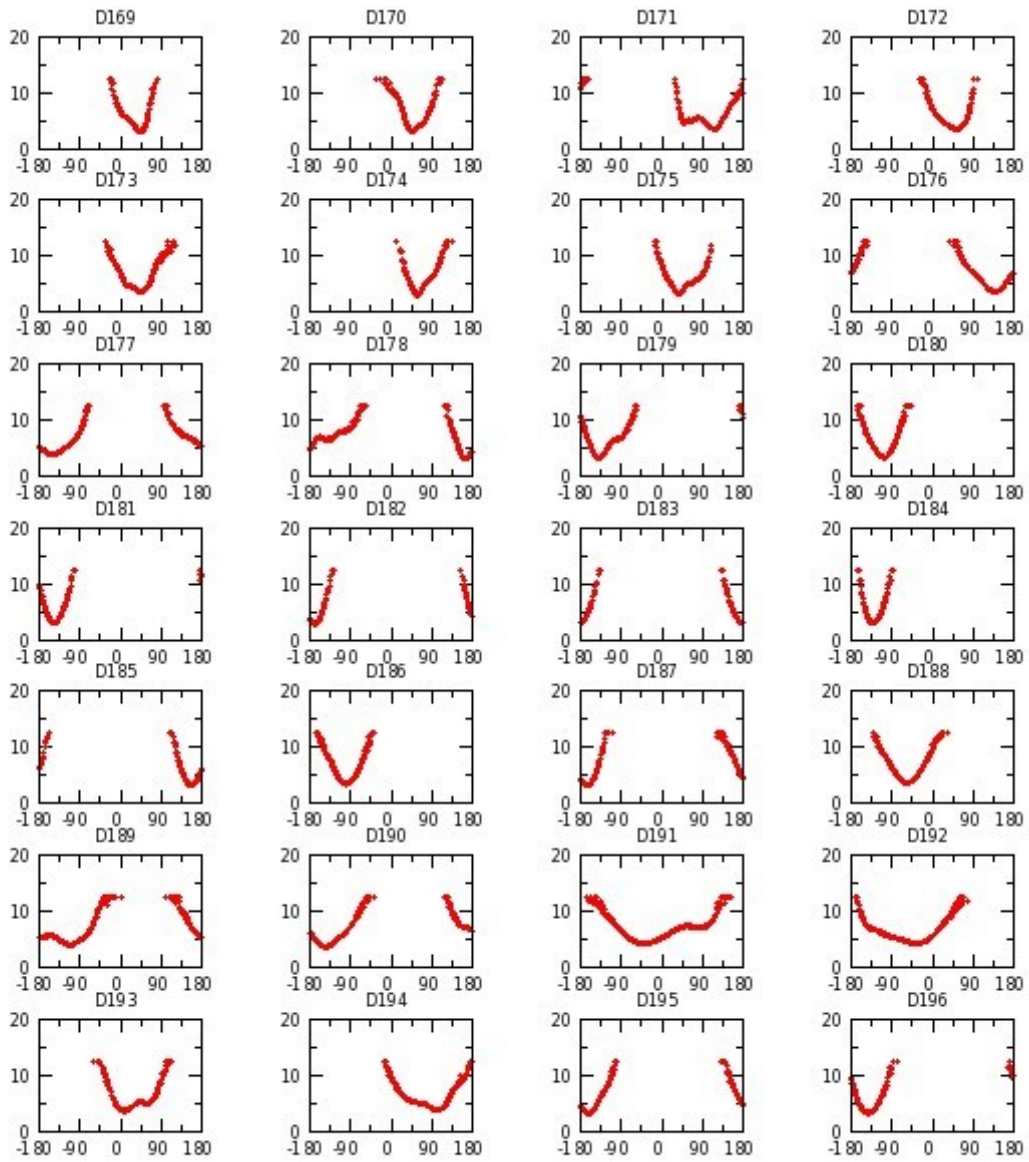


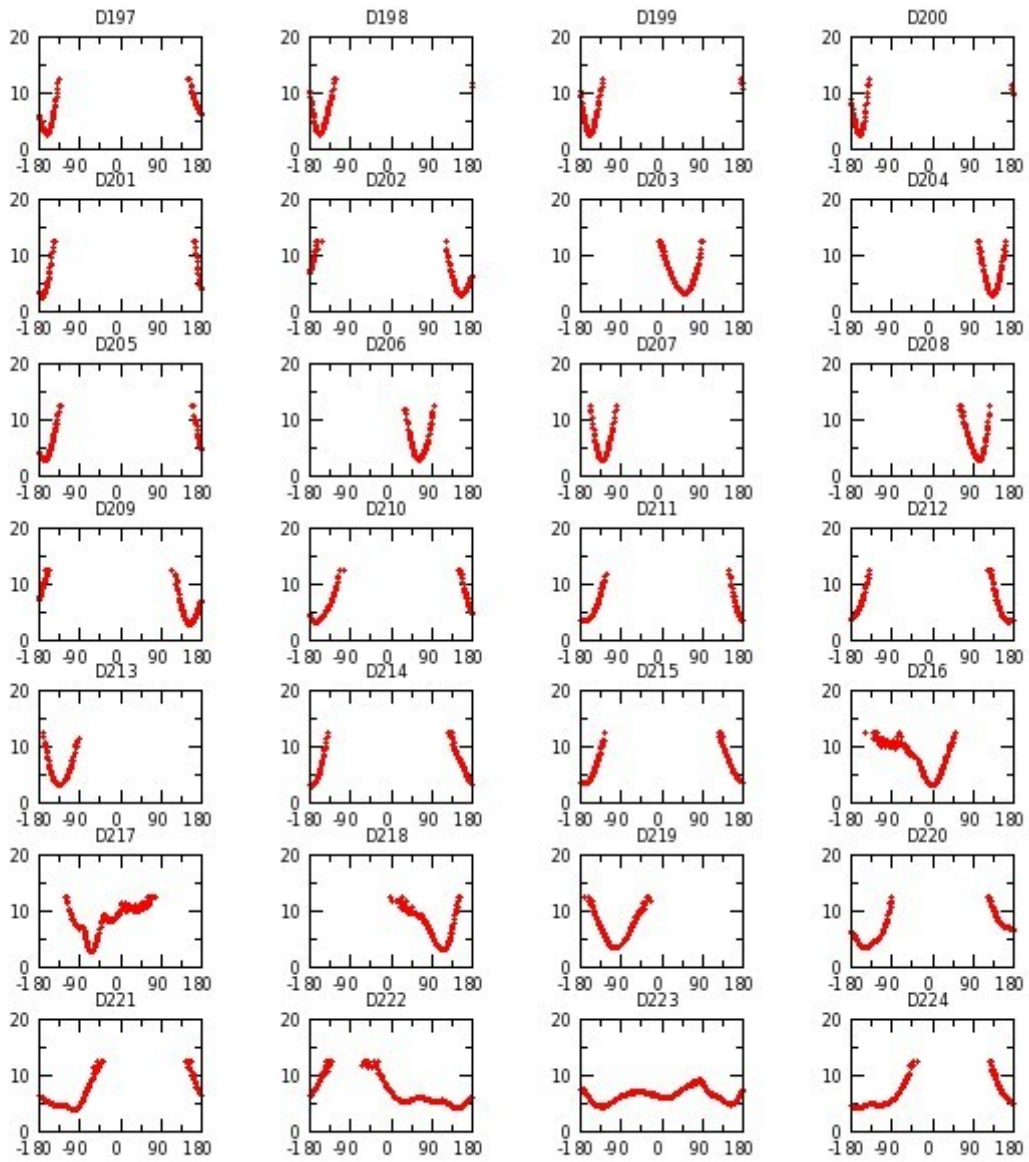


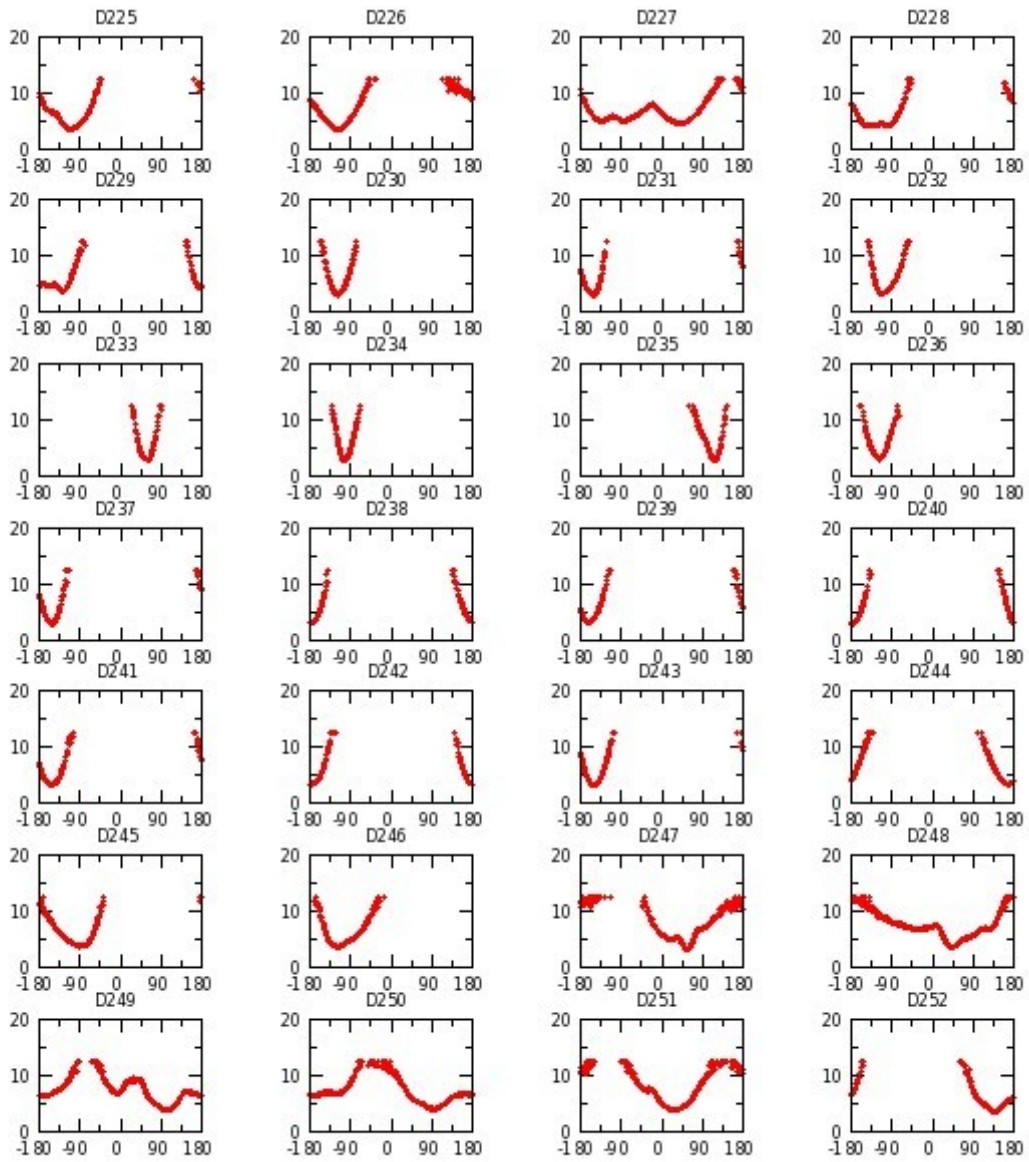


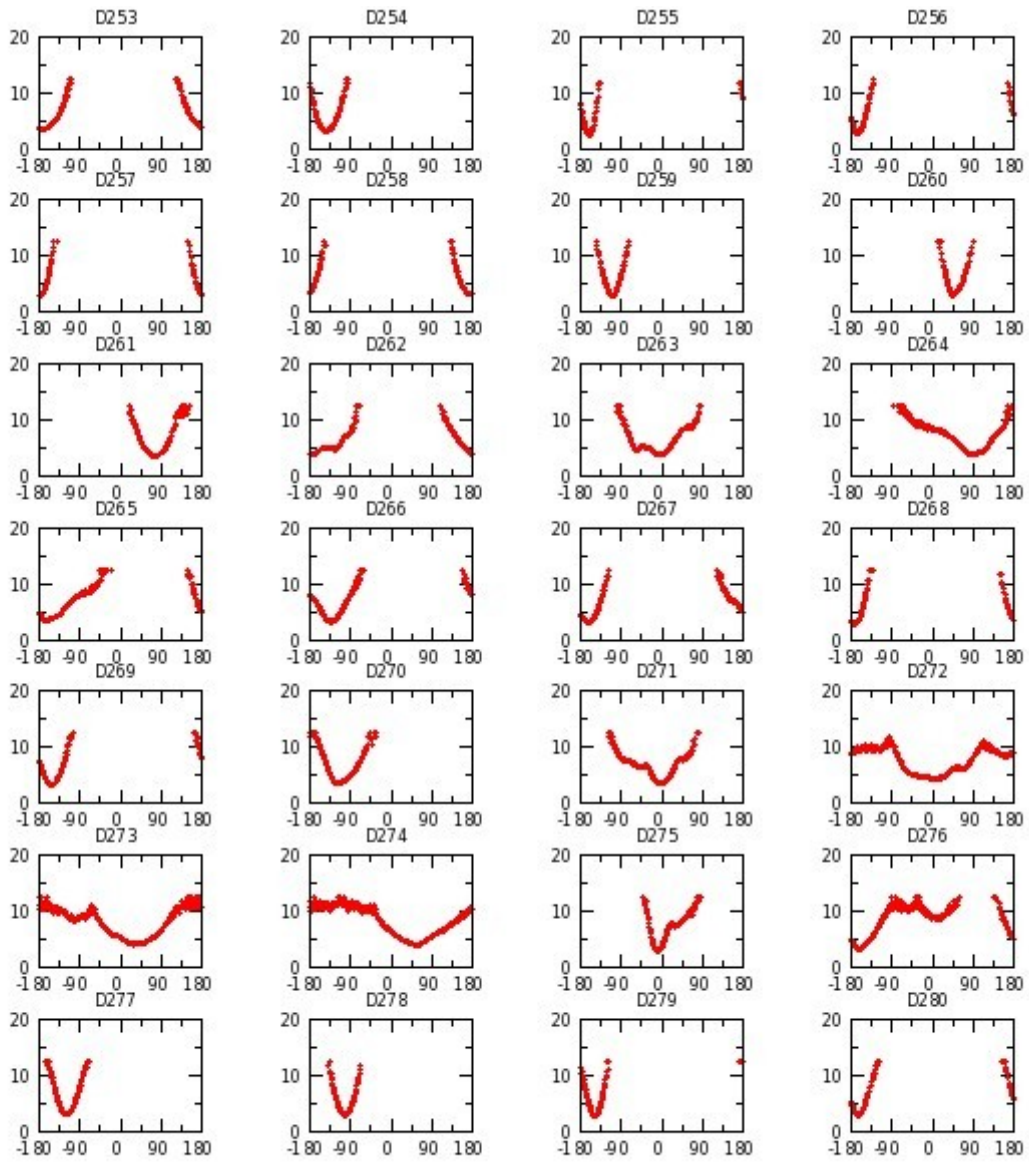


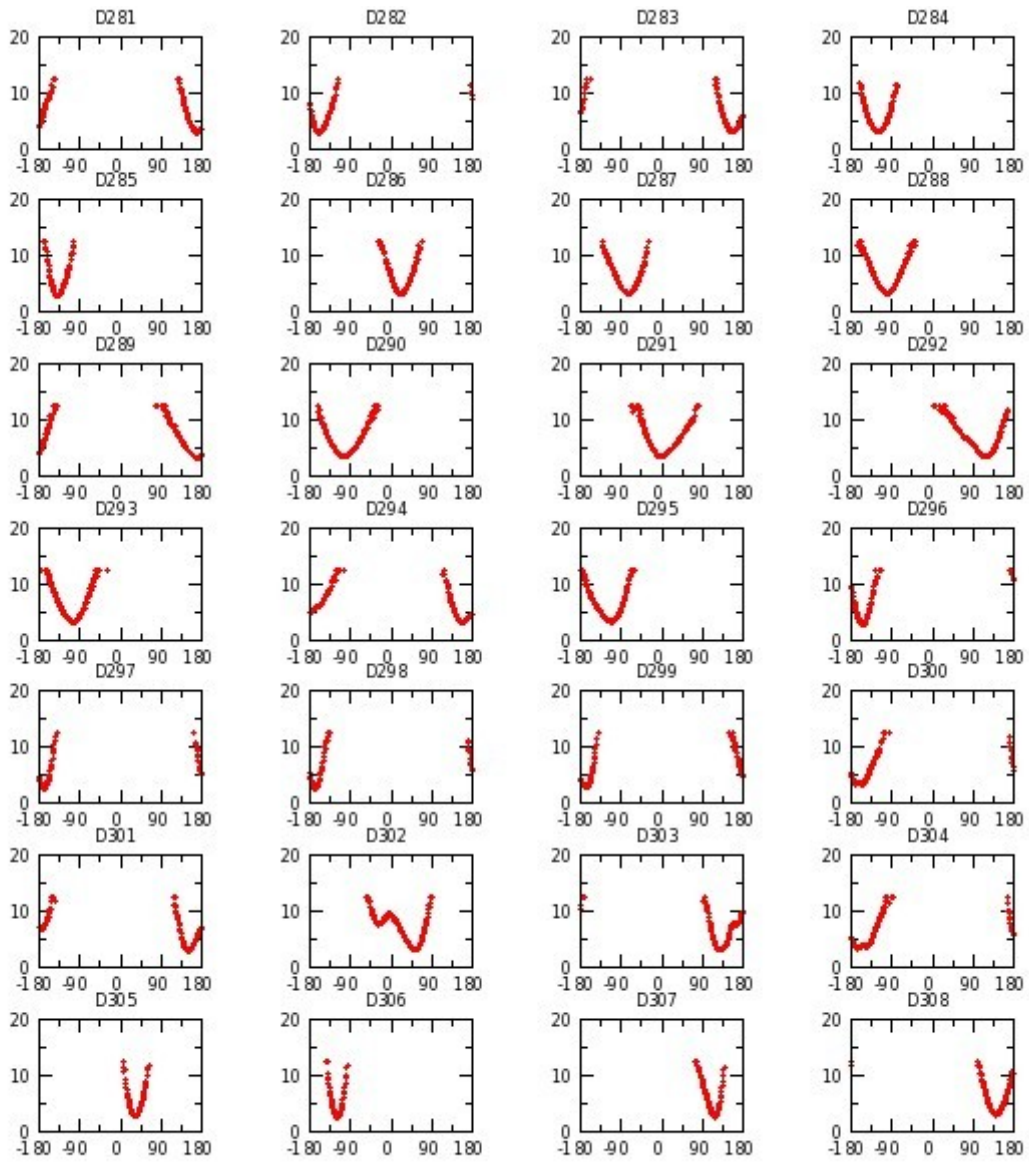


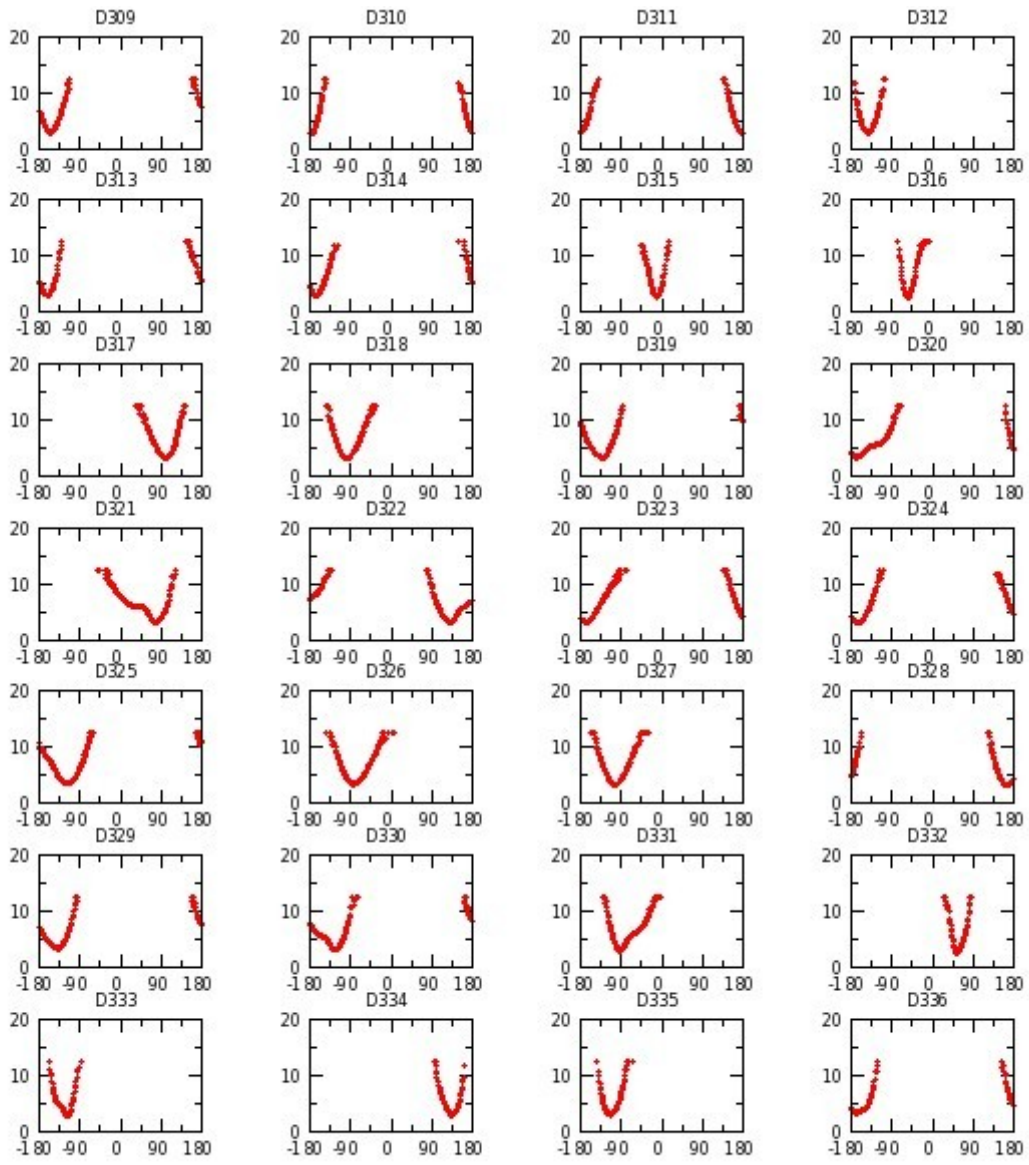


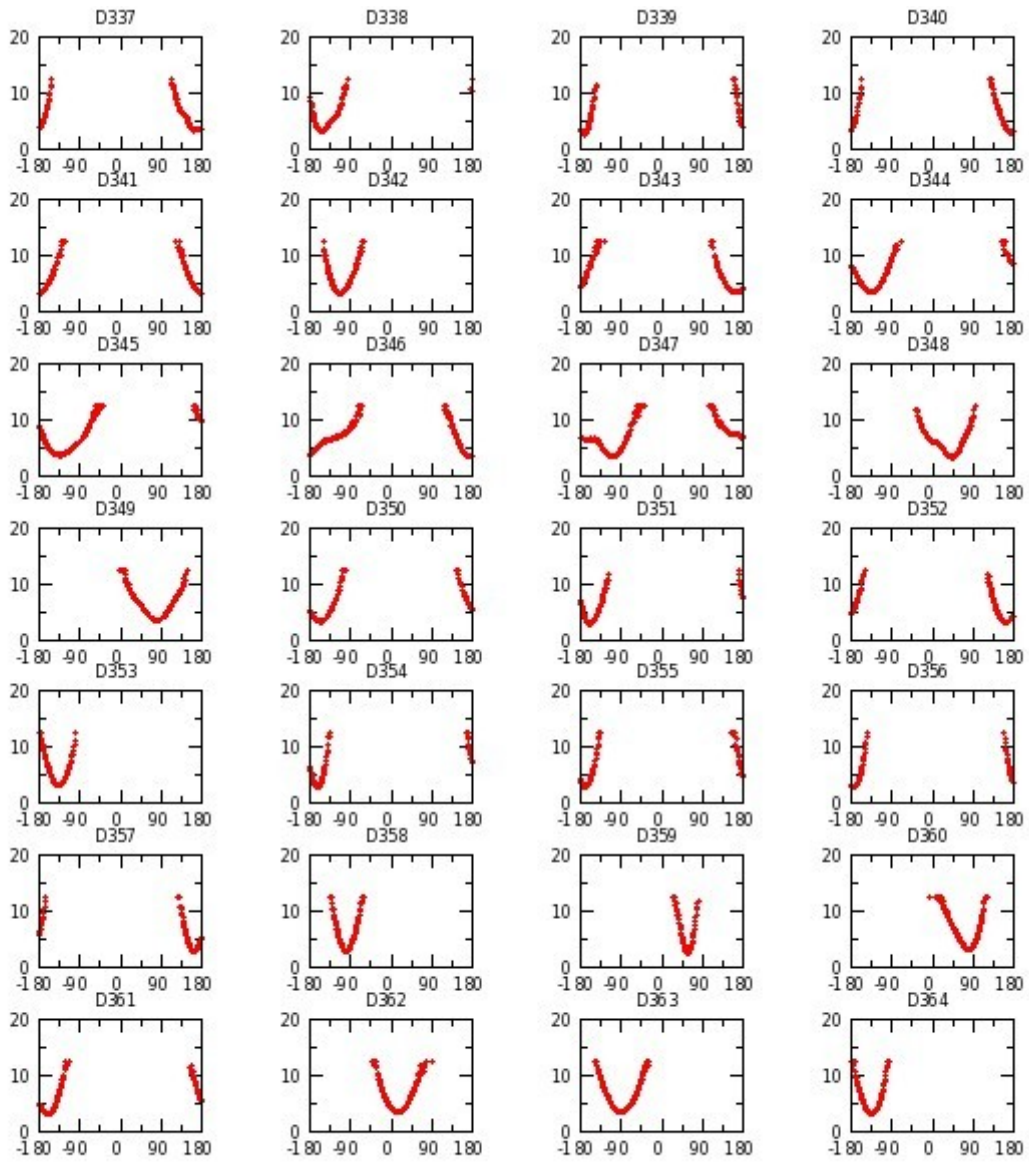


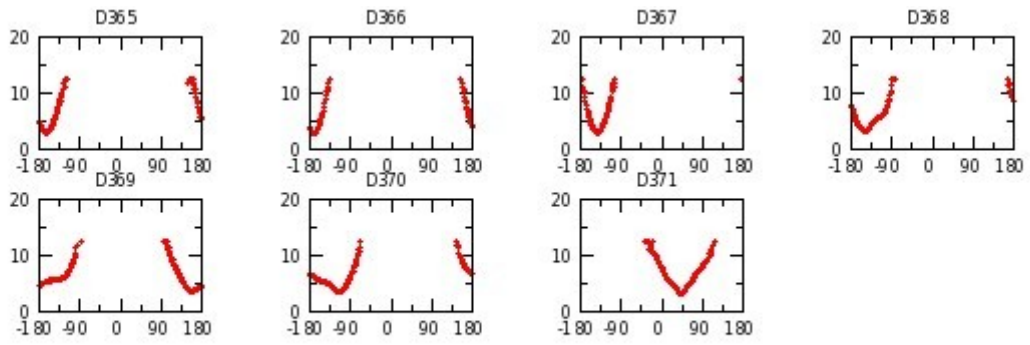




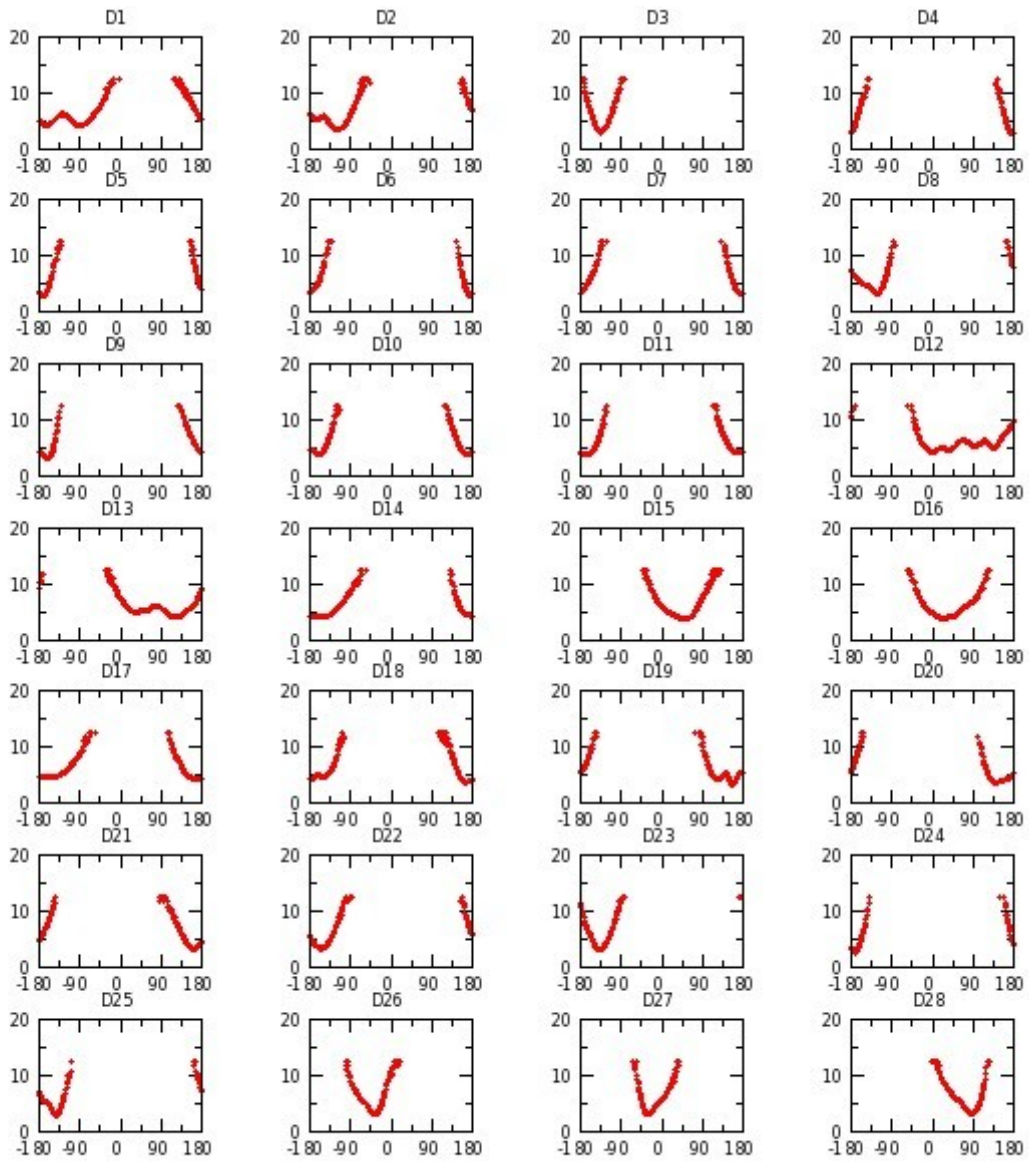


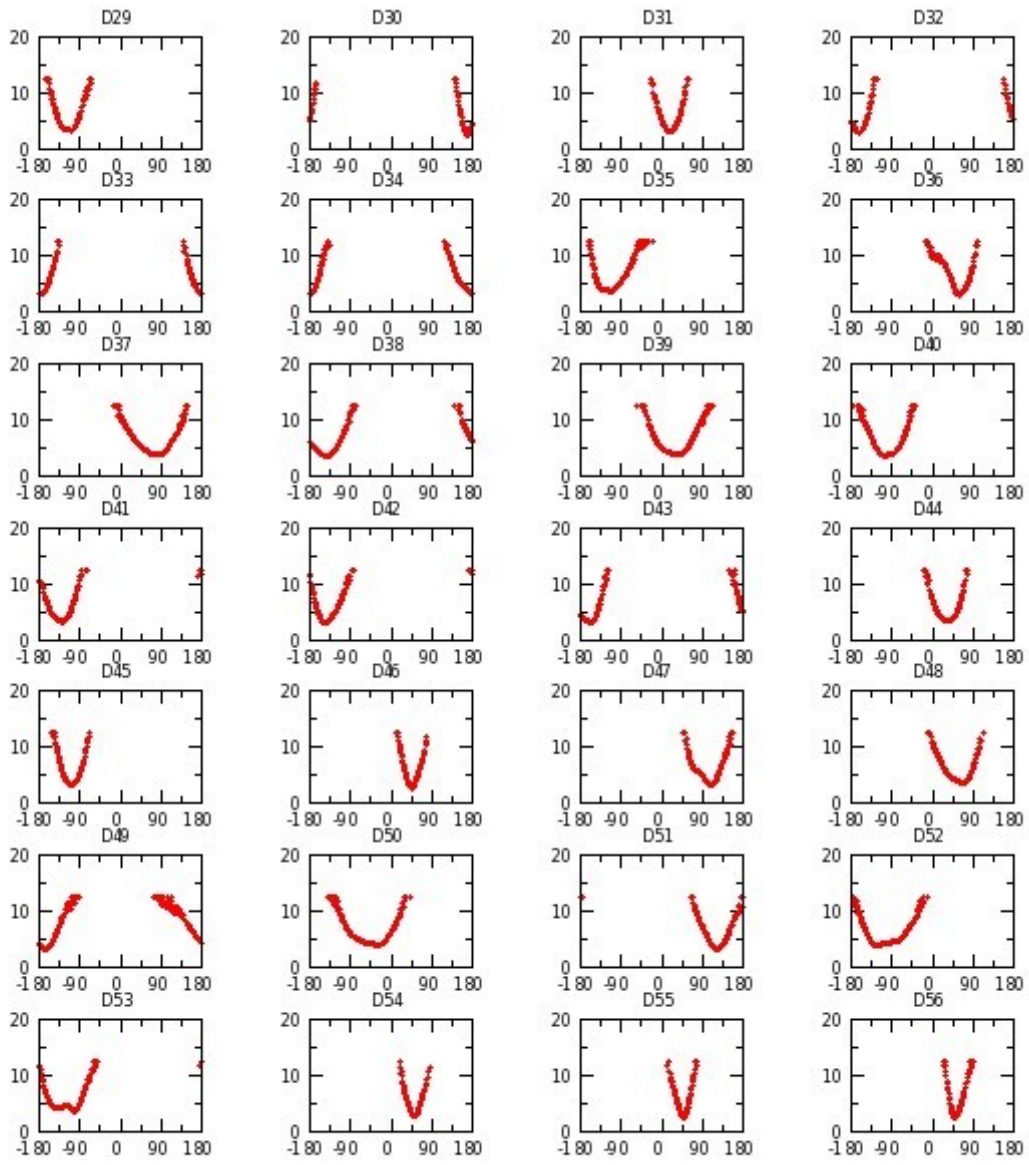


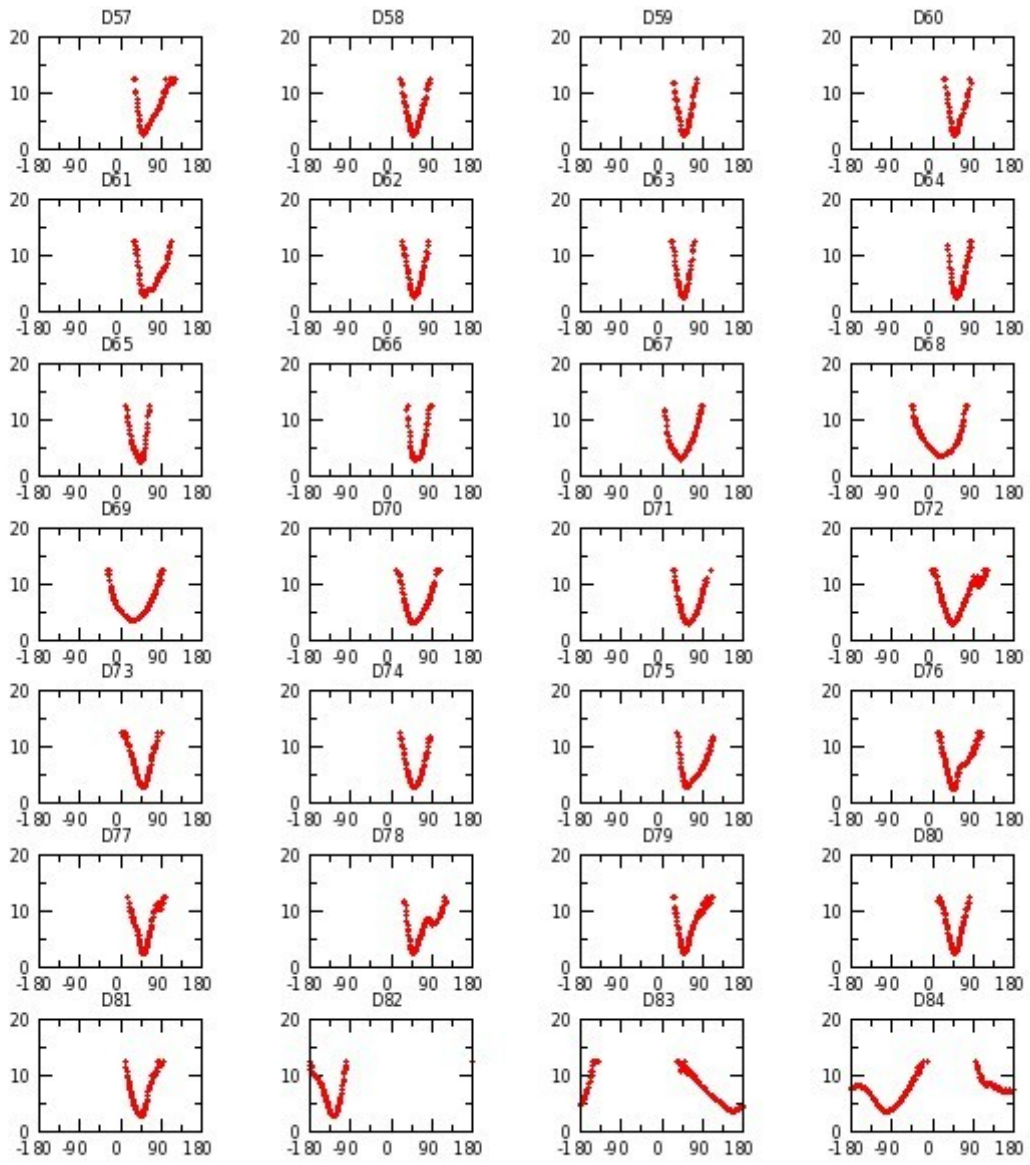


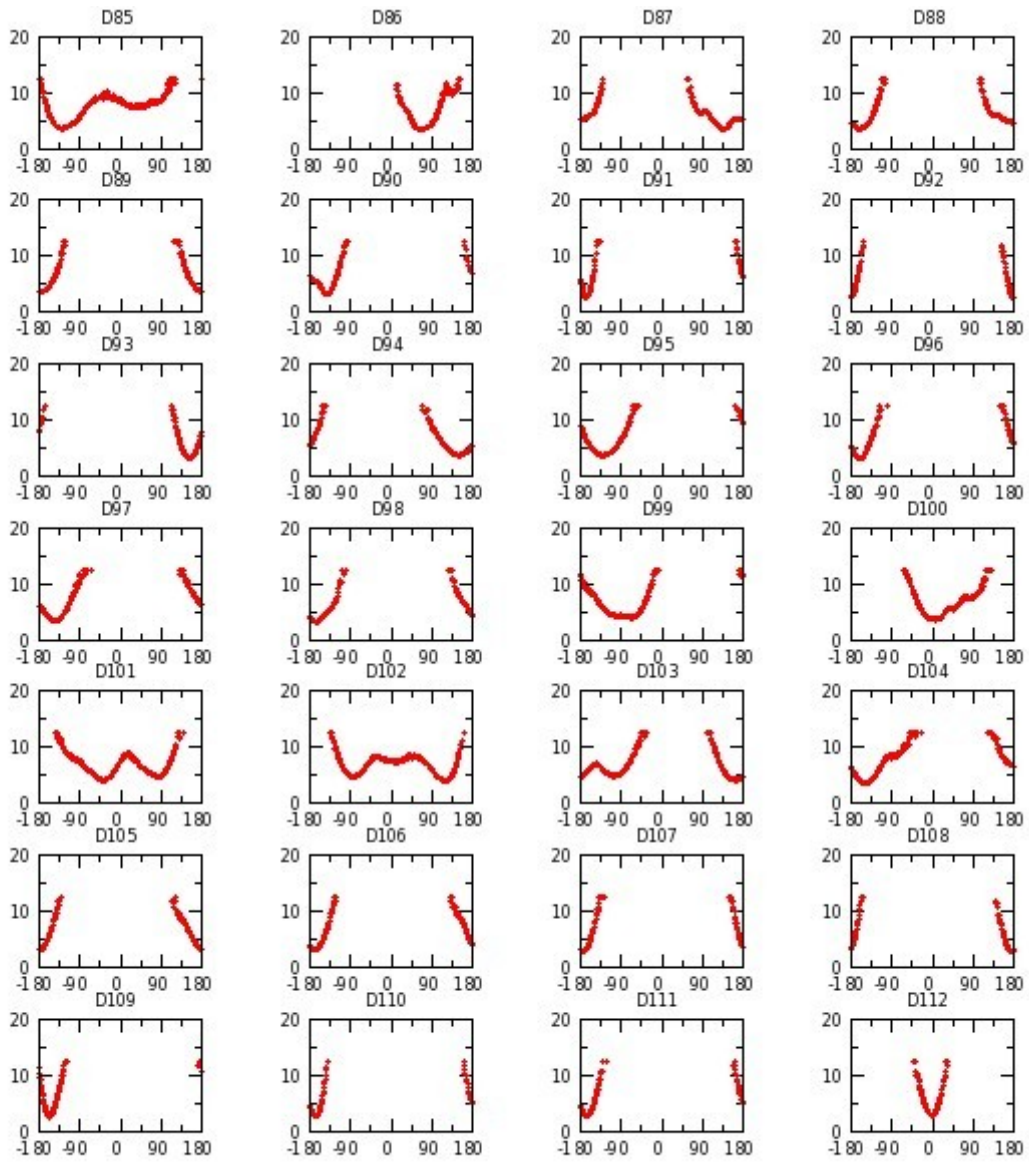


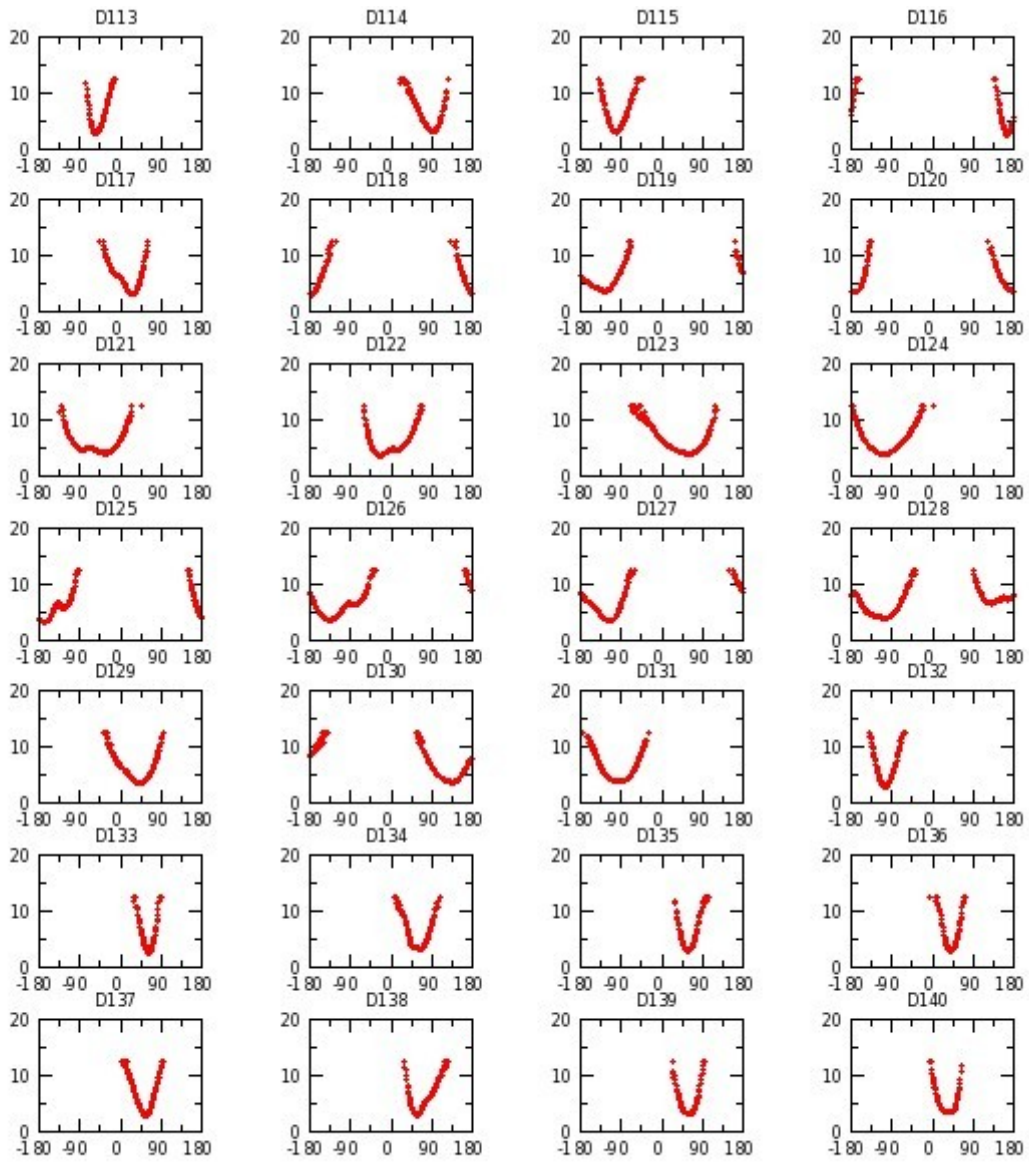
Annexe G 14 : H_LIP réplique II

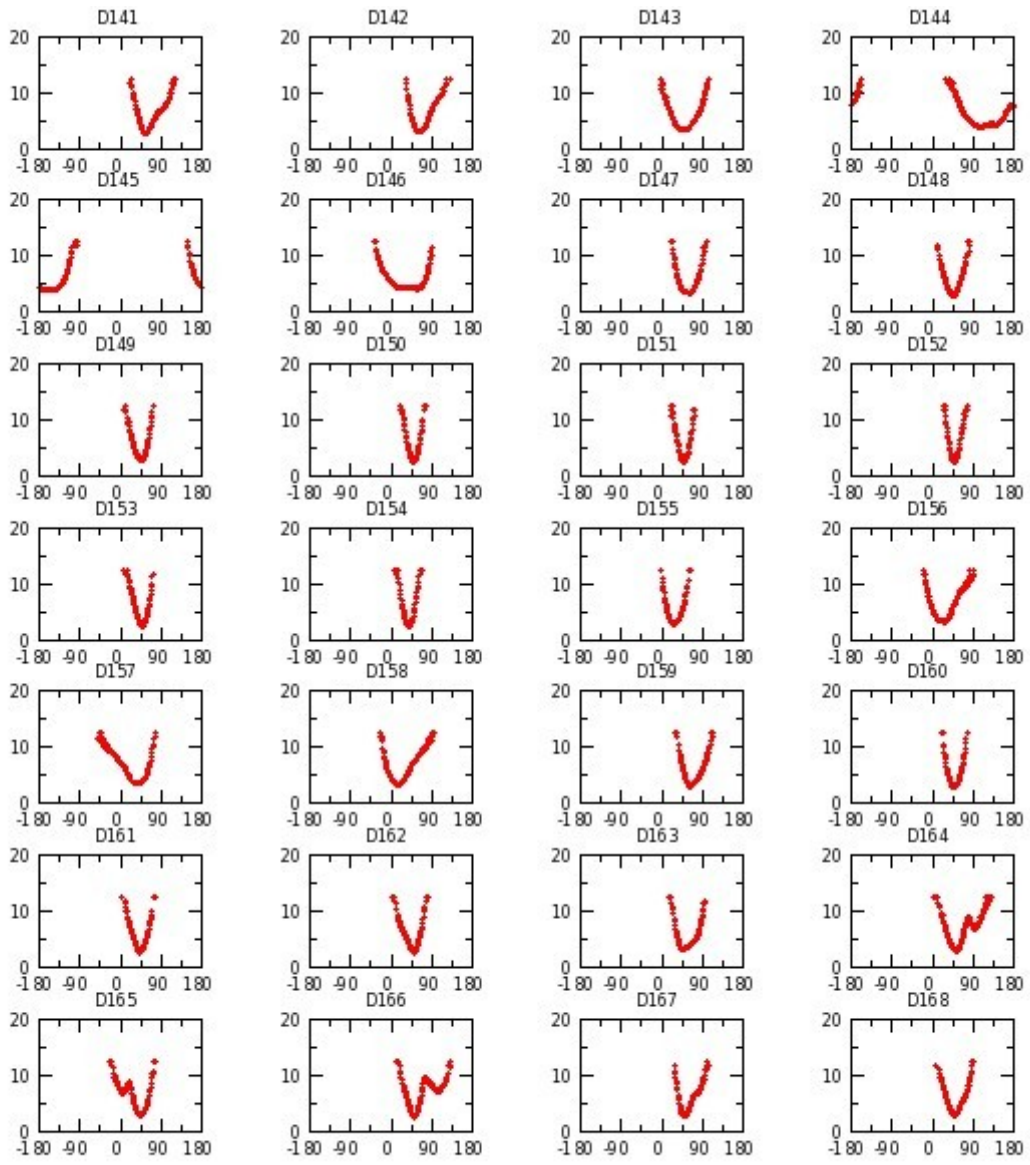


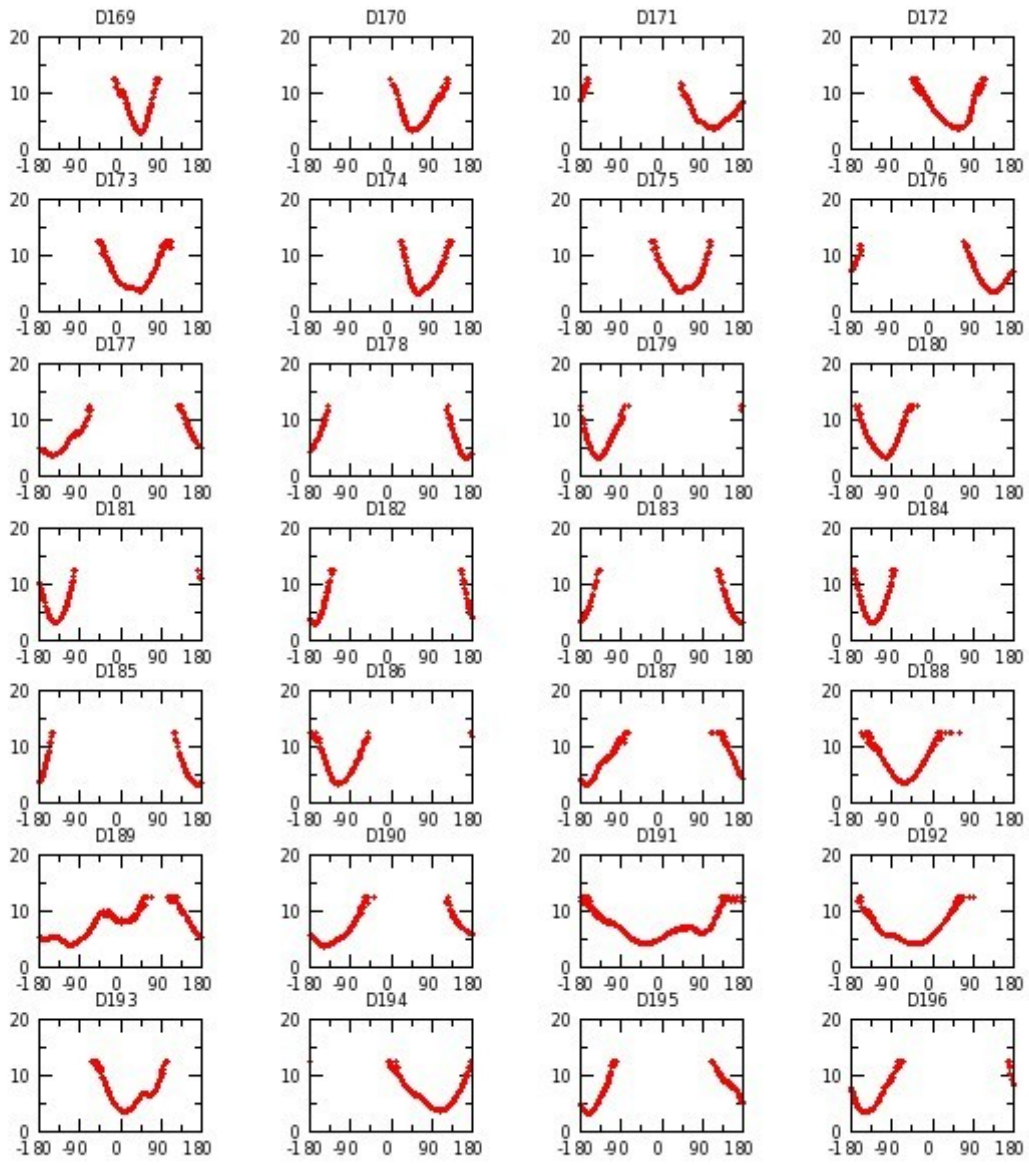


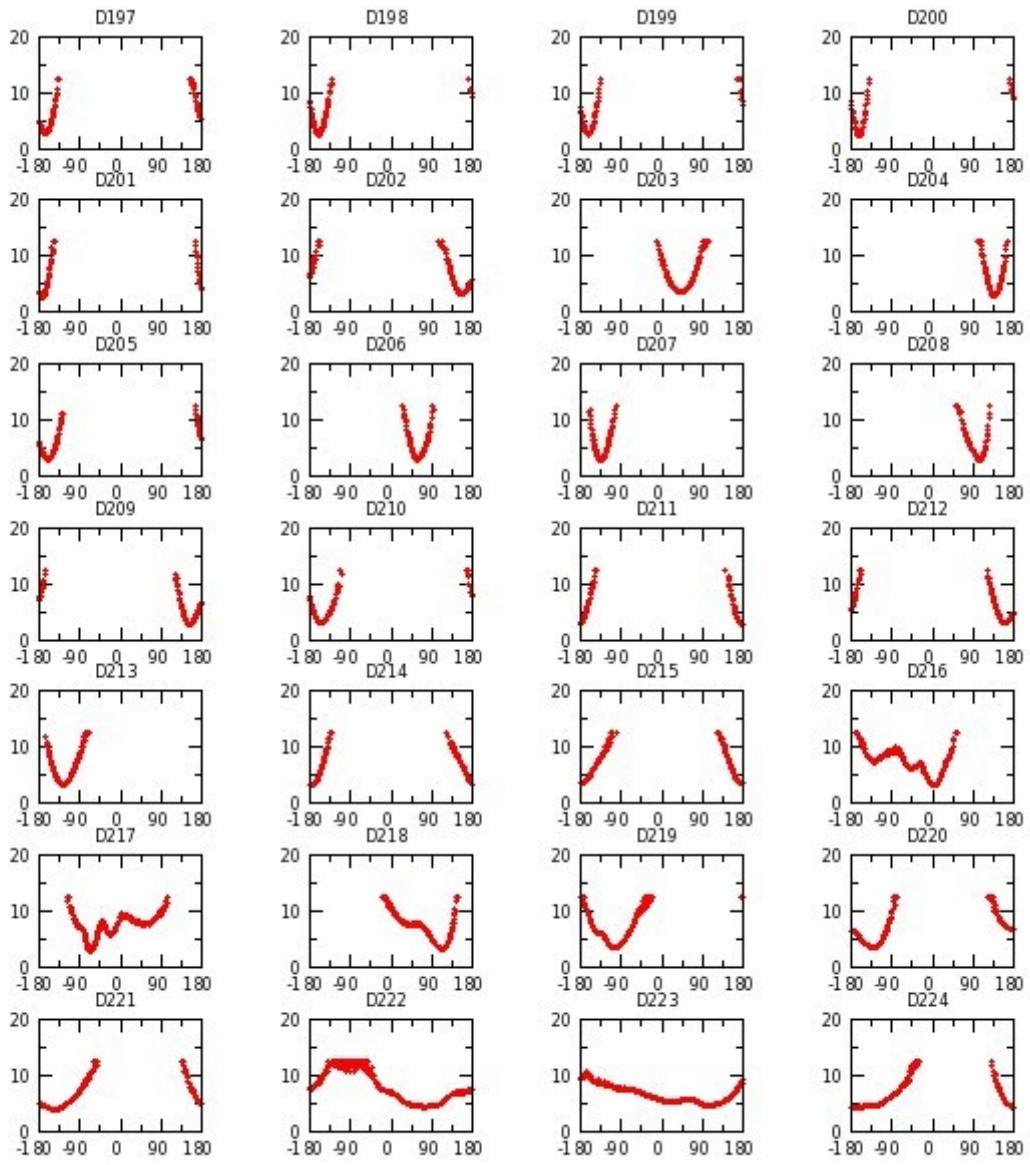


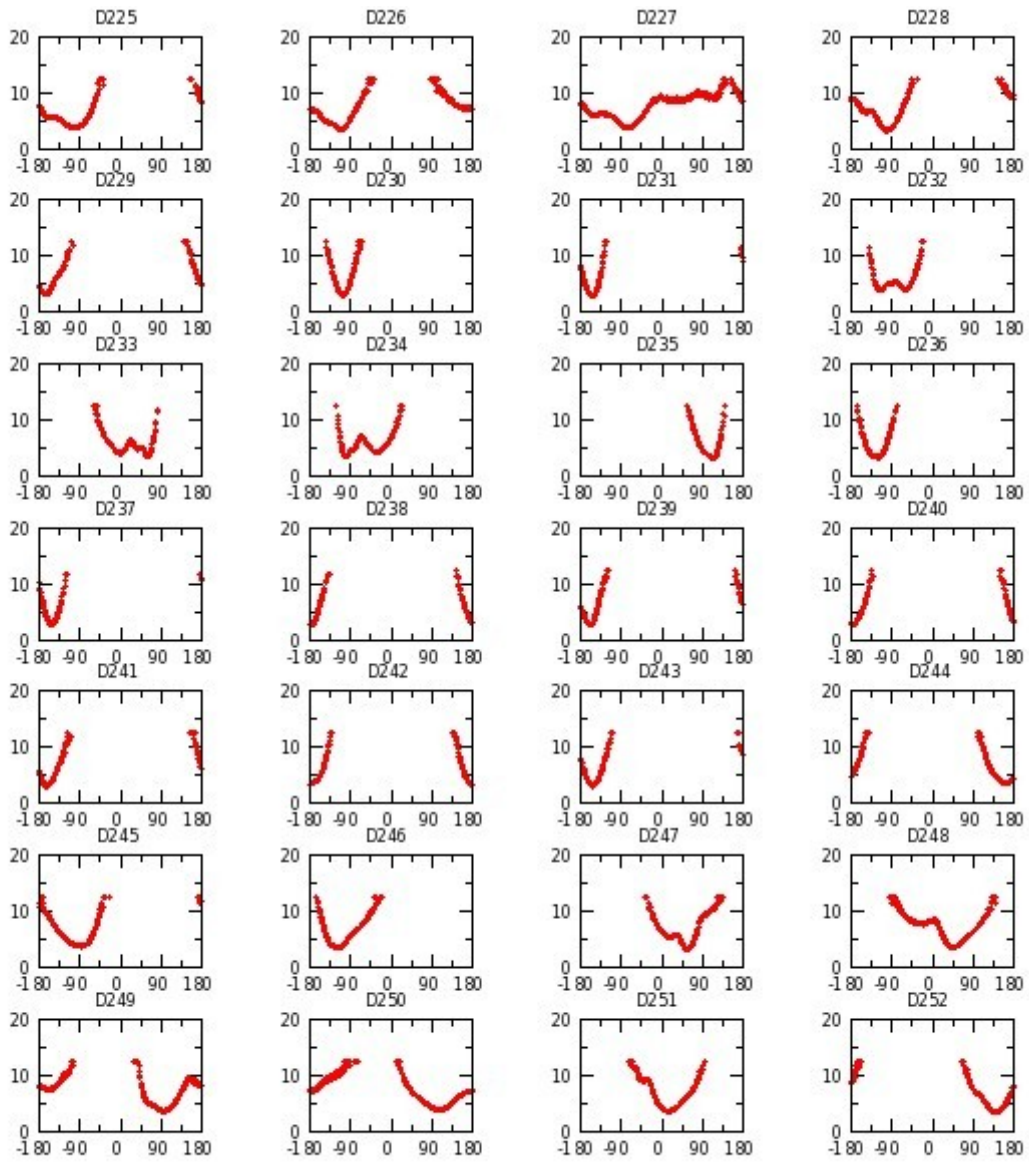


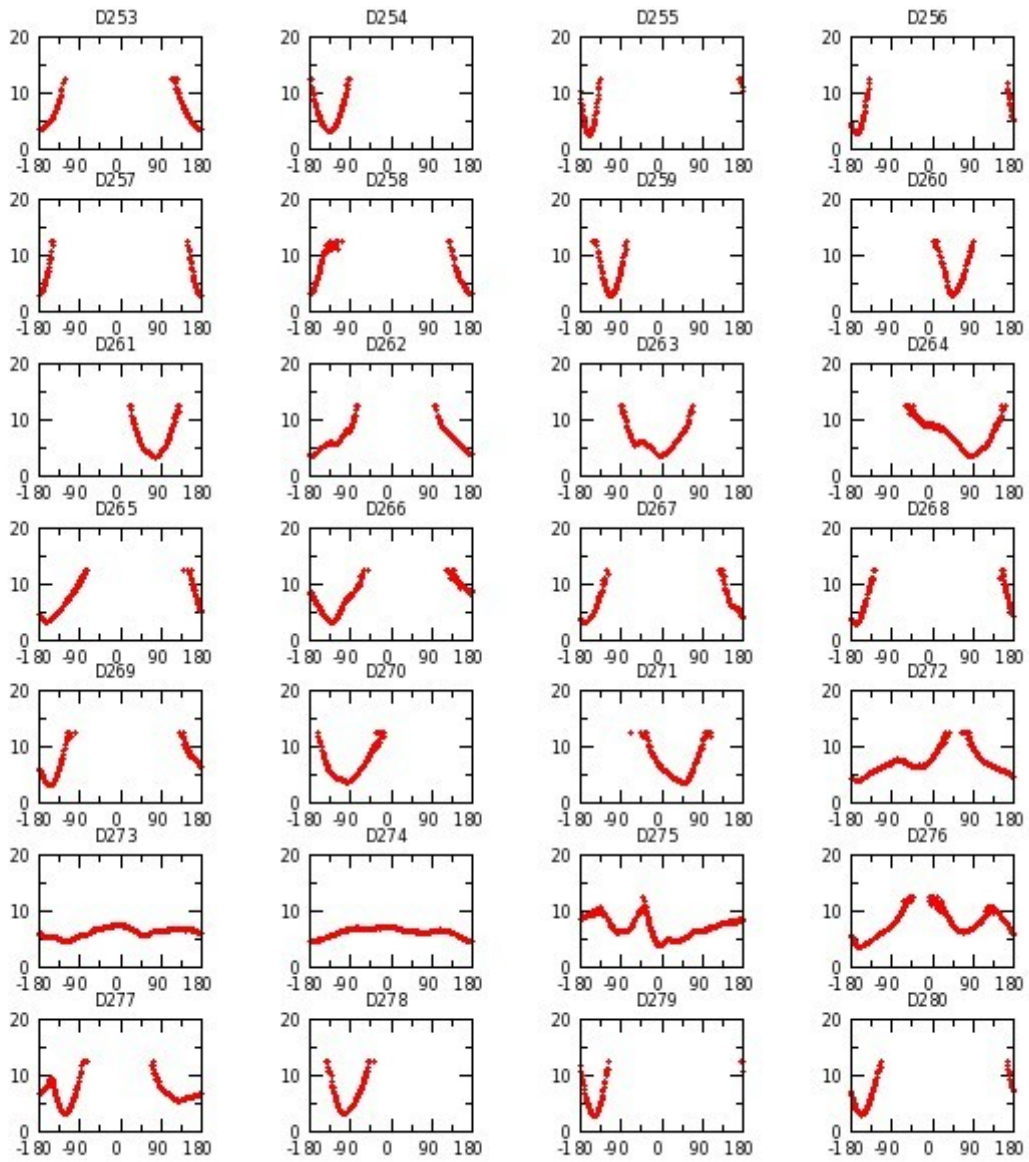


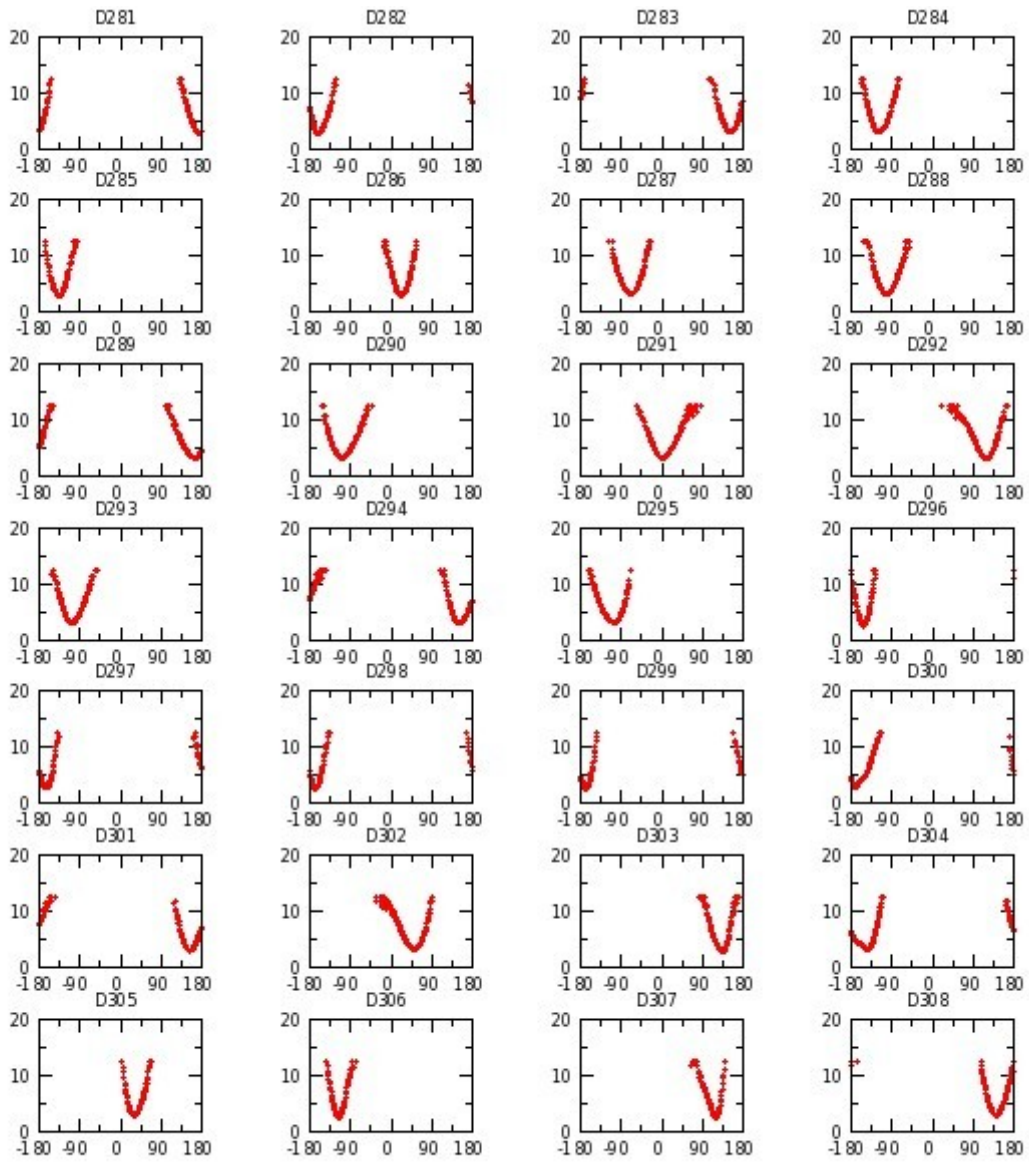


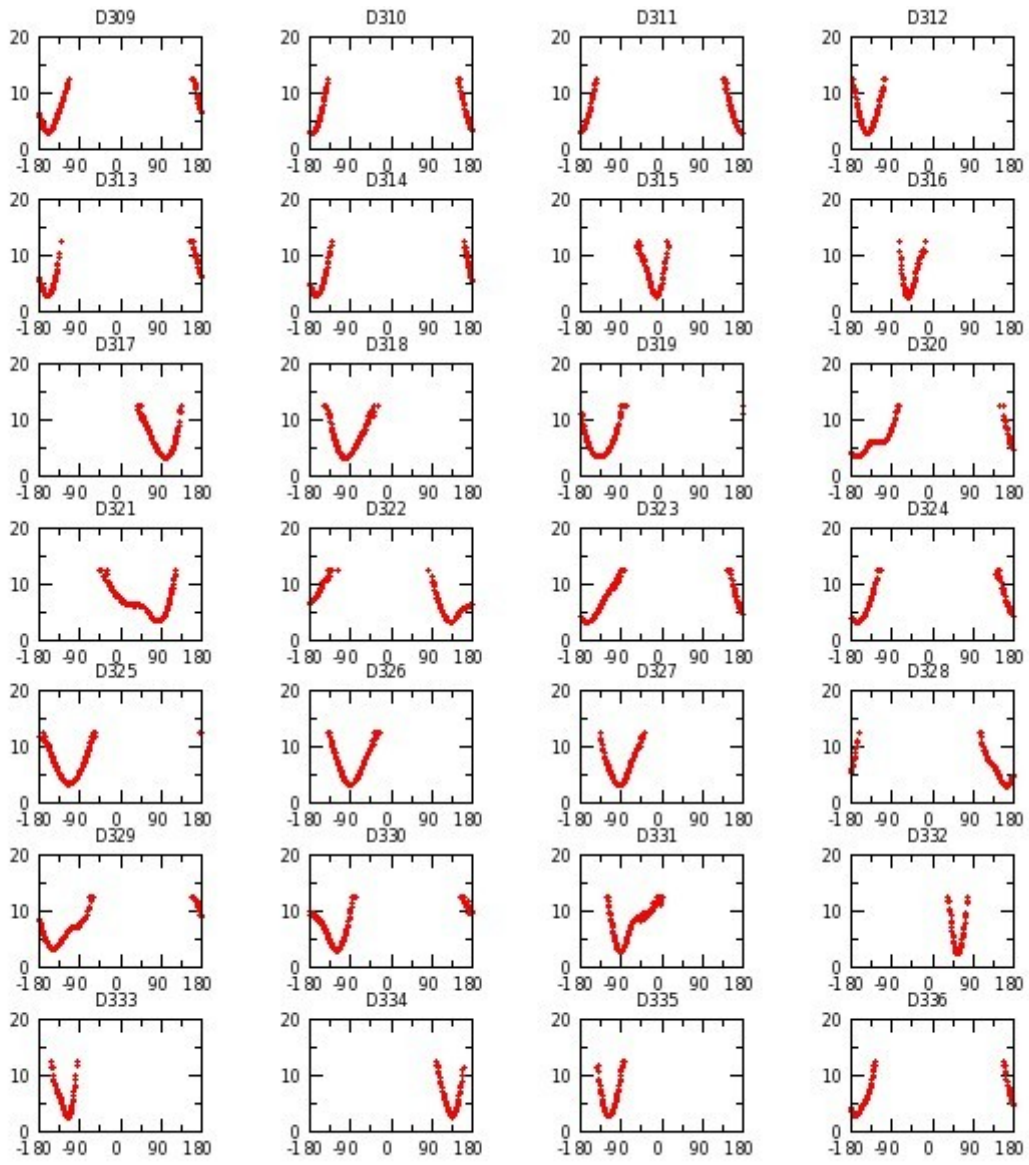


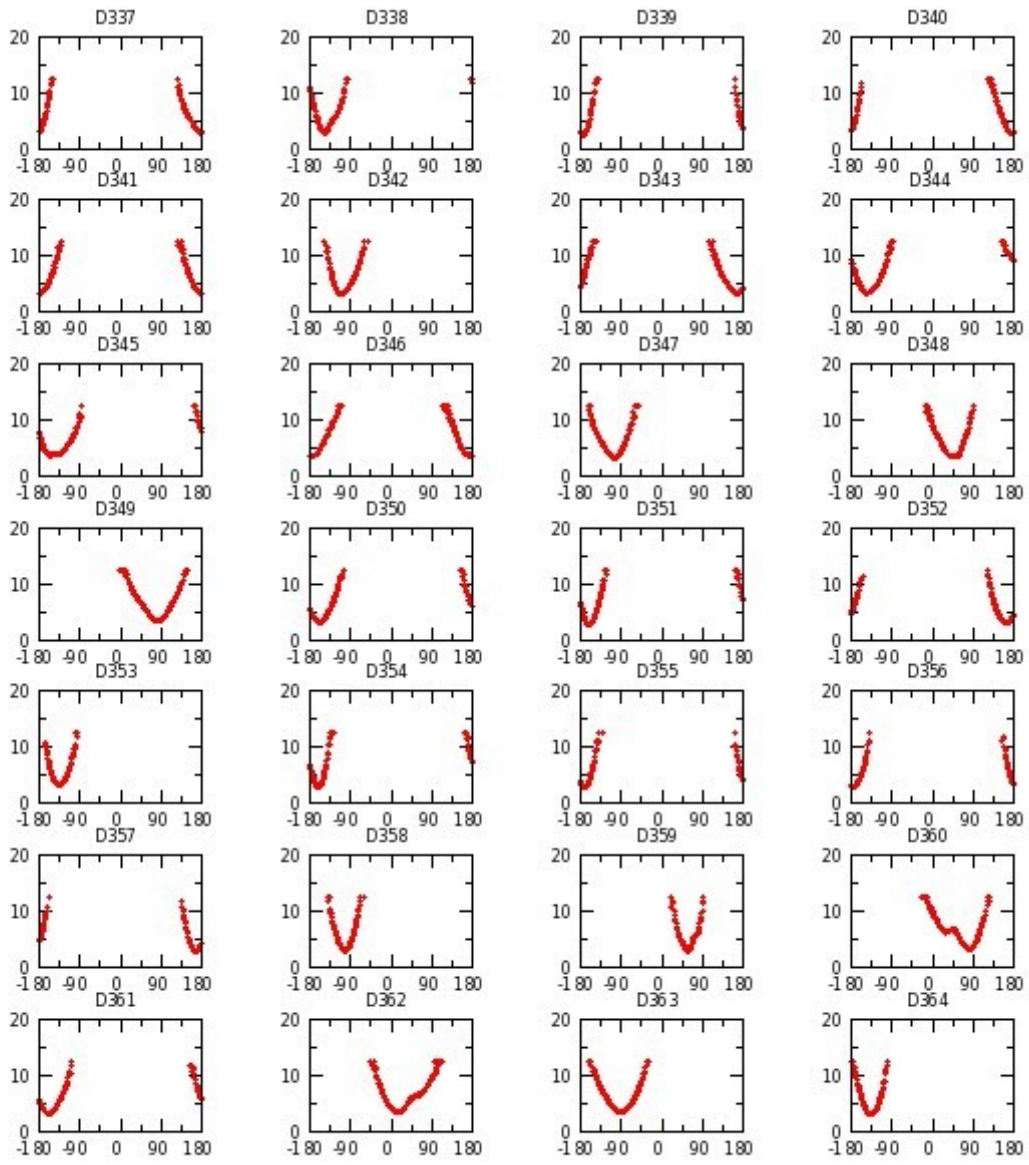


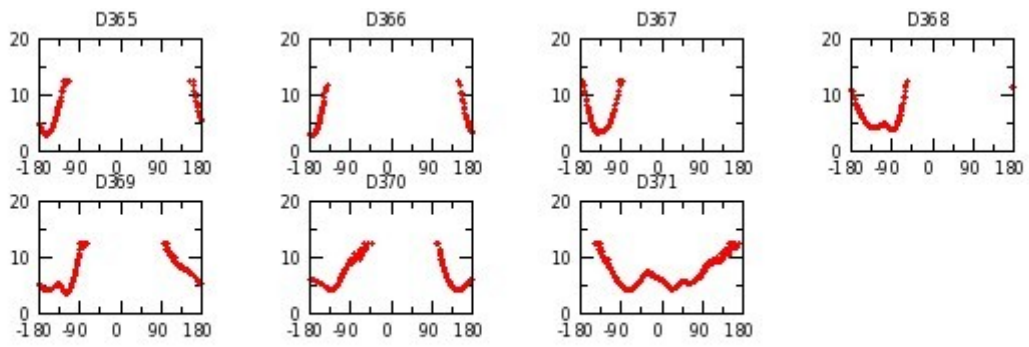




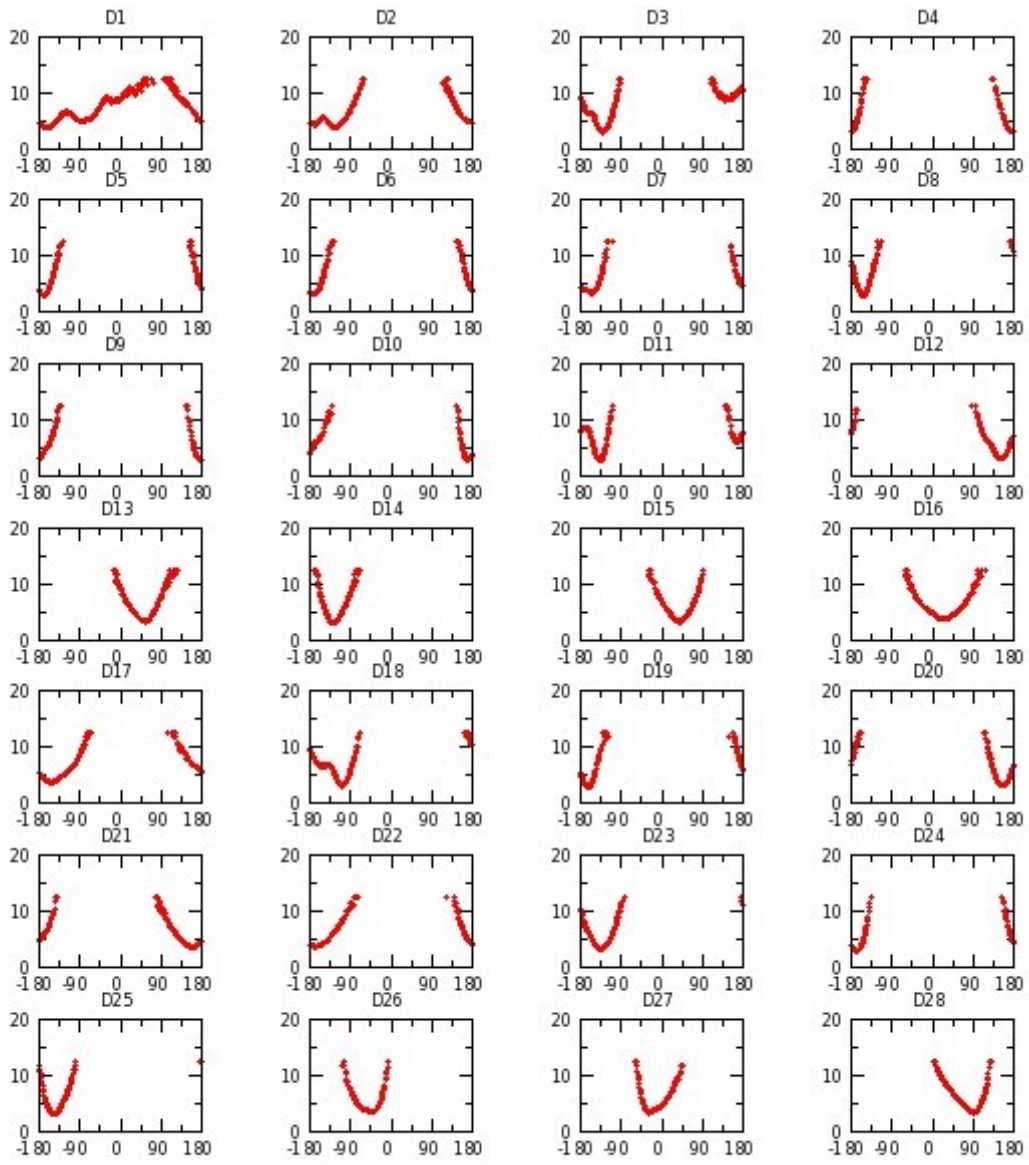


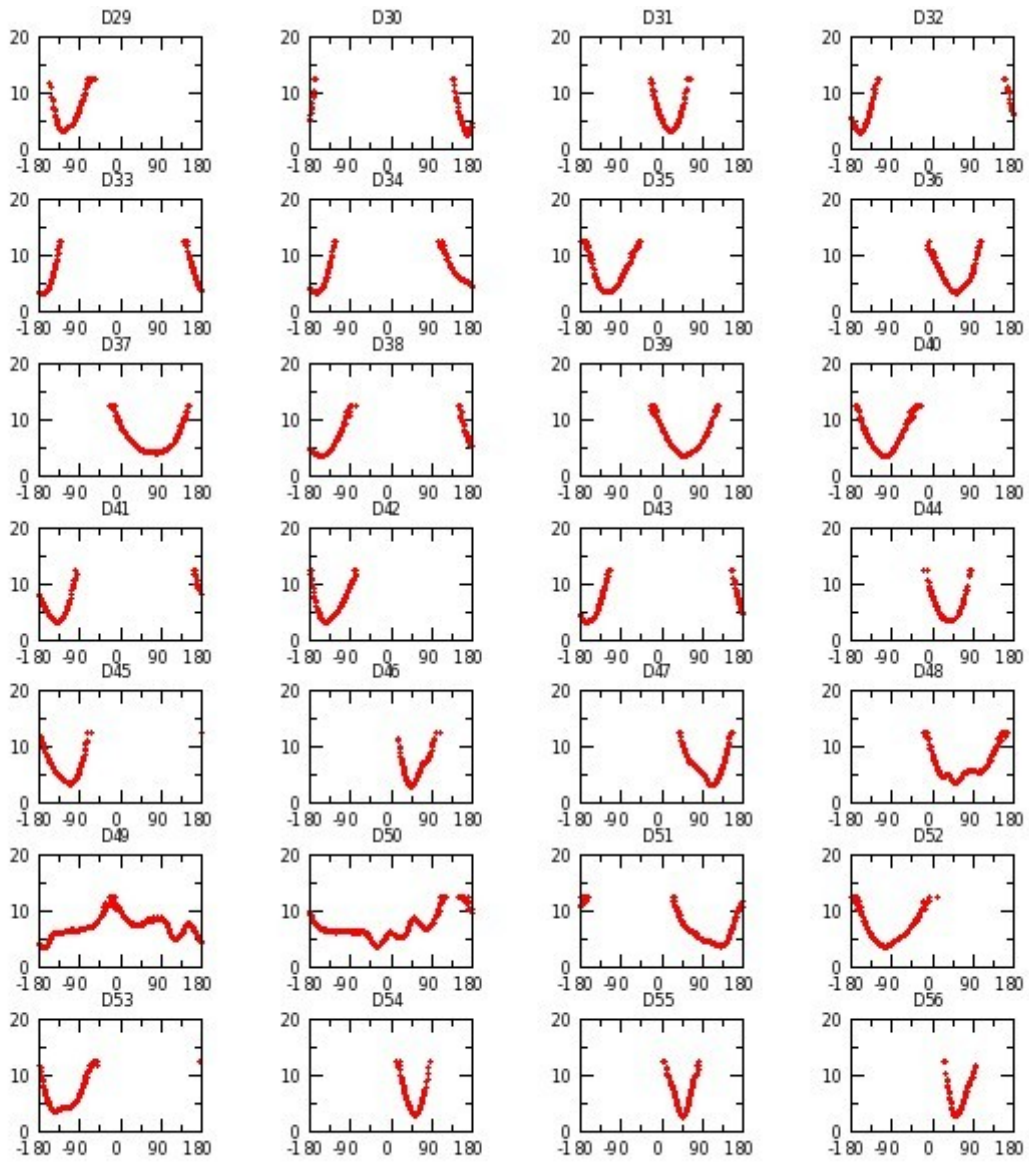


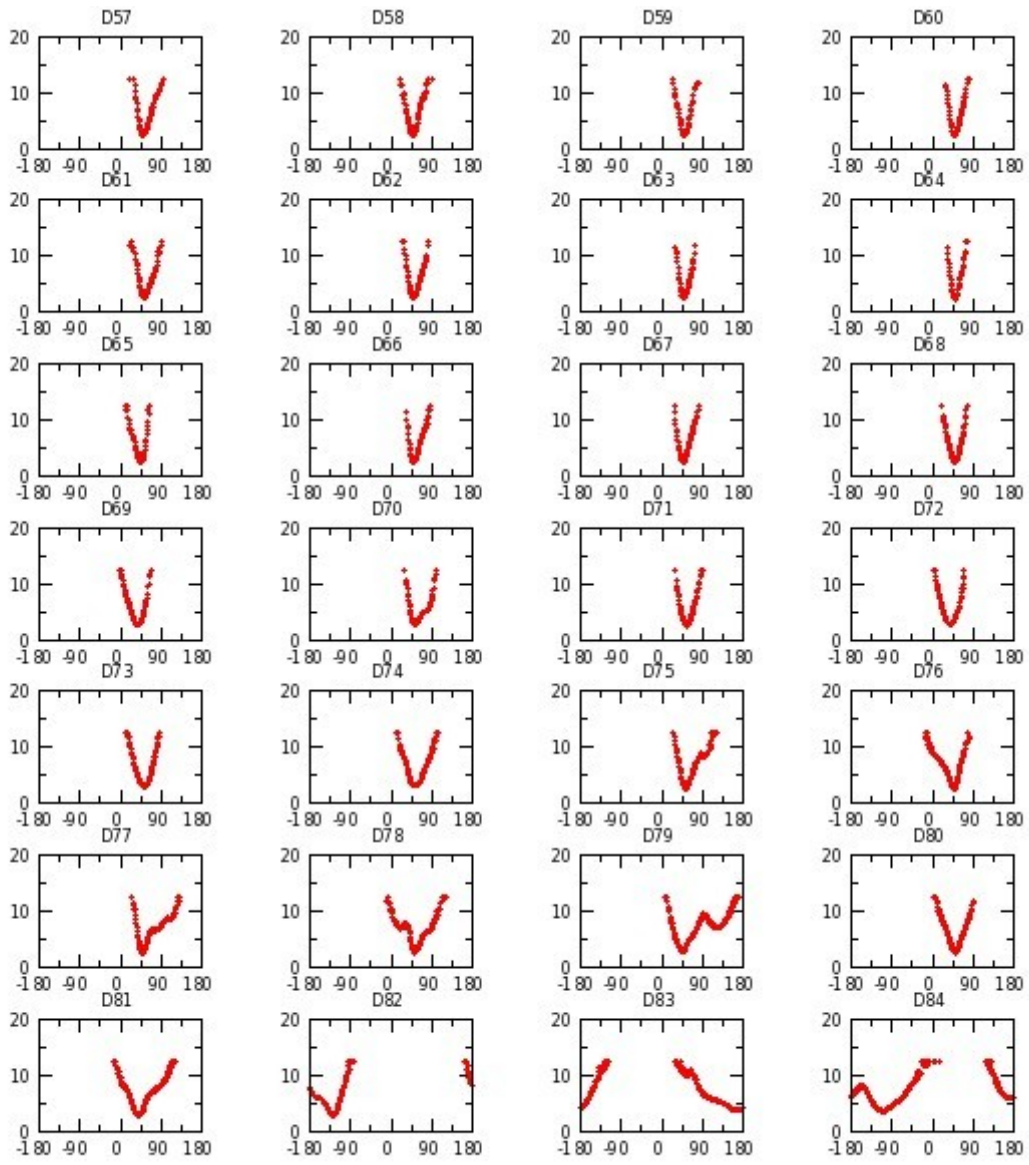


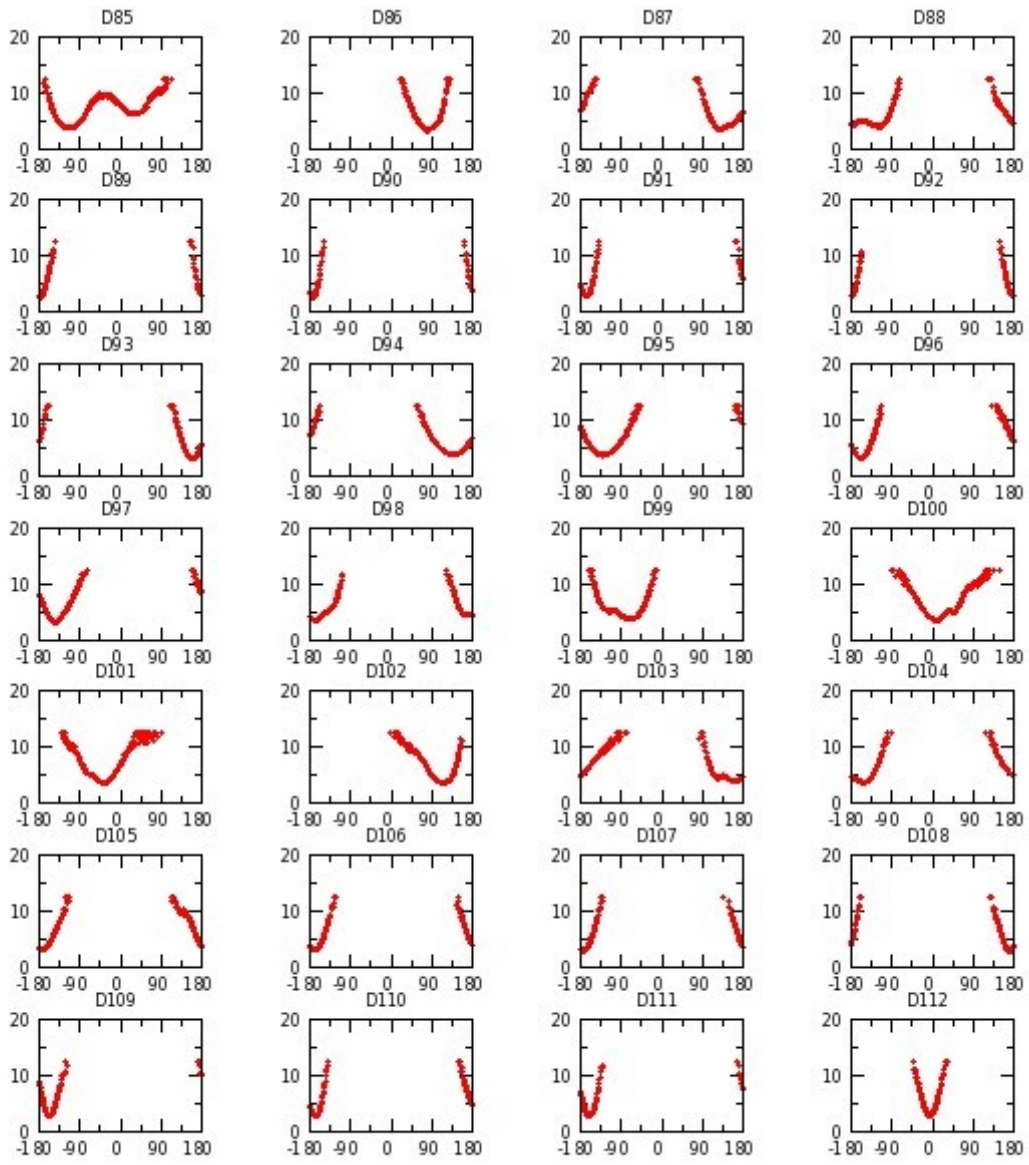


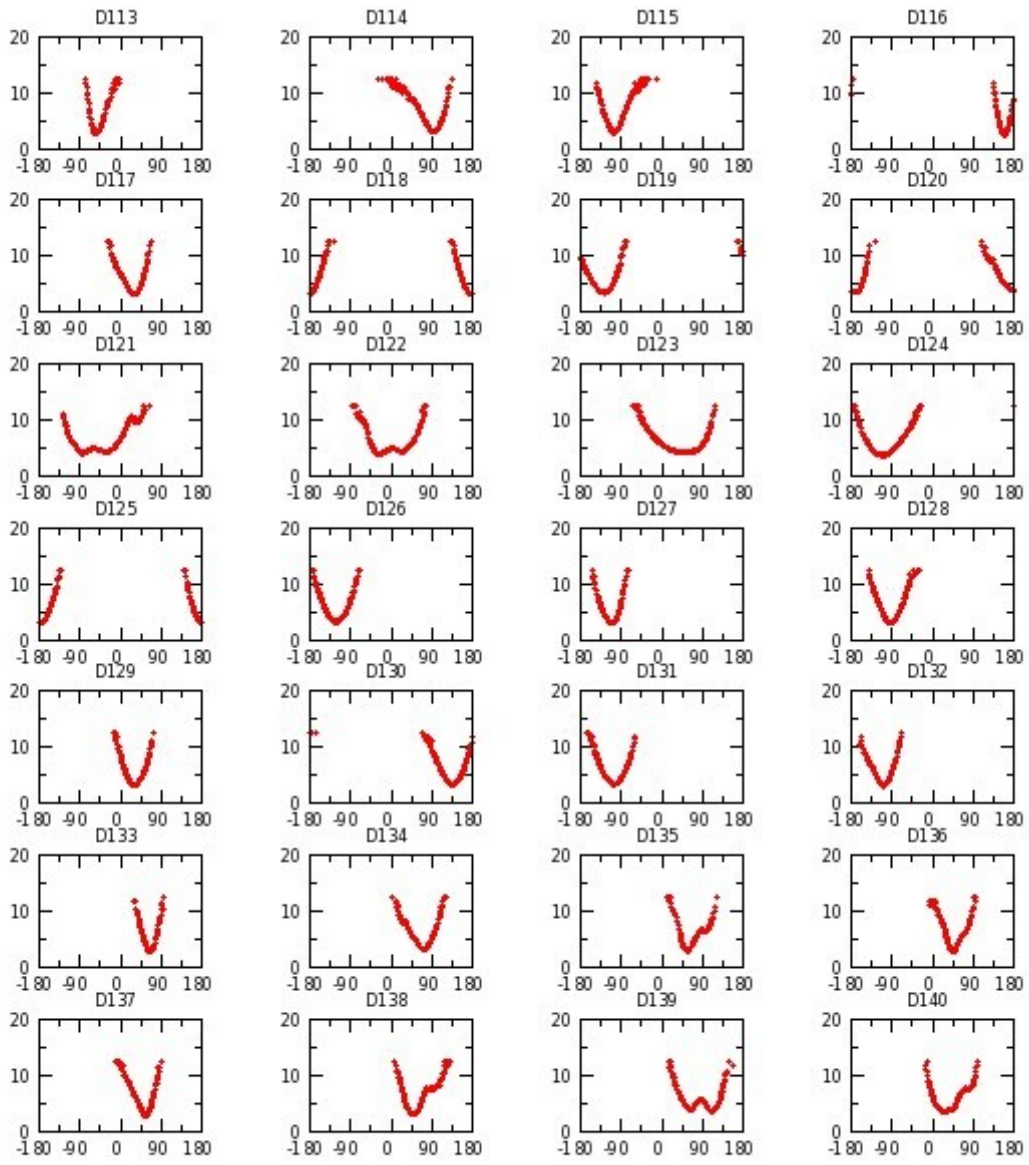
Annexe G 15 : H_LIP réplique III

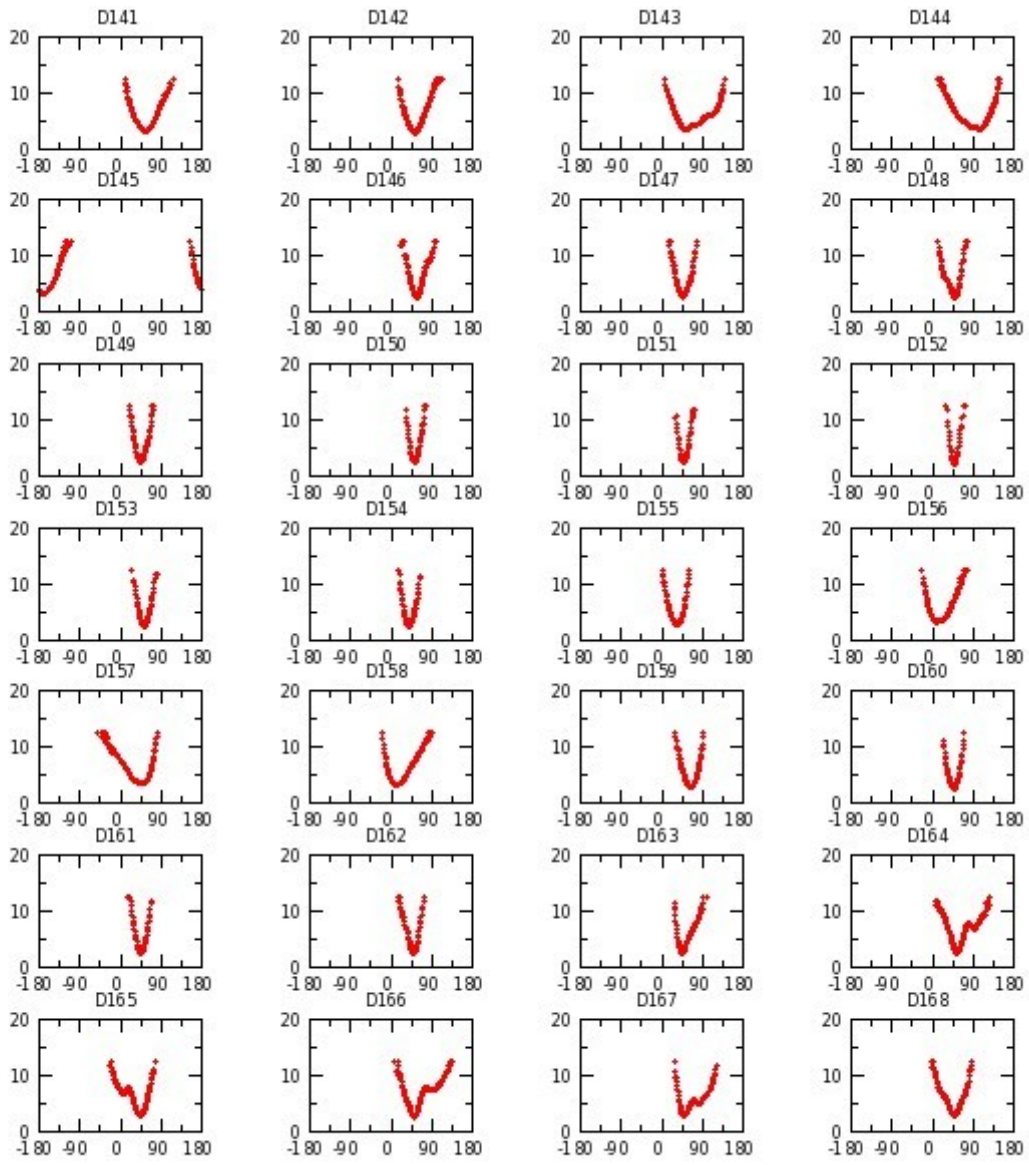


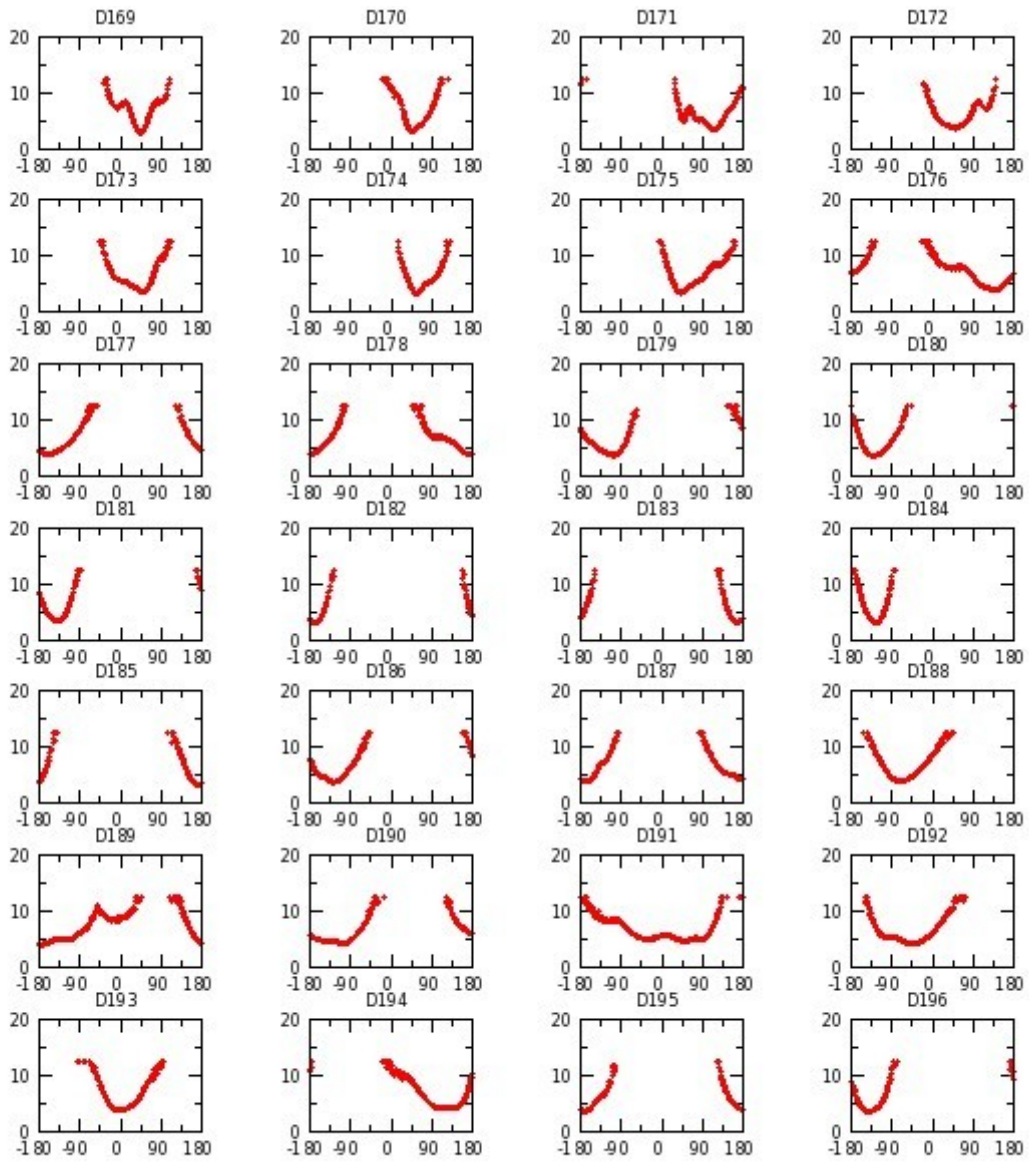


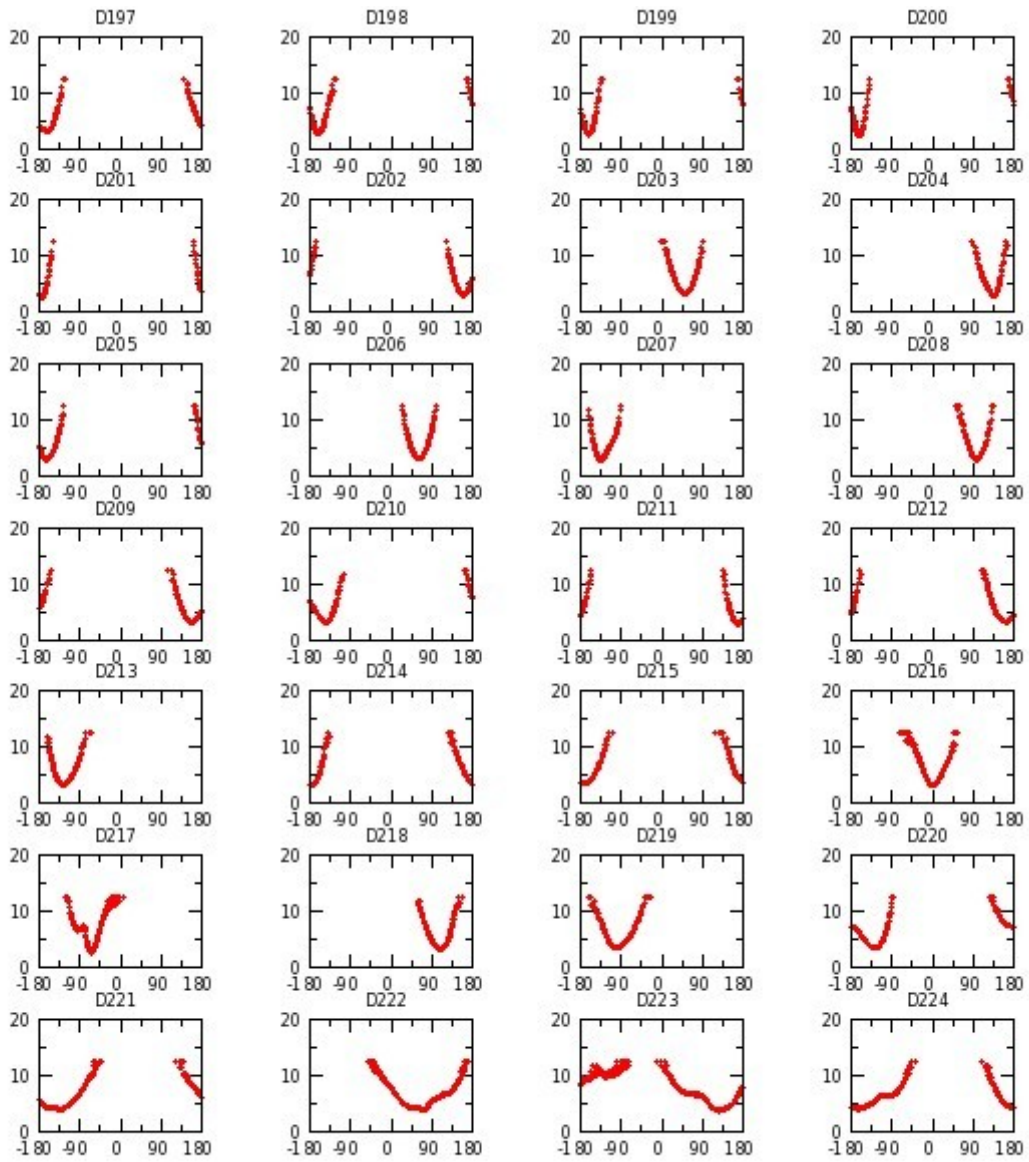


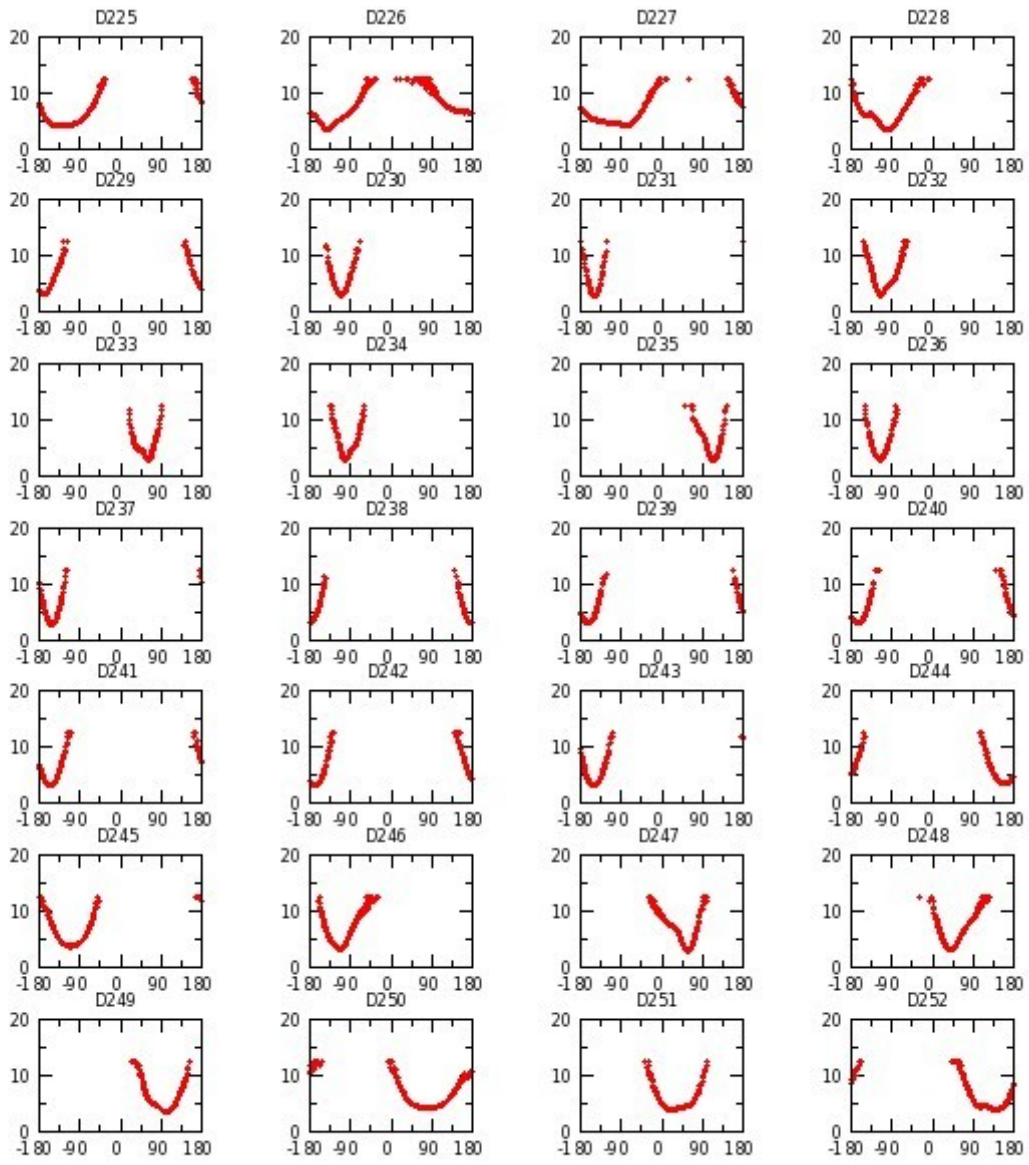


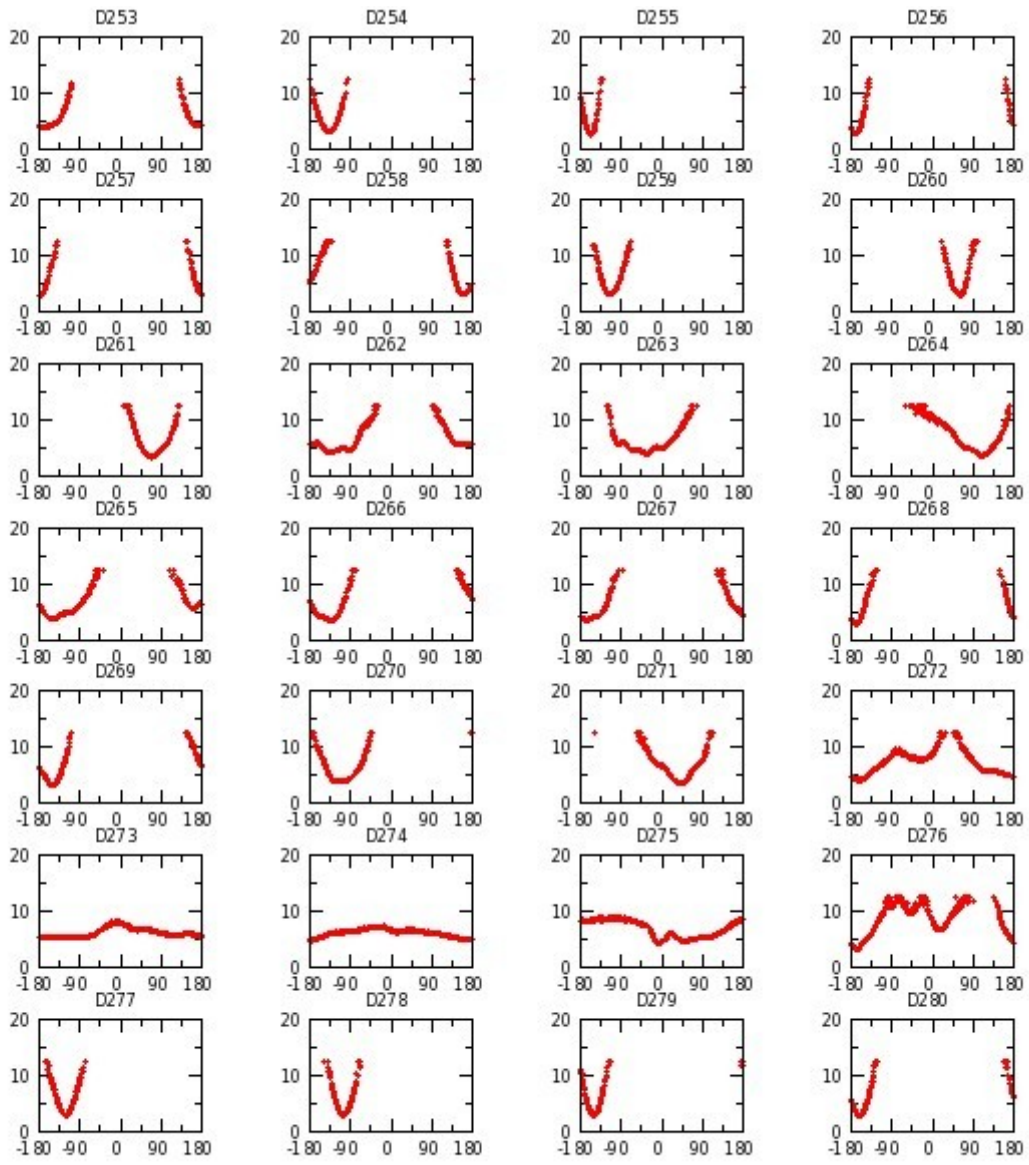


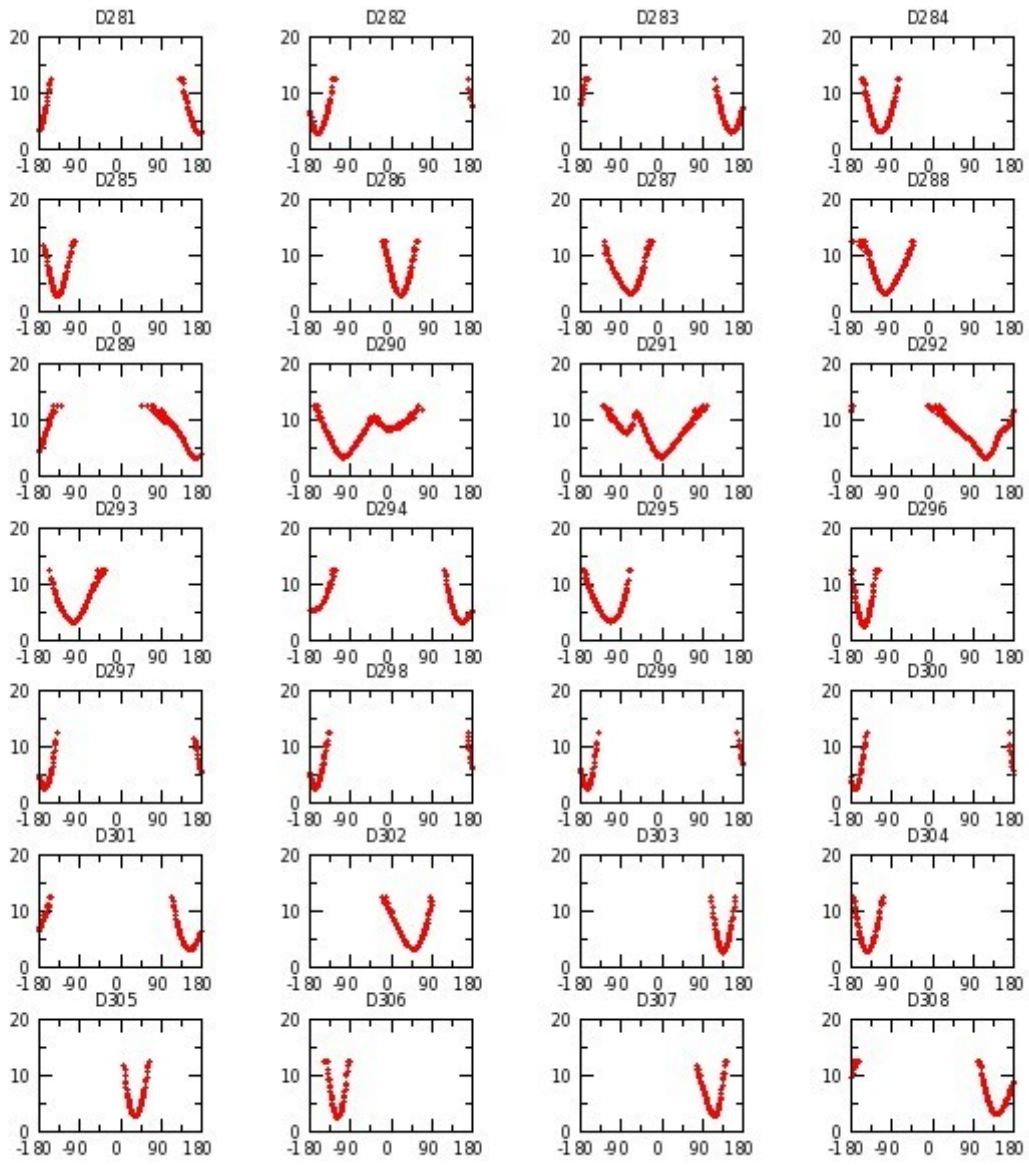


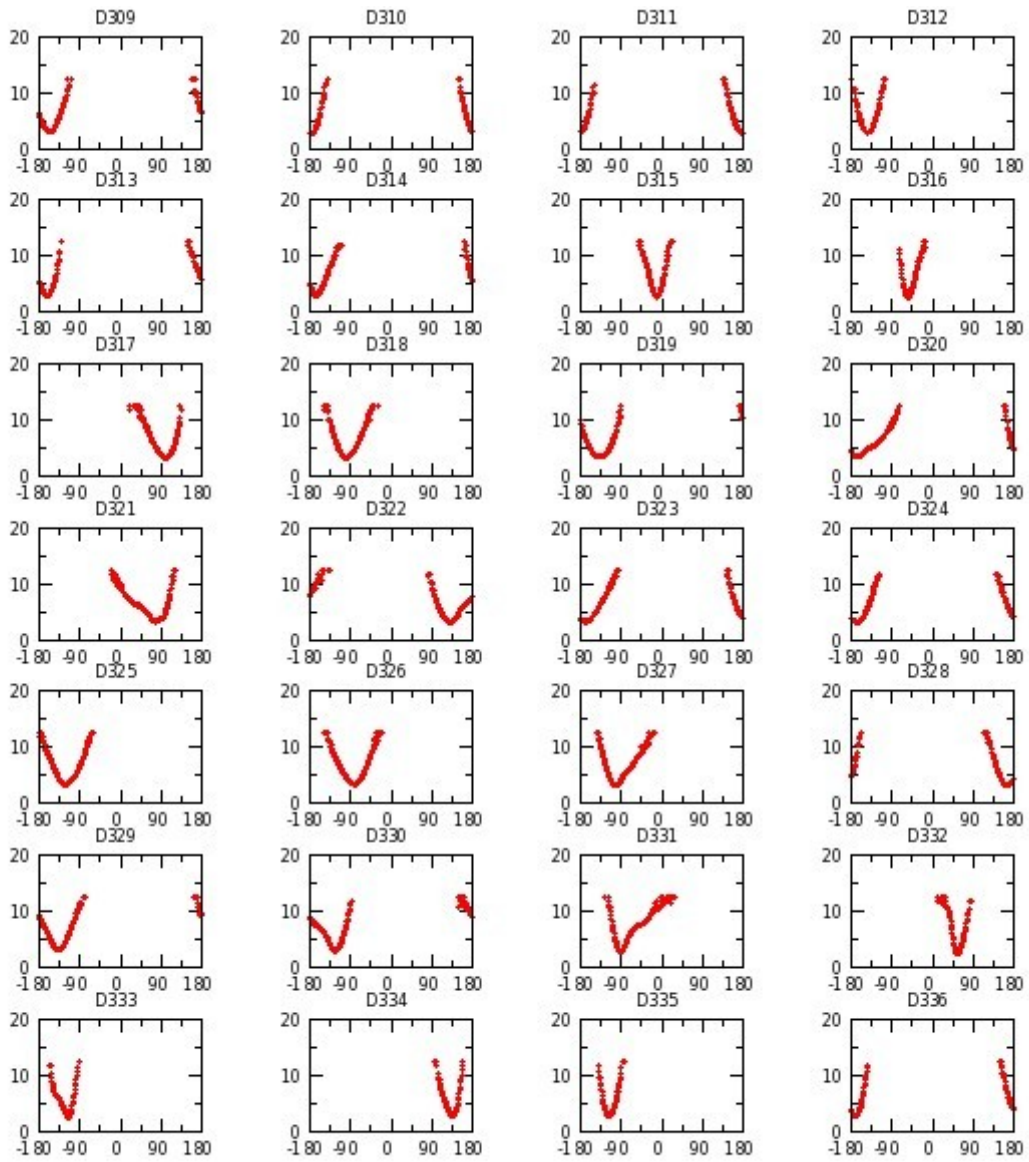


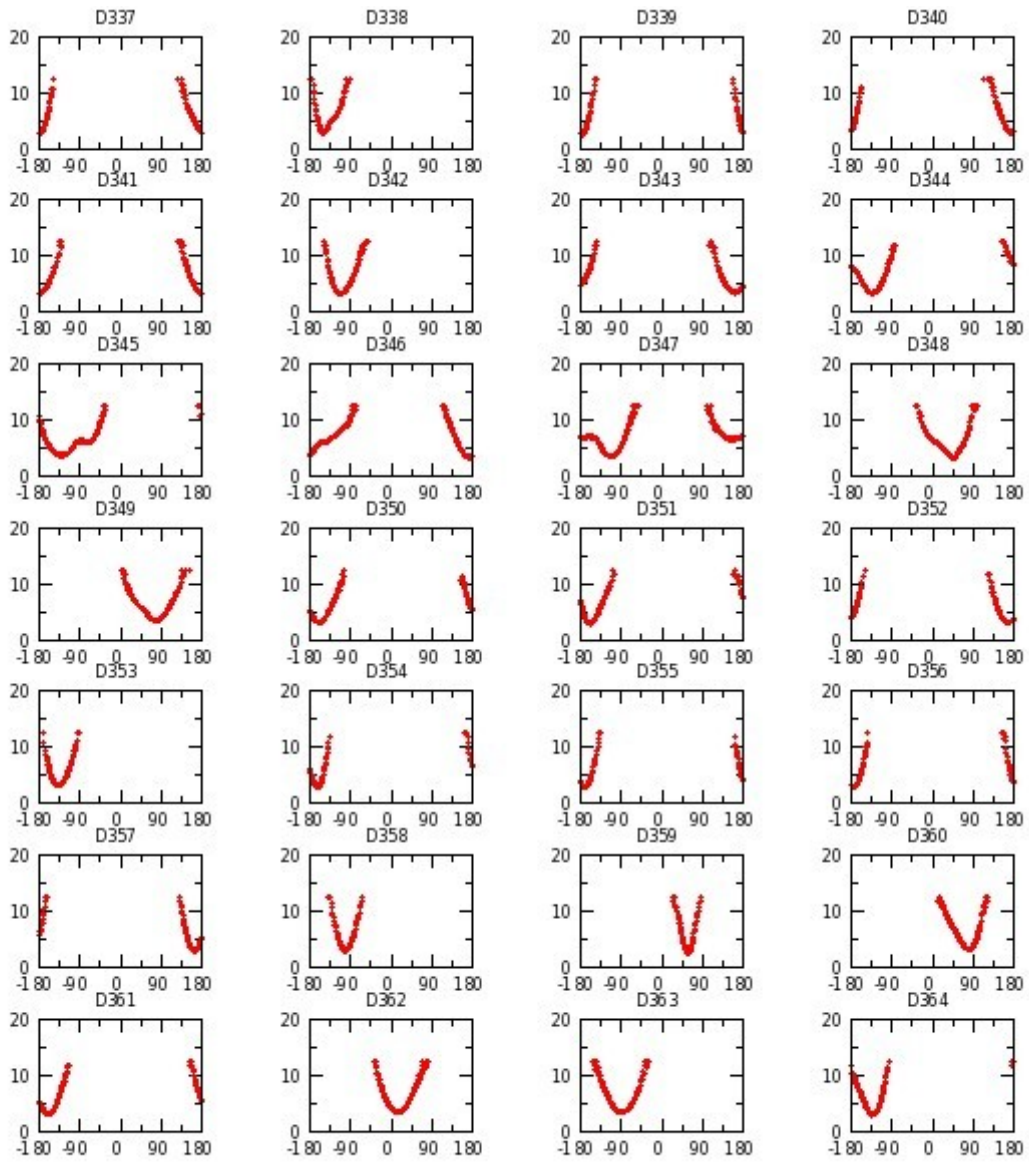


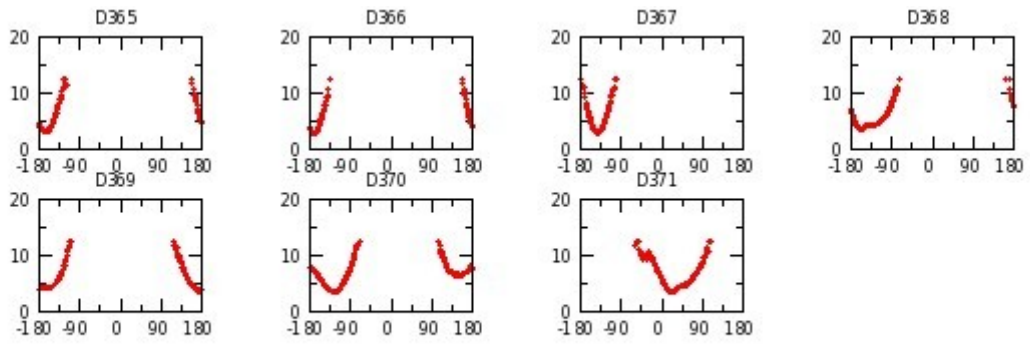




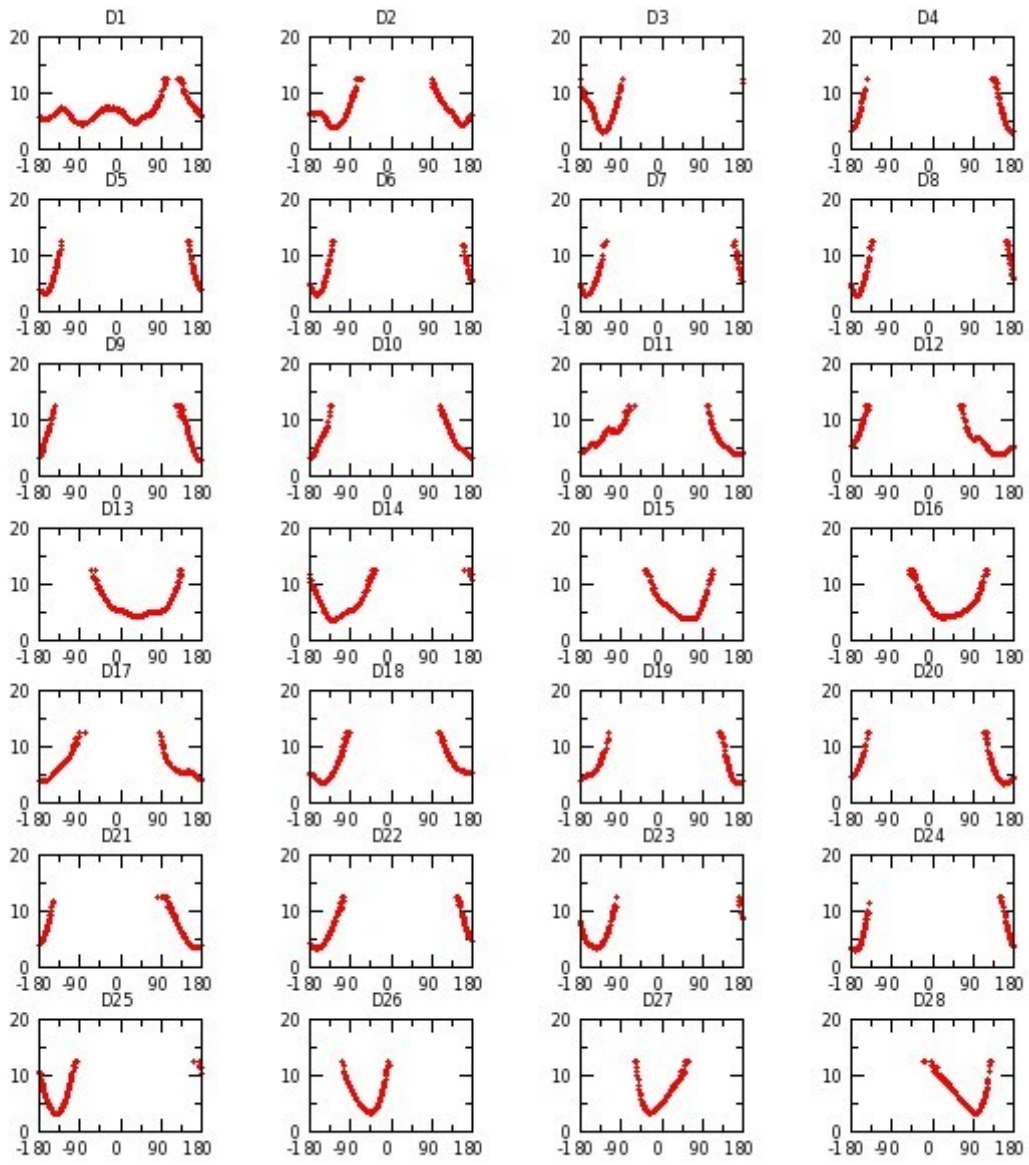


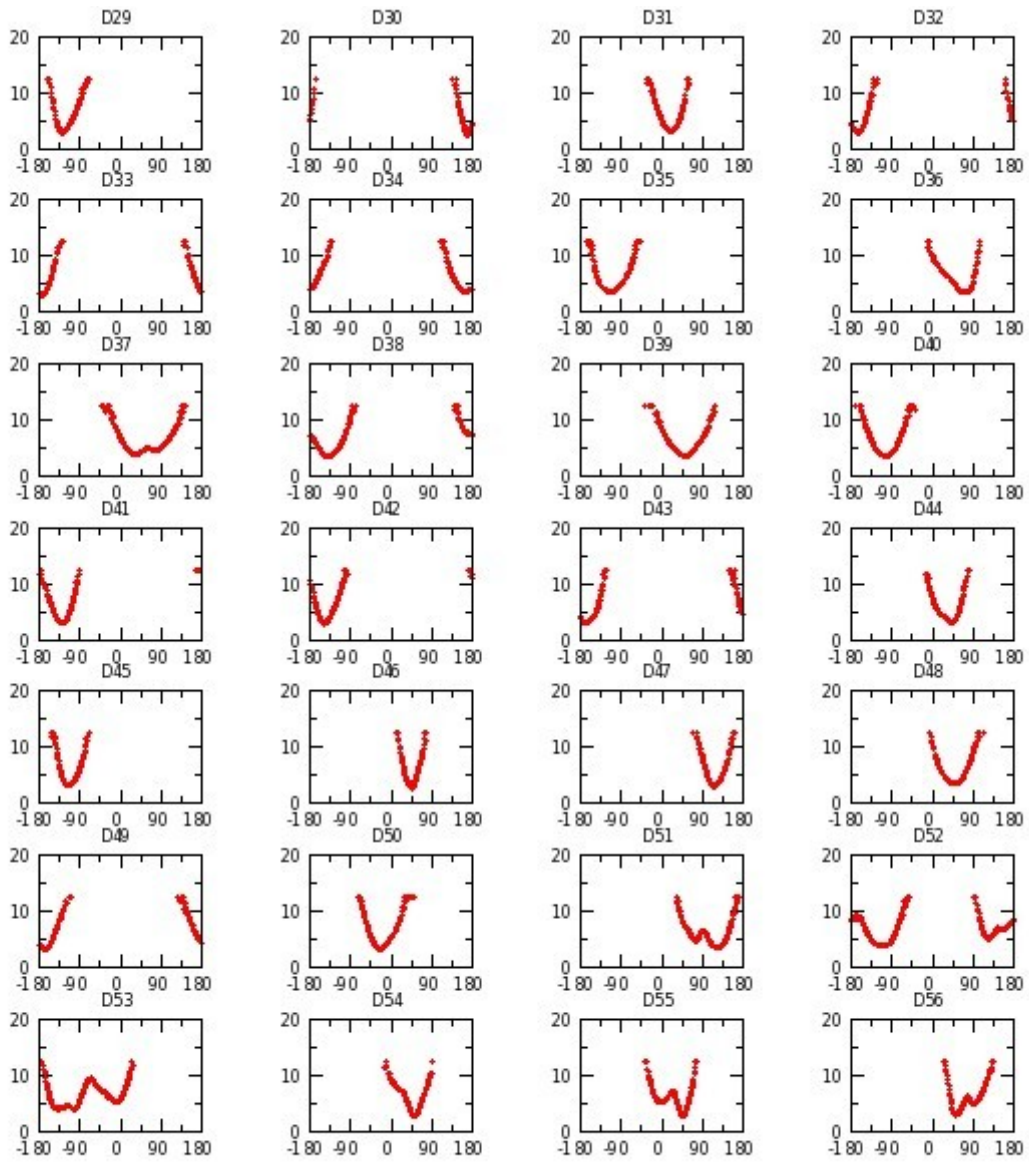


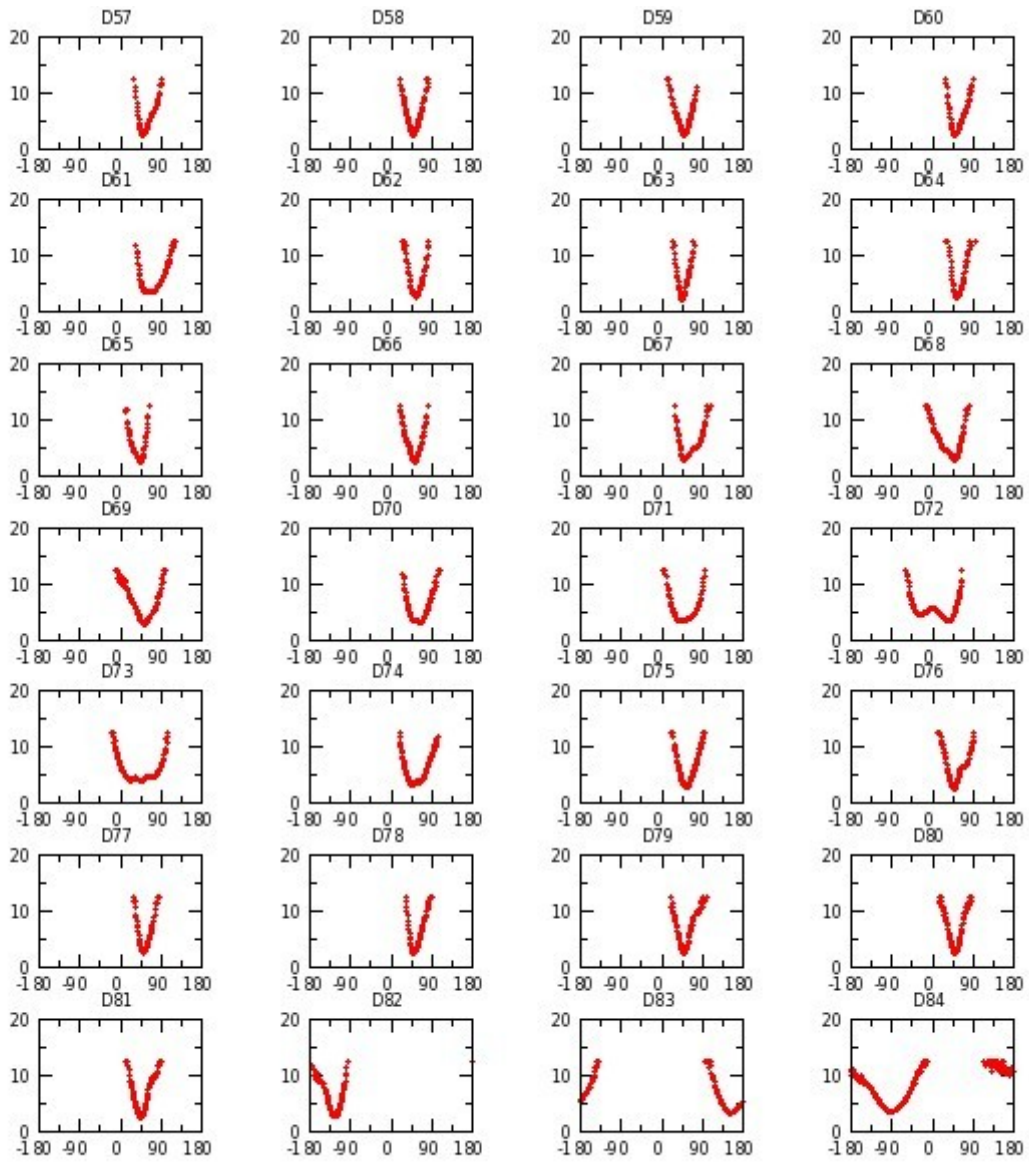


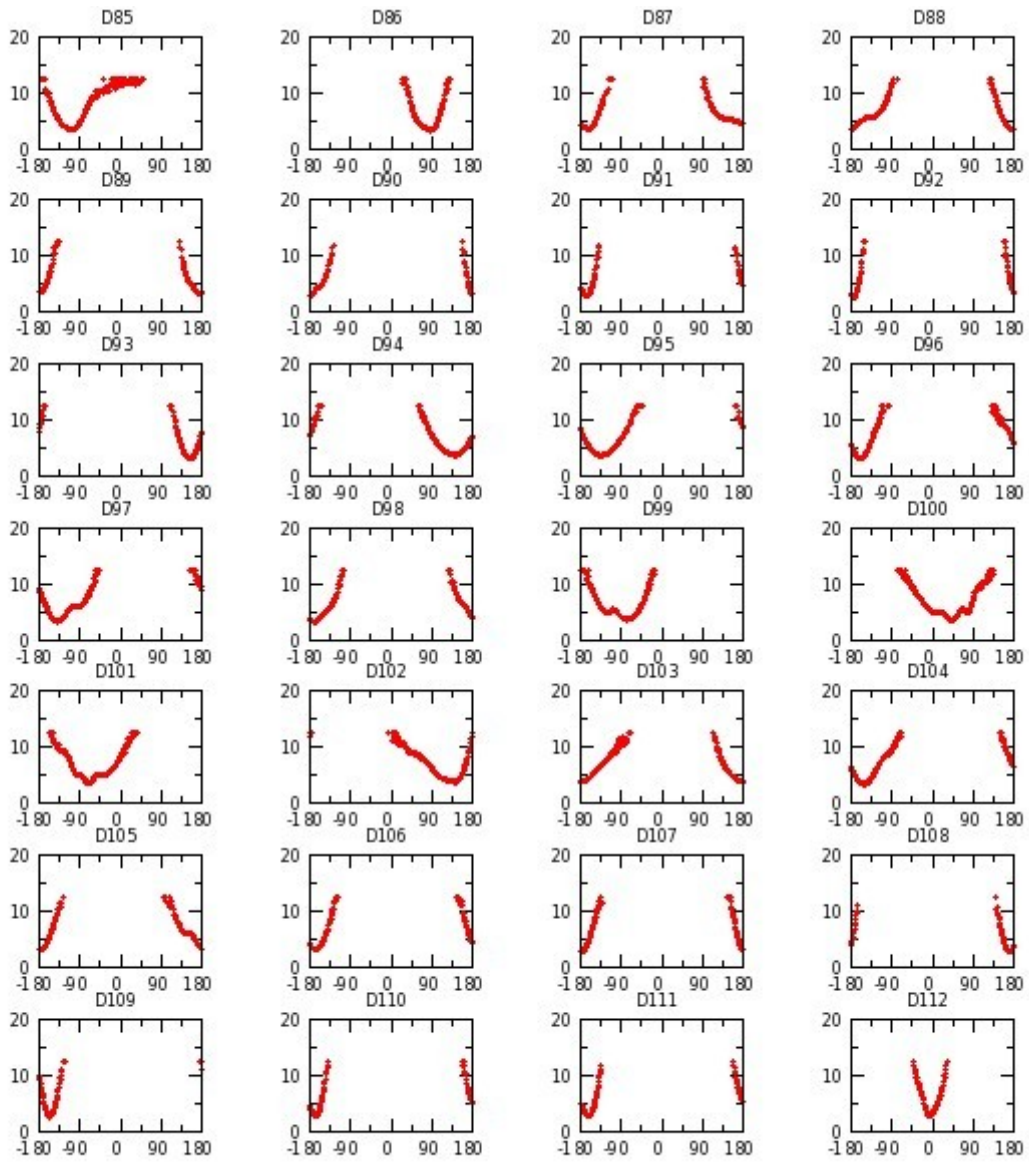


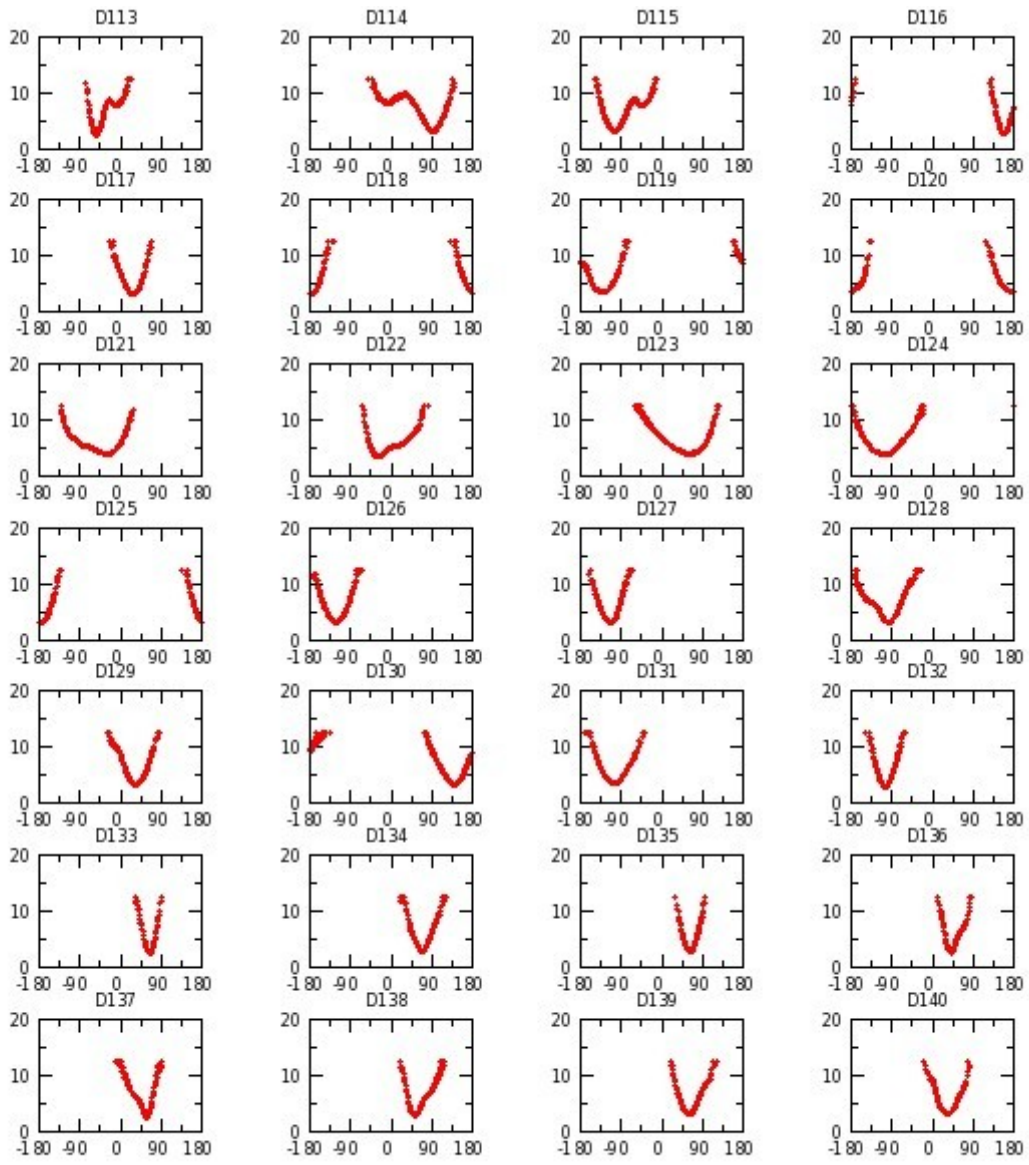
Annexe G 16 : H_NUaGAL réplique I

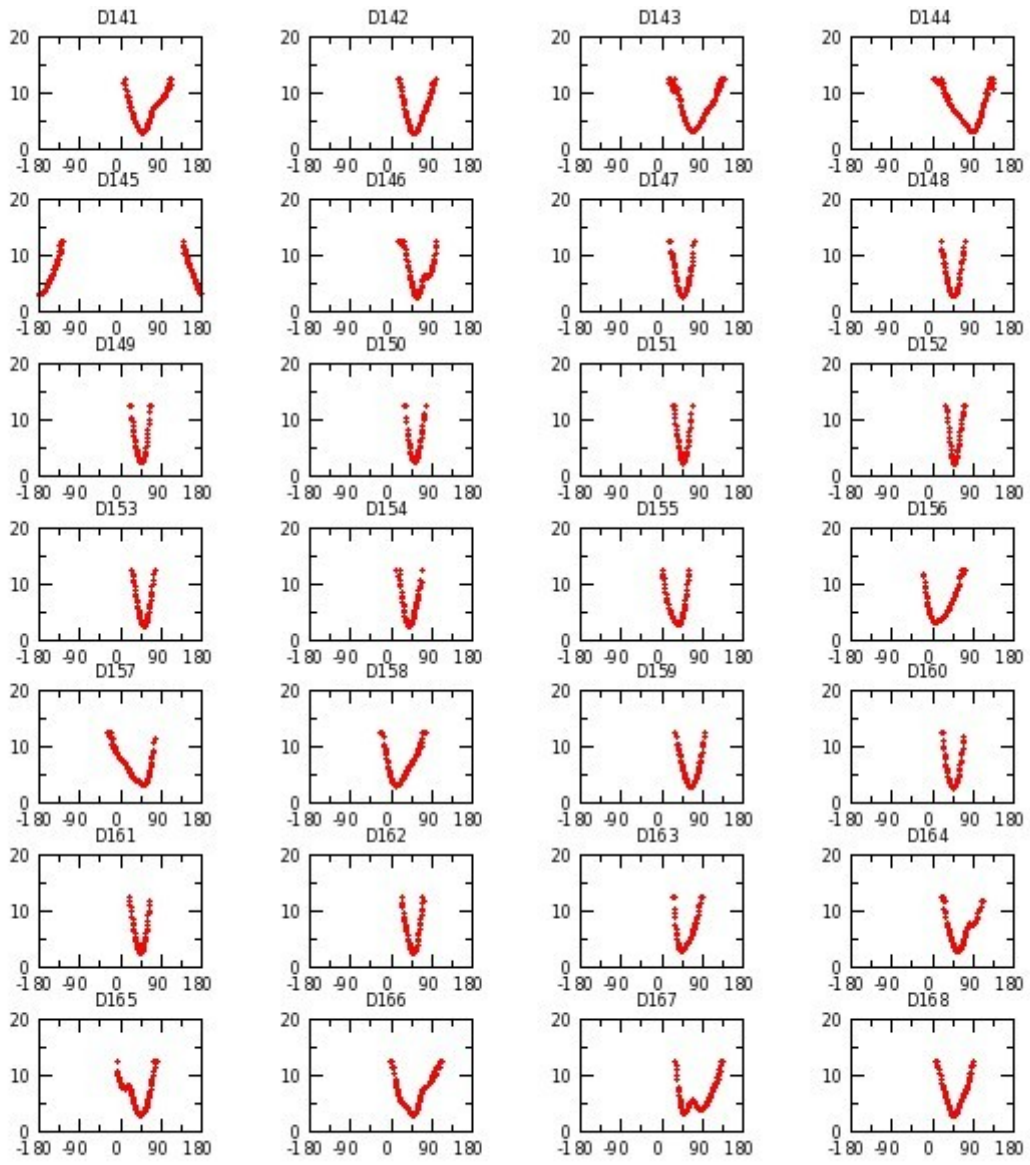


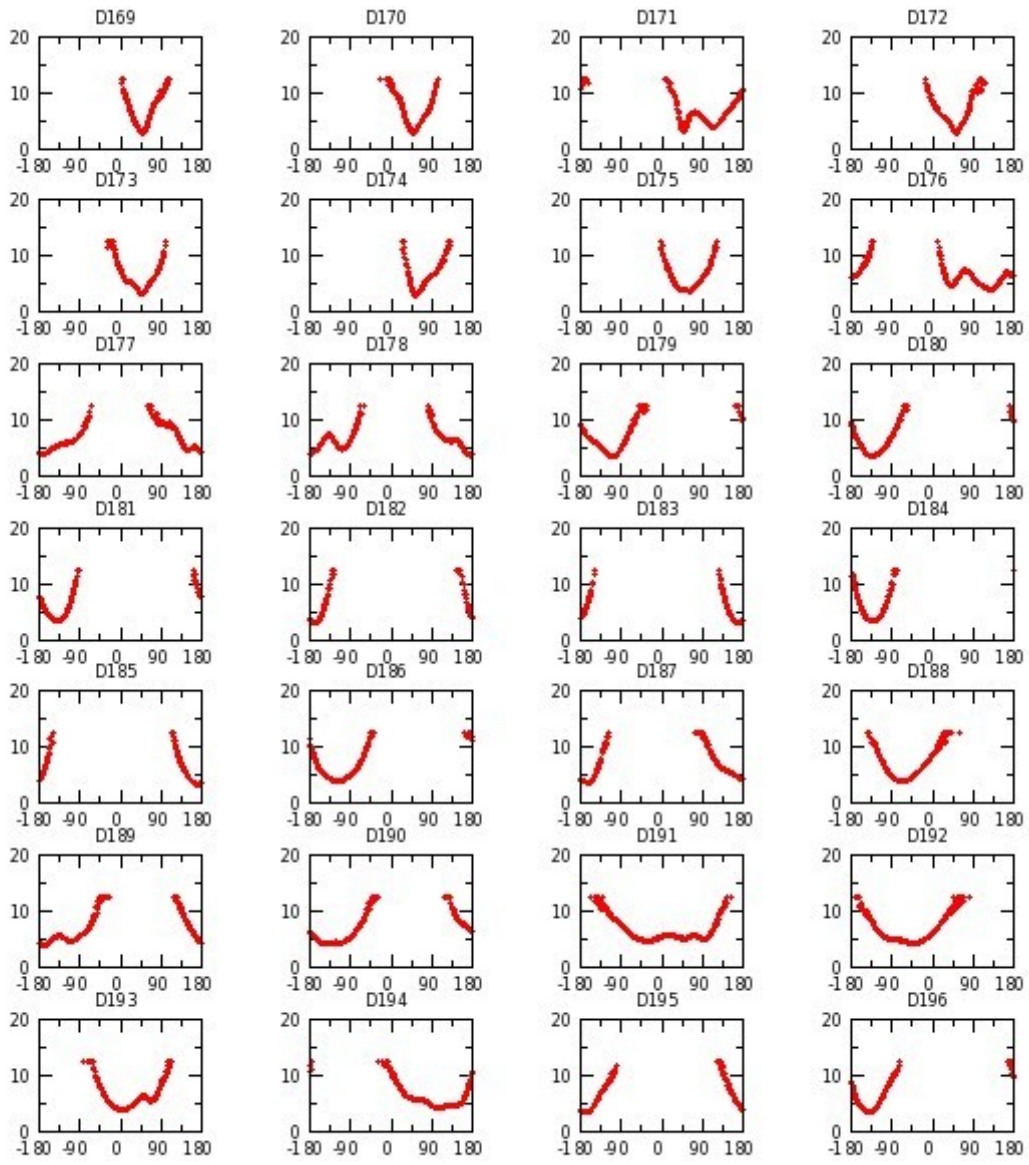


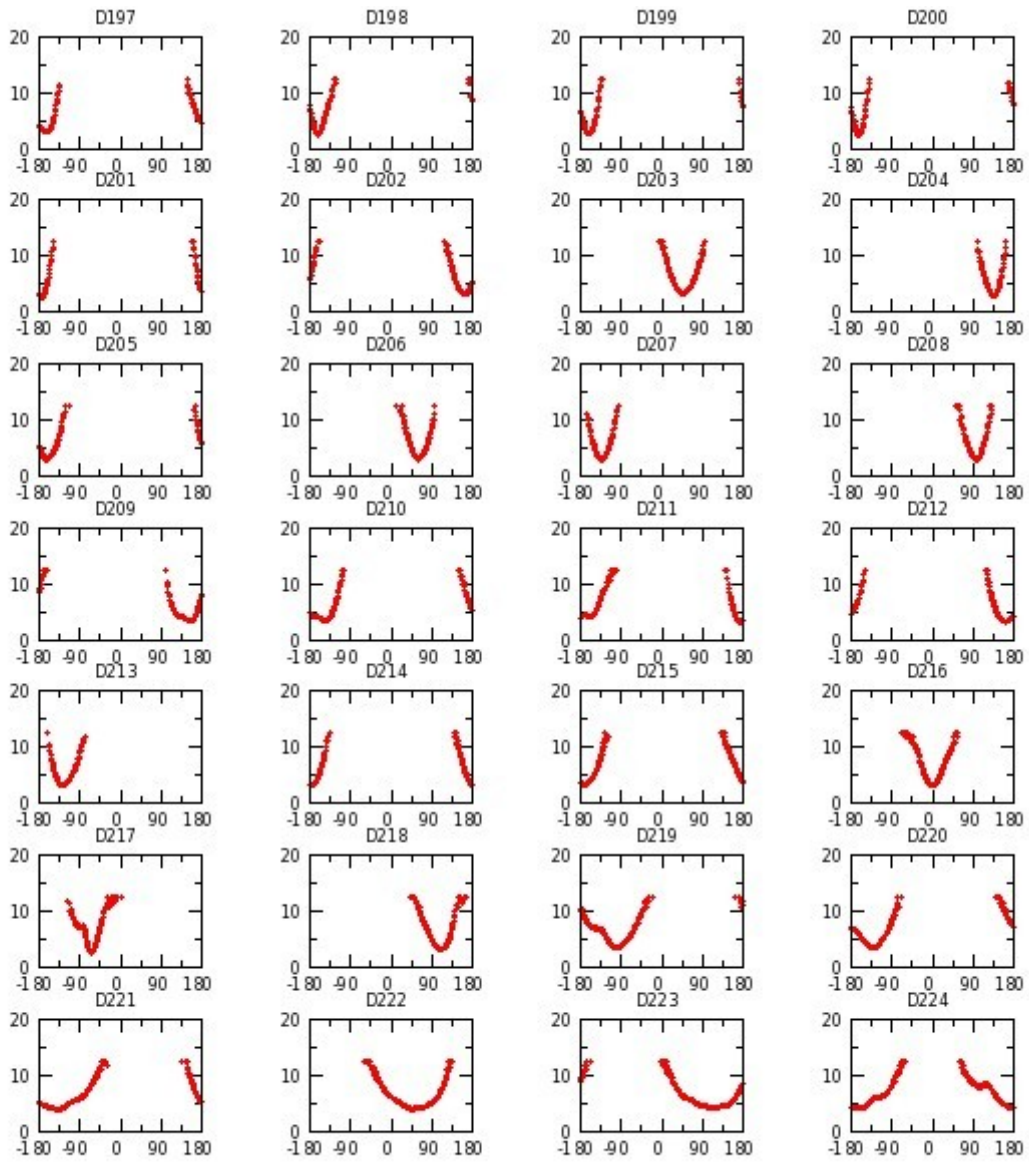


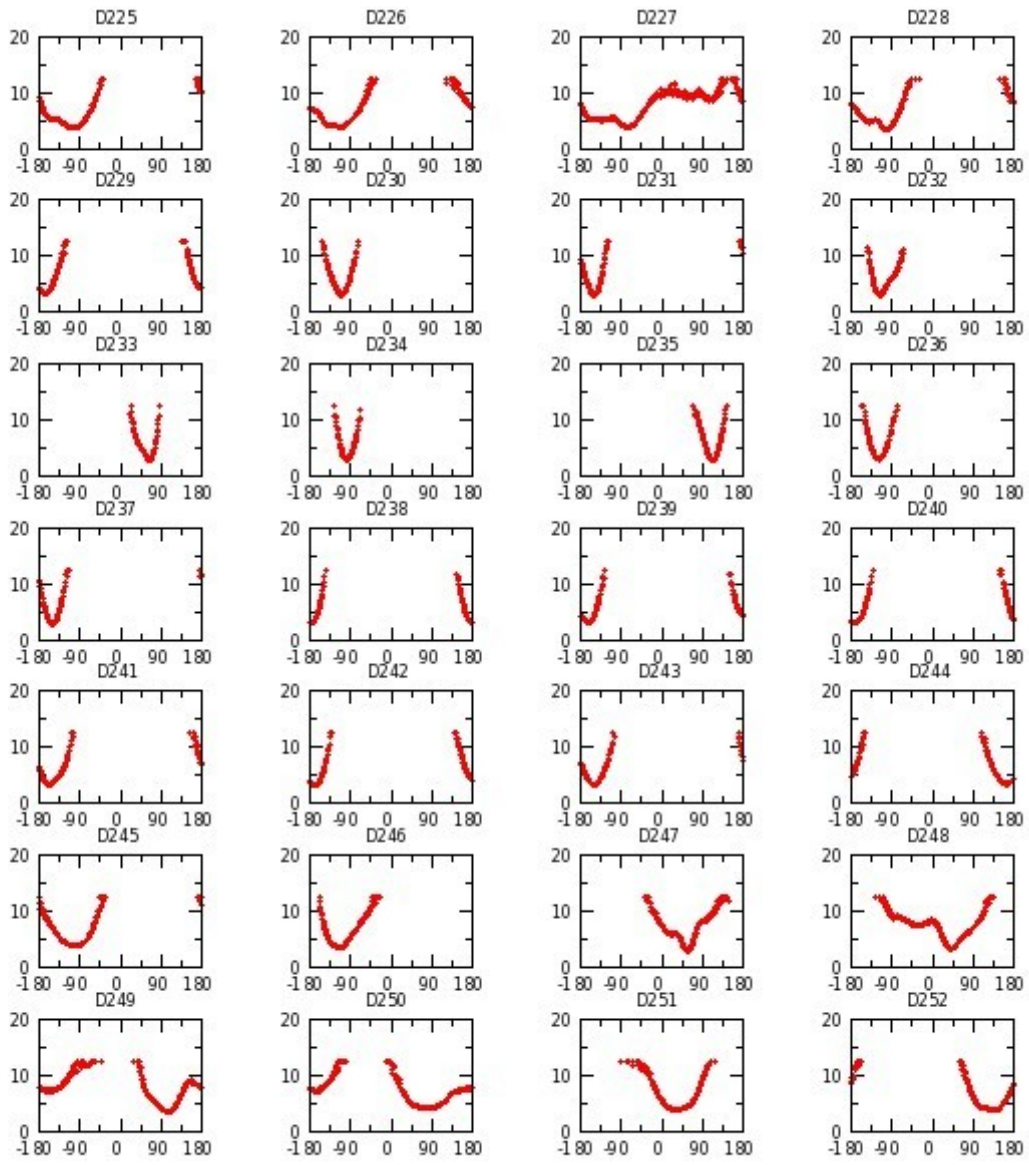


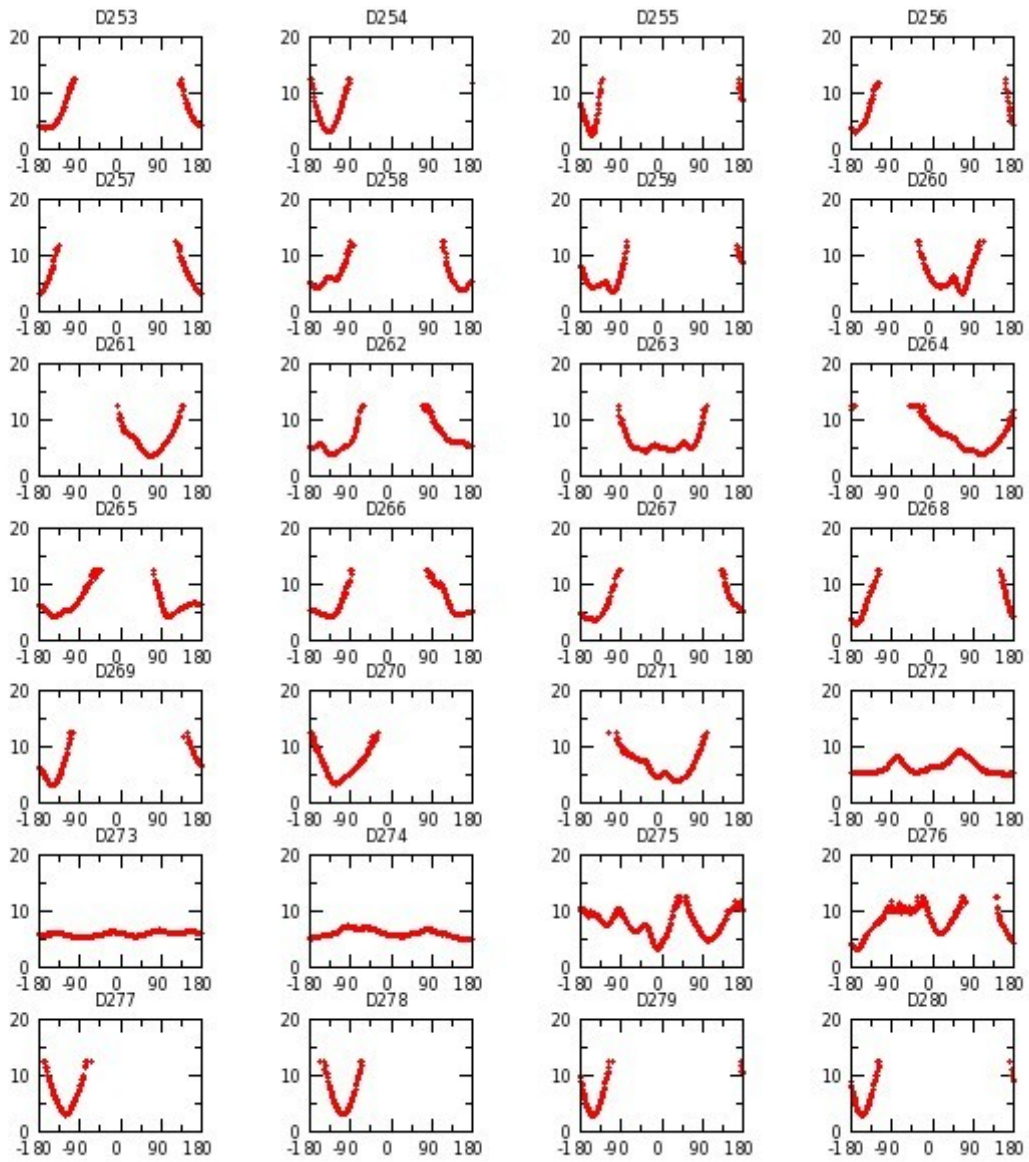


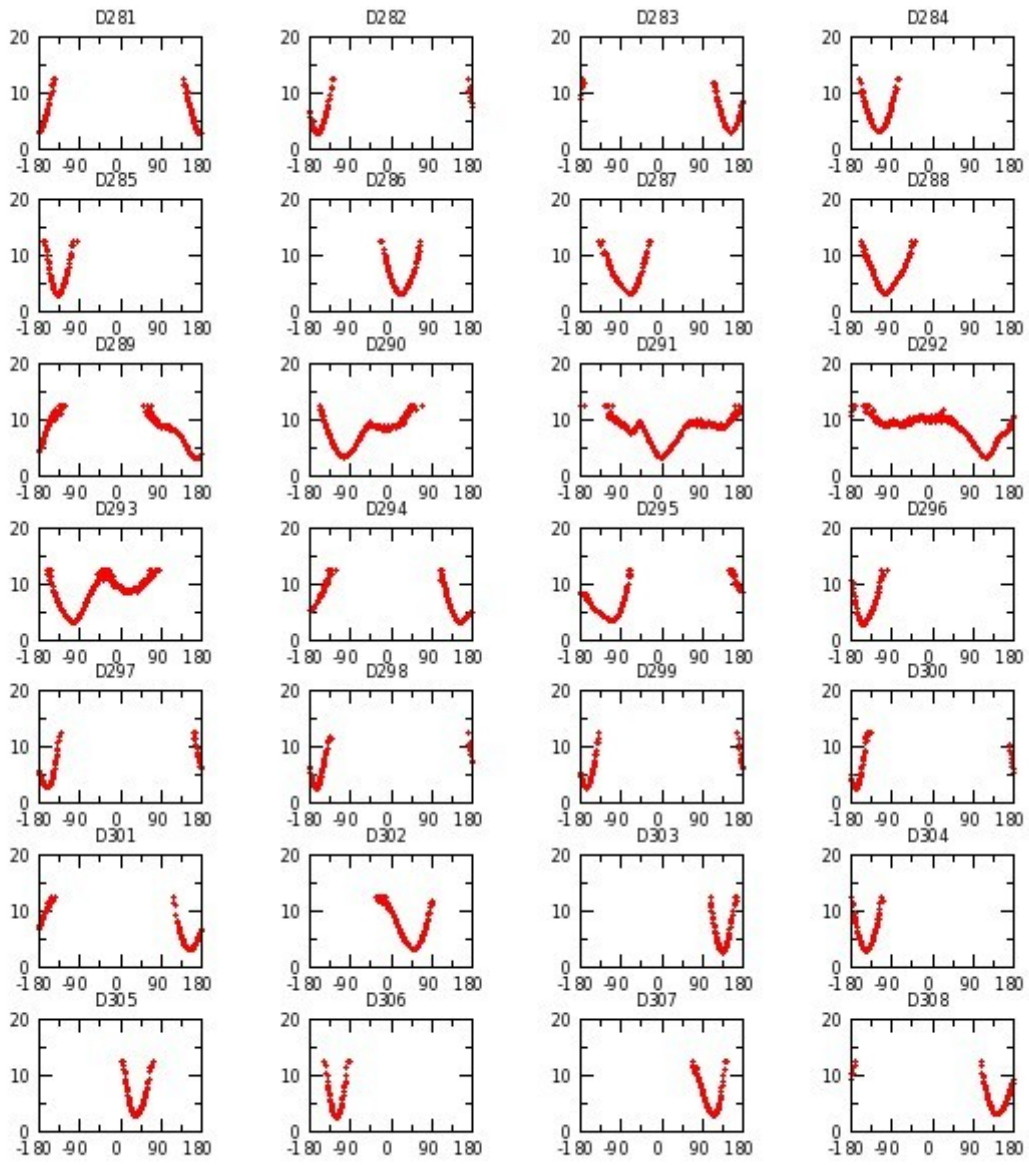


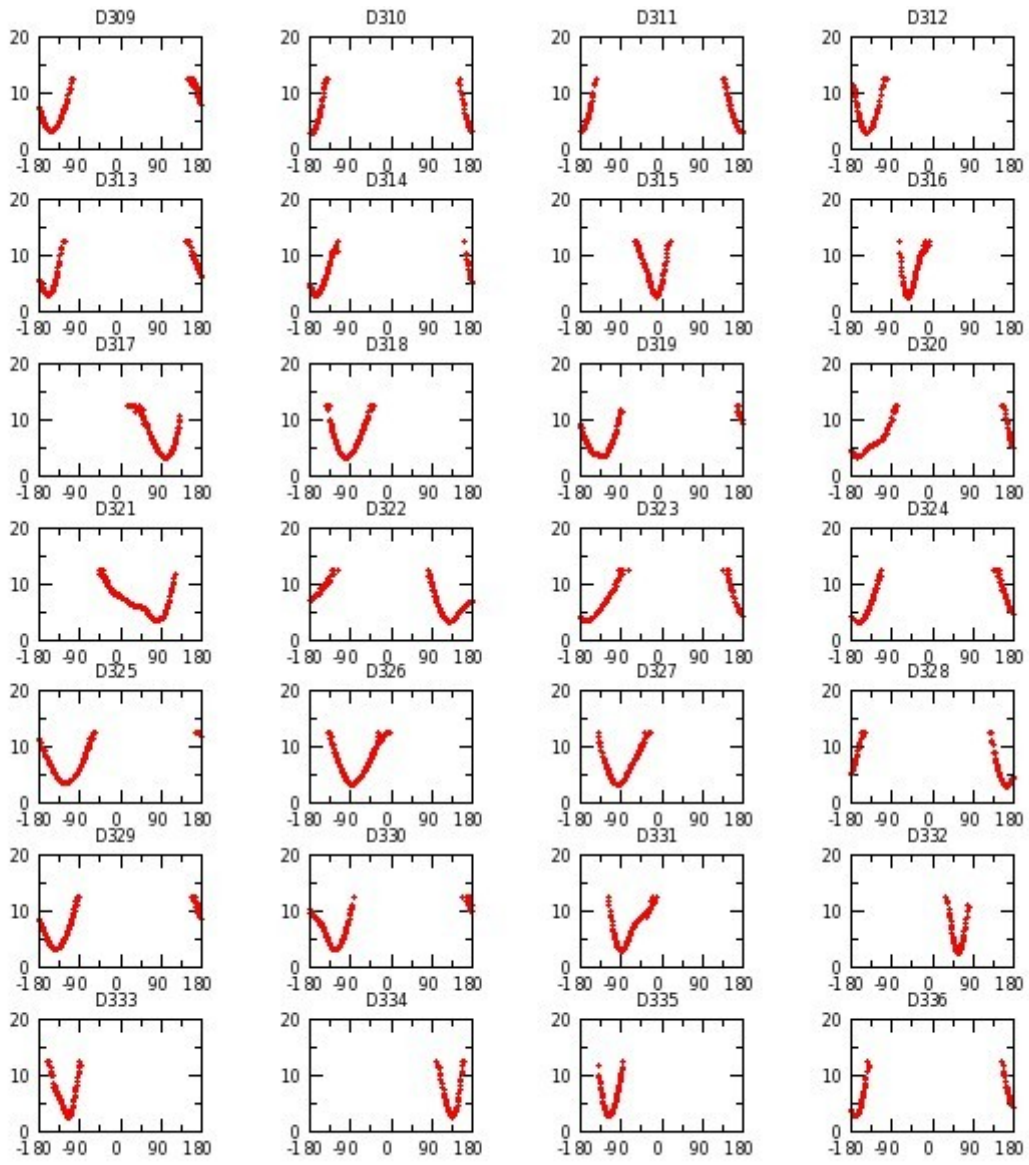


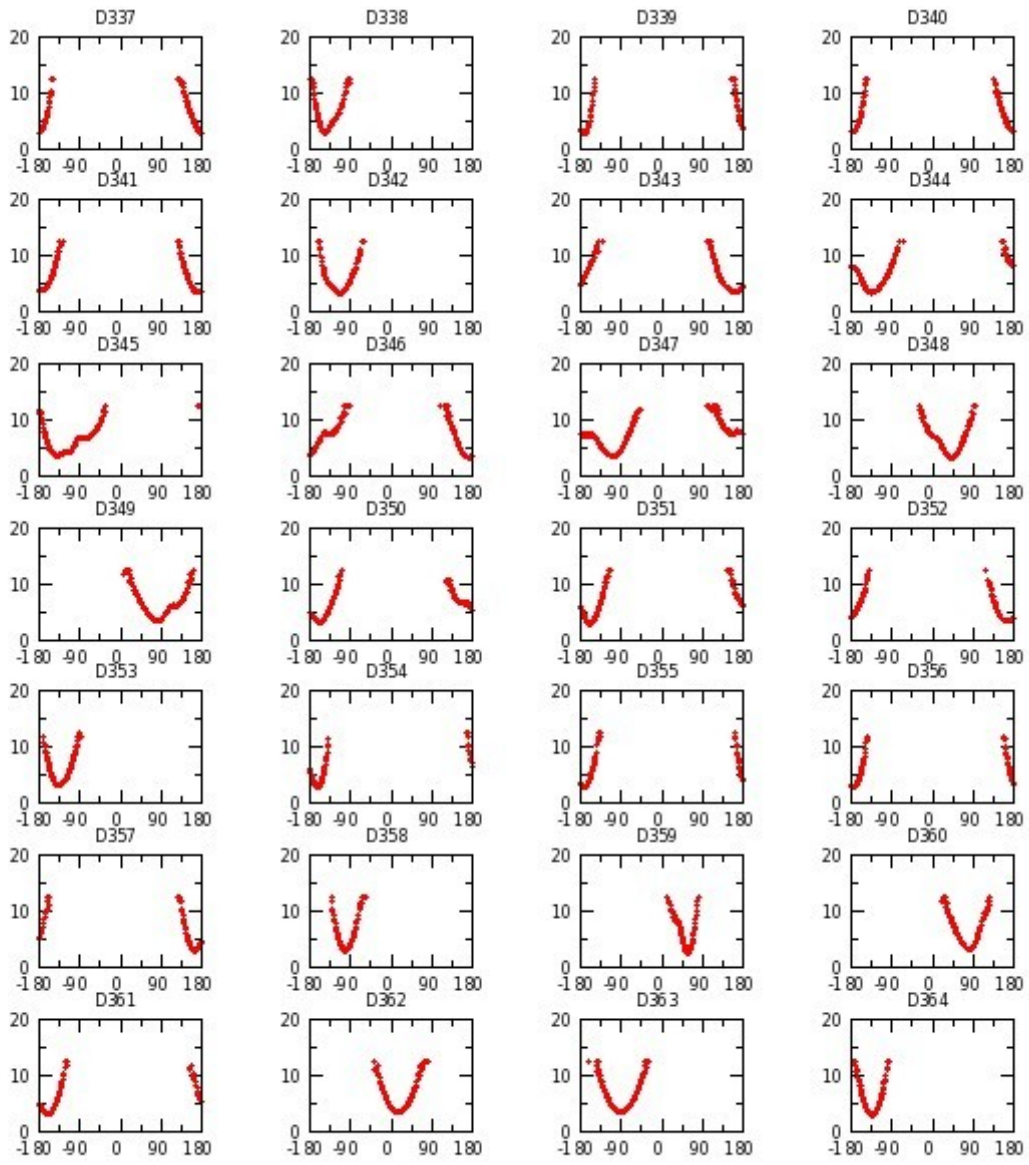


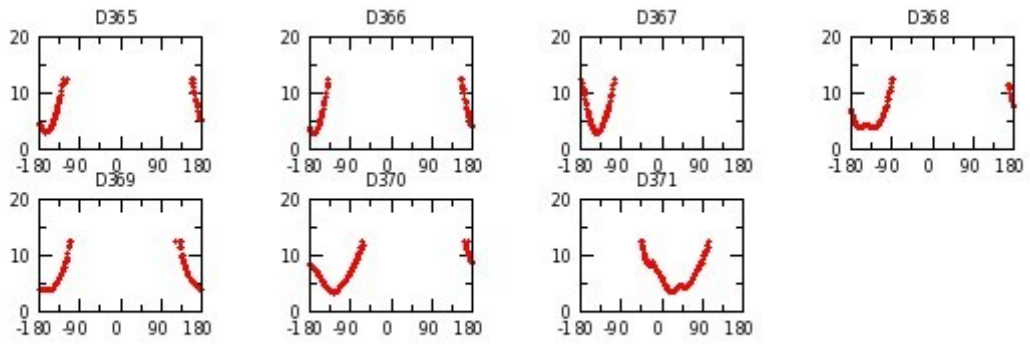




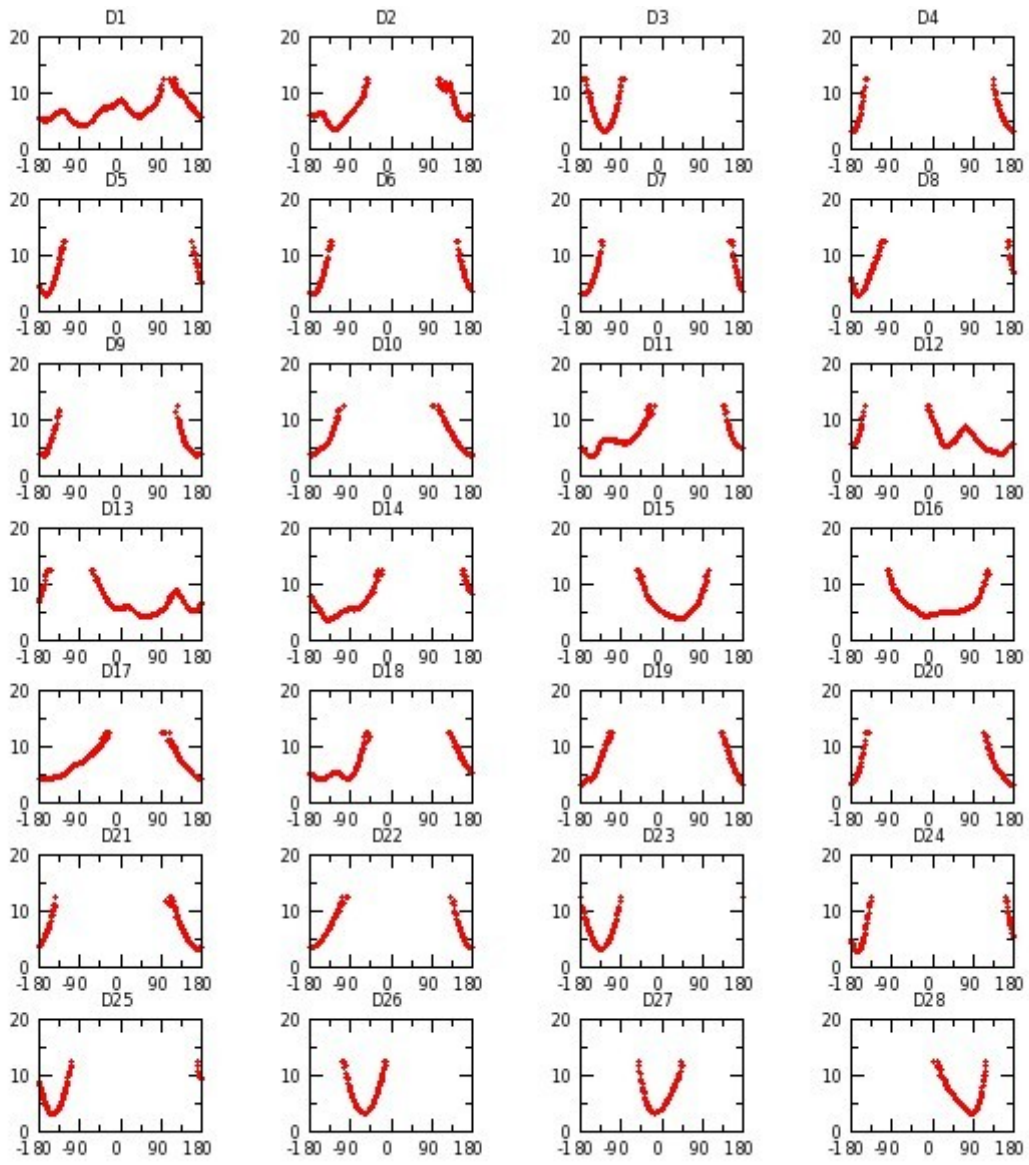


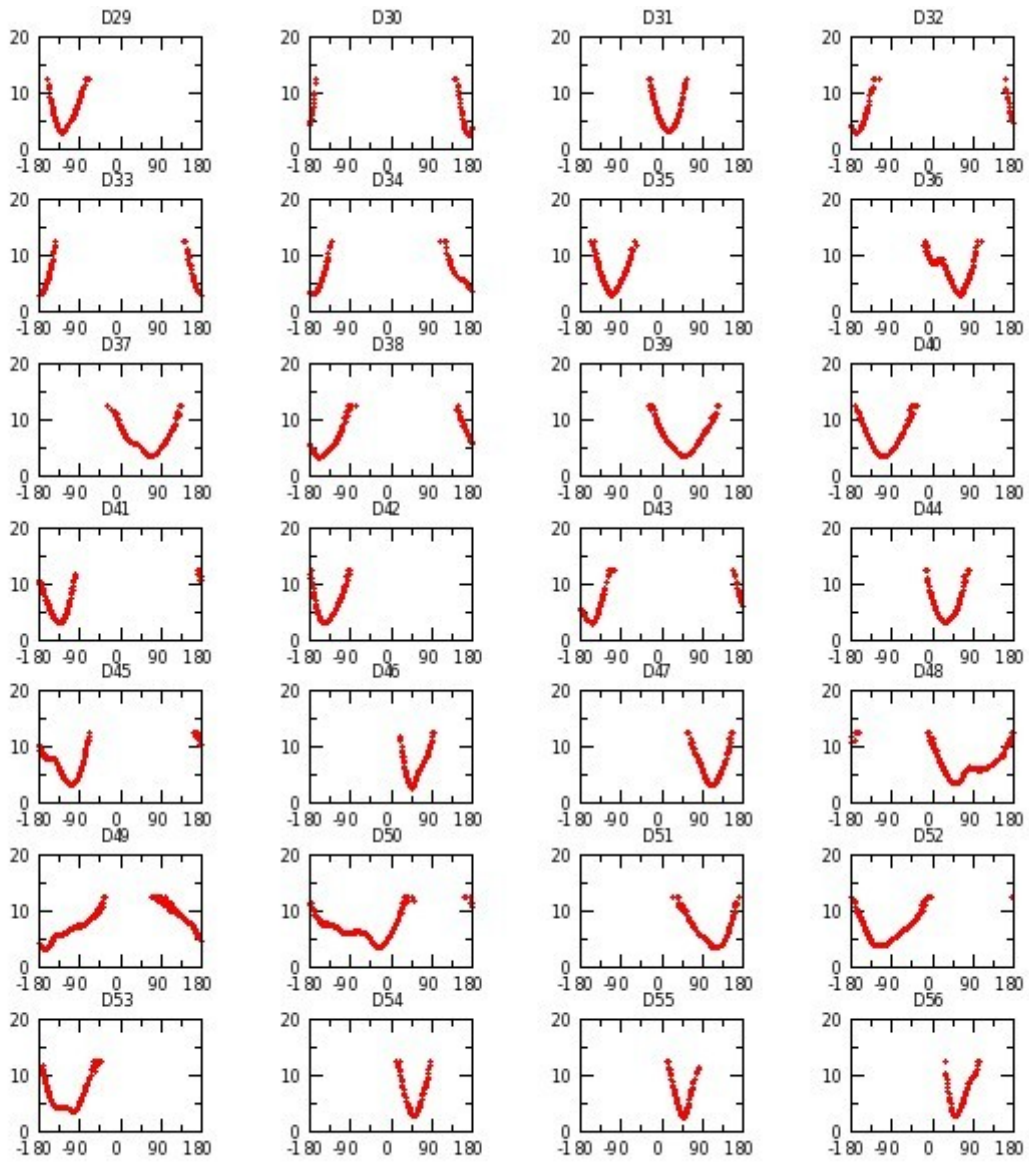


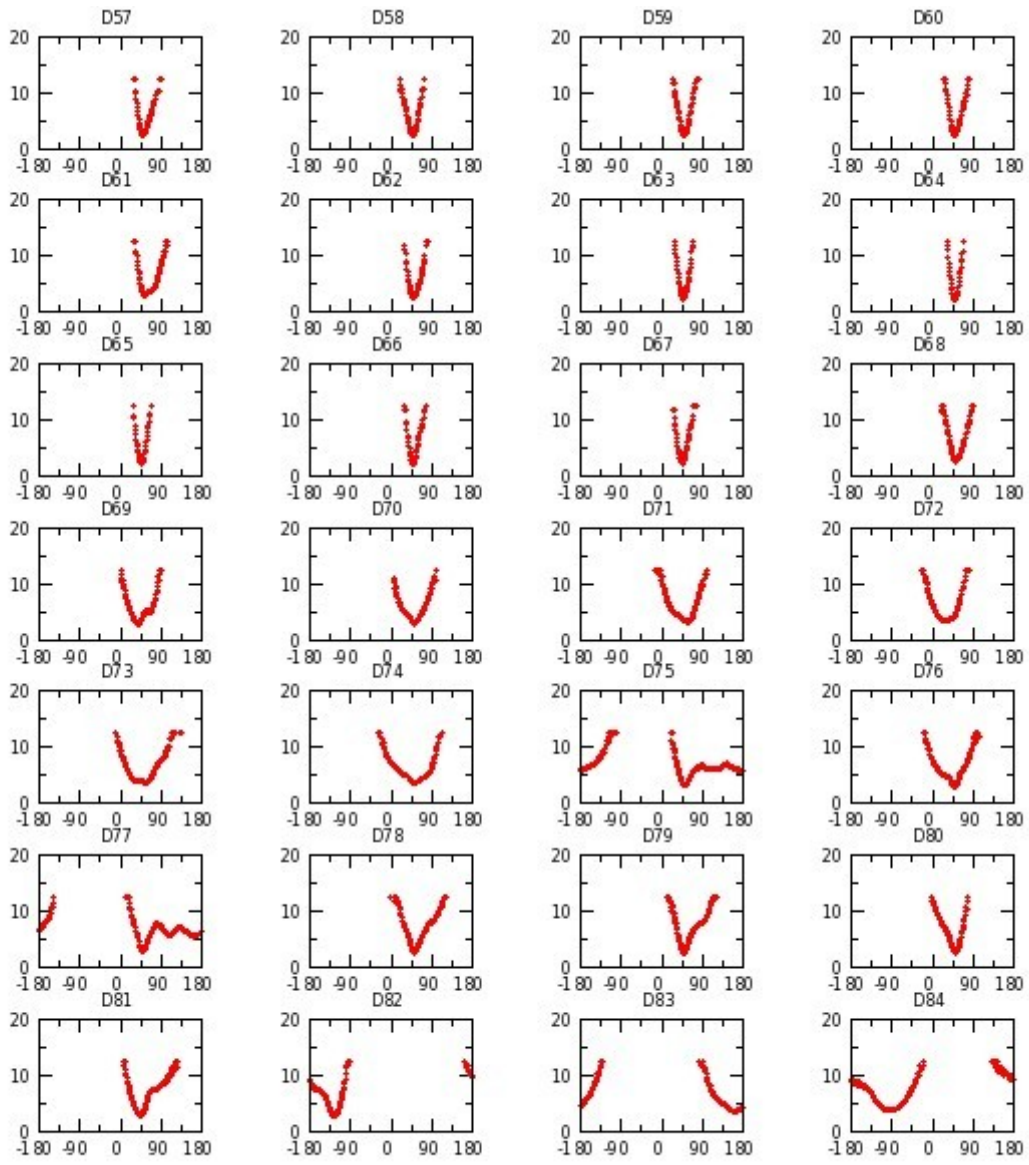


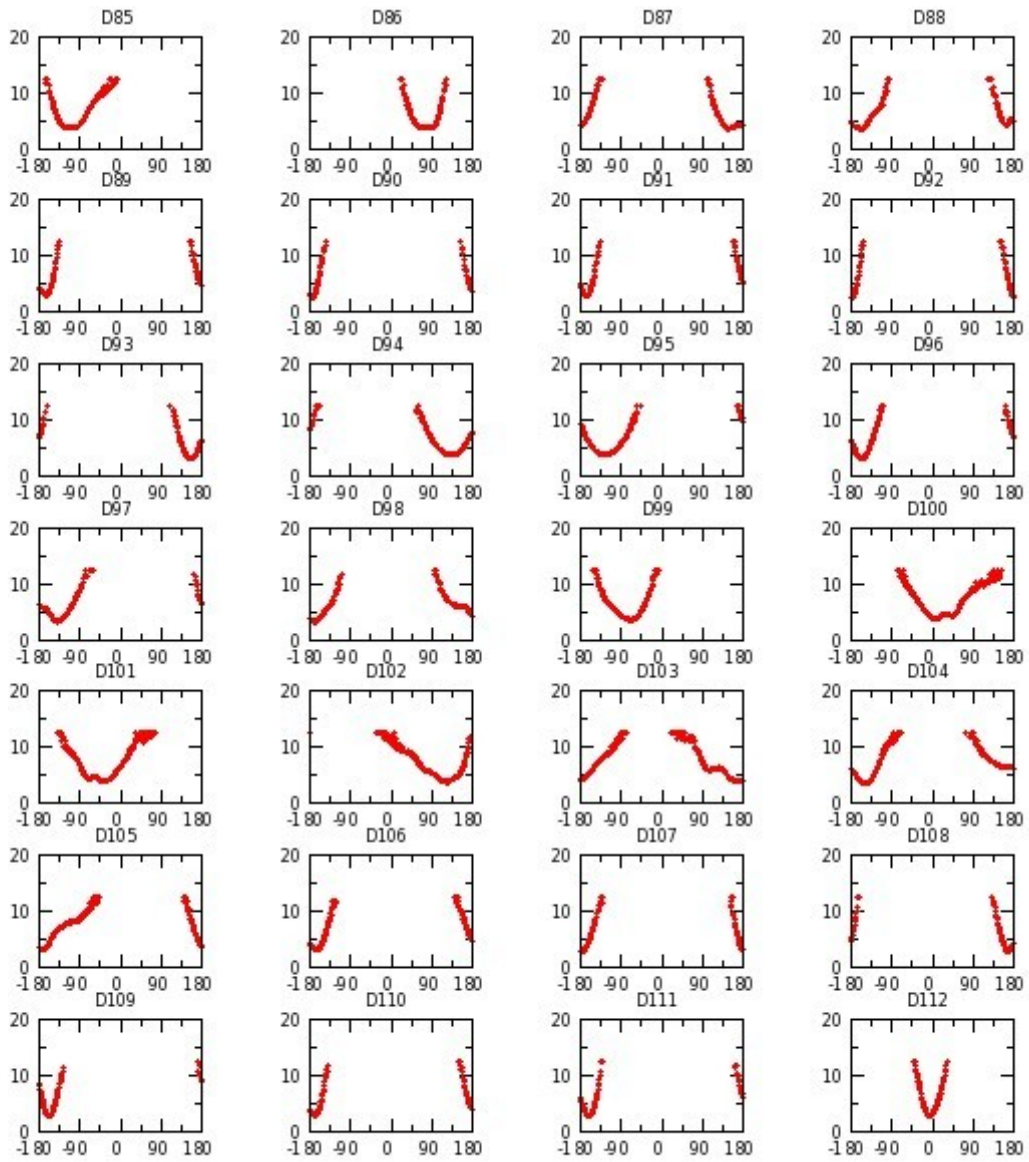


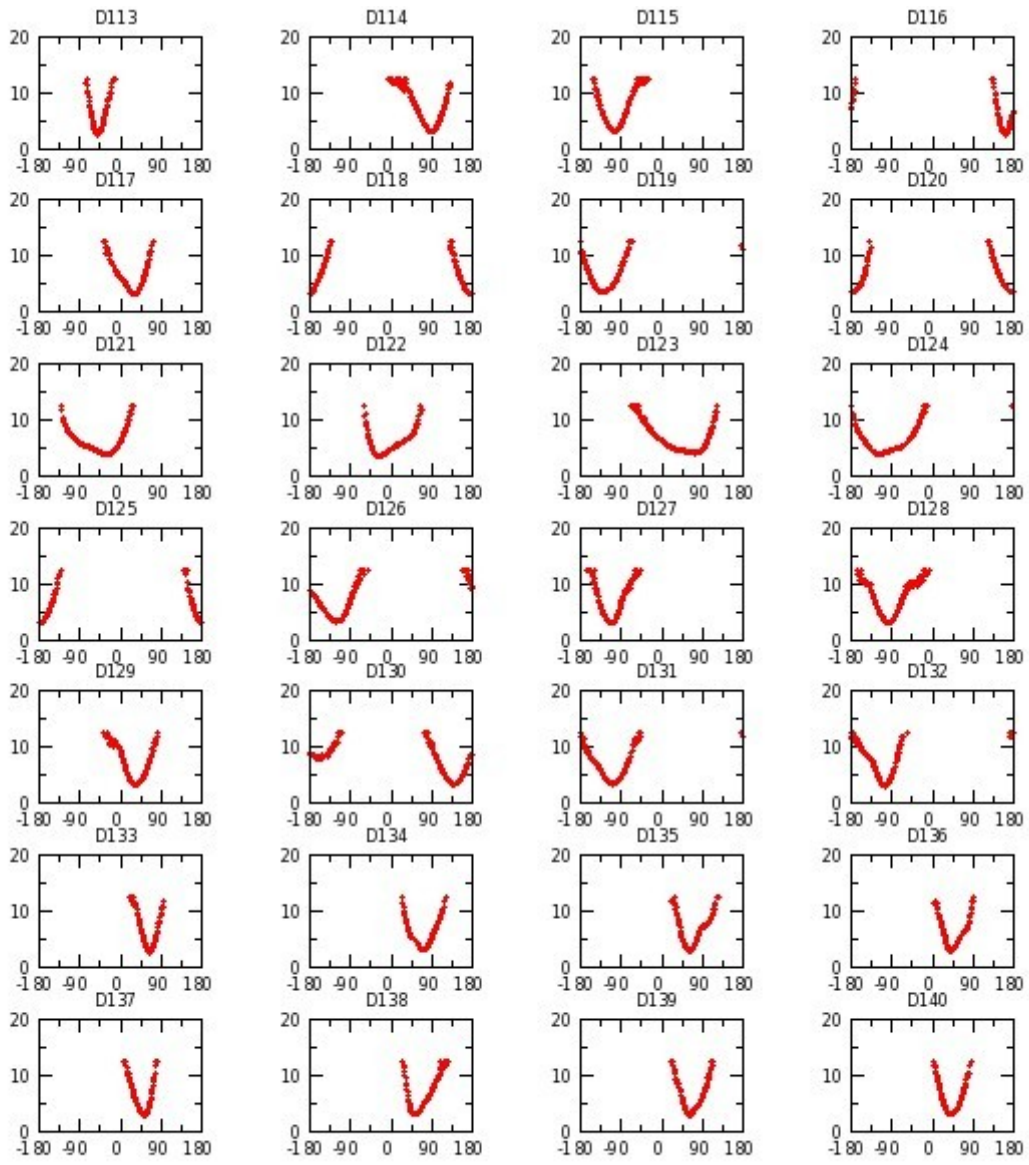
Annexe G 17 : H_NUaGAL réplique II

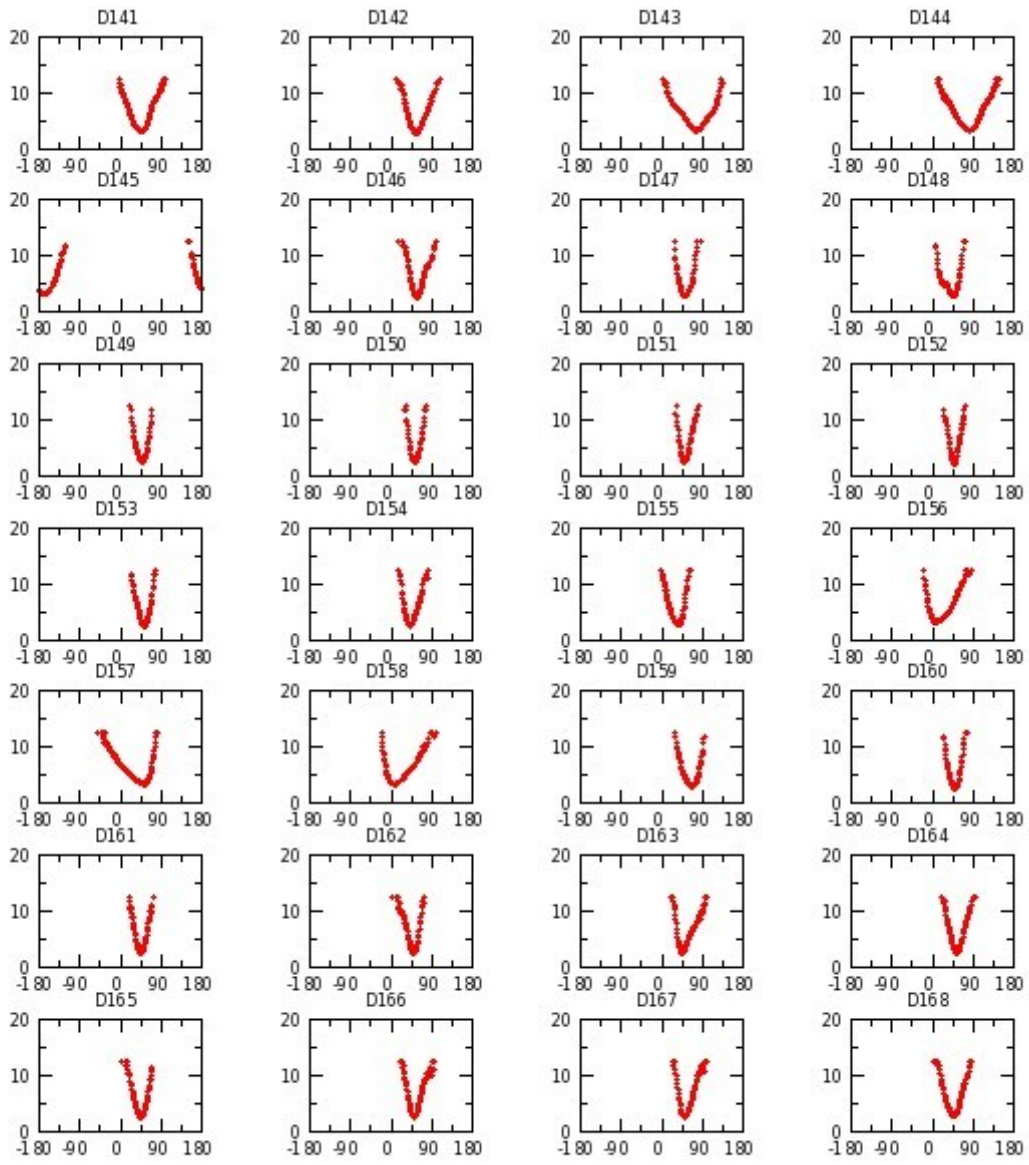


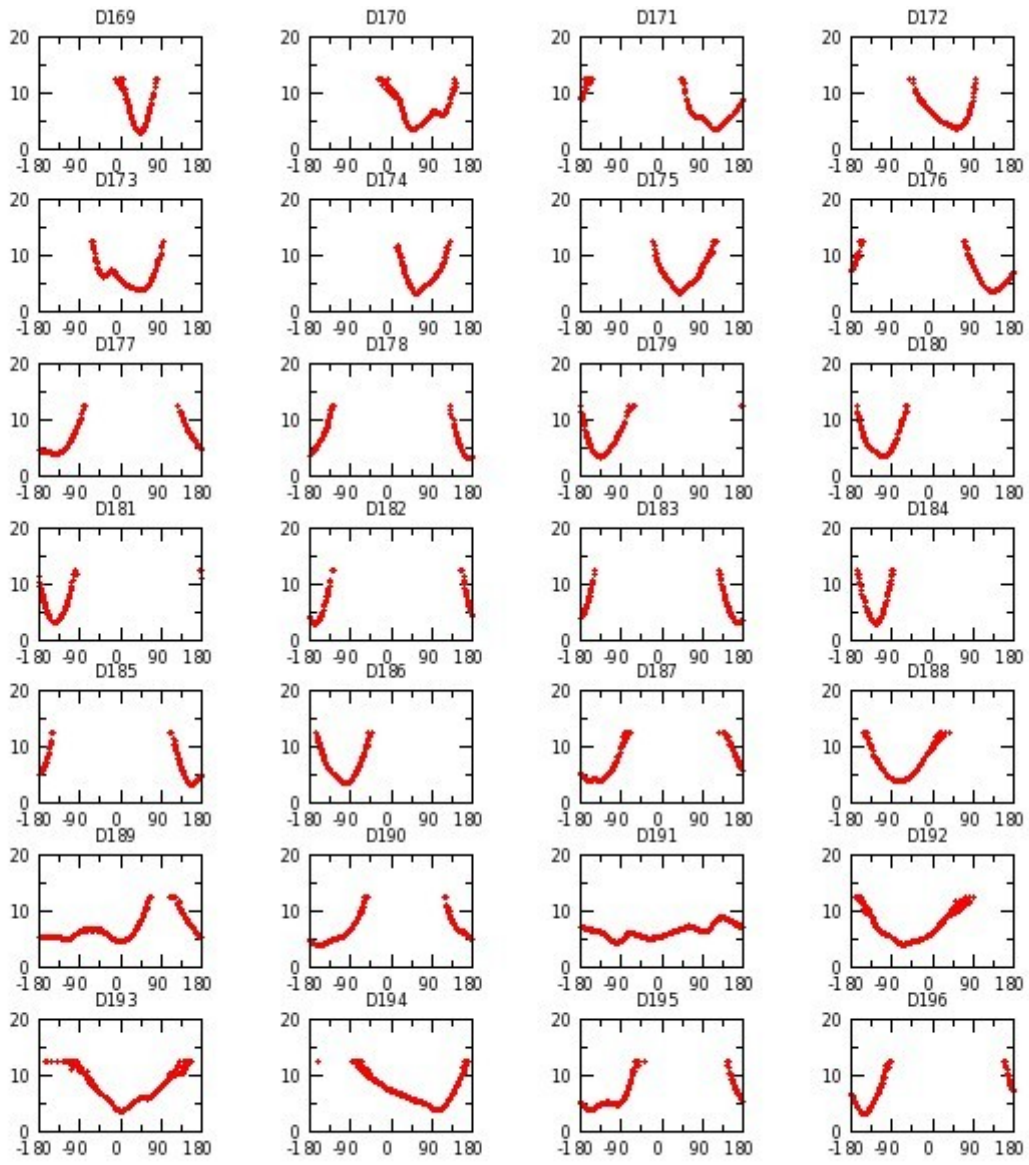


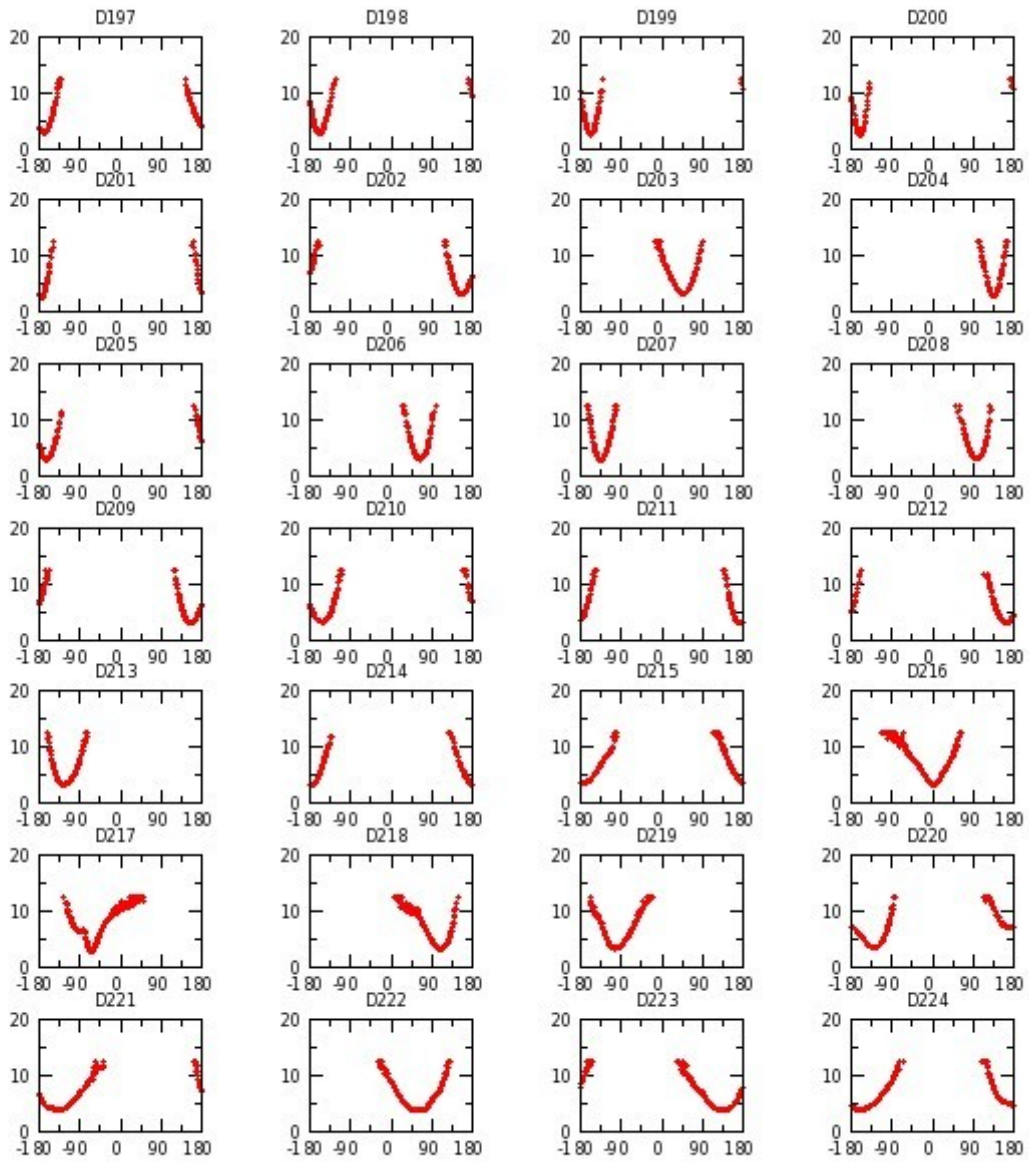


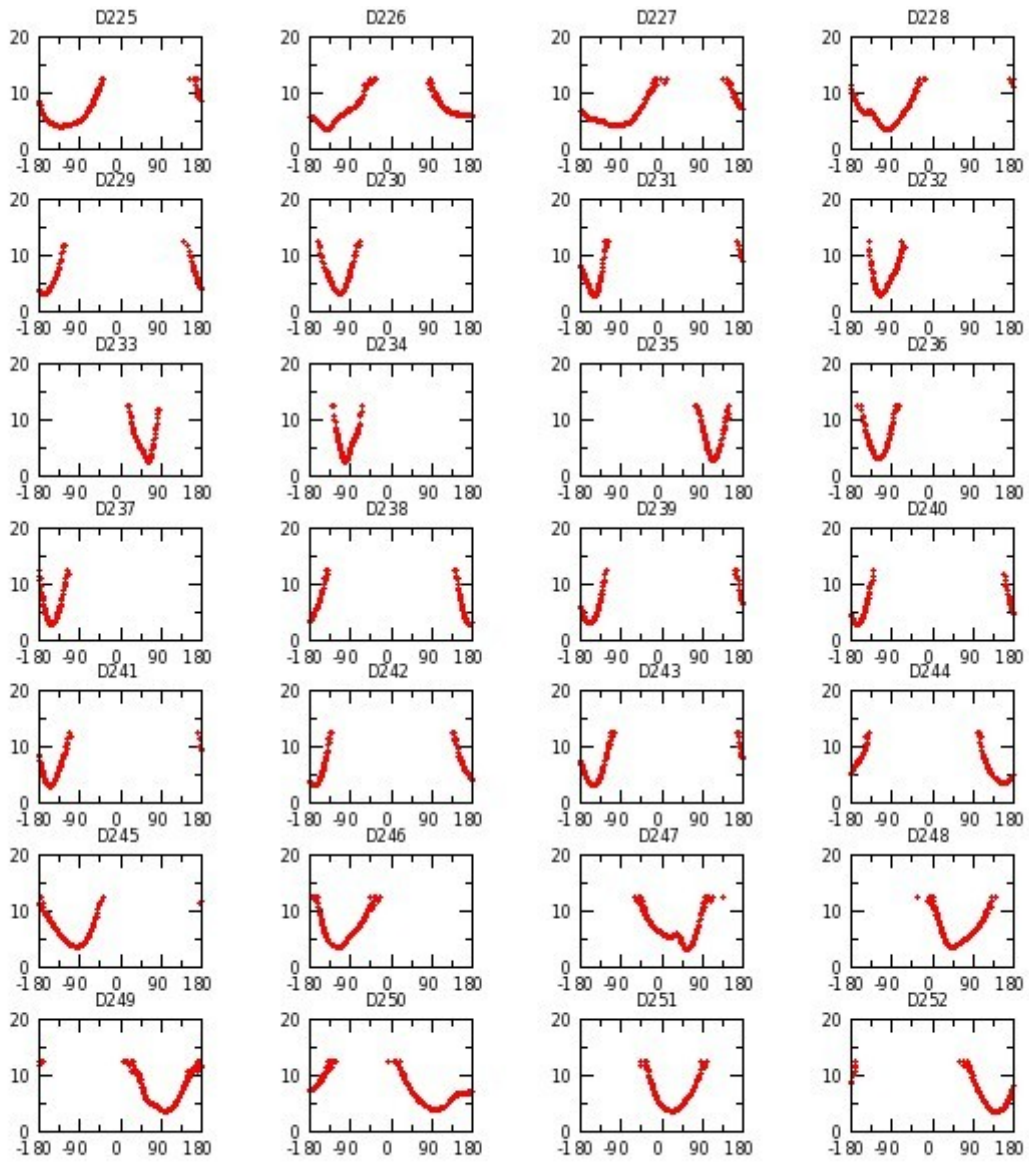


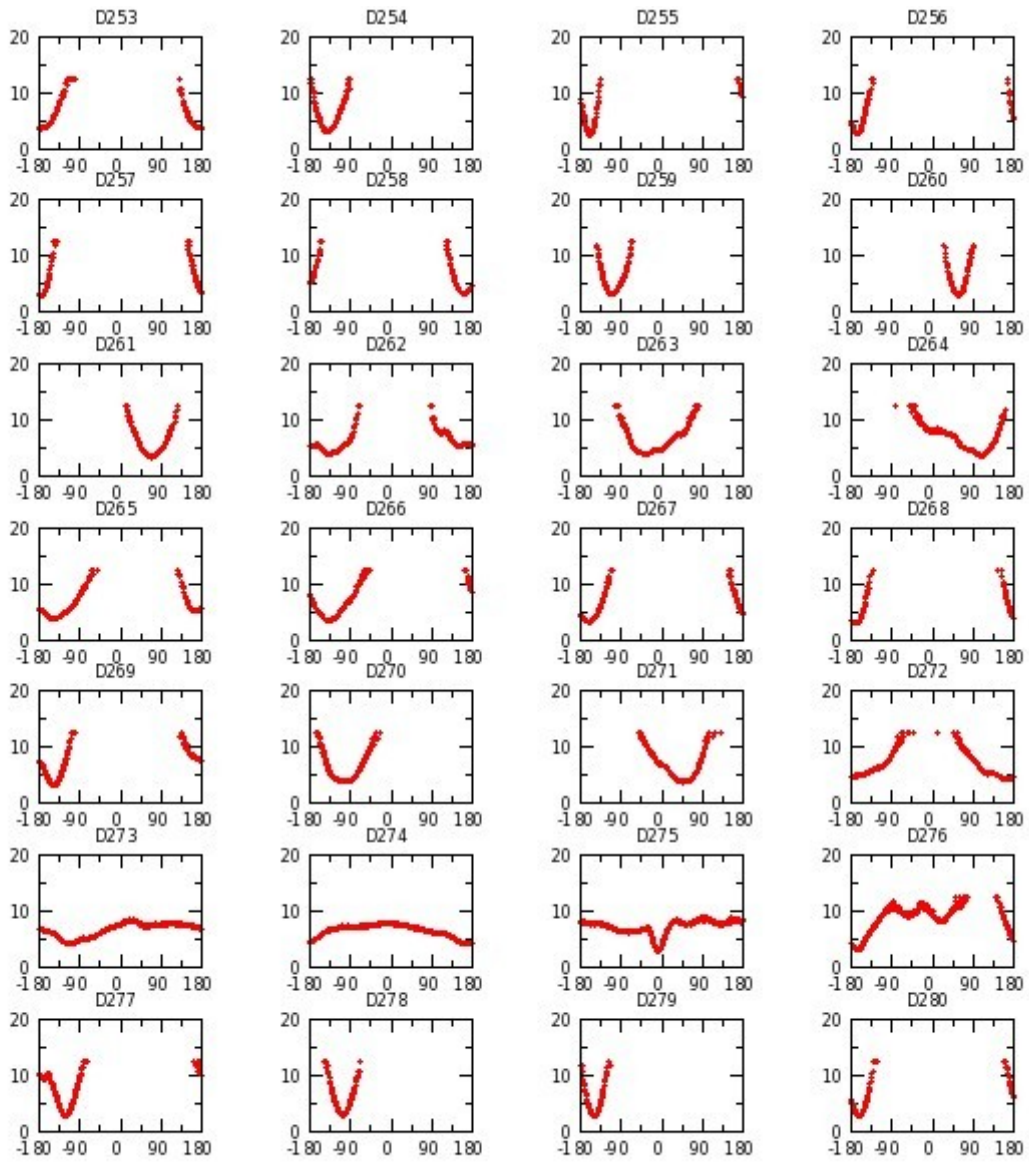


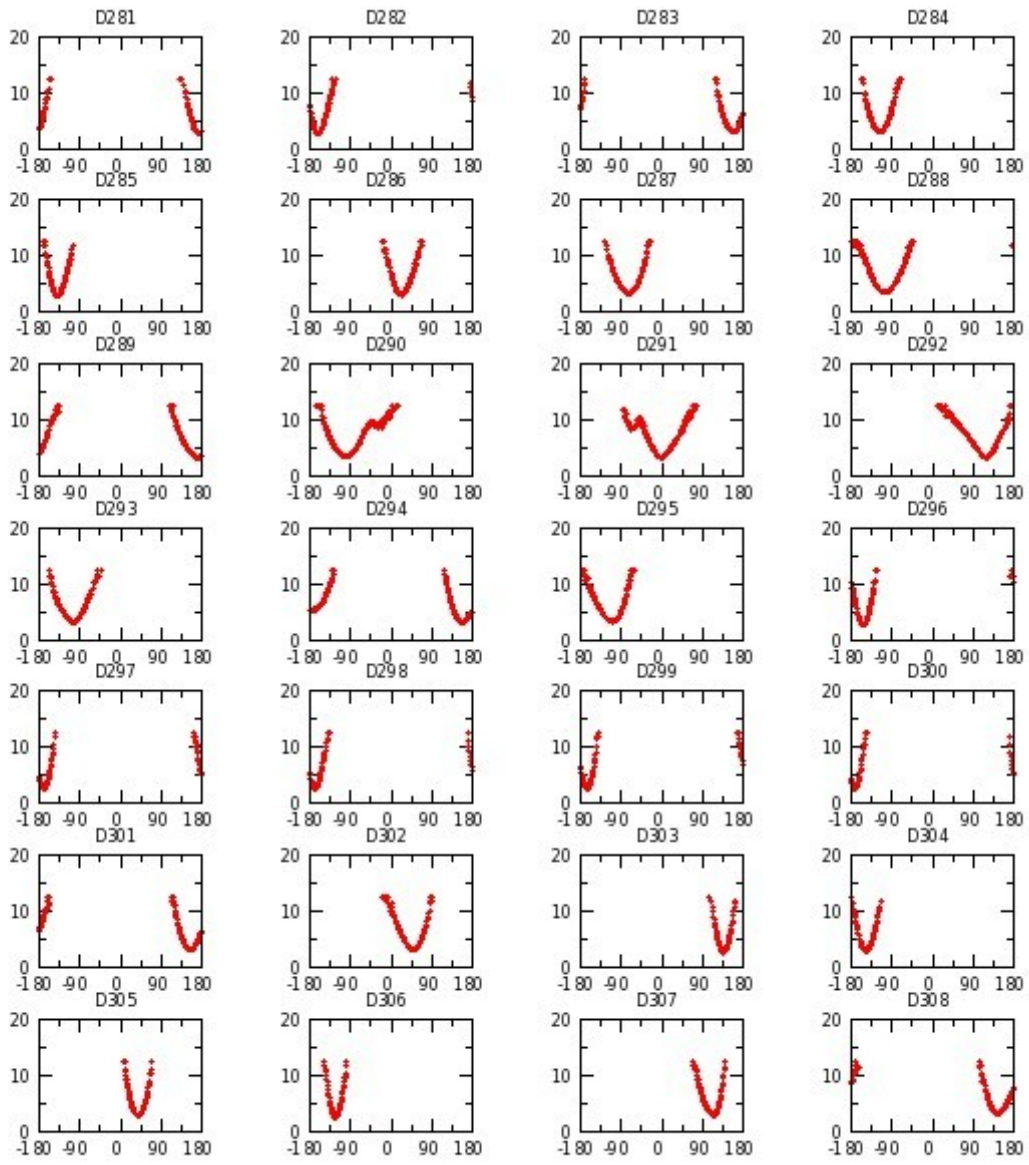


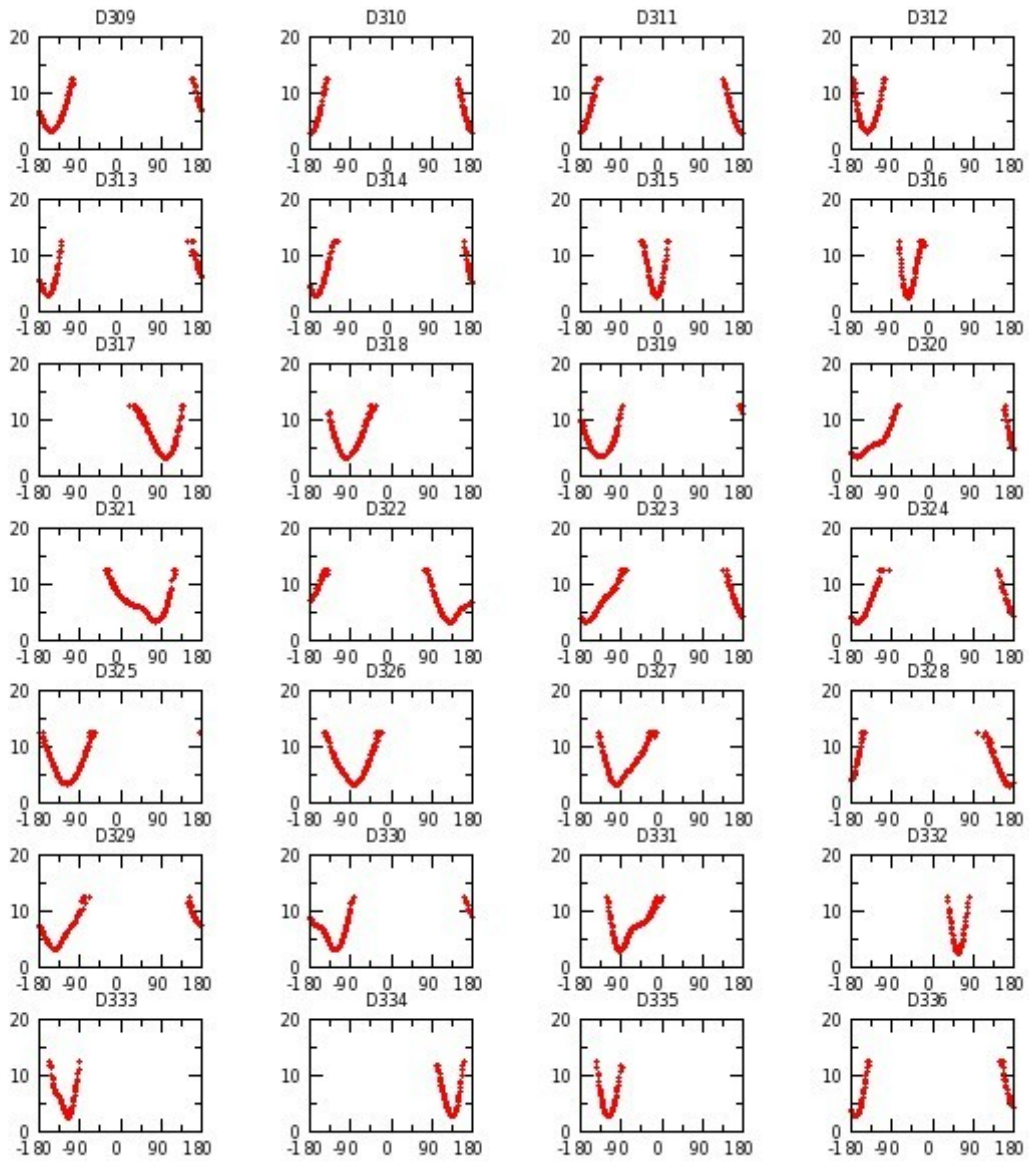


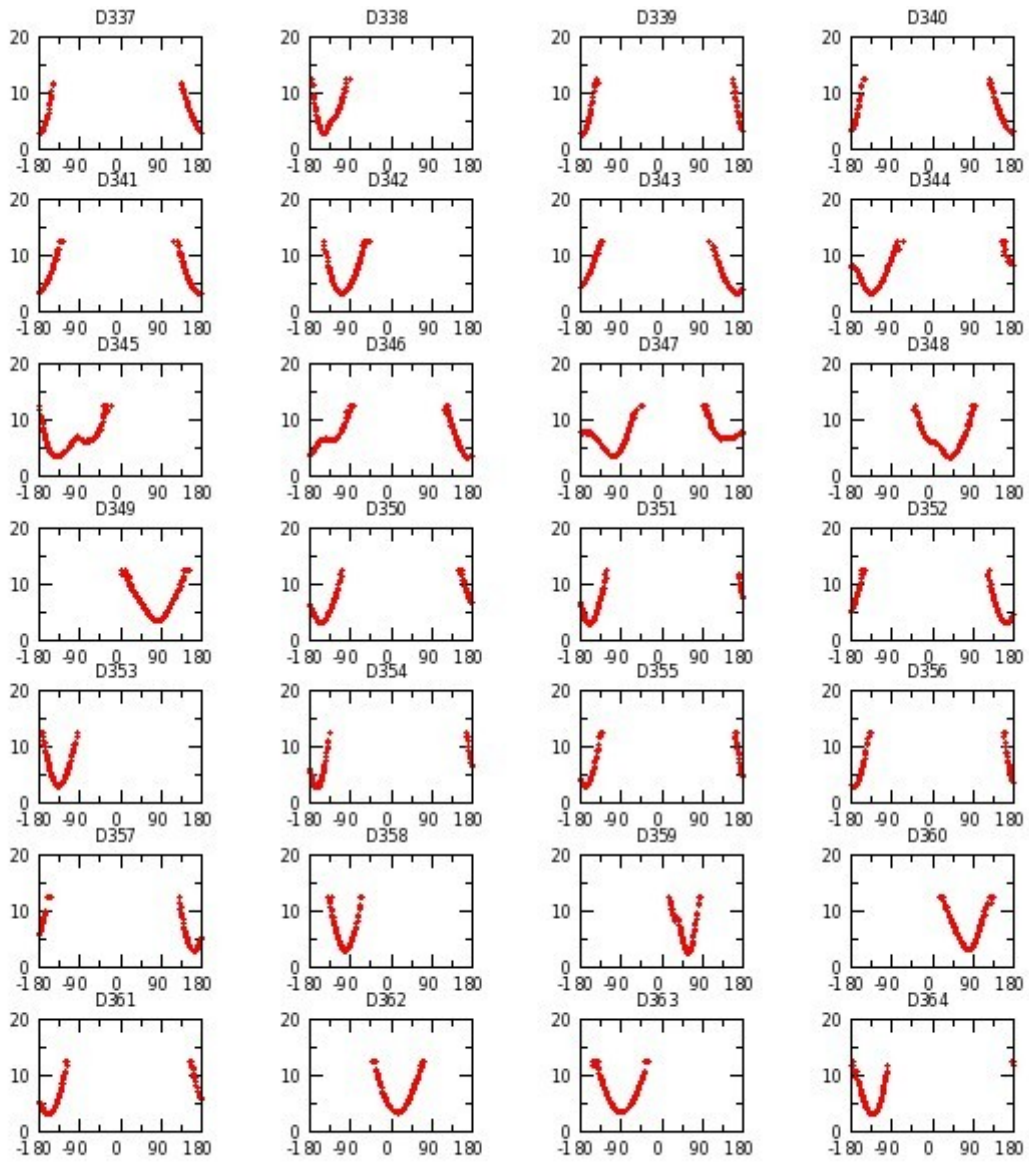


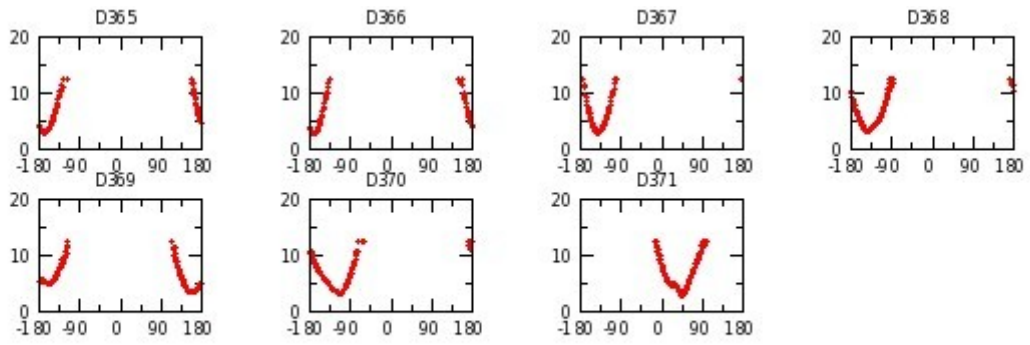




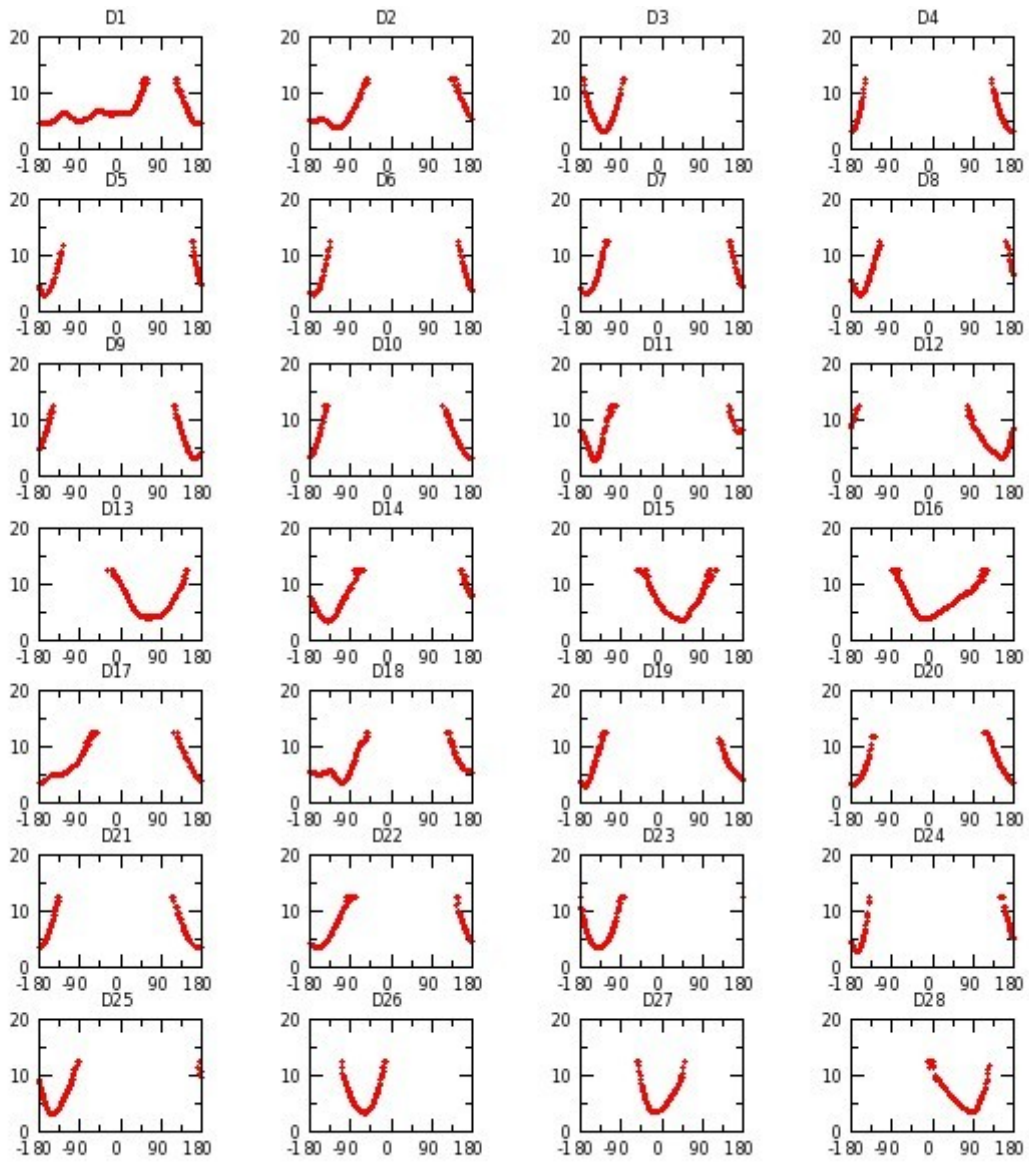


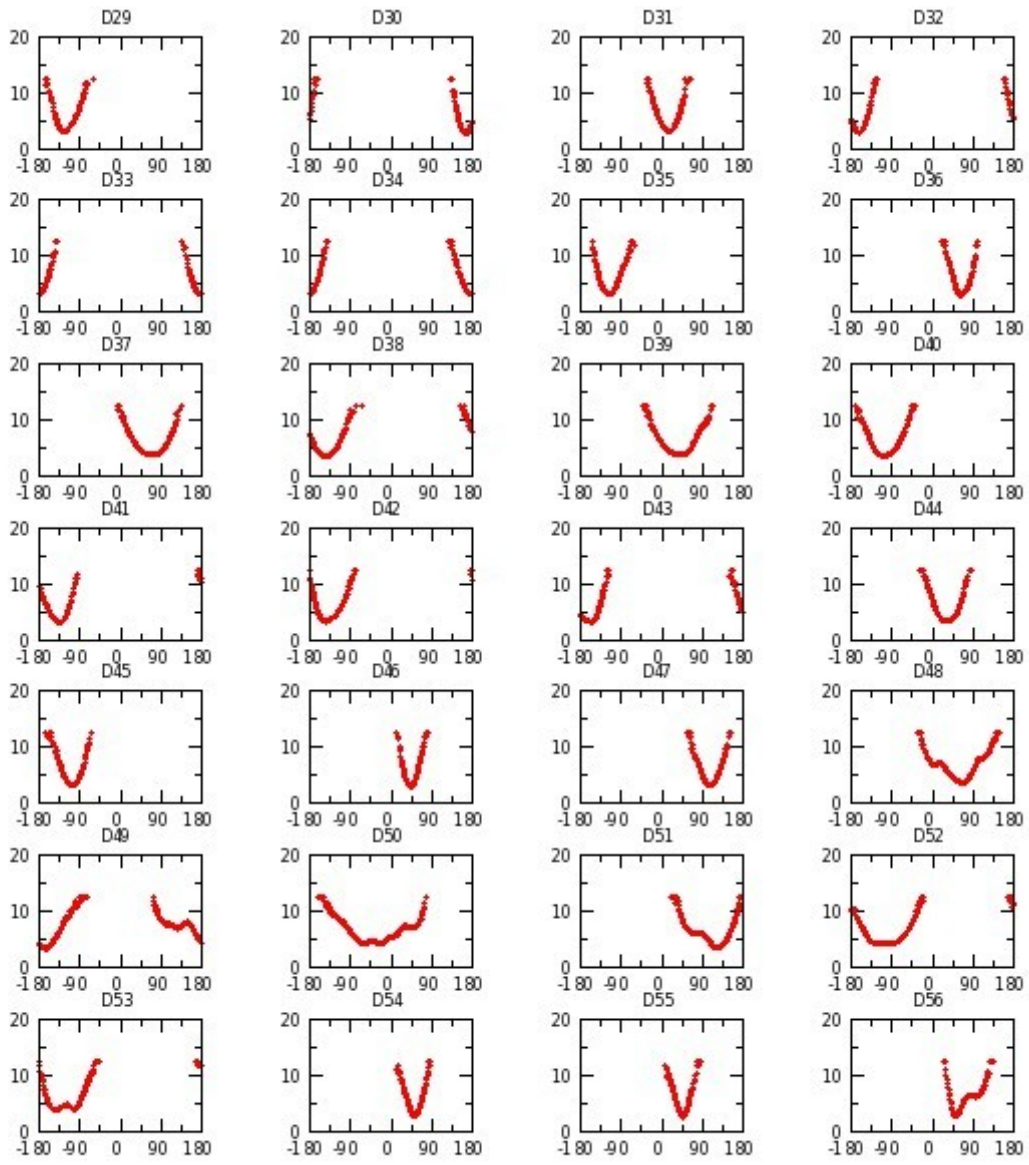


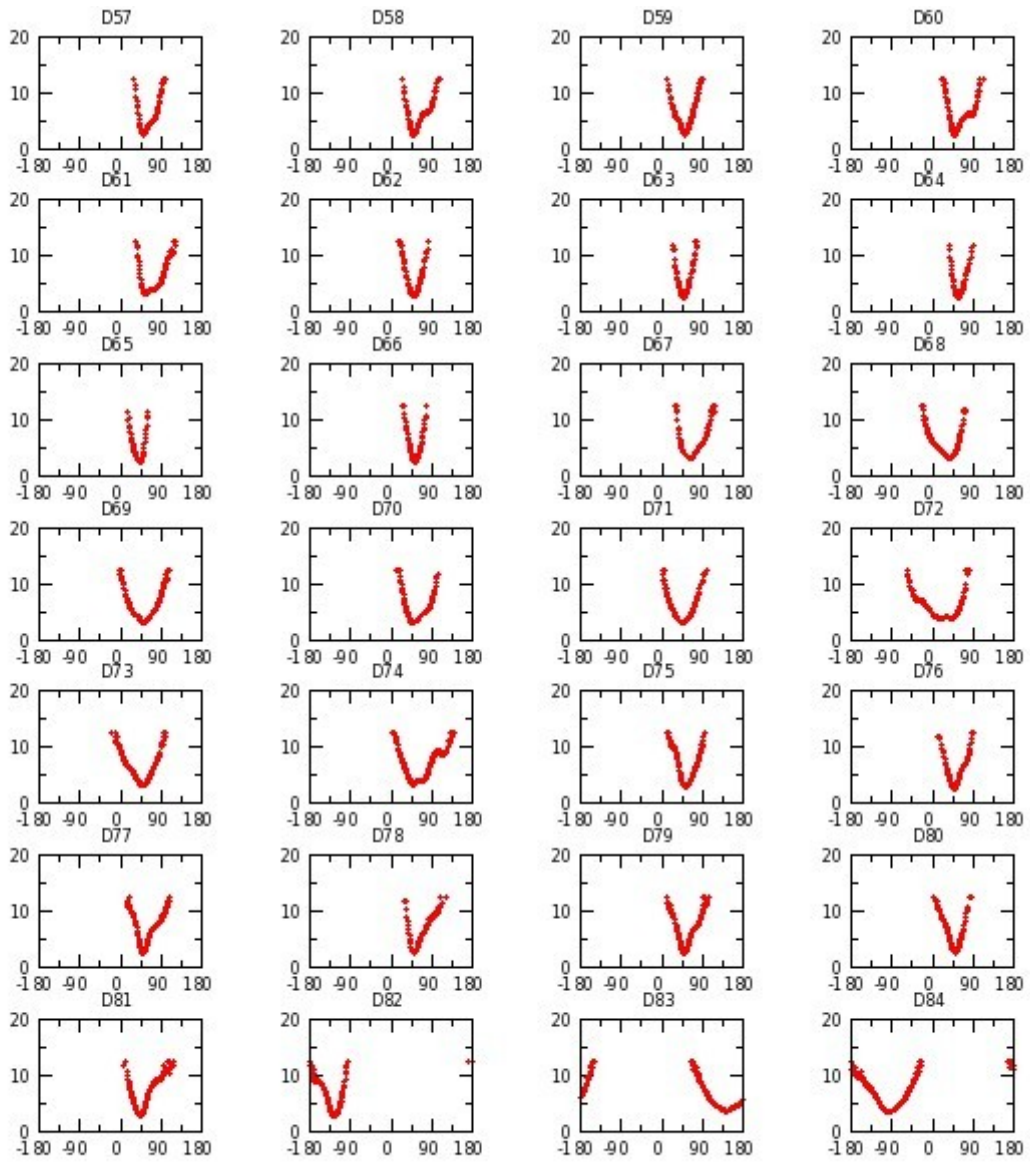


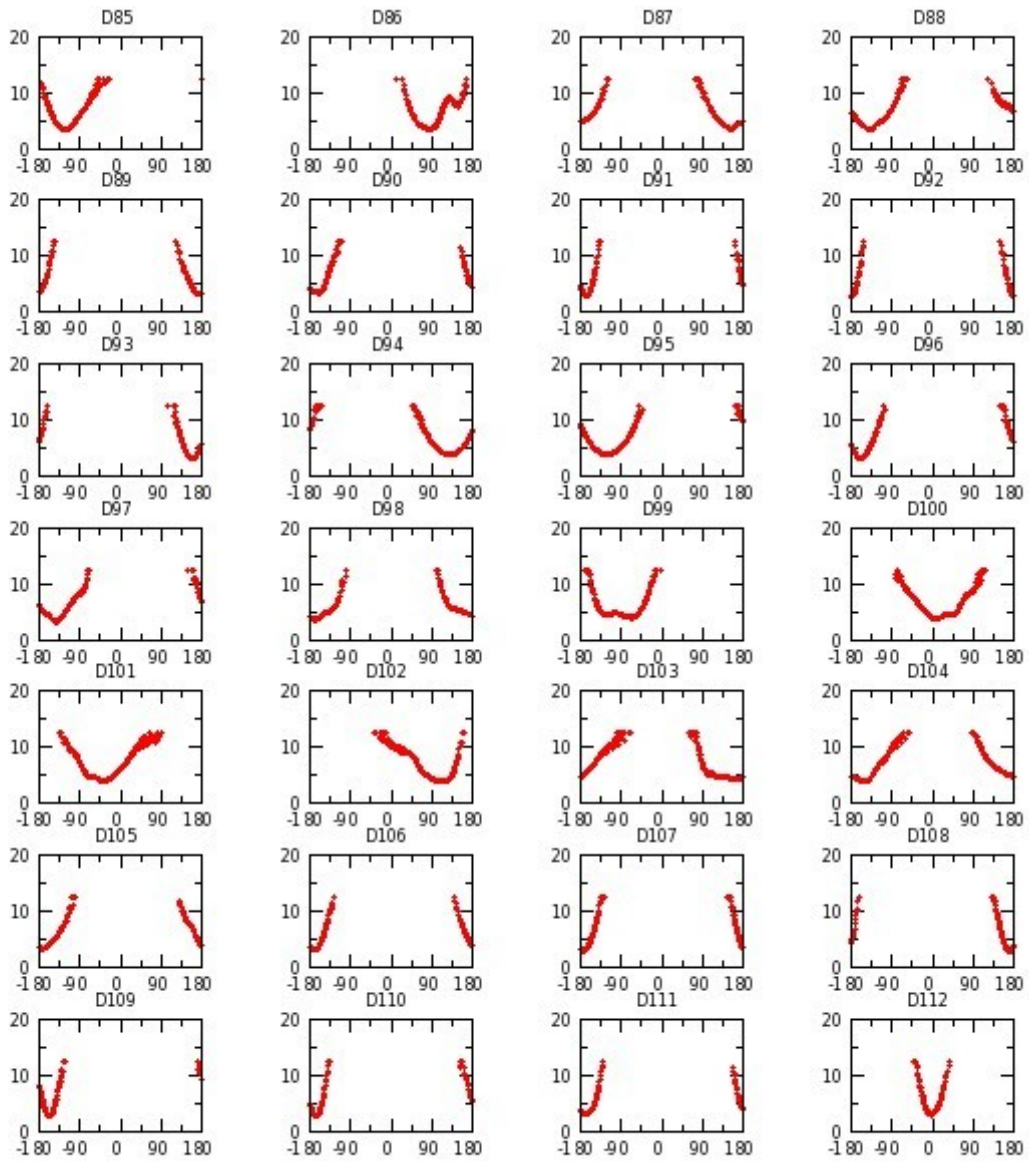


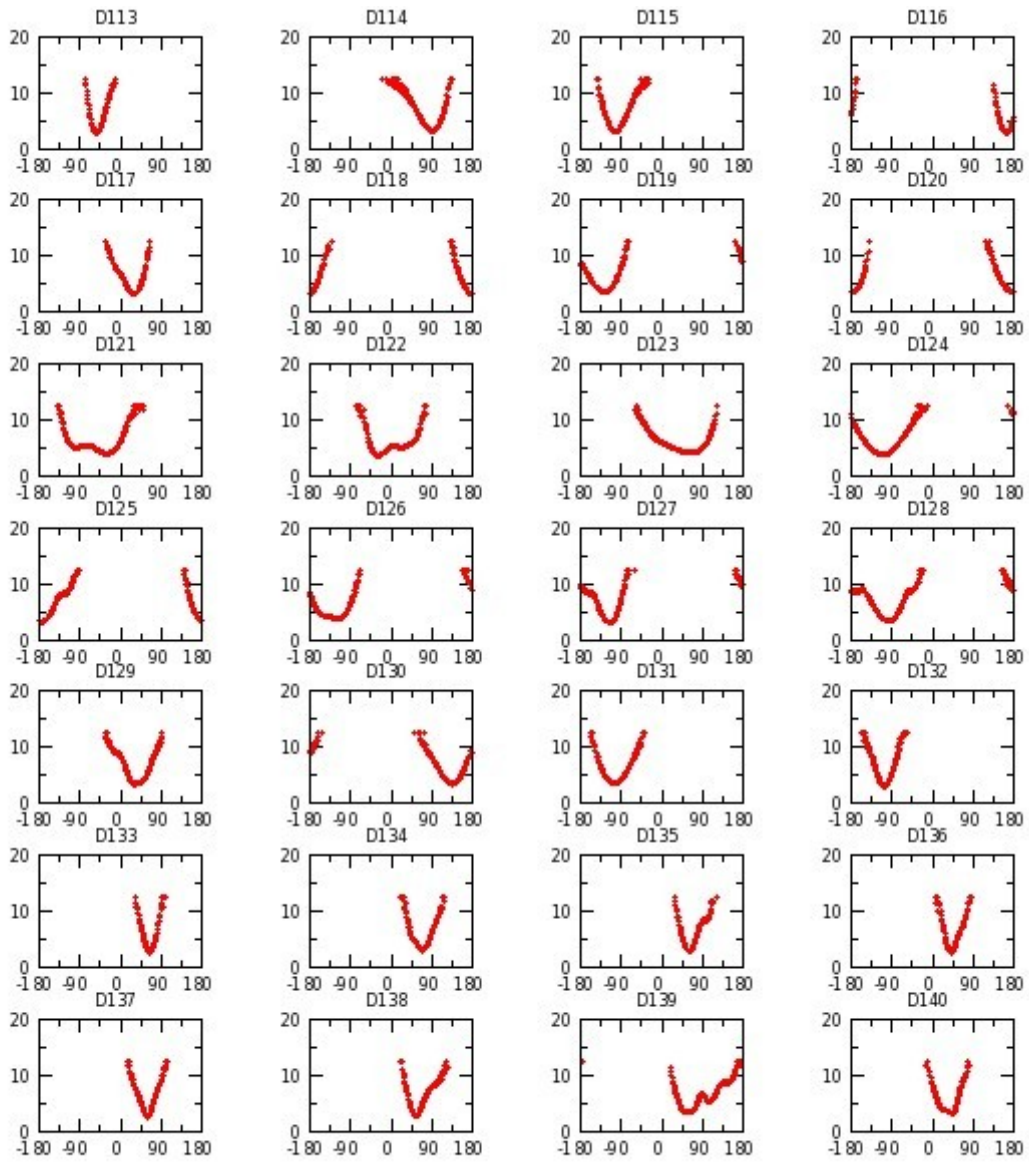
Annexe G 18 : H_NUaGAL réplique III

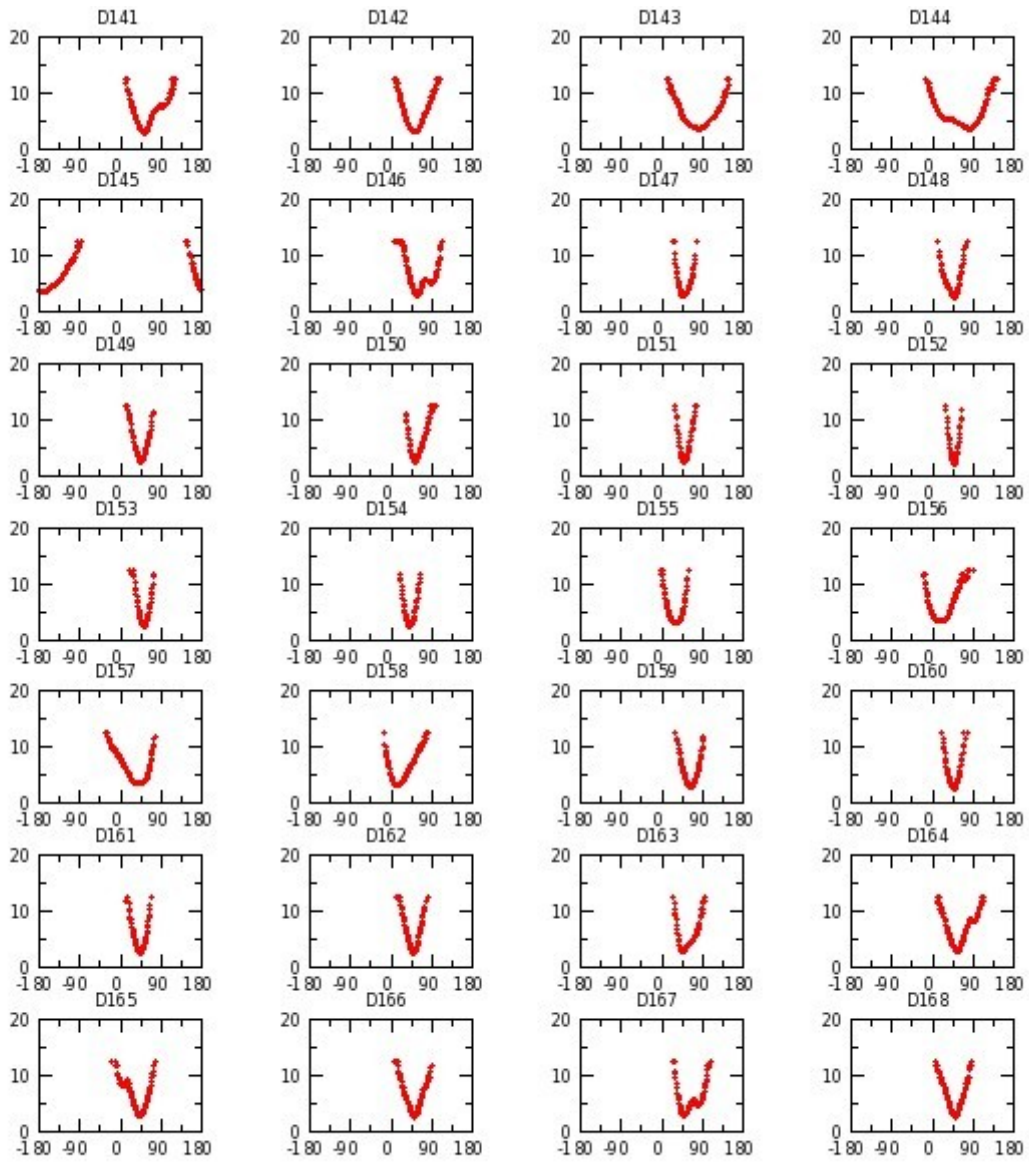


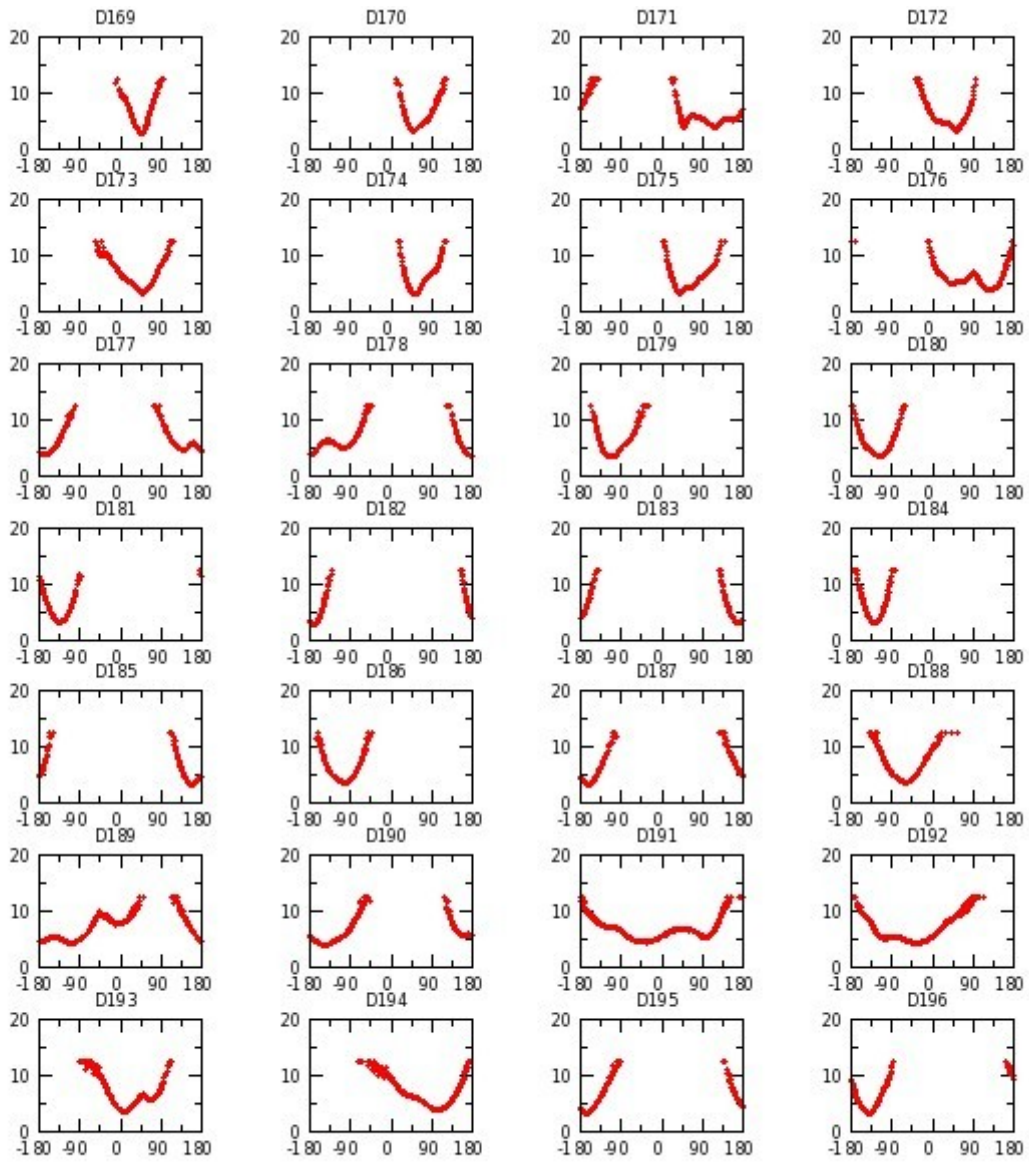


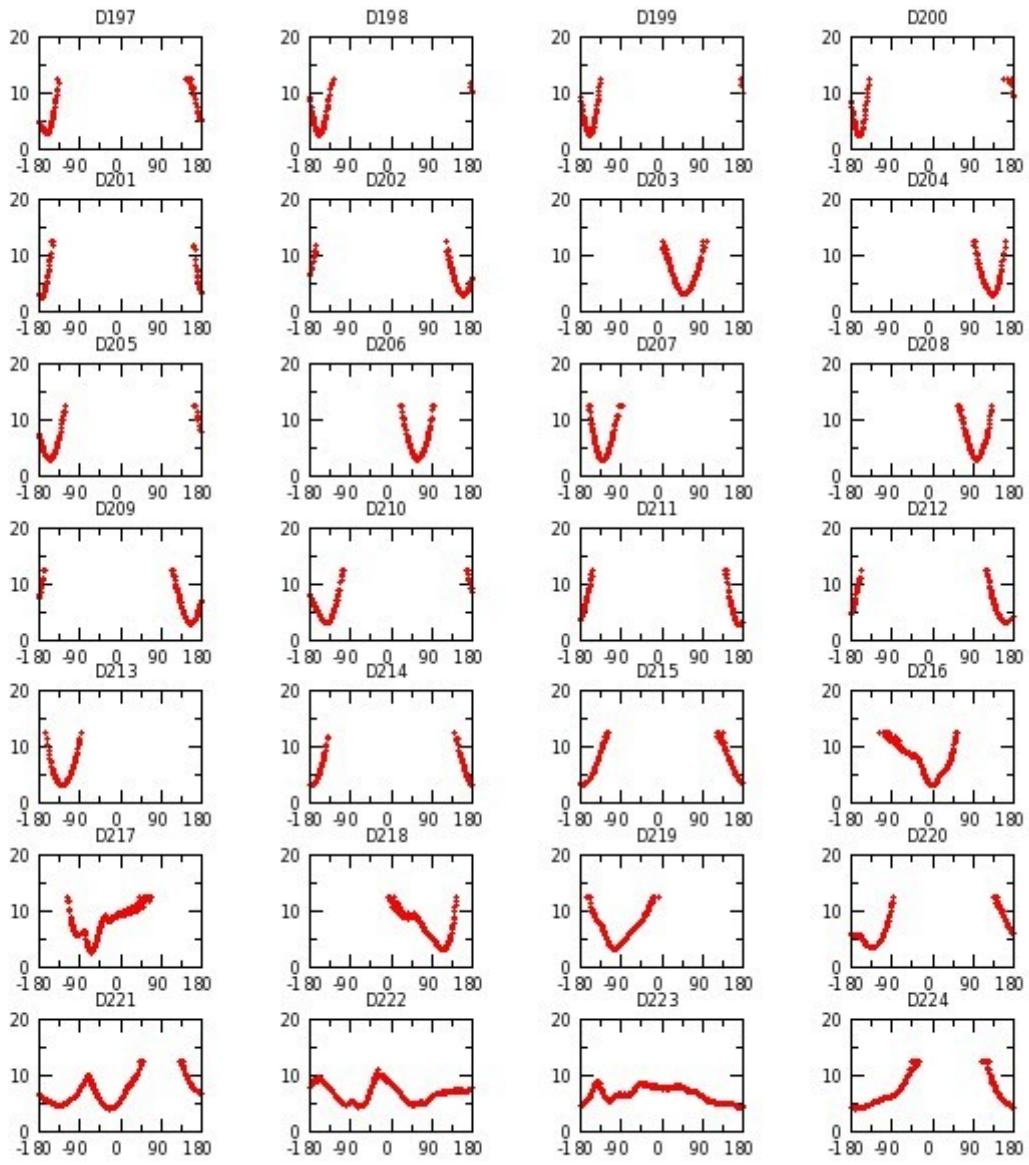


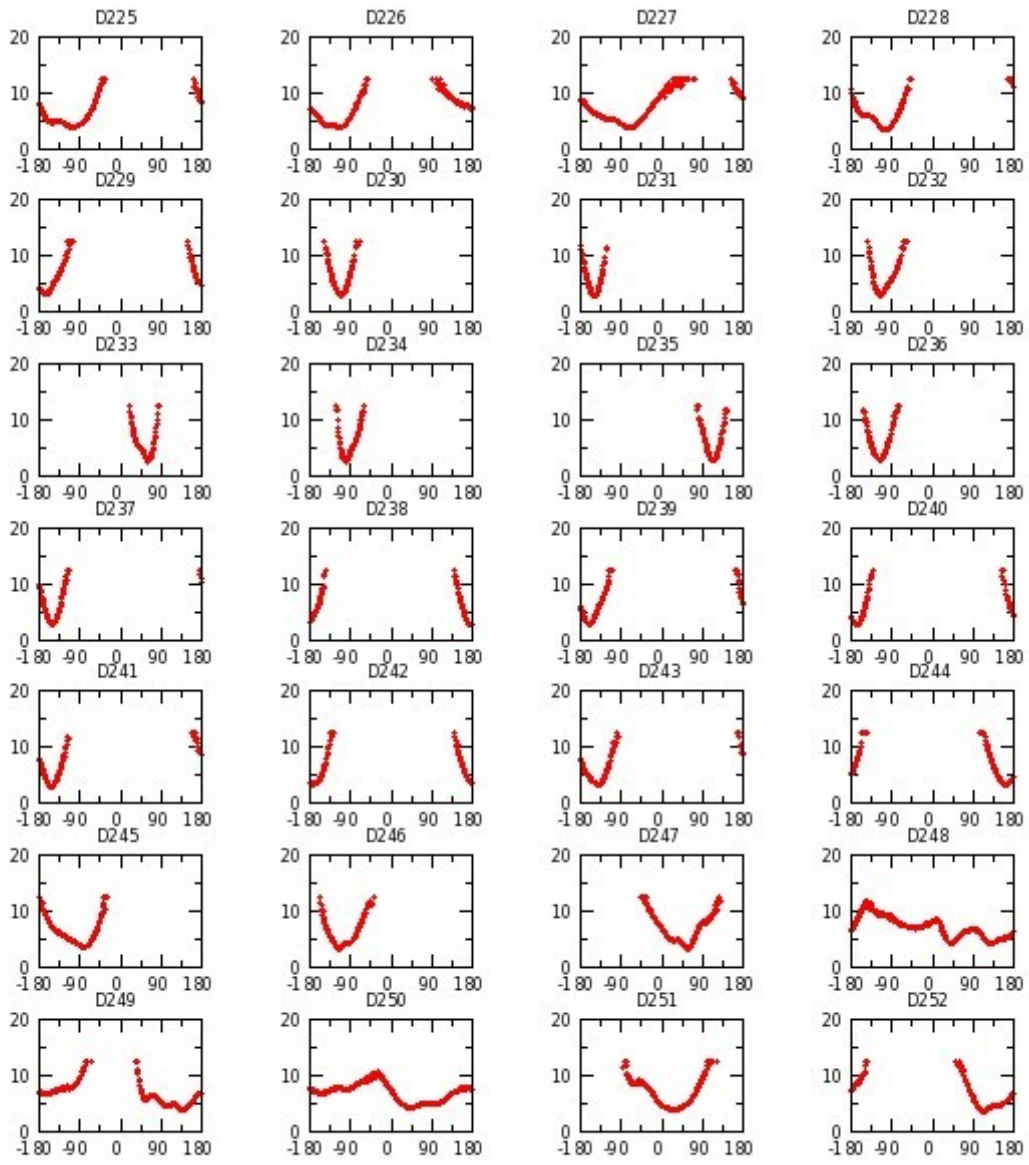


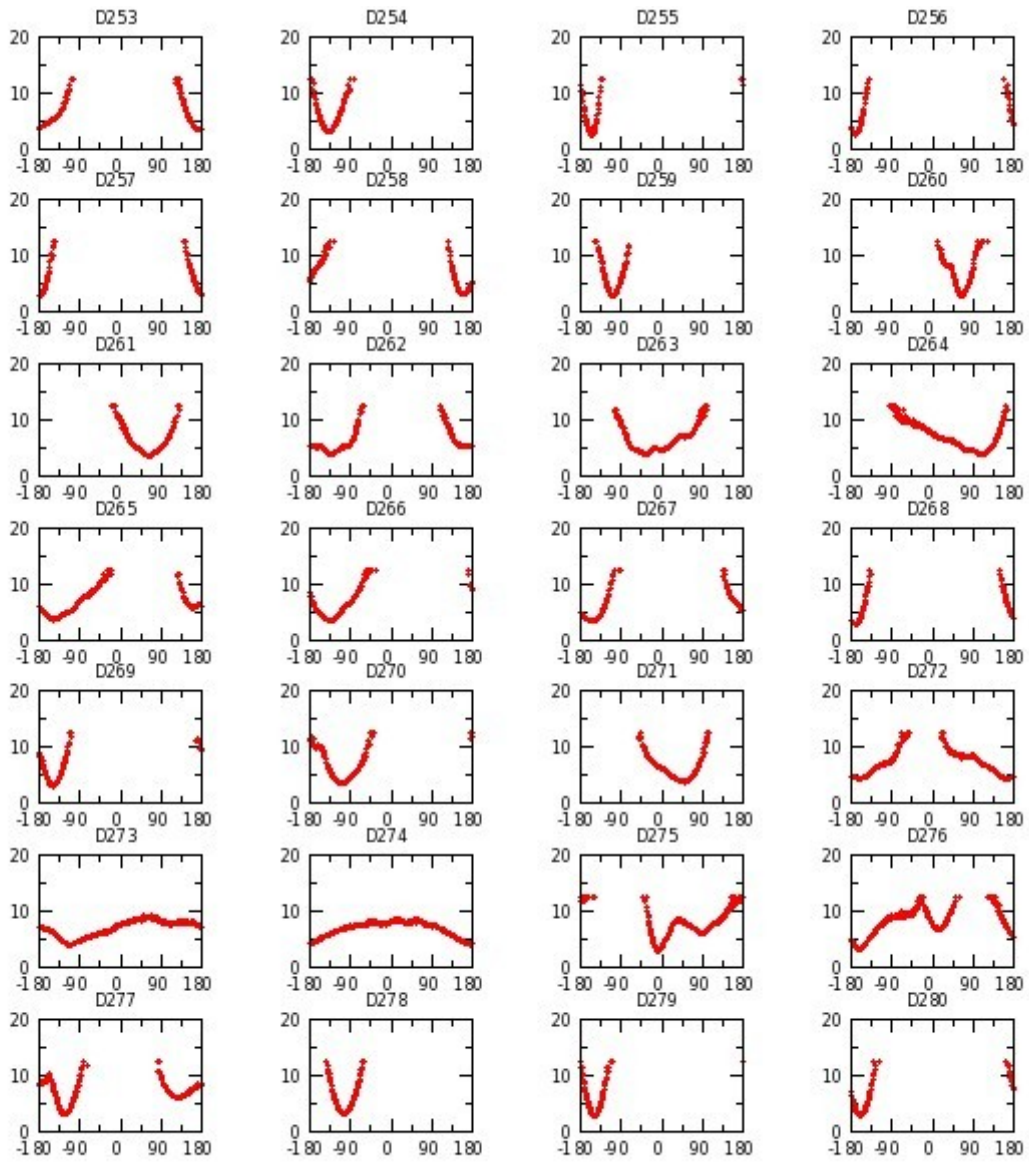


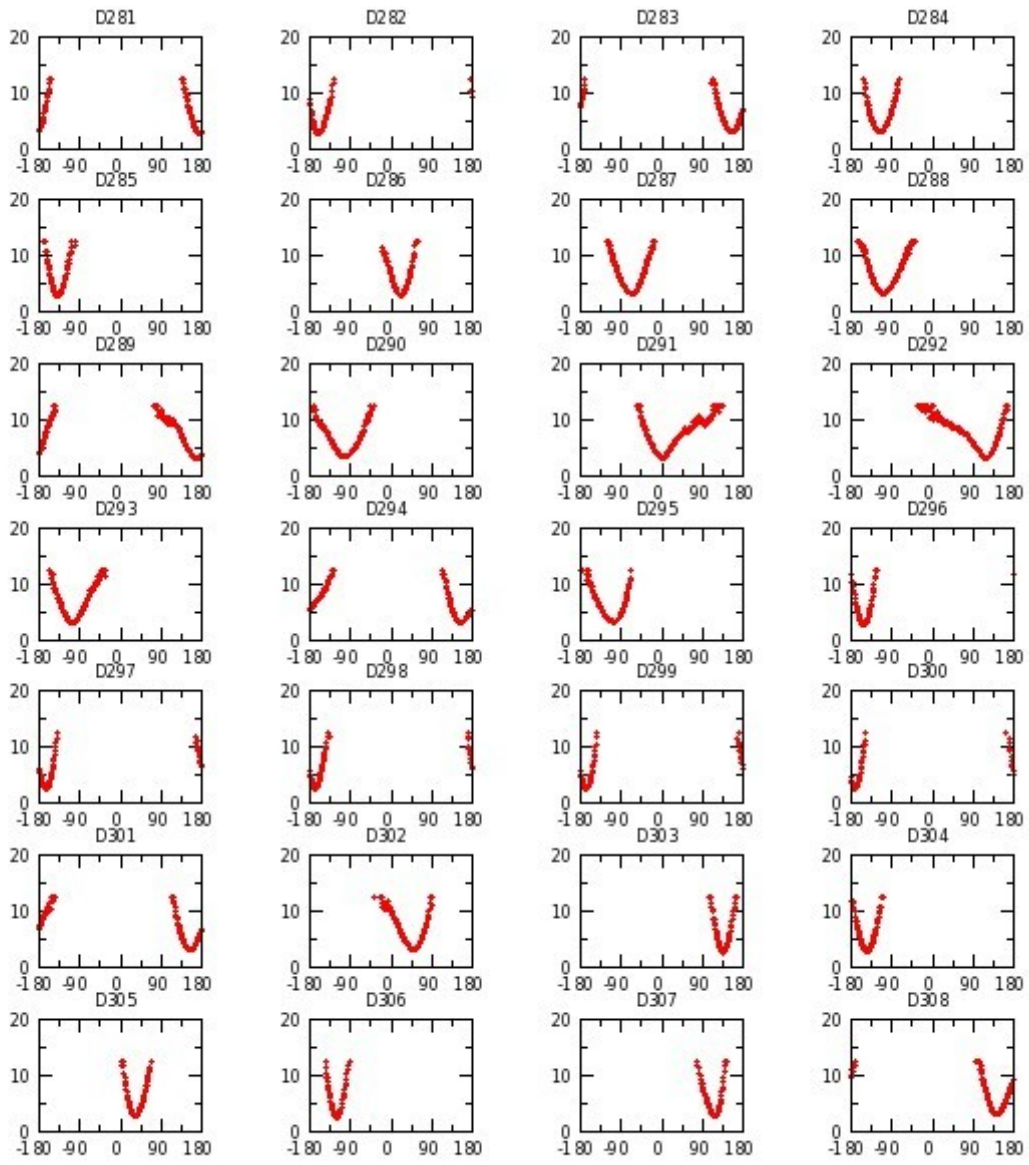


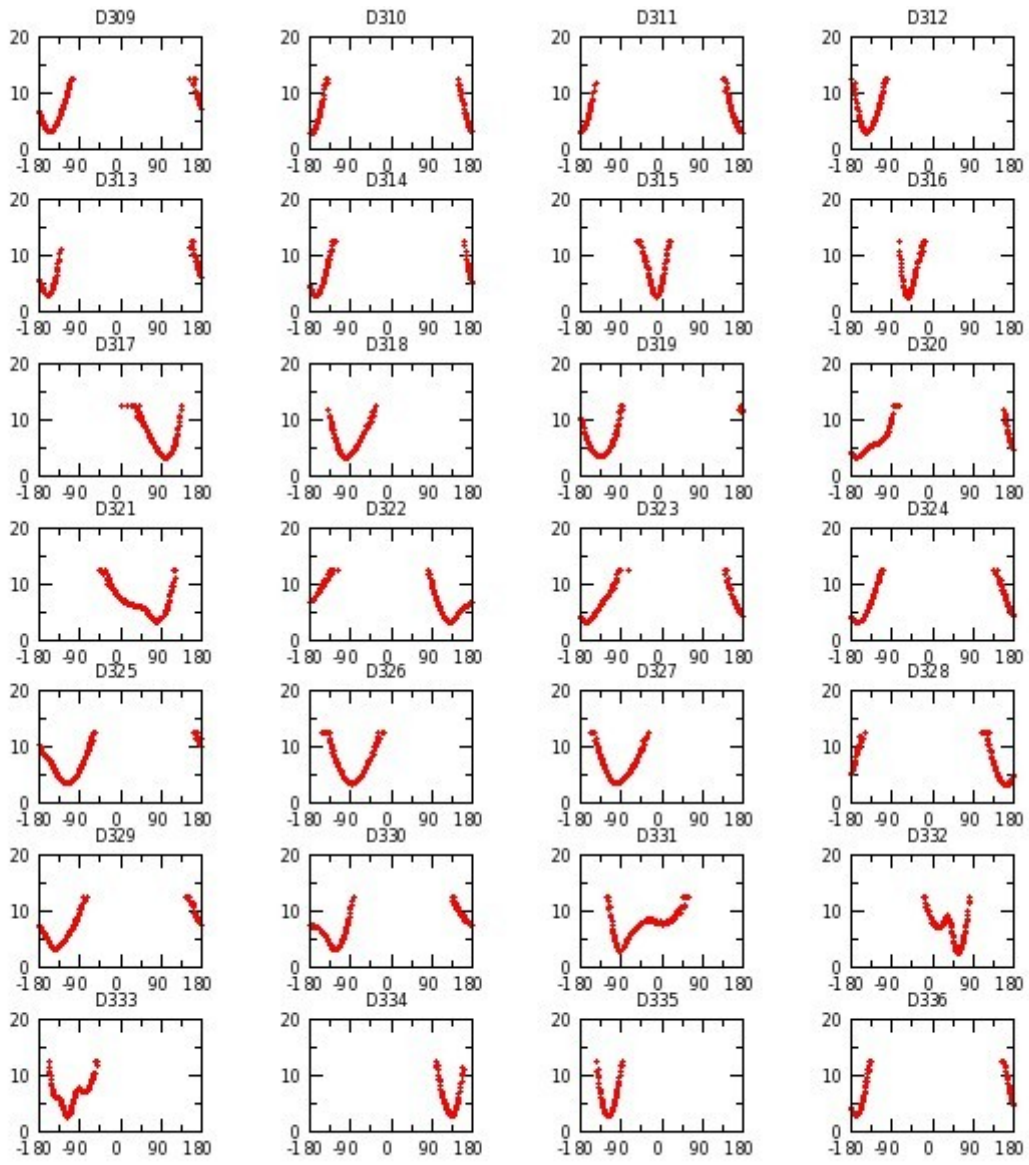


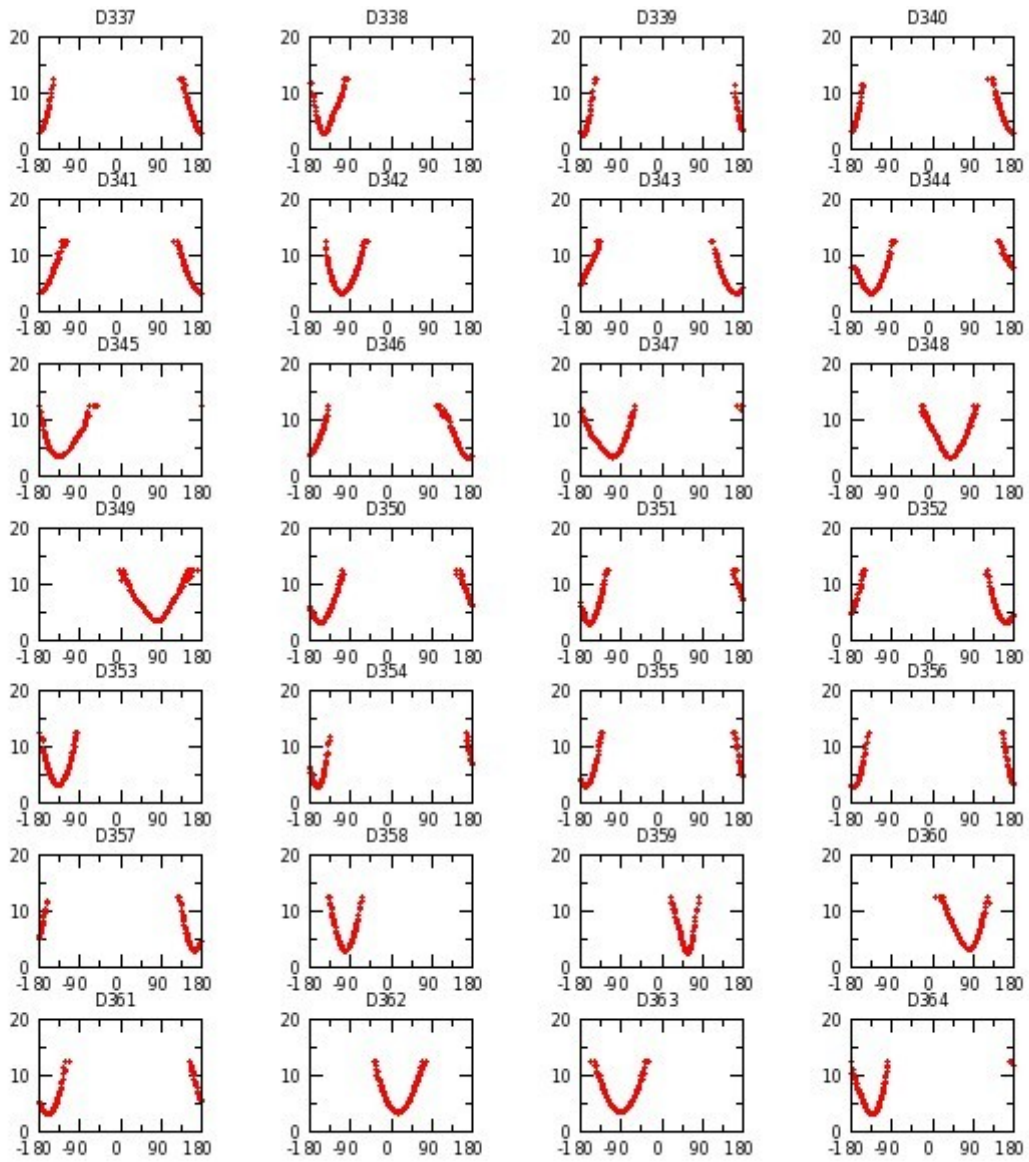


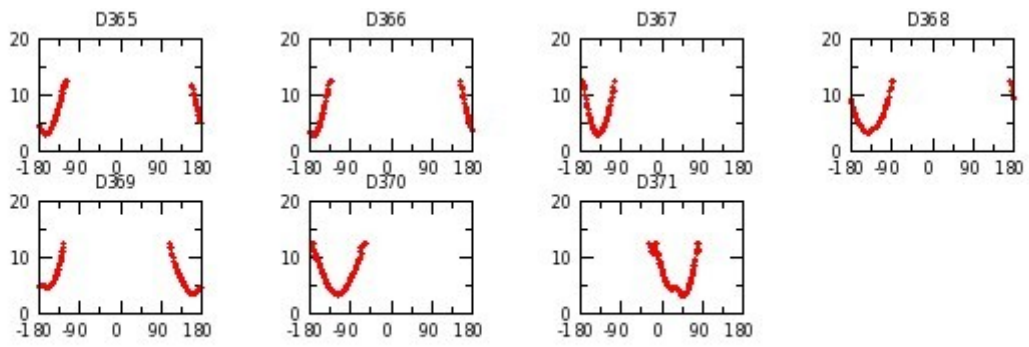




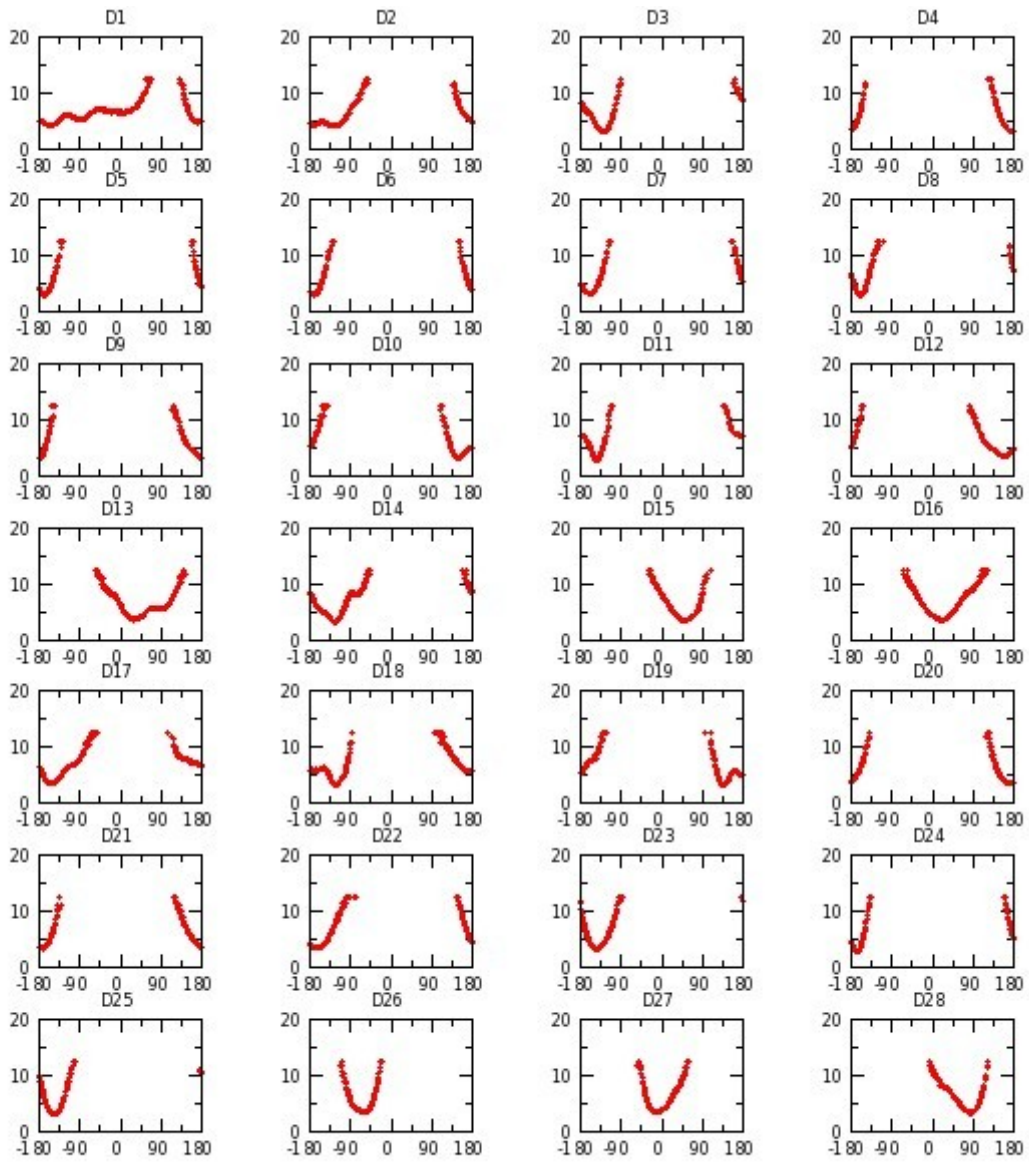


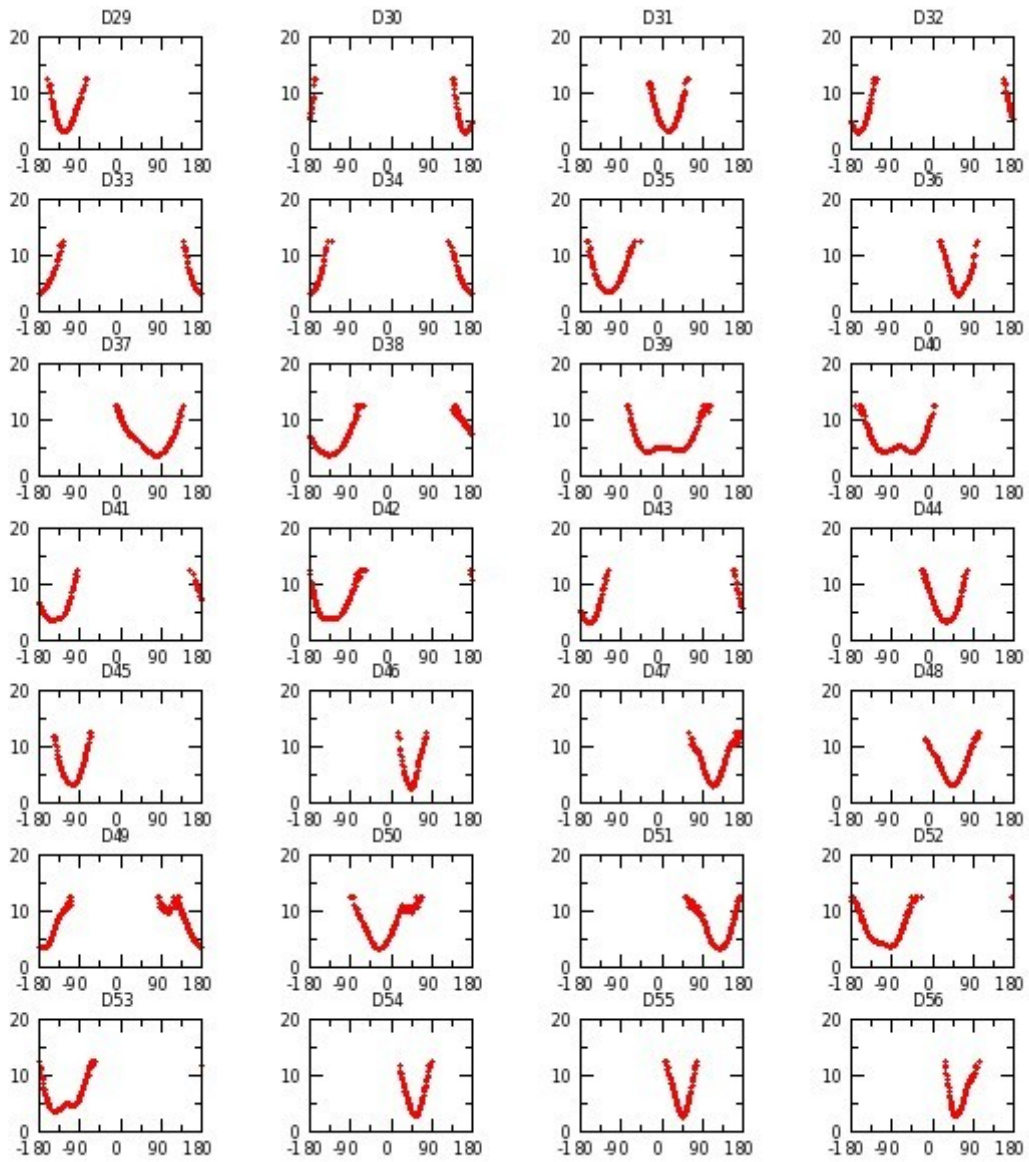


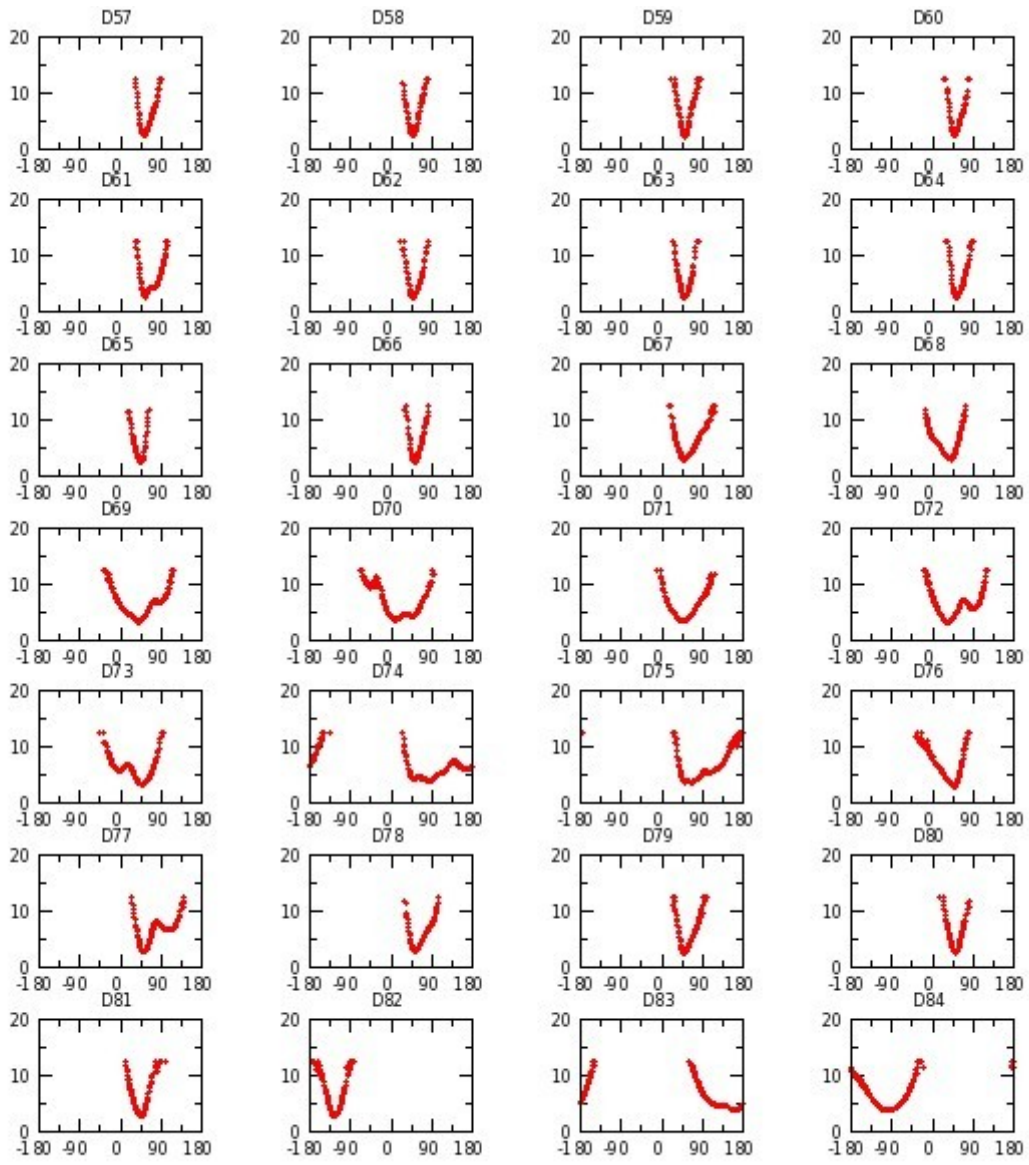


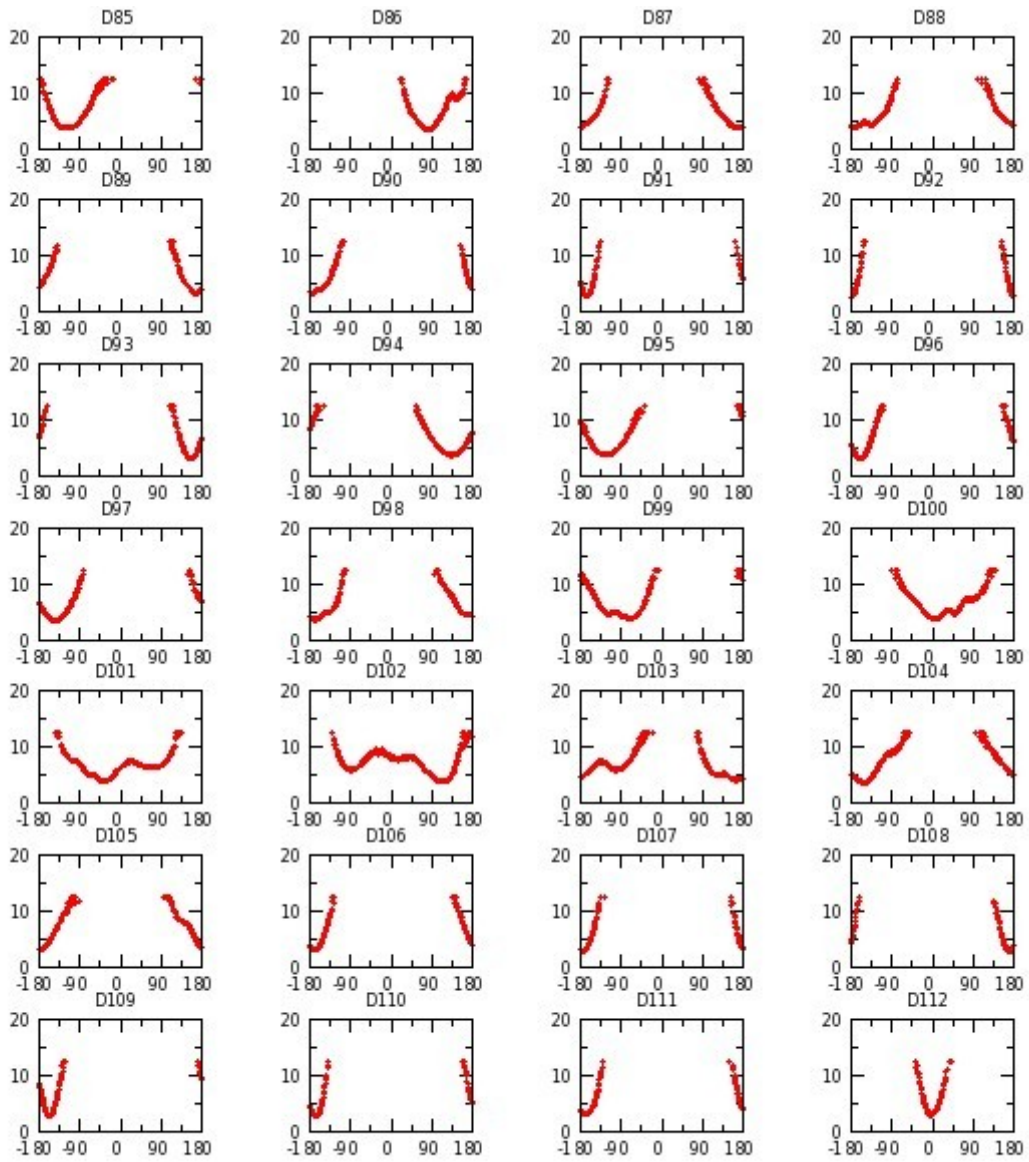


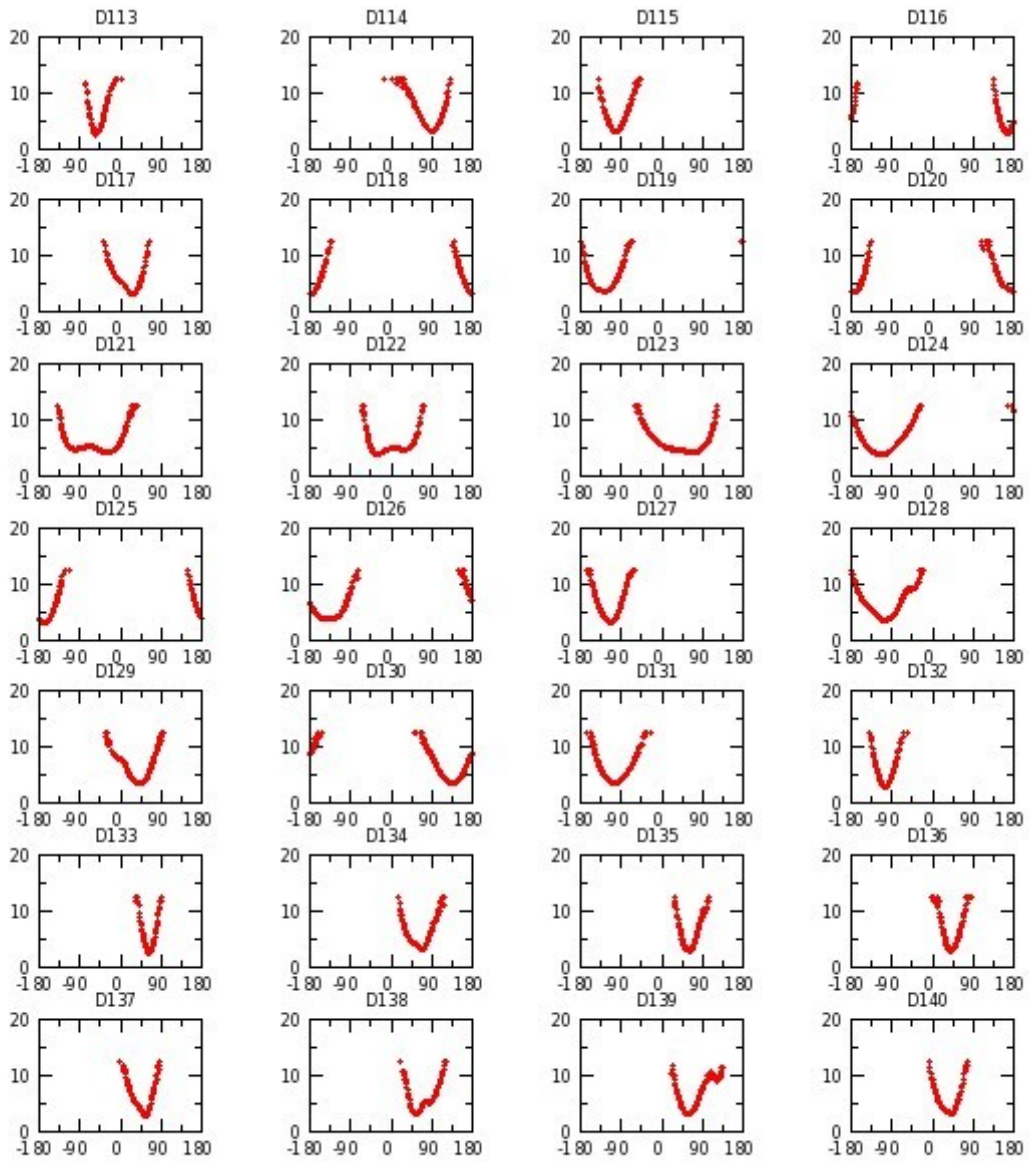
Annexe G 19 : H₂OCH réplique I

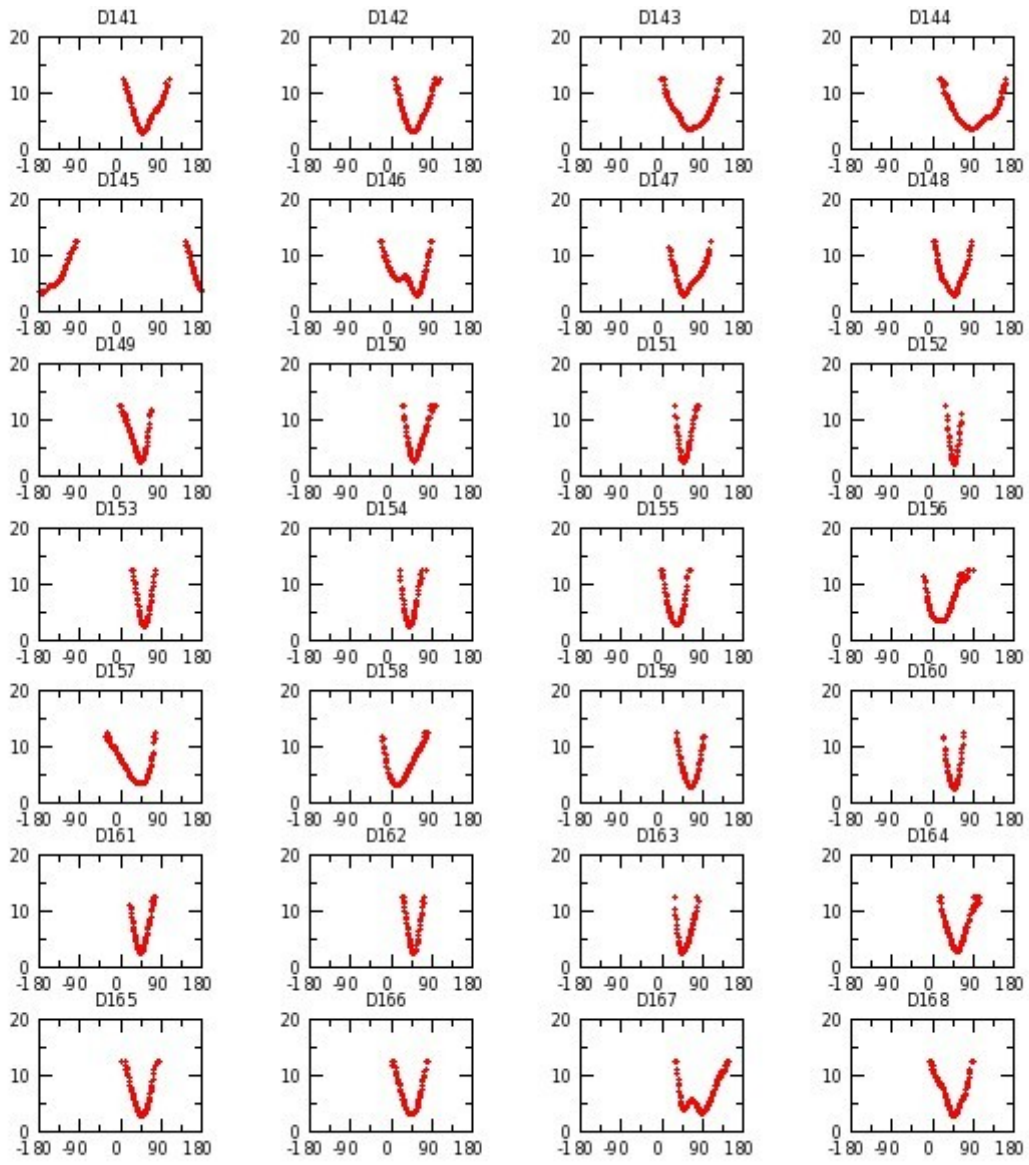


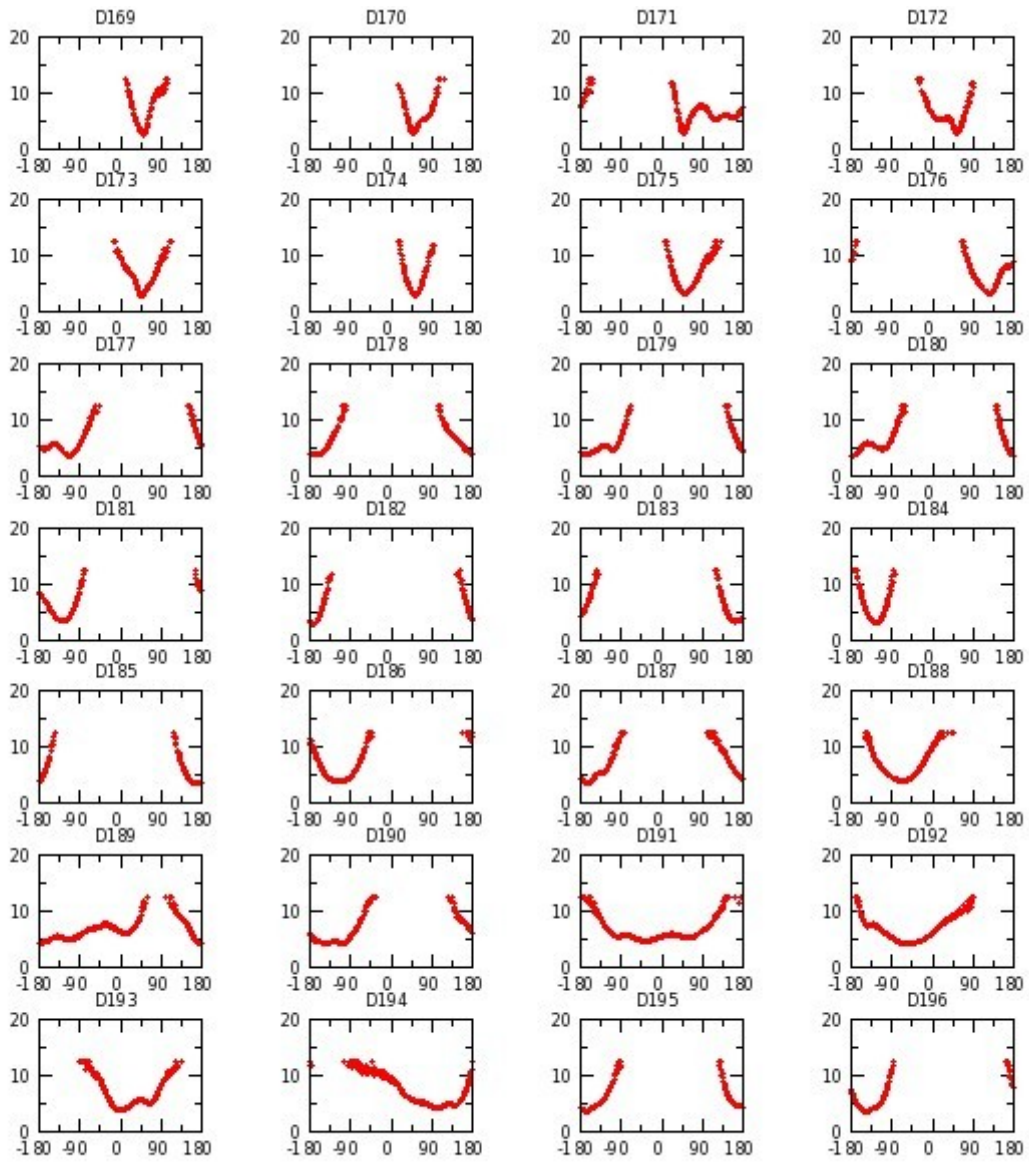


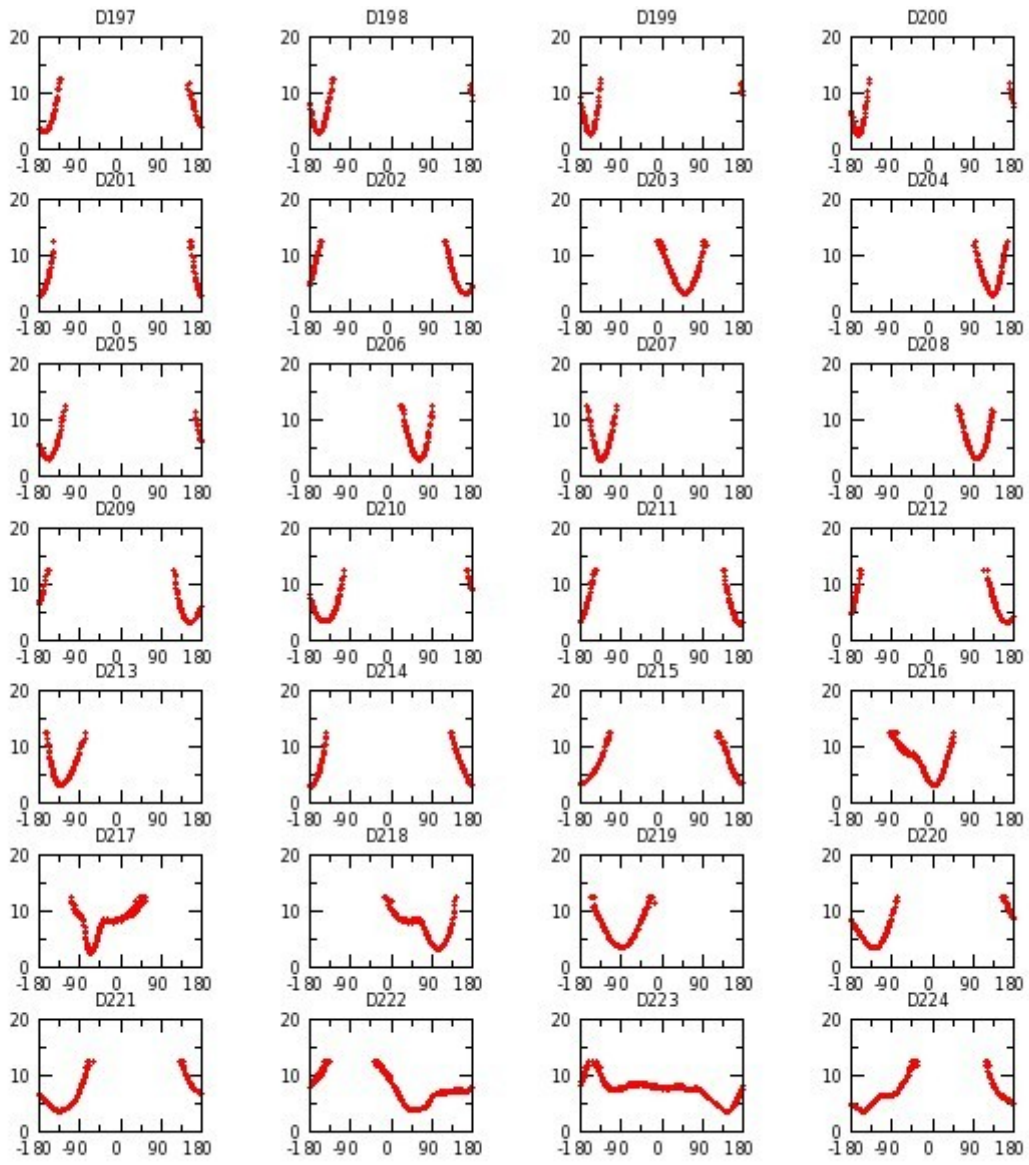


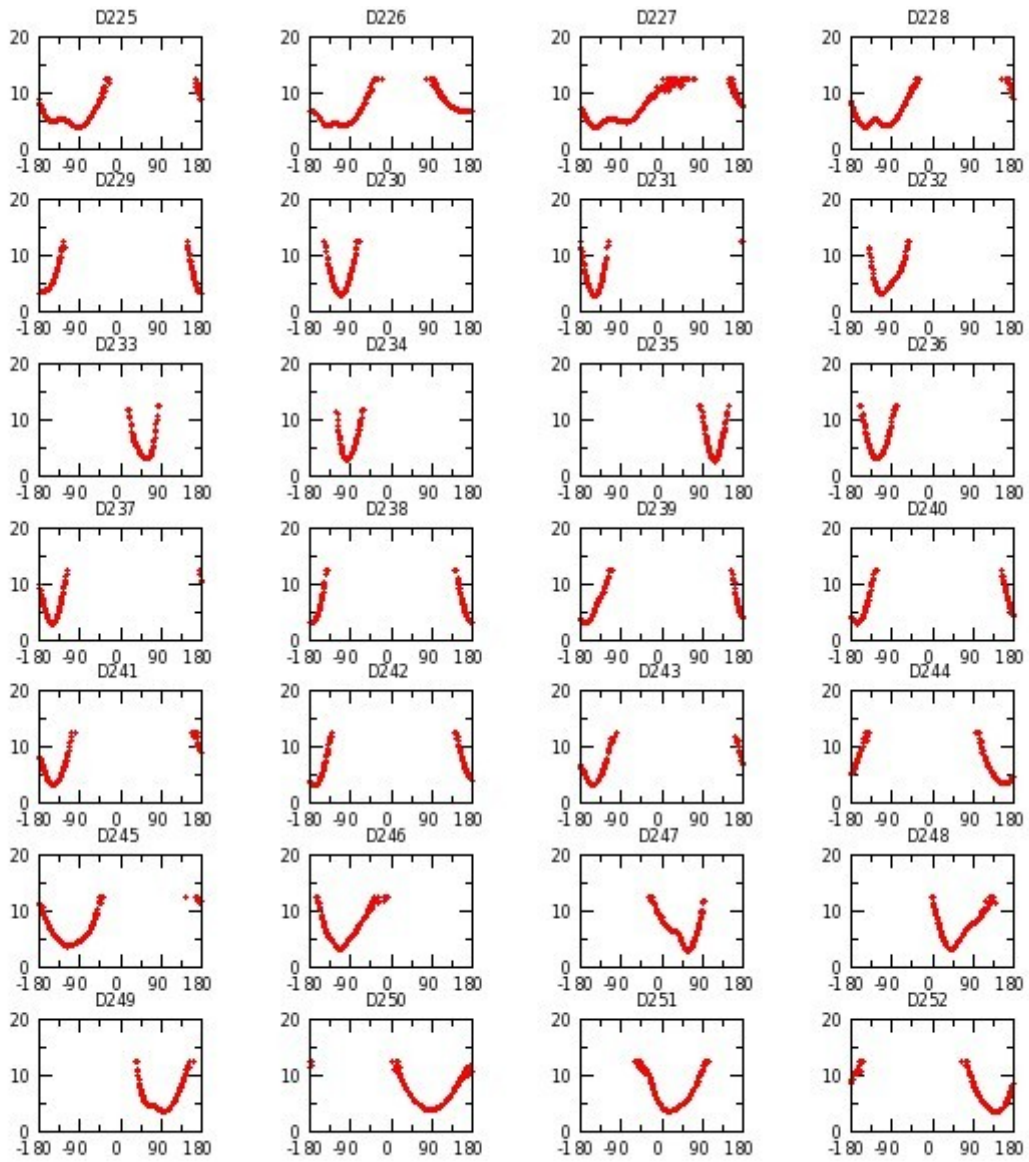


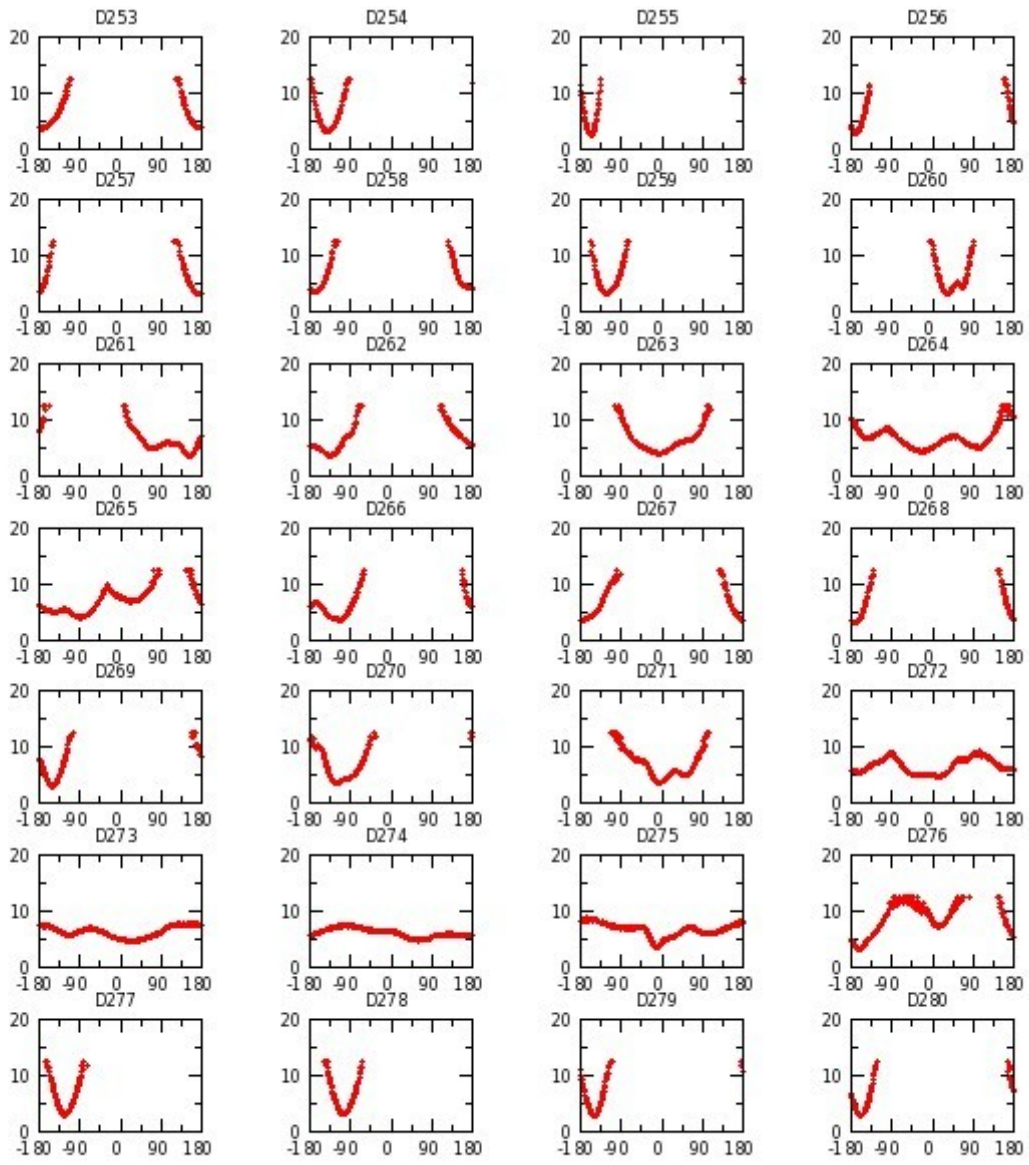




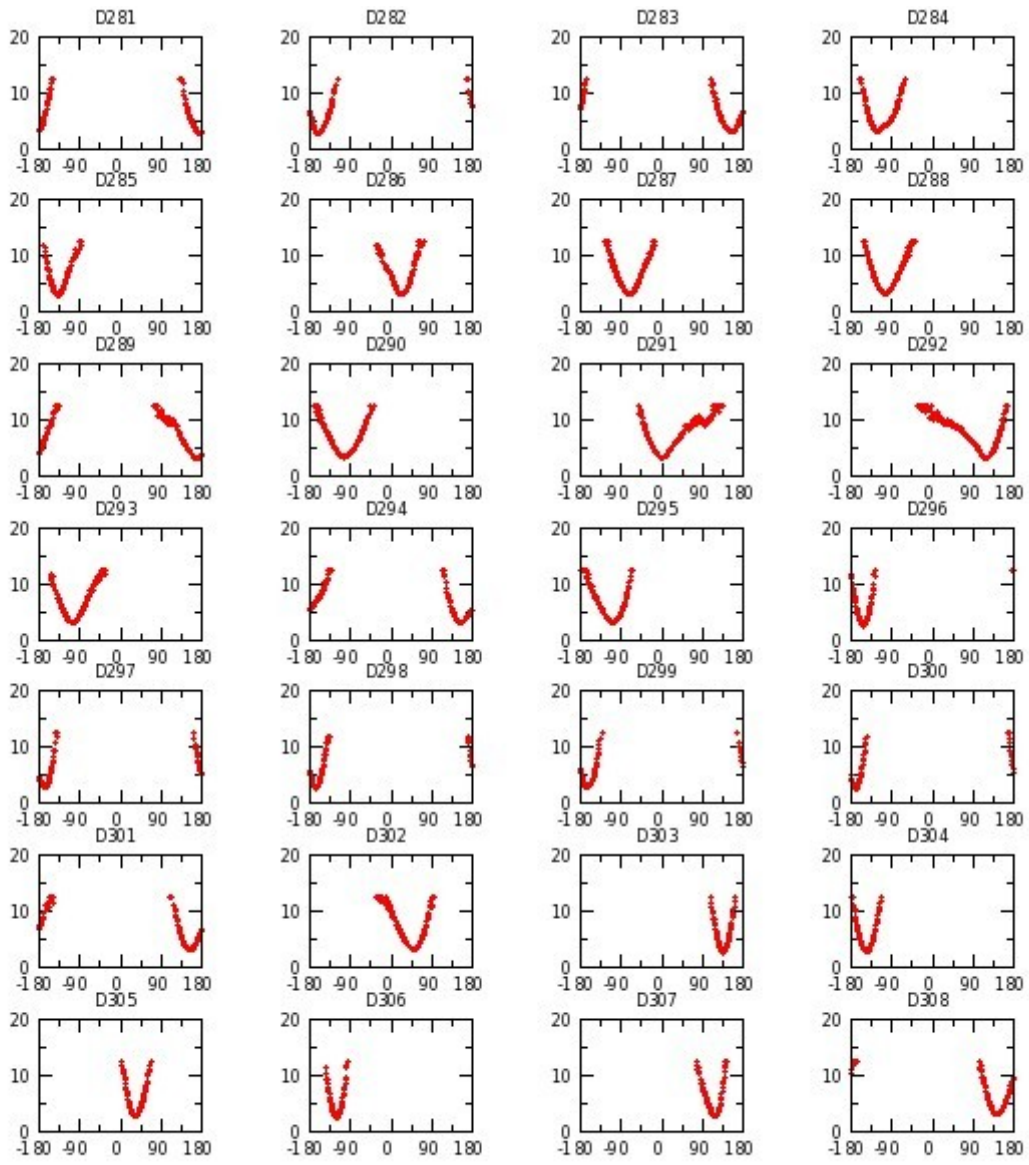


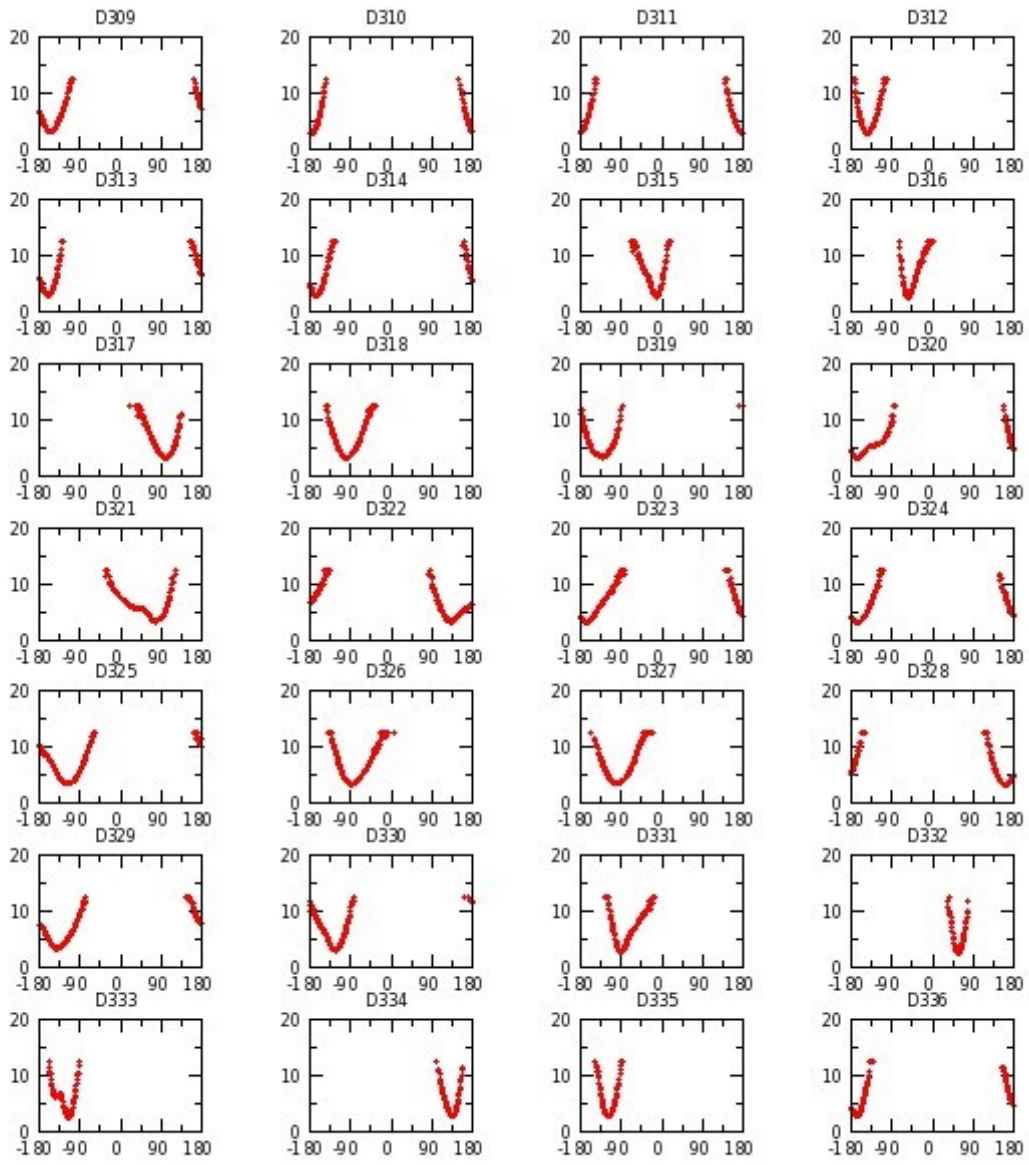


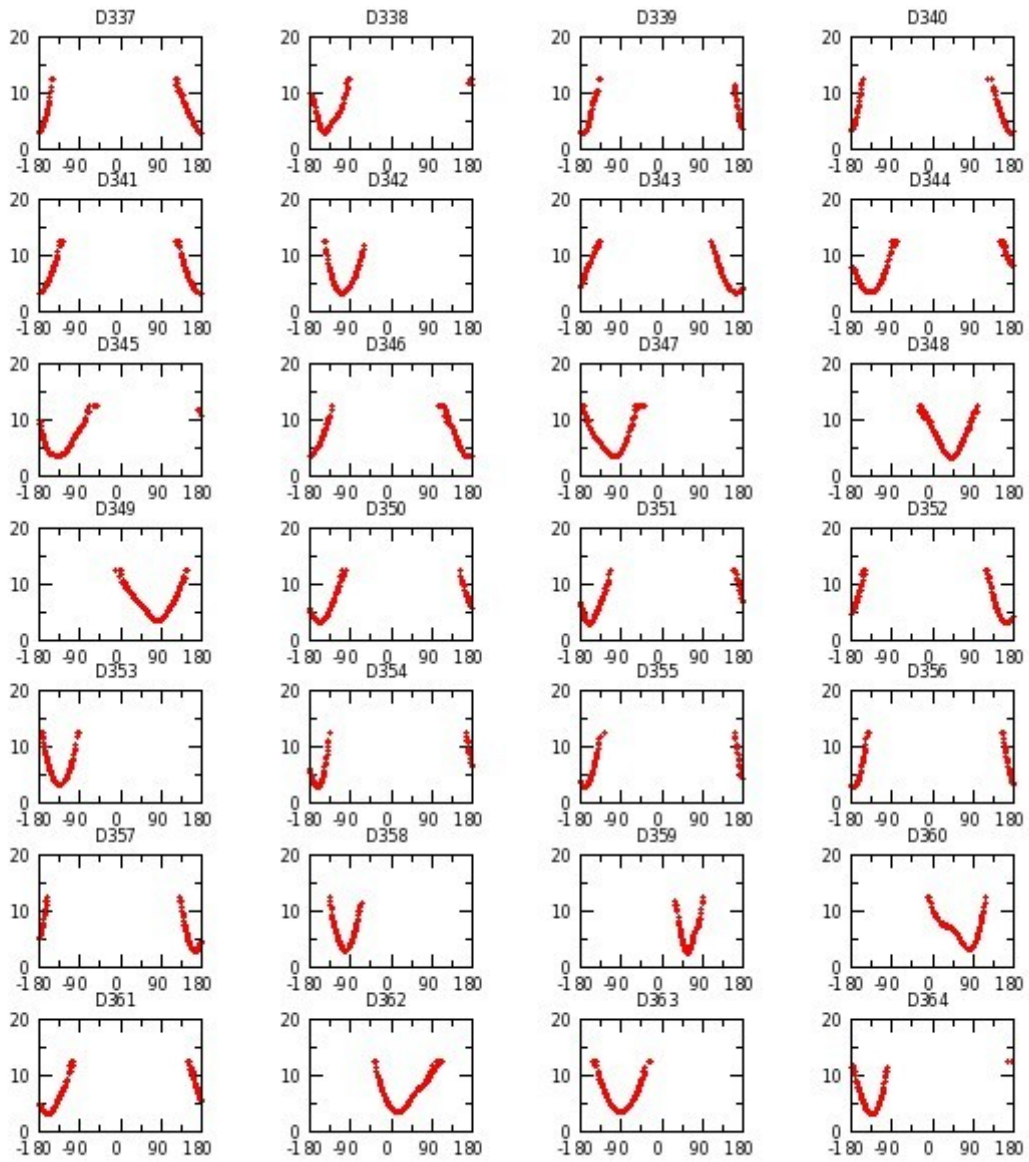


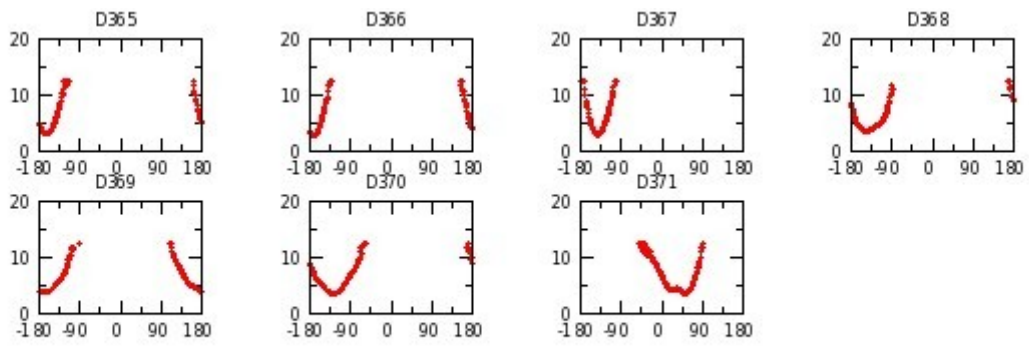


0

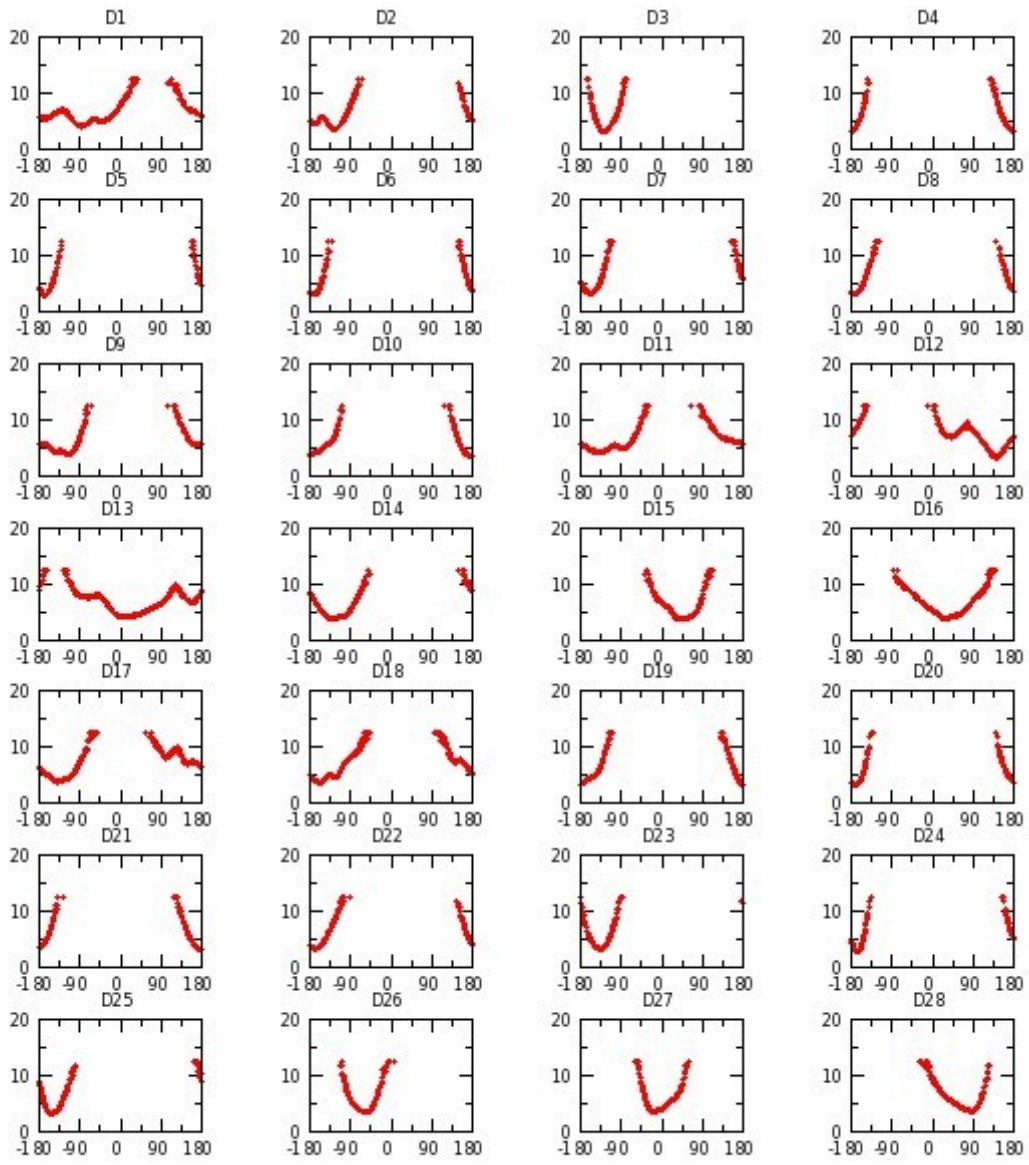


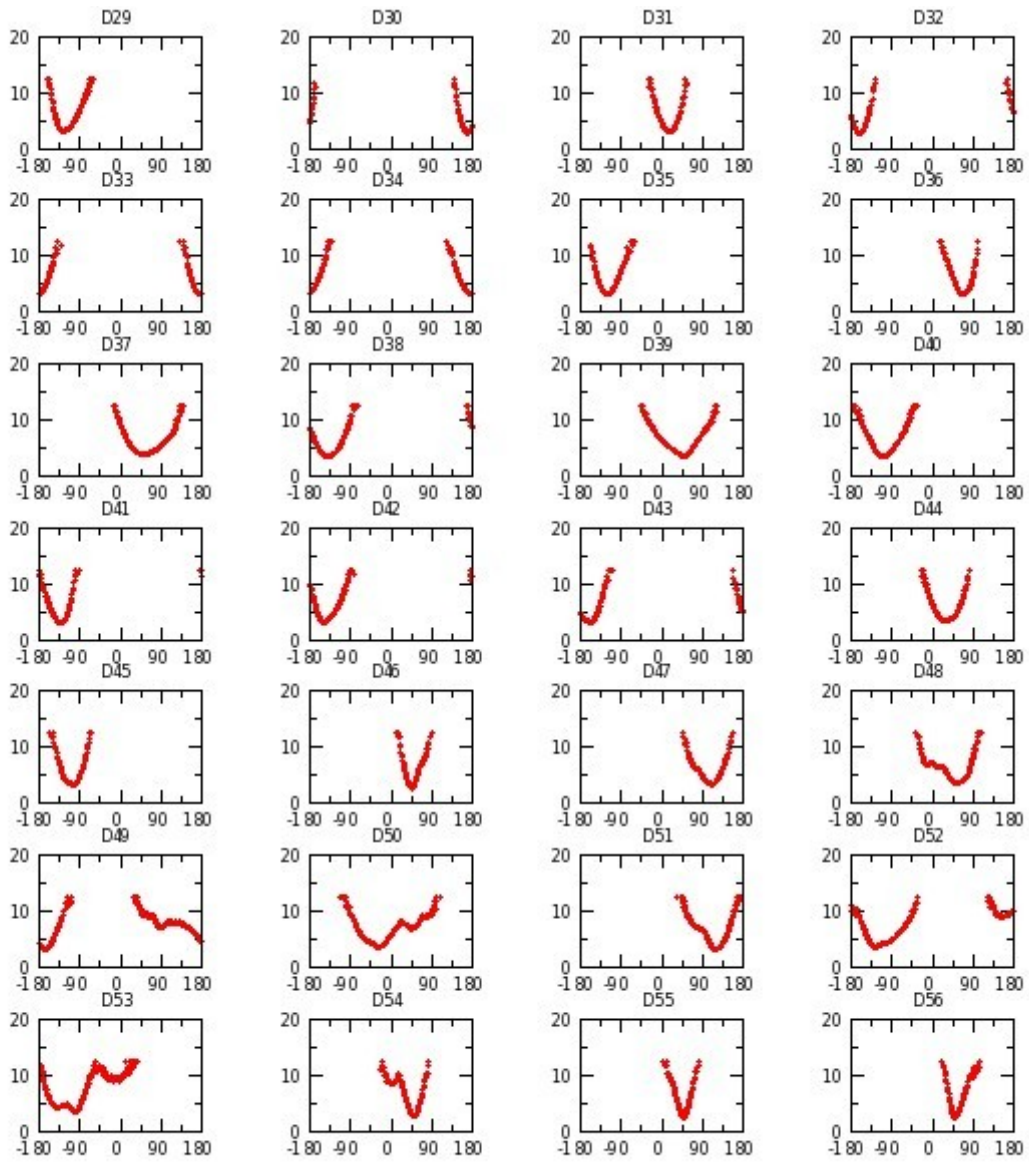


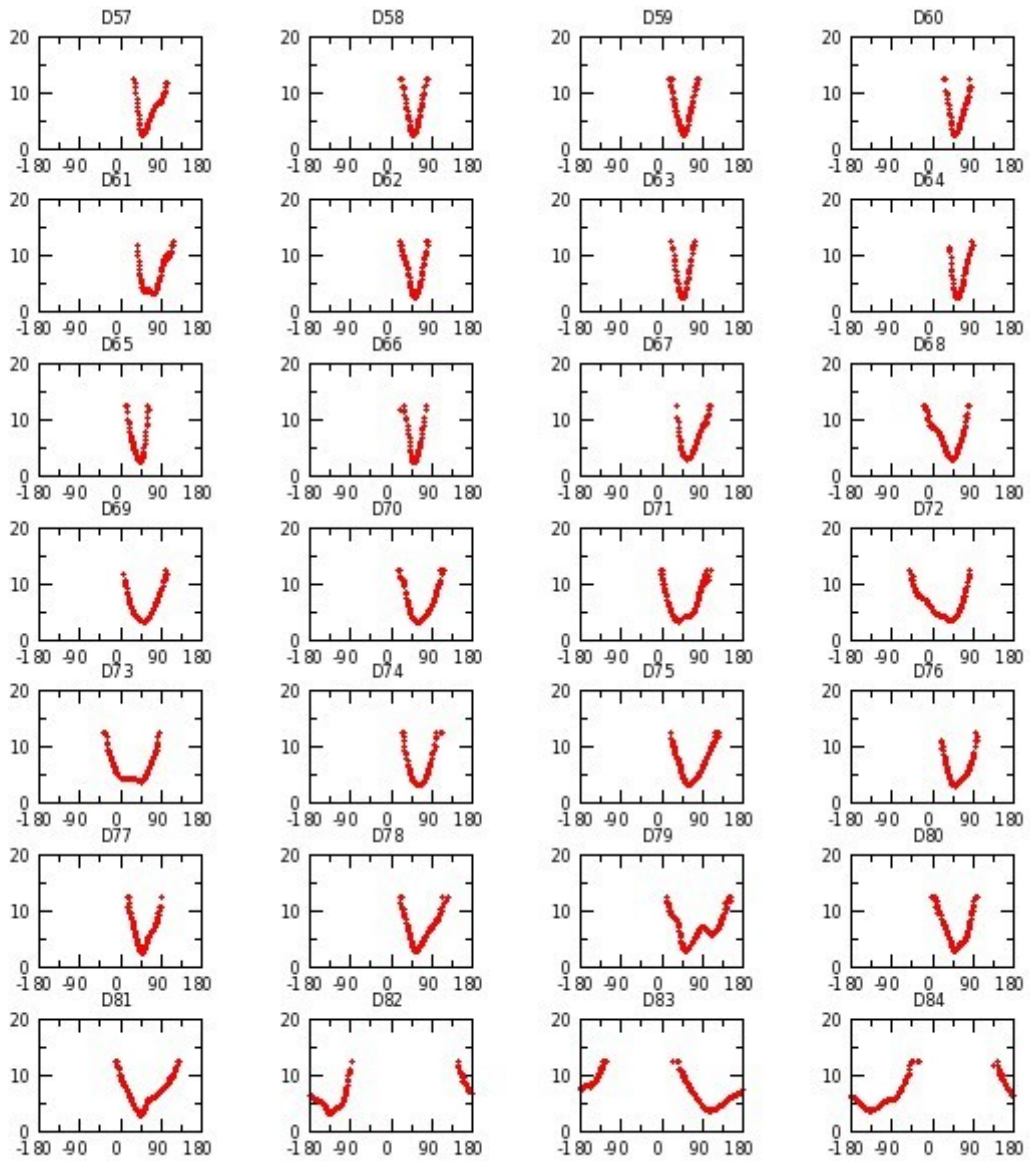


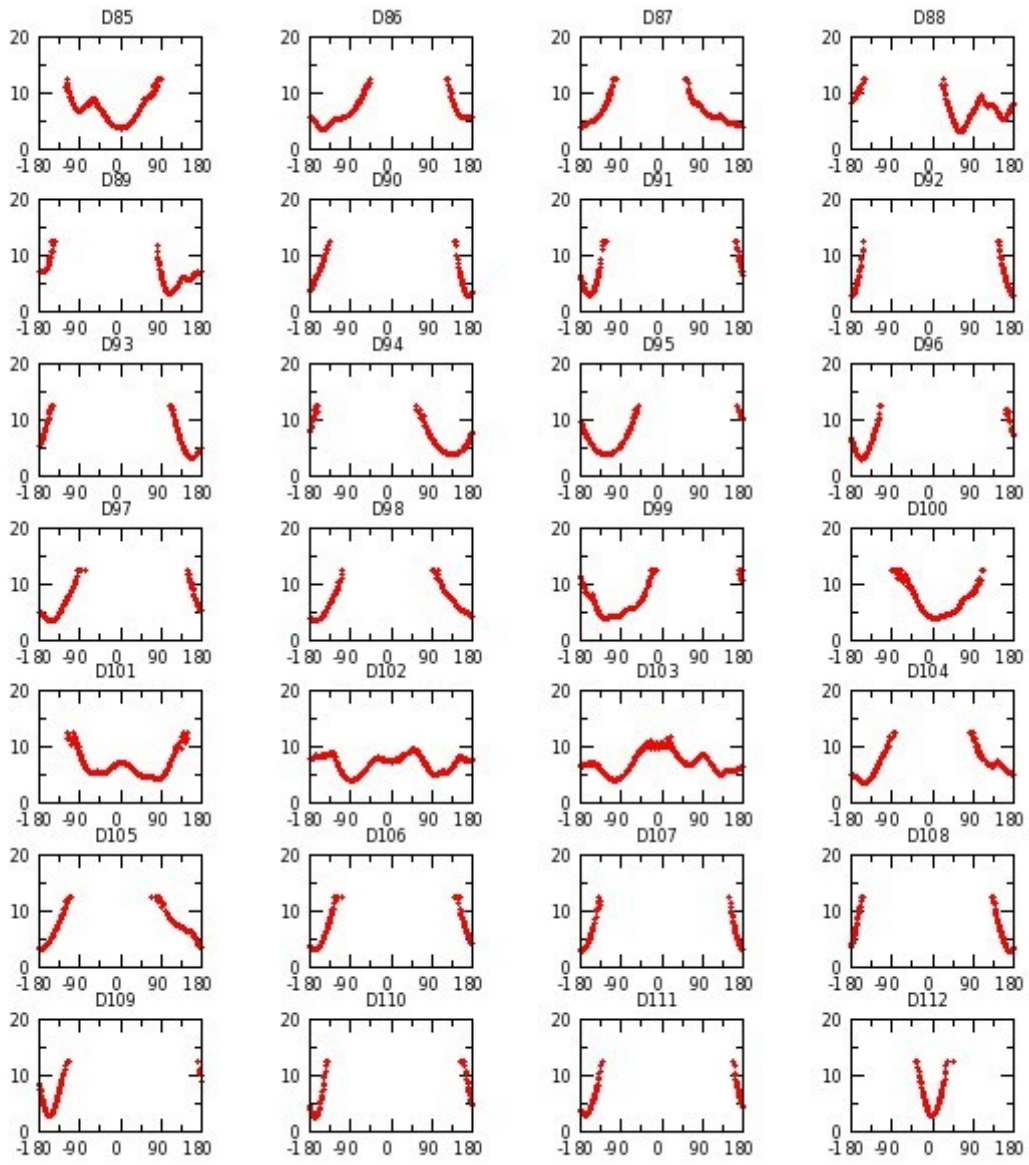


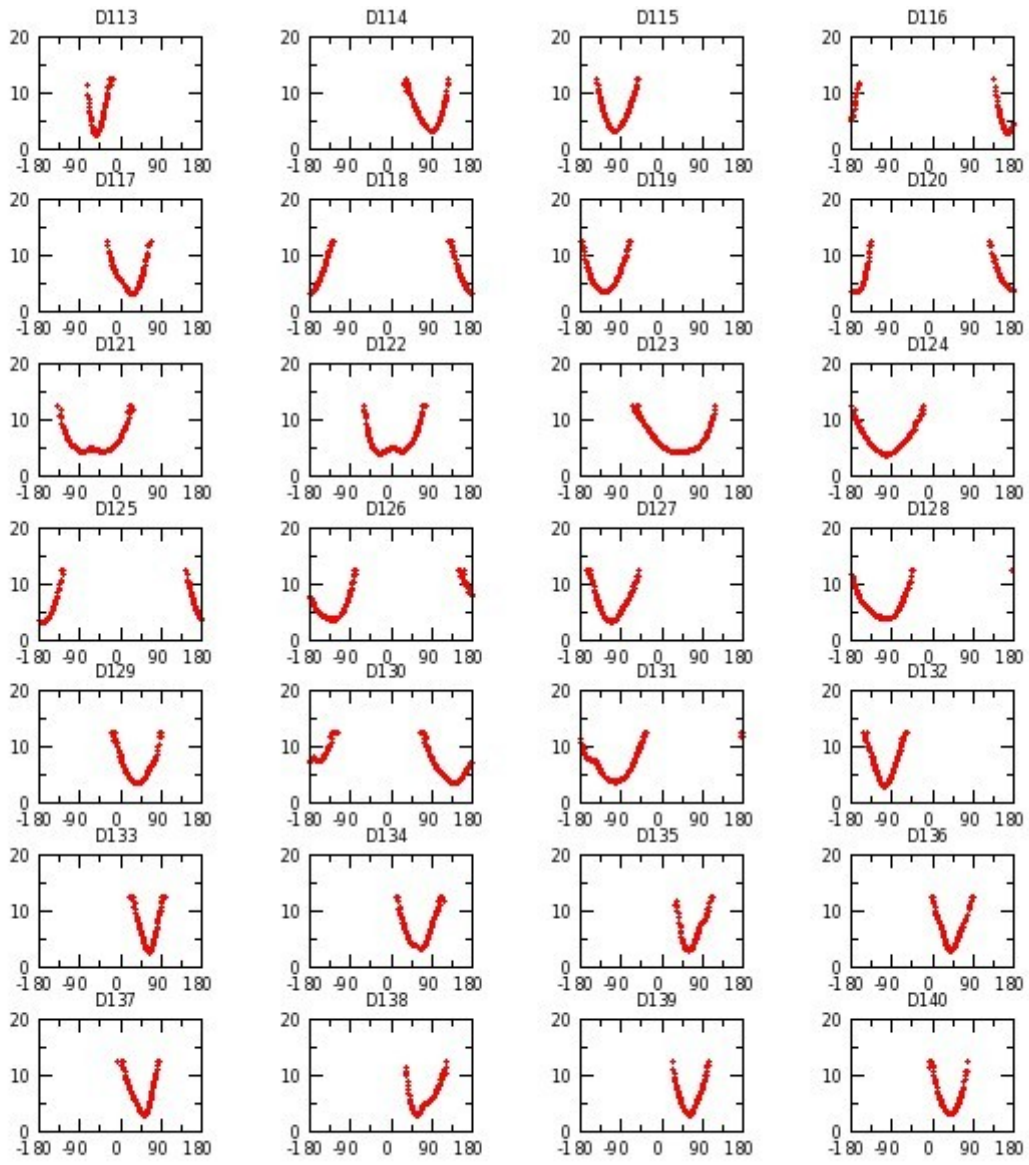
Annexe G 20 : H₂OCH réplique II

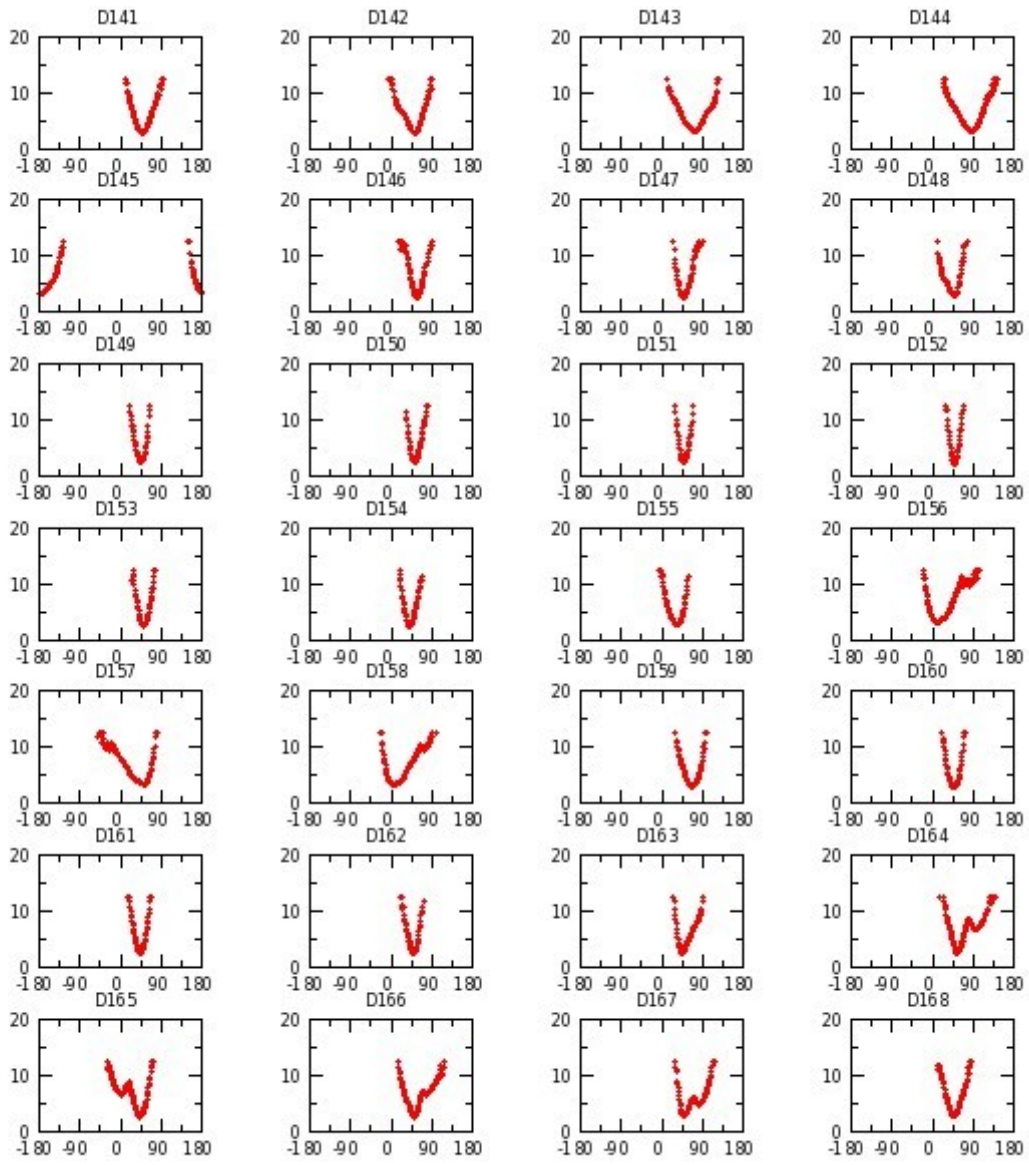


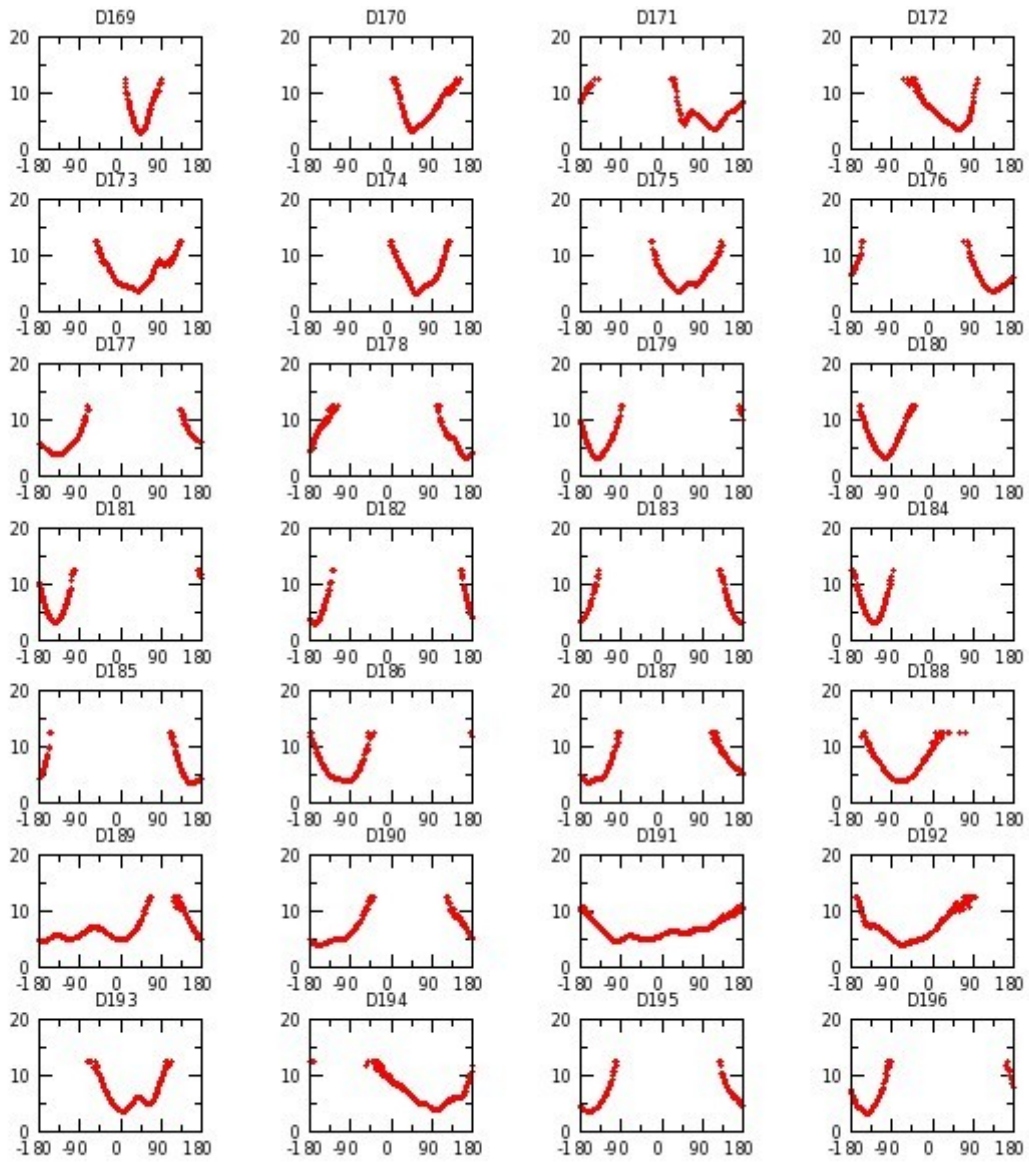


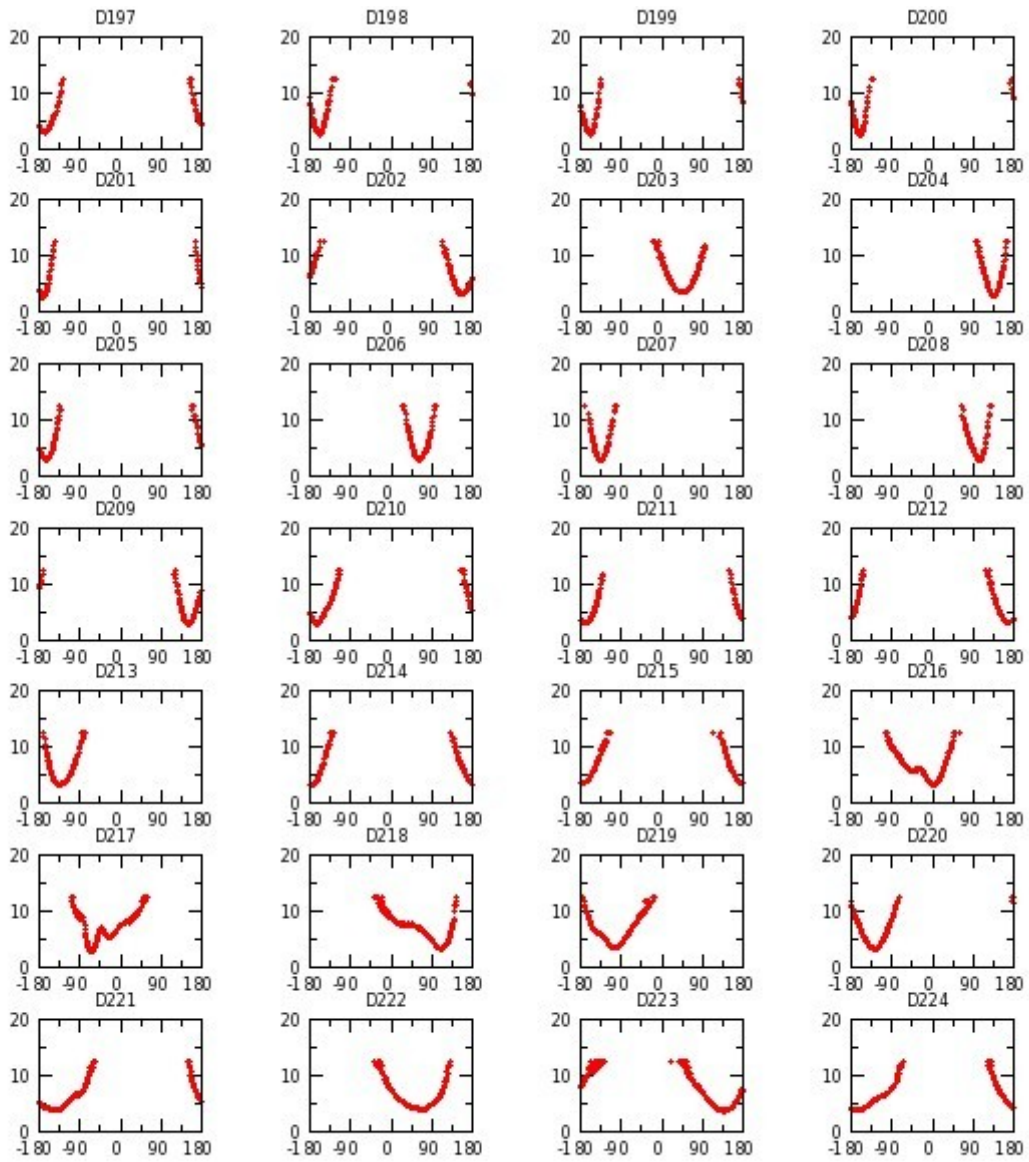


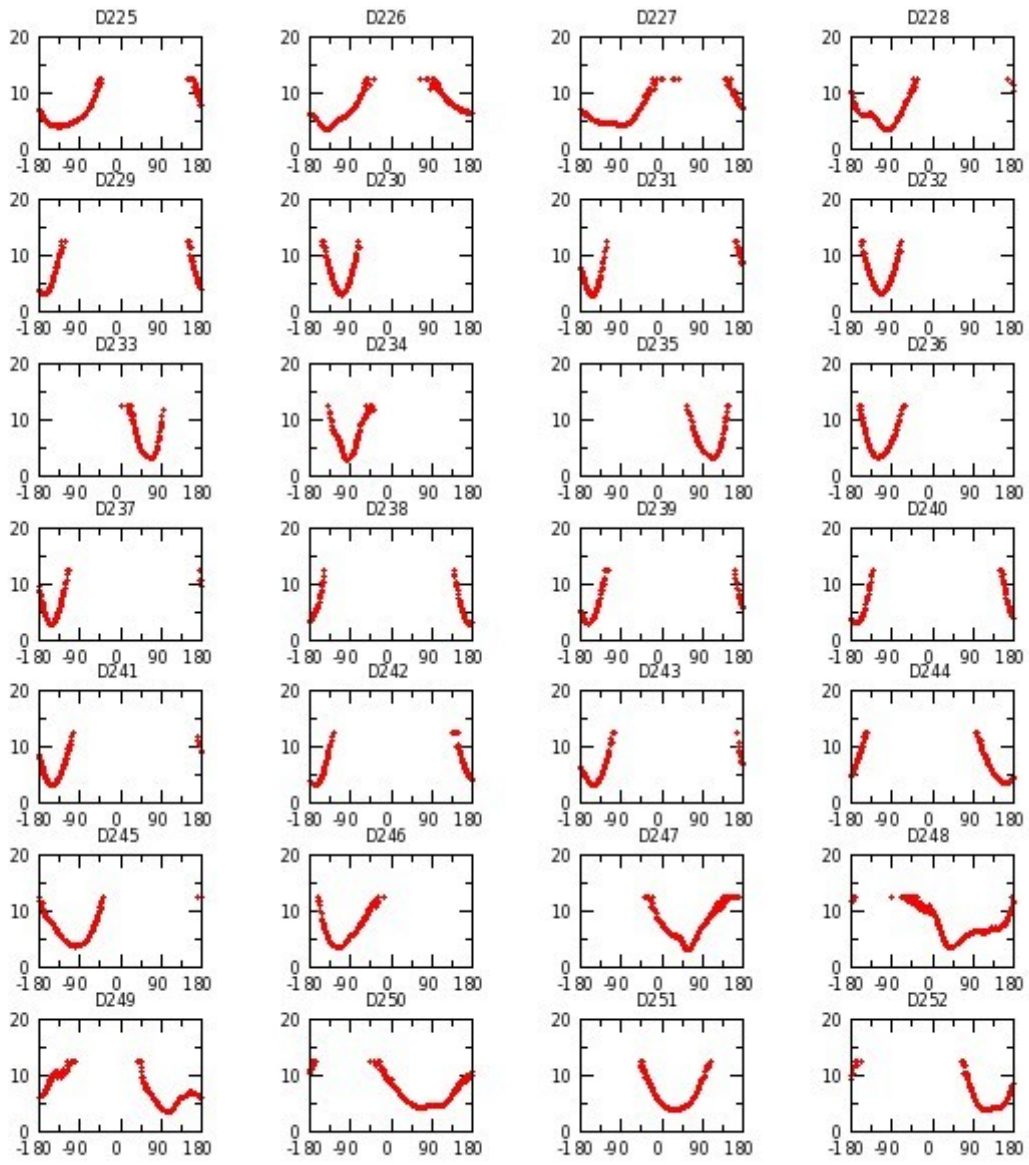


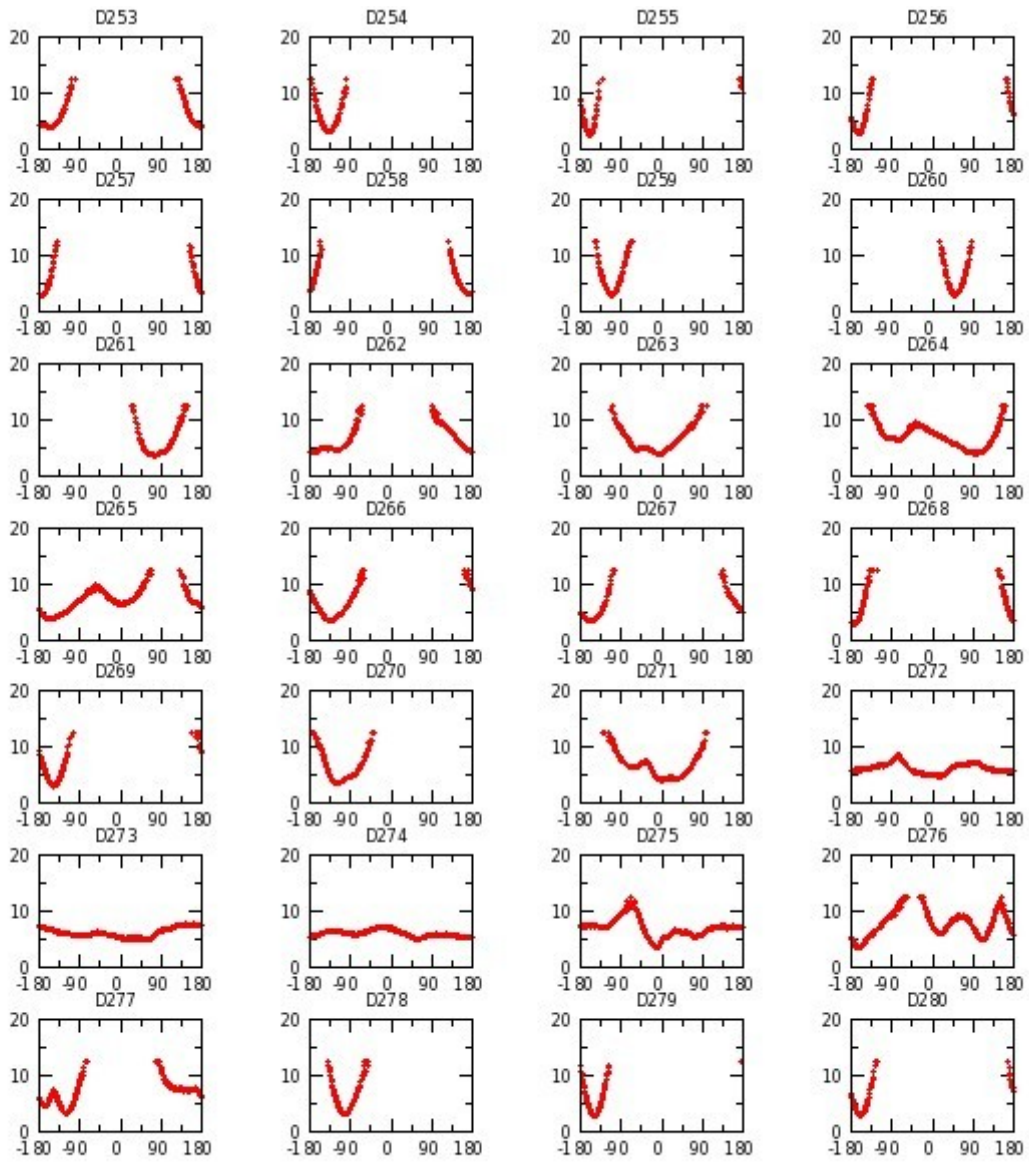


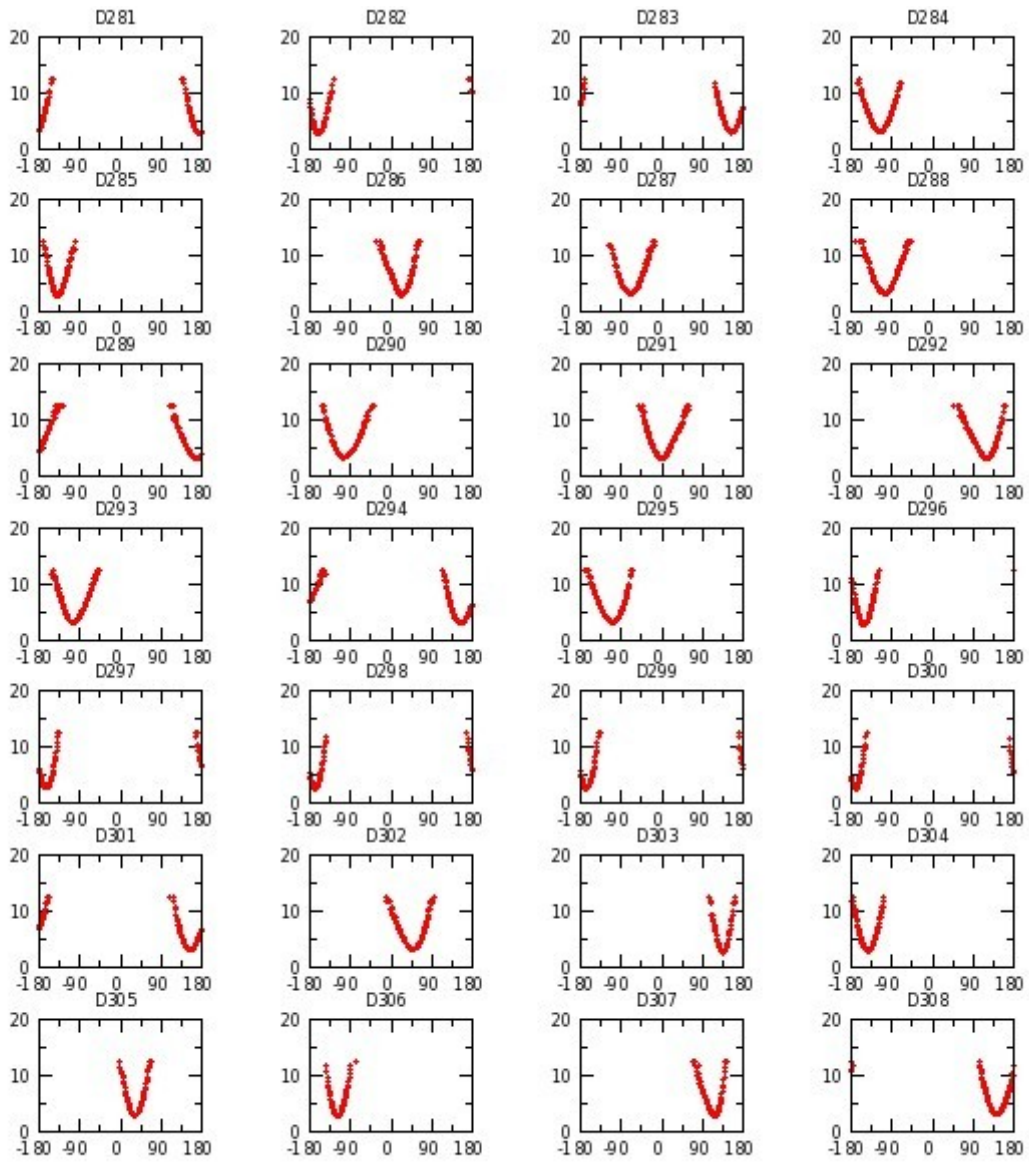


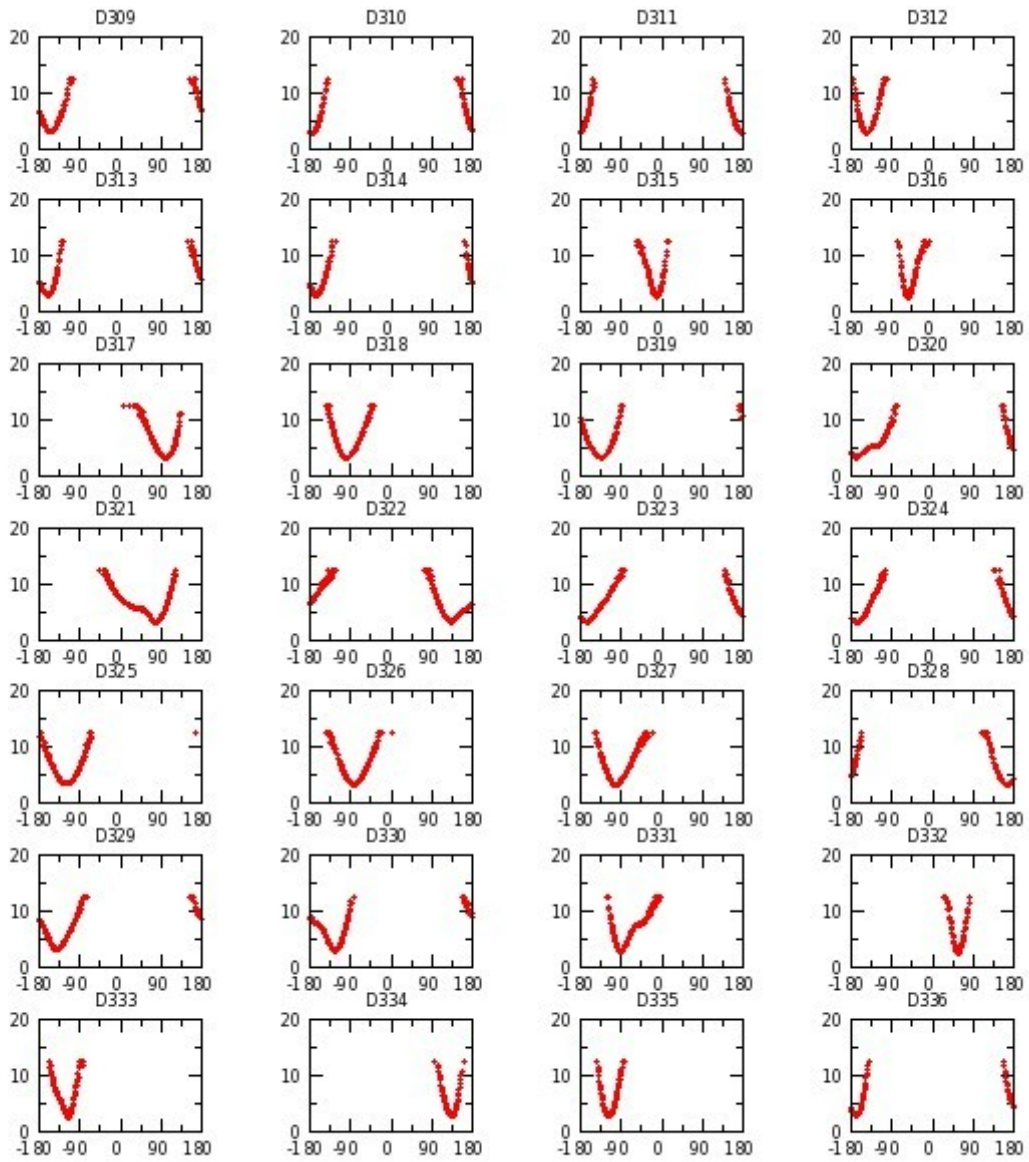


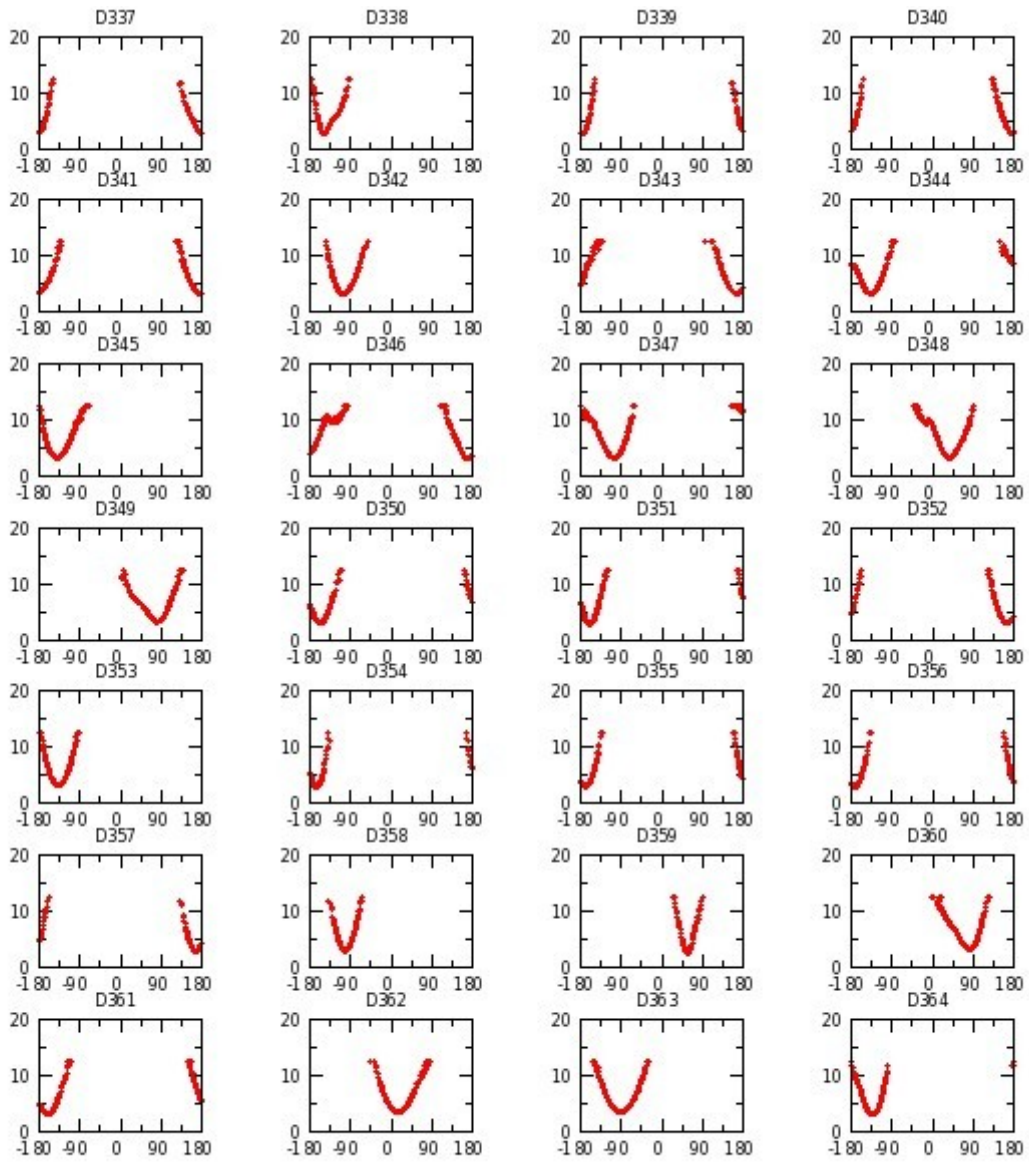


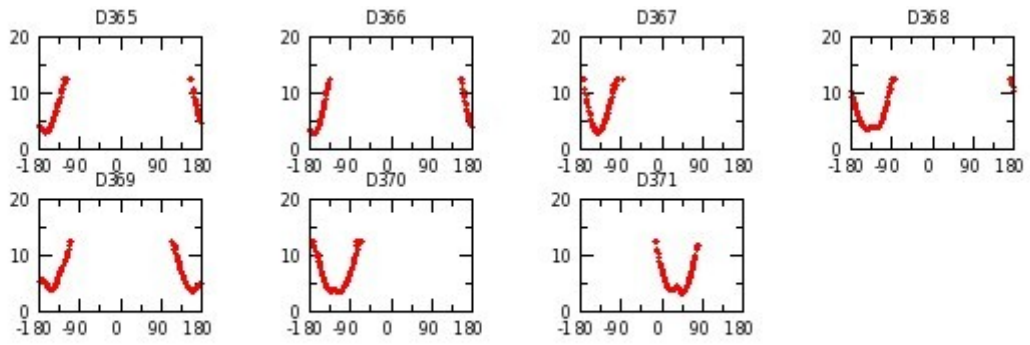




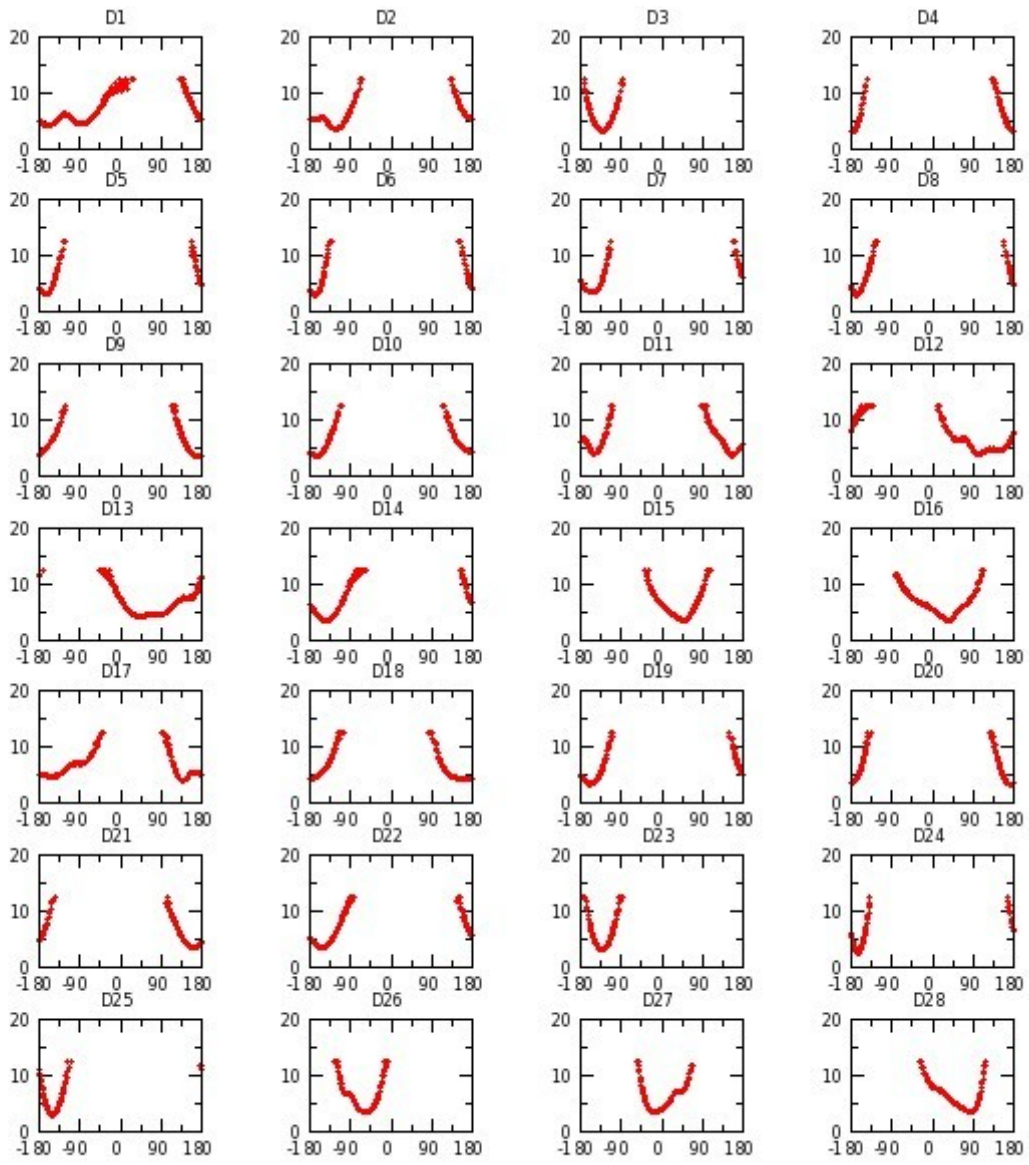


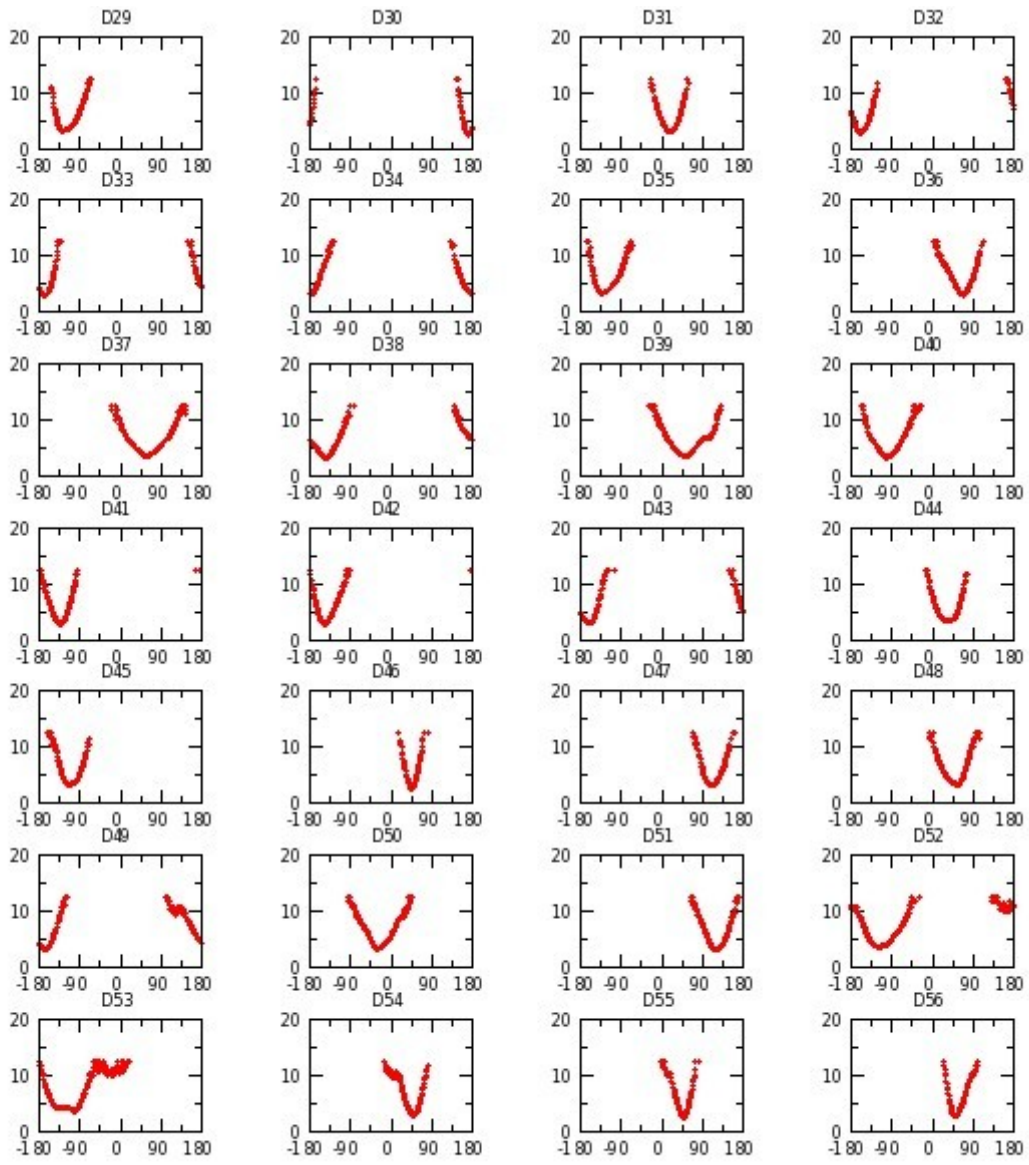


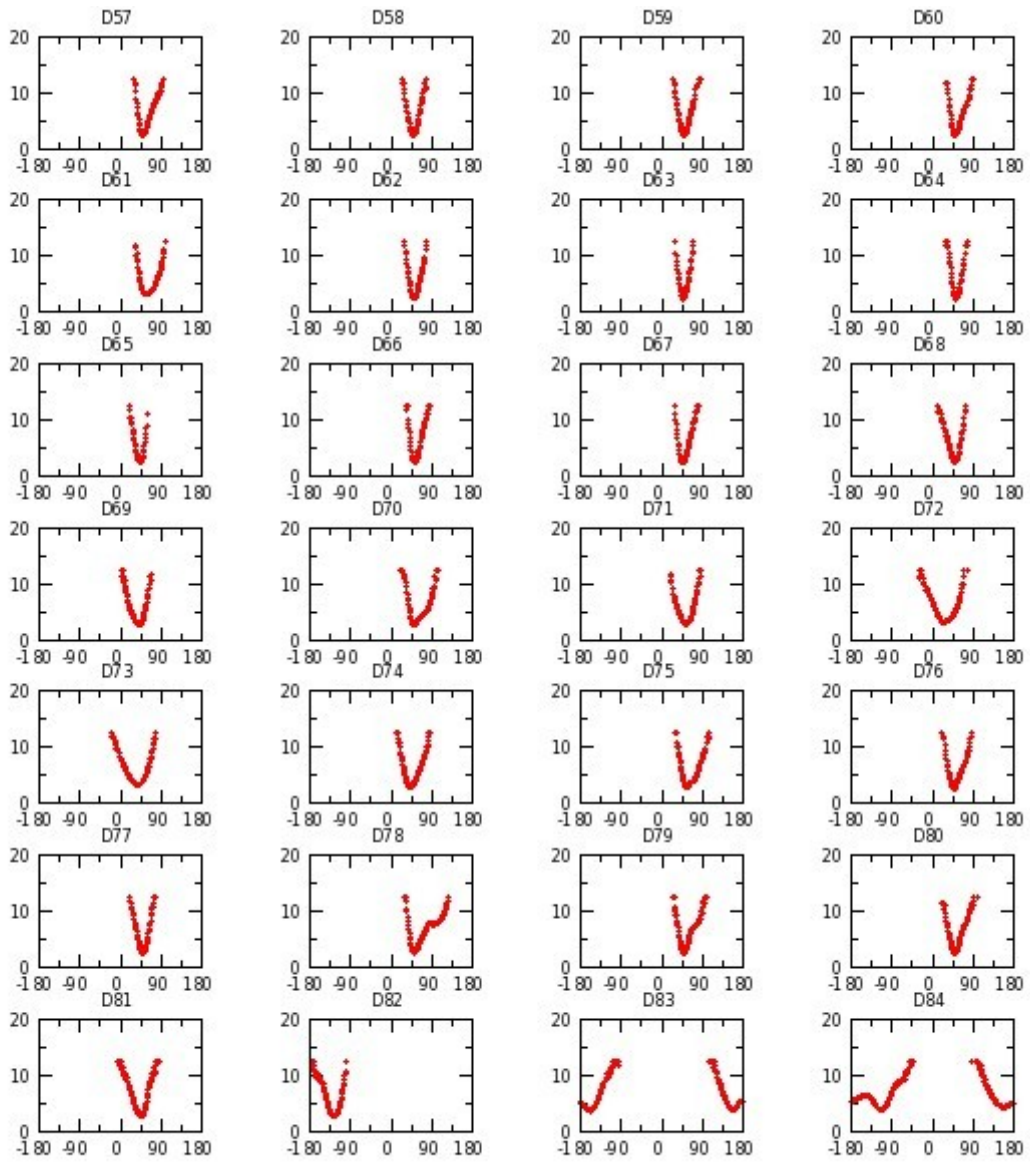


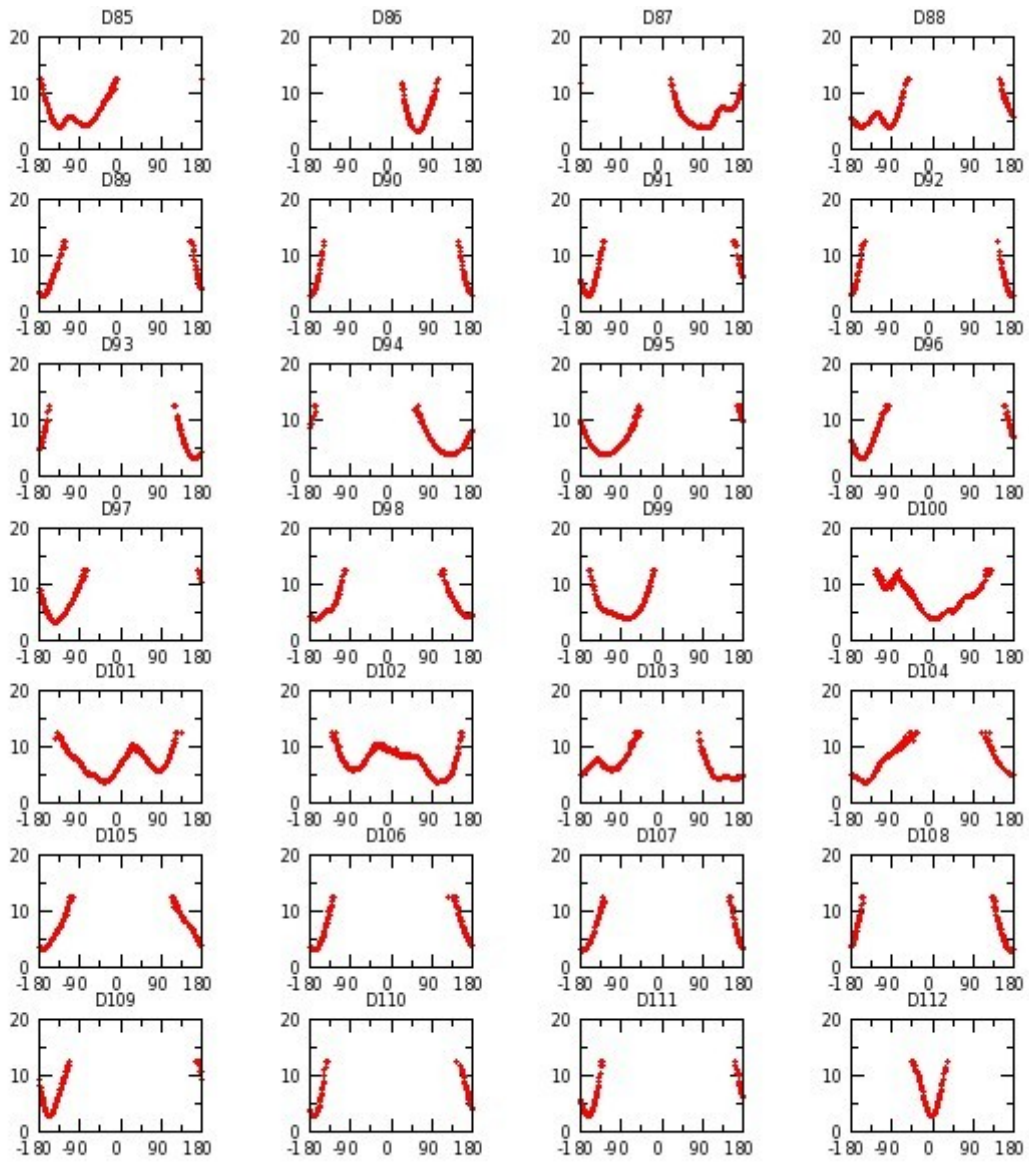


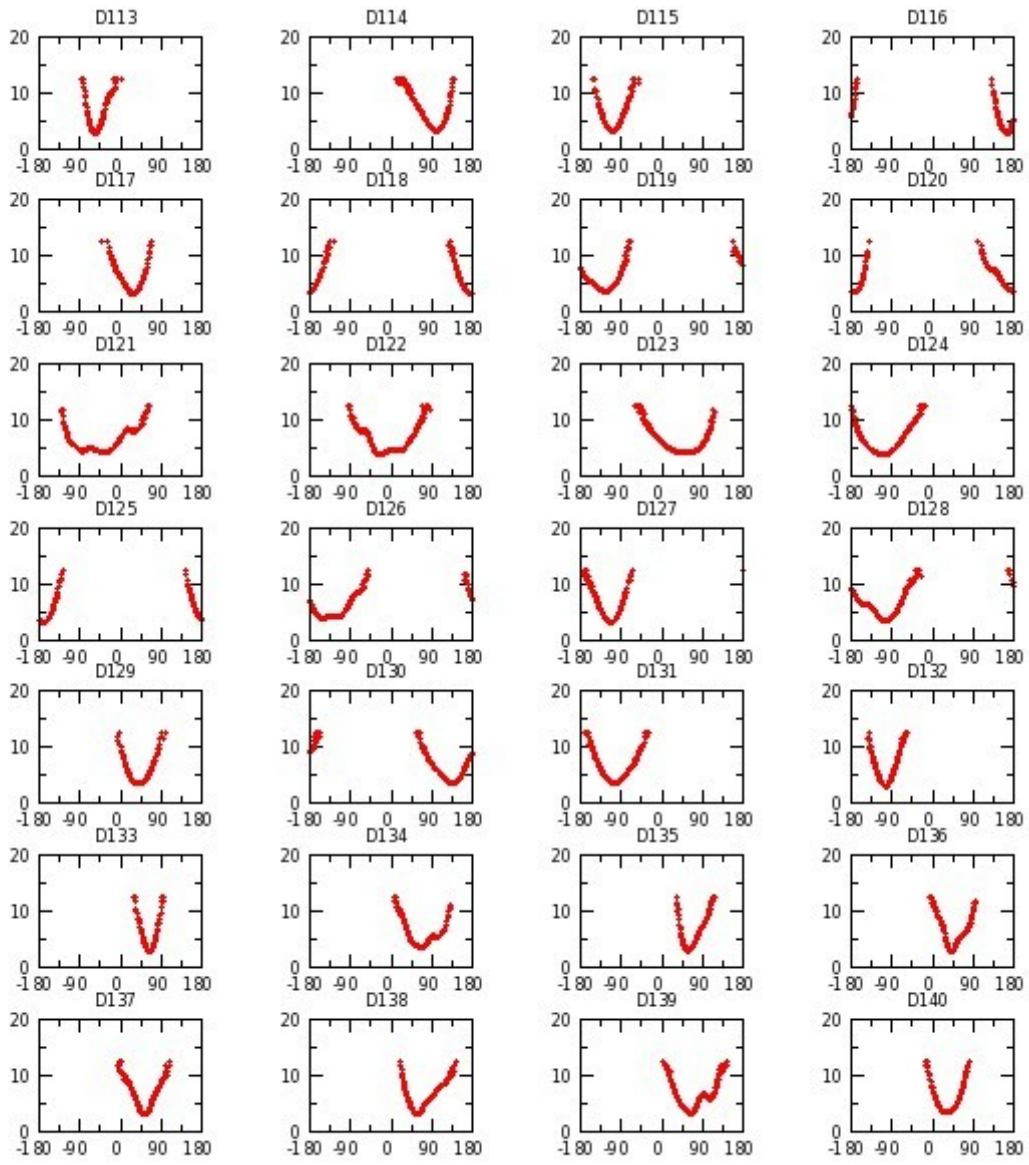
Annexe G 21 : H₂OCH réplique III

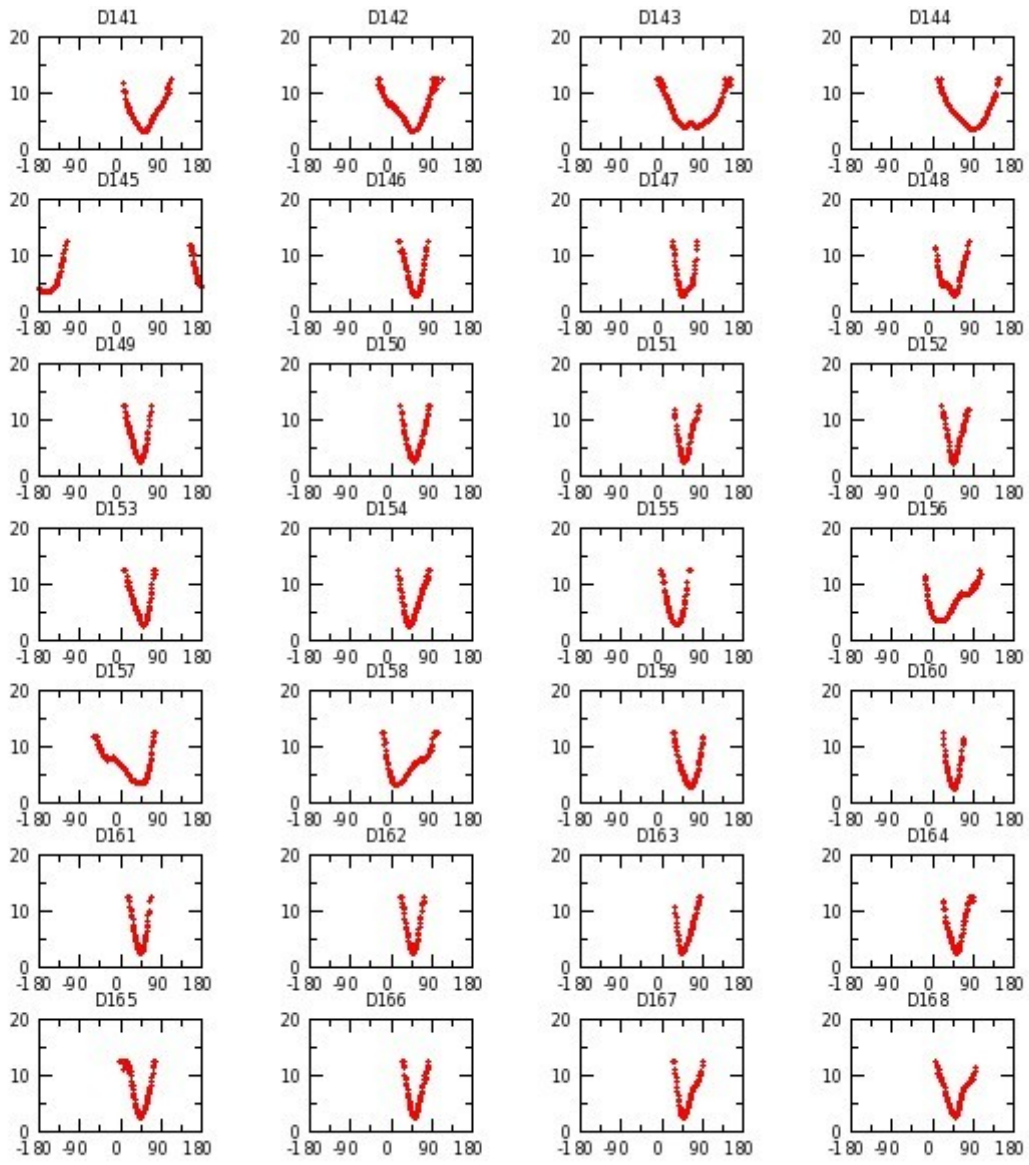


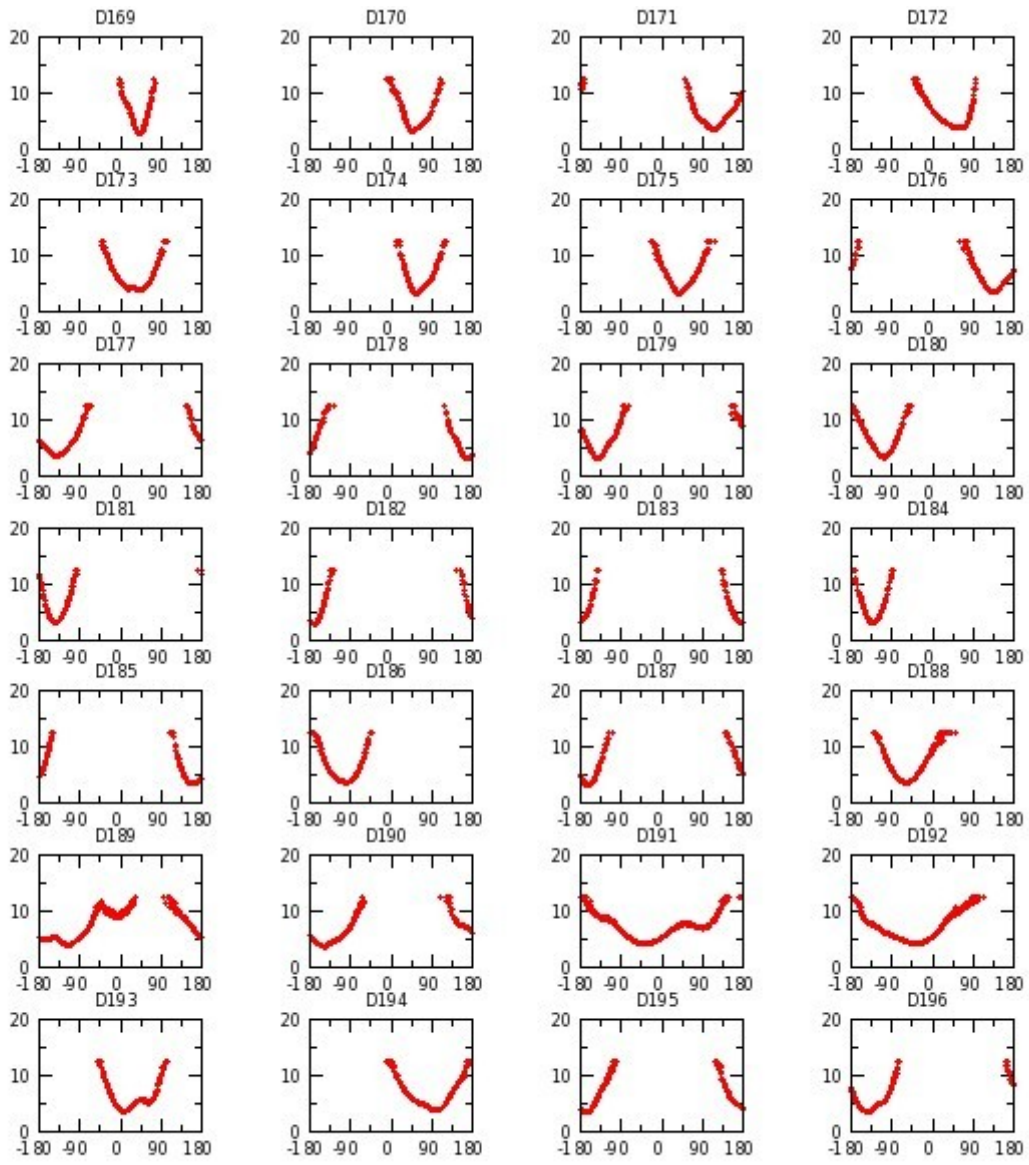


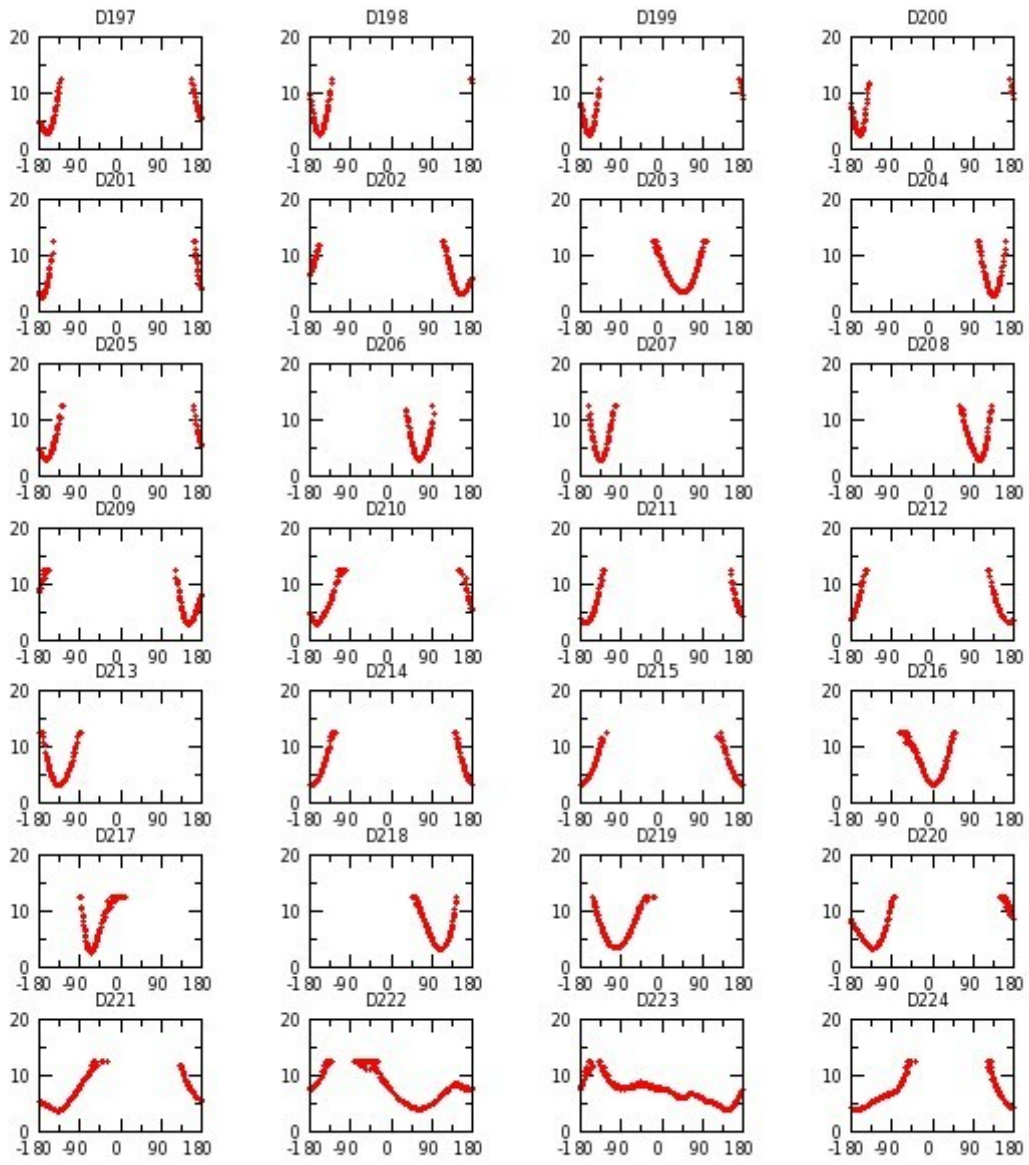


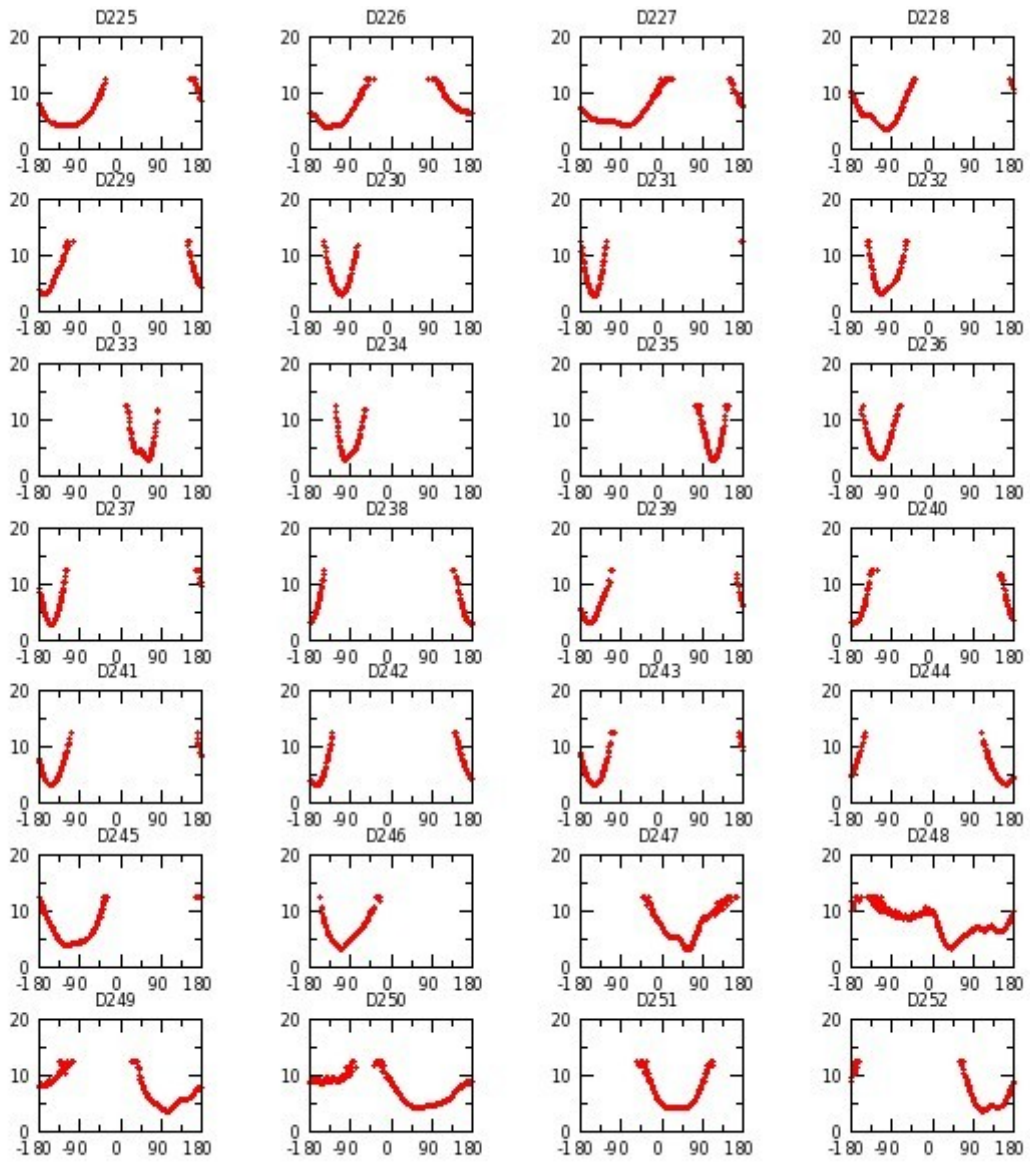


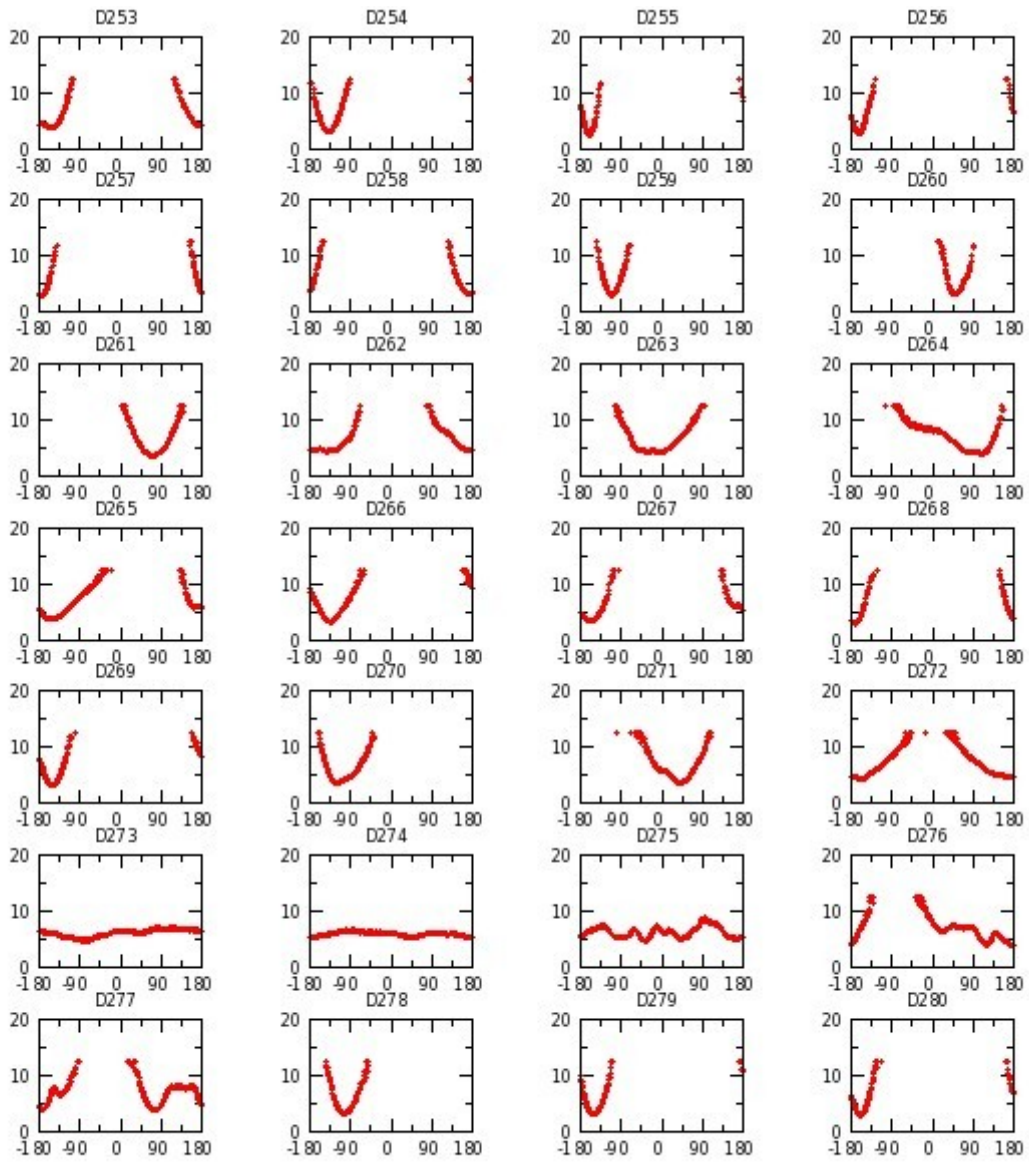


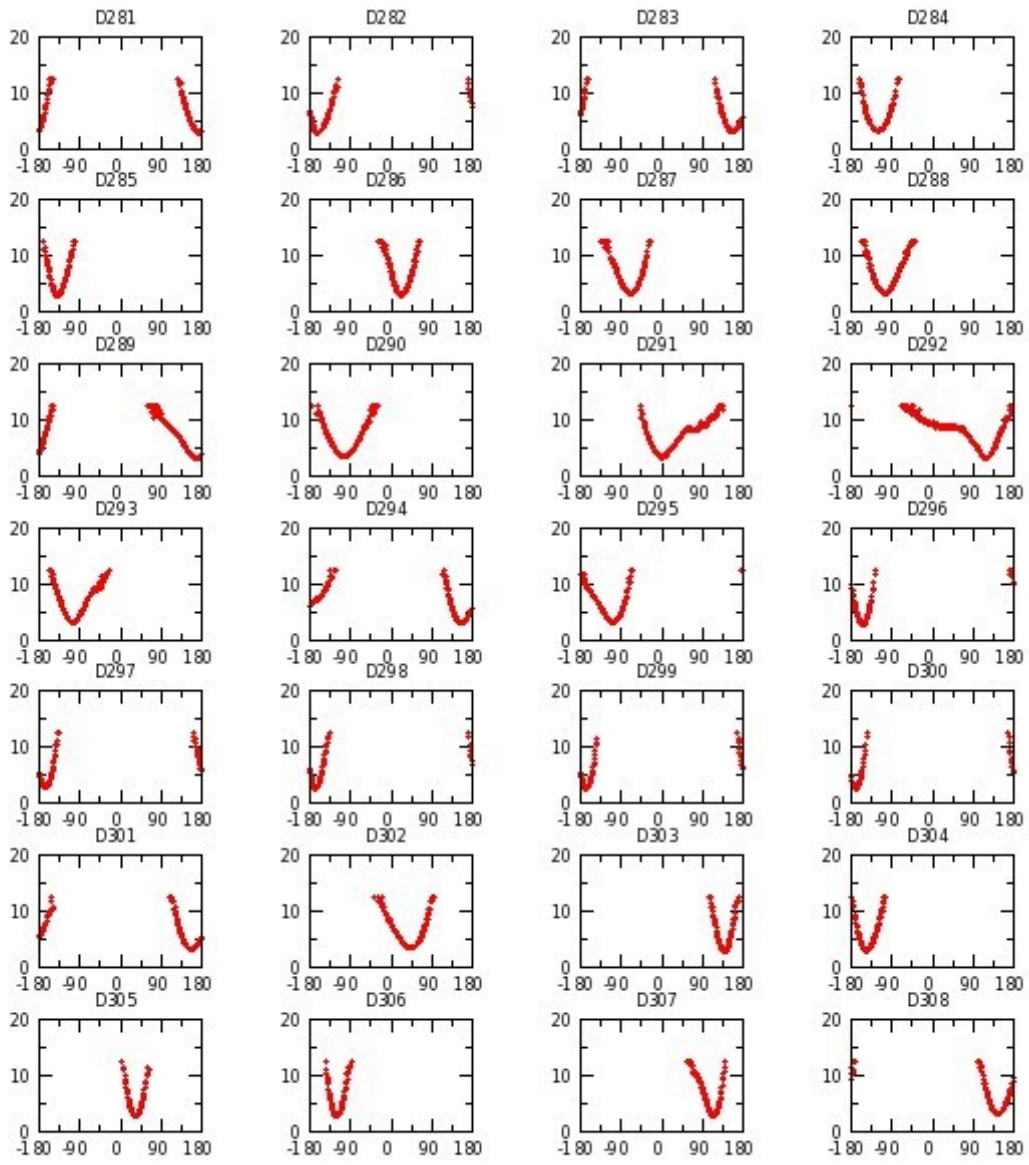


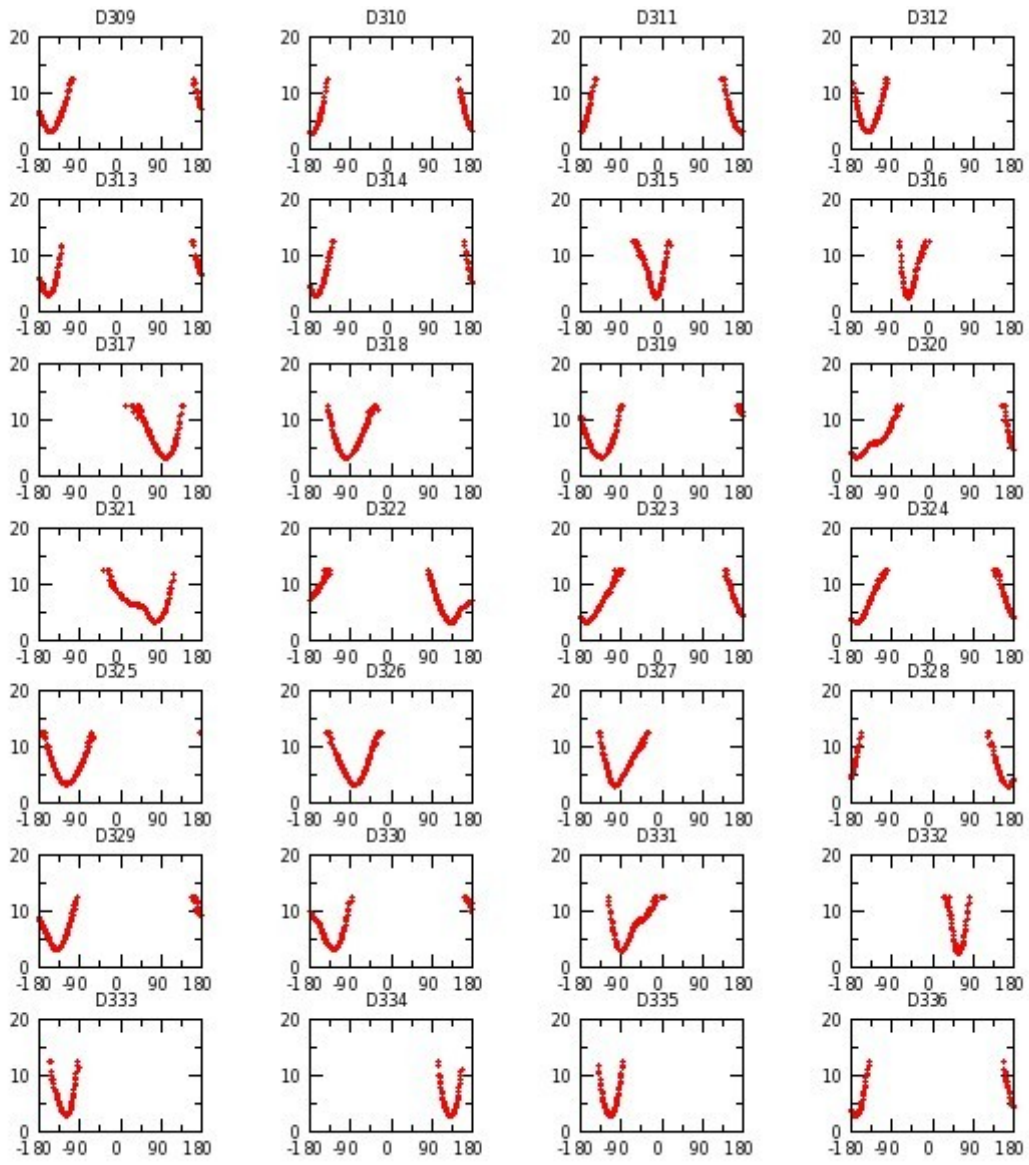


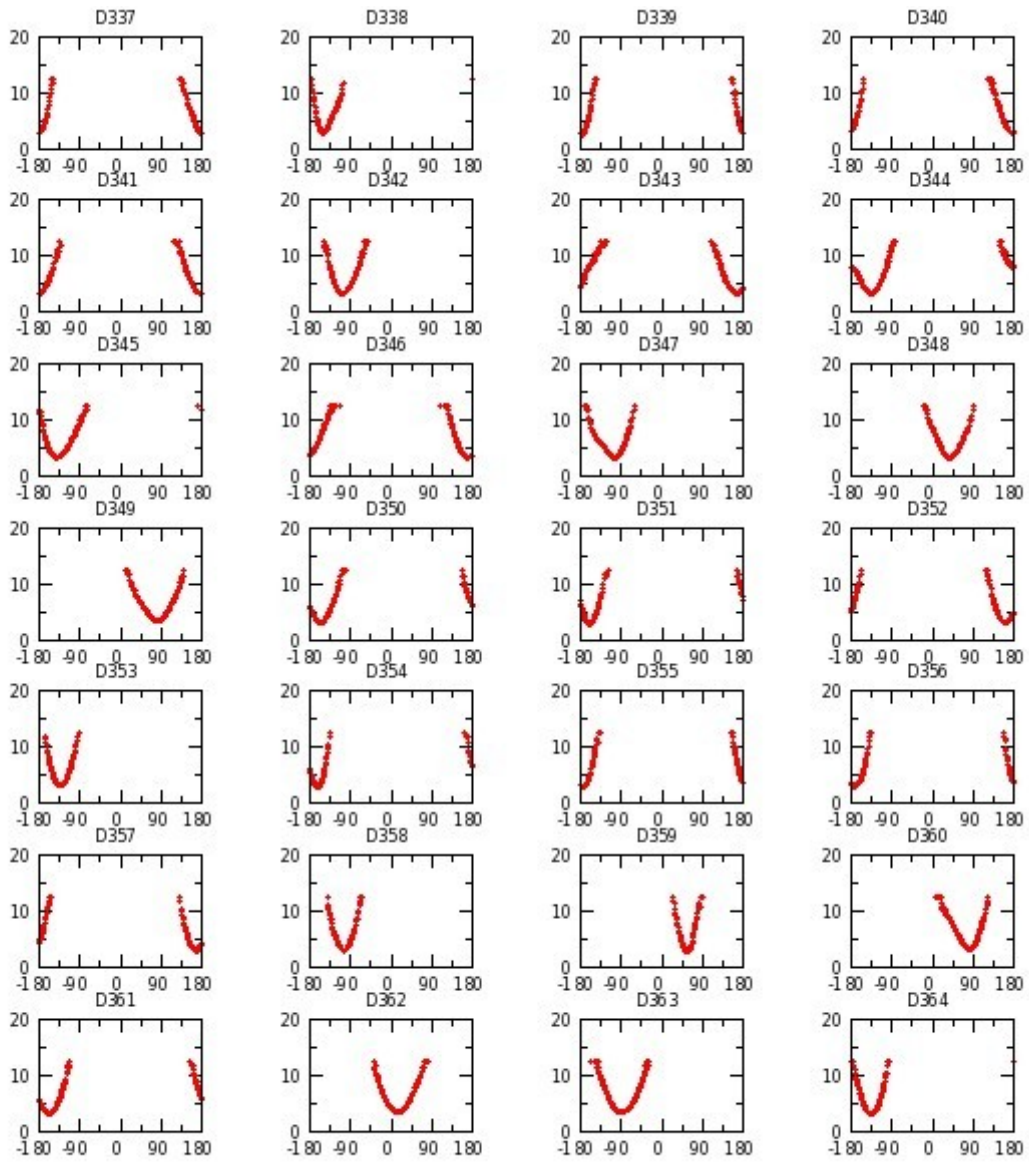


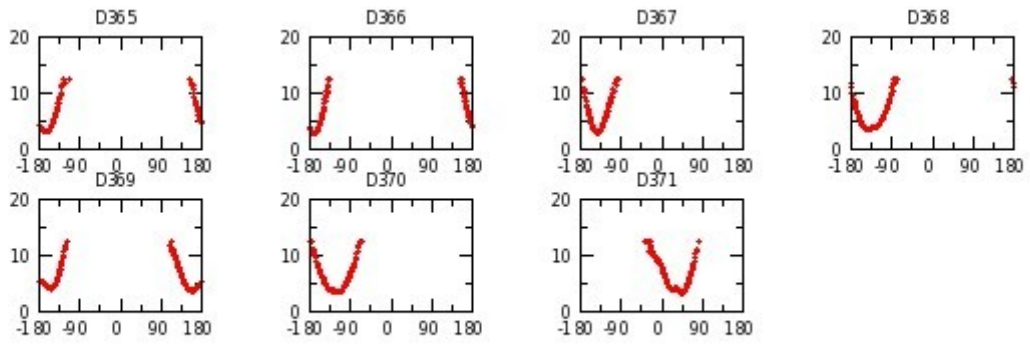




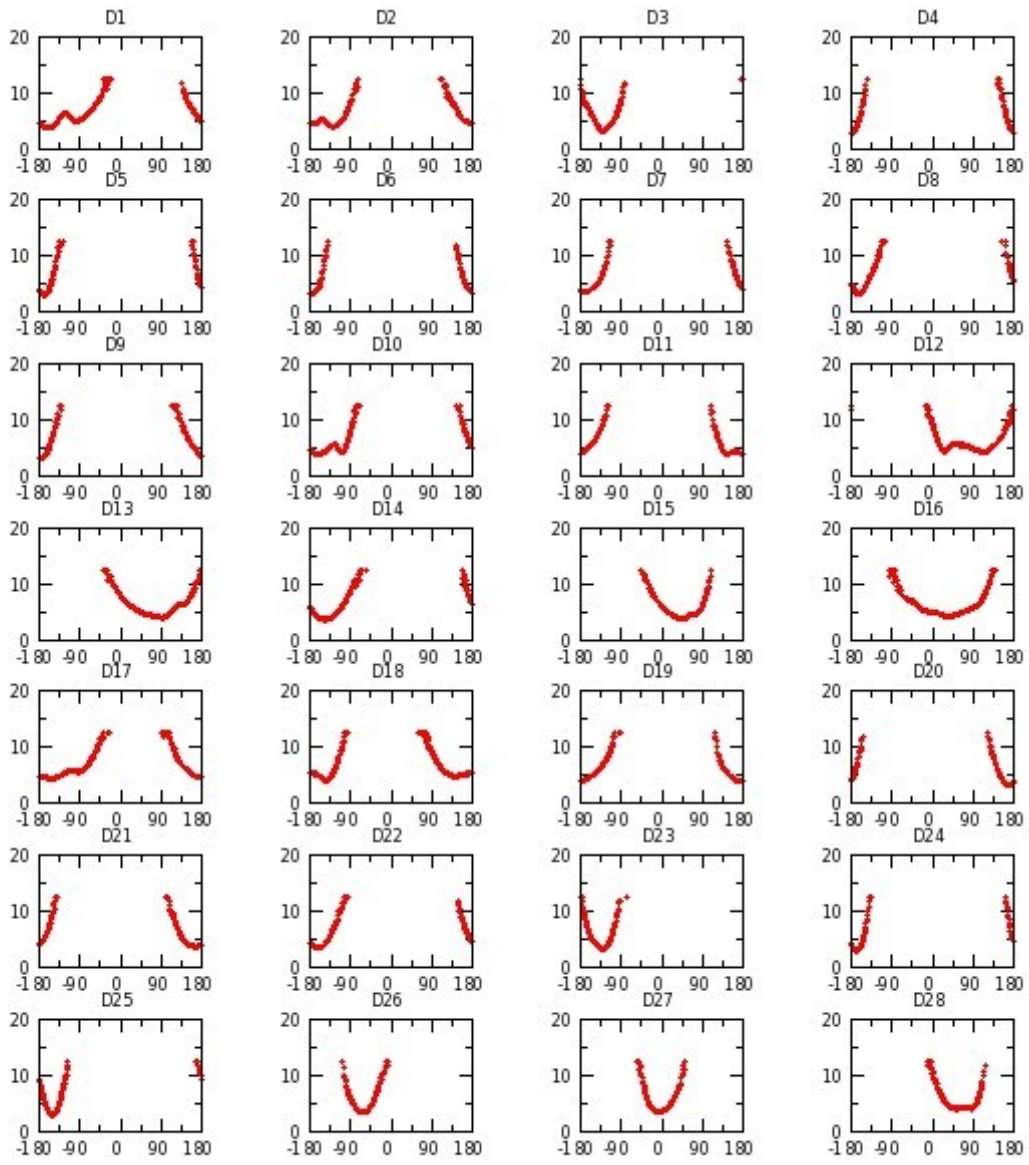


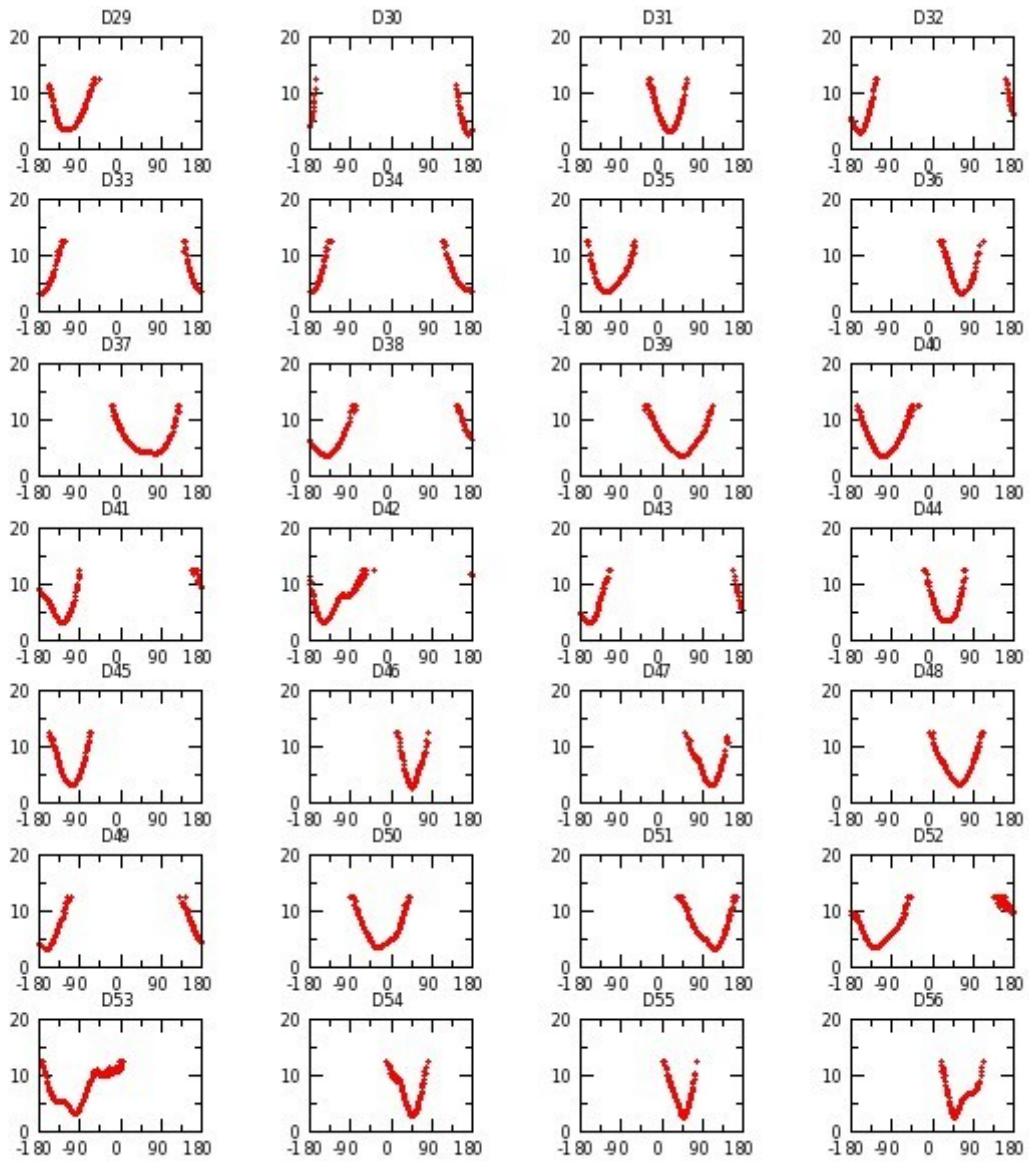


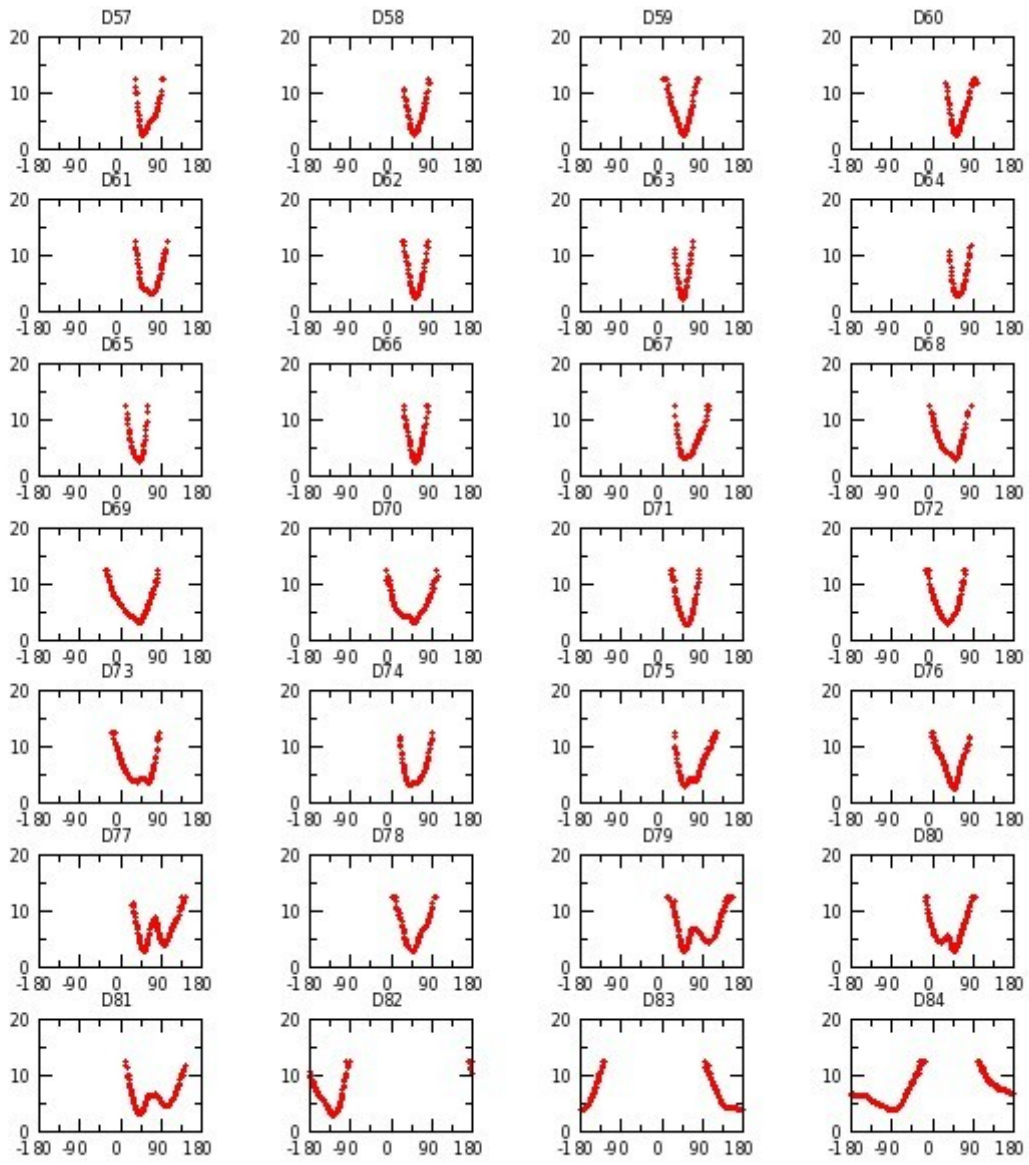


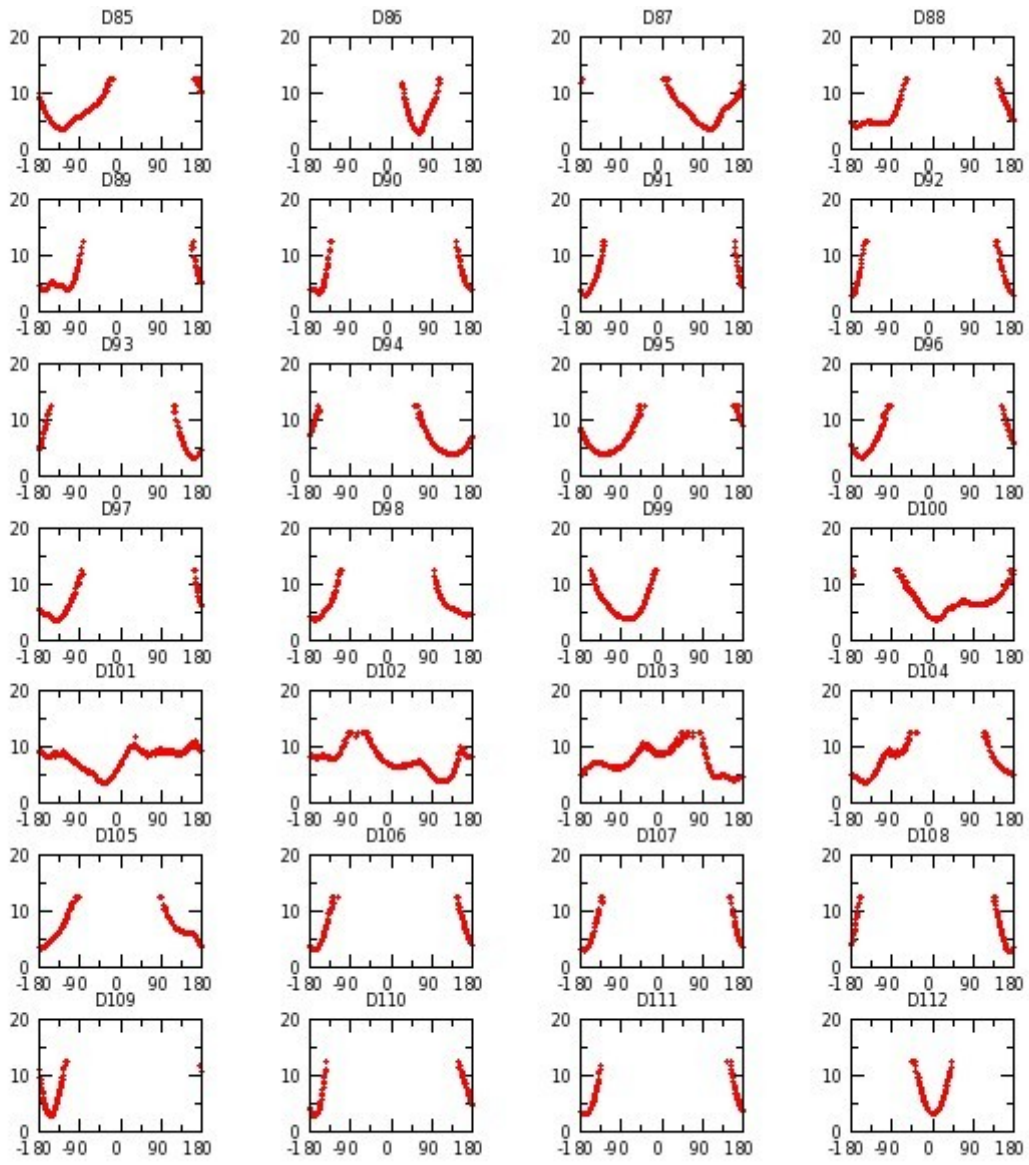


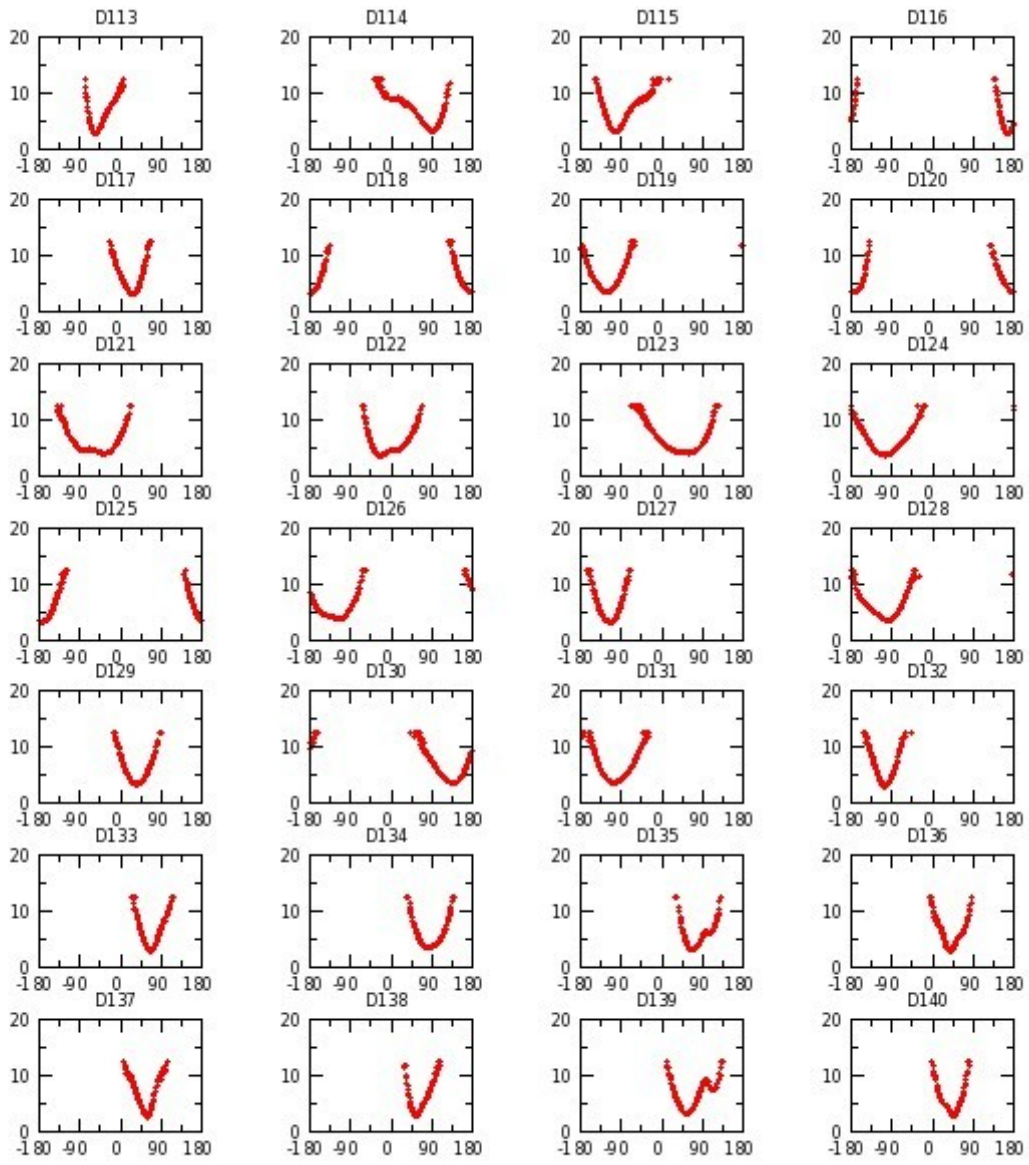
Annexe G 22 : H₂OCH₉ réplique I

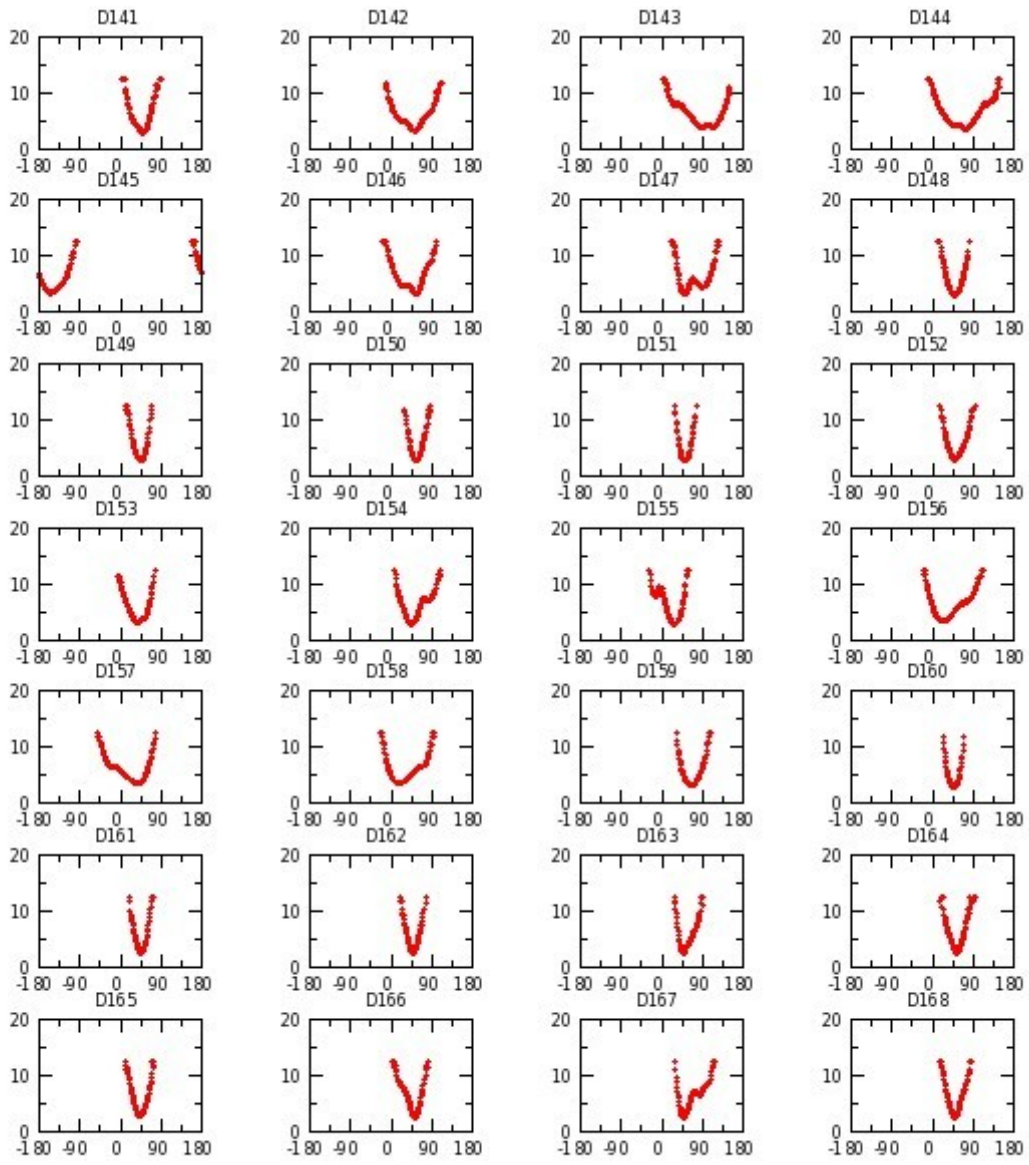


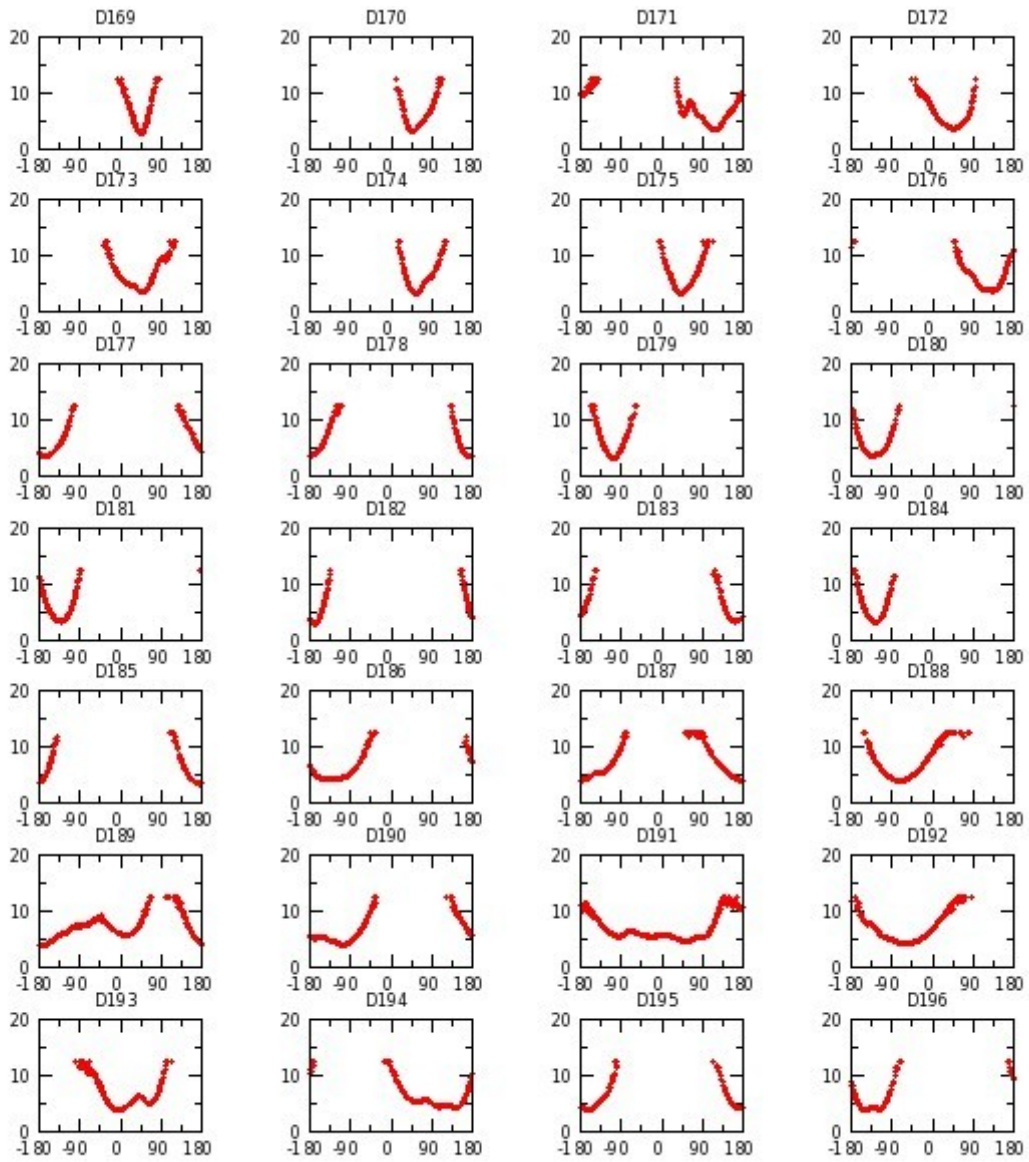


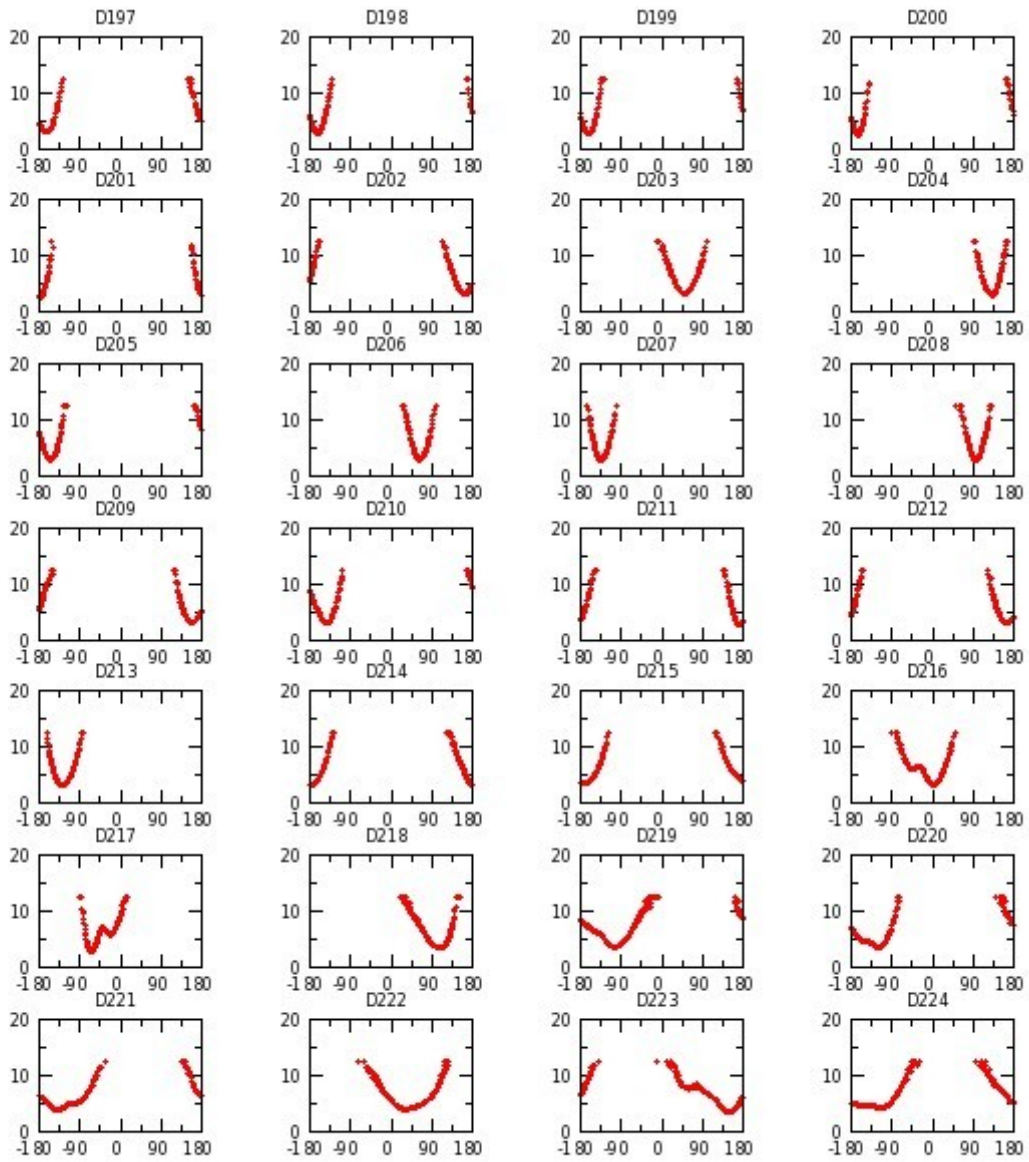


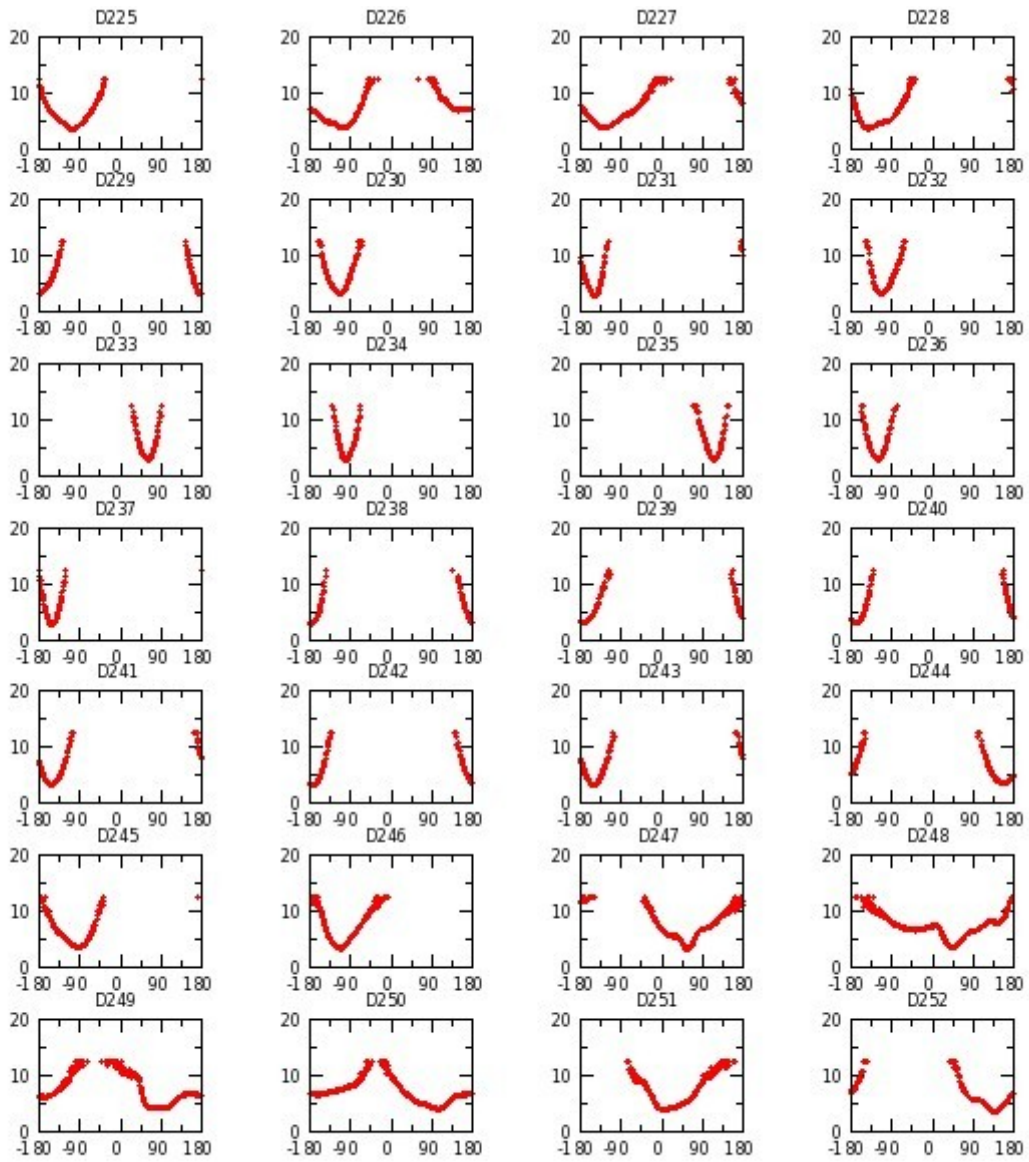


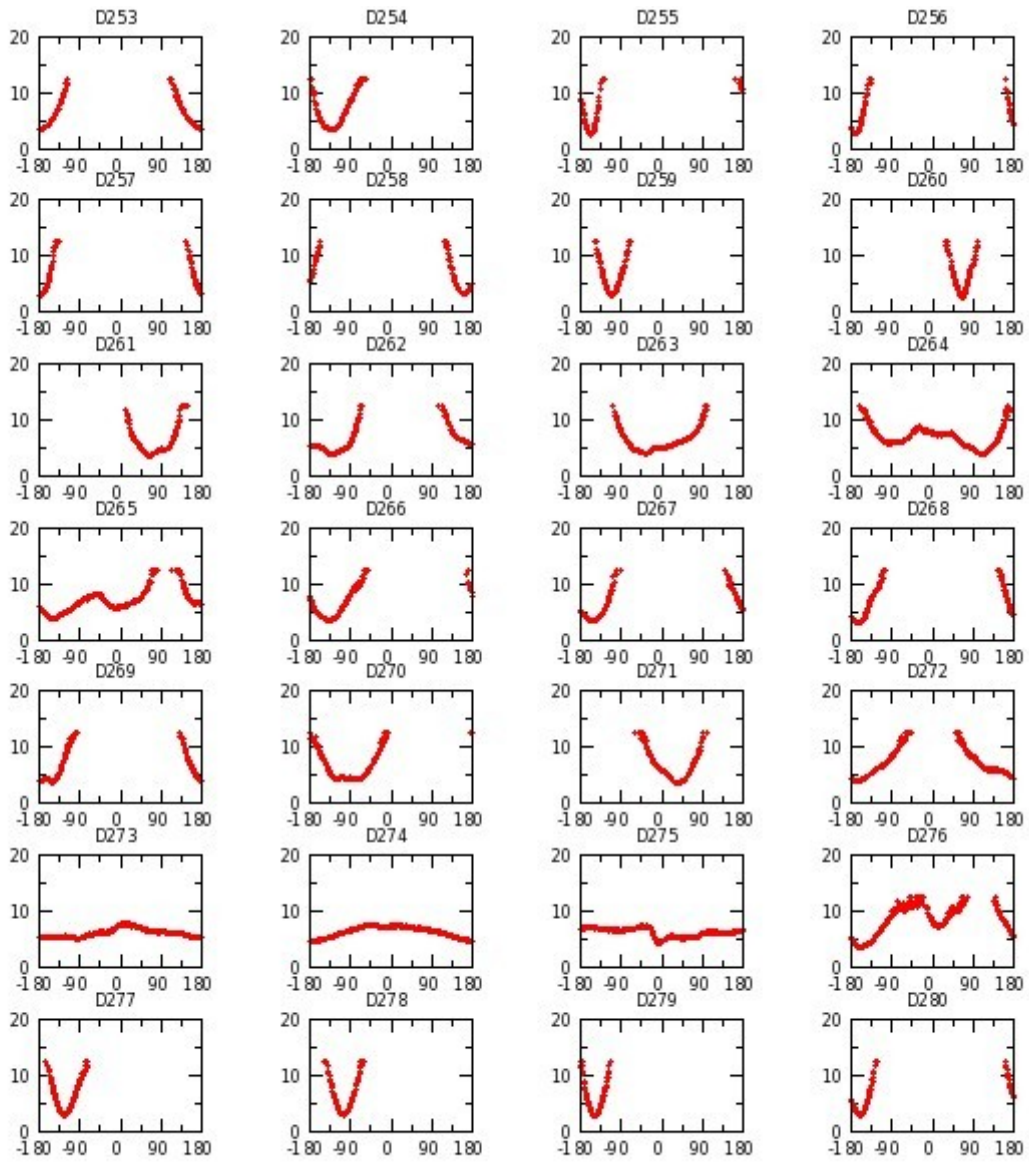


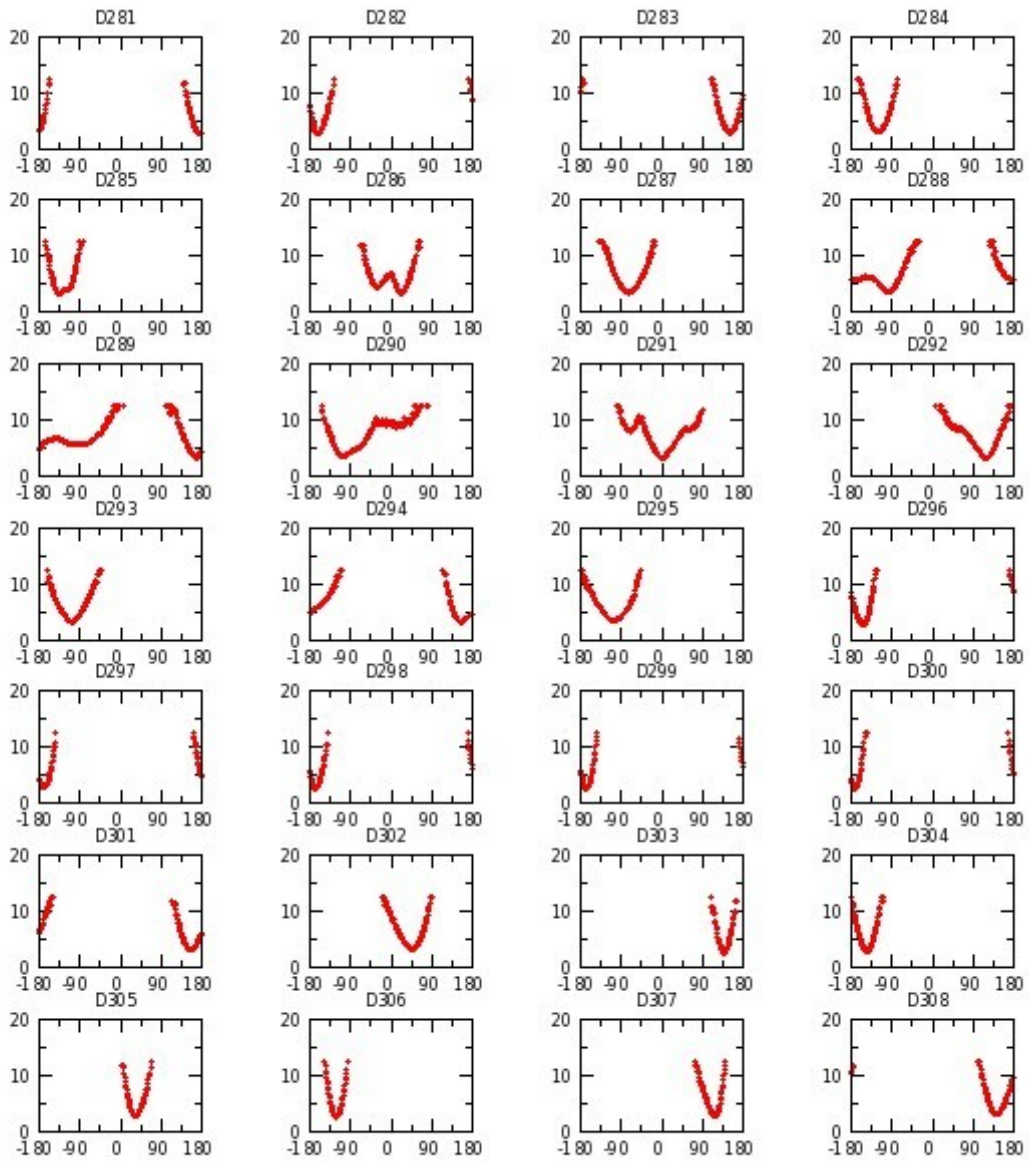


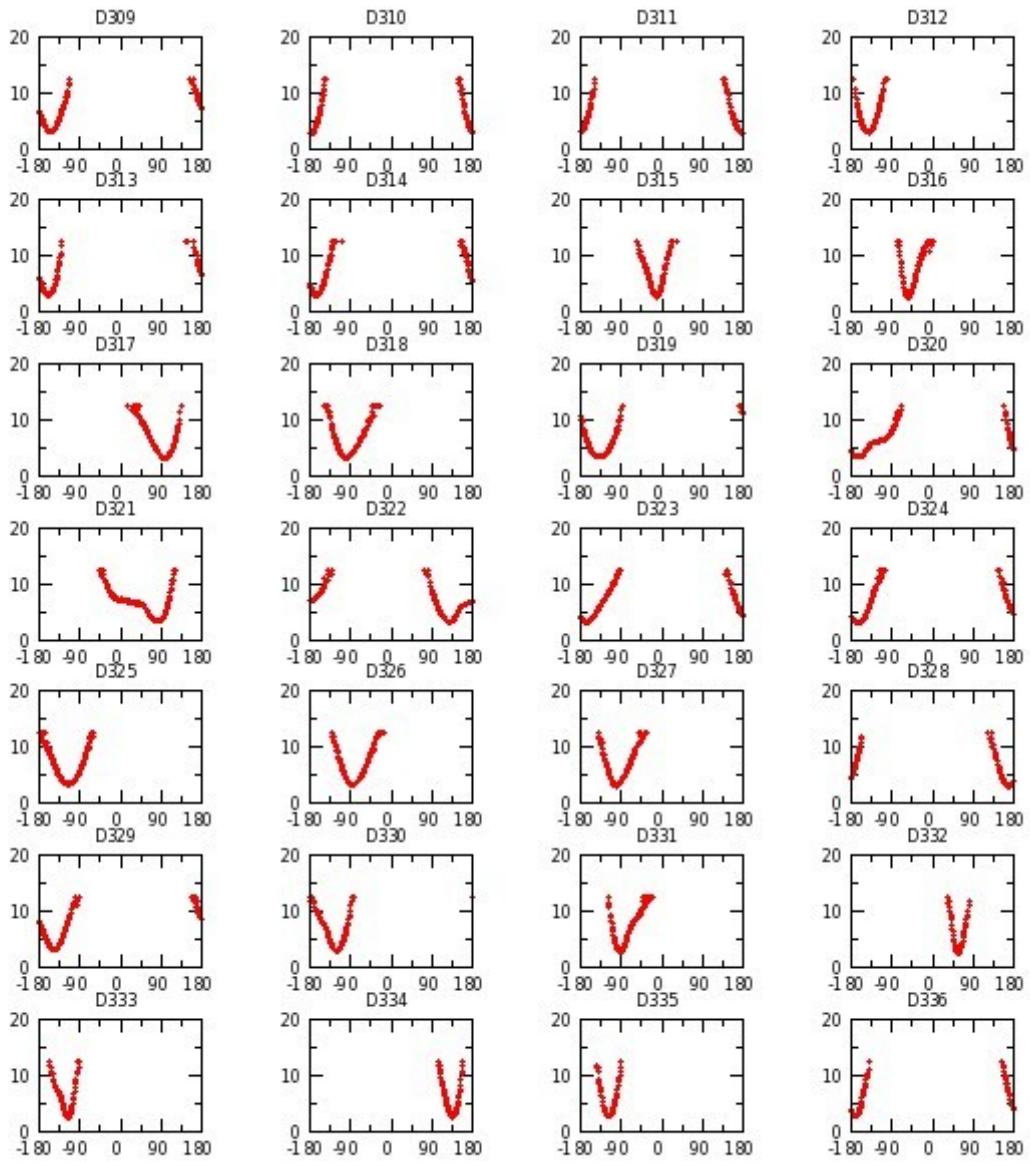


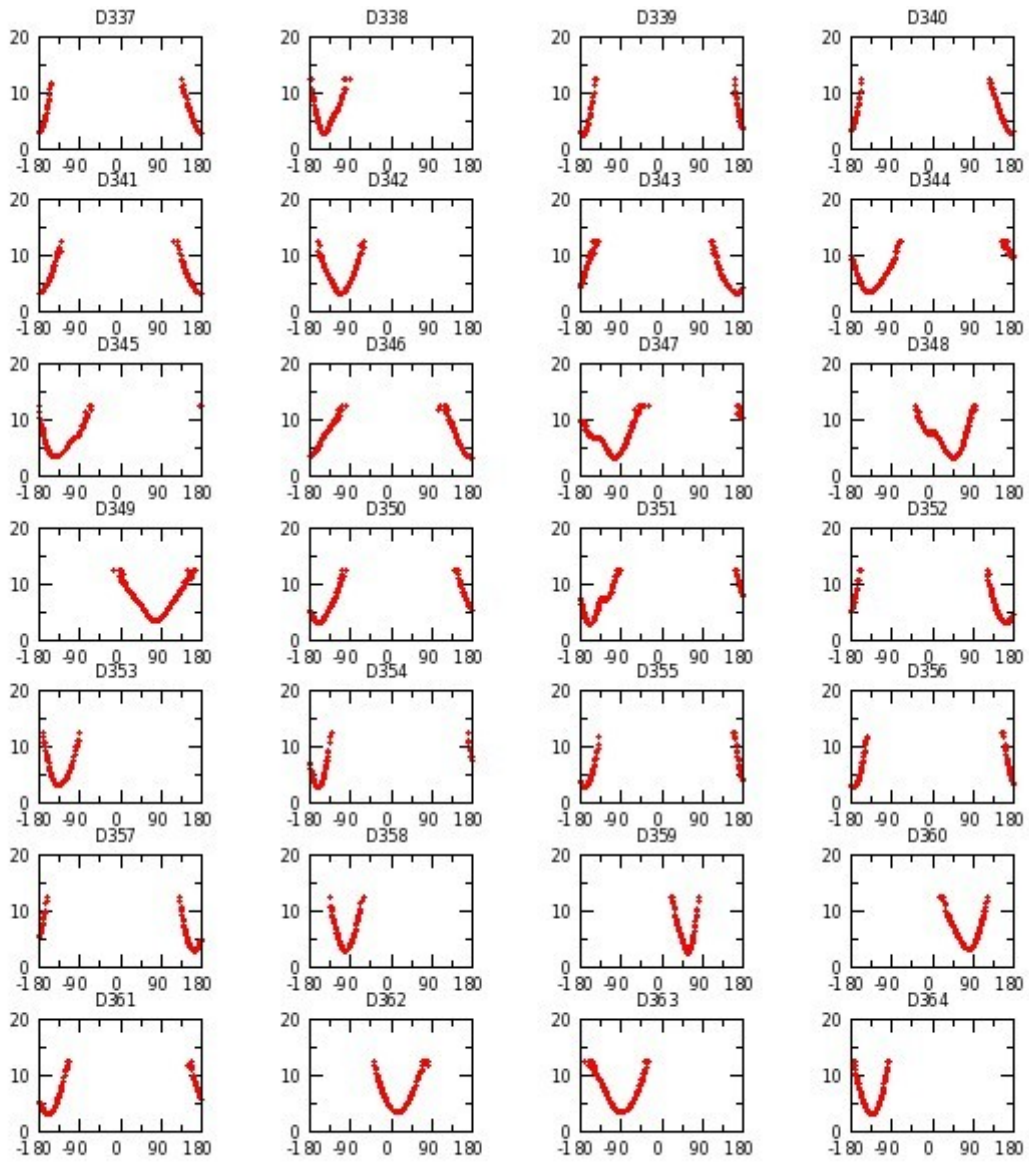


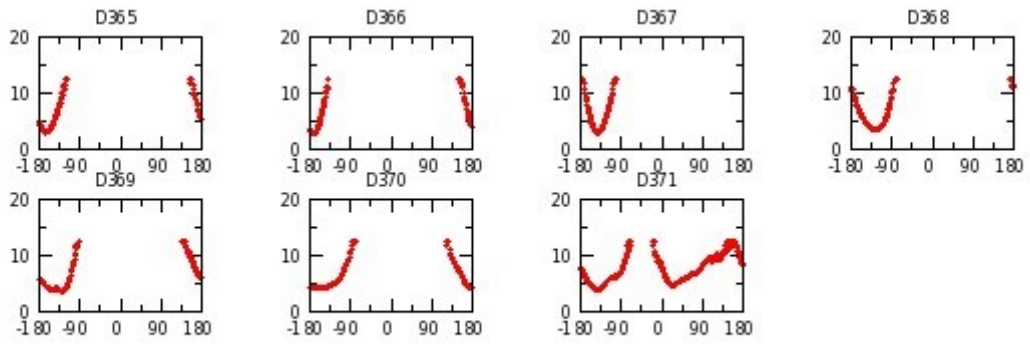




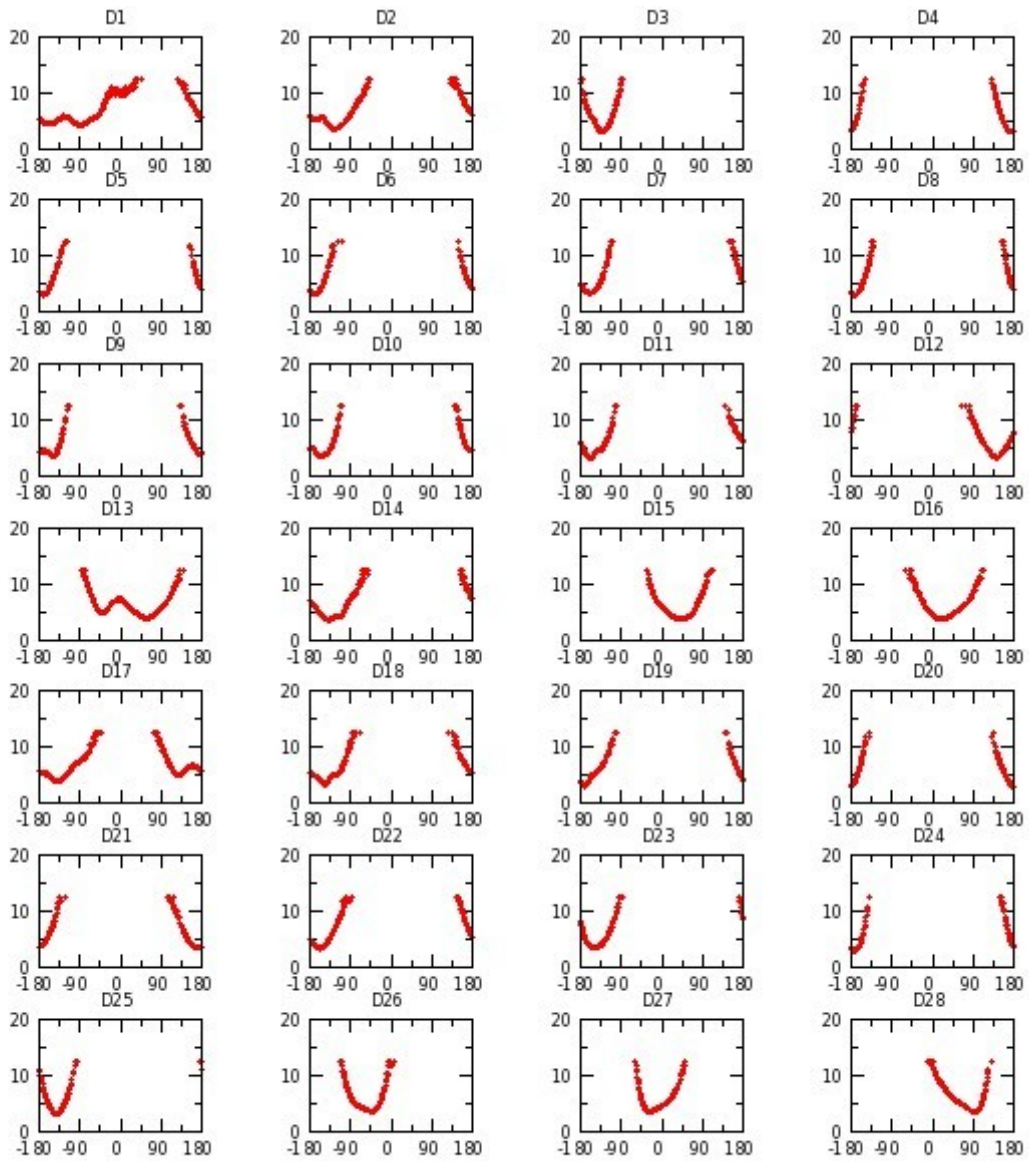


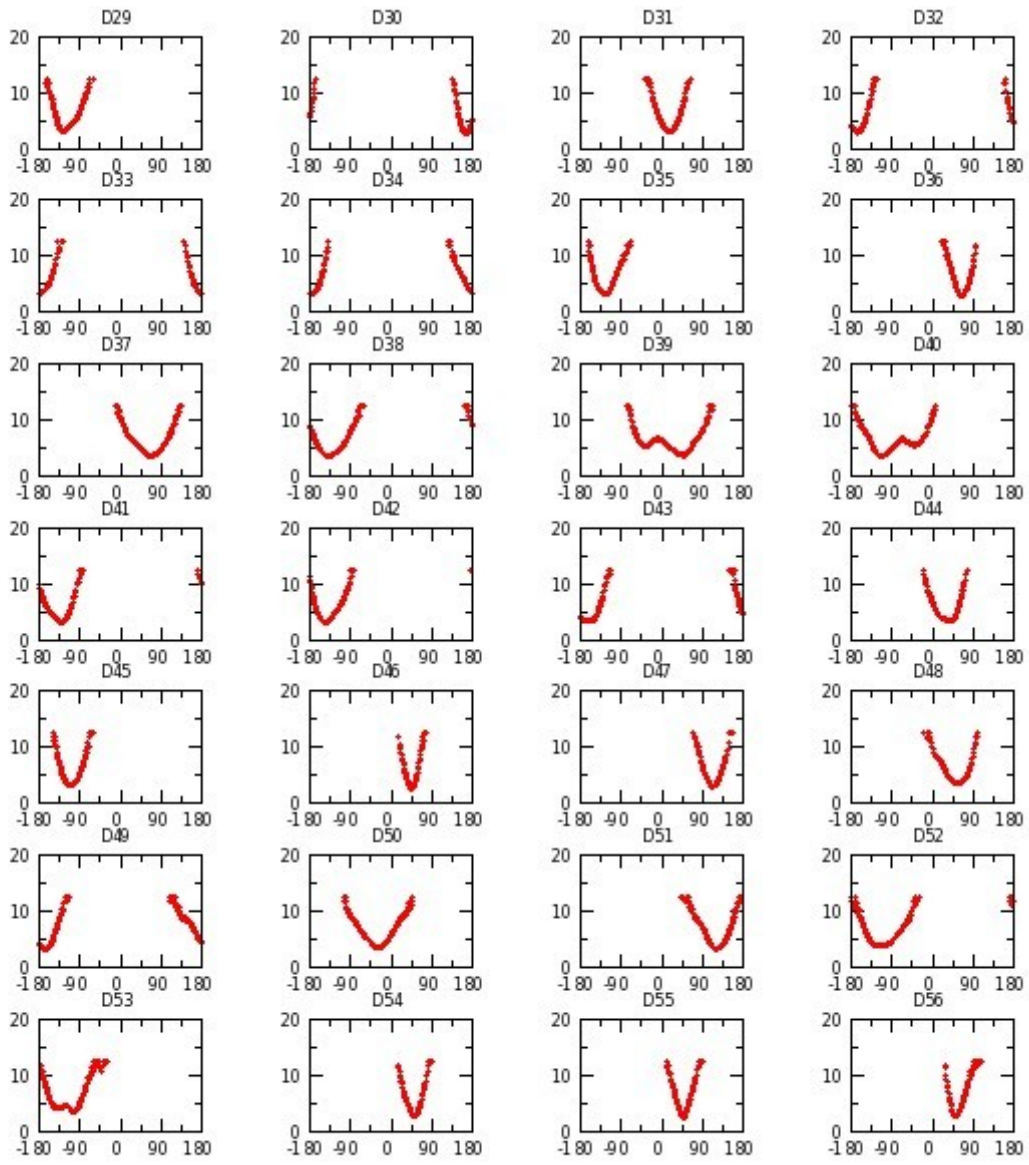


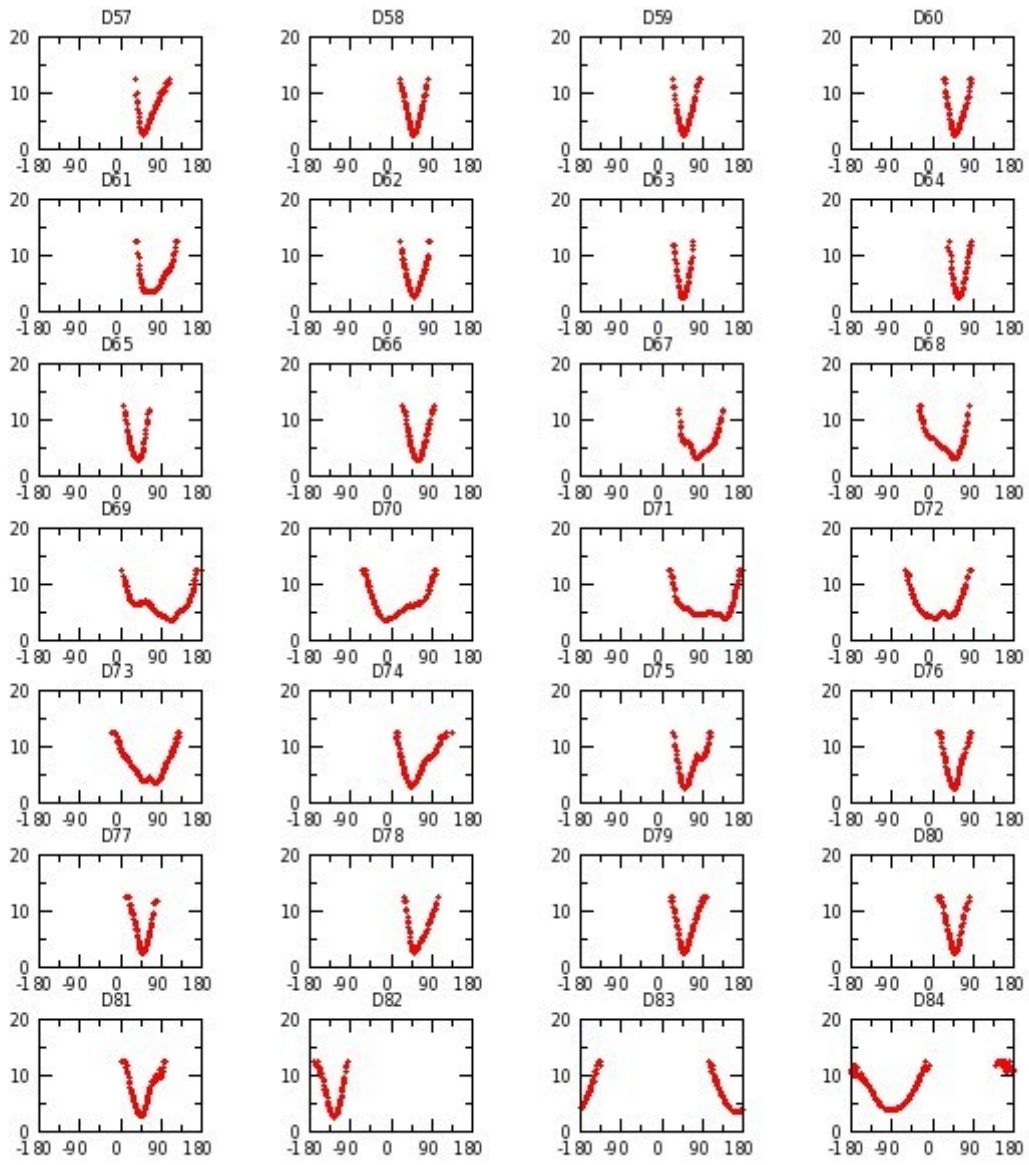


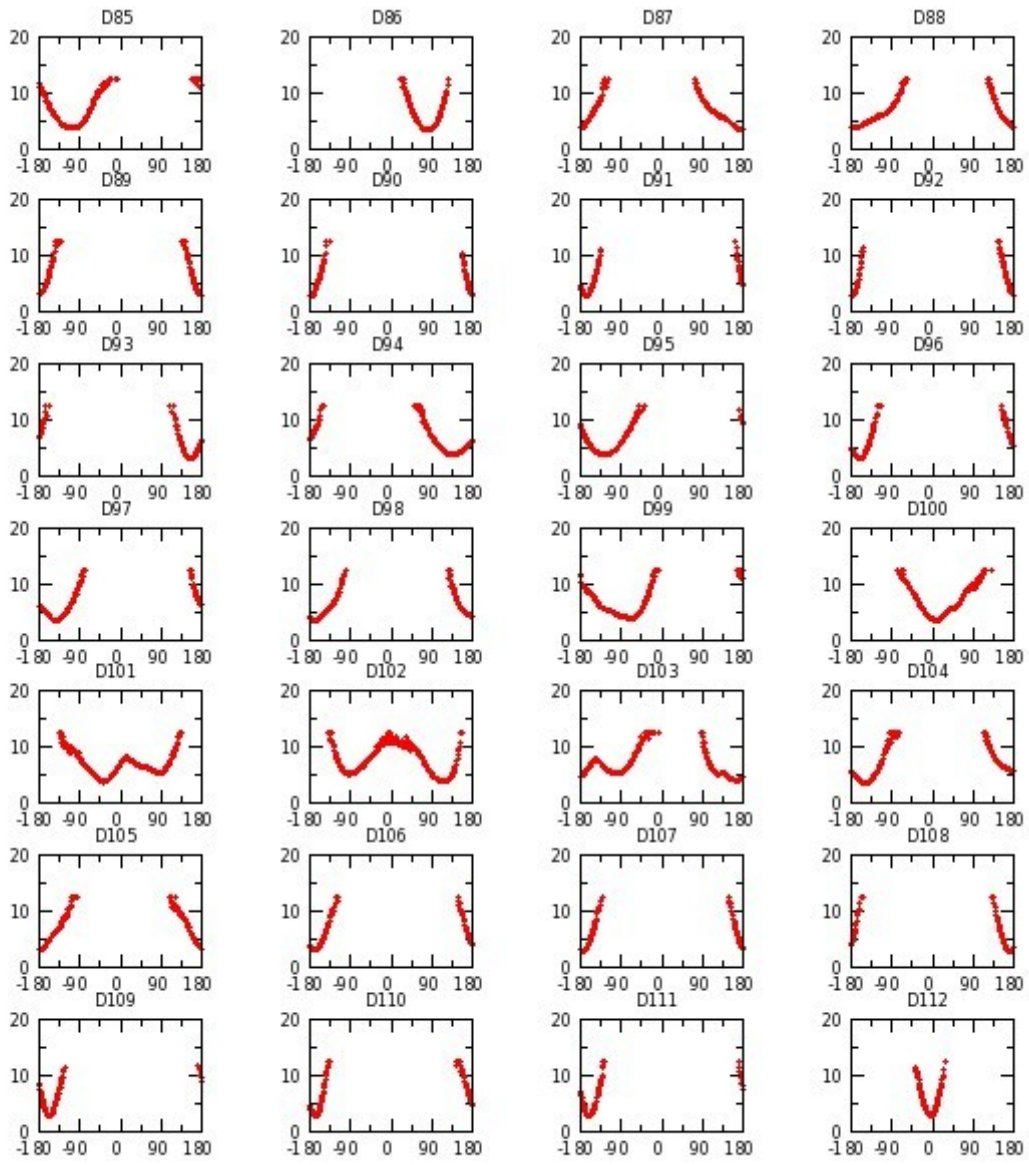


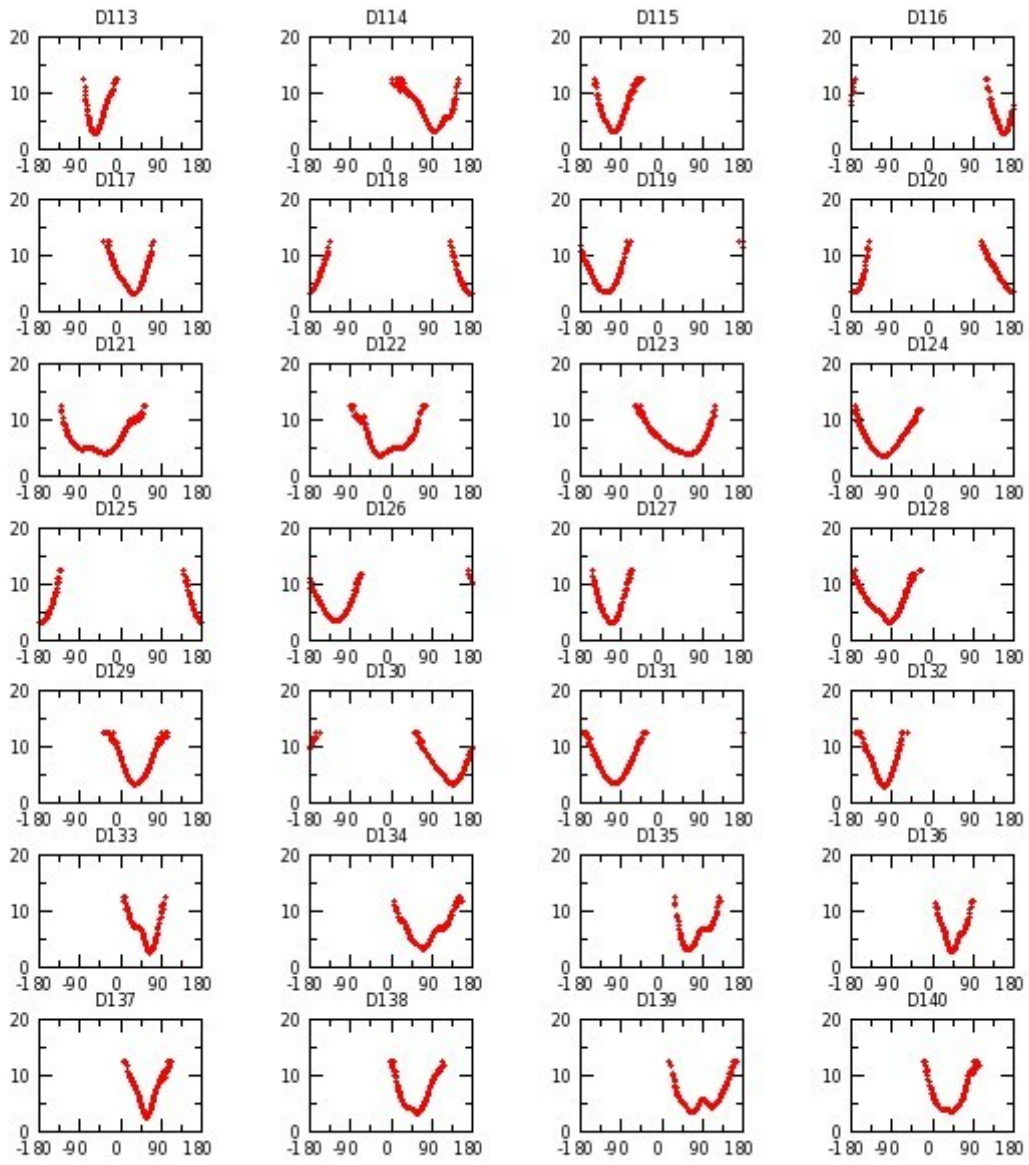
Annexe G 23 : H₂OCH₉ réplique II

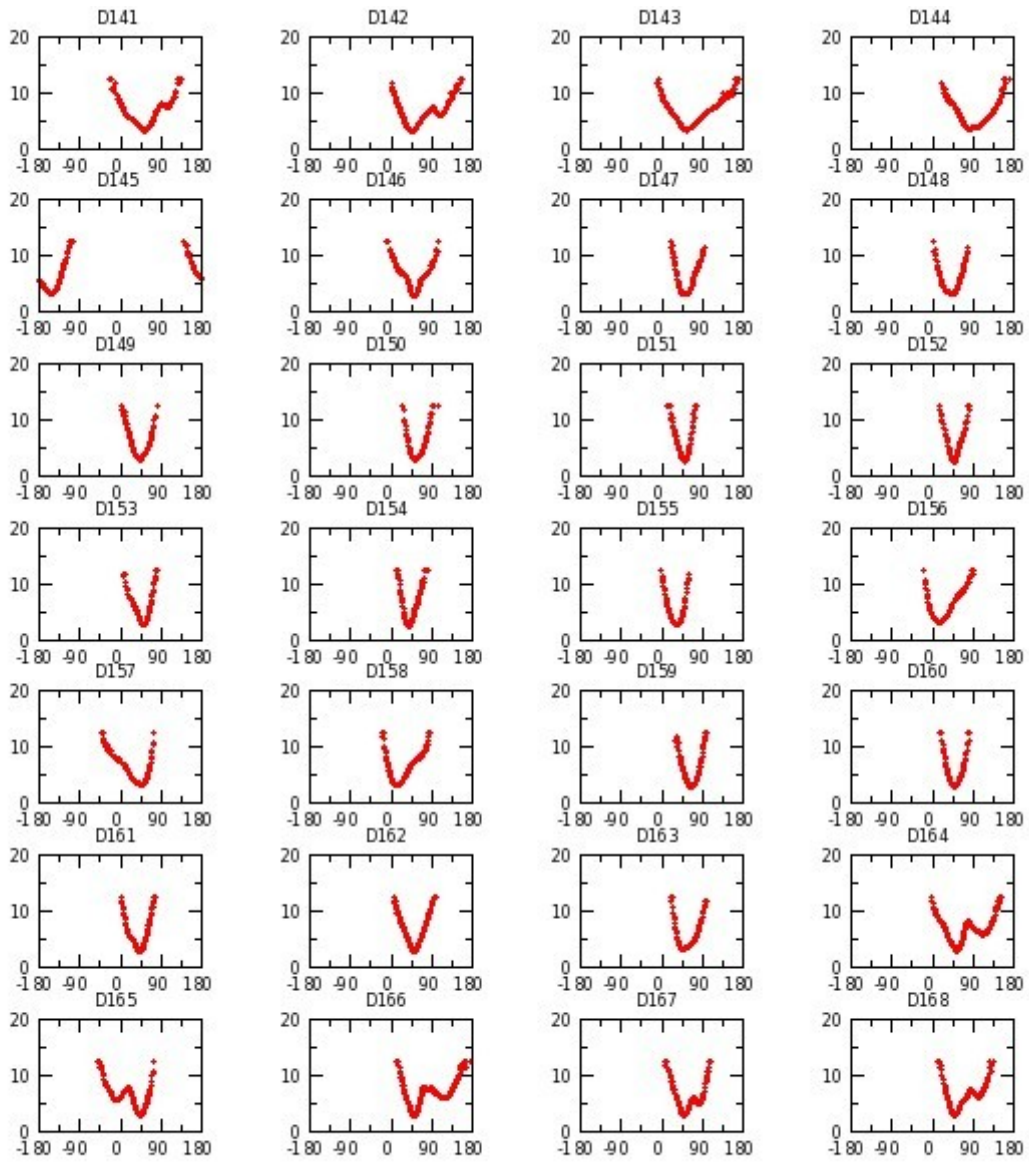


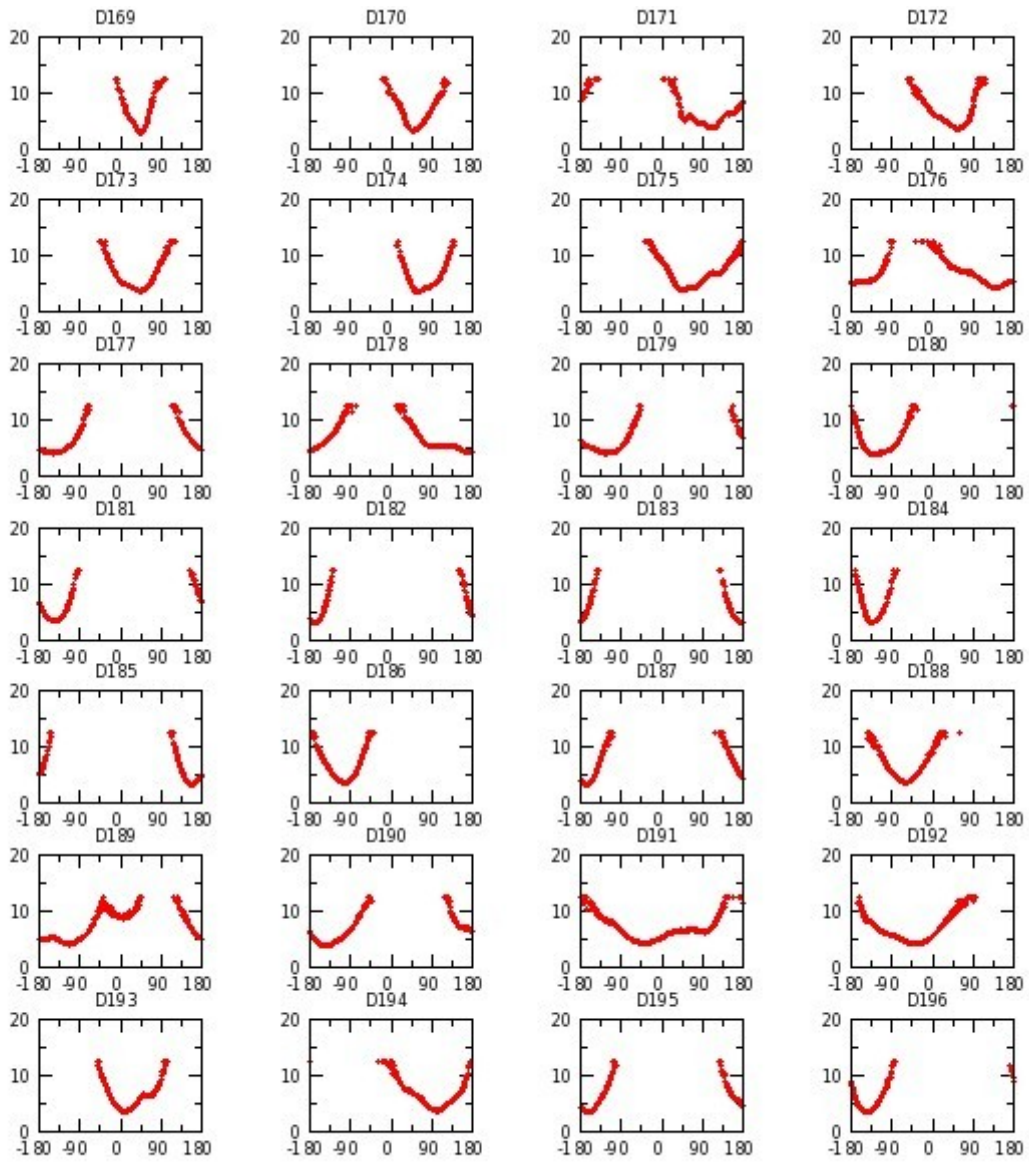


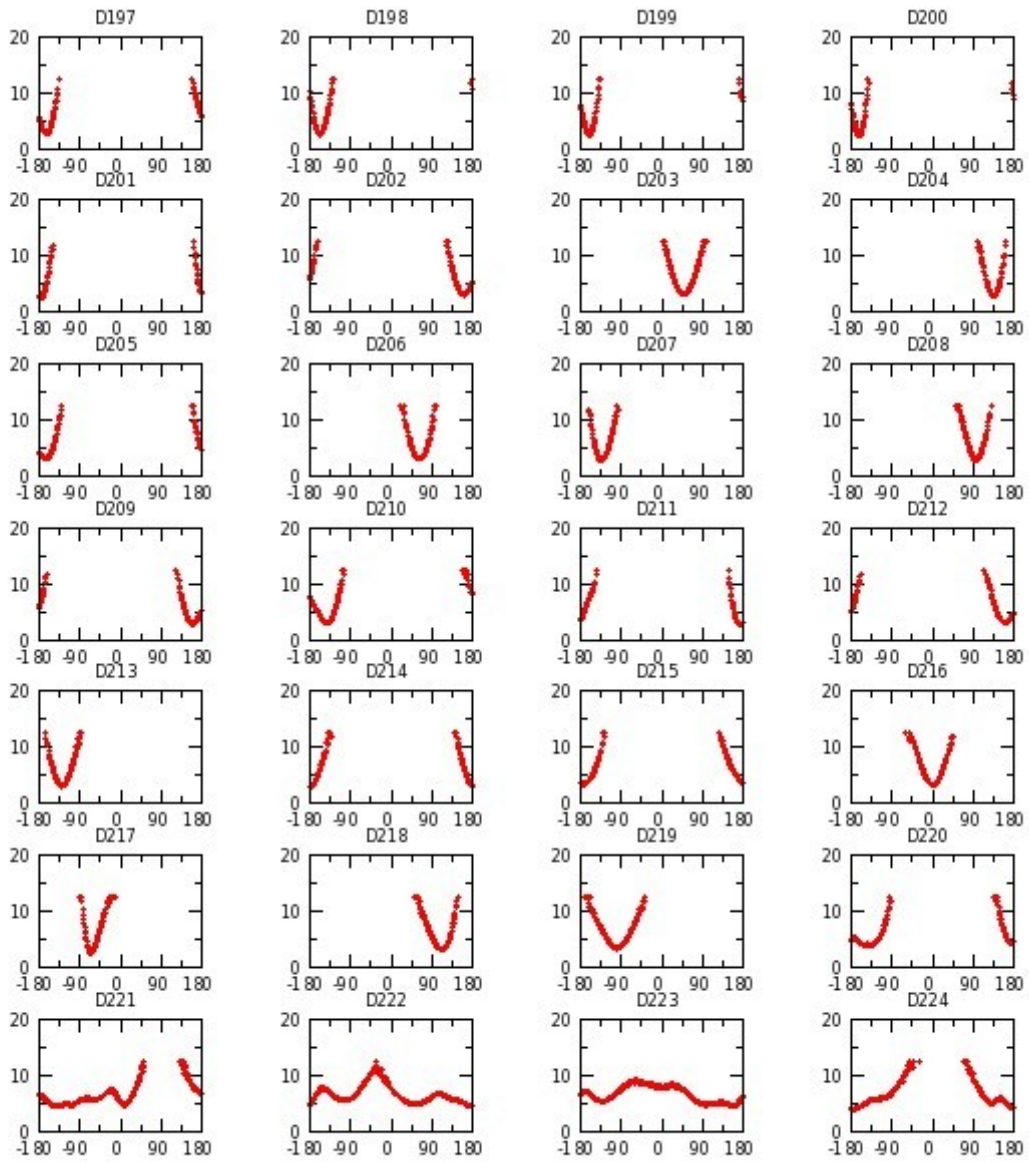


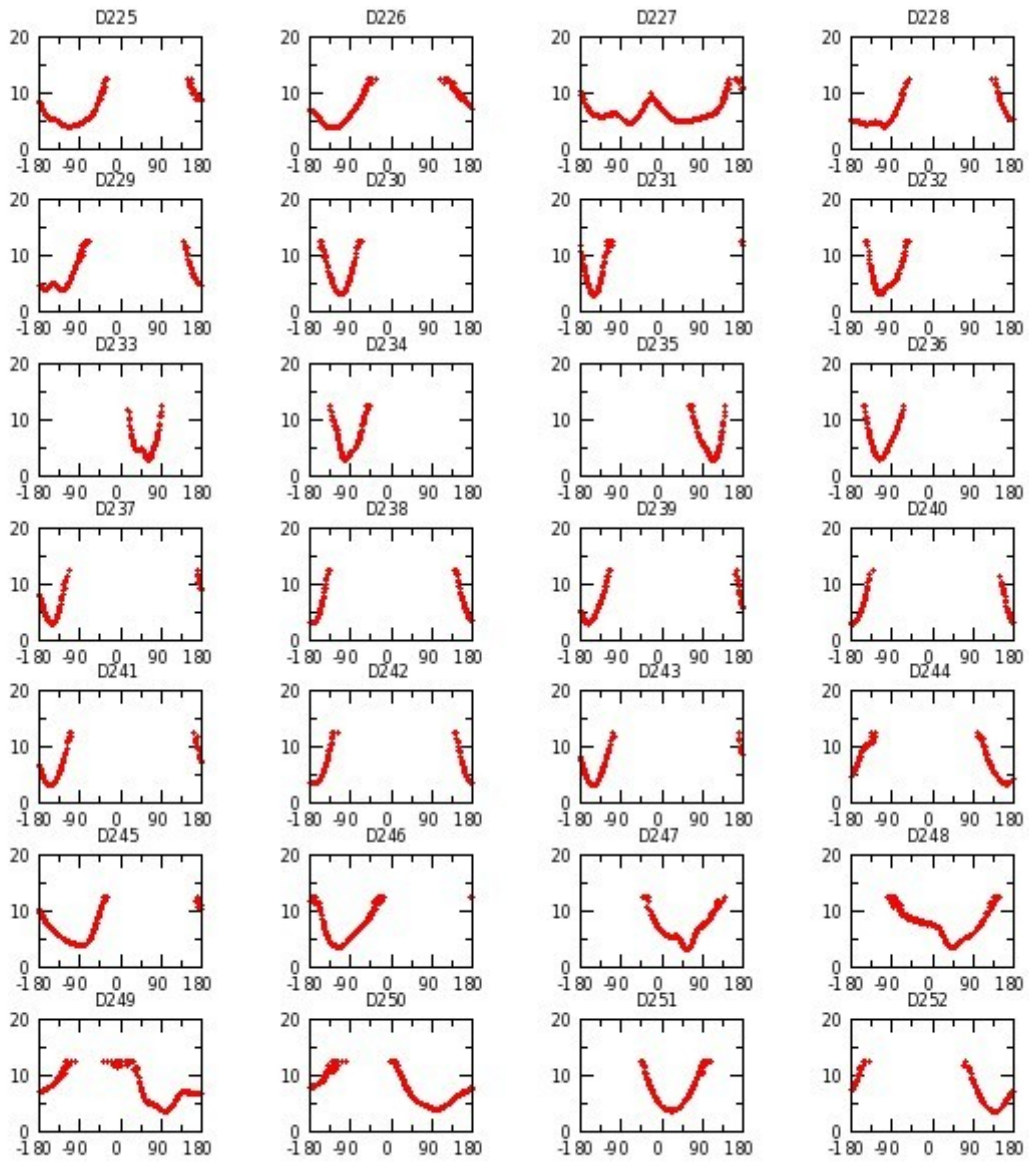


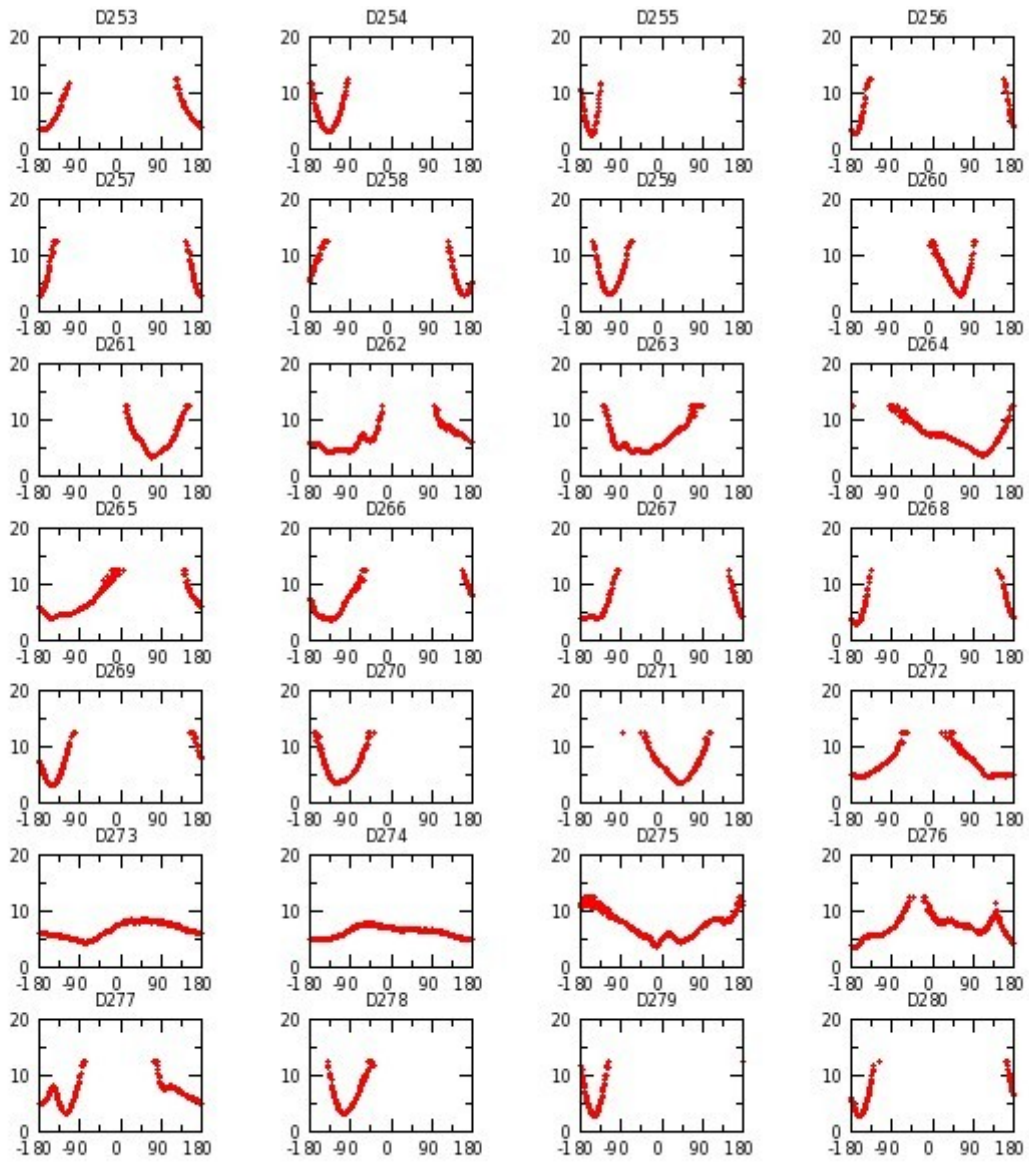


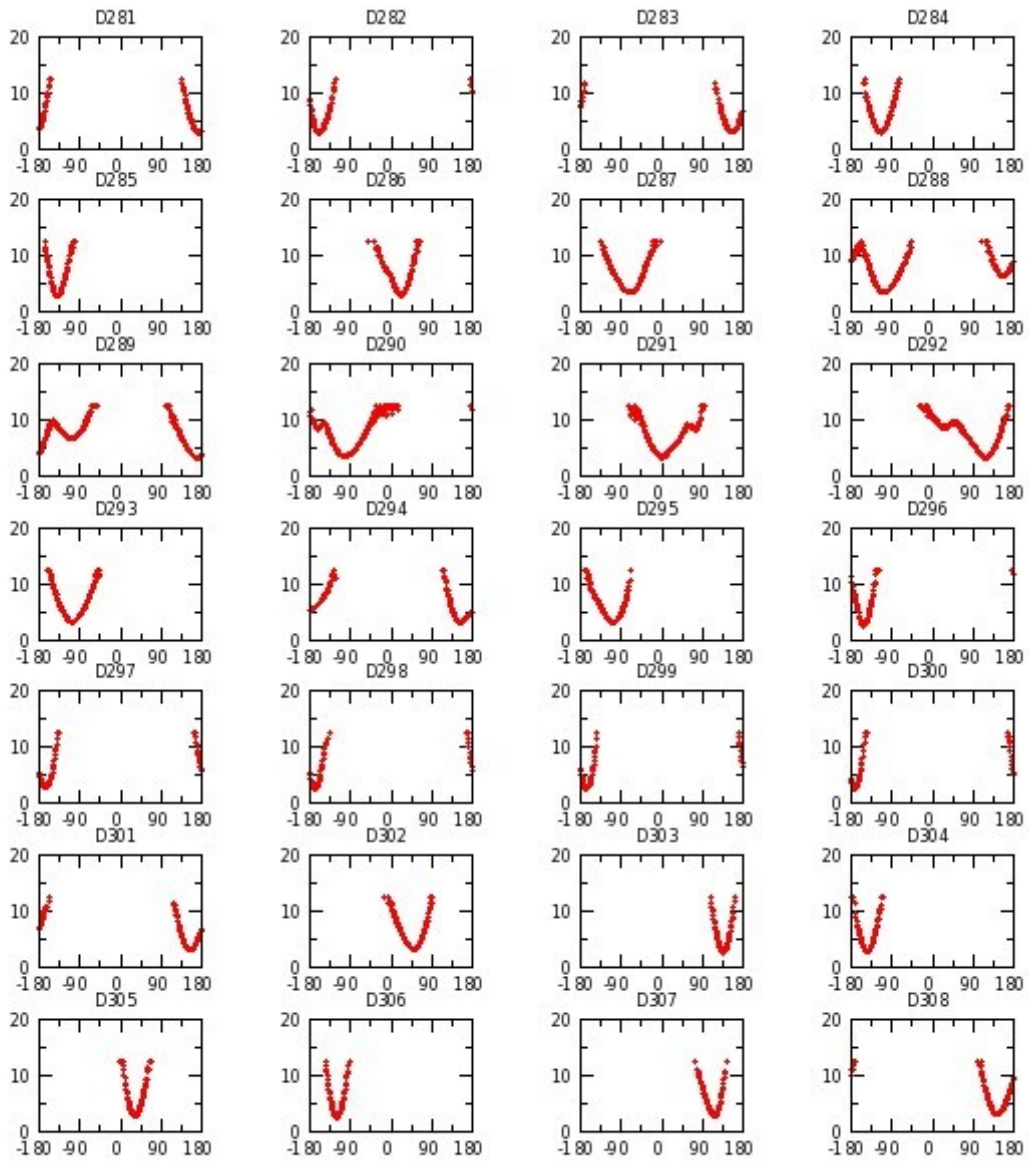


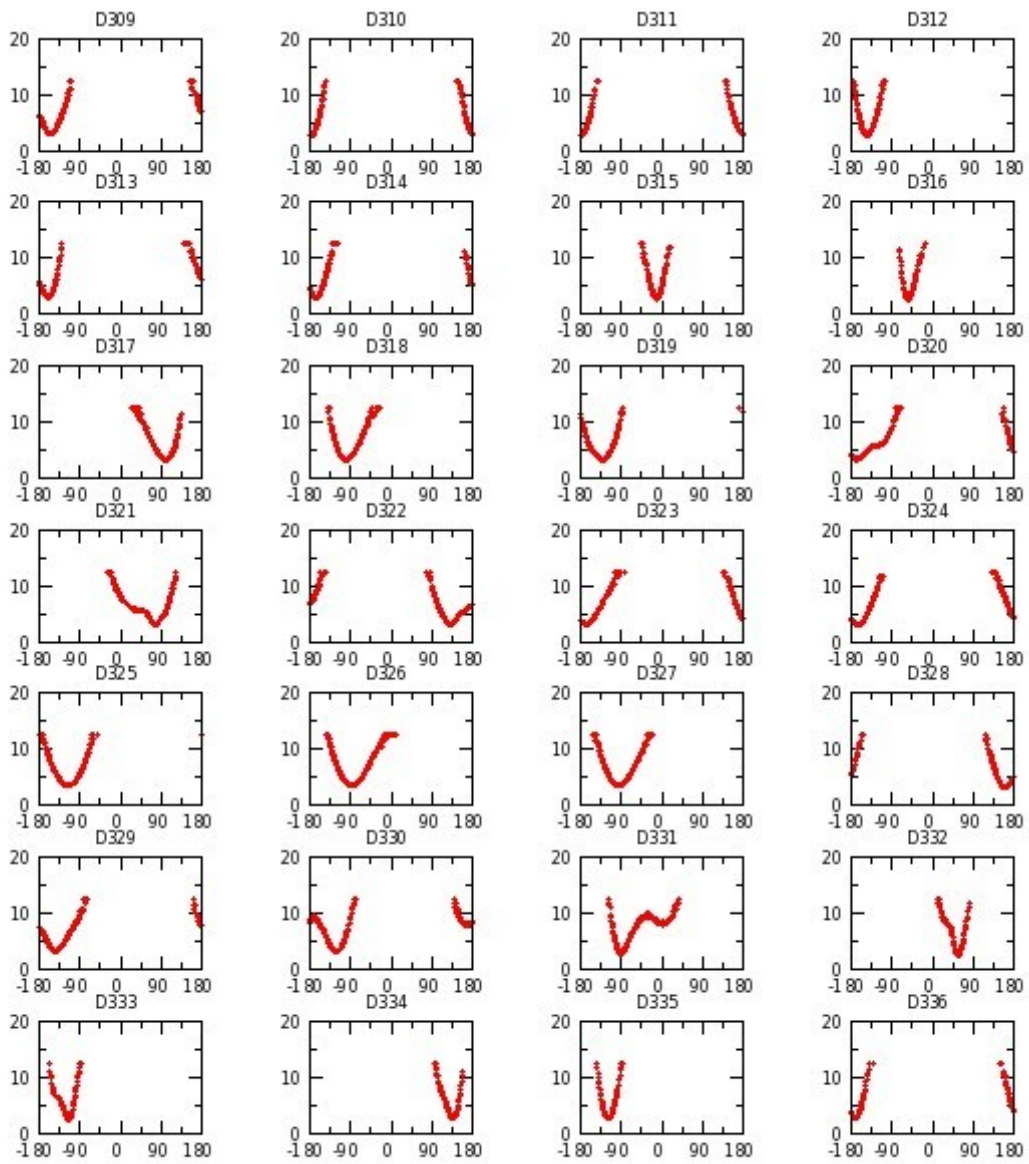


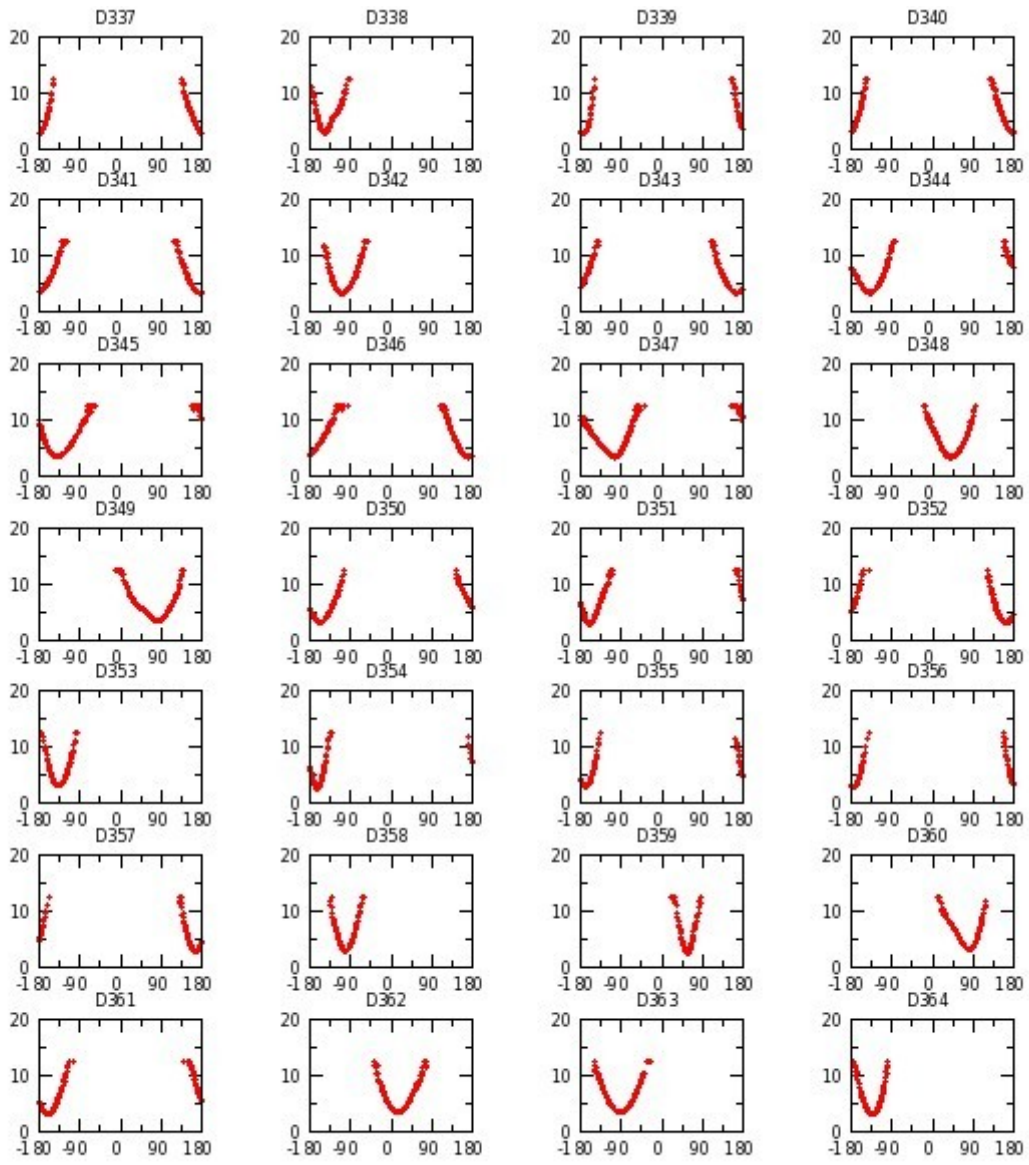


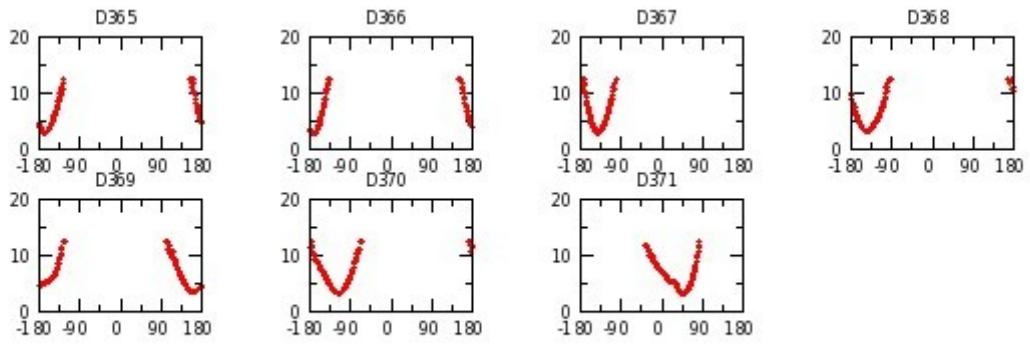




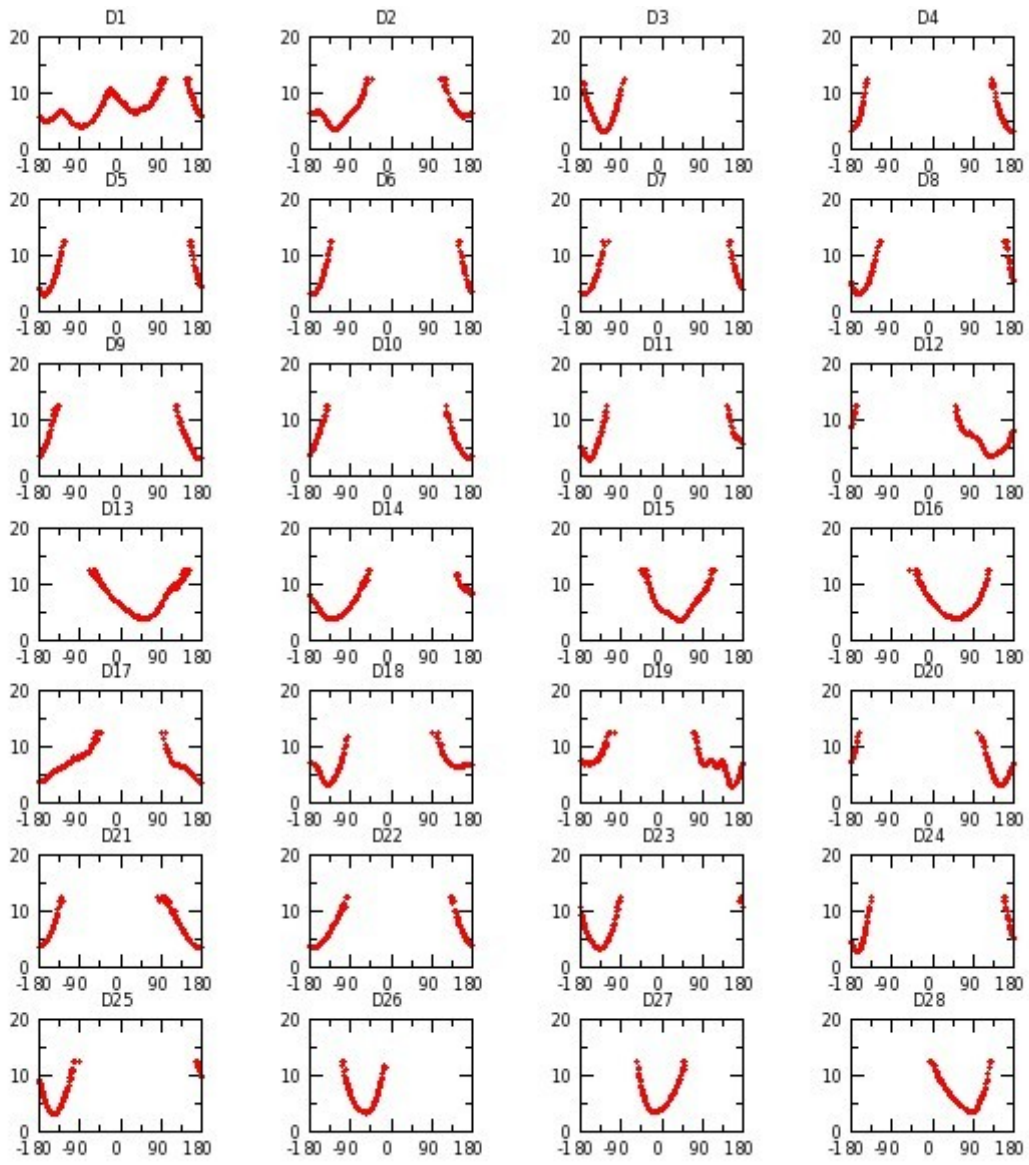


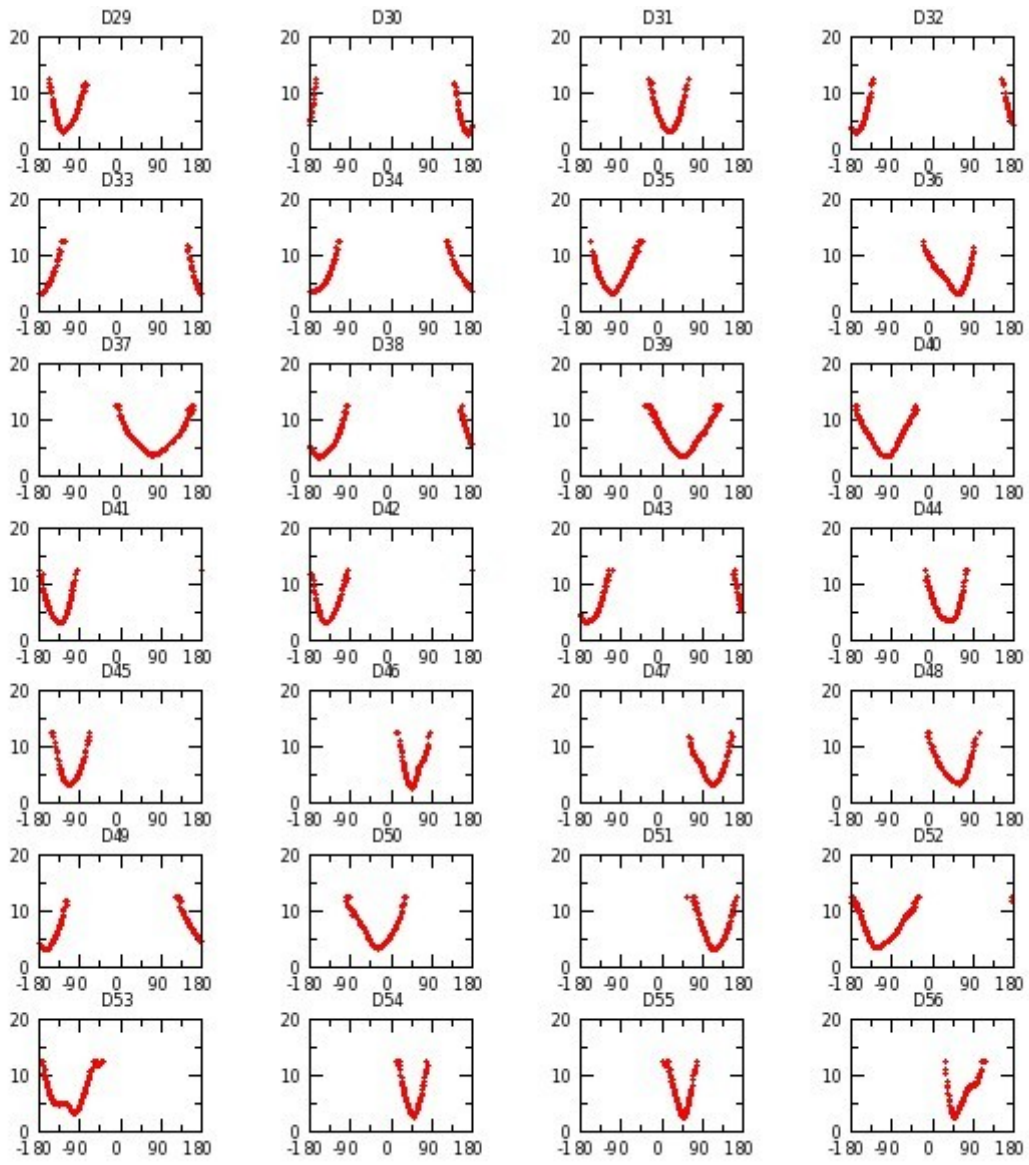


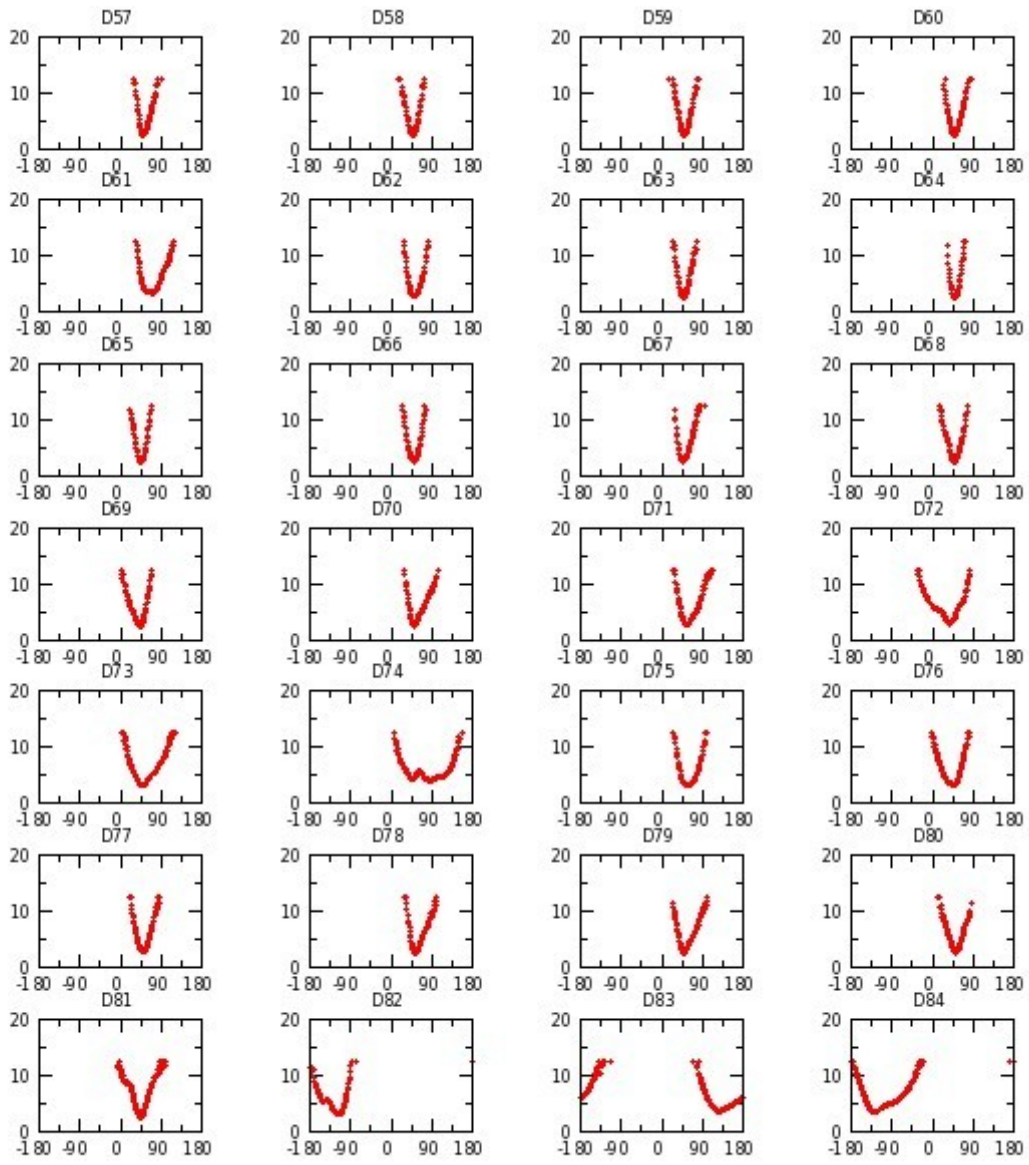


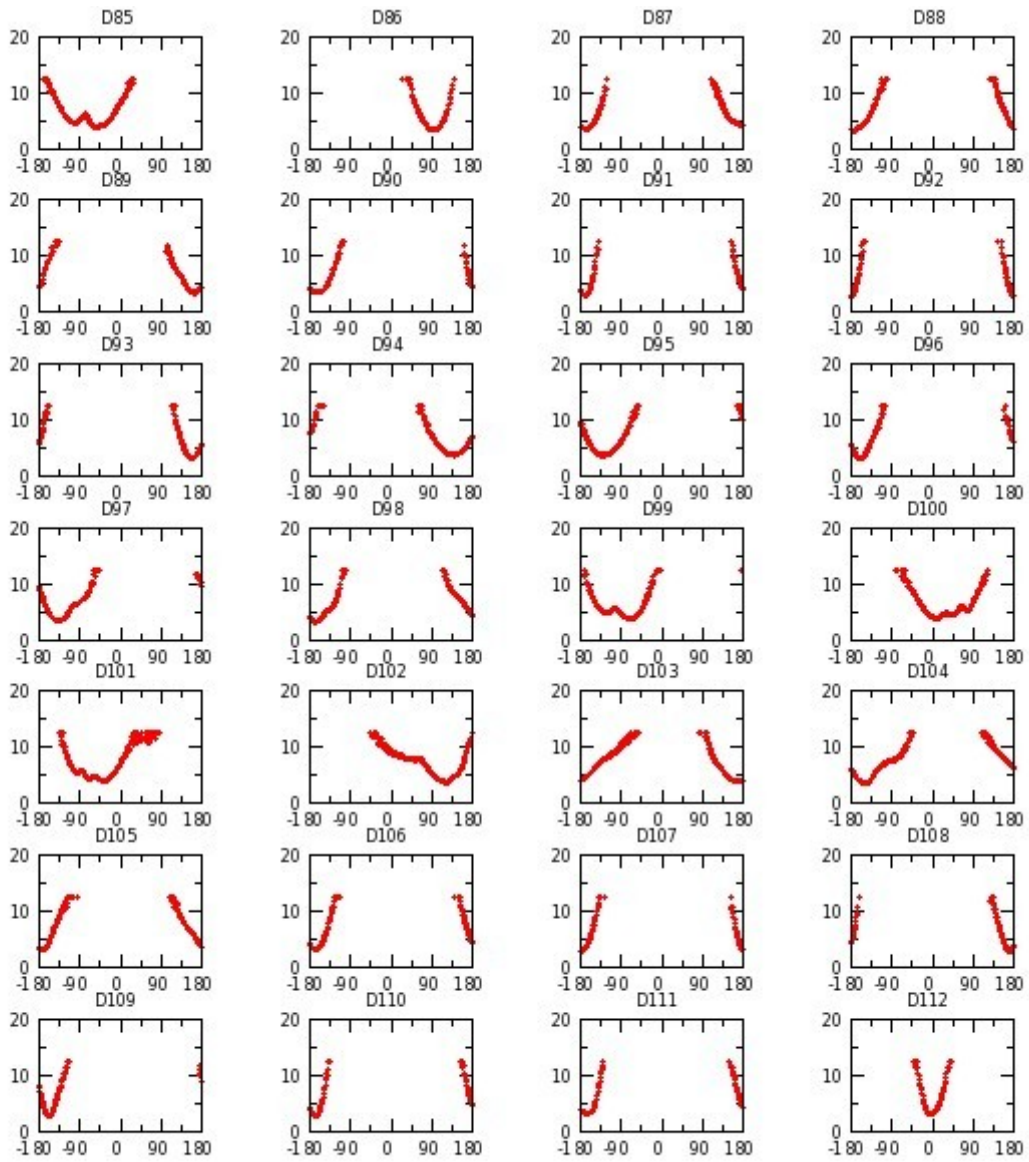


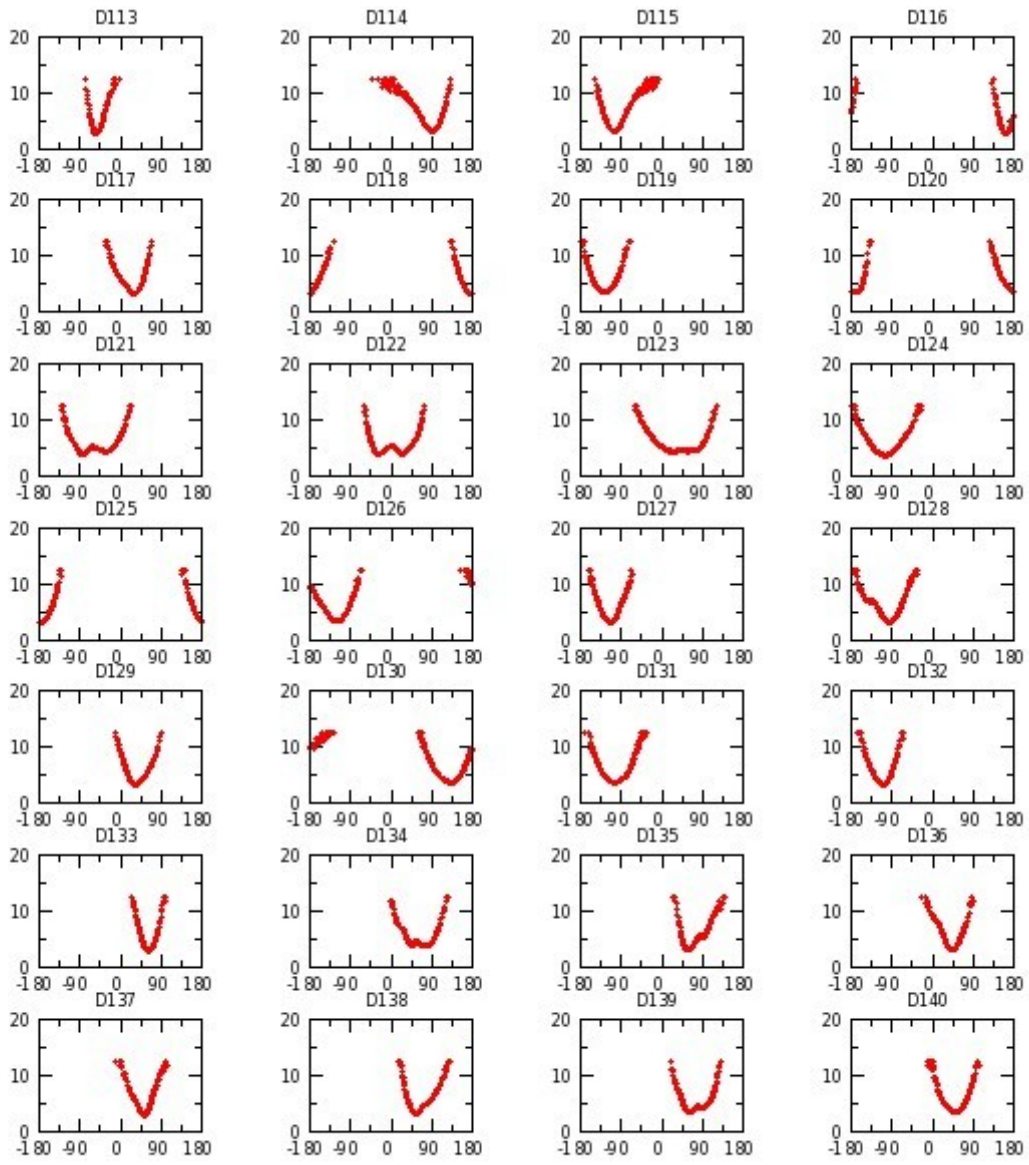
Annexe G 24 : H₂OCH₉ réplique III

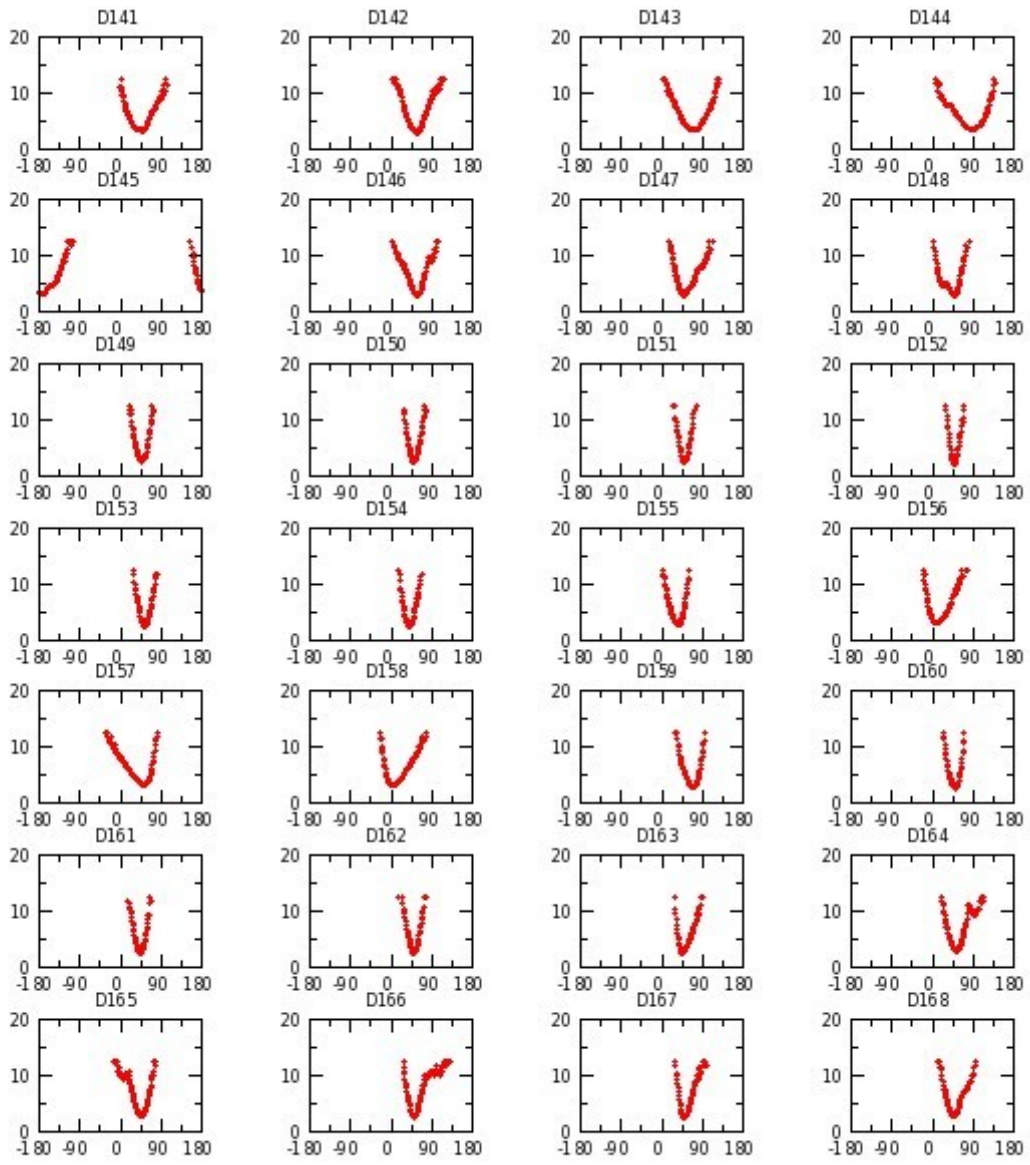


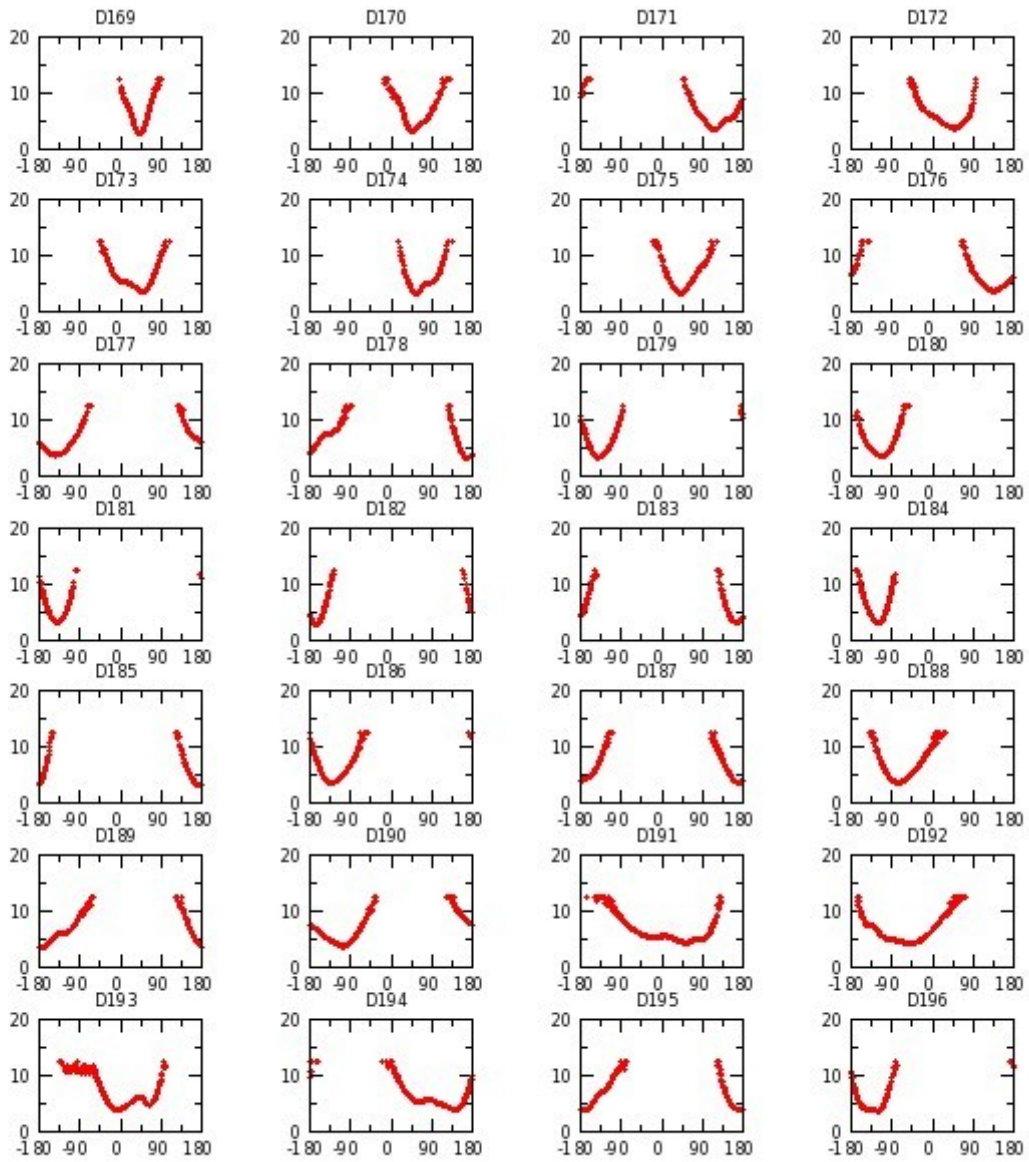


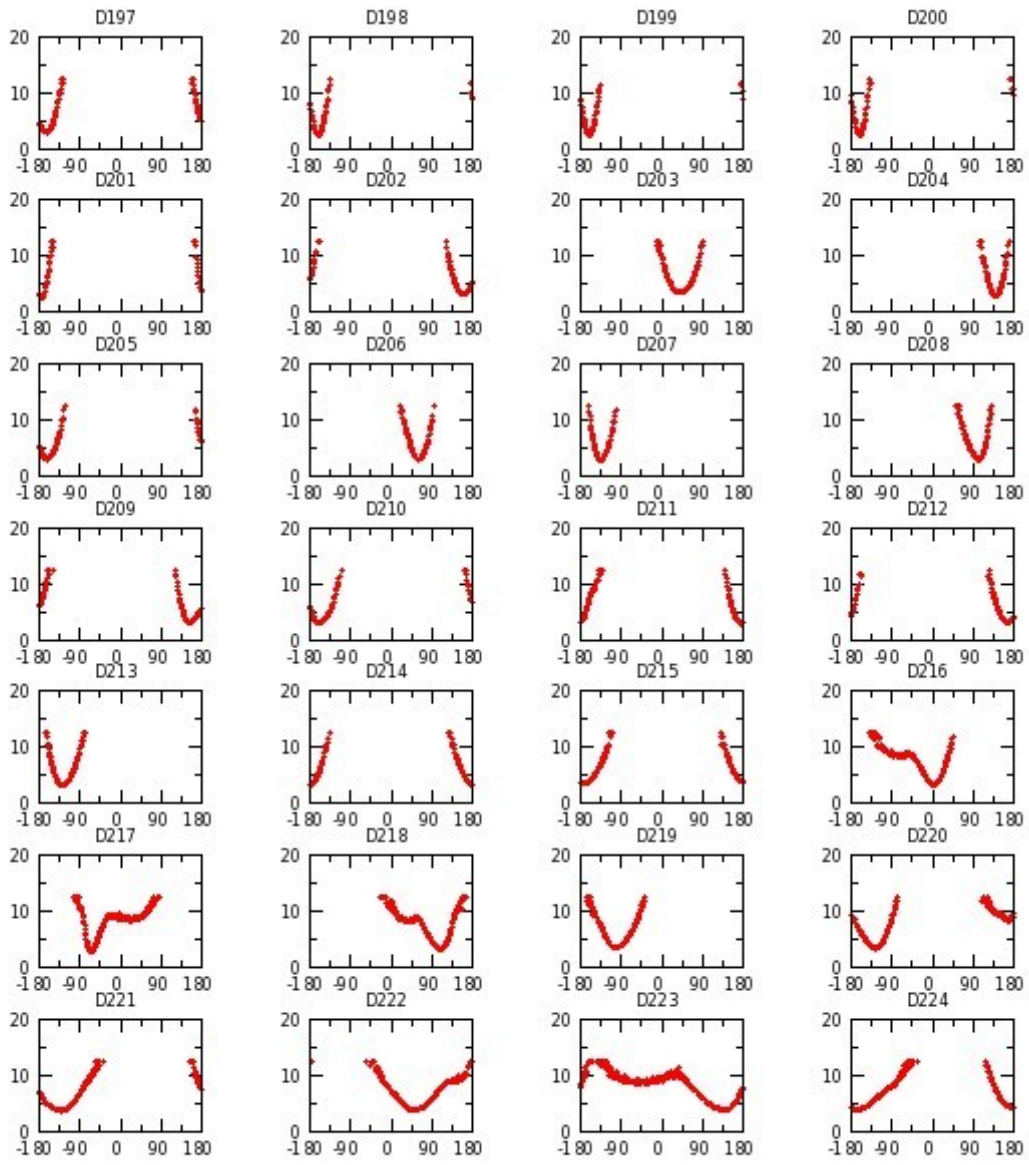


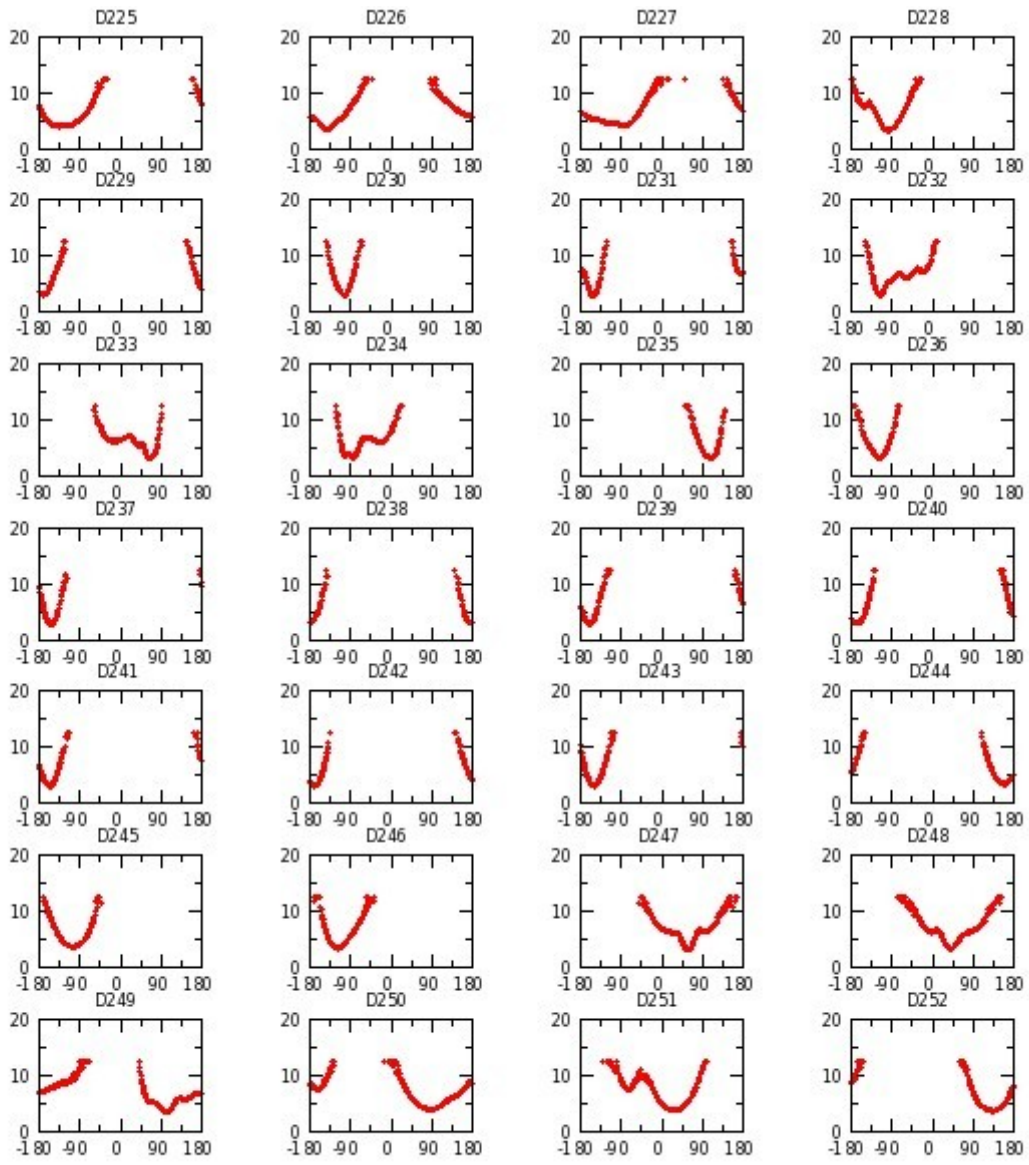


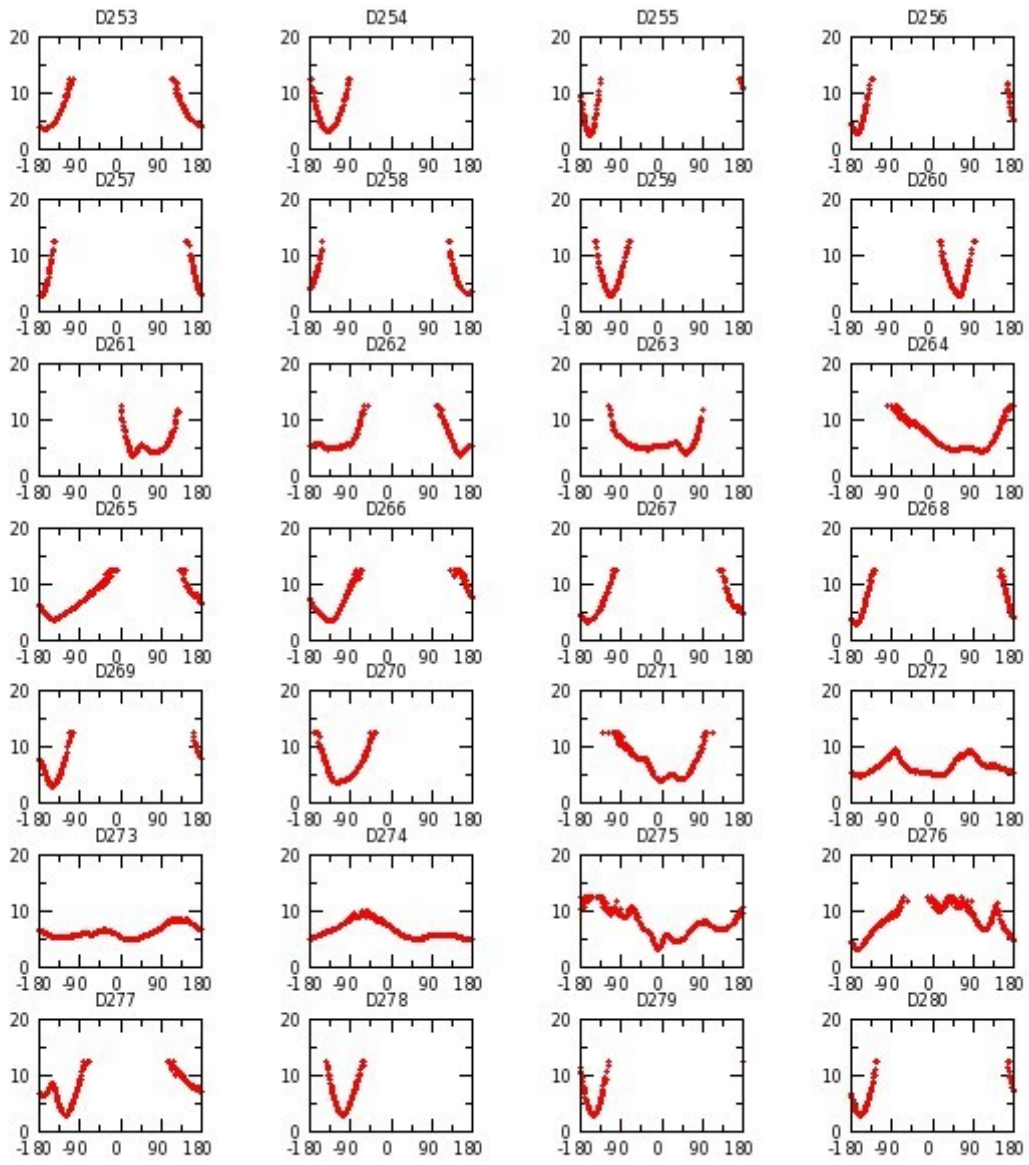


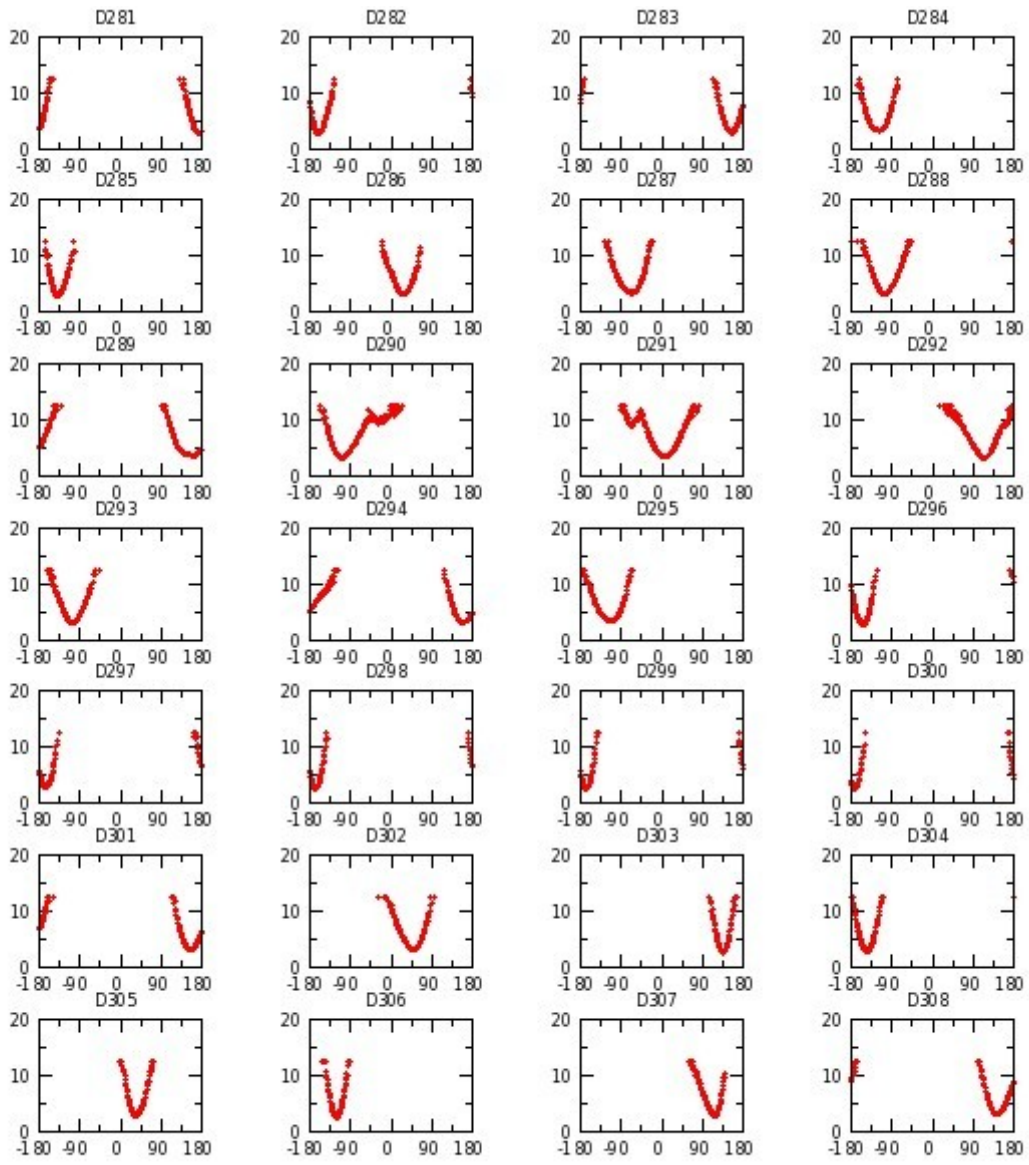


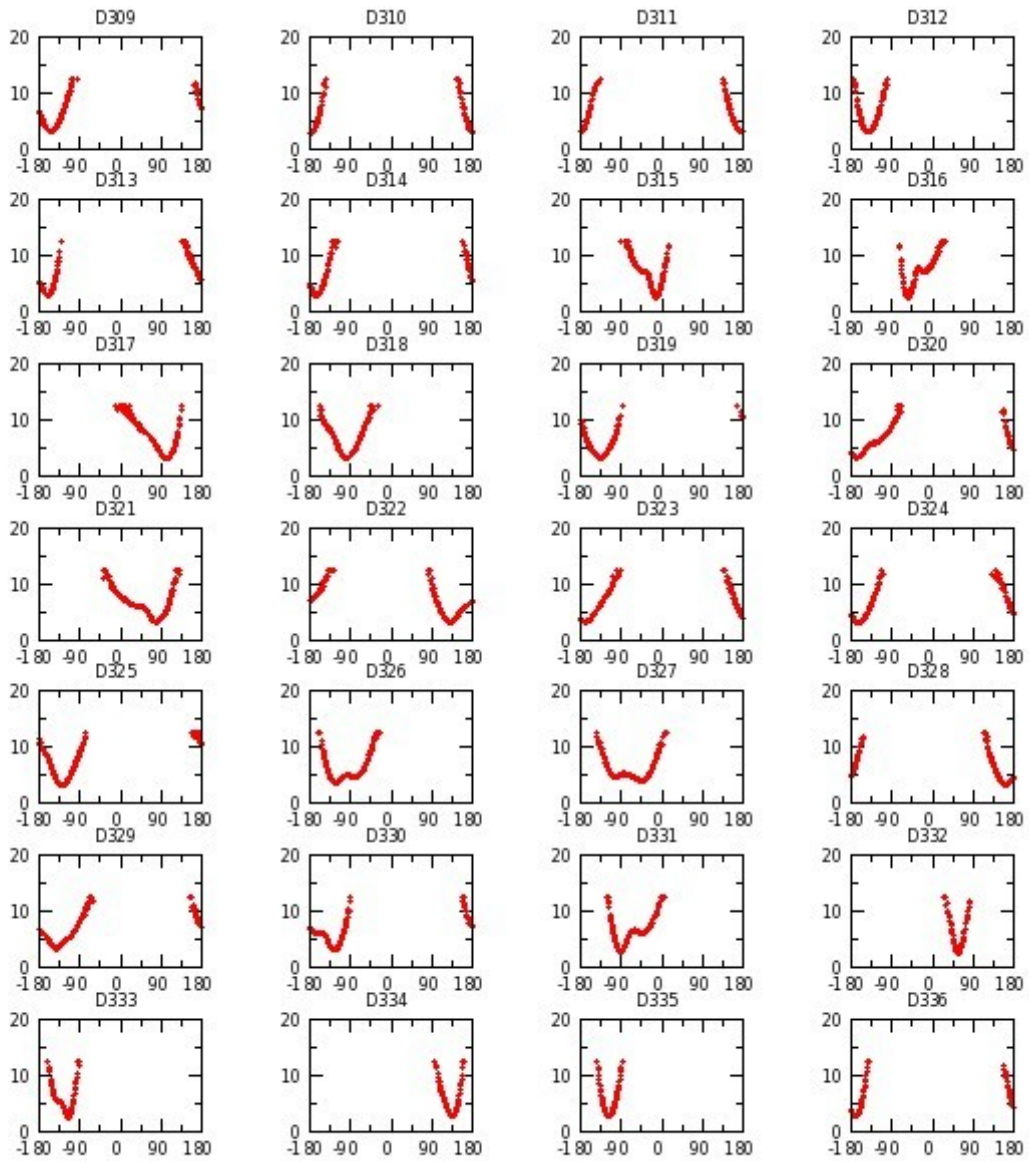


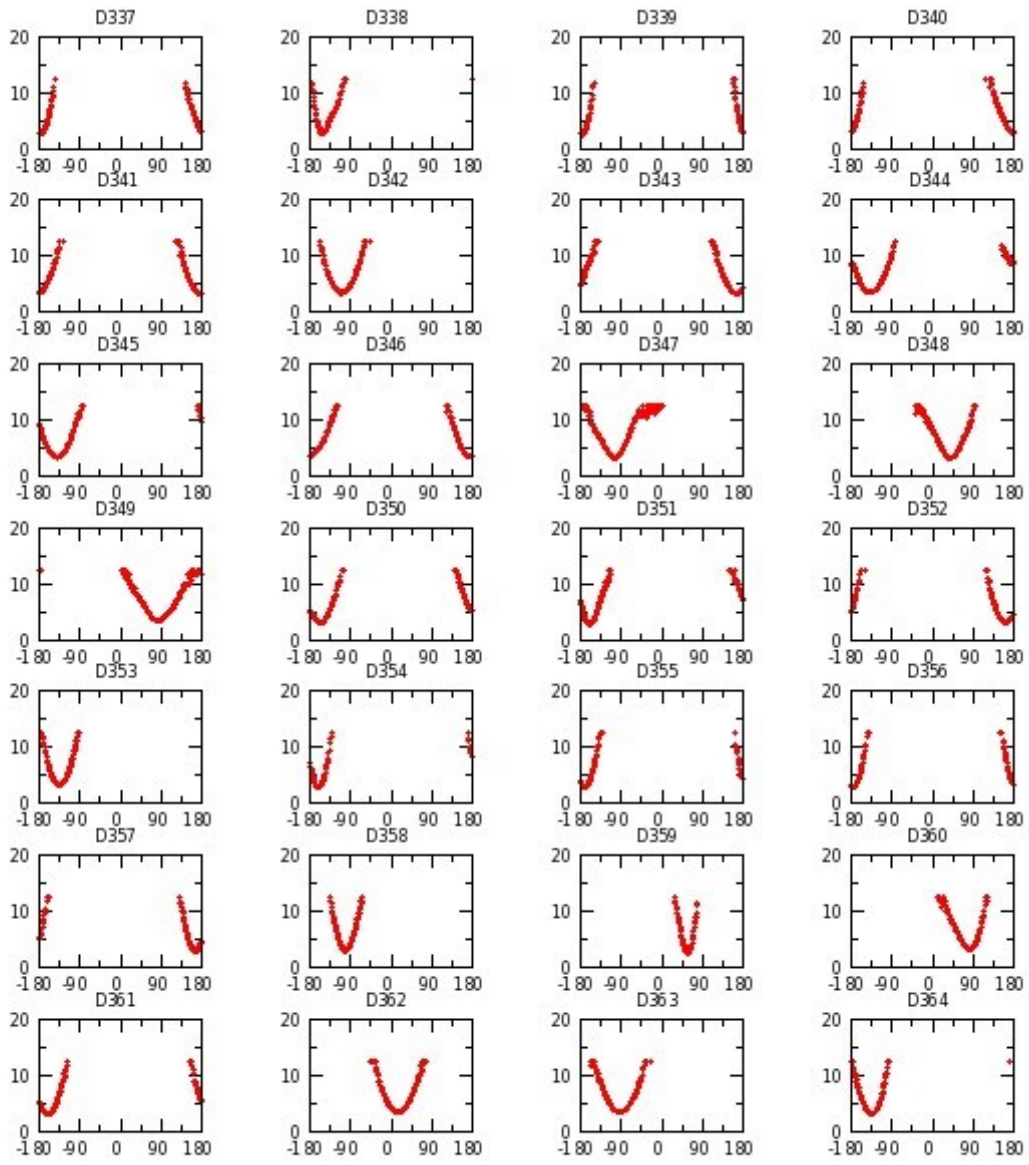


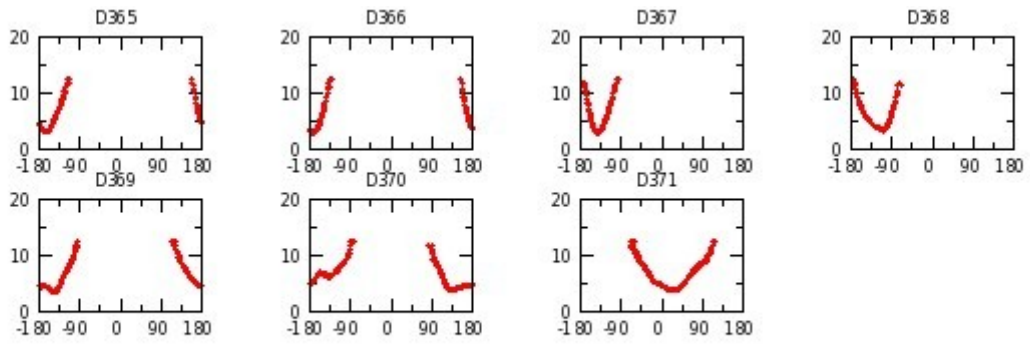




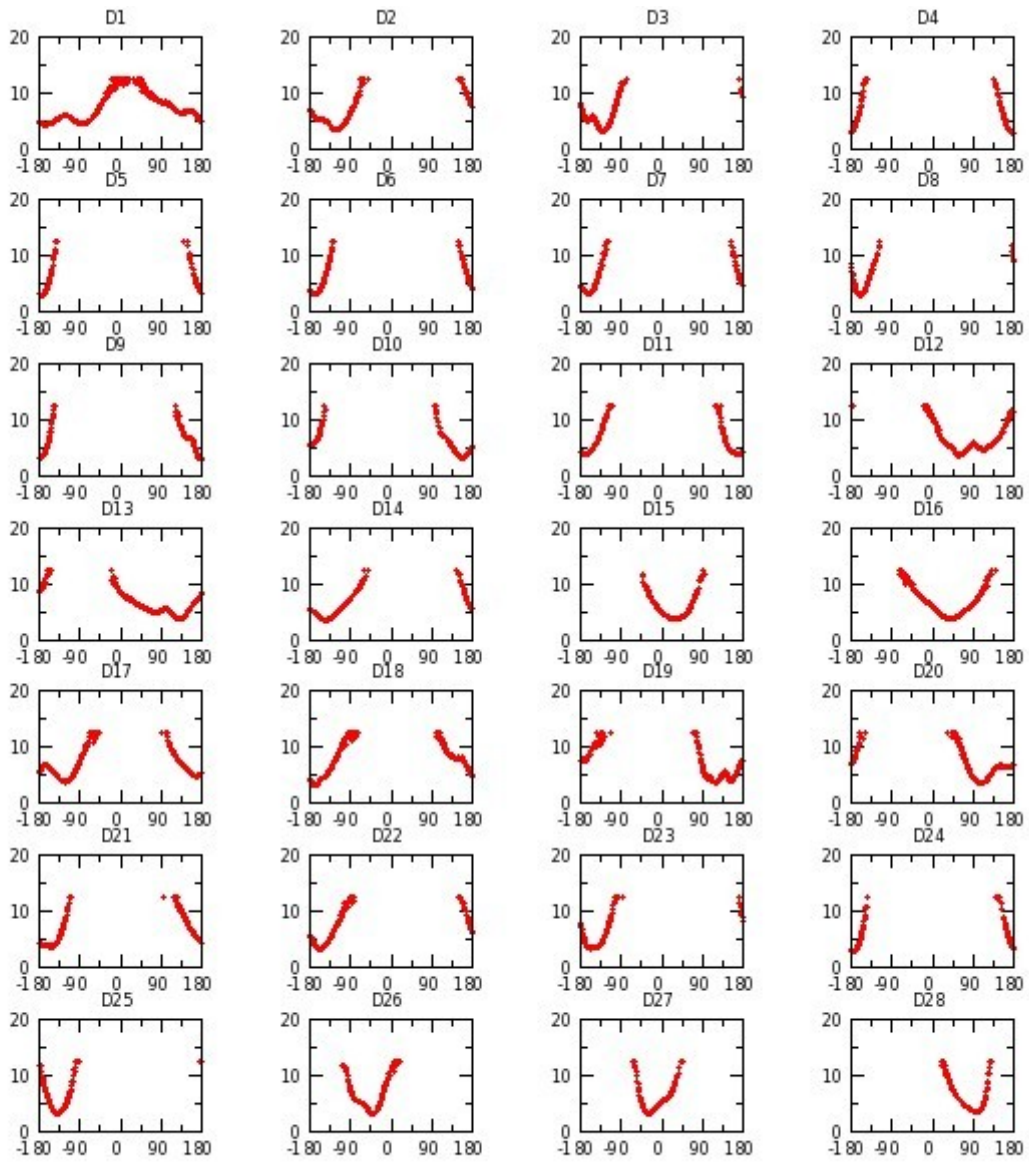


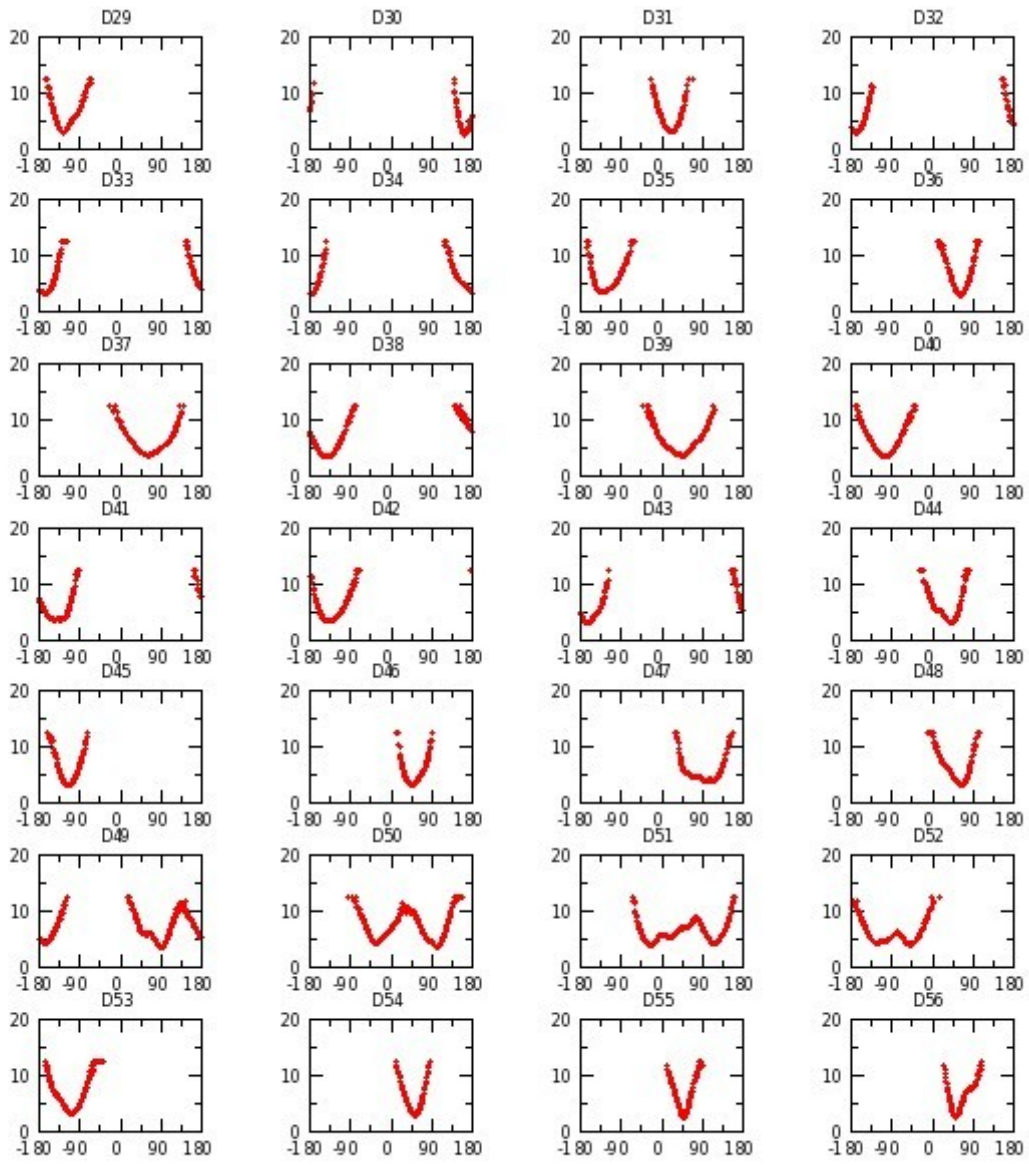


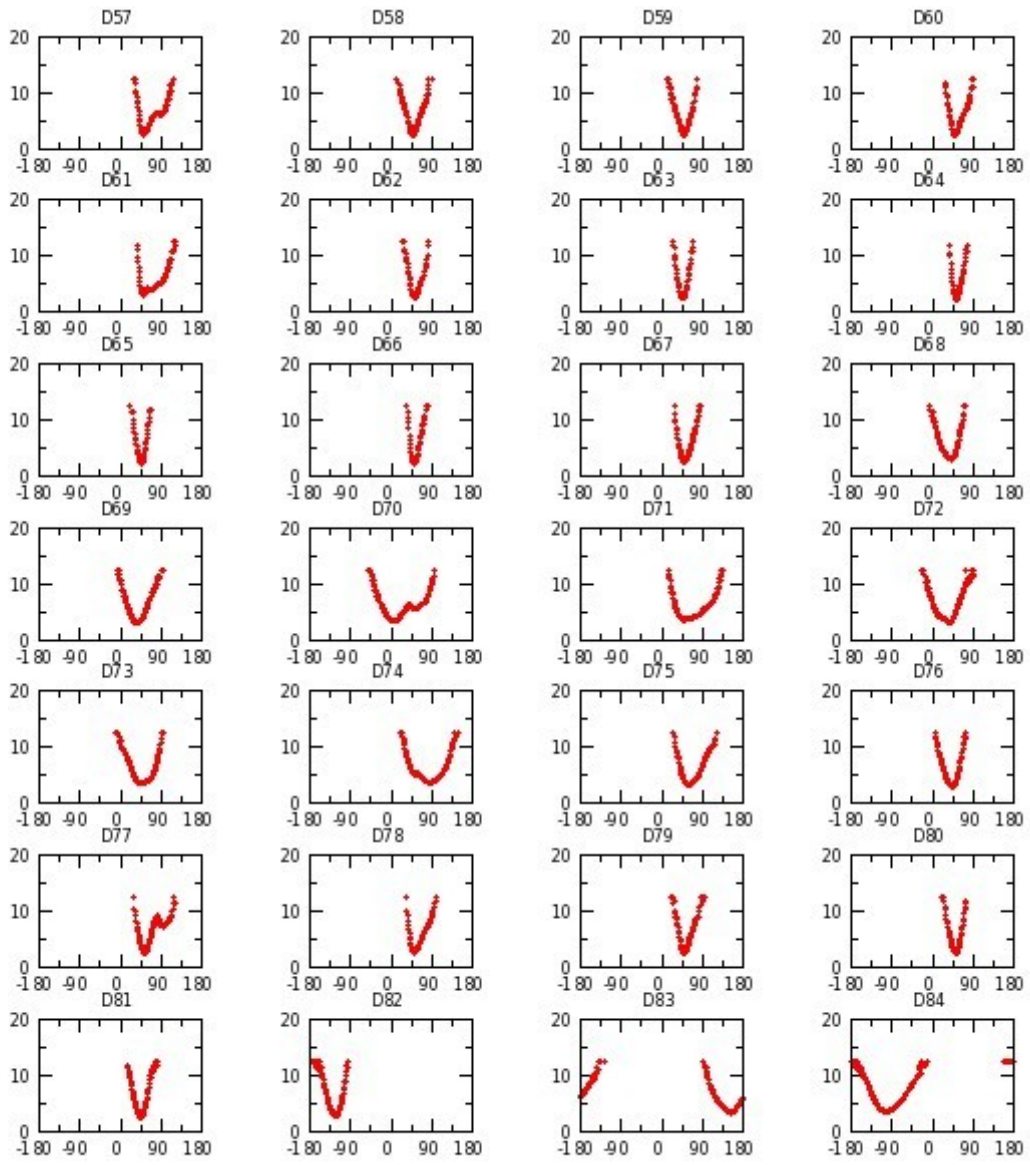


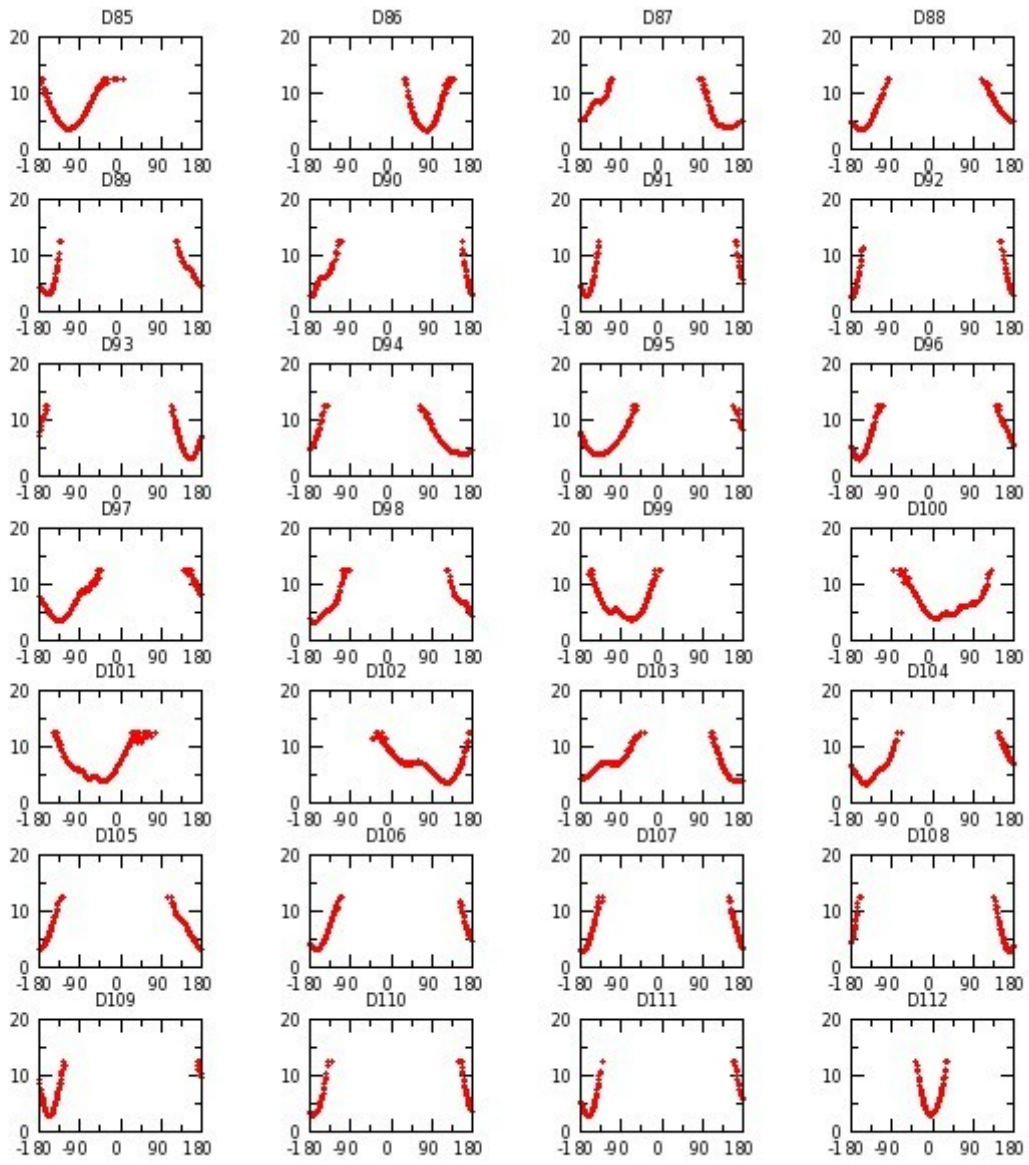


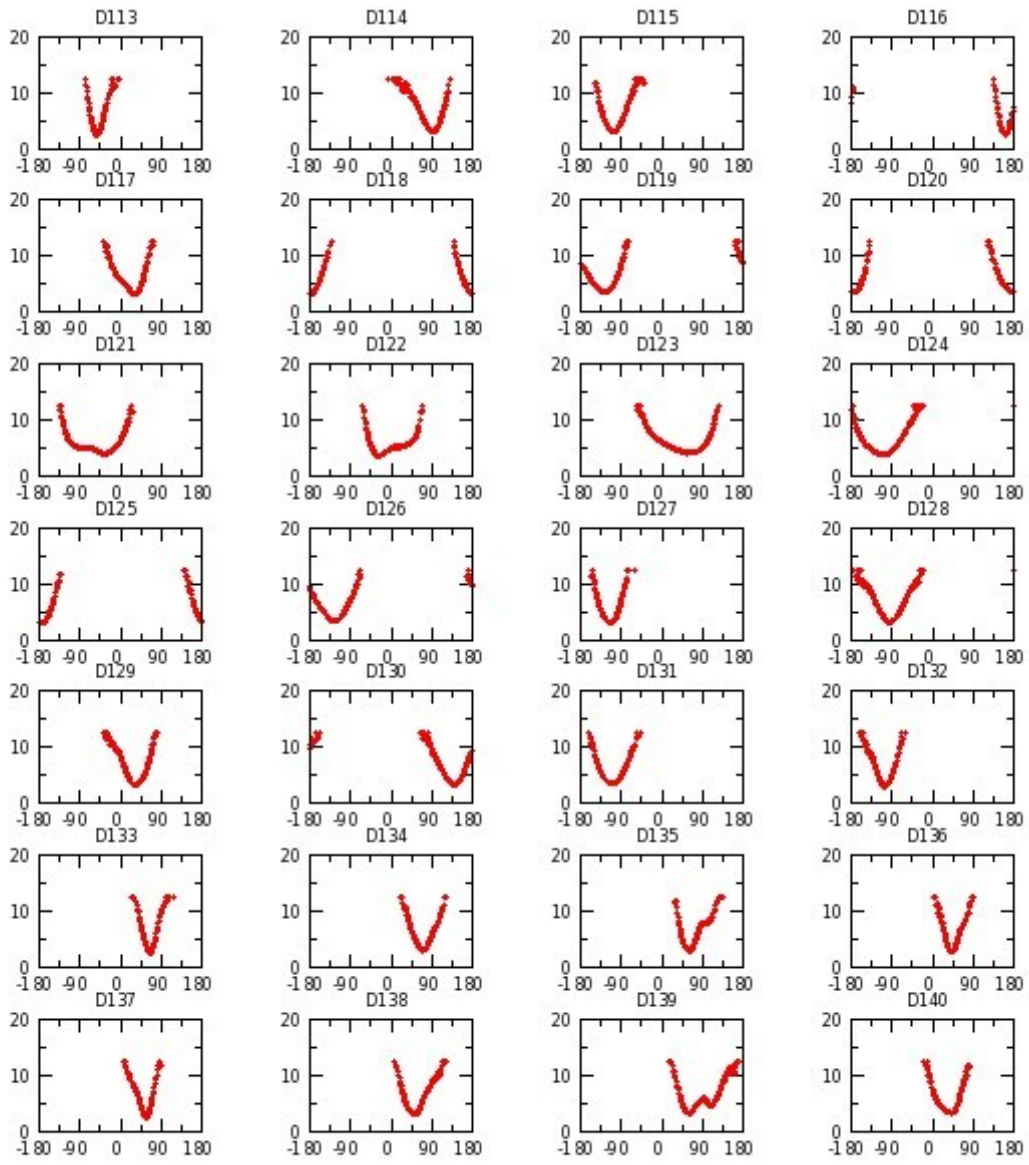
Annexe G 25 : H_SaGAL réplique I

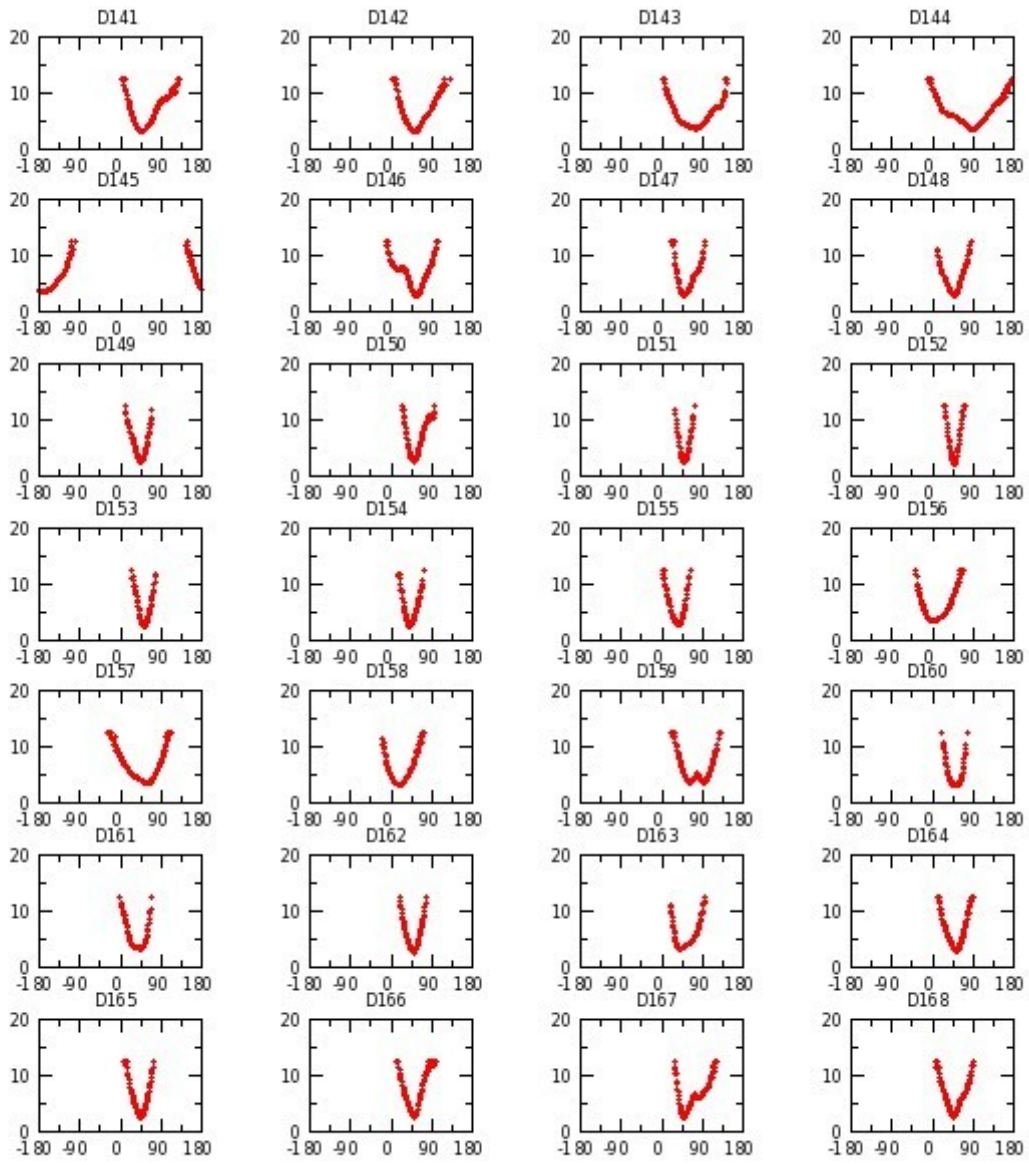


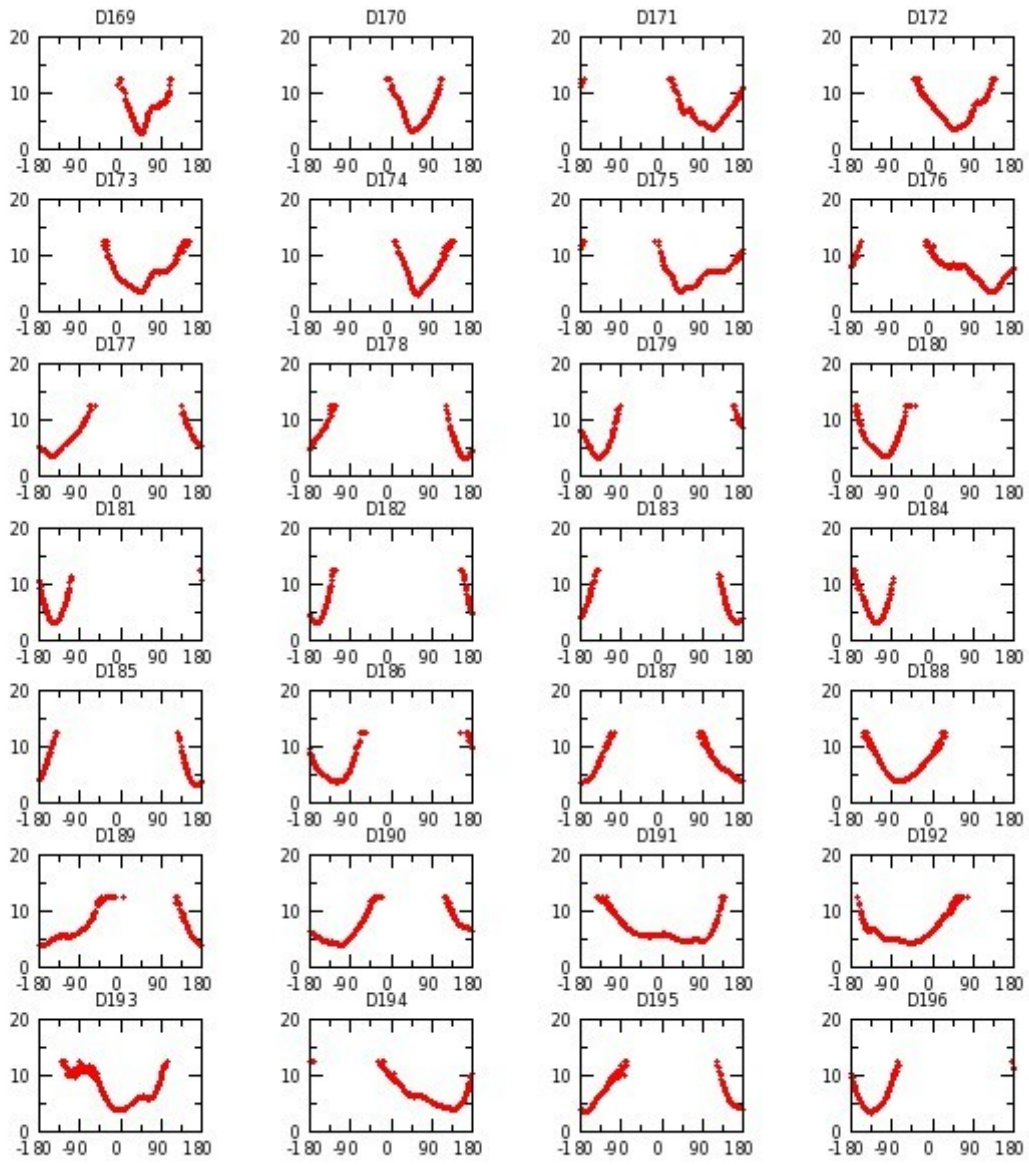


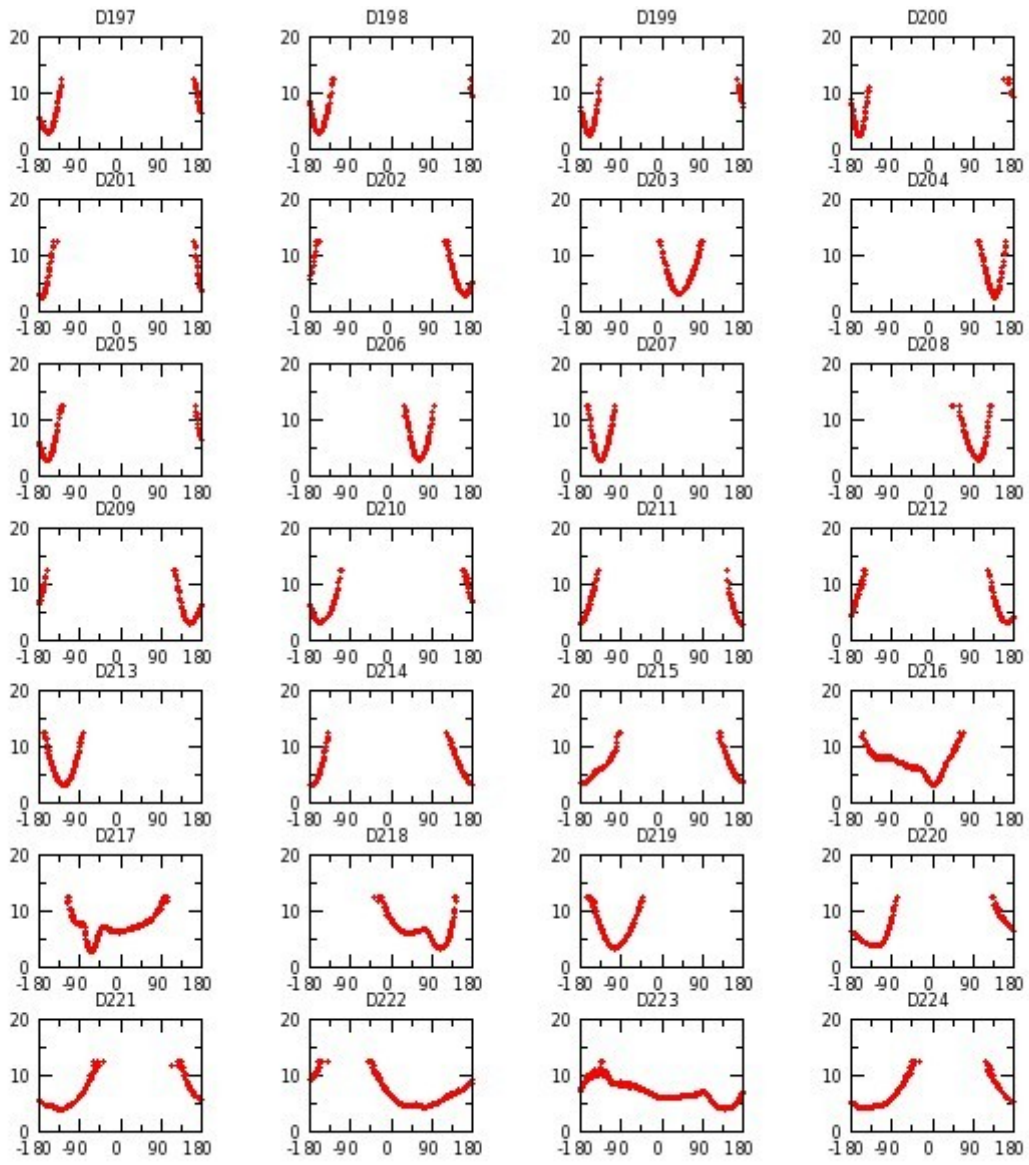


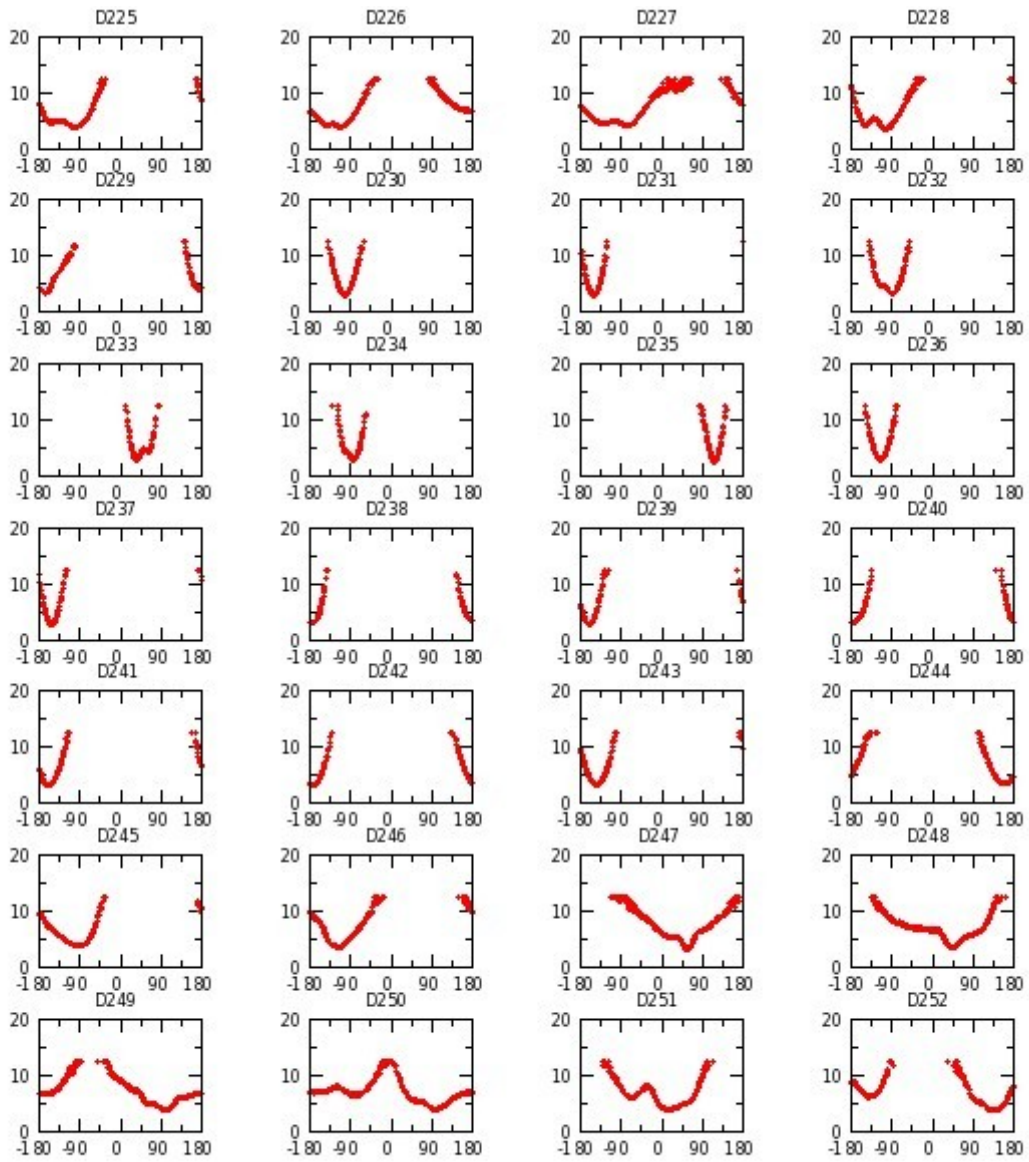


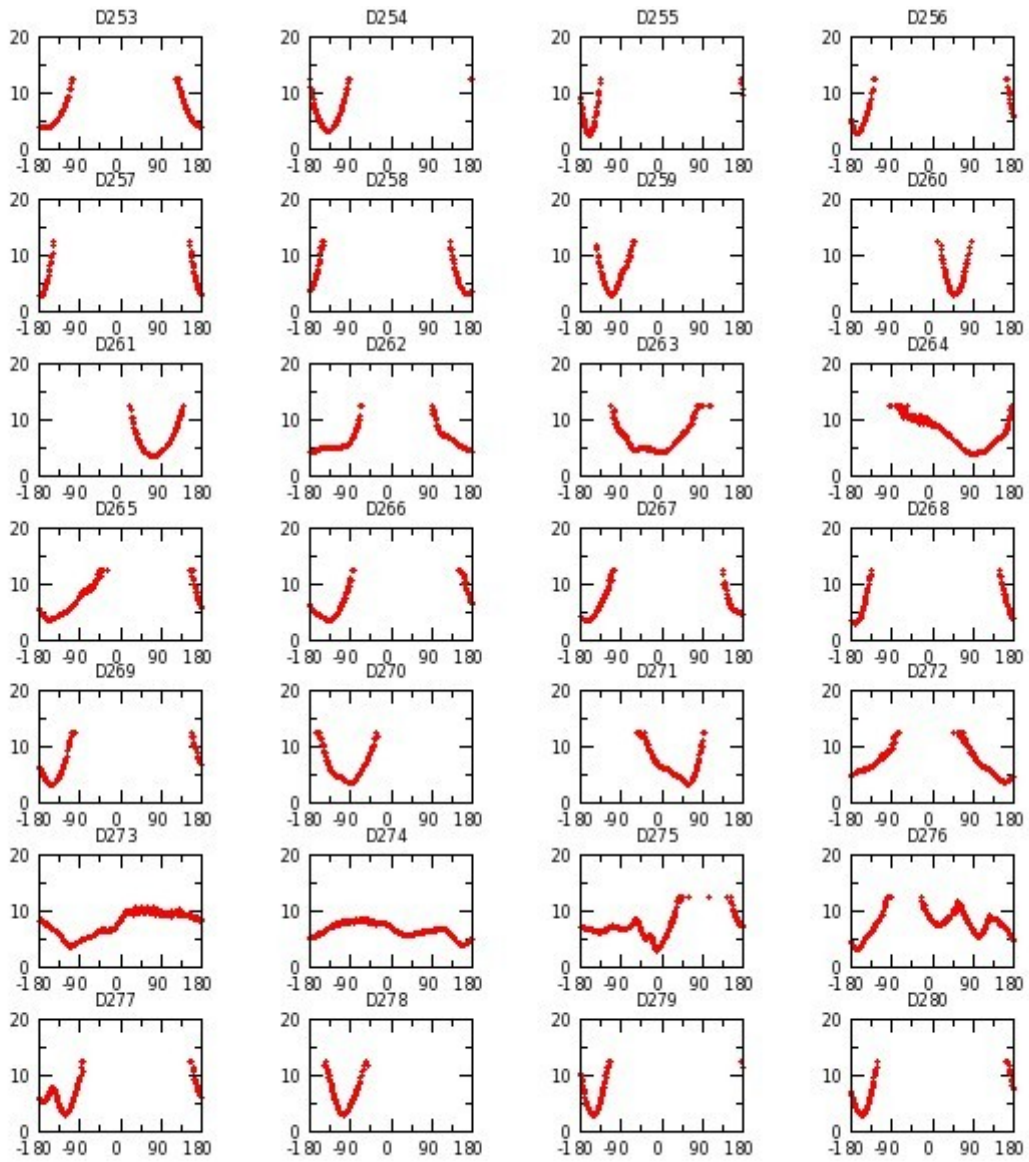


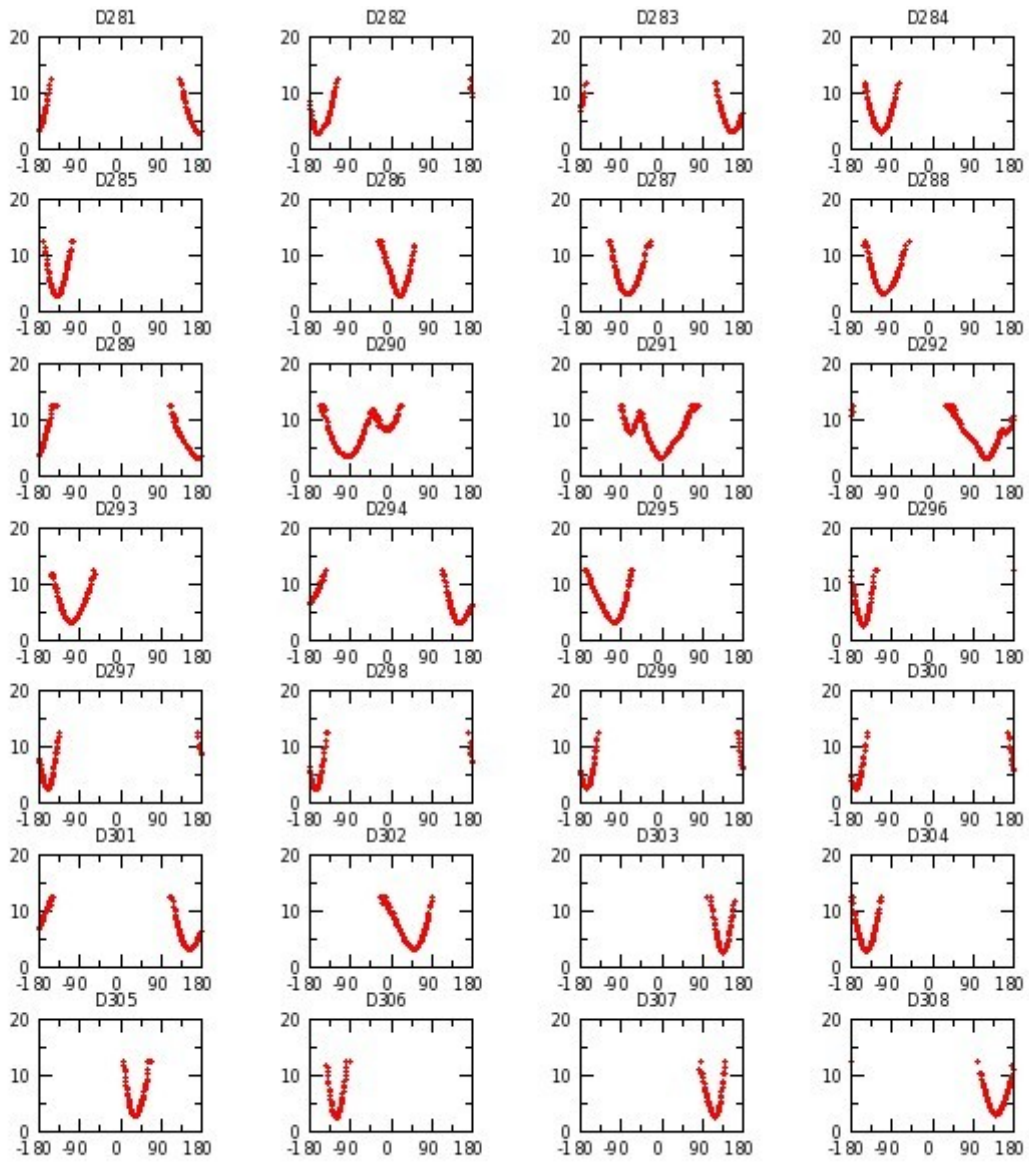


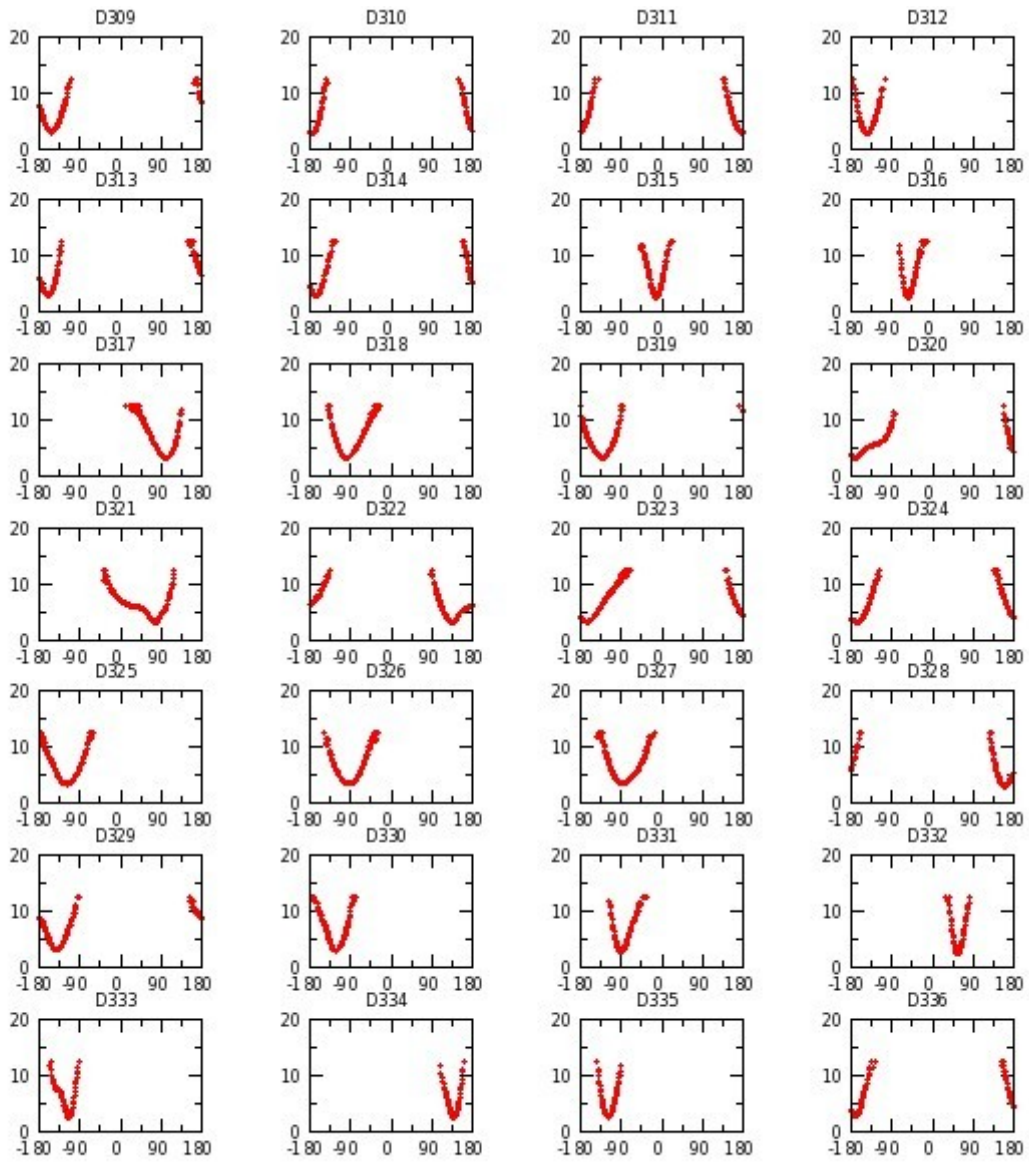


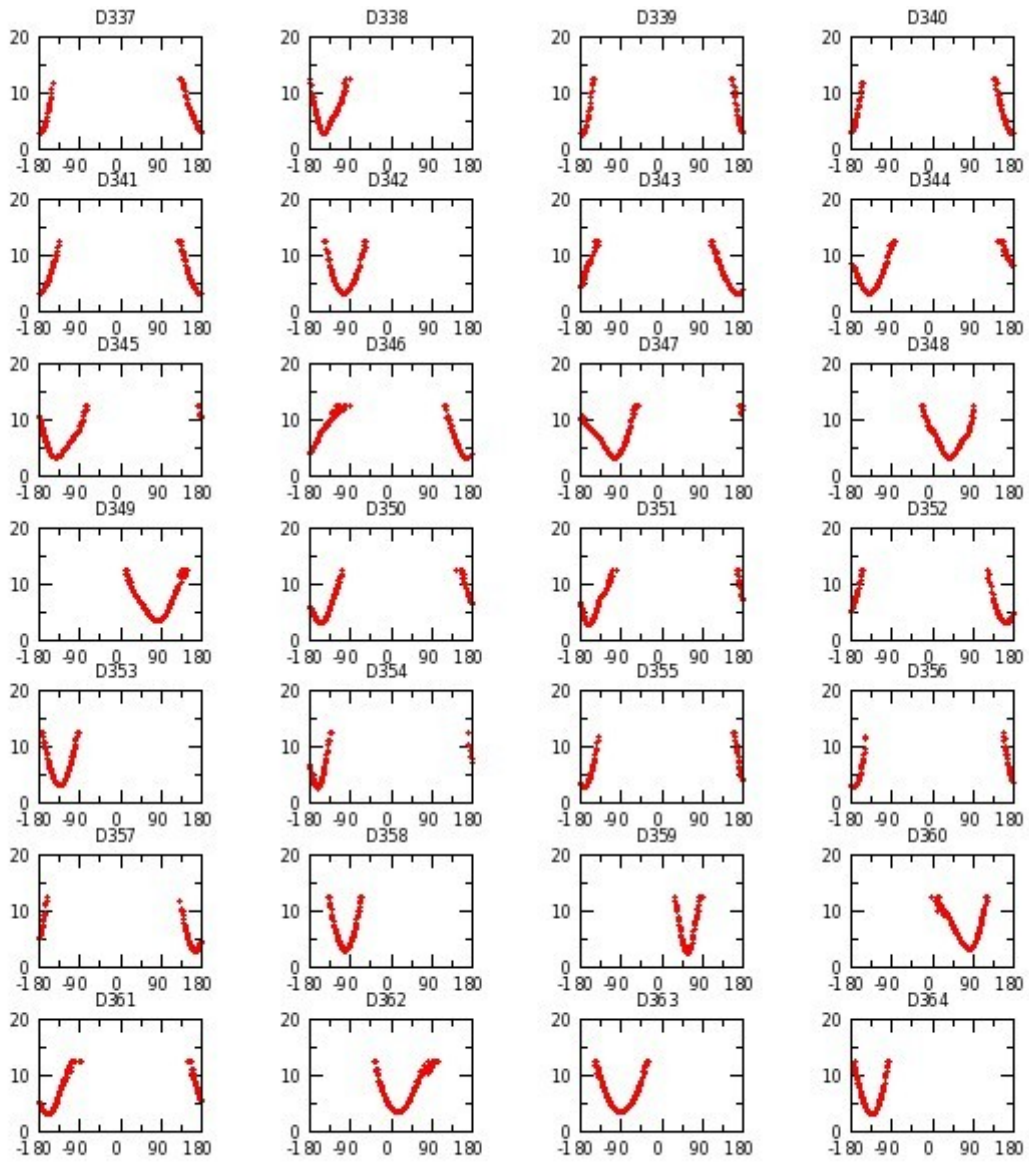


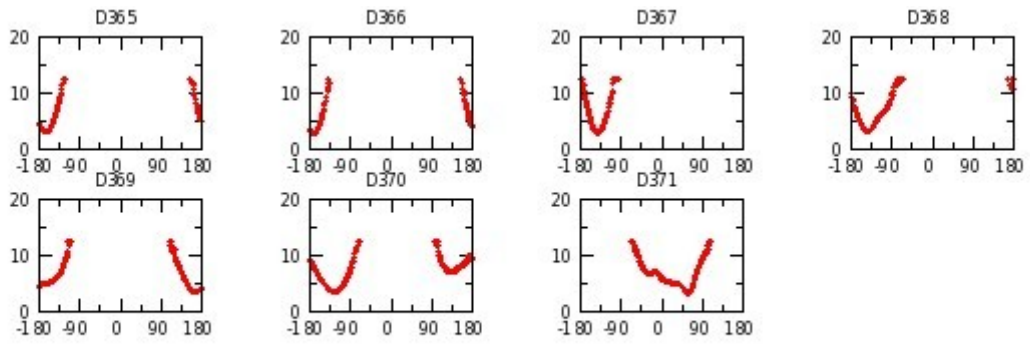




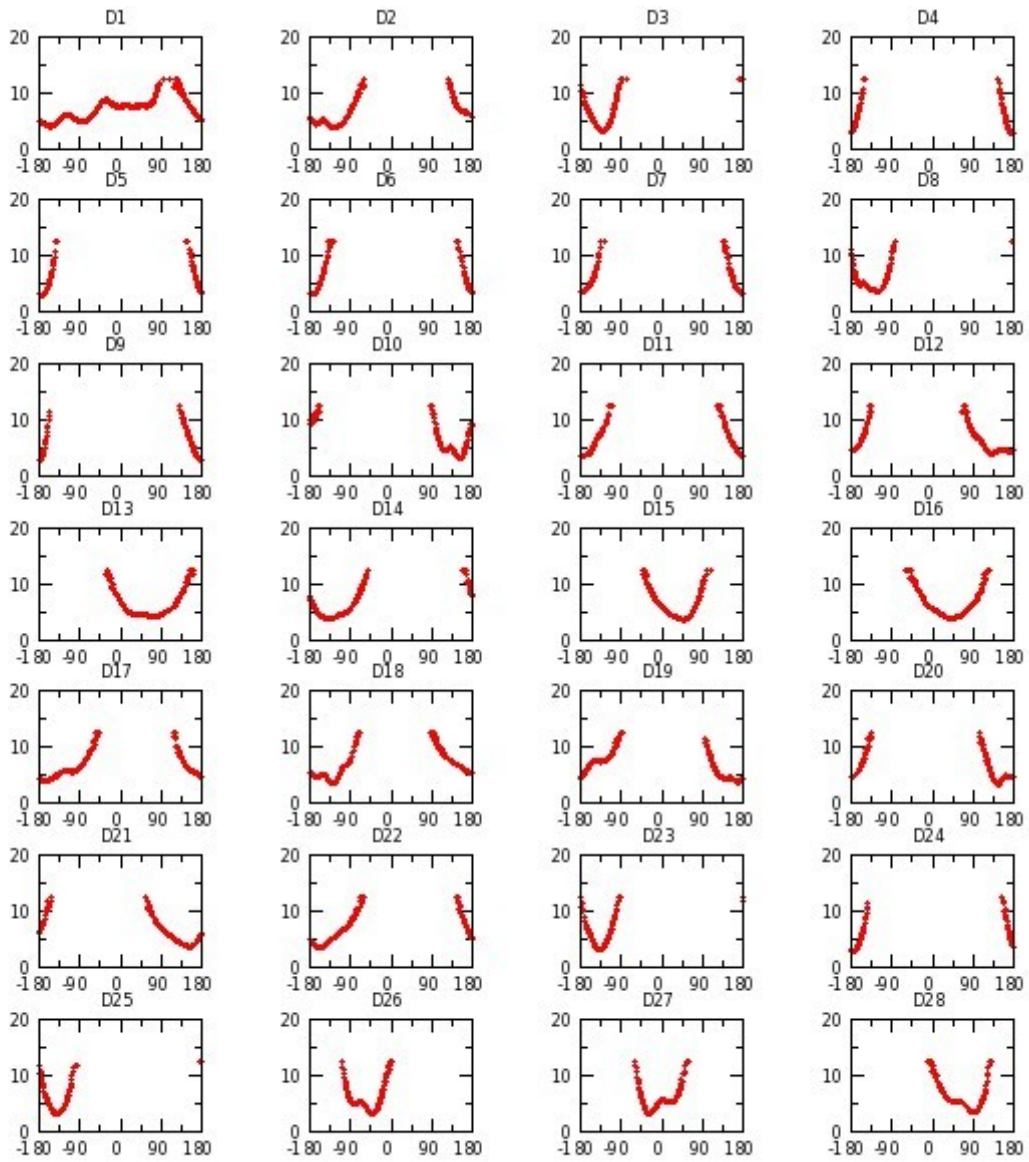


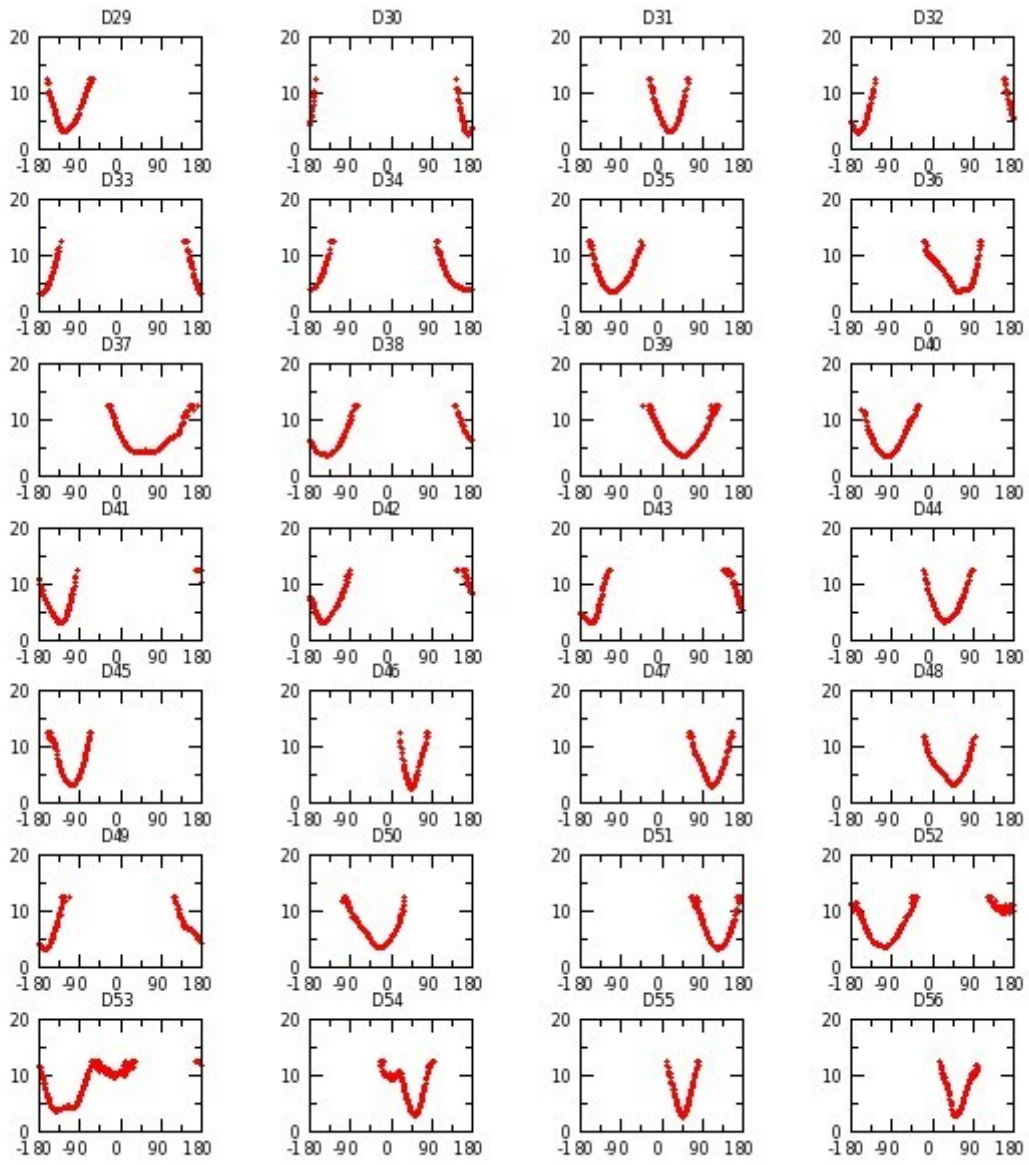


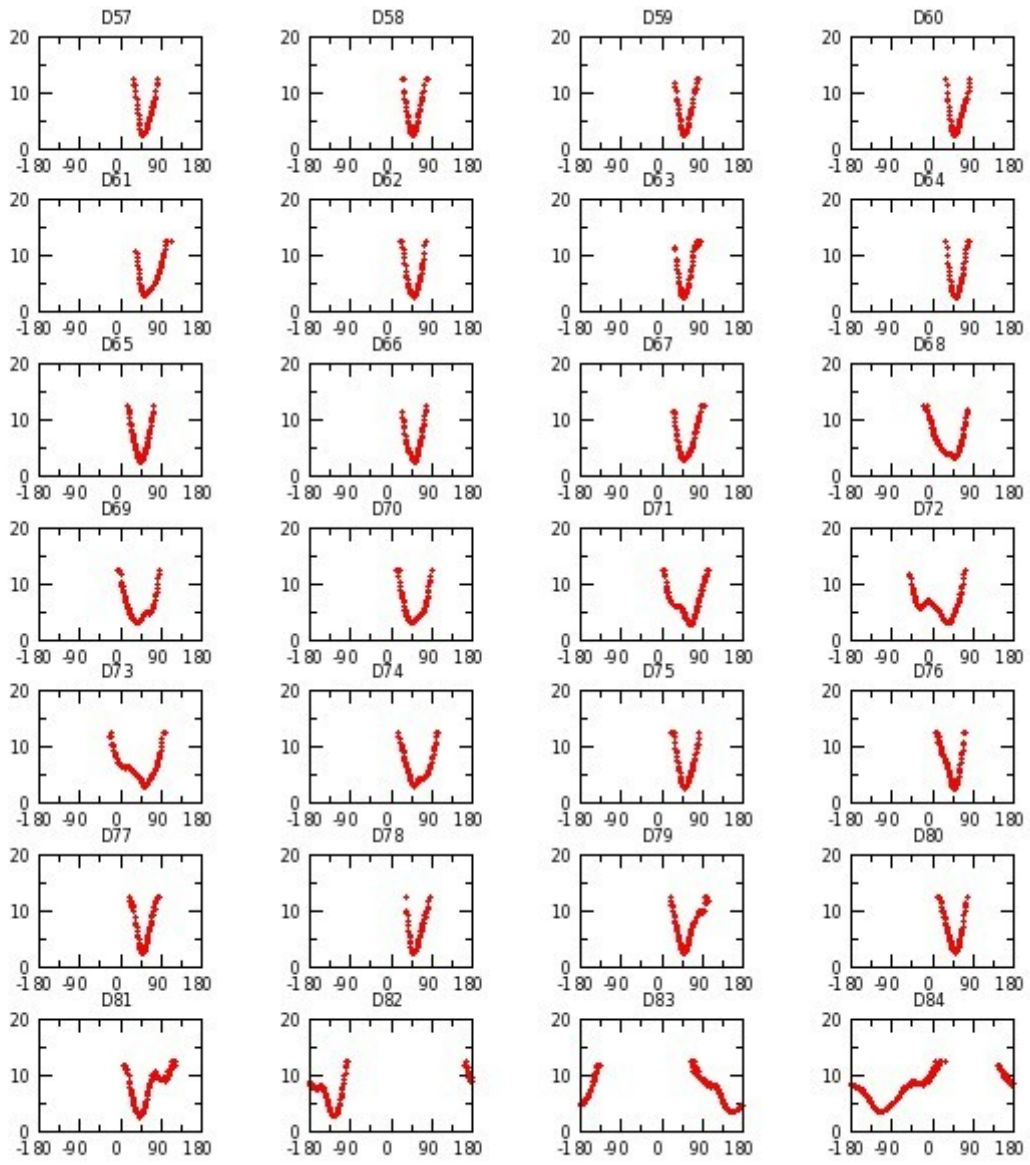


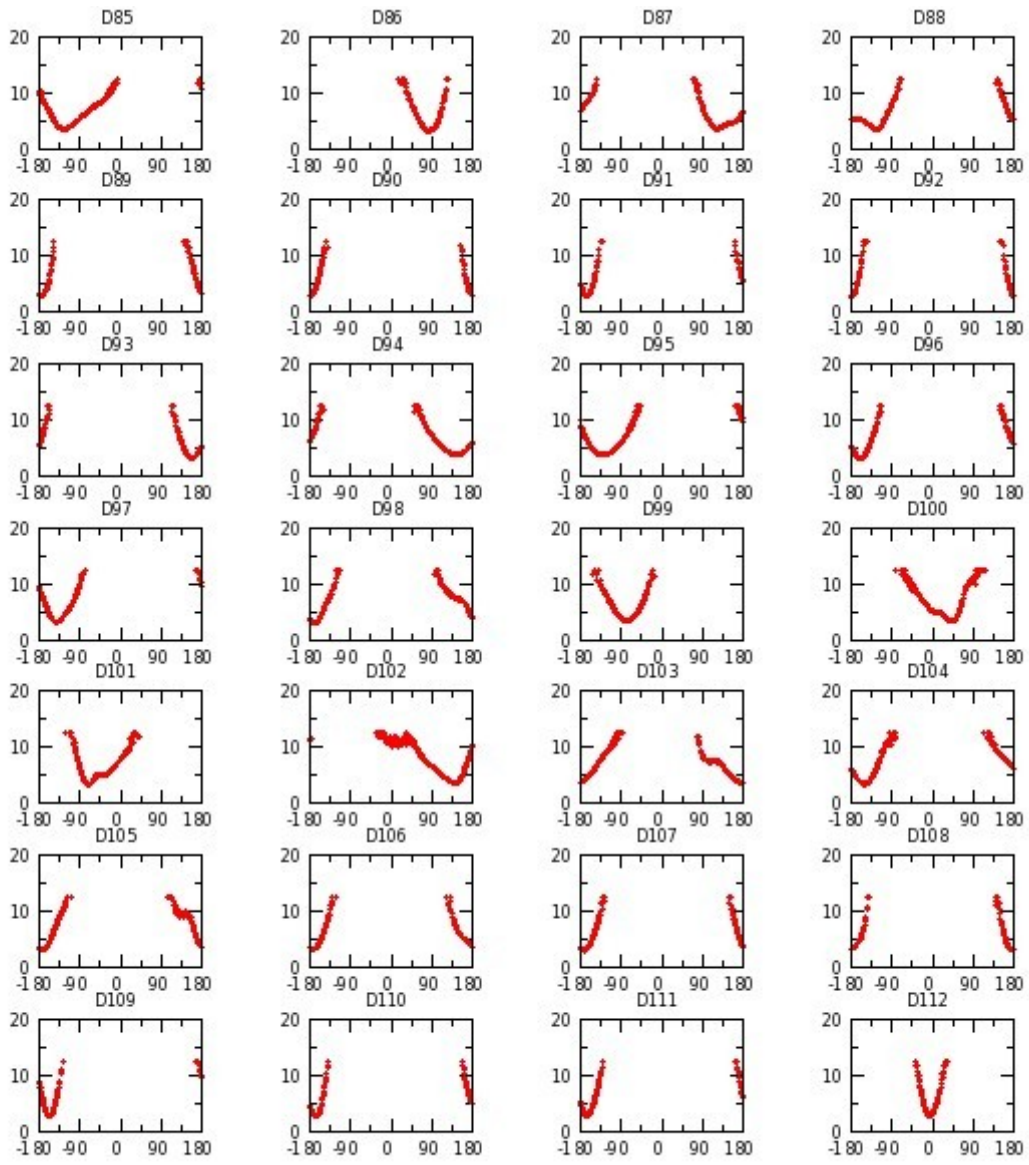


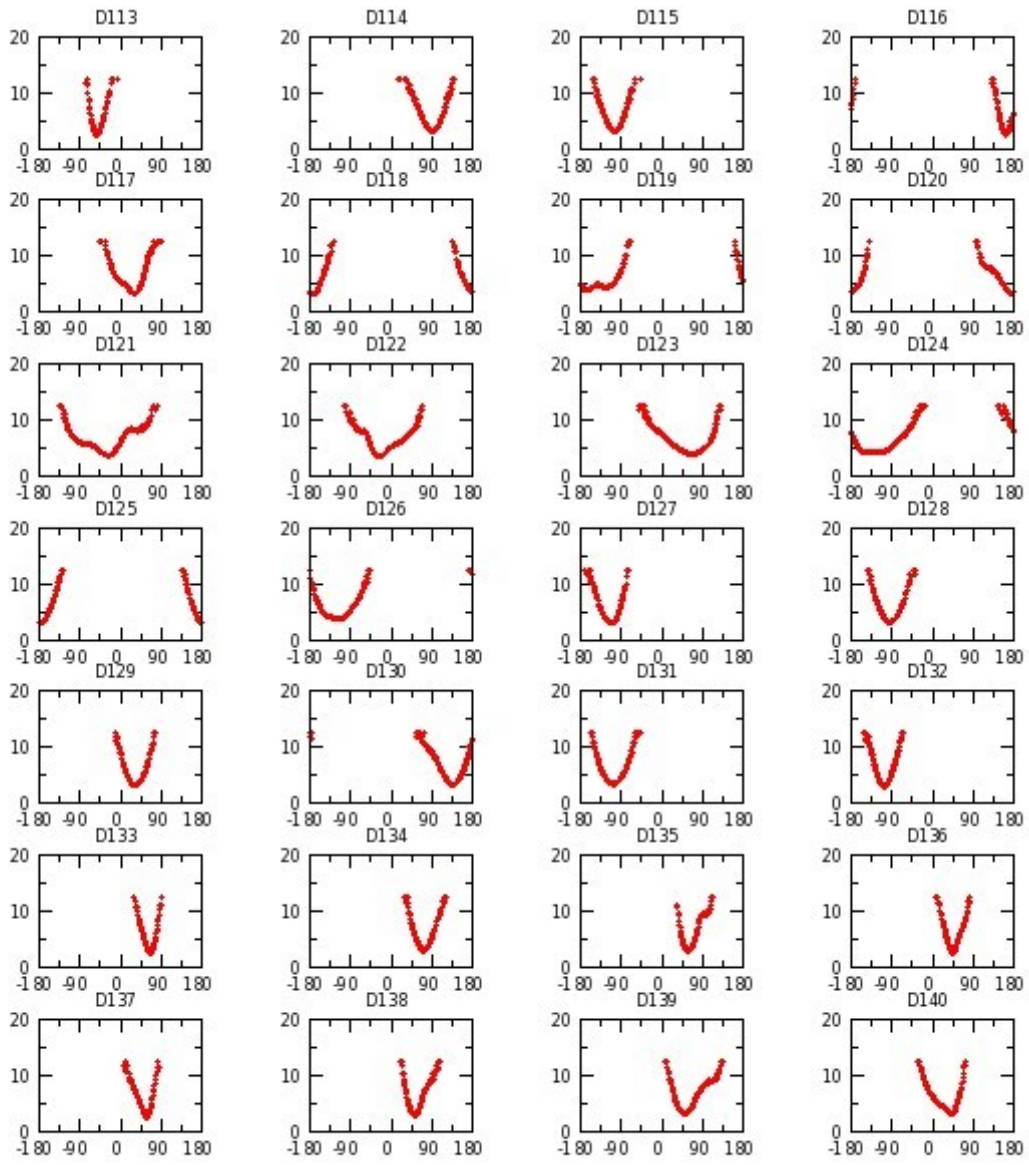
Annexe G 26 : H_SaGAL réplique II

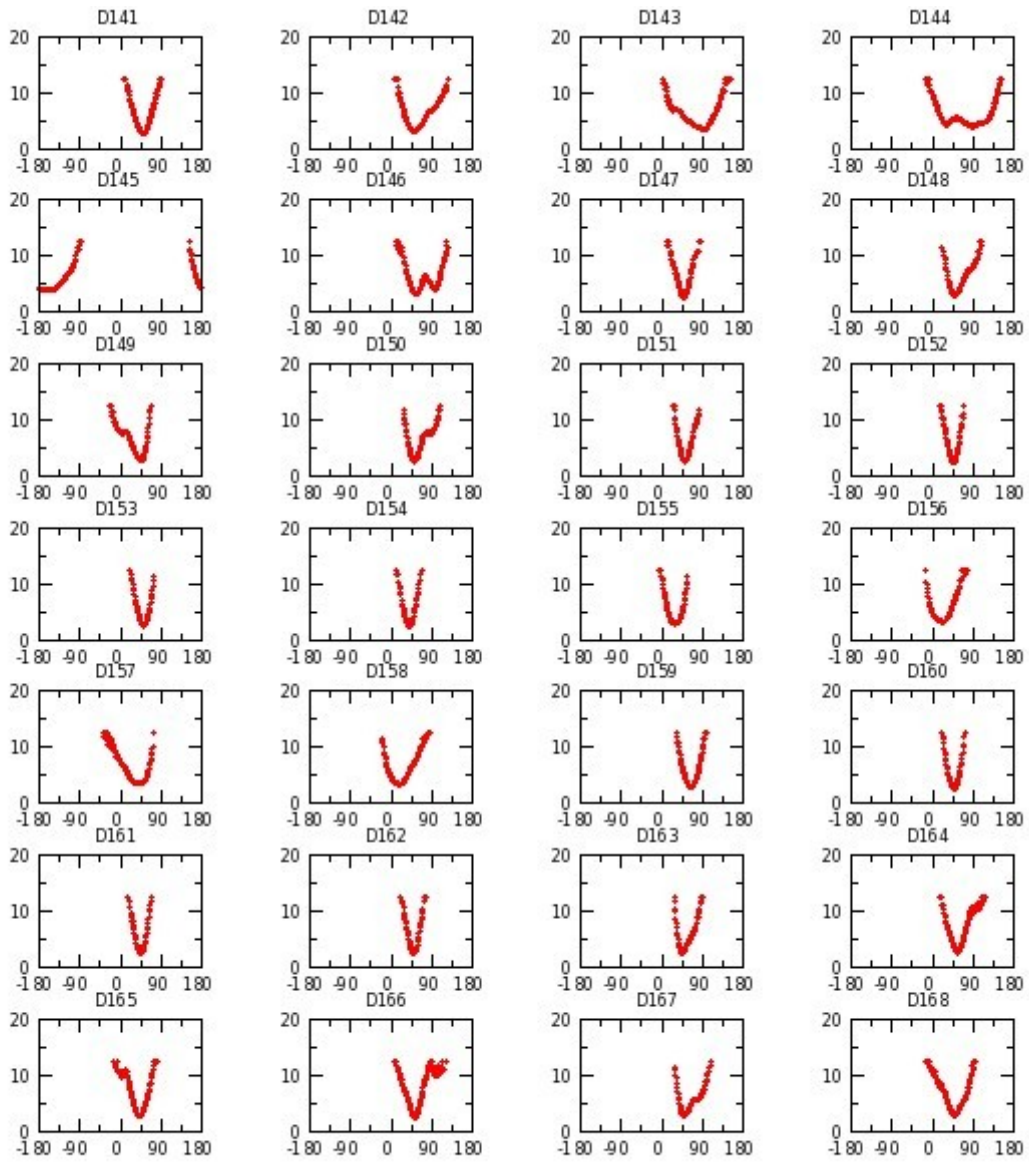


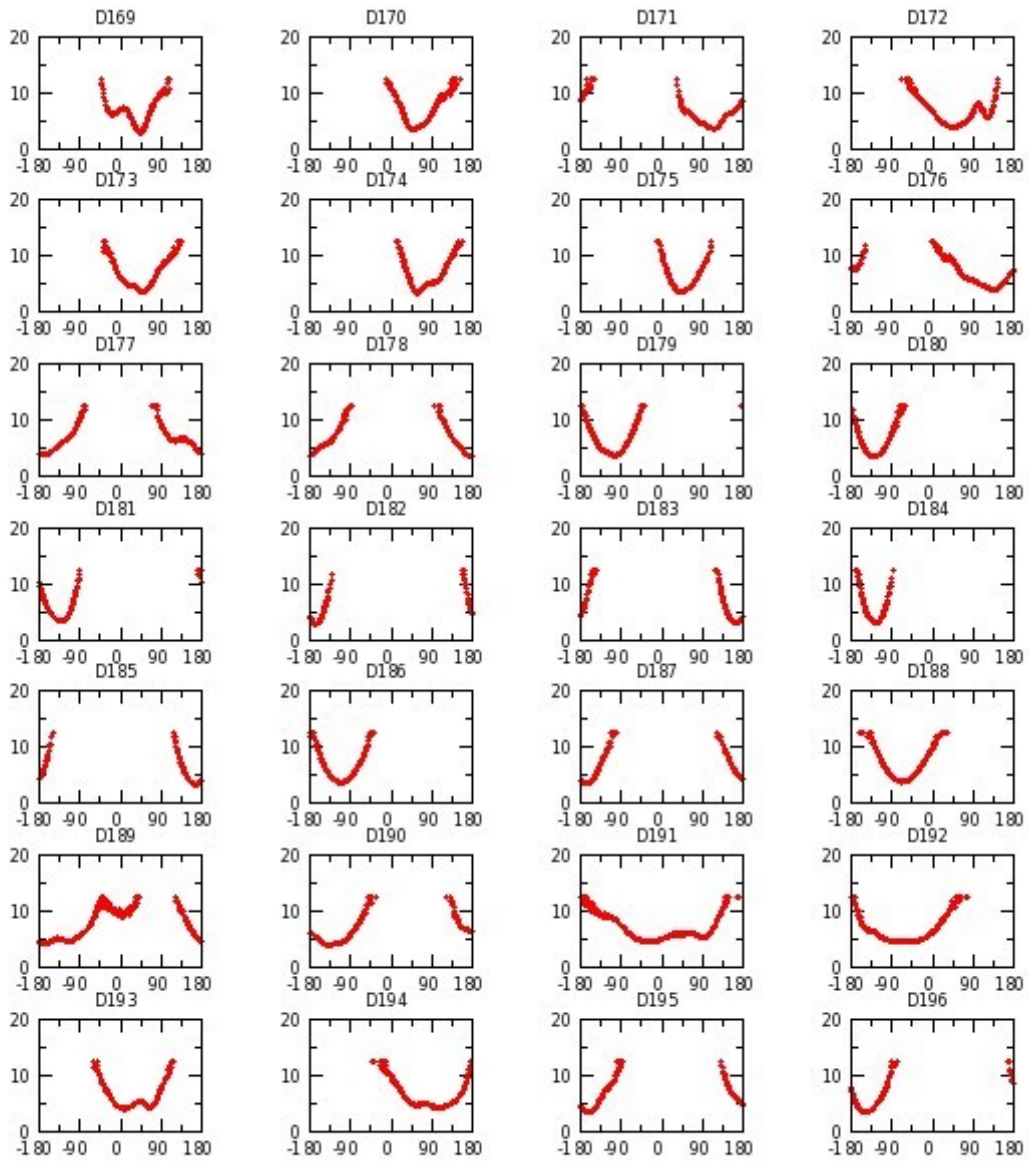


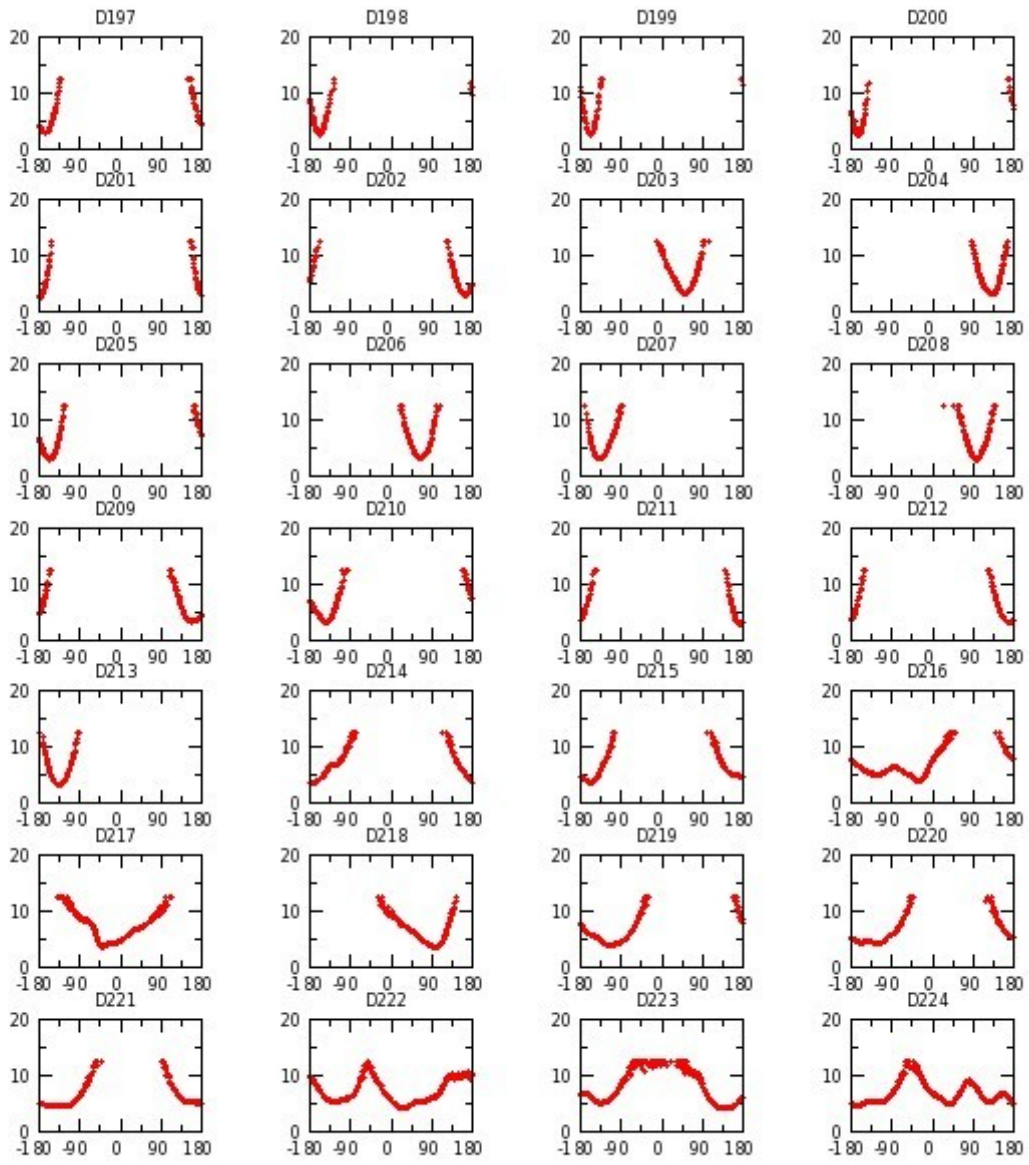


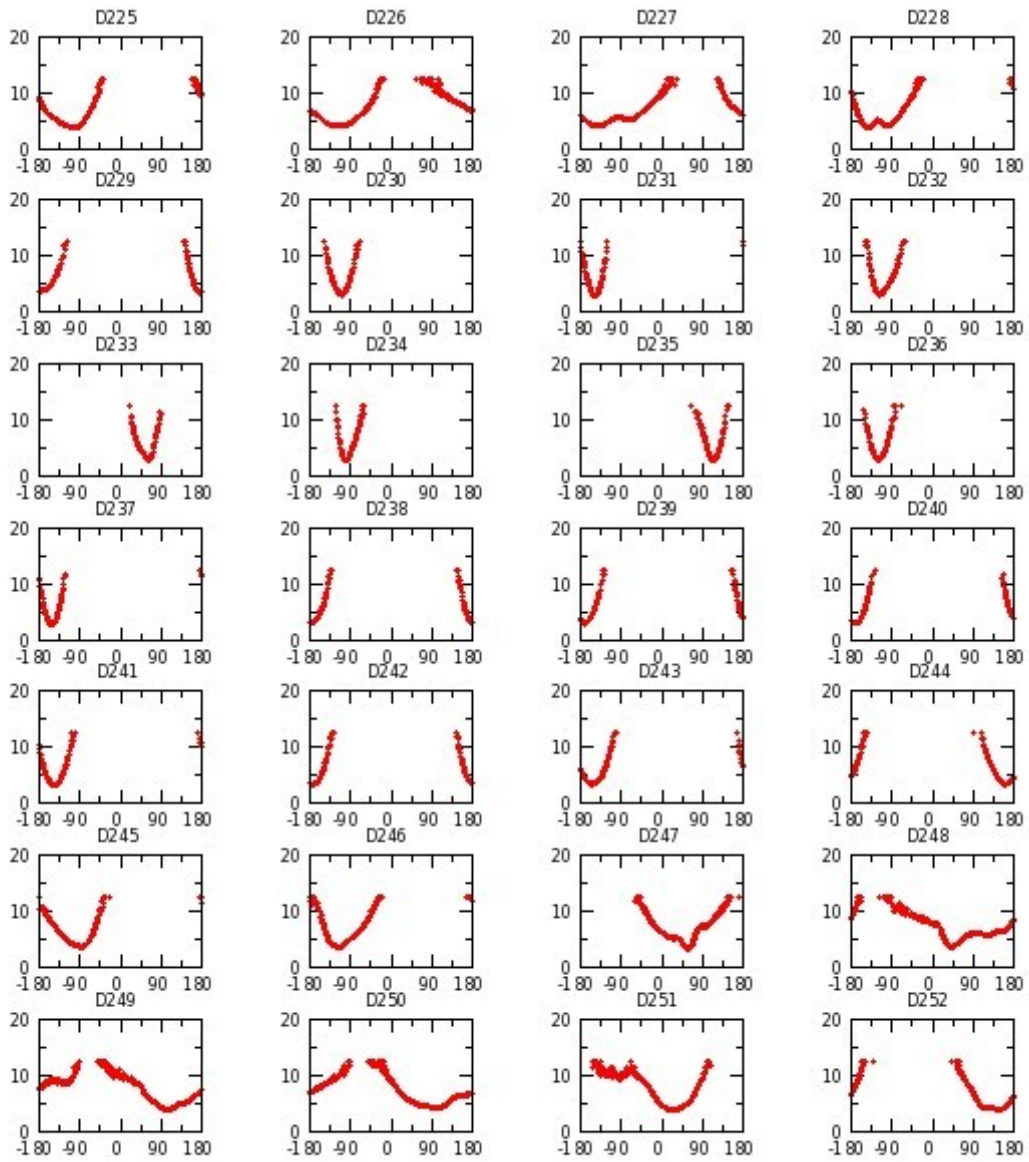


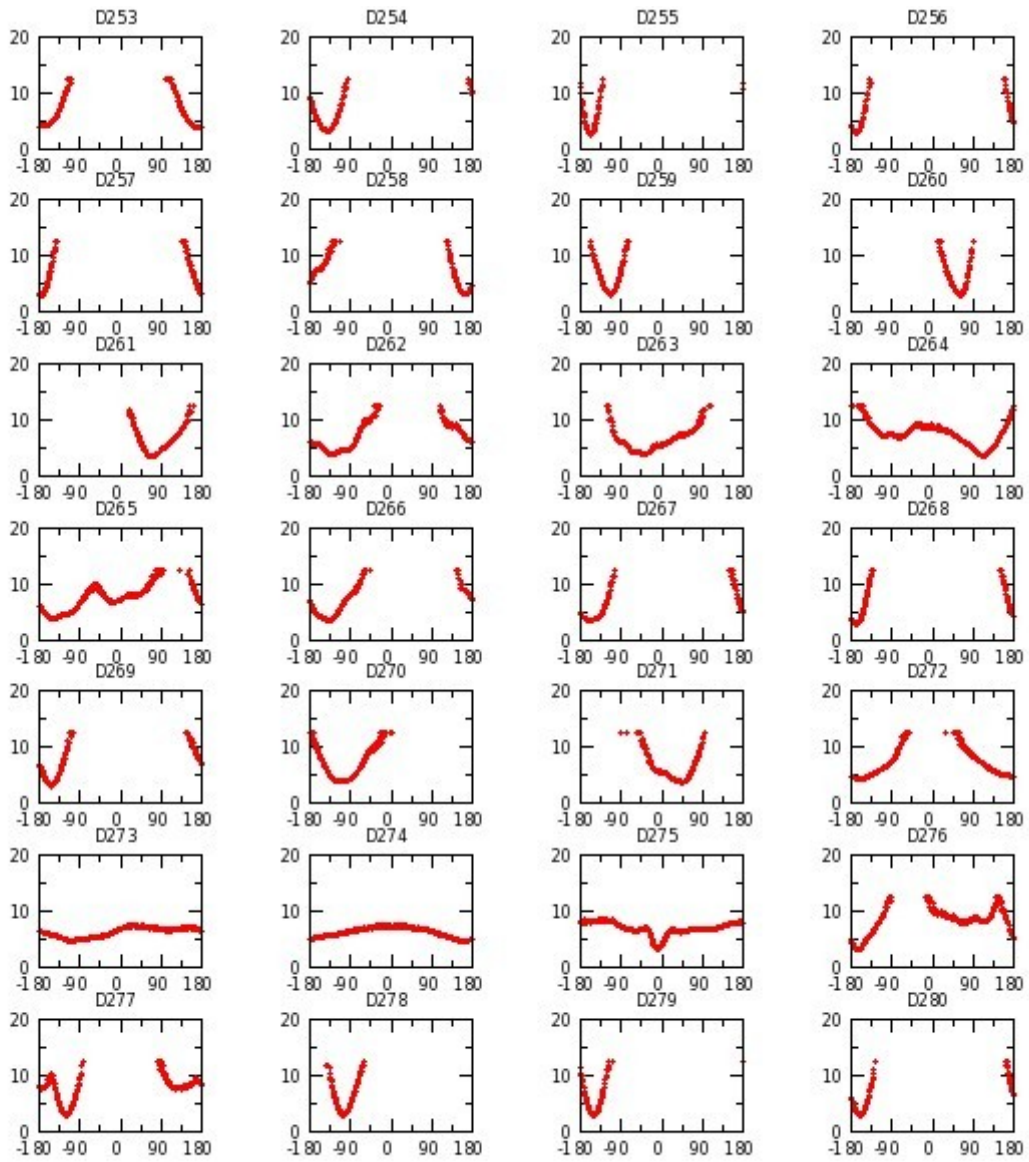


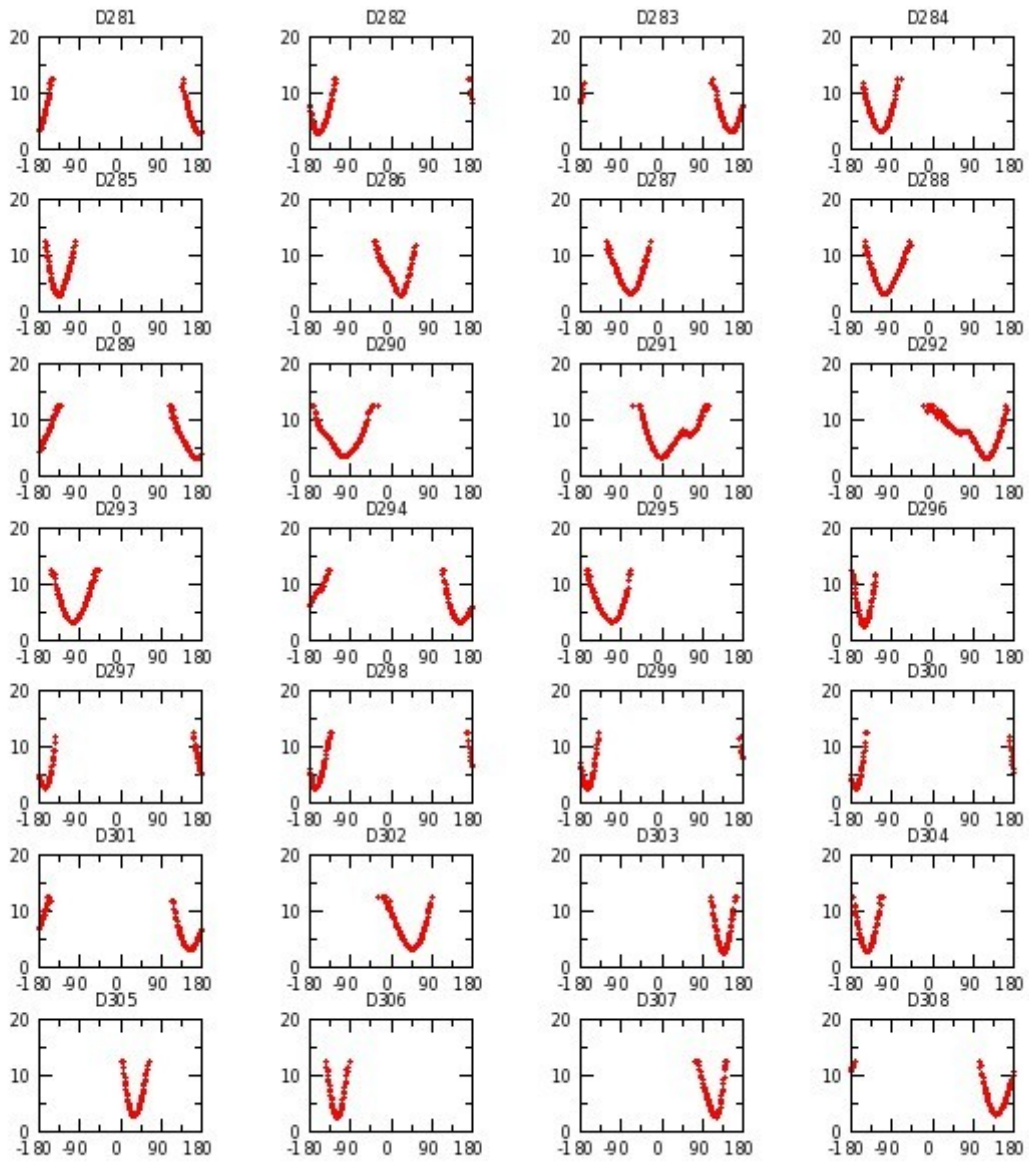


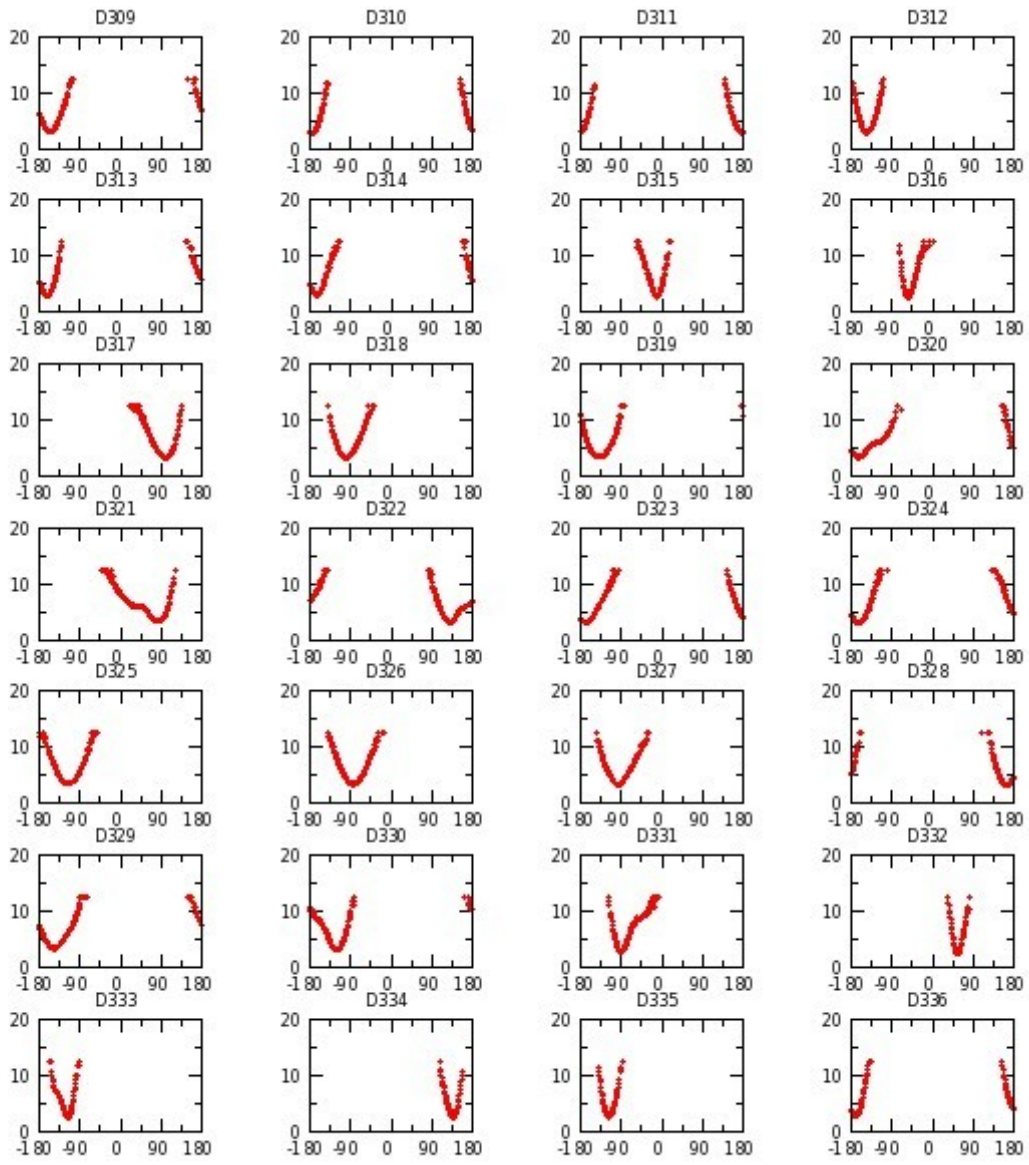


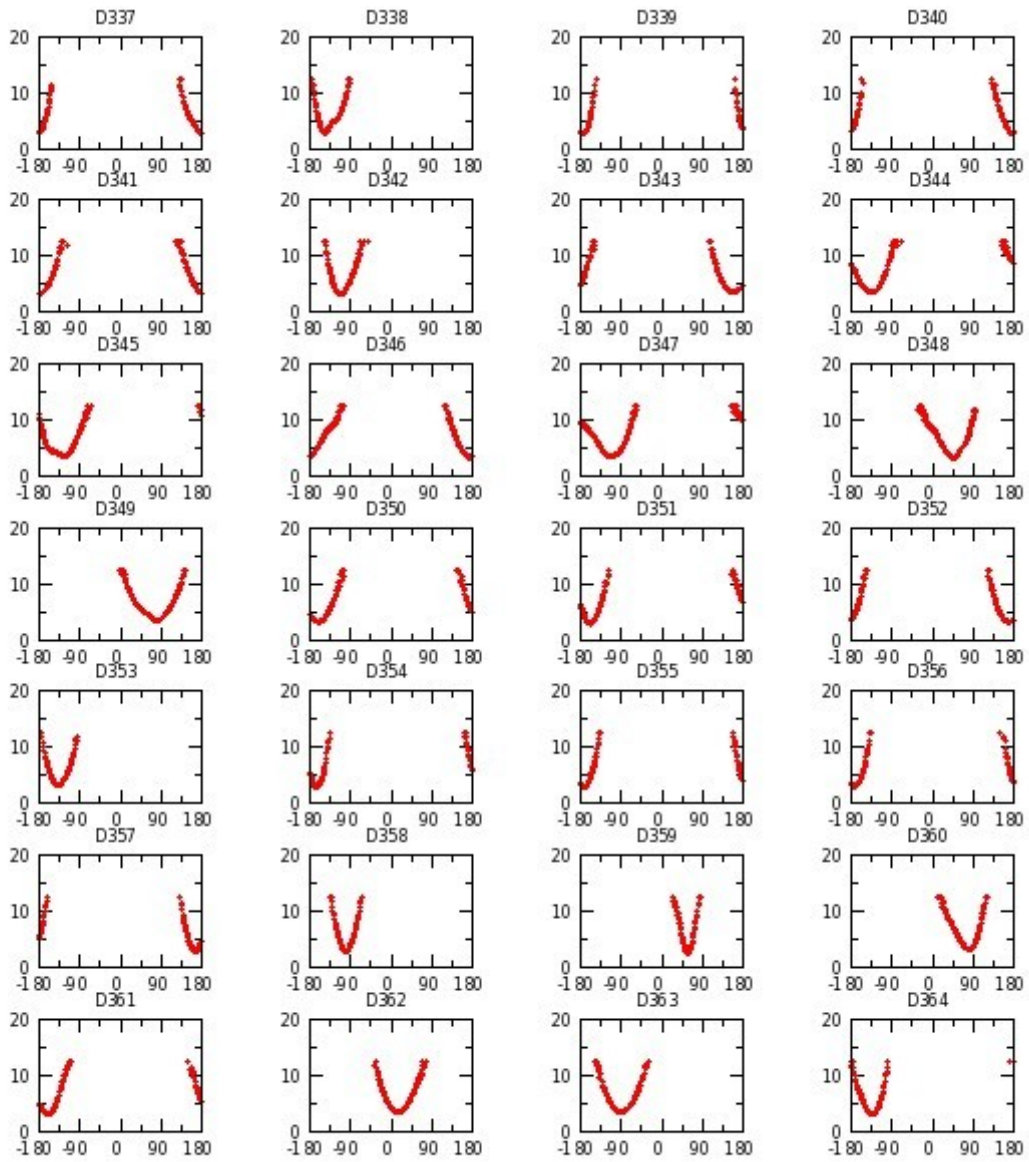


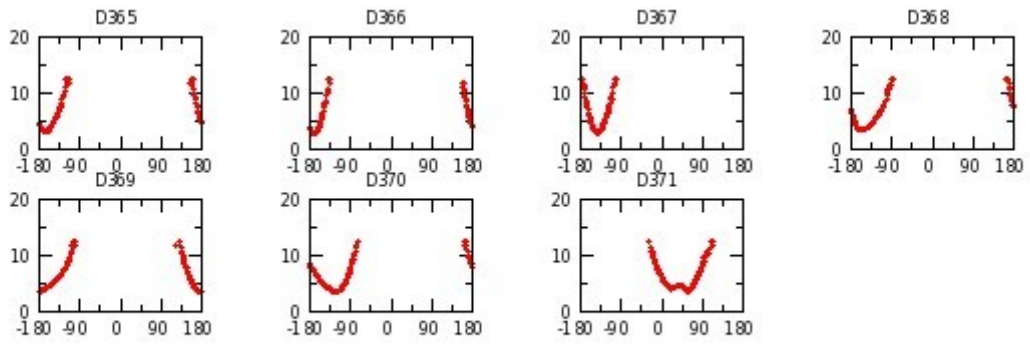




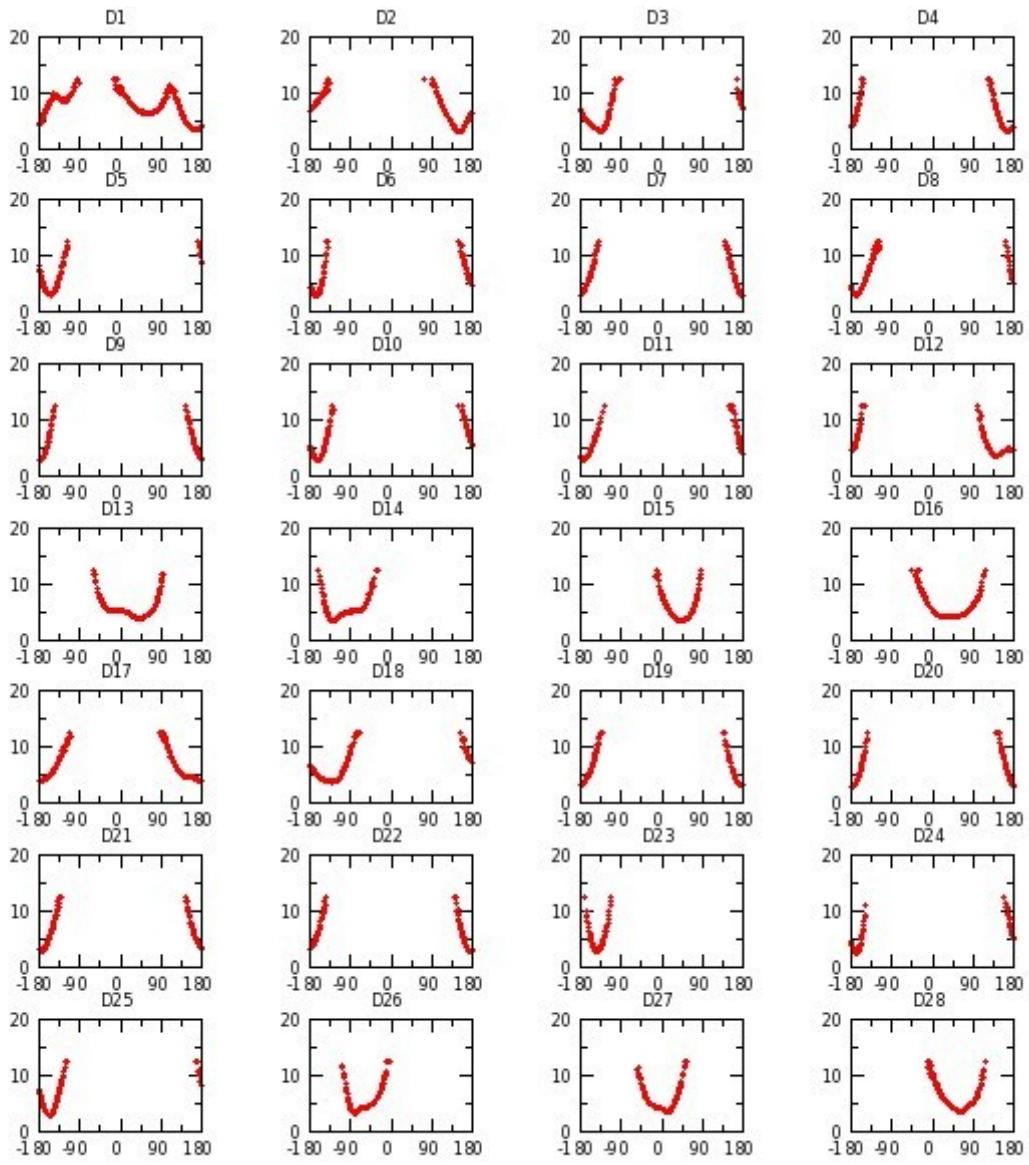


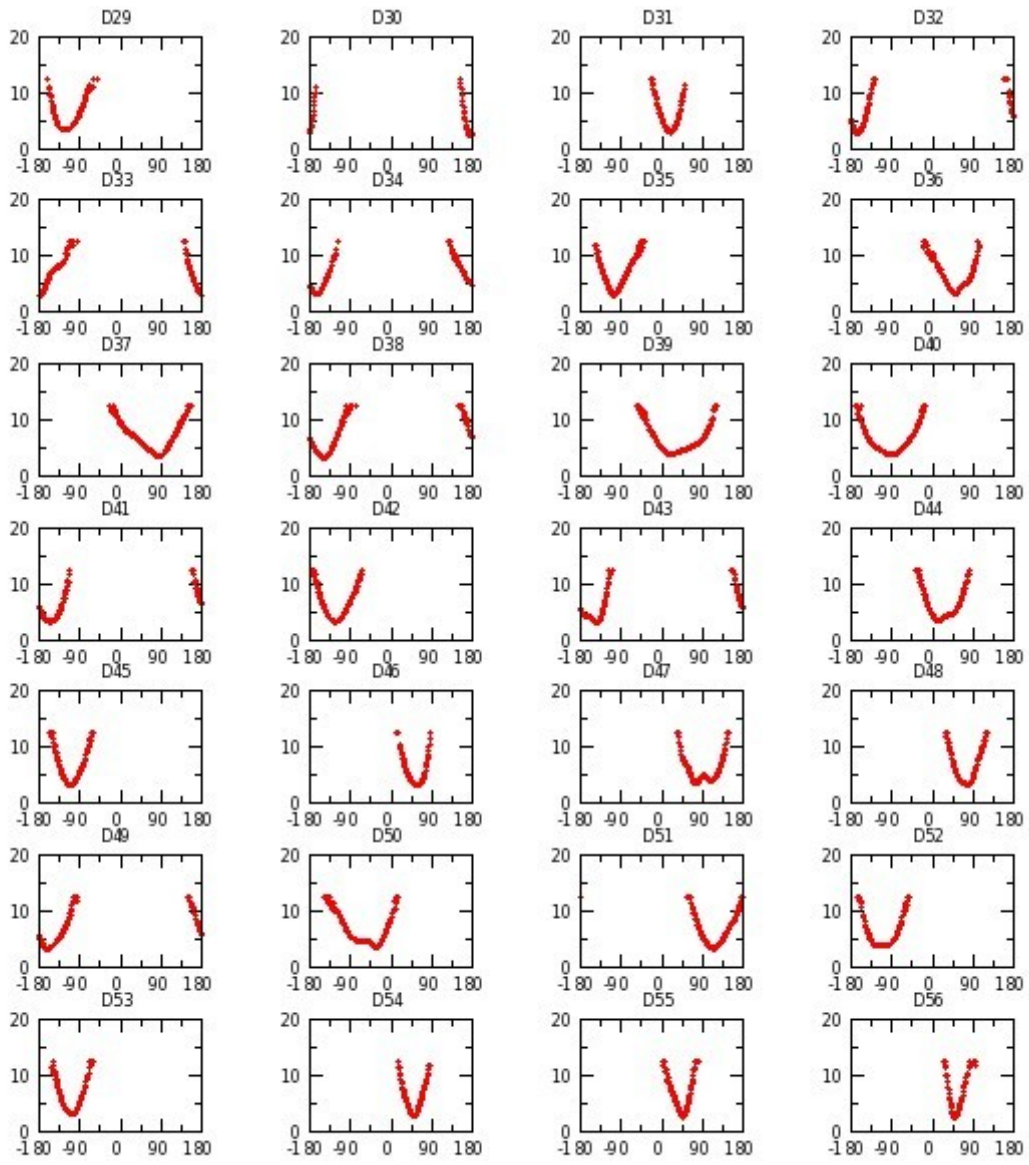


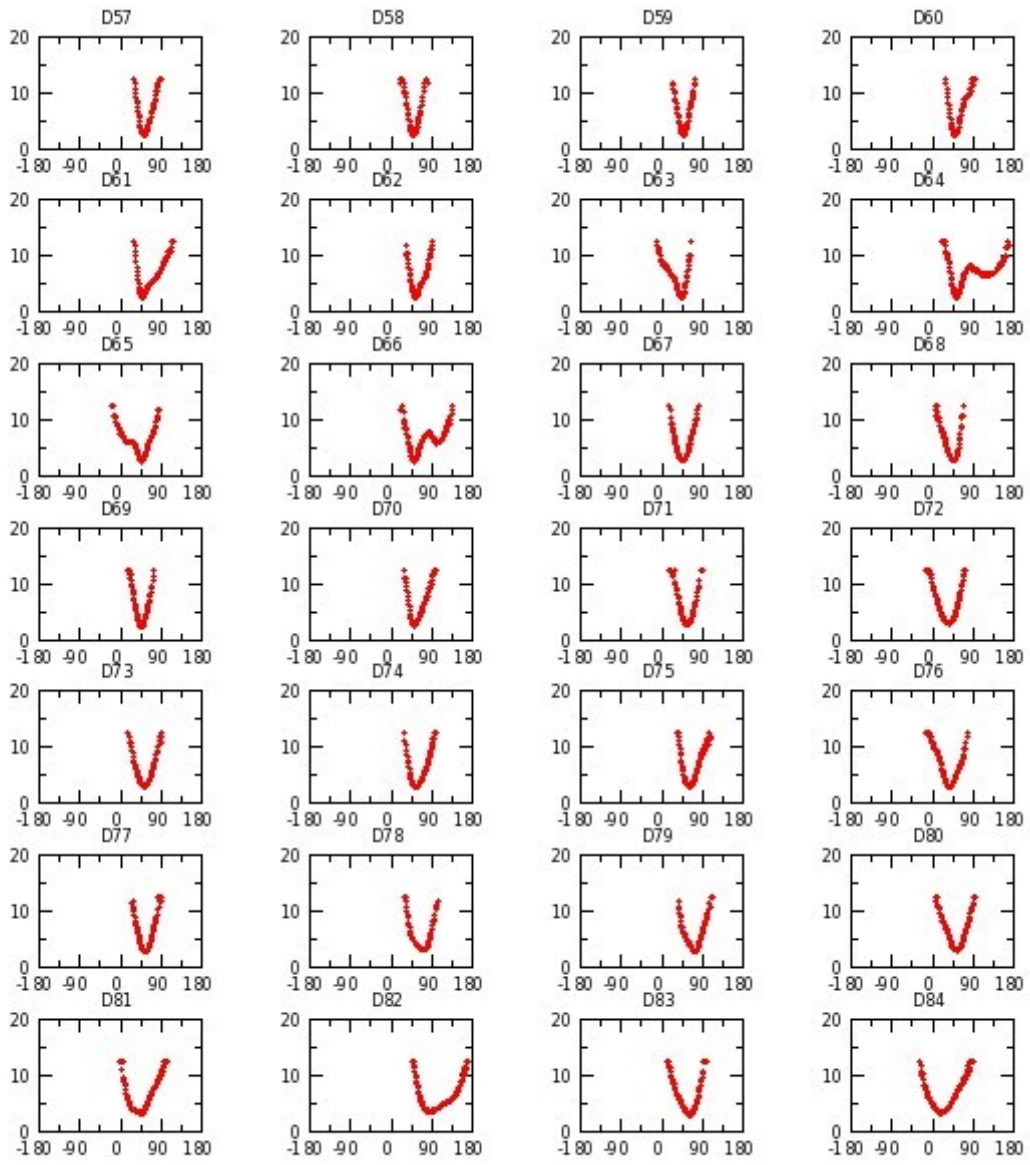


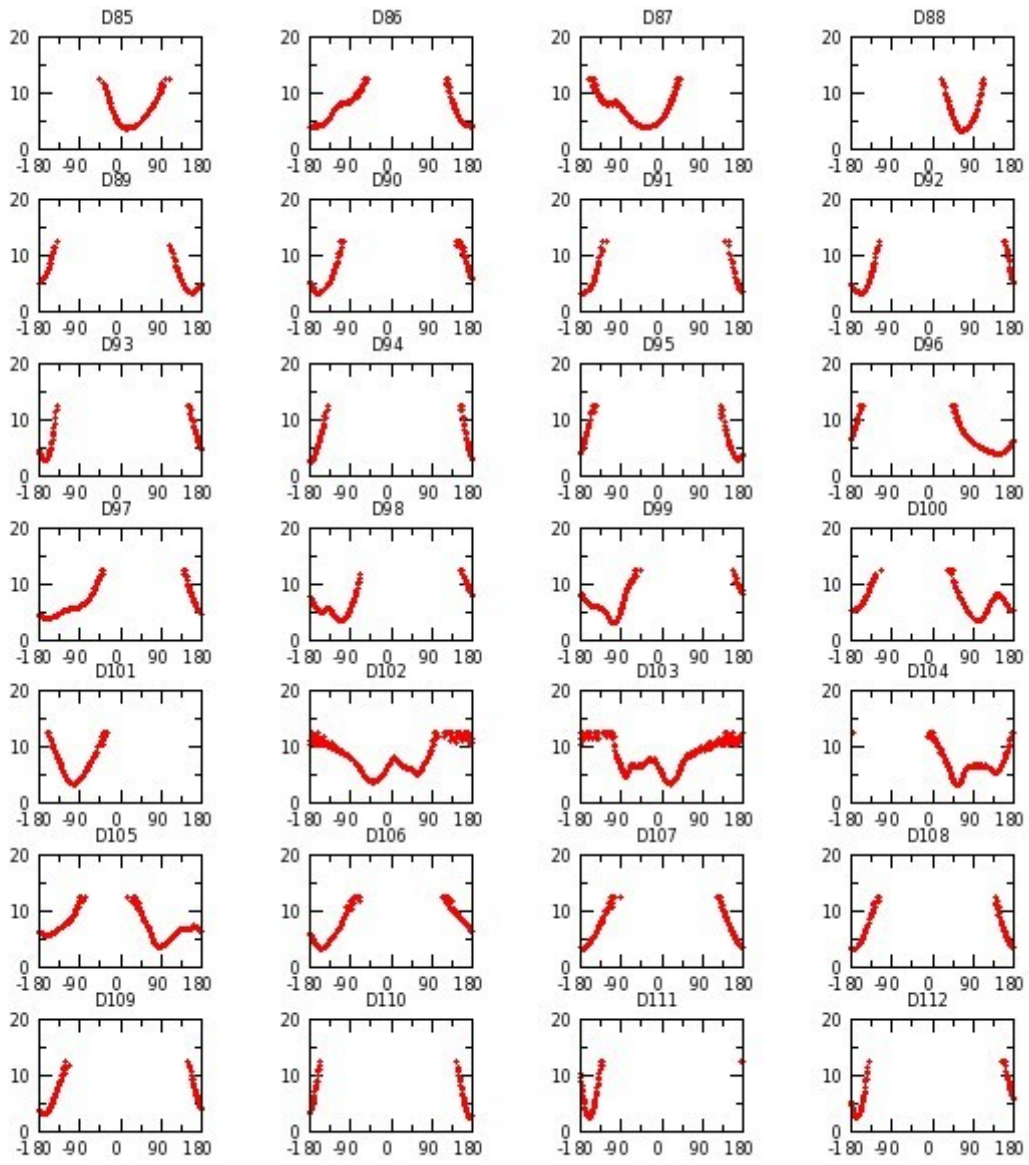


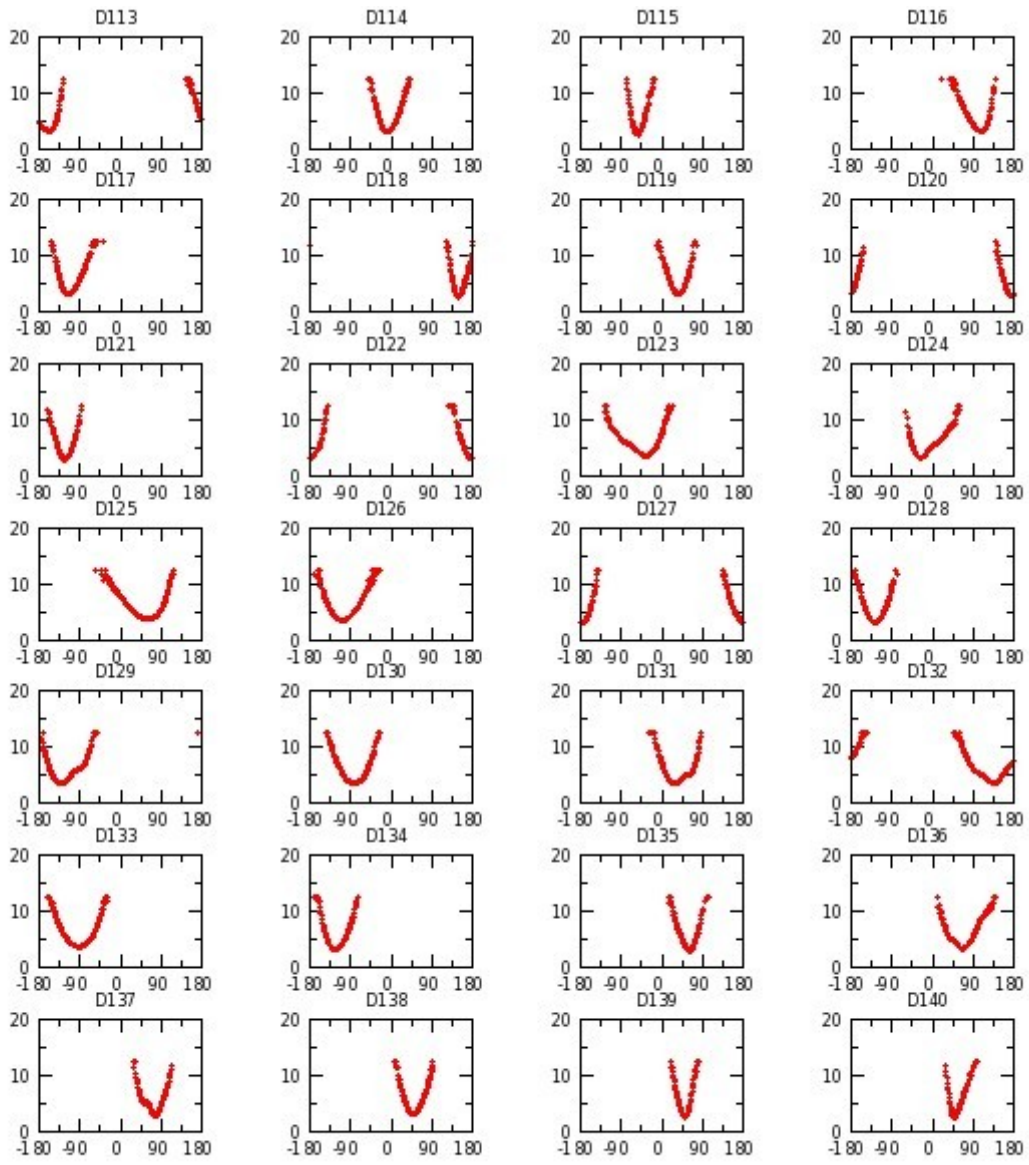
Annexe G 27 : H_SaGAL réplique III

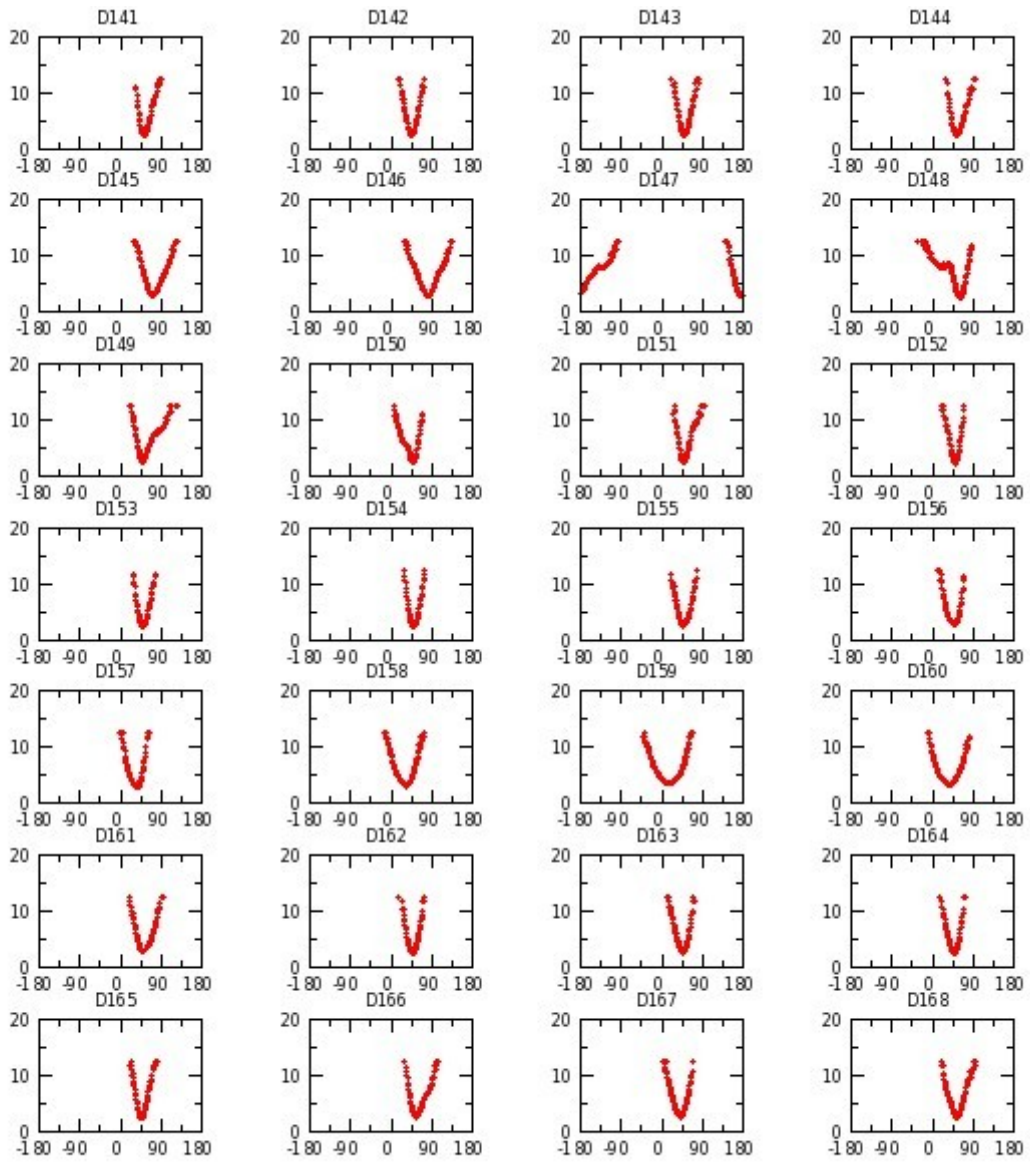


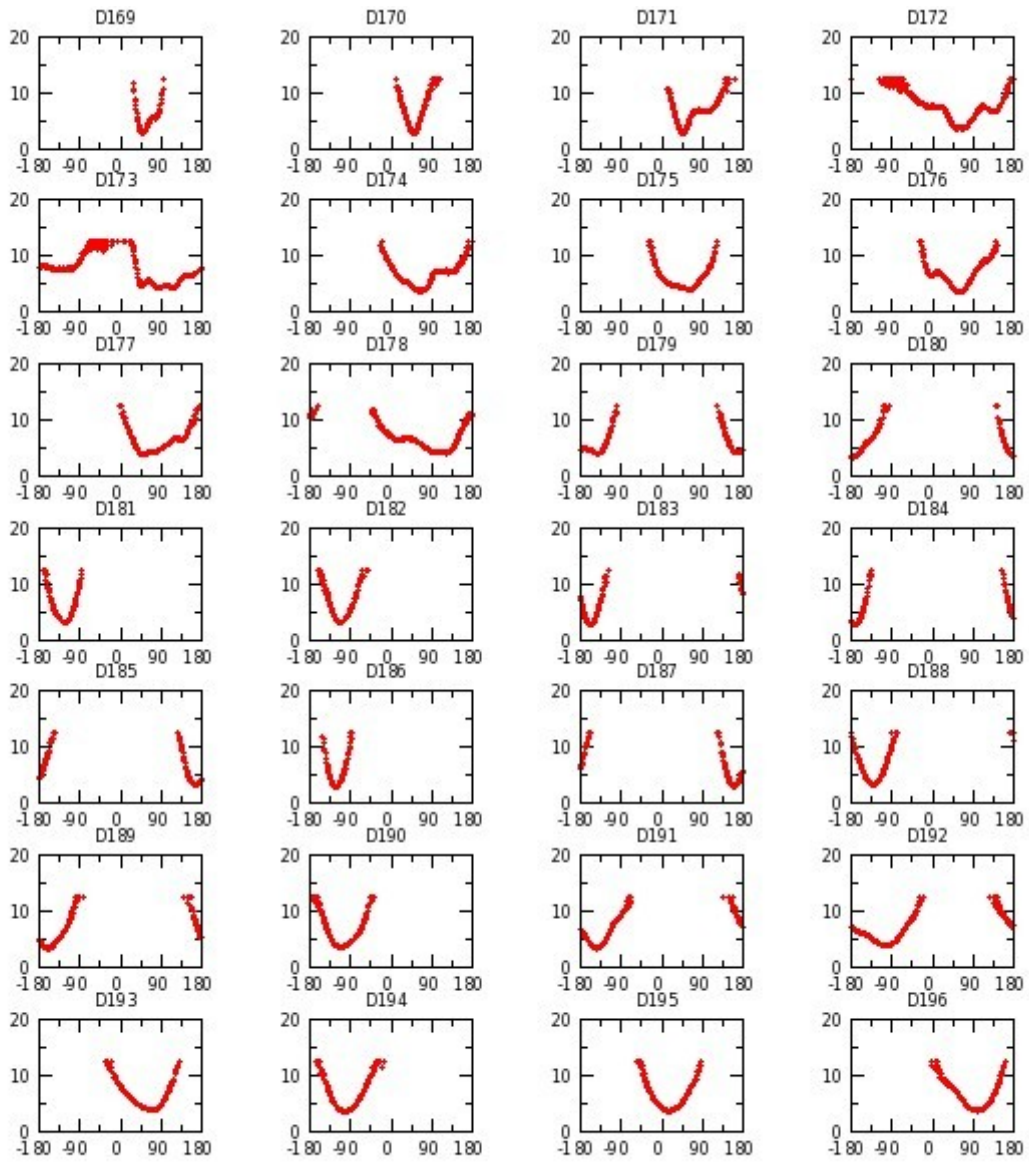


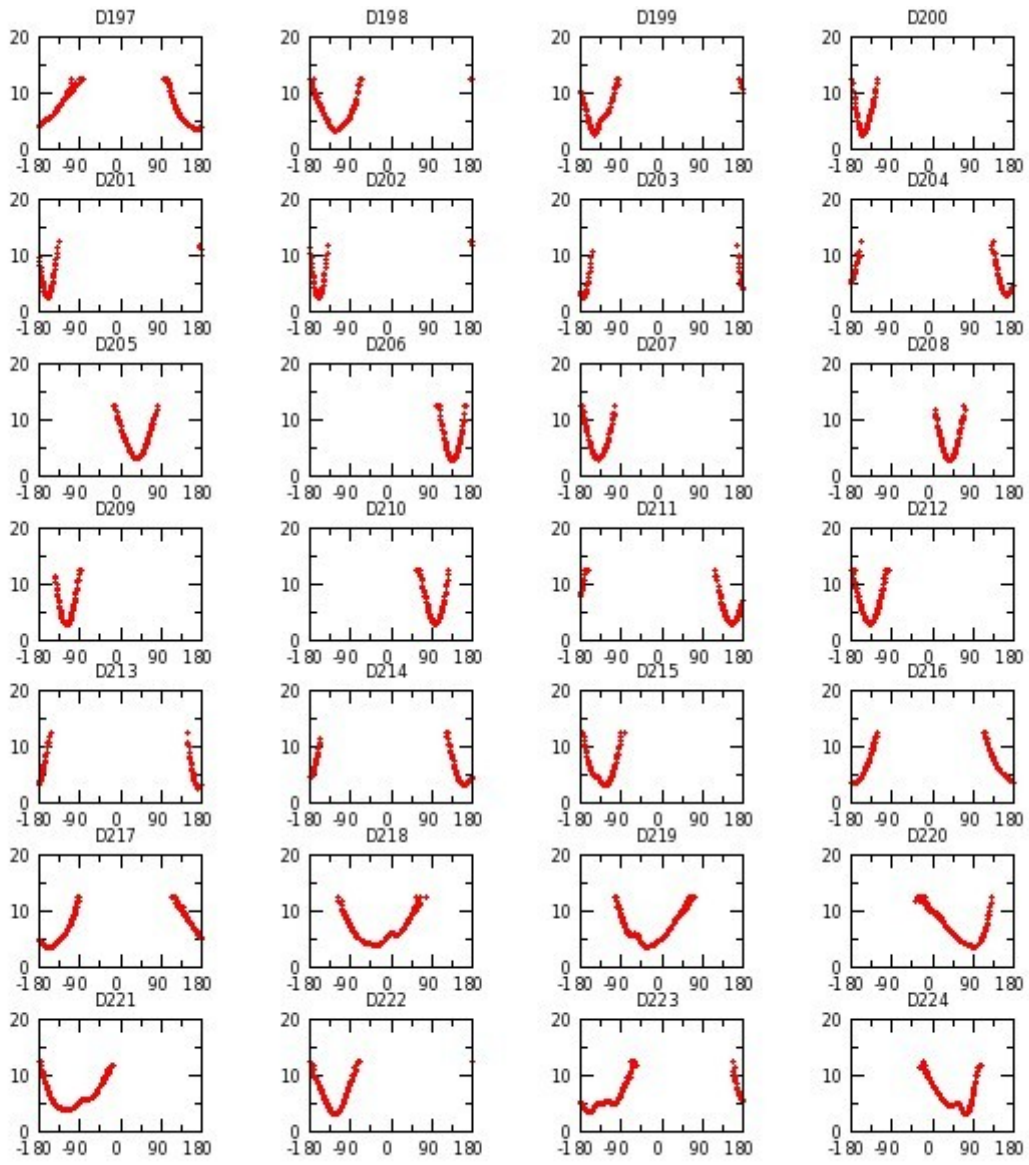


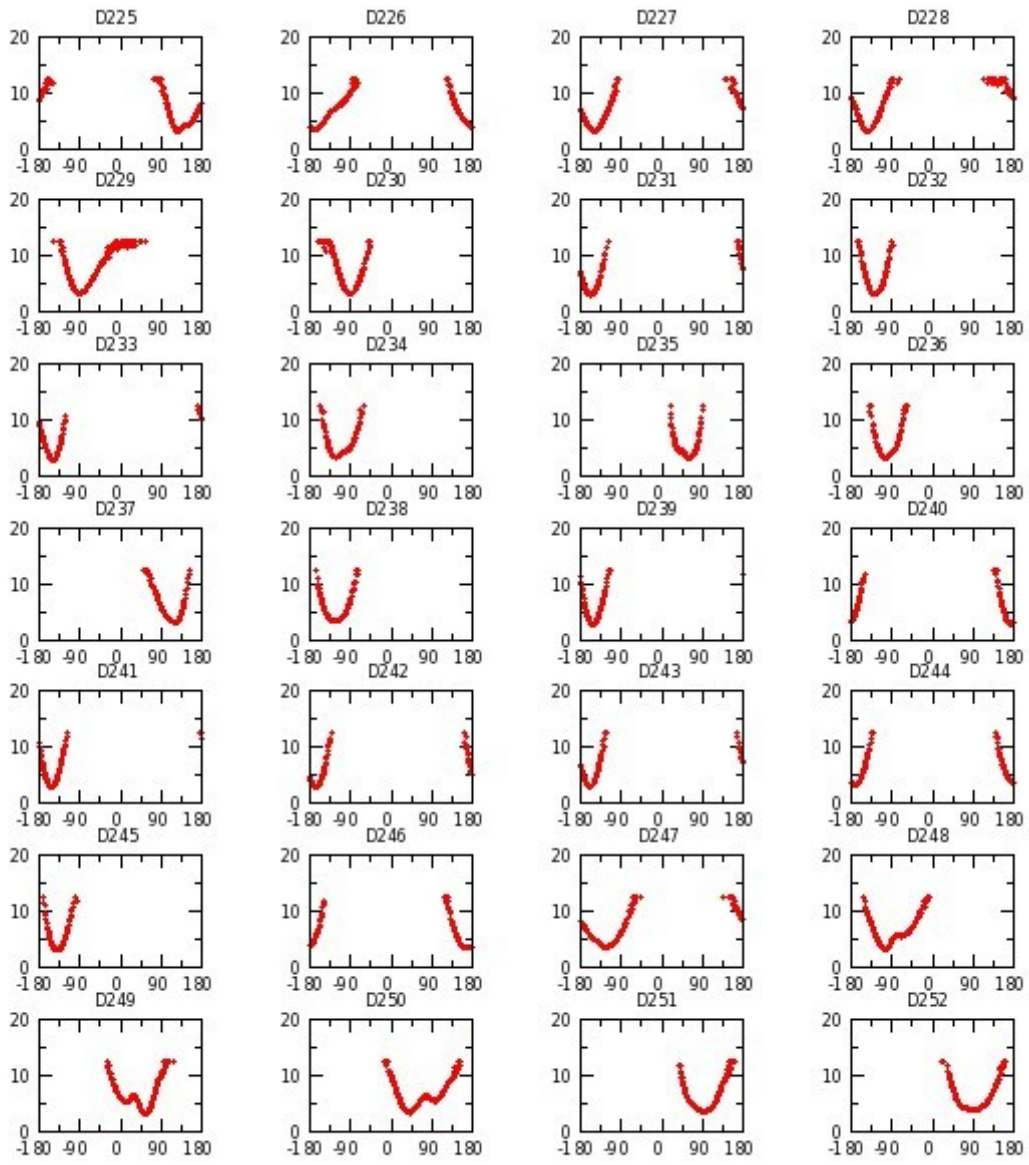


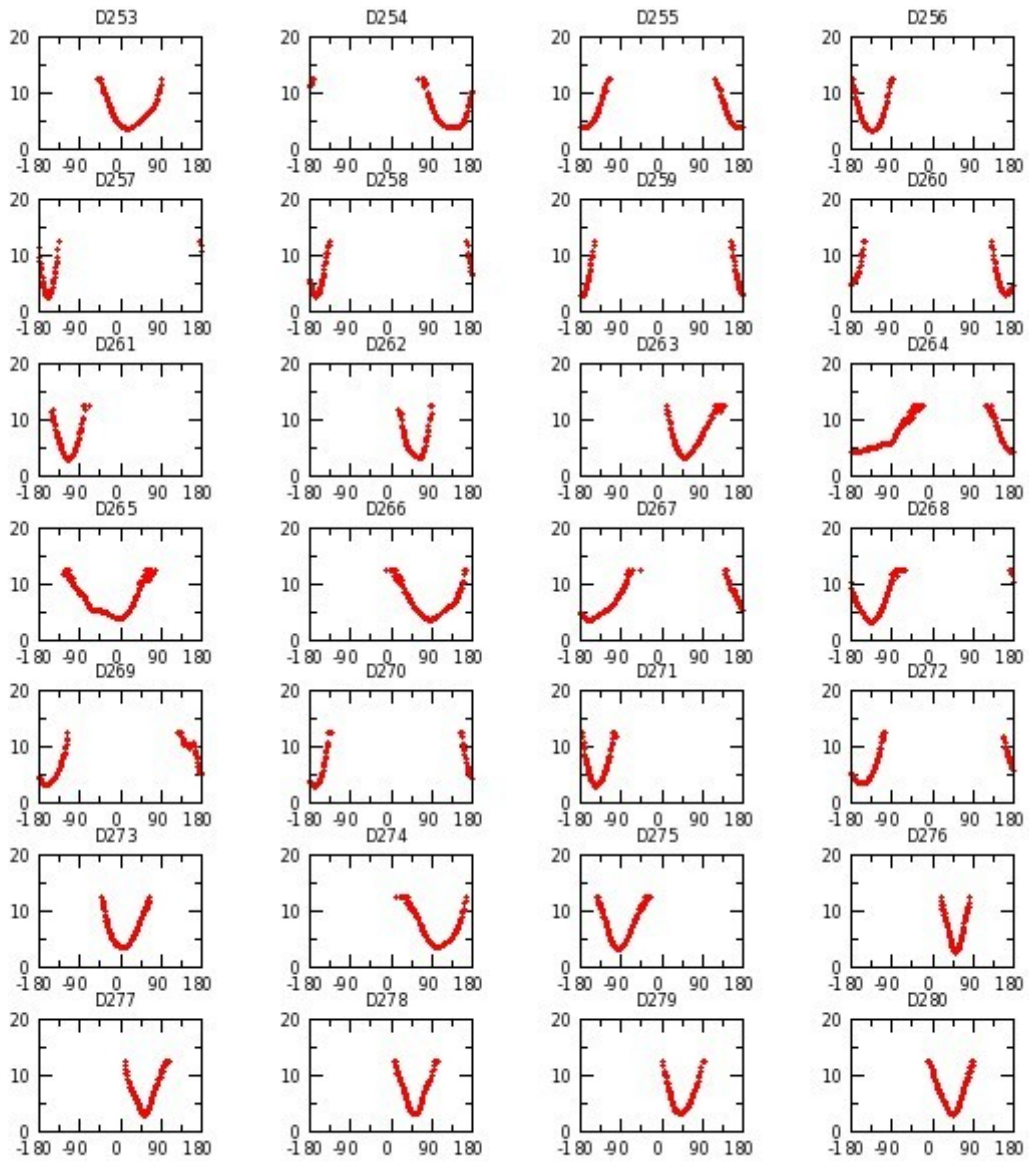


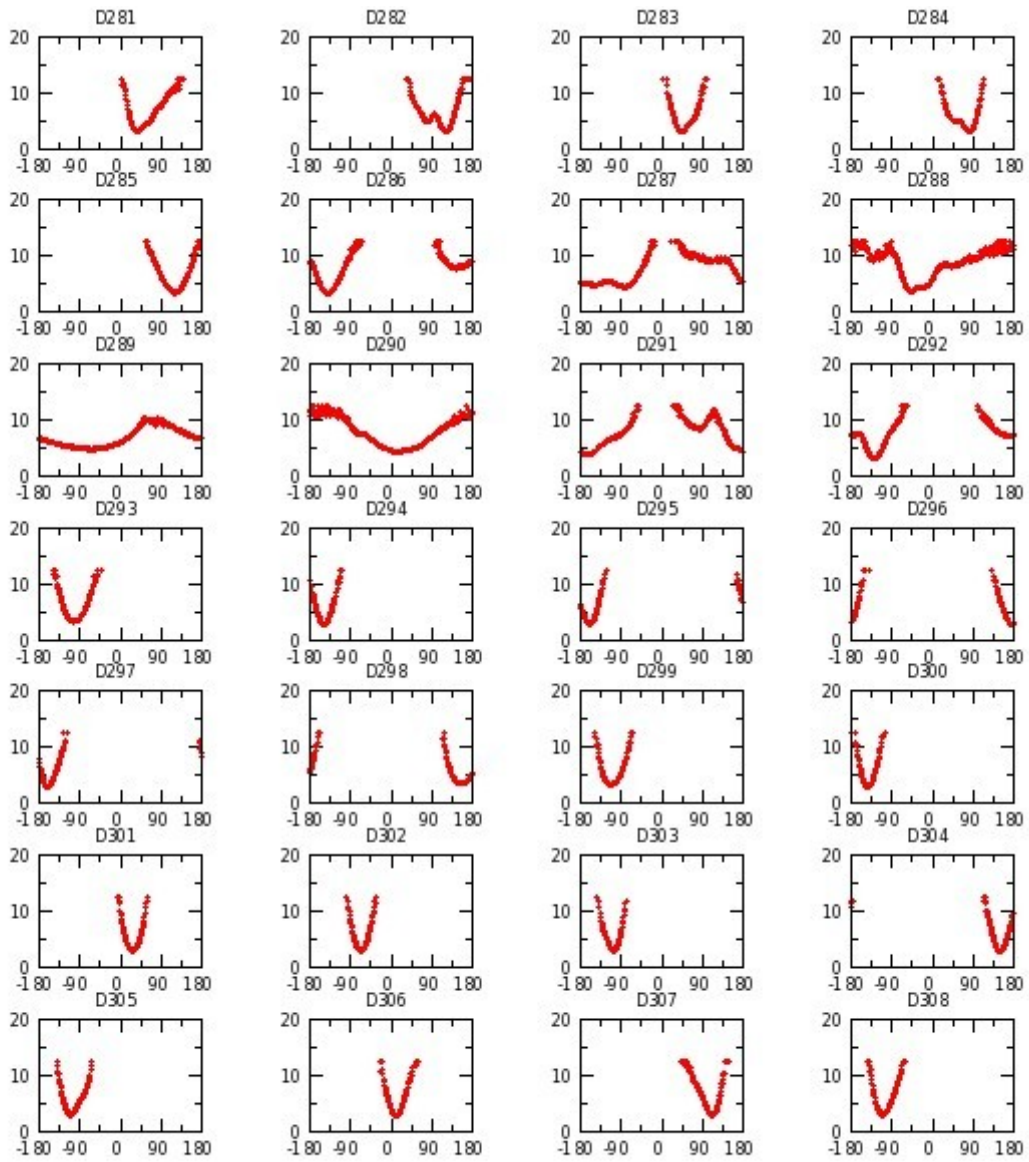


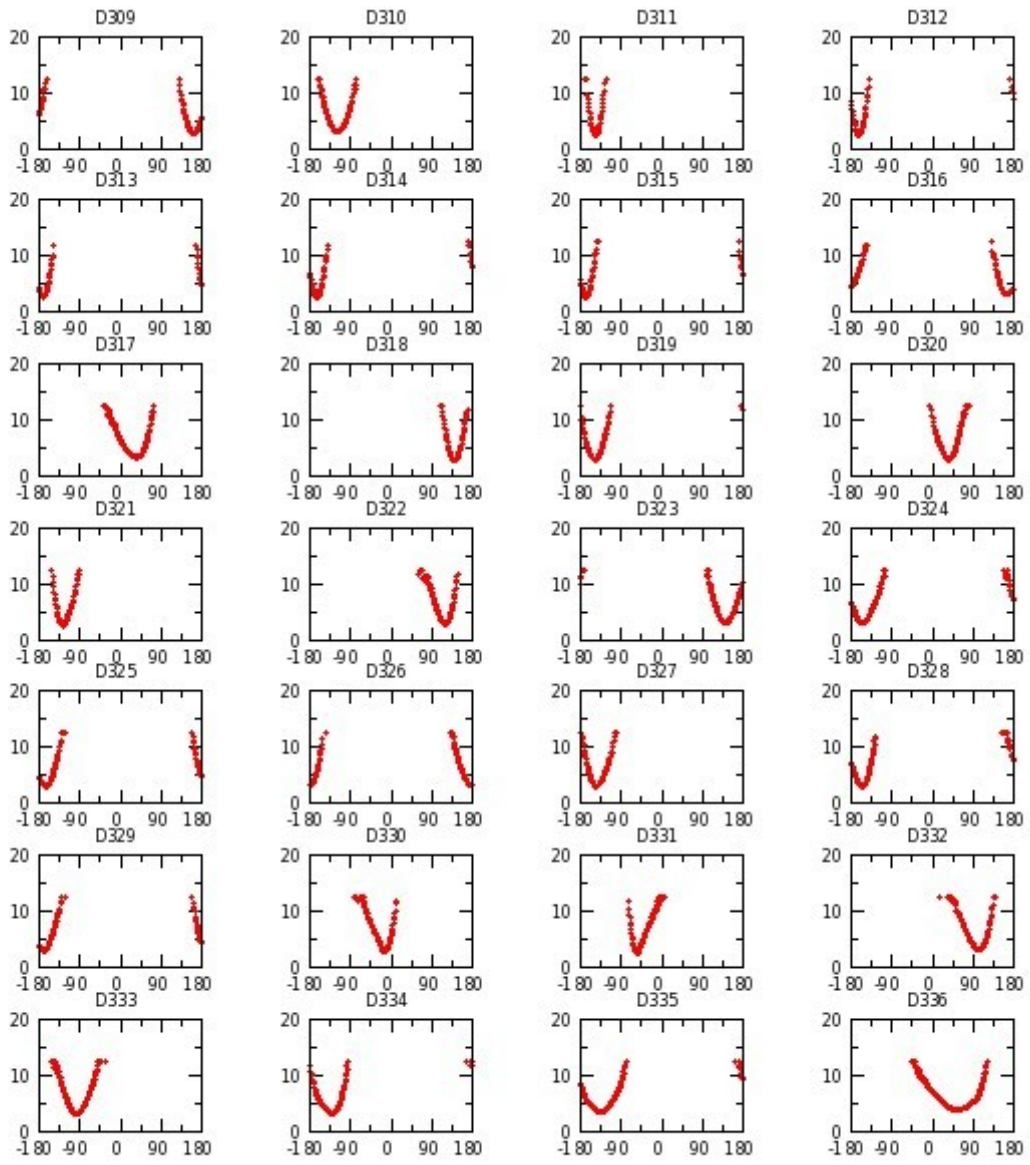


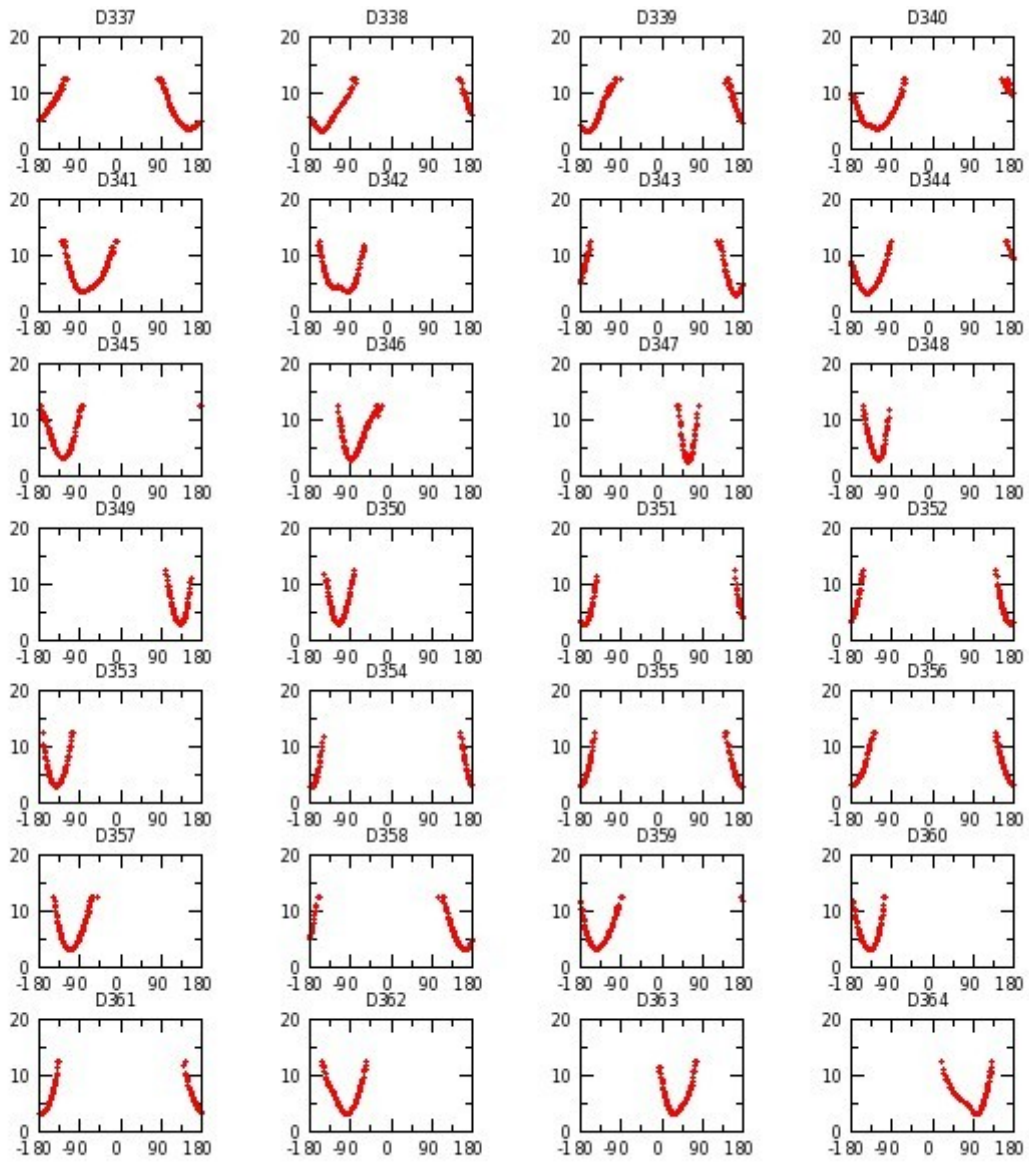


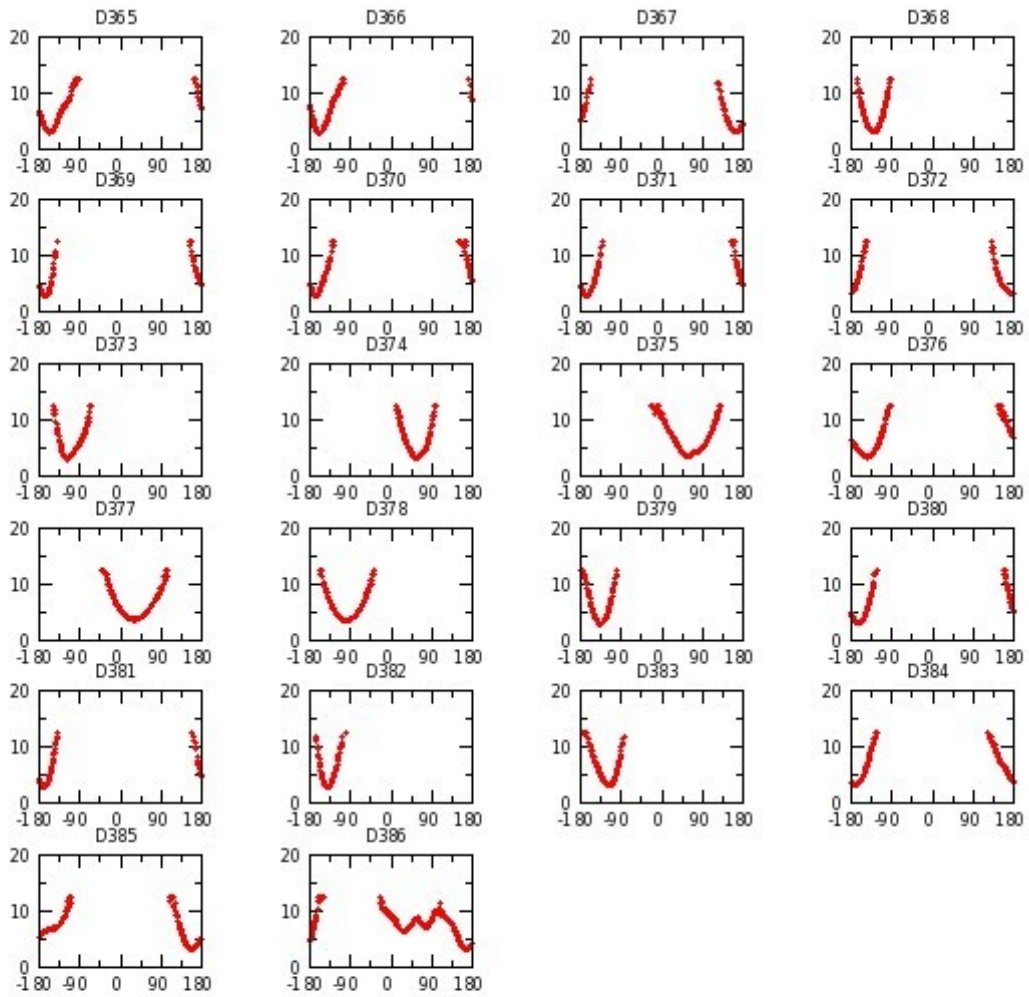




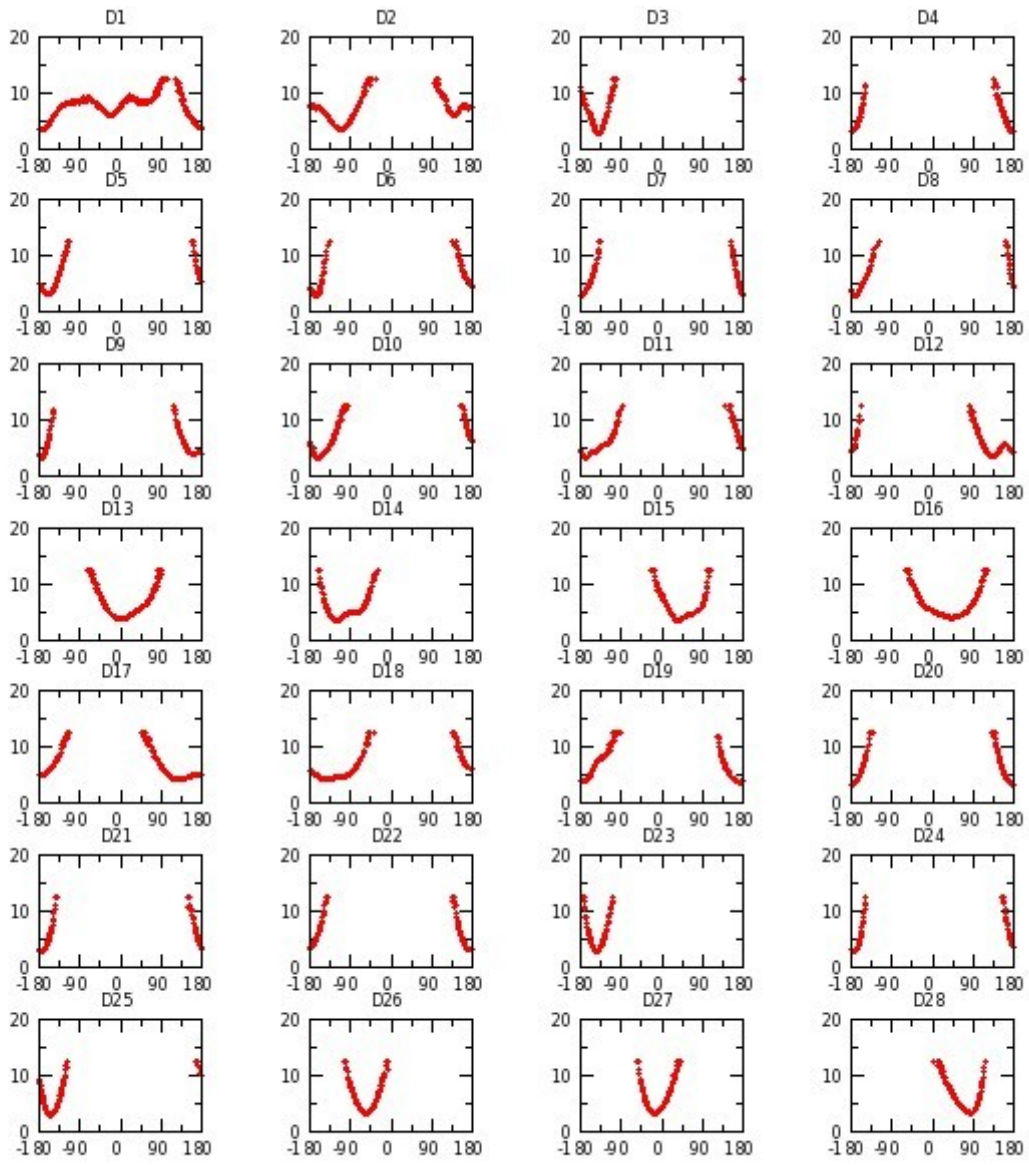


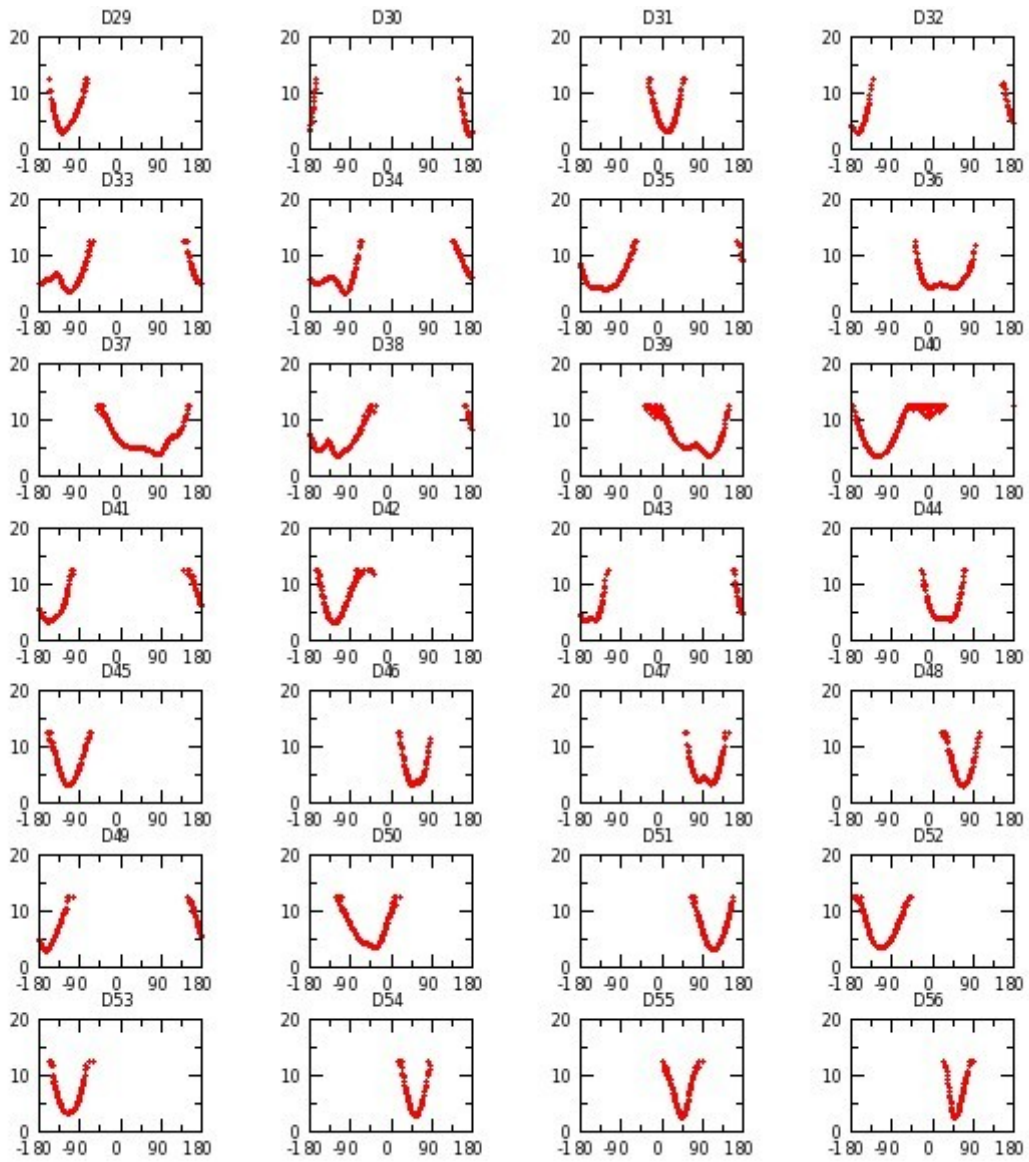


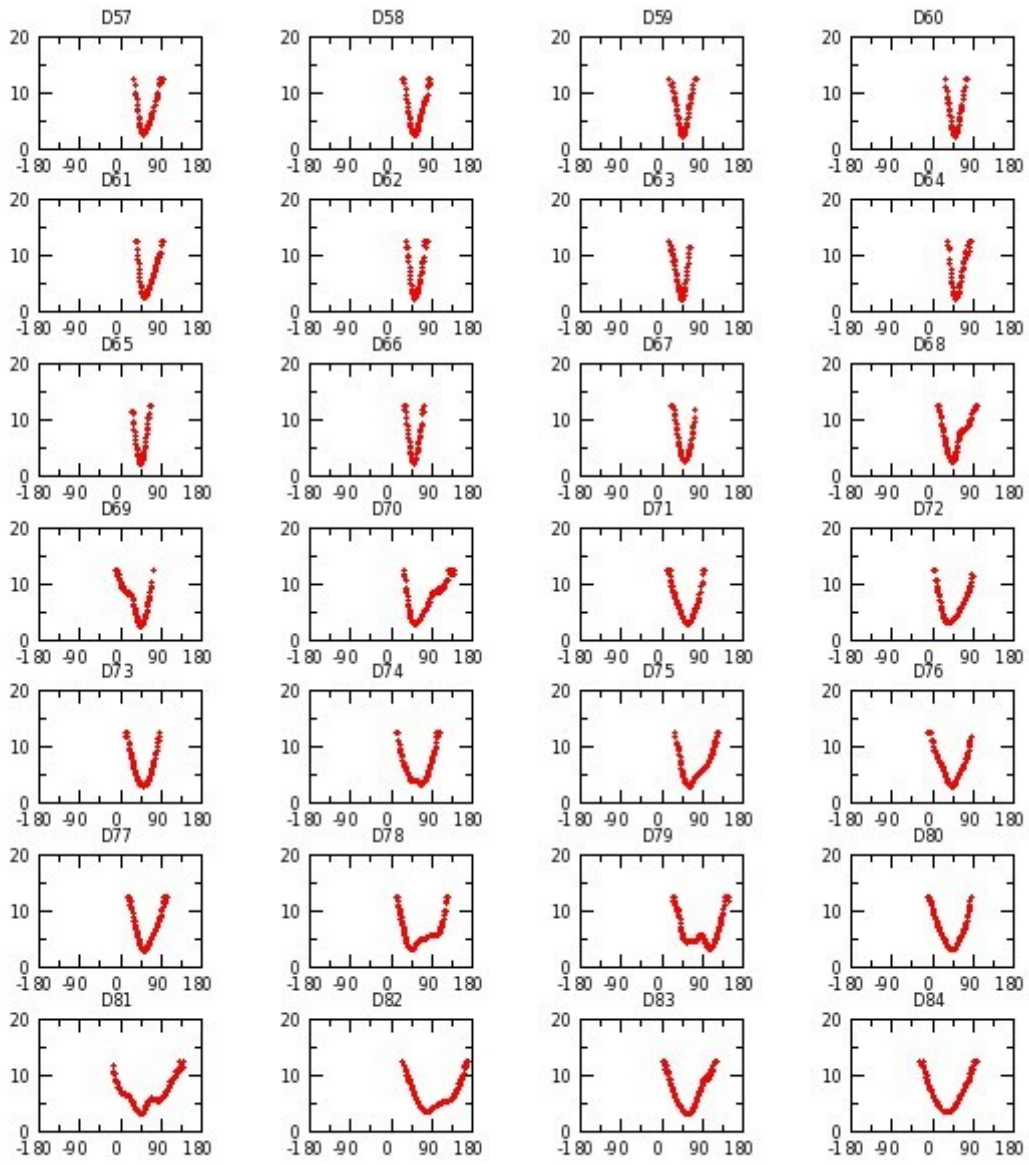


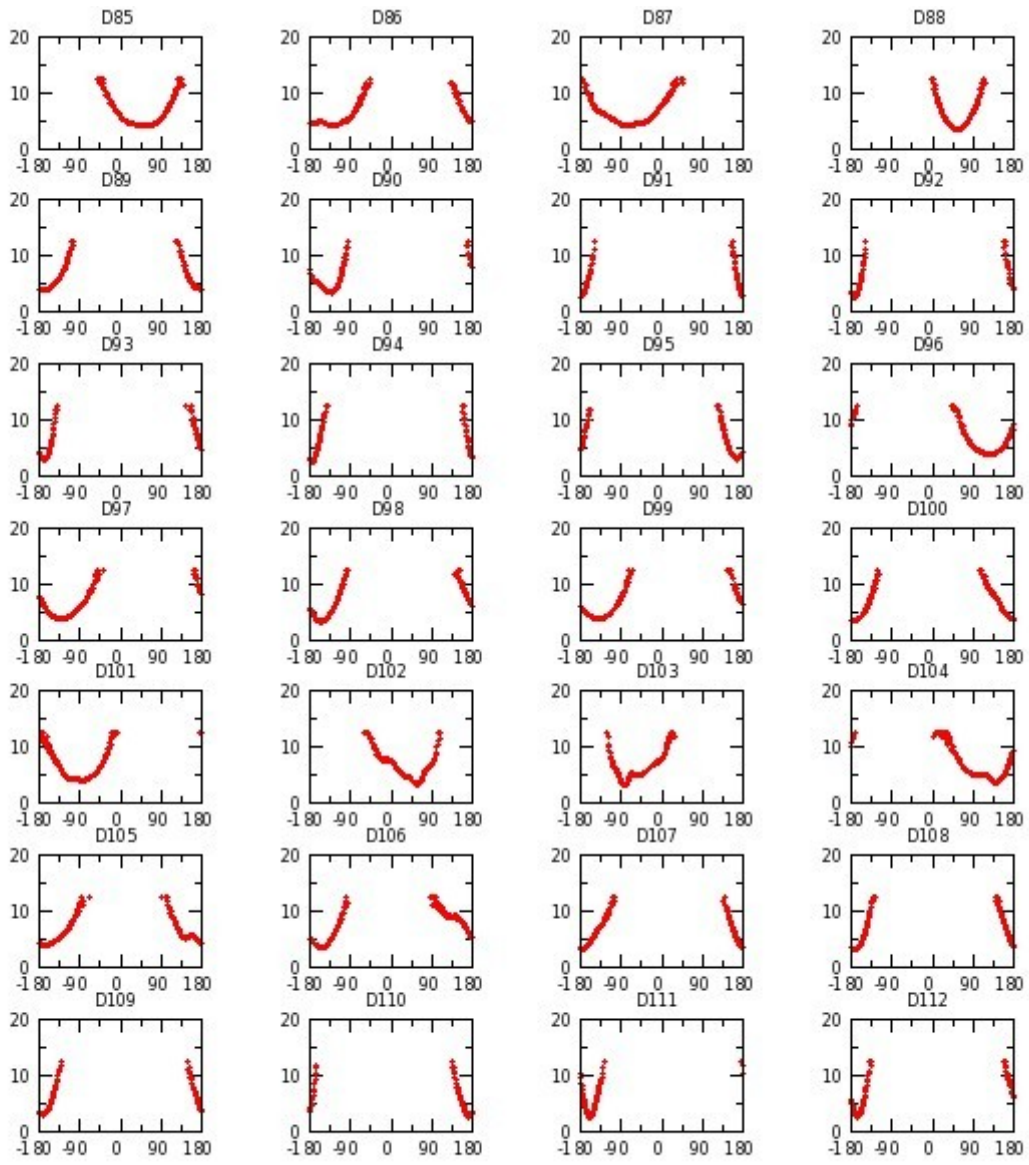


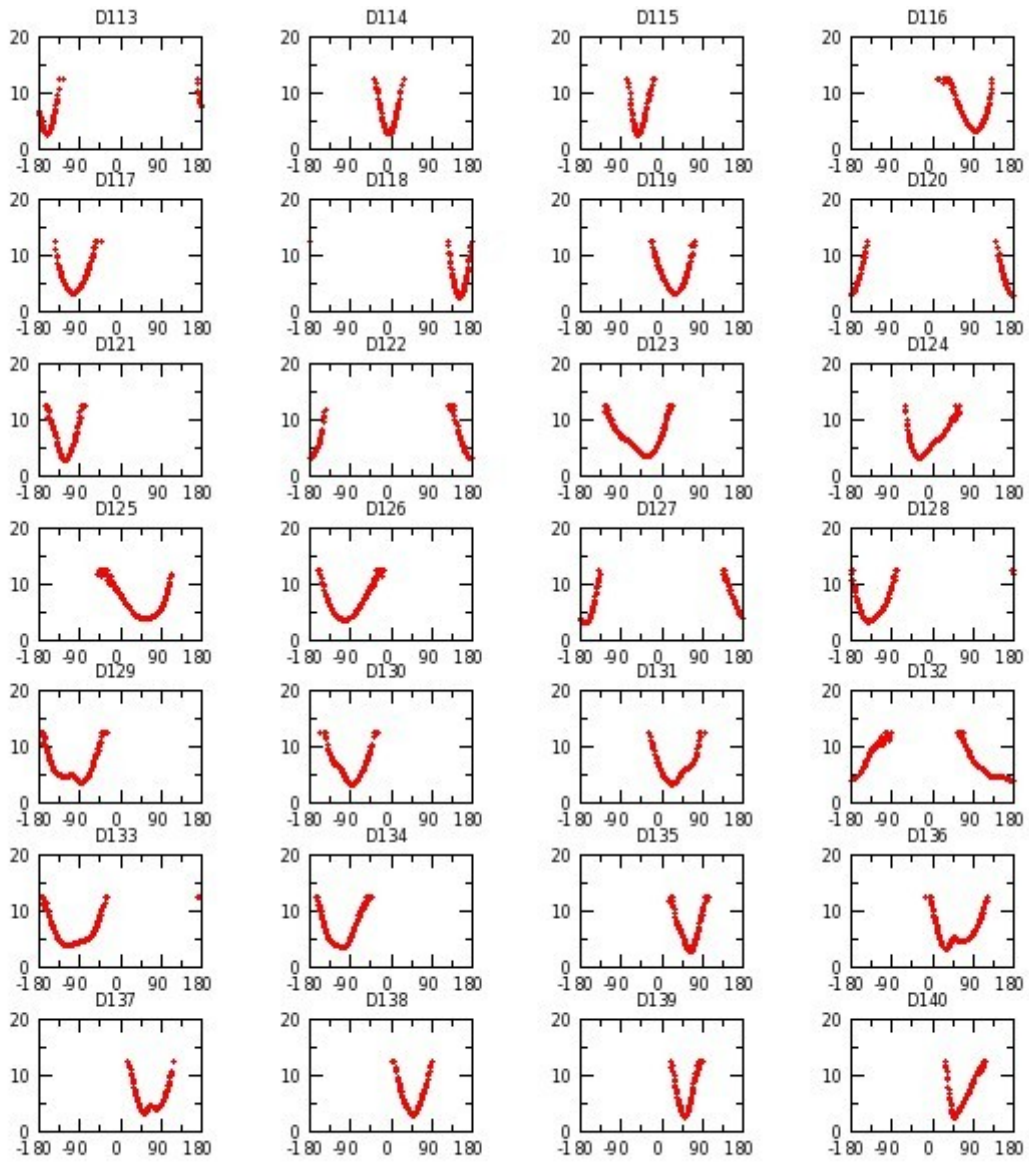
Annexe G 28 : M_7DW réplique I

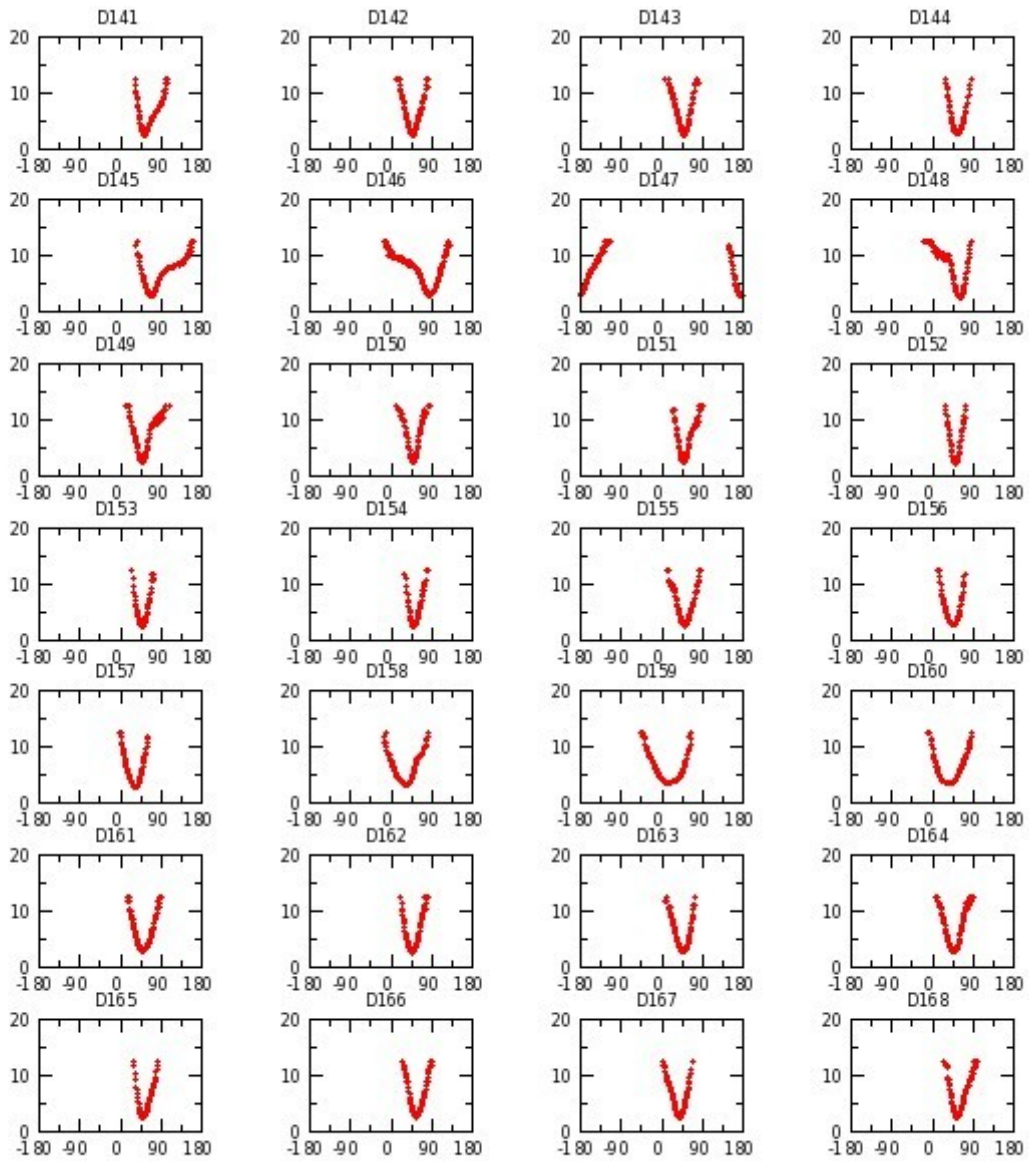


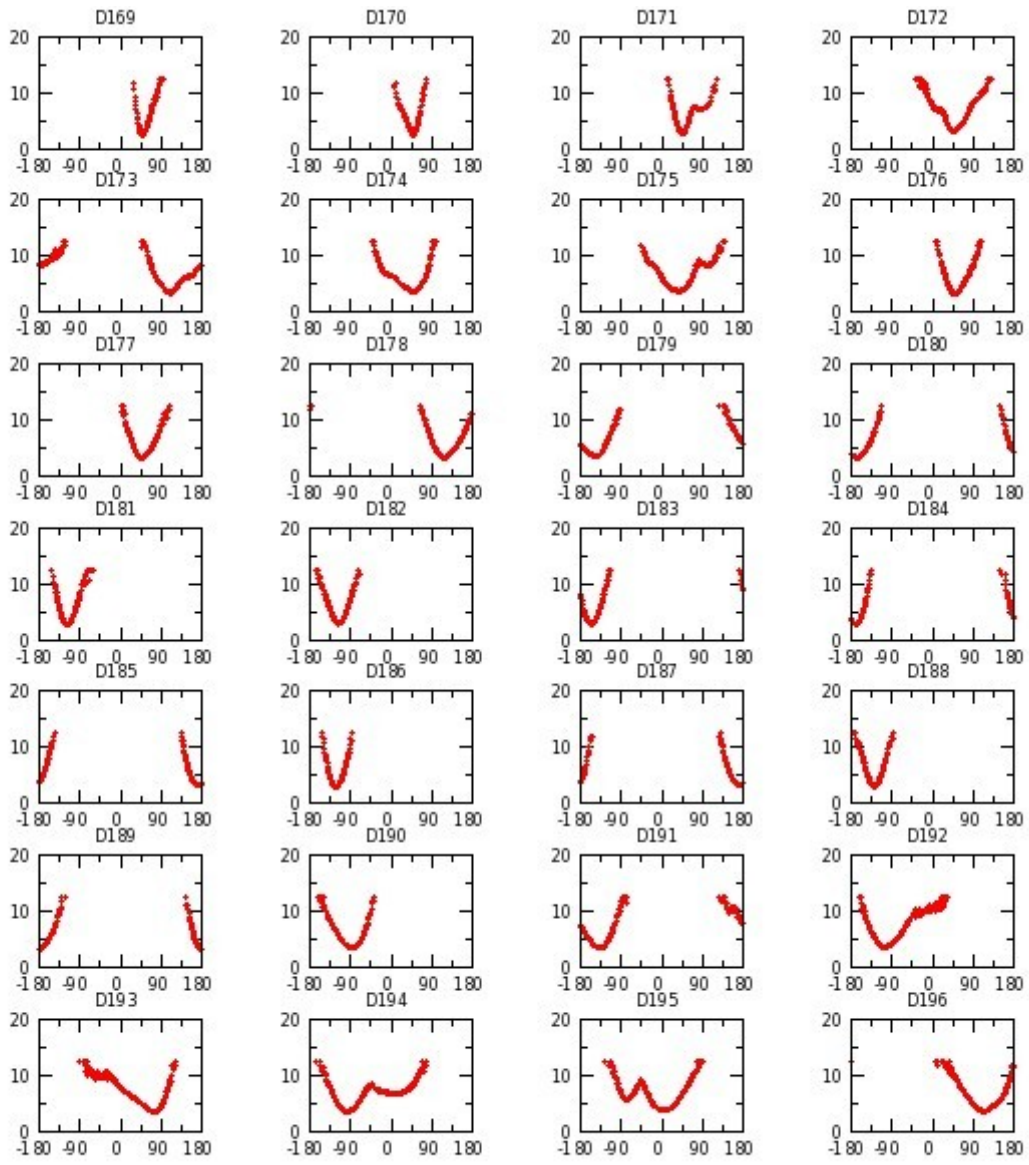


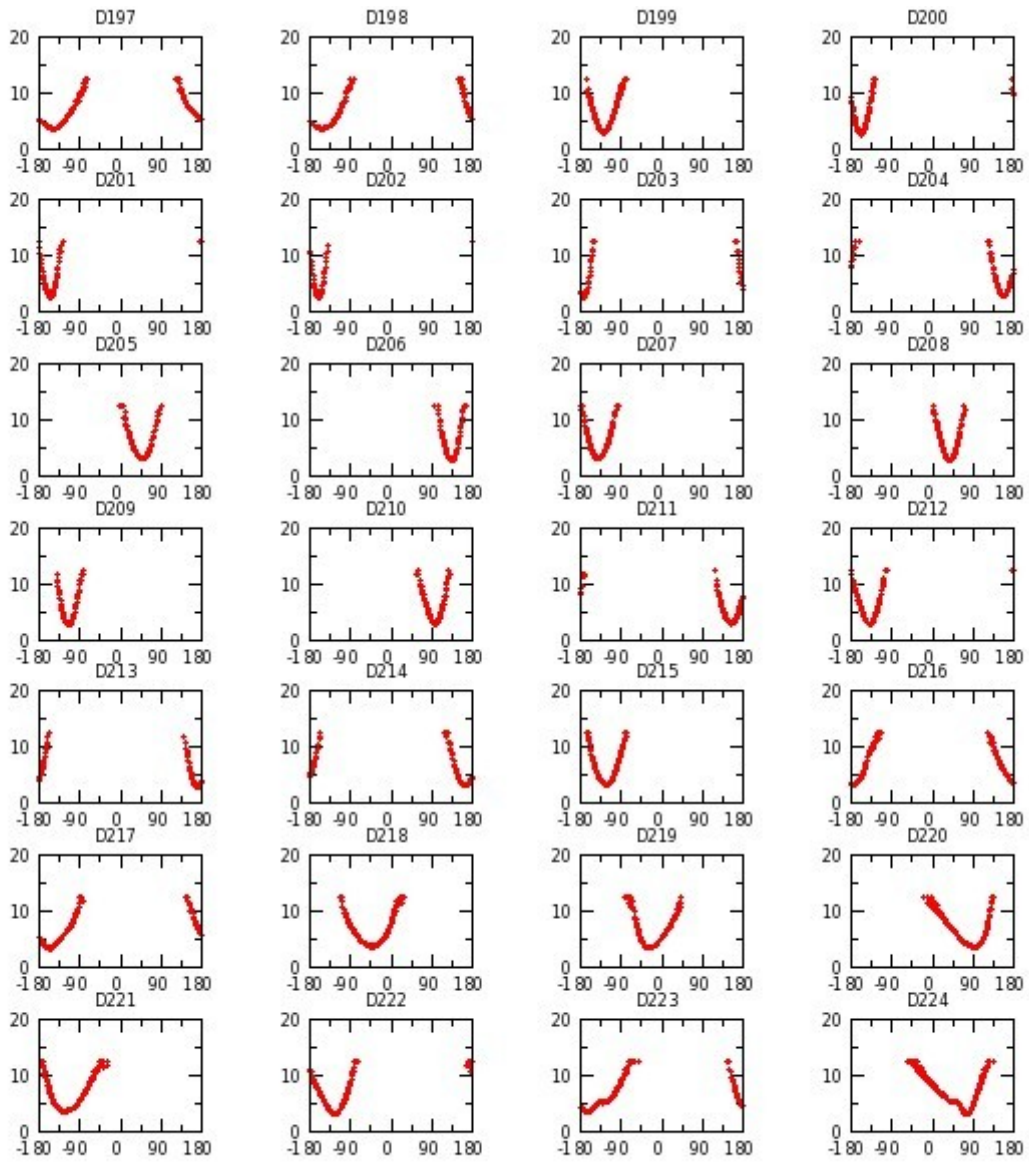


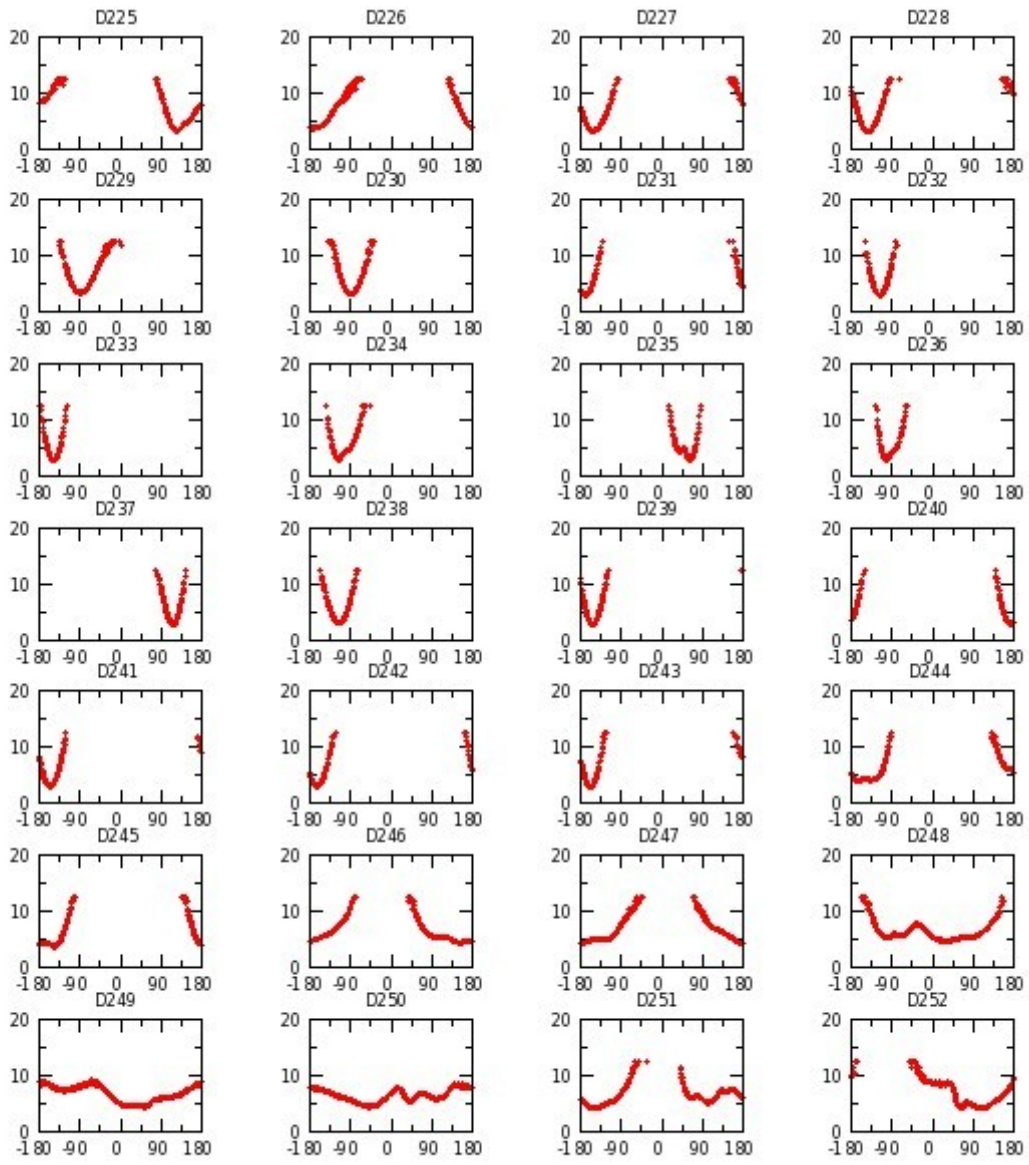


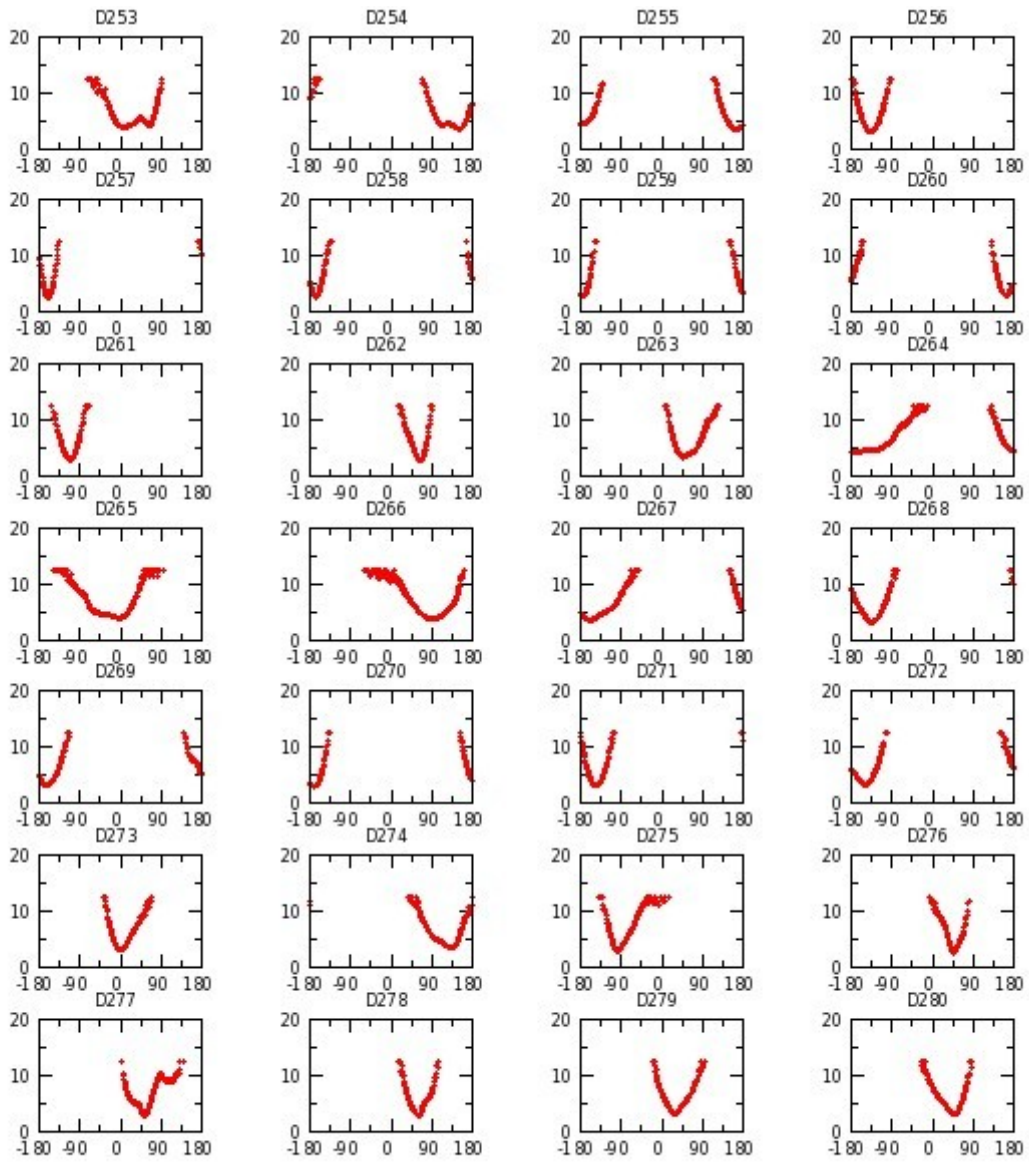


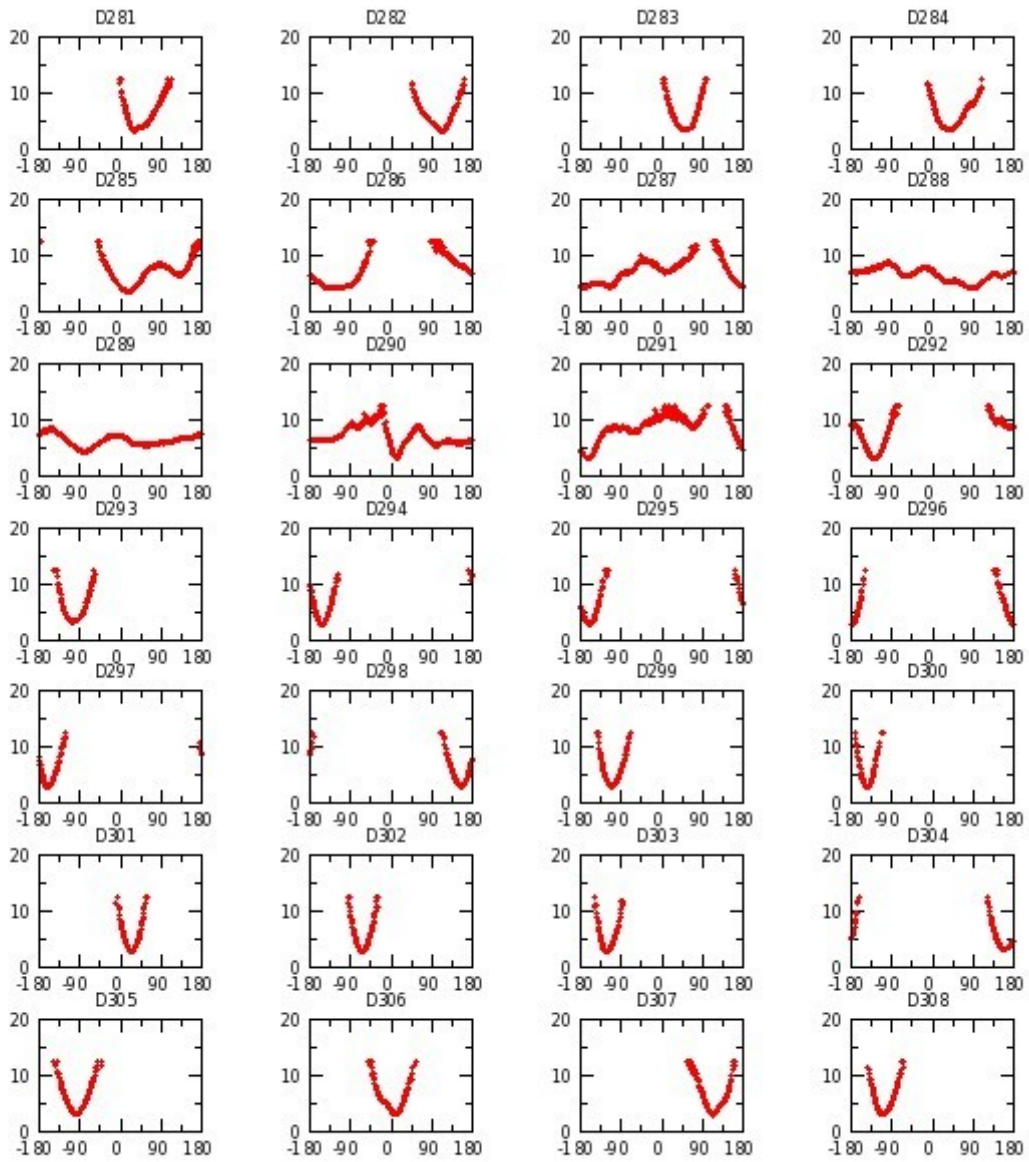


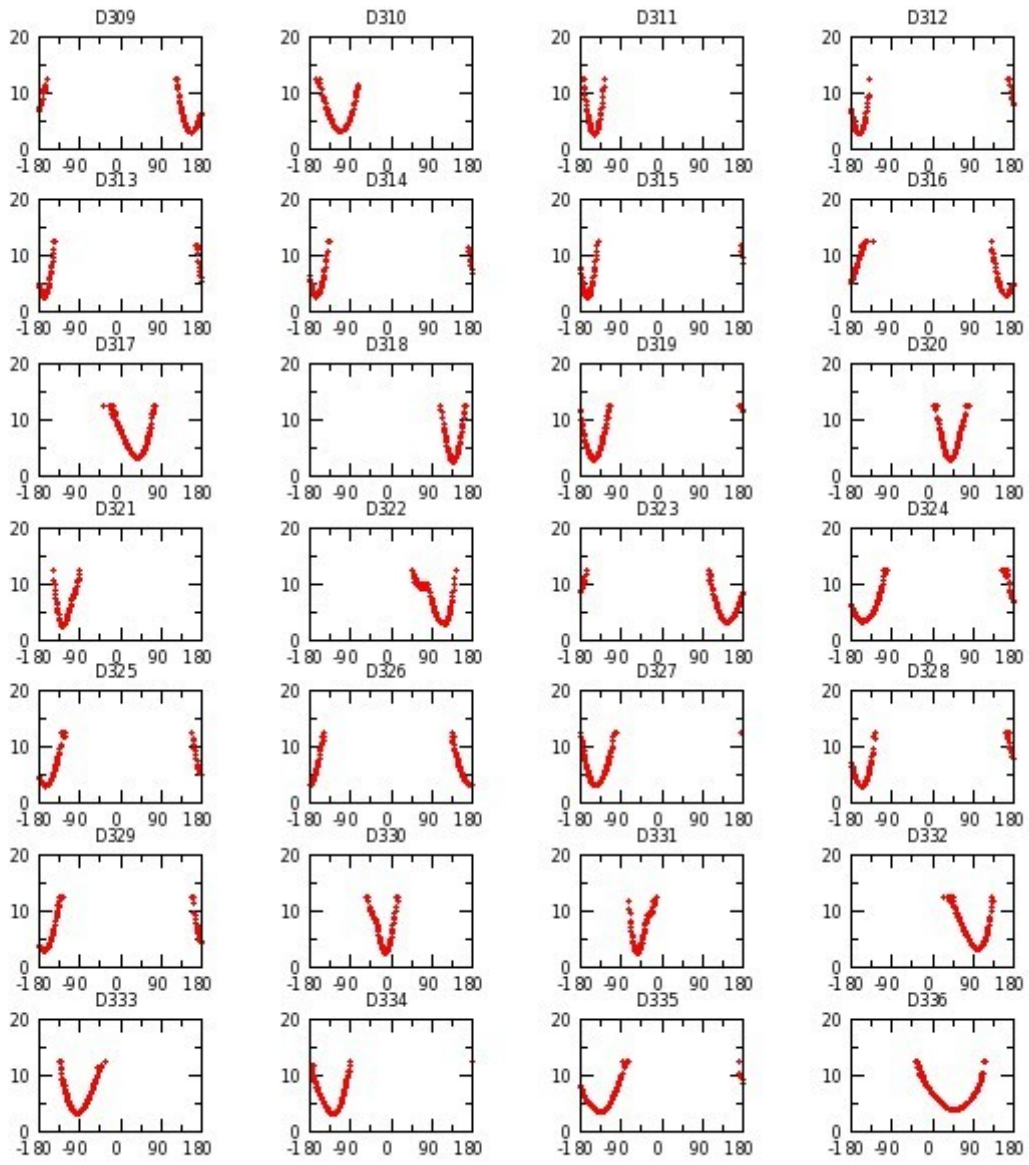


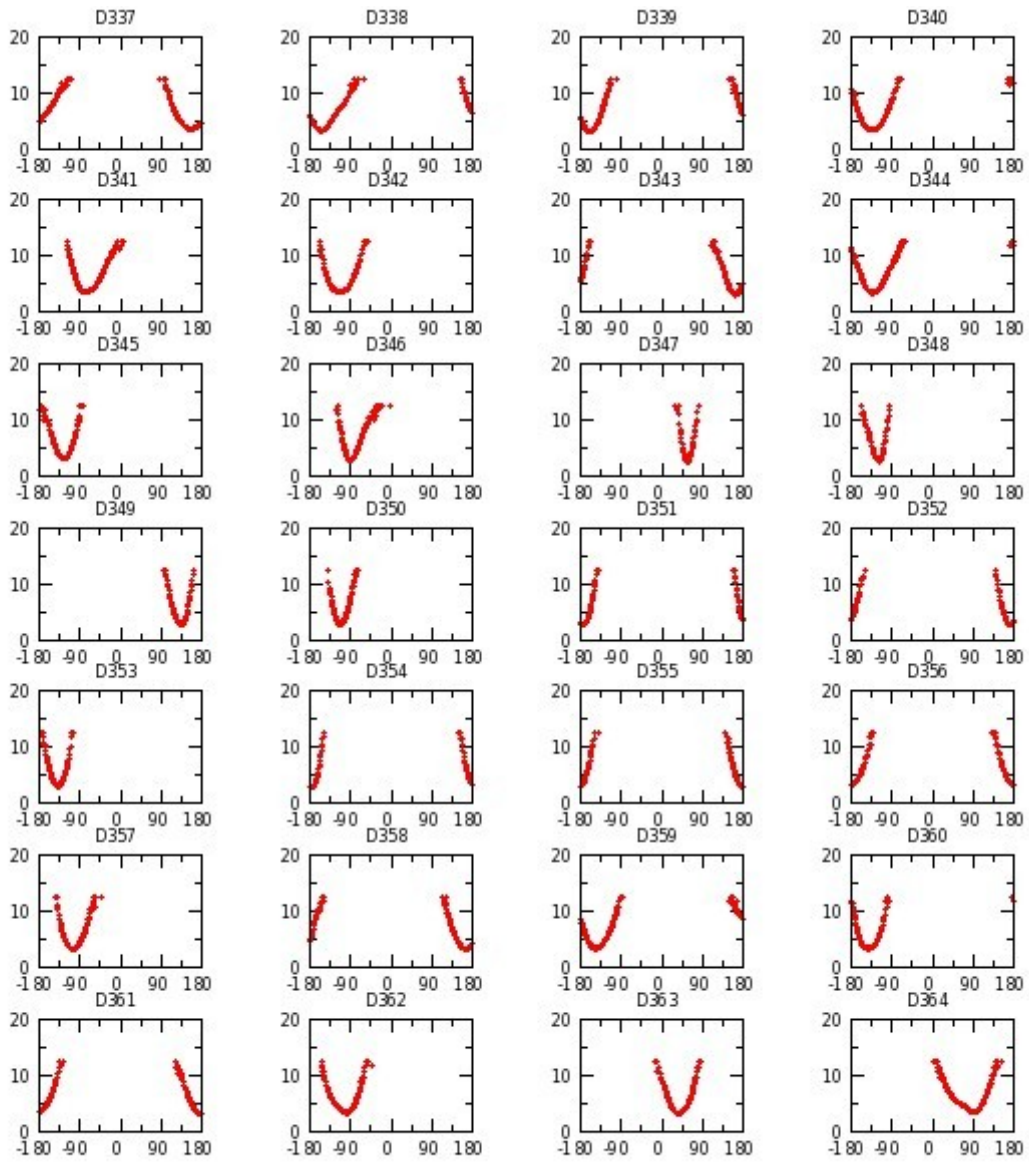


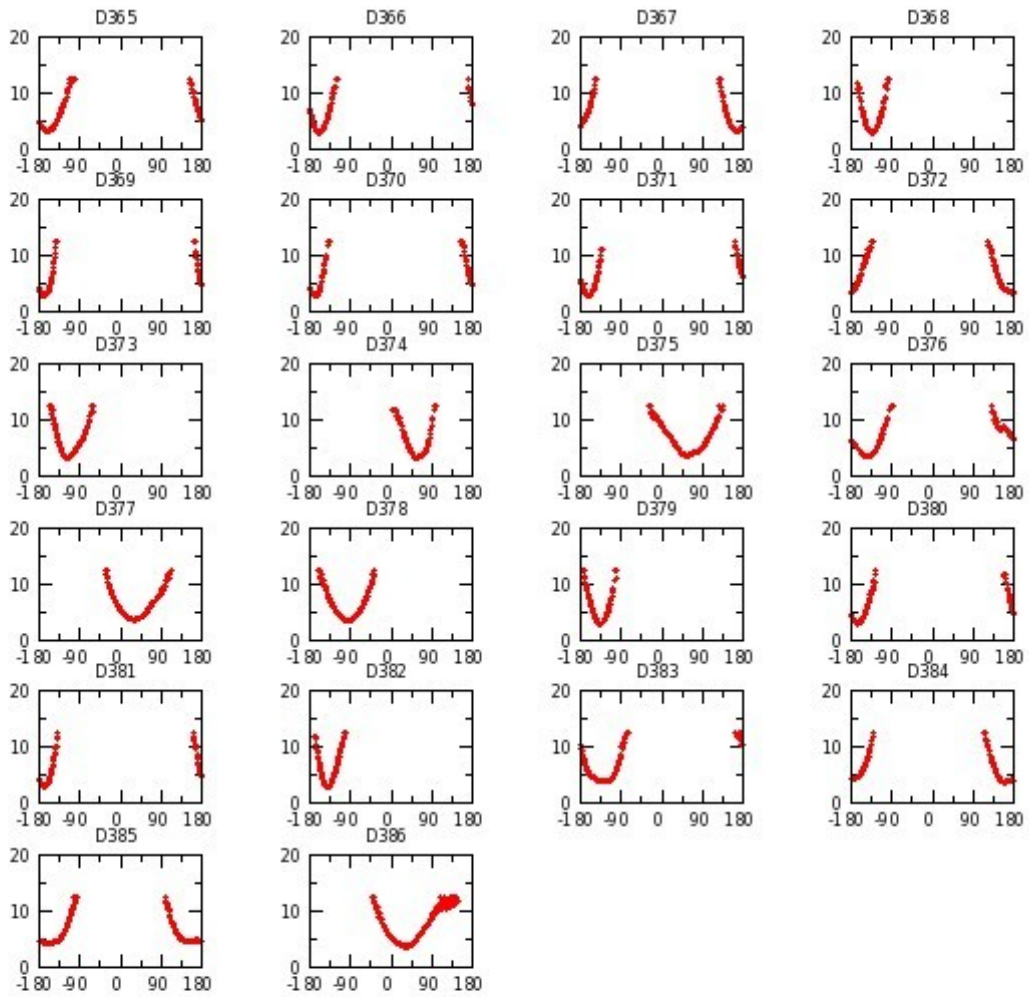




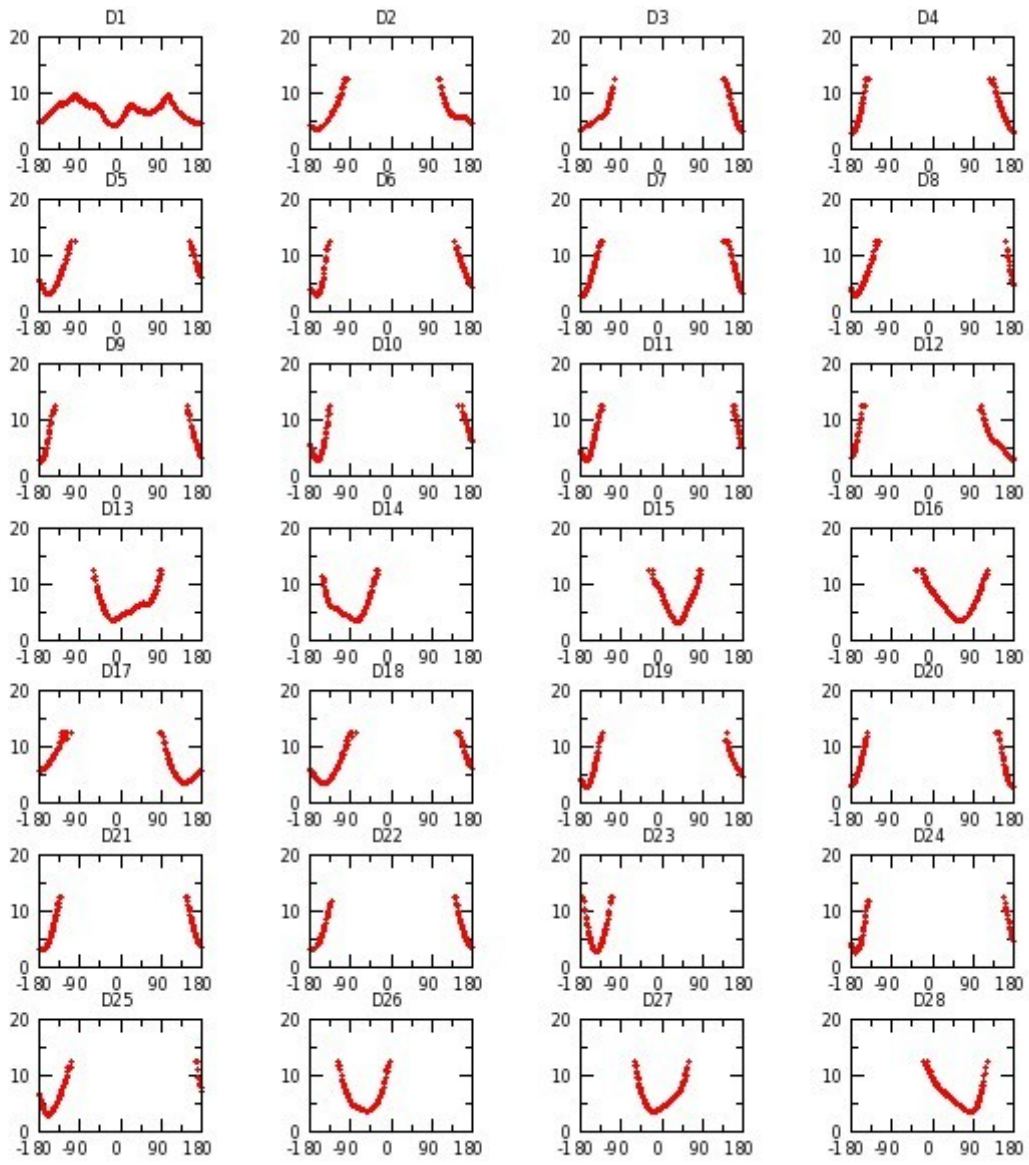


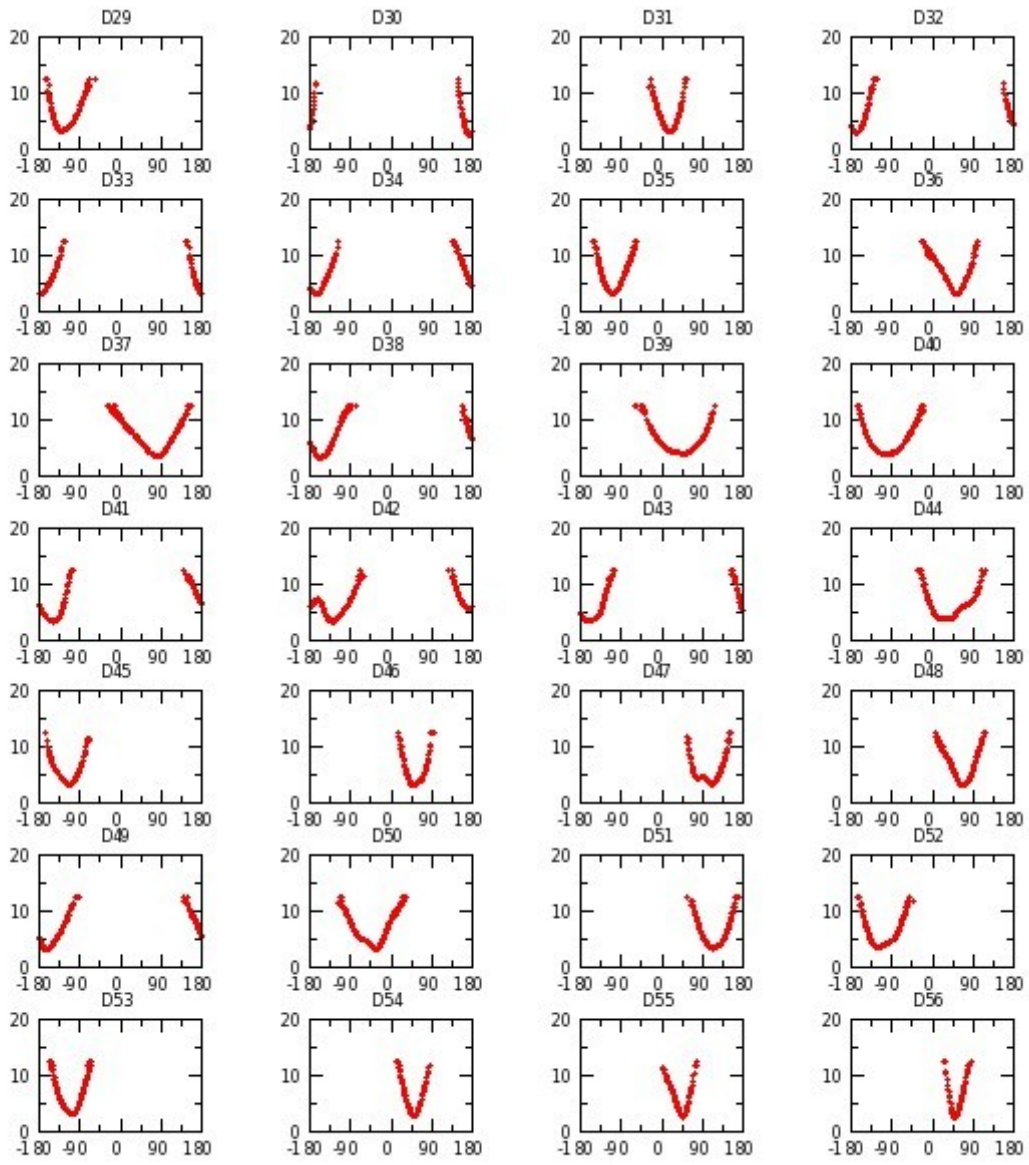


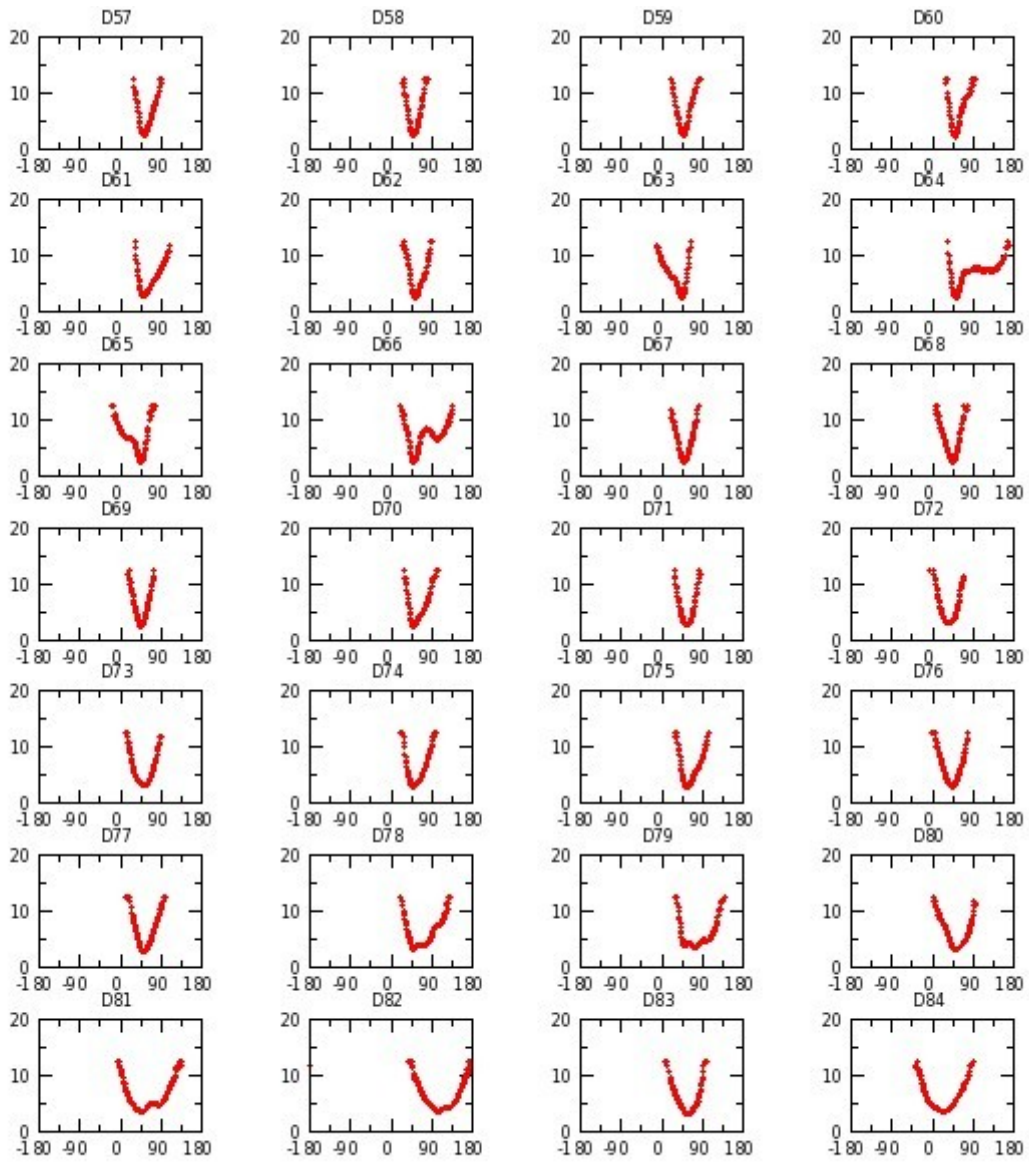


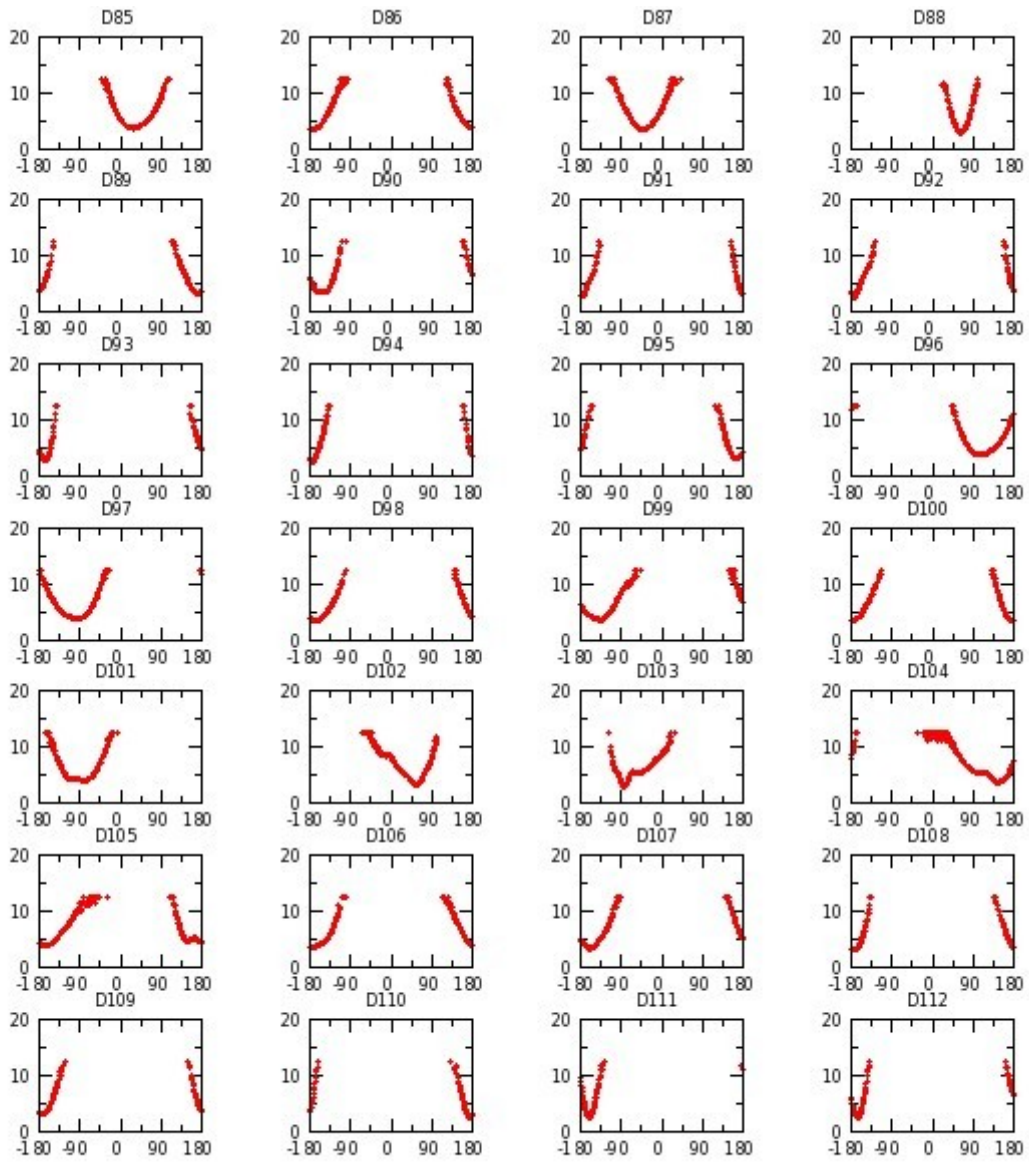


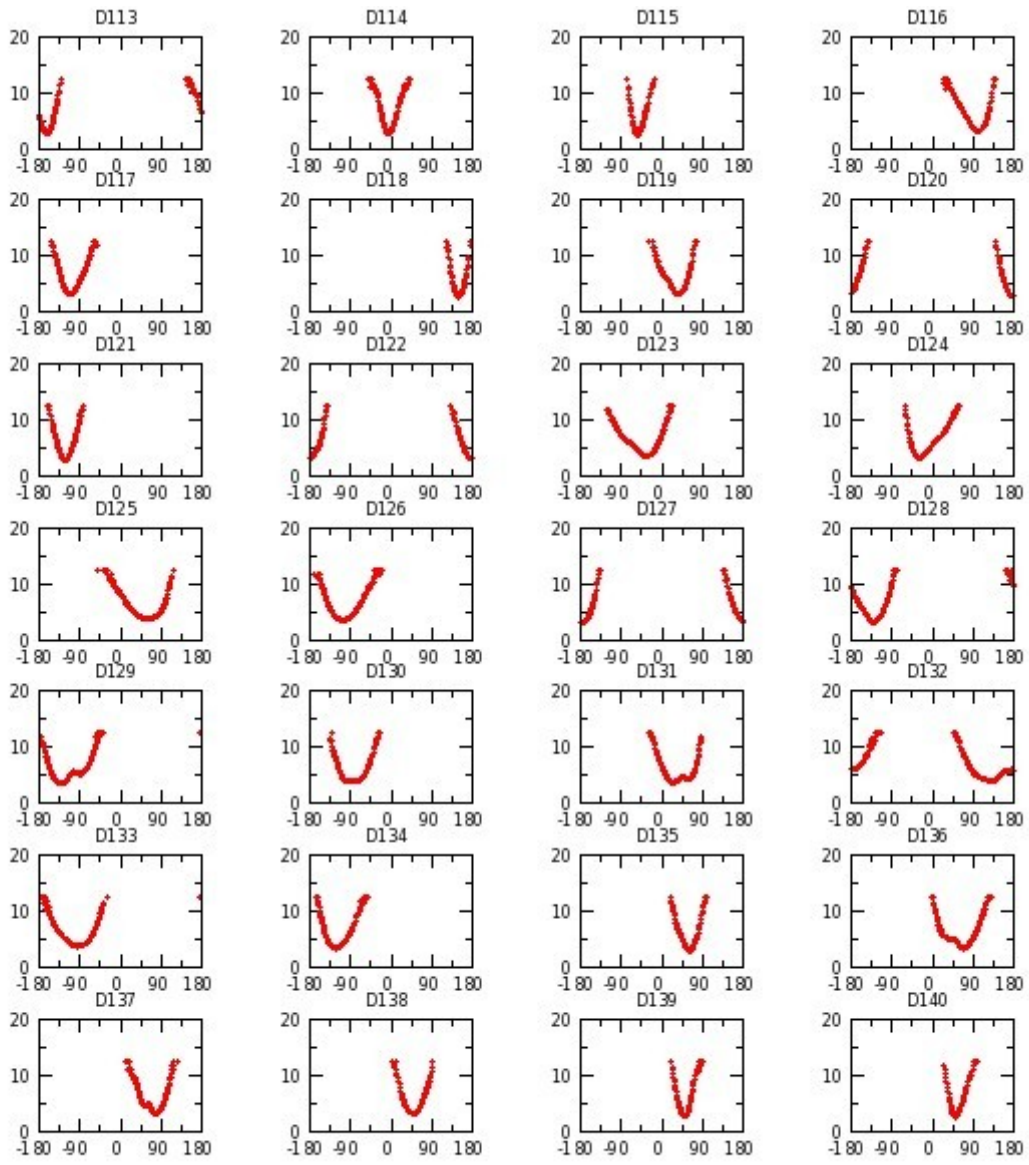
Annexe G 29 : M_7DW réplique II

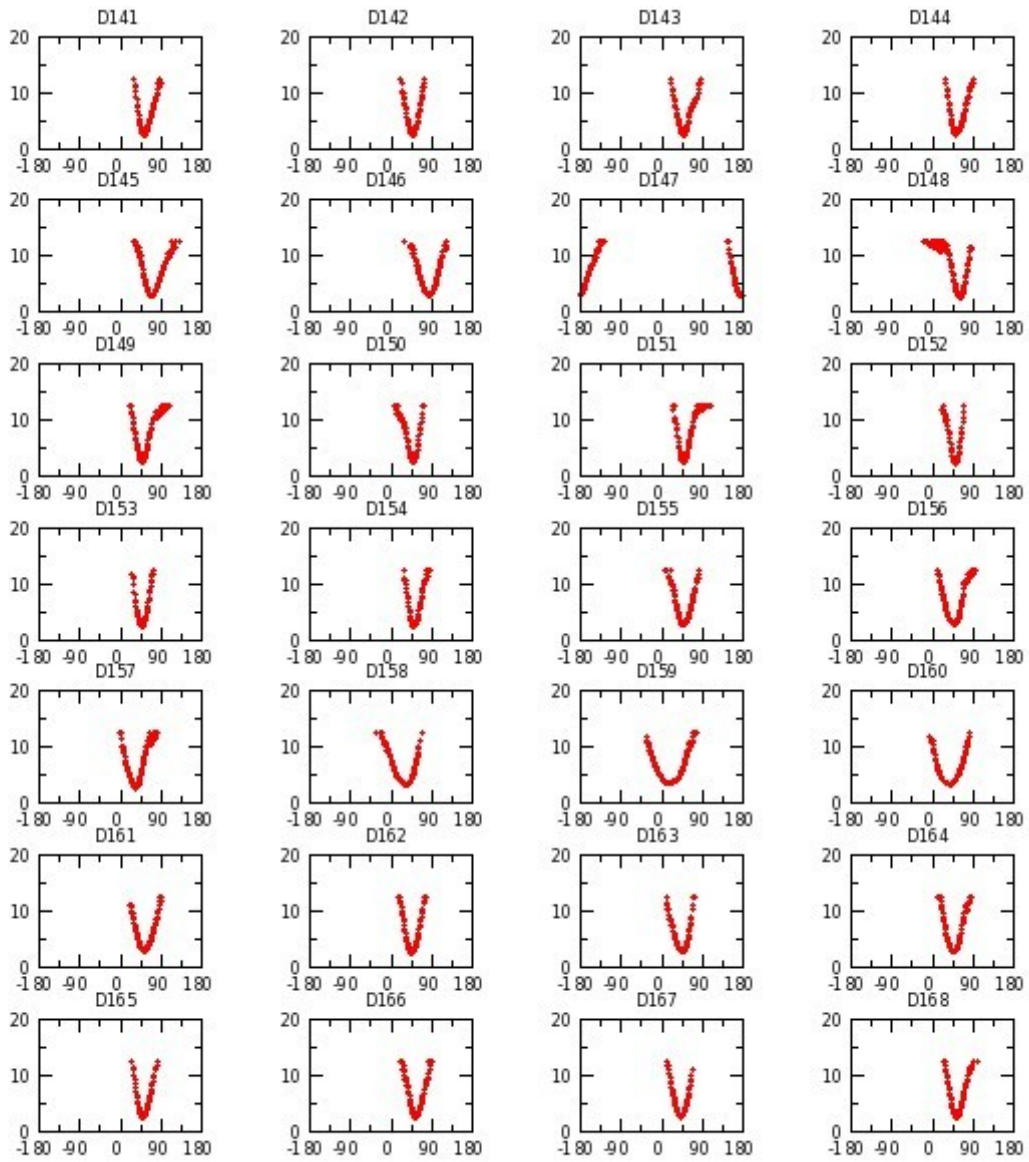


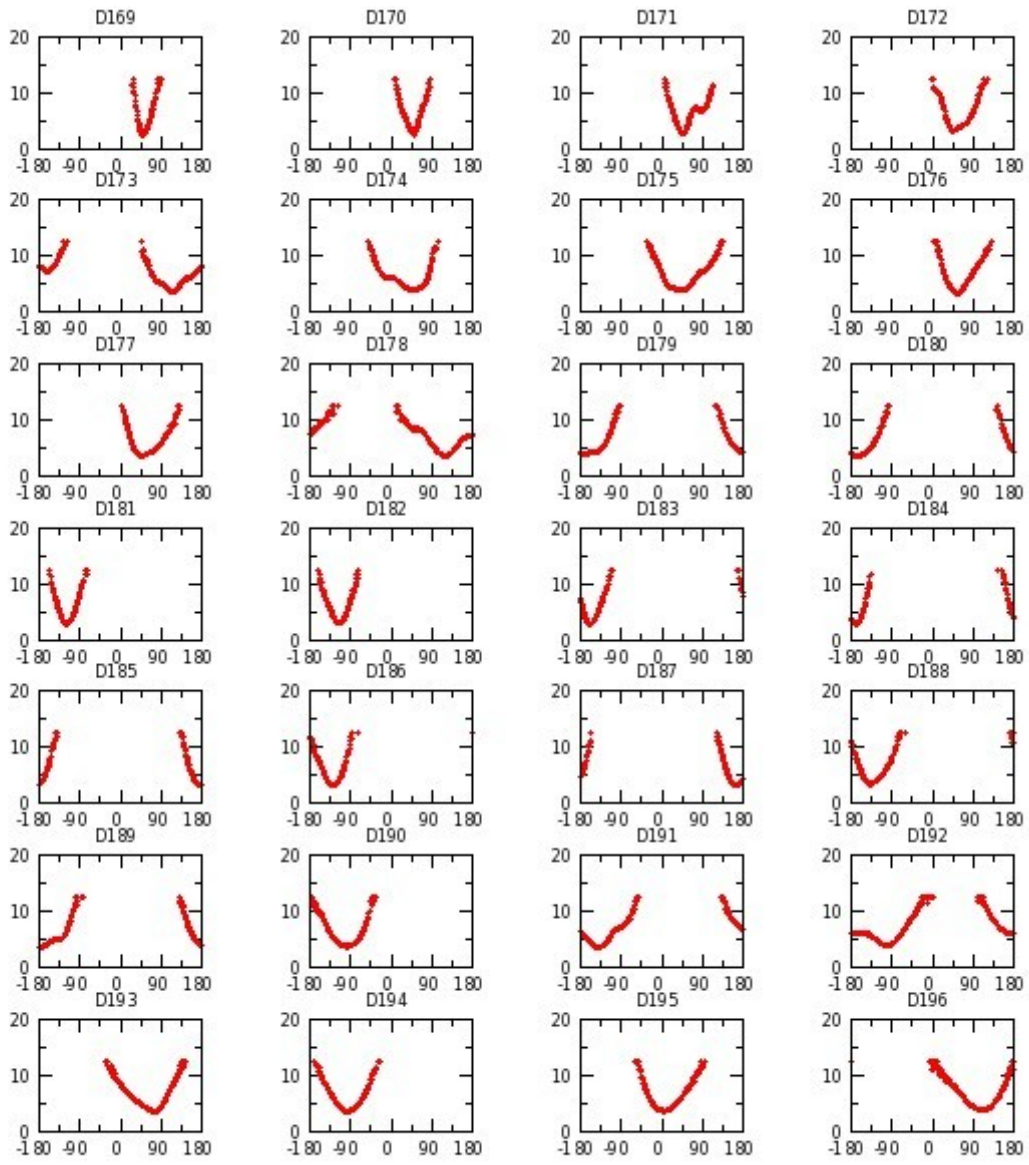


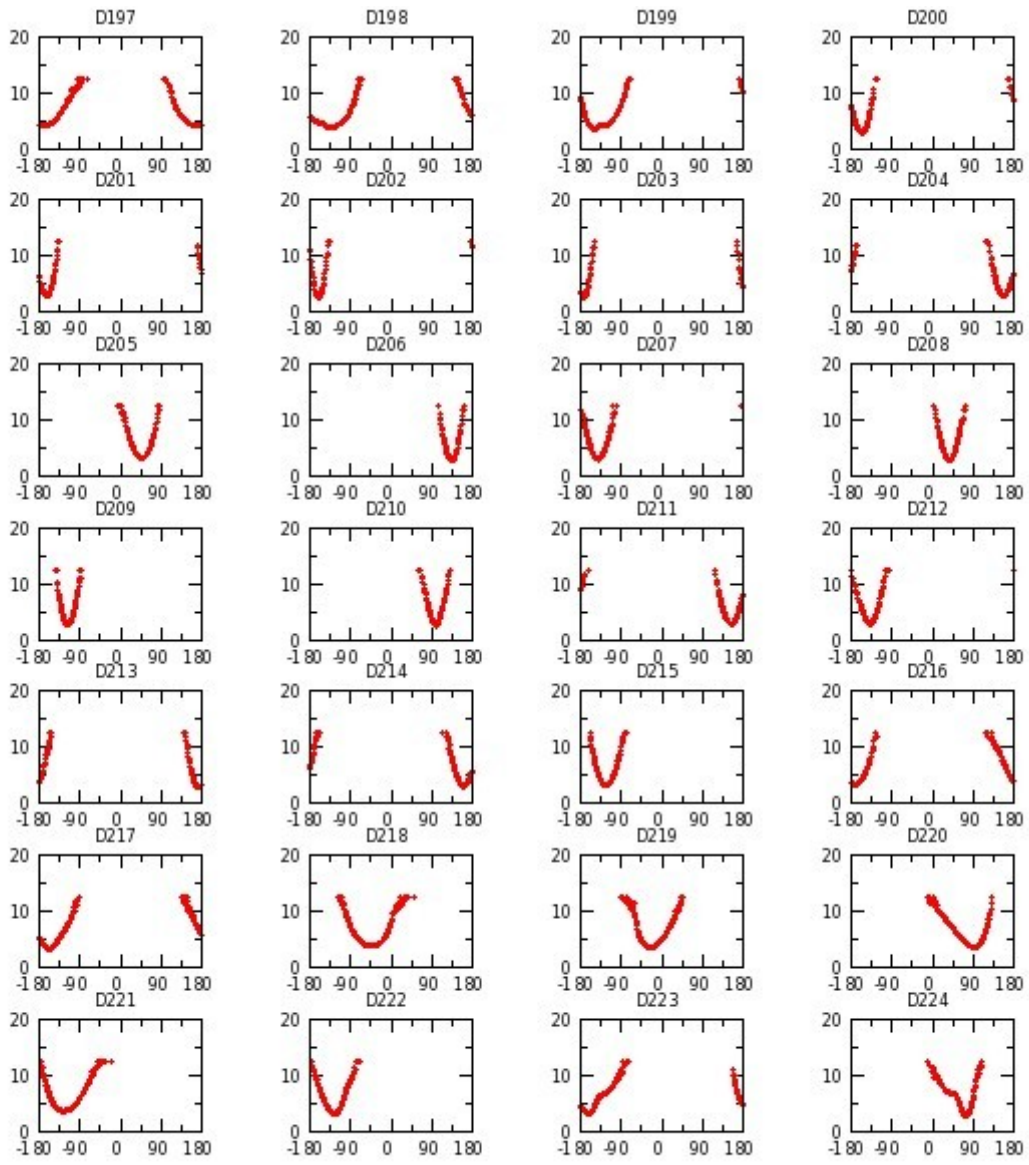


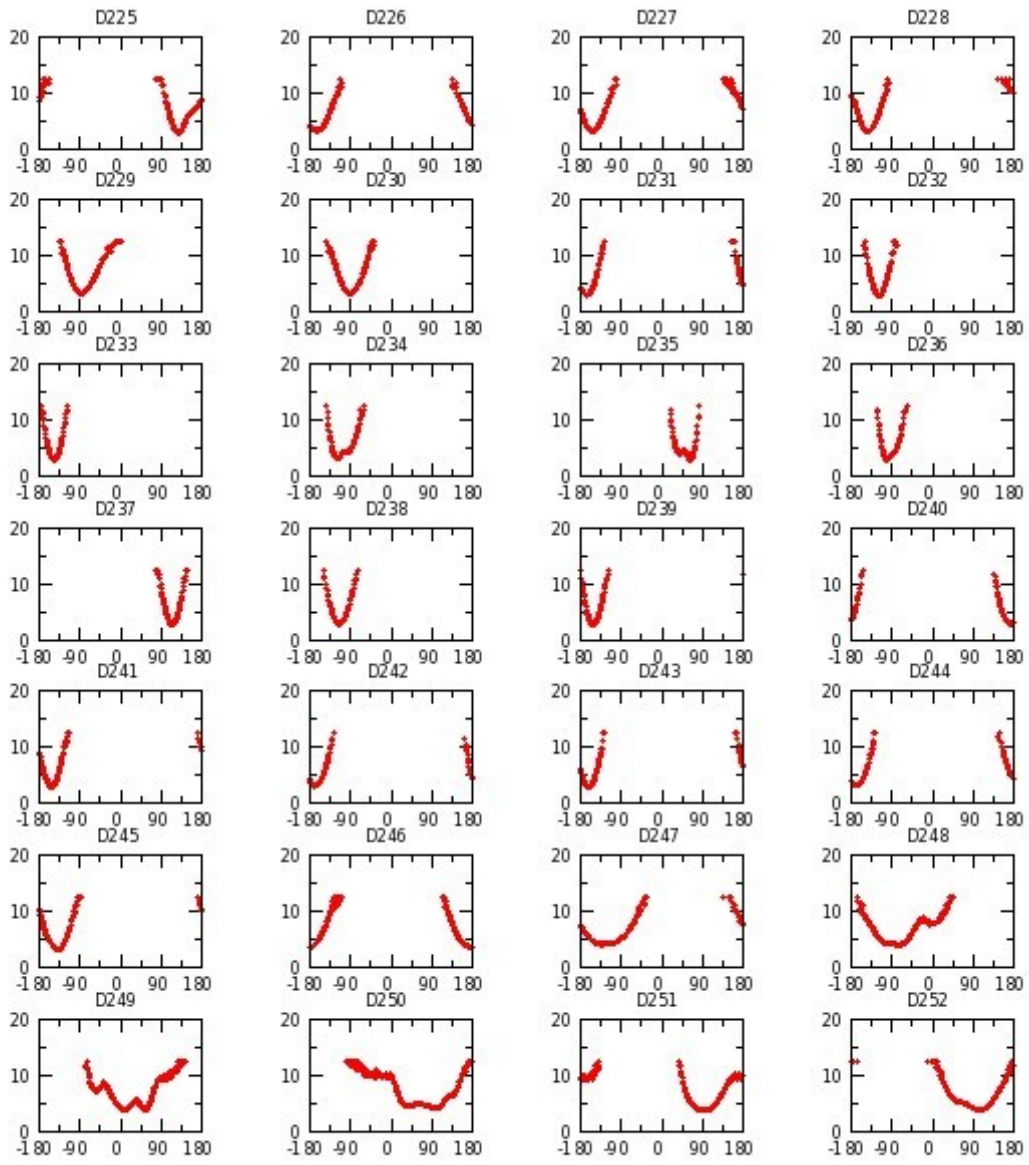


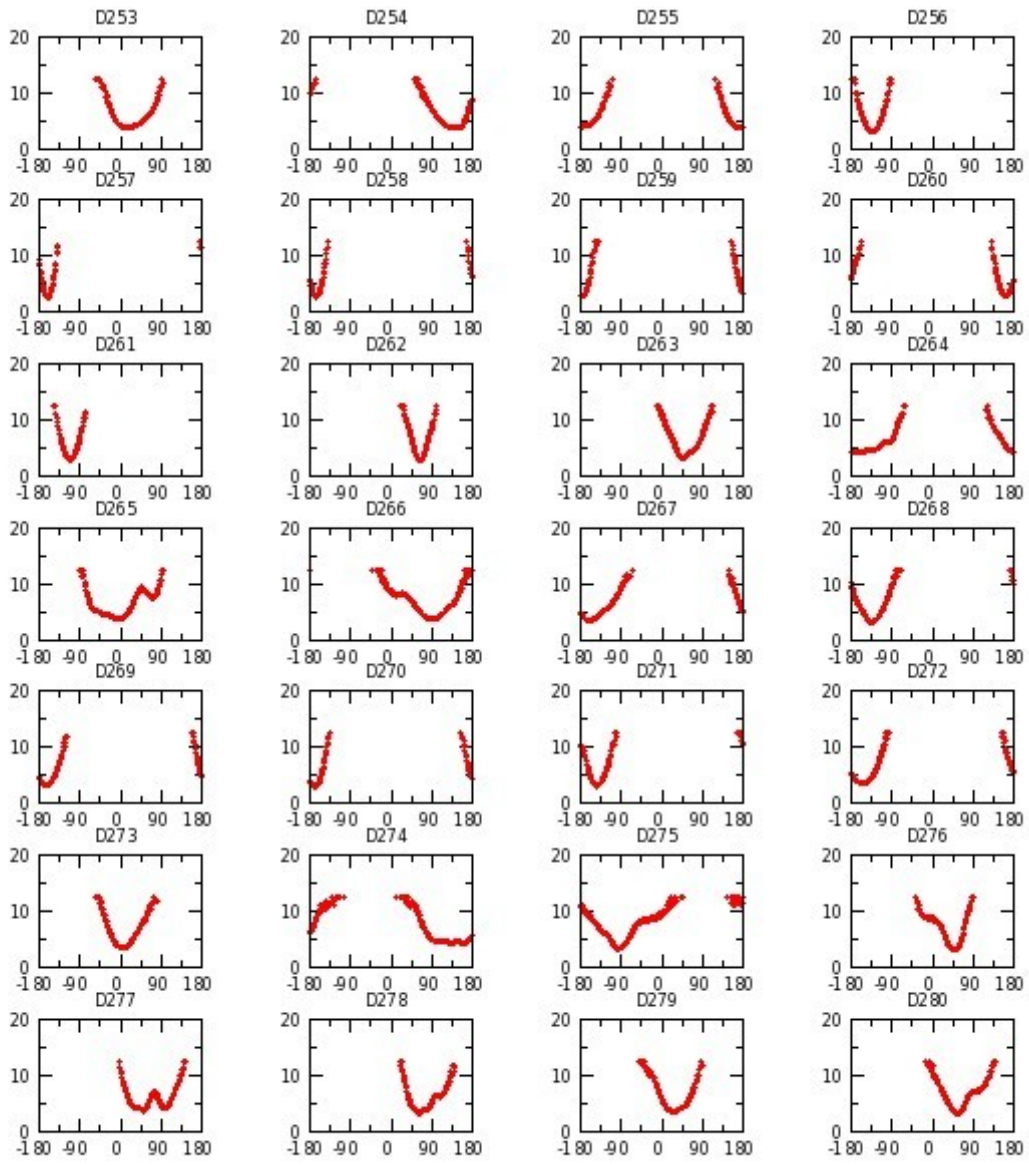


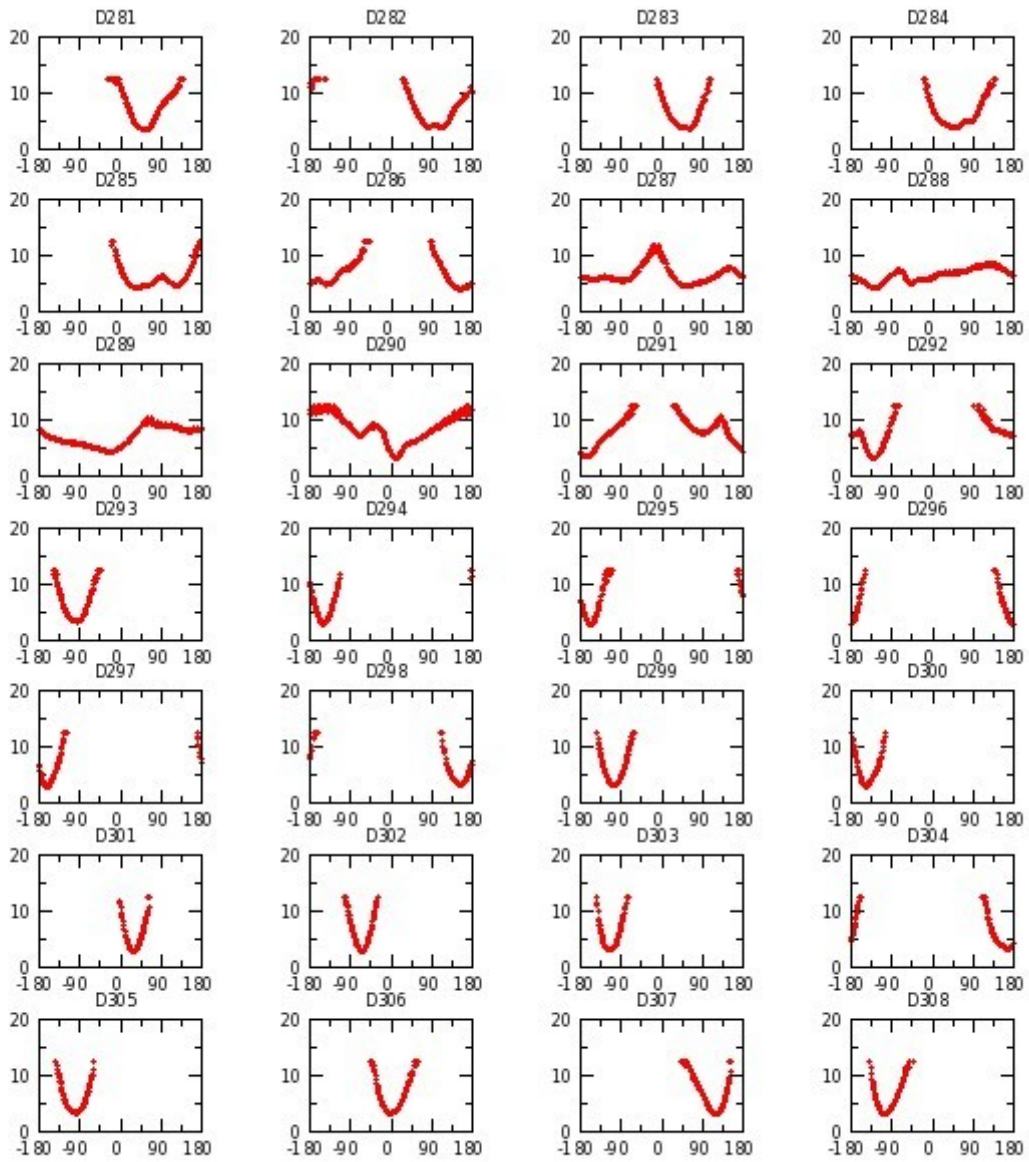


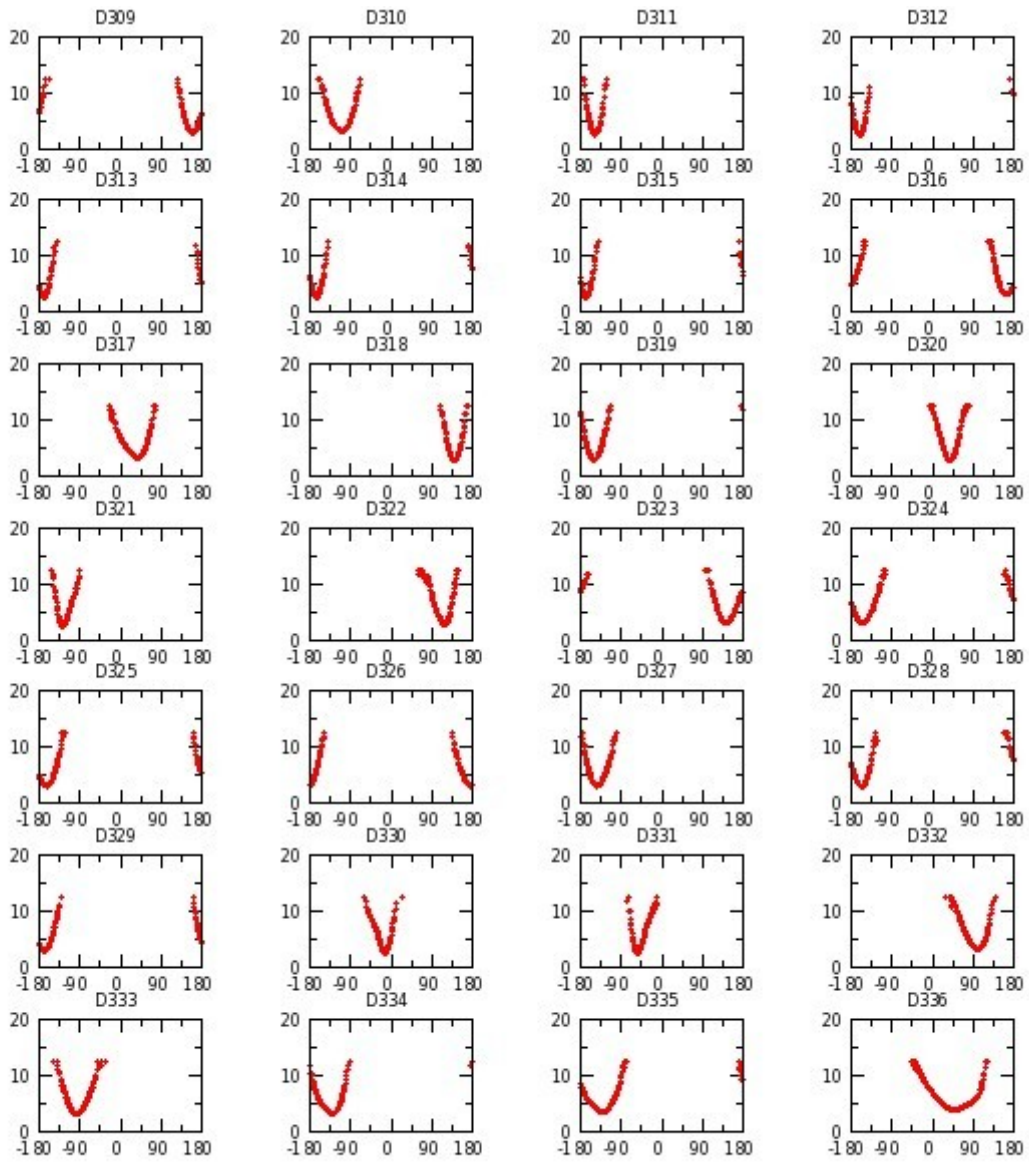


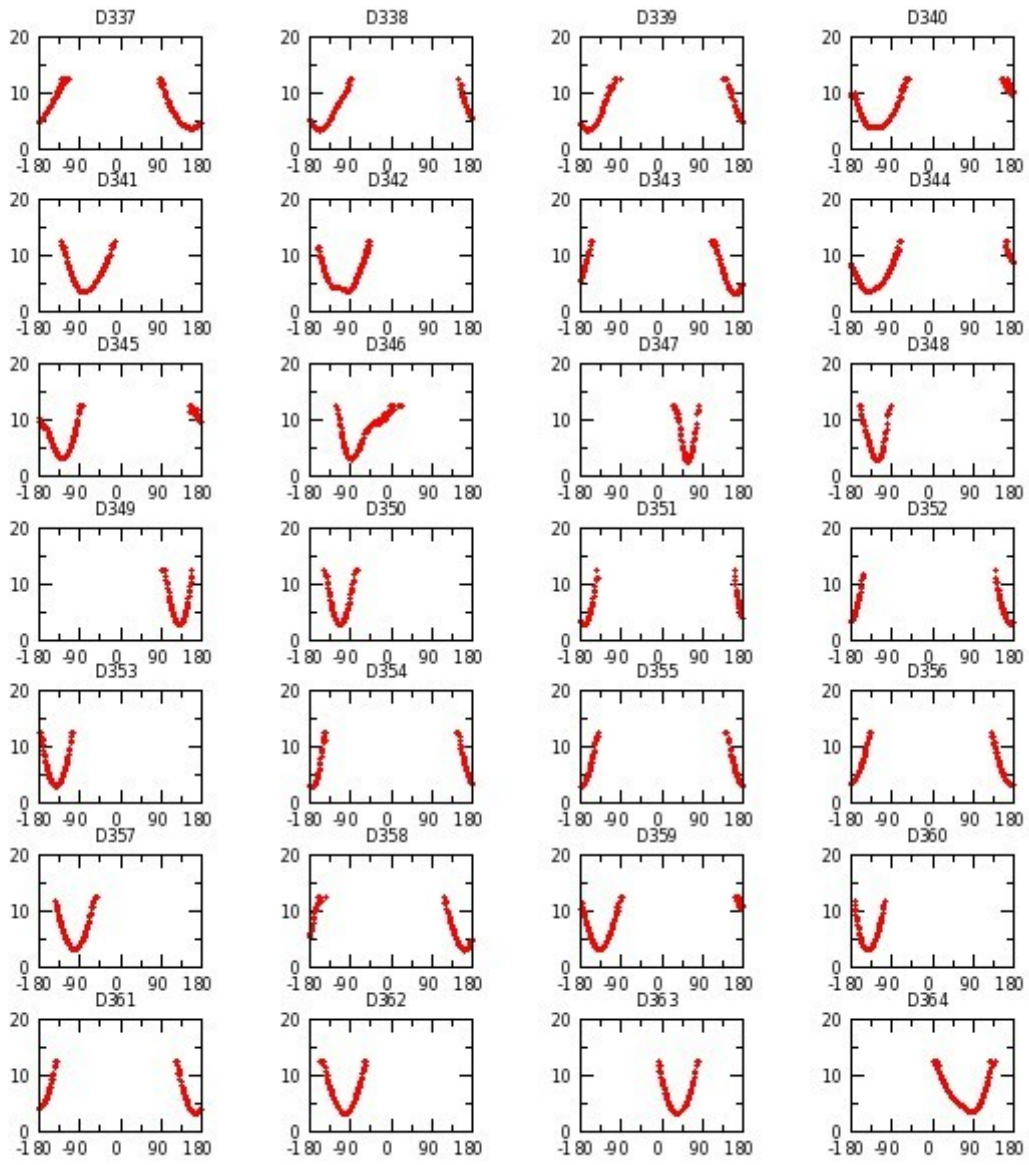


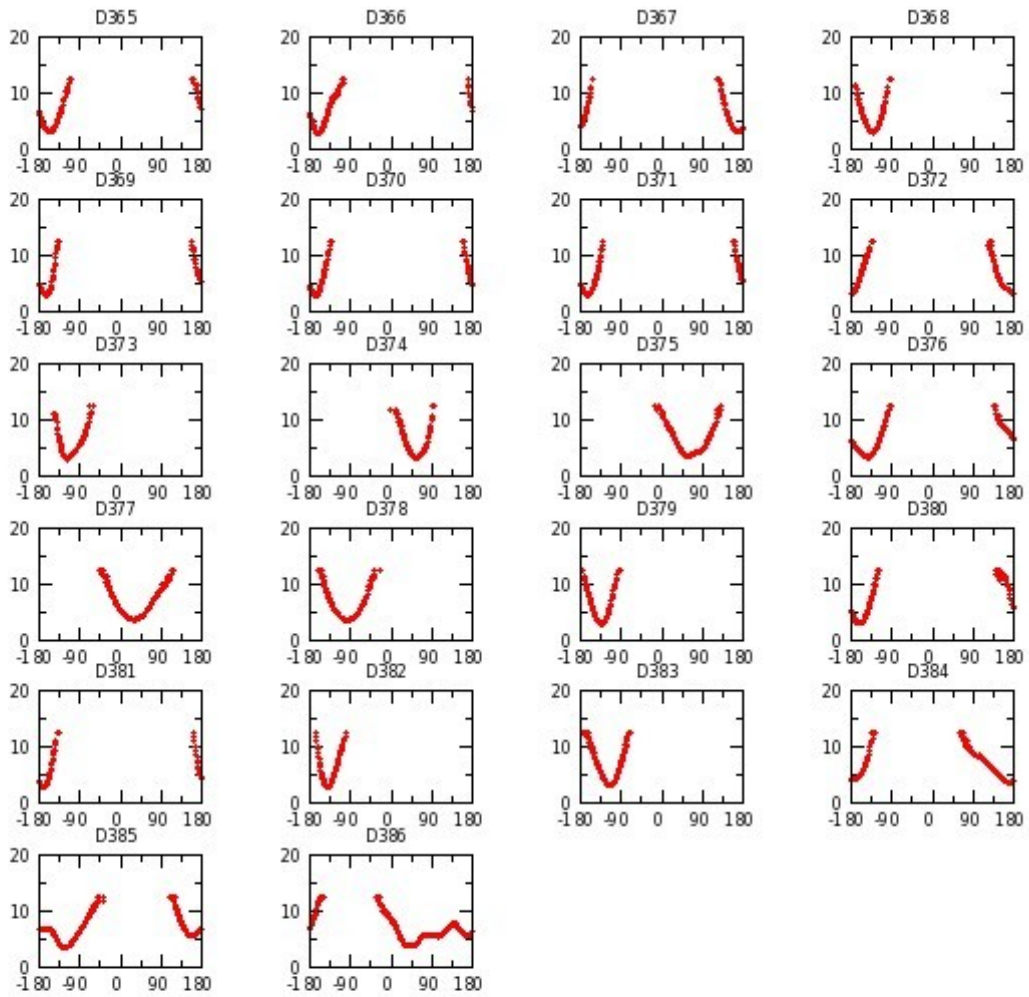




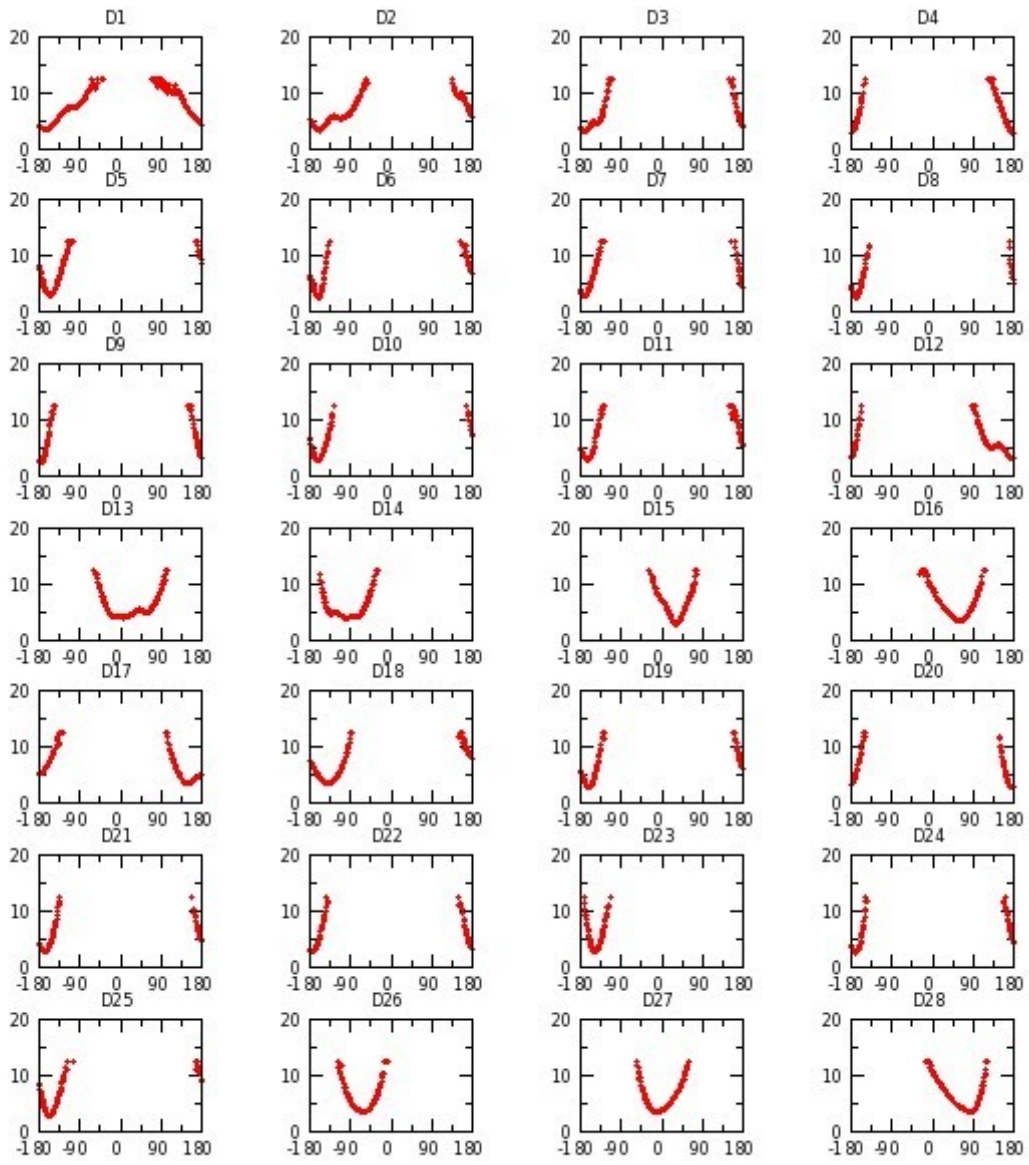


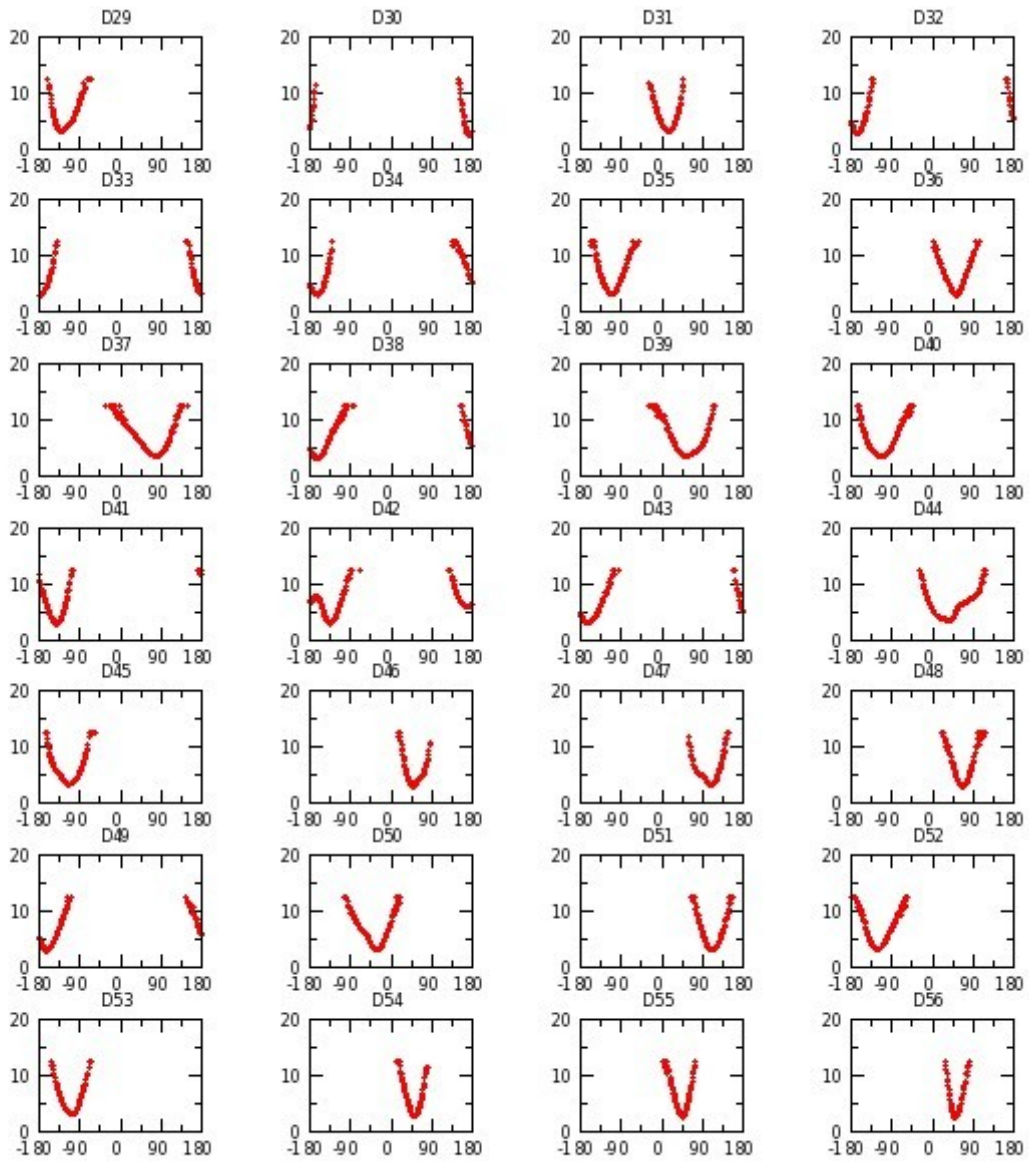


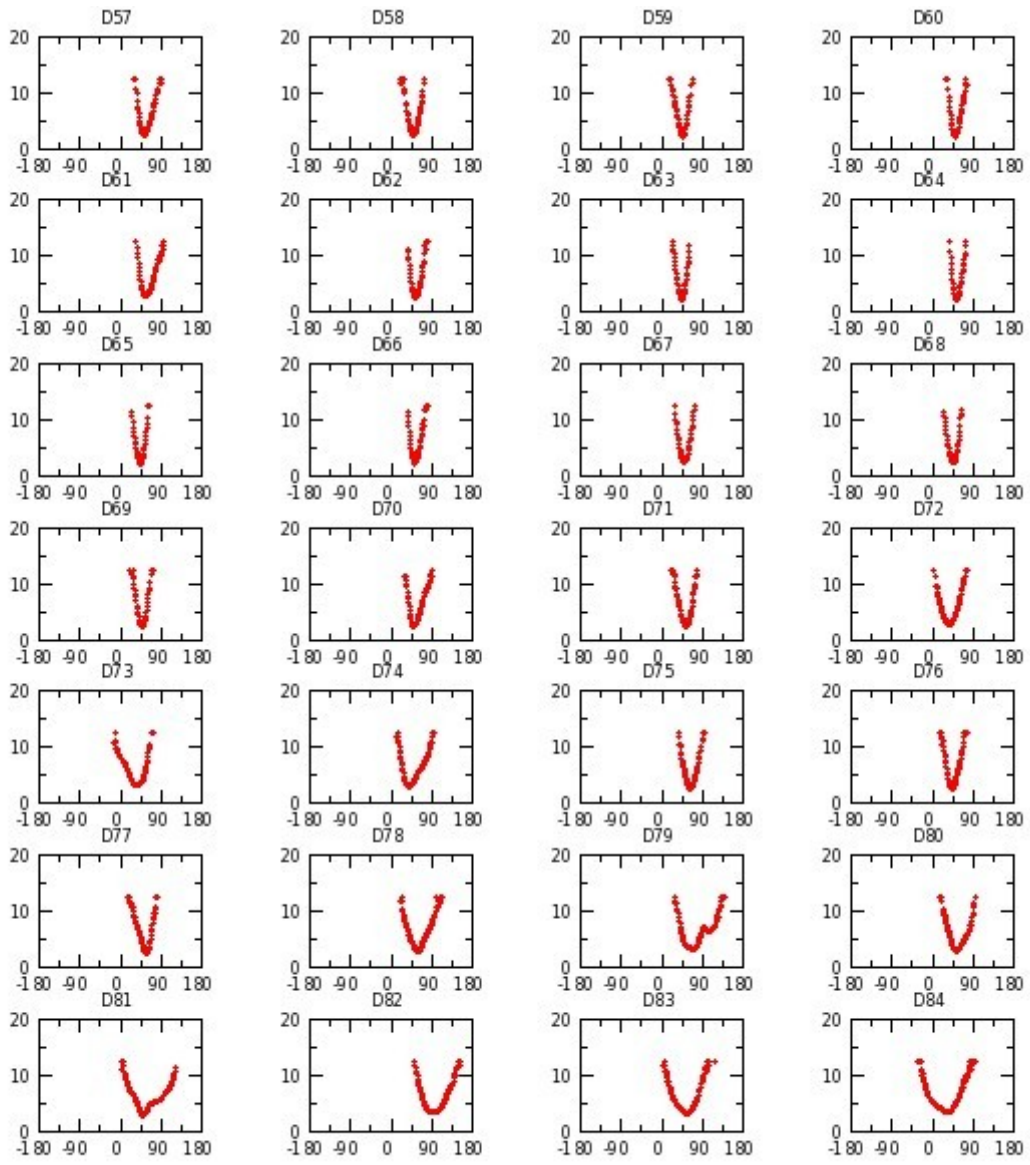


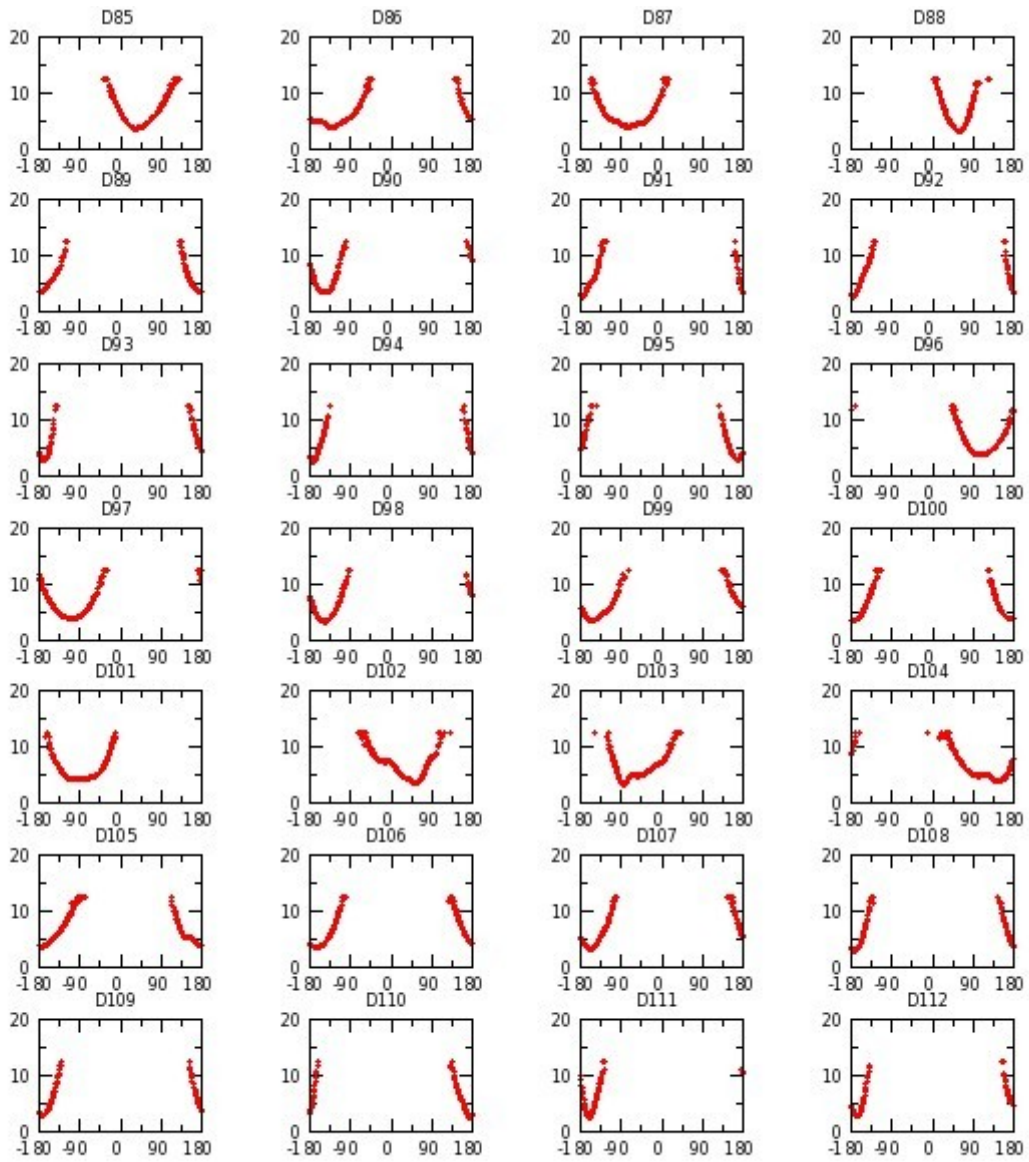


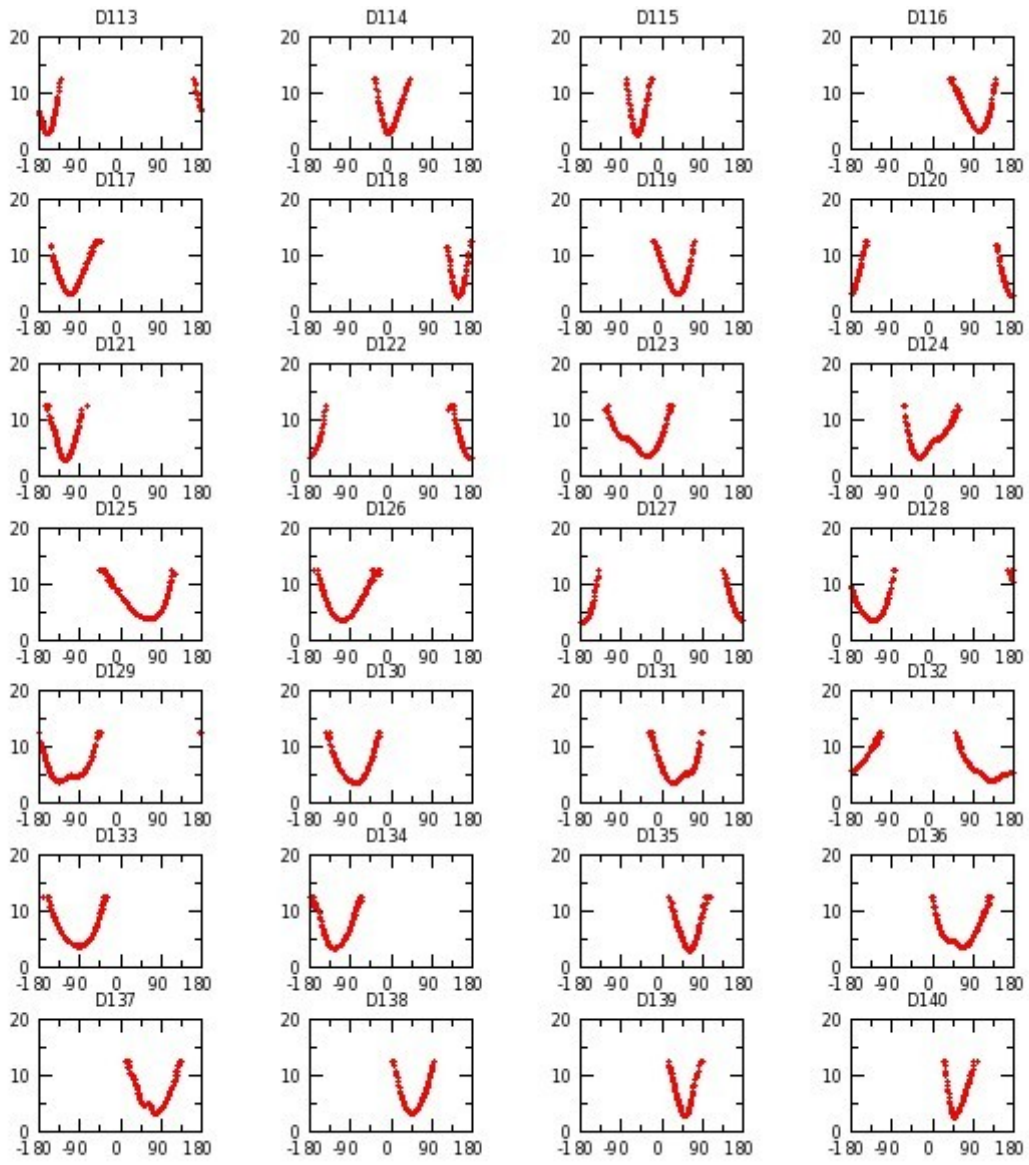
Annexe G 30 : M_7DW réplique III

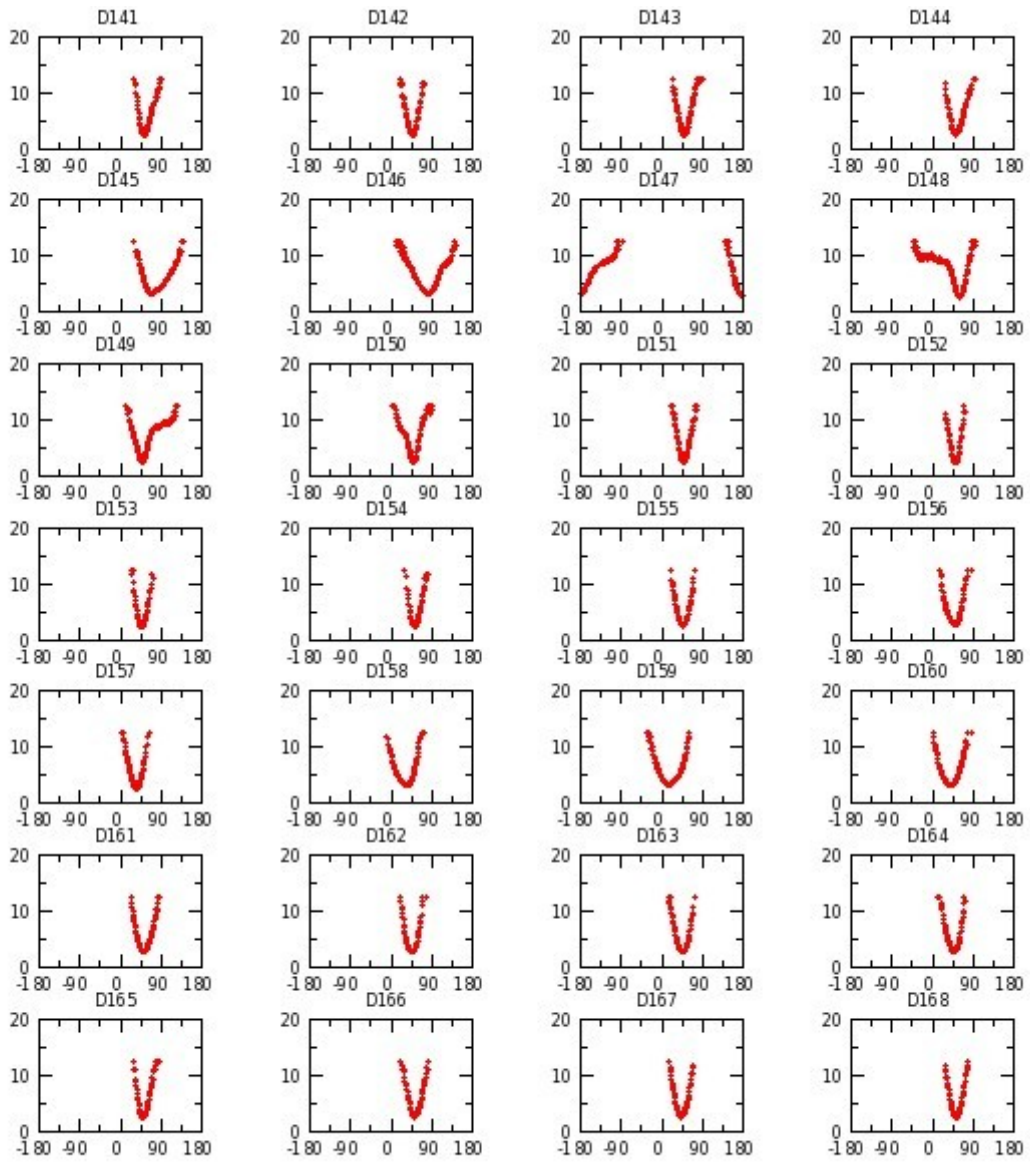


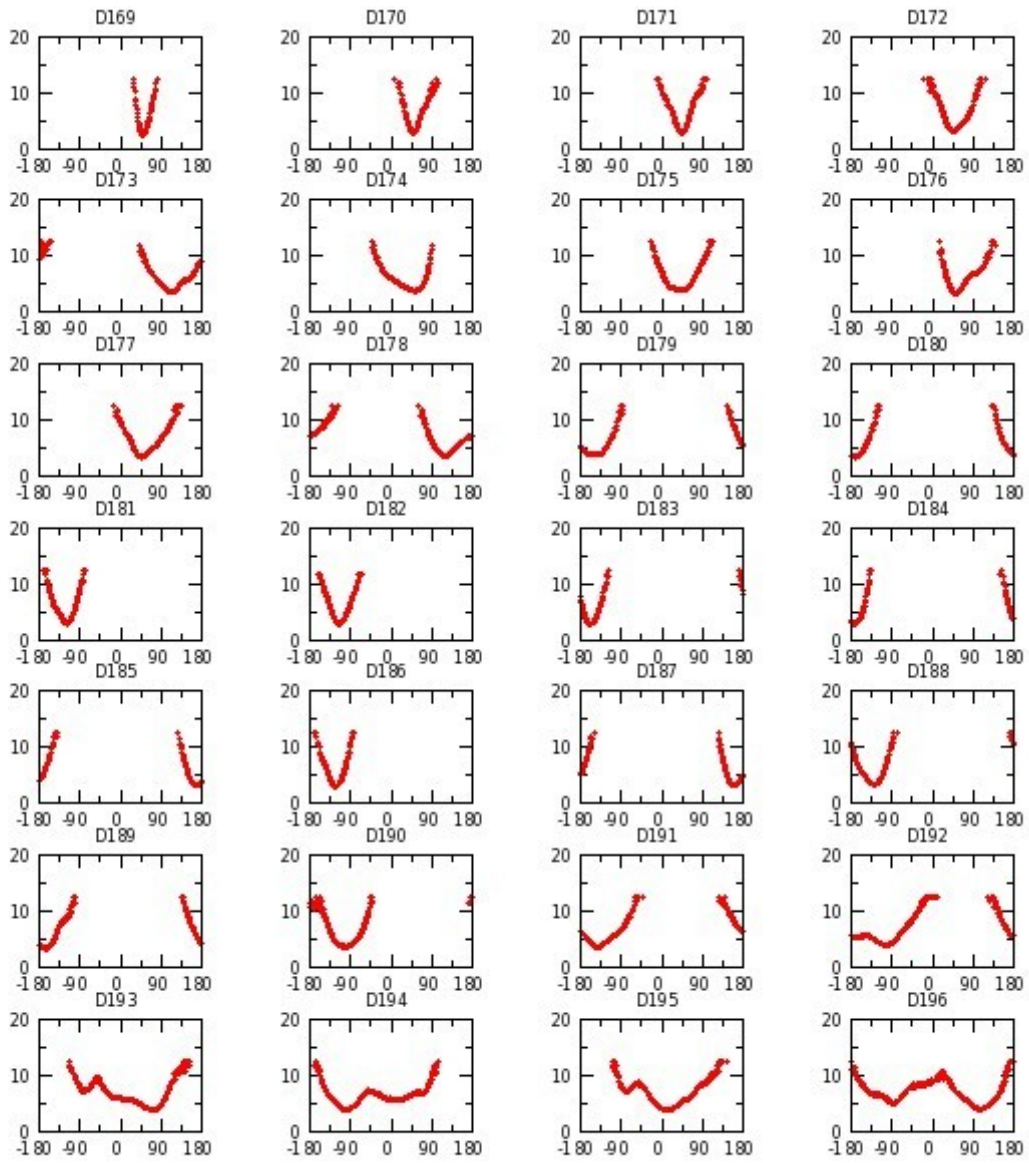


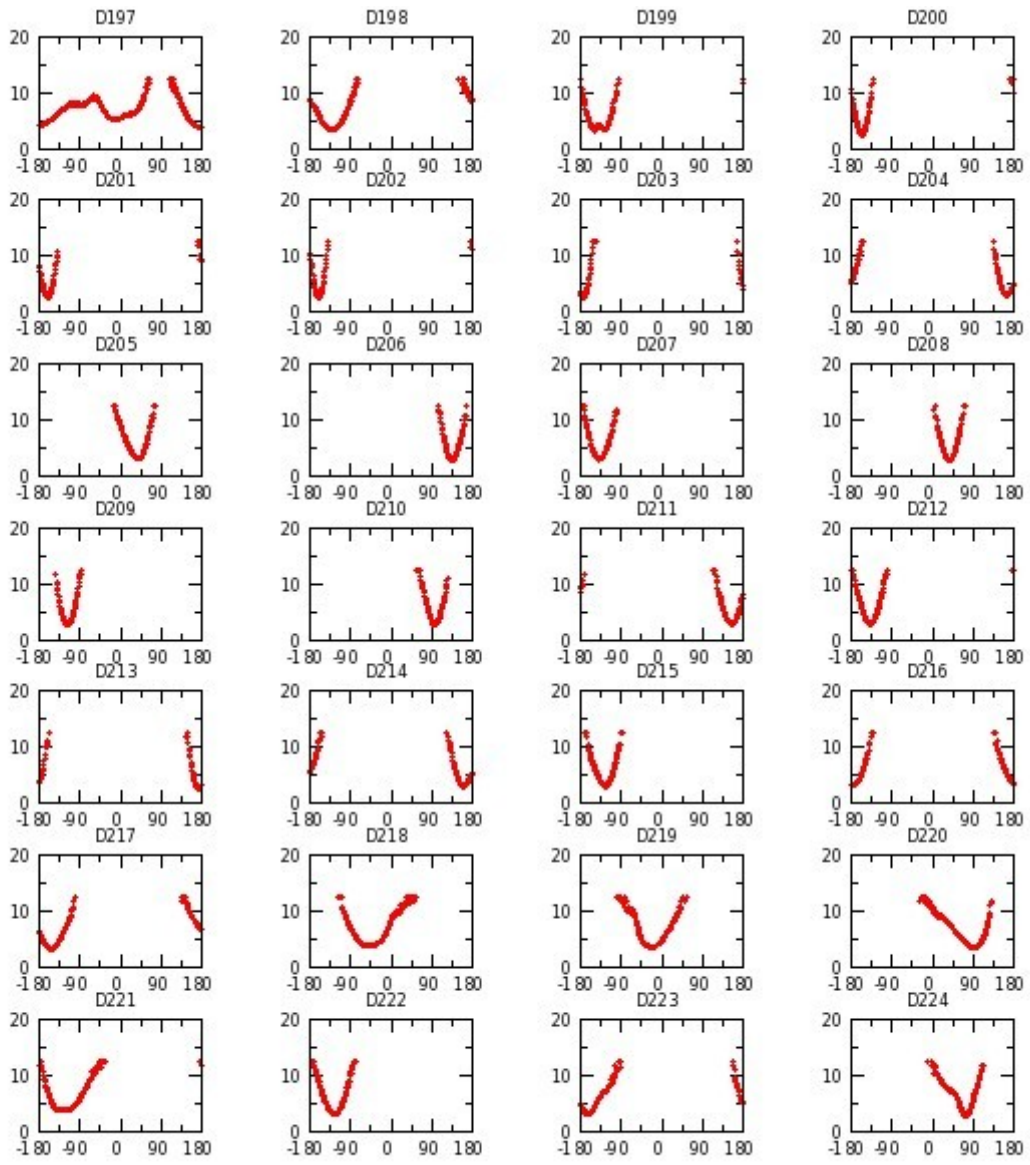


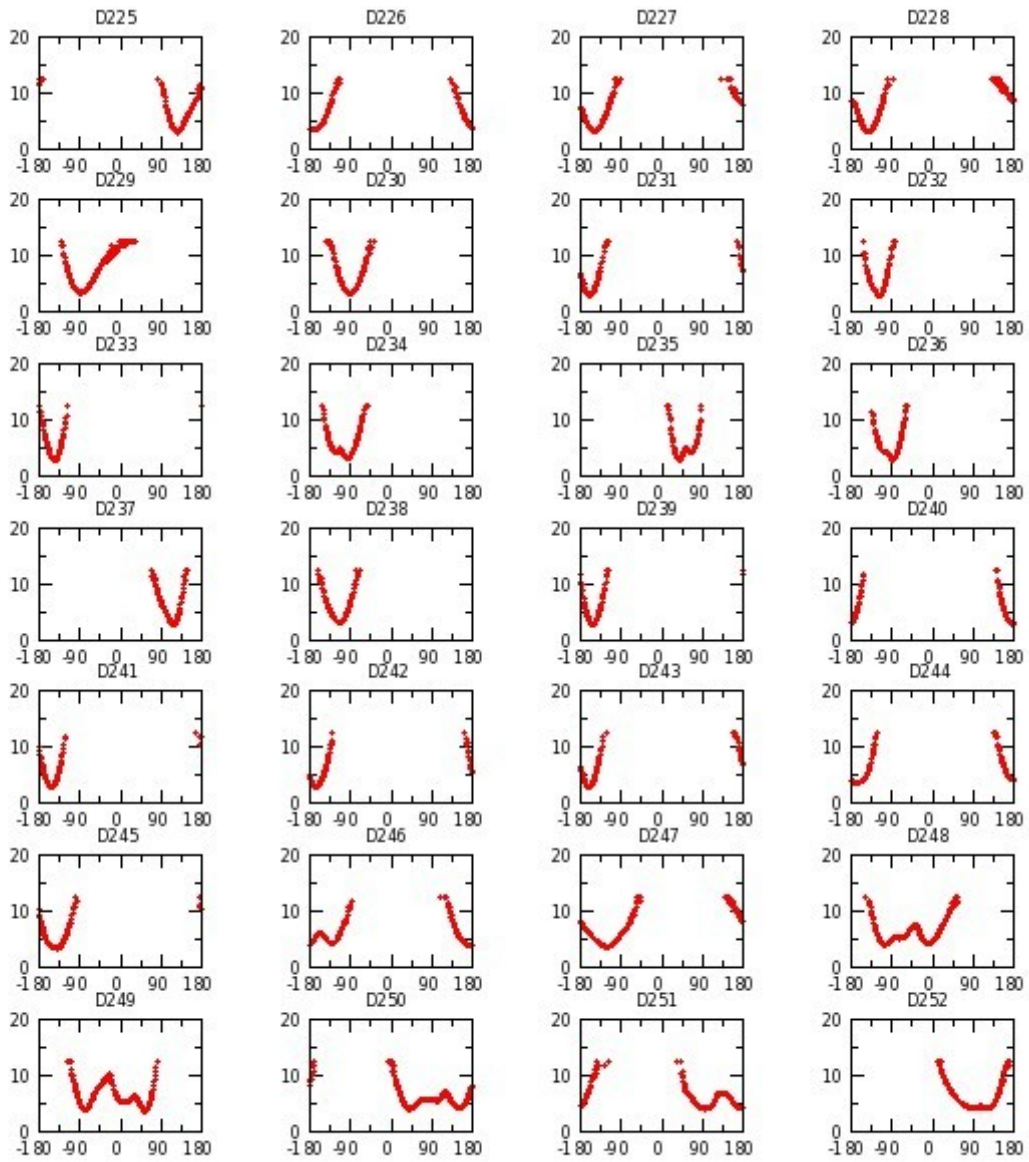


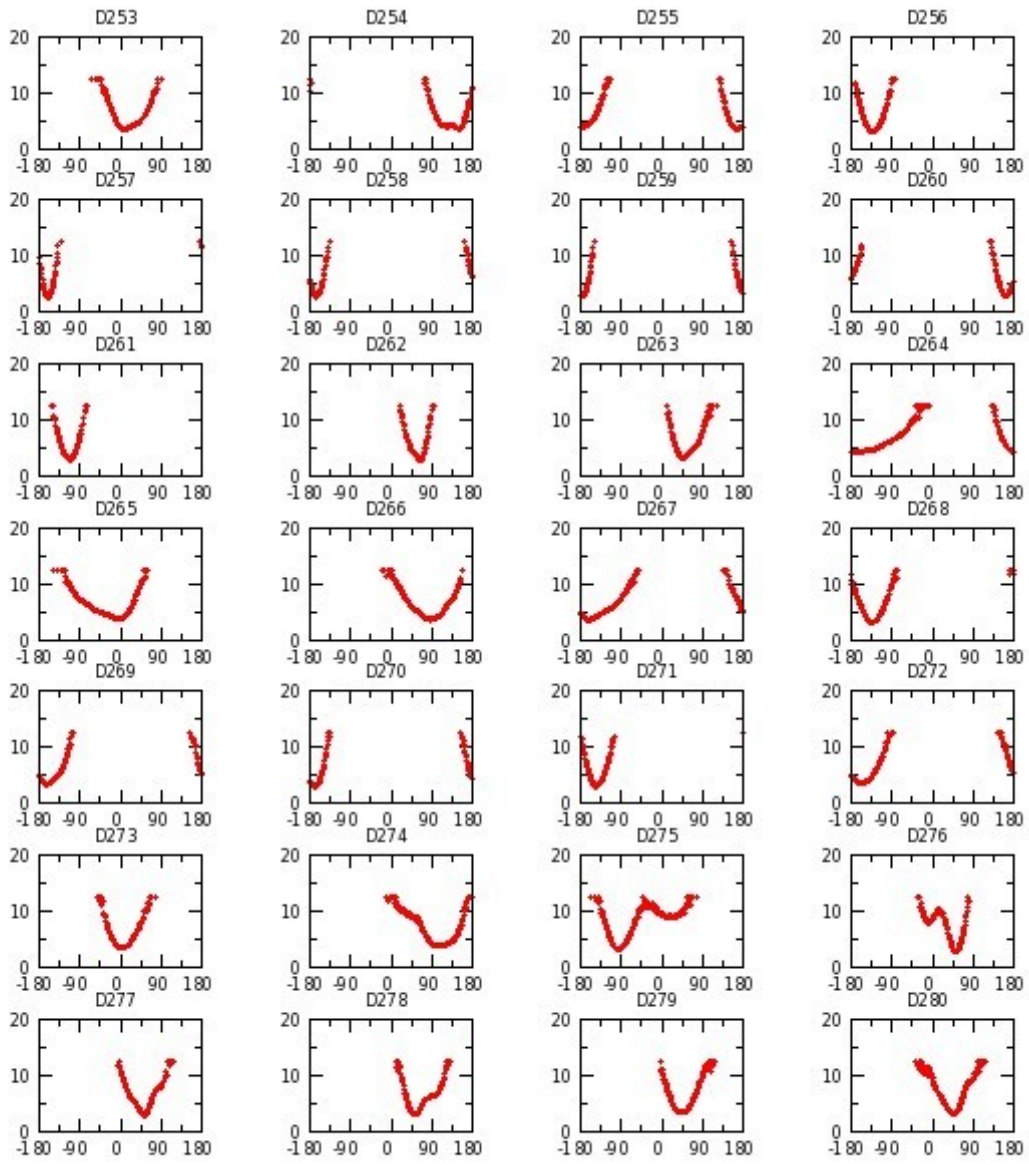


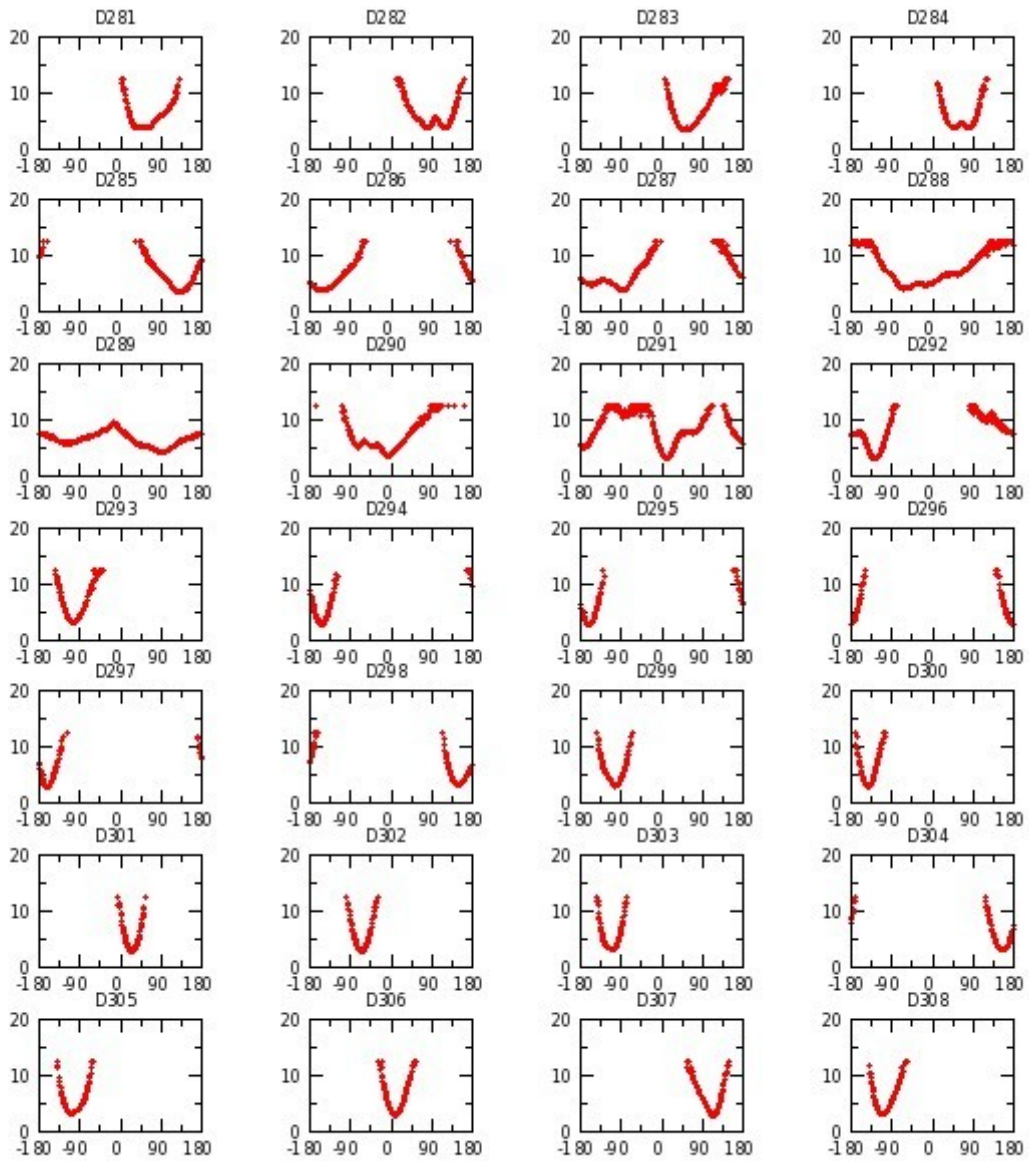


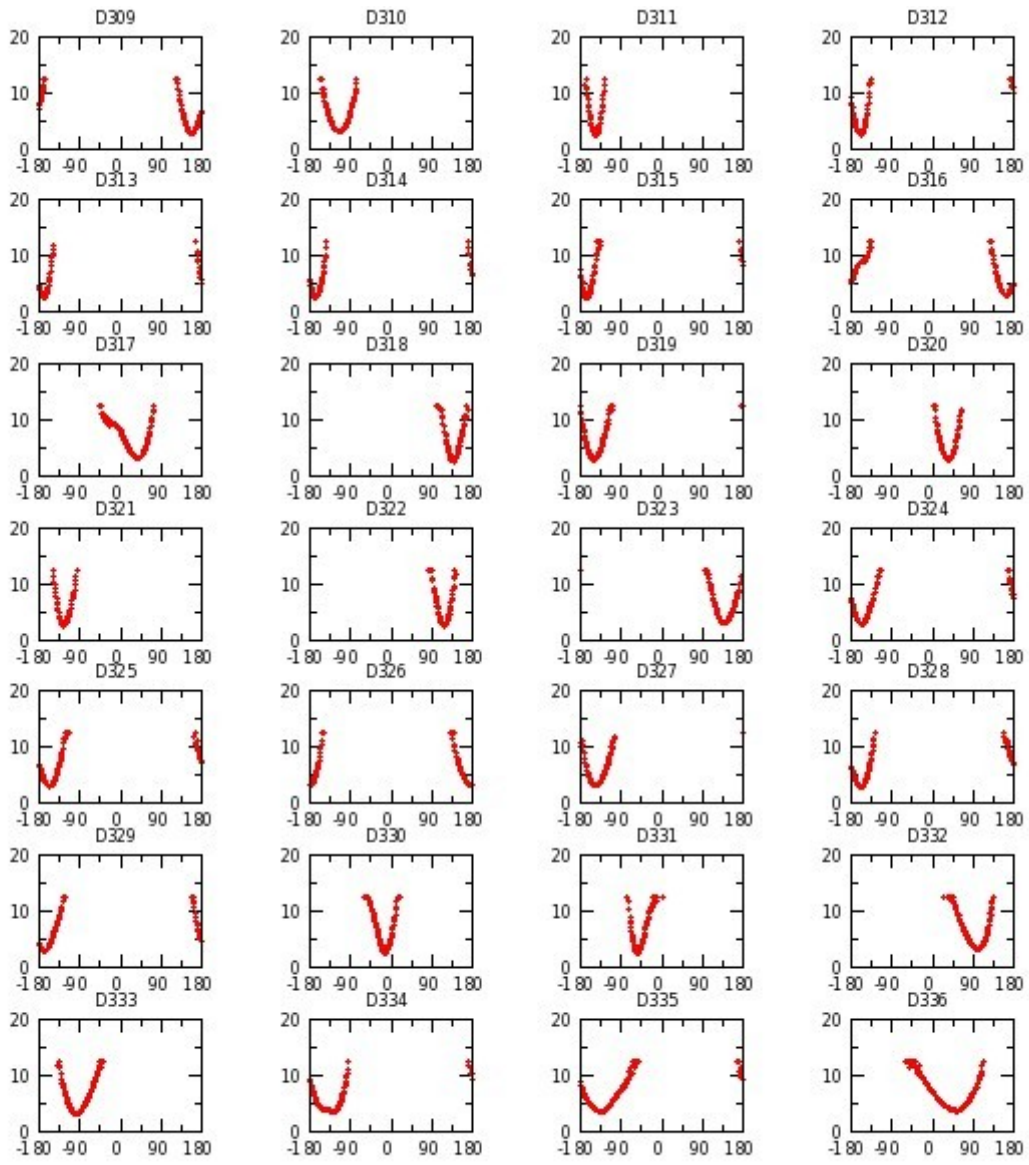


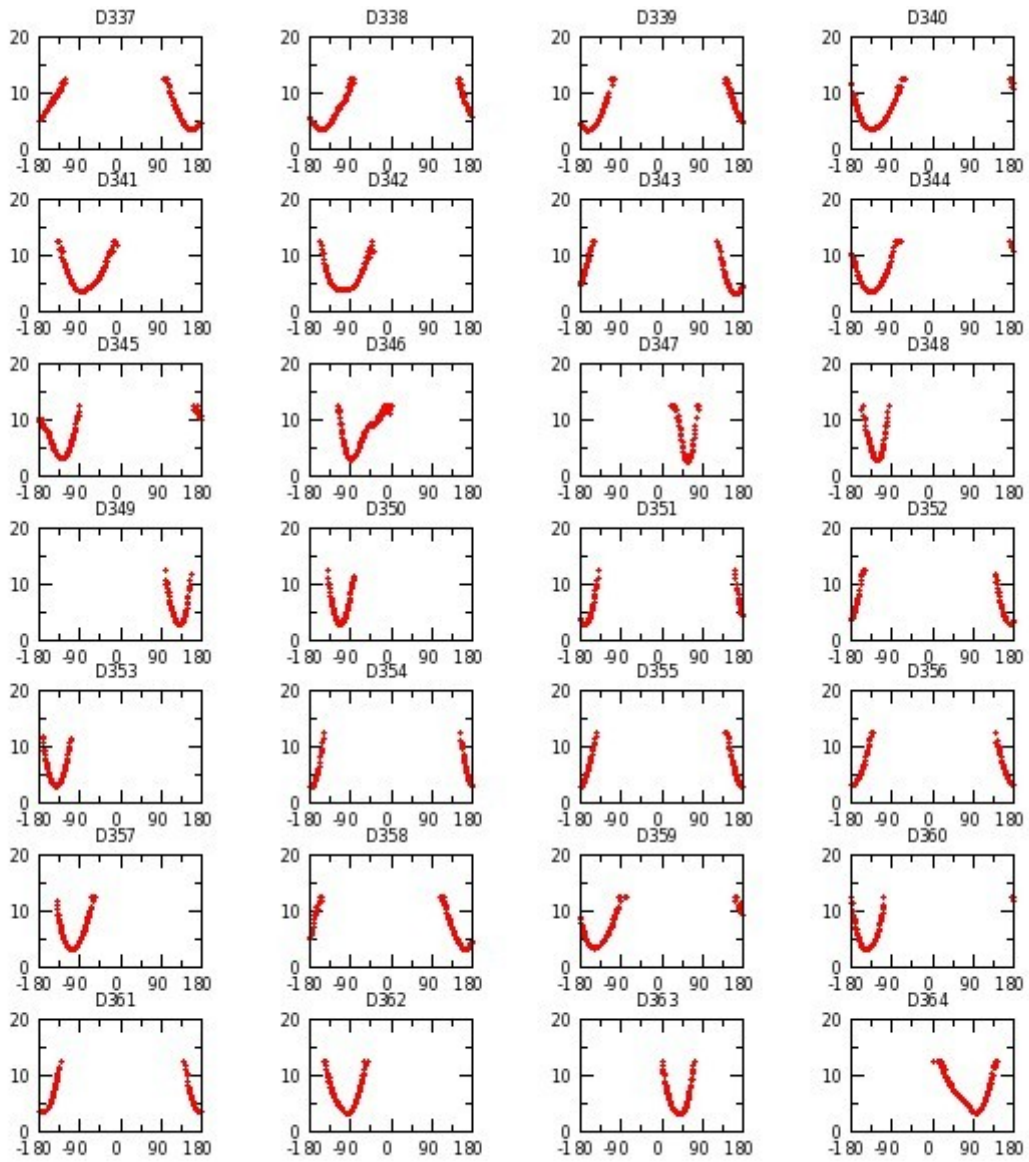


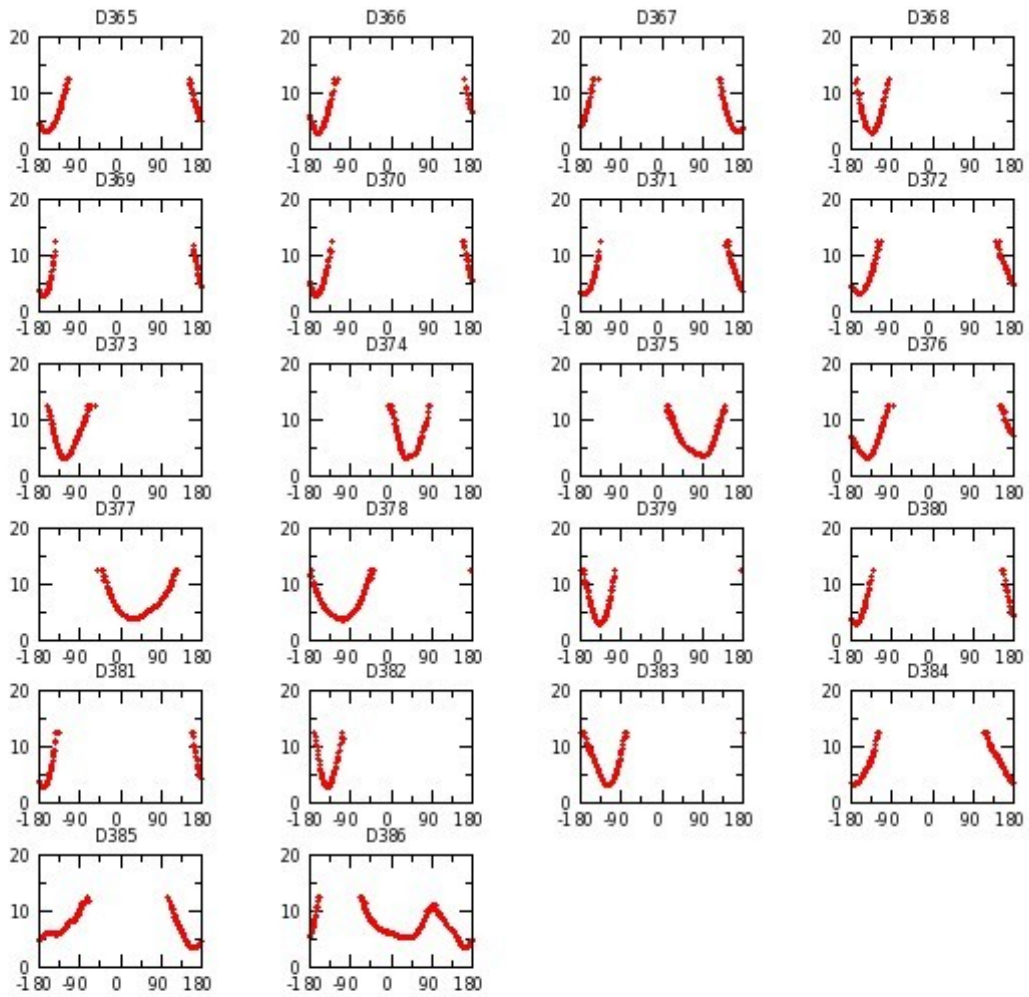




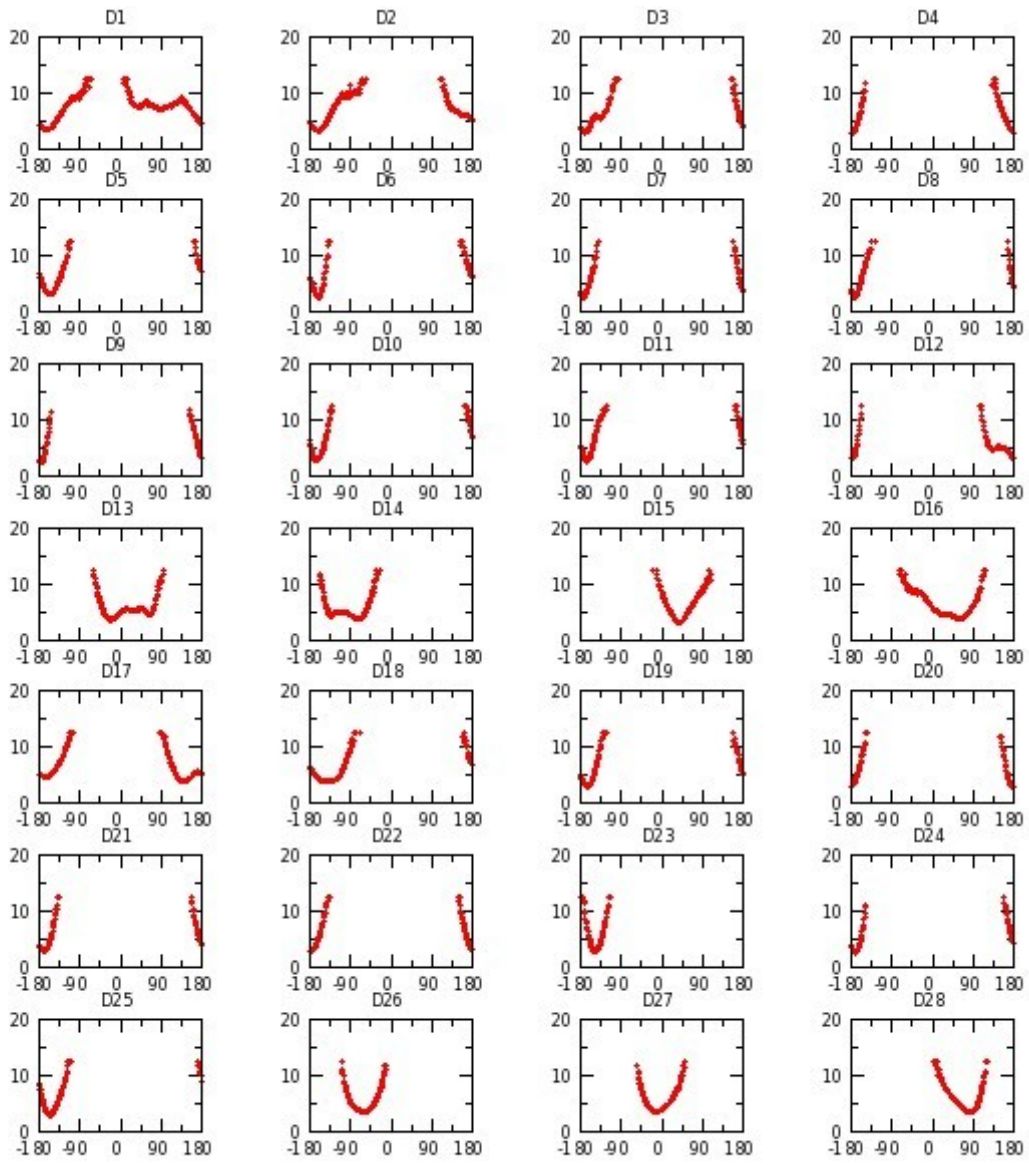


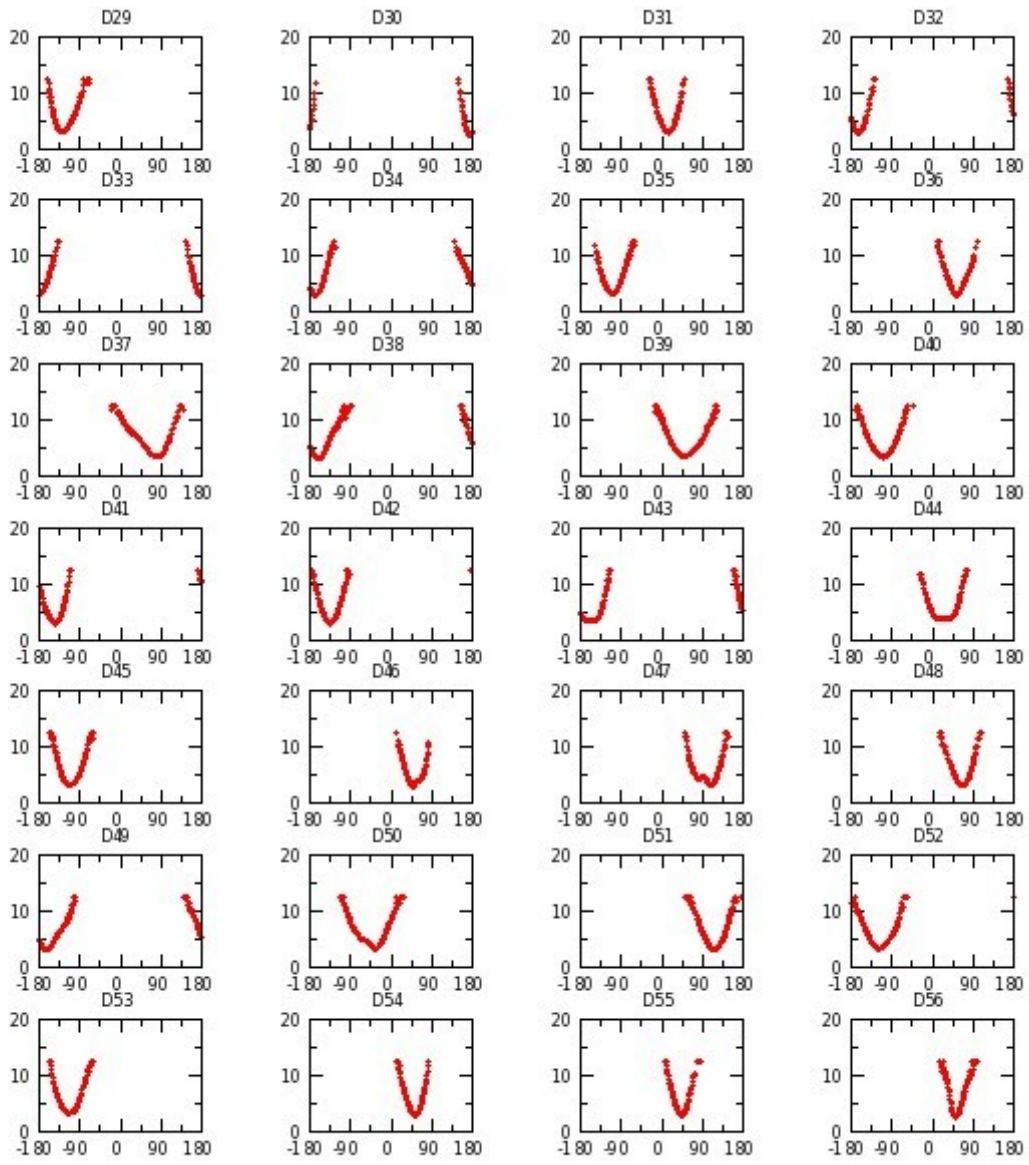


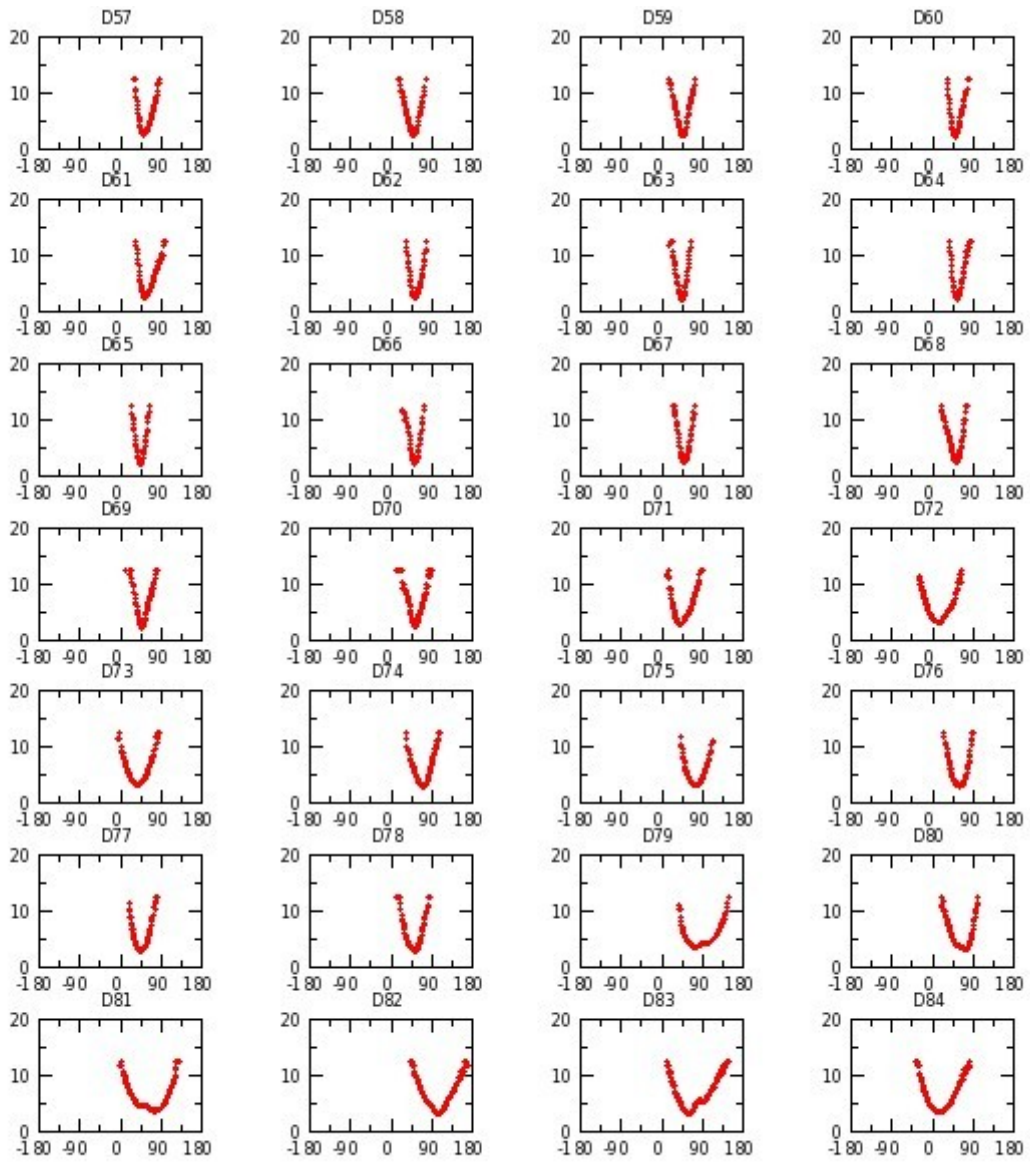


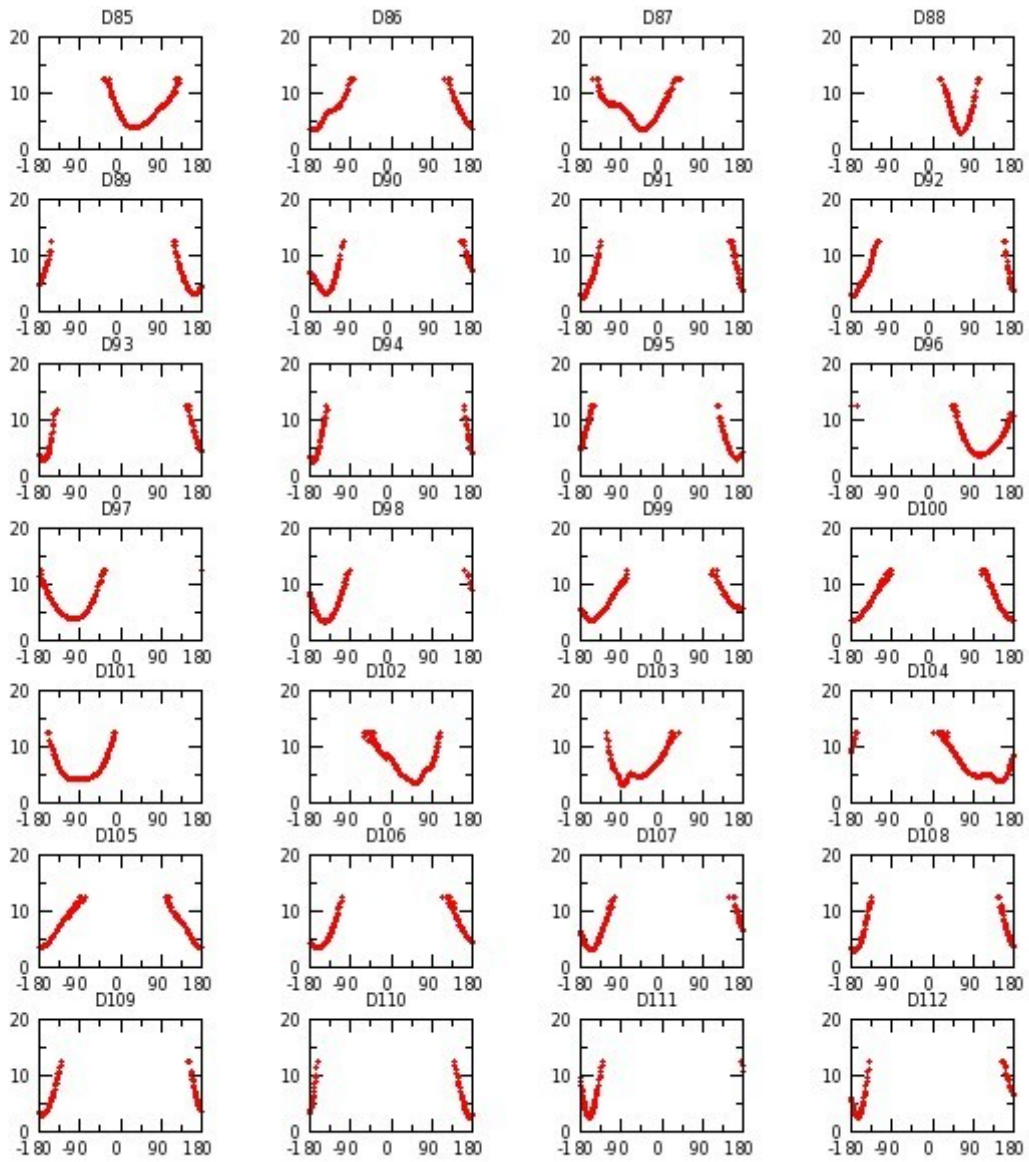


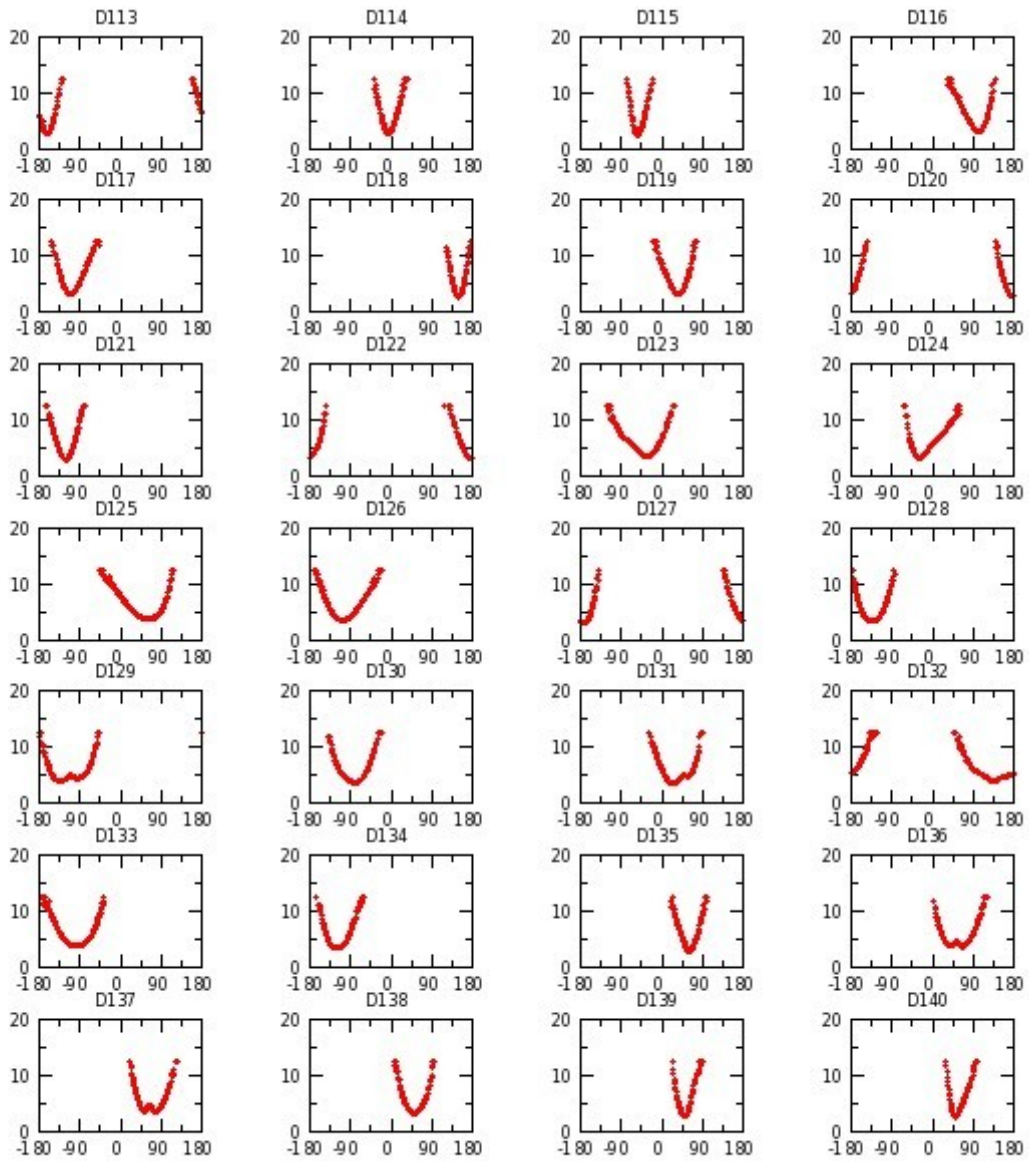
Annexe G 31 : M_aGAL réplique I

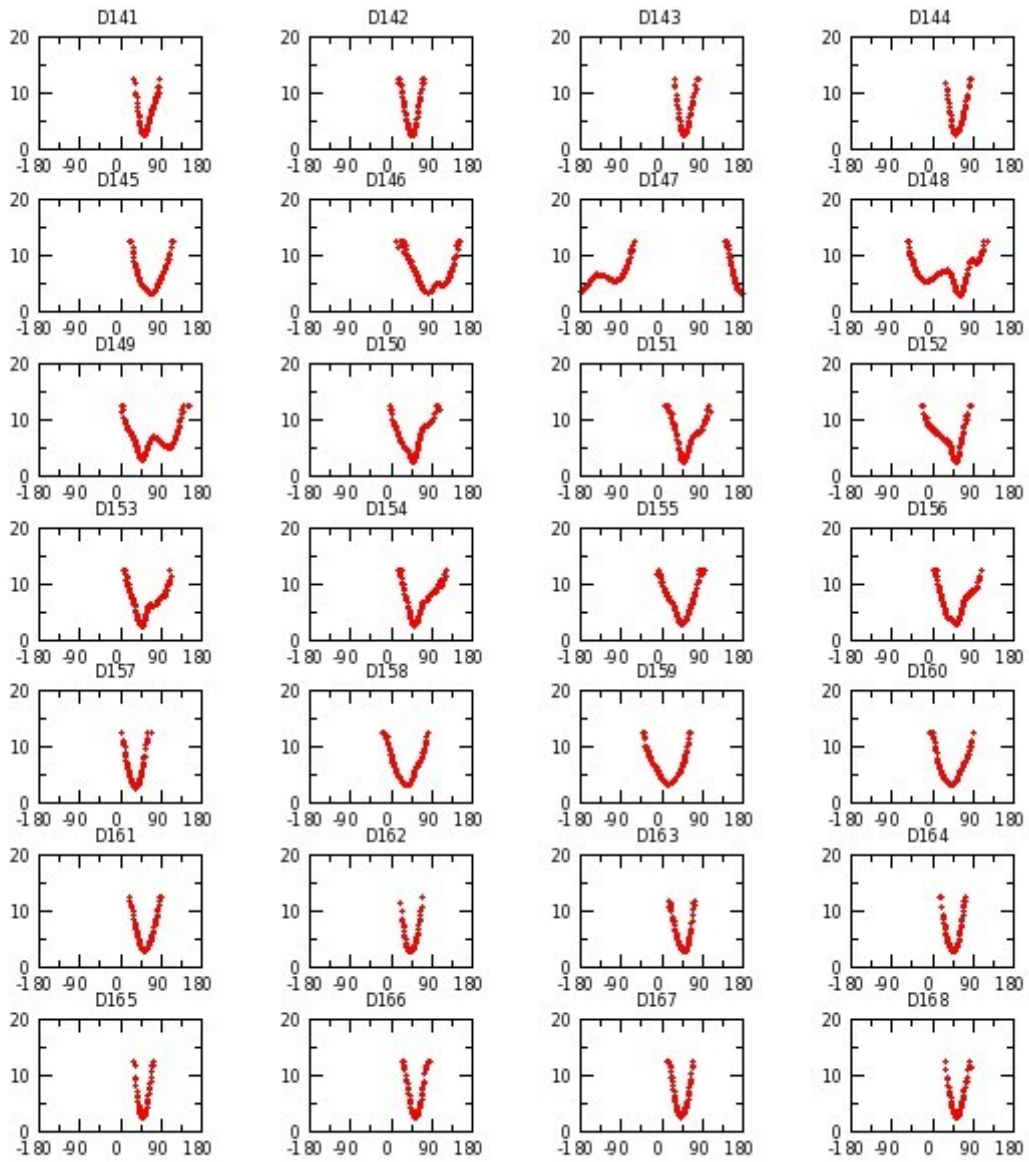


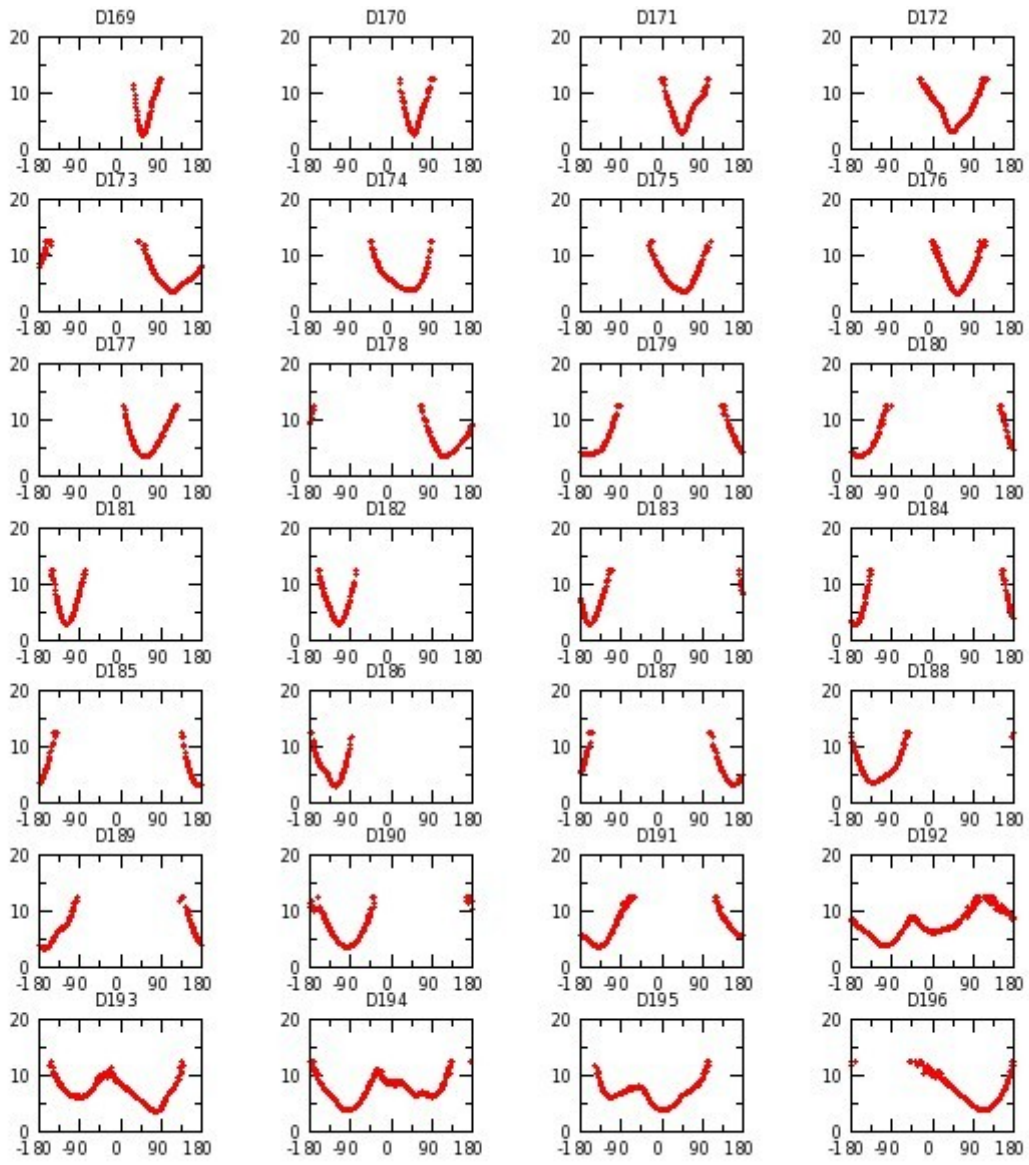


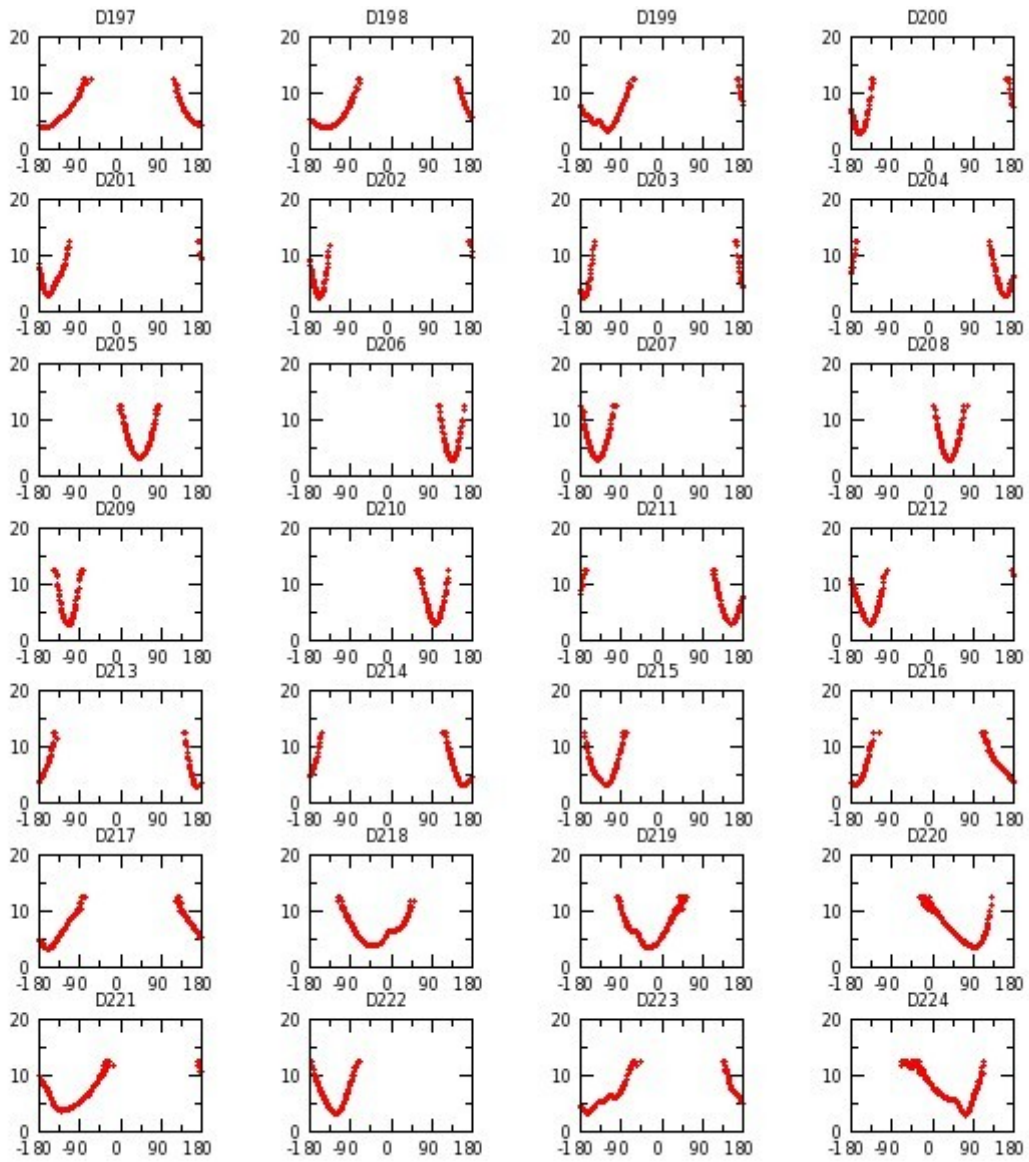


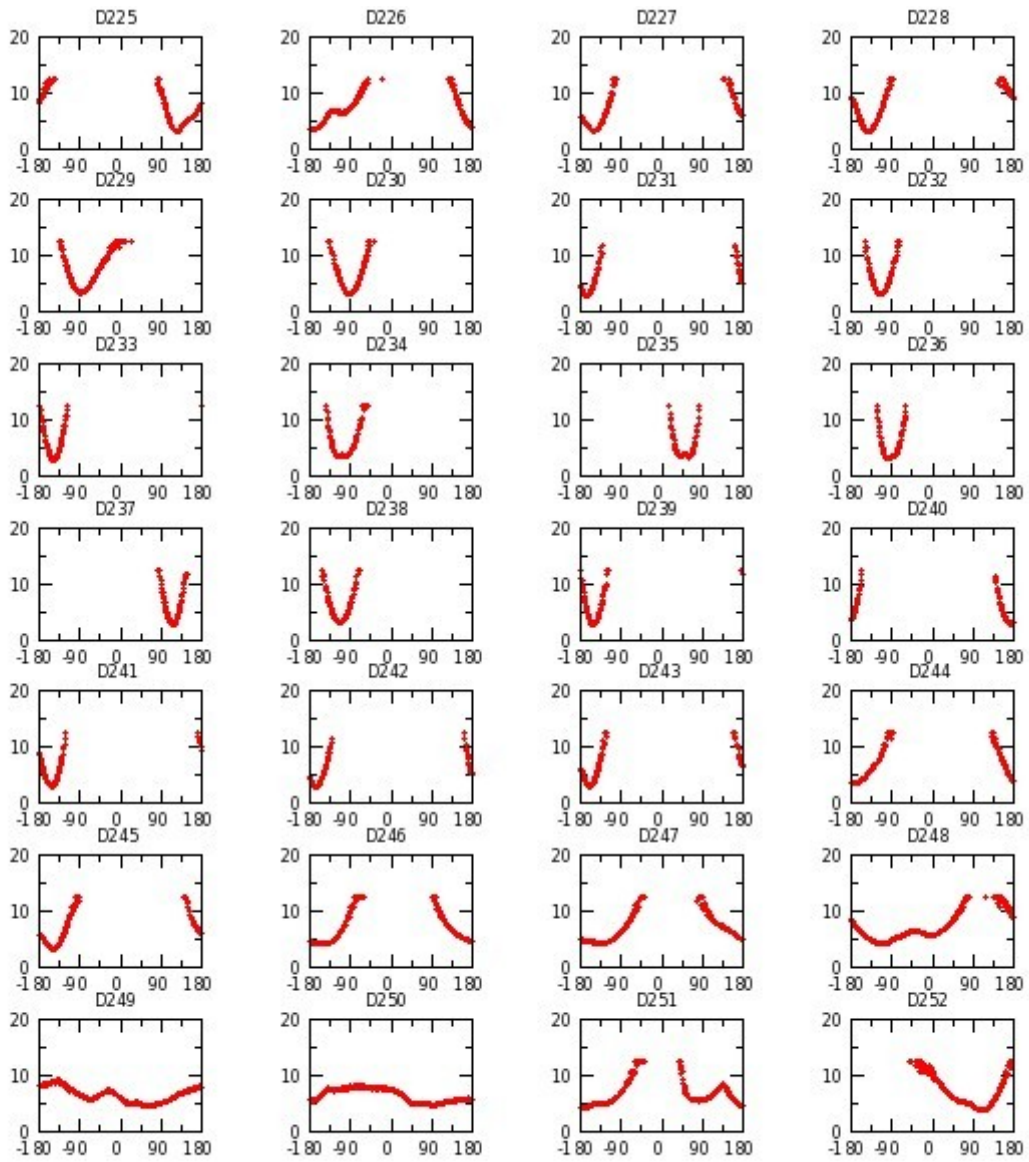


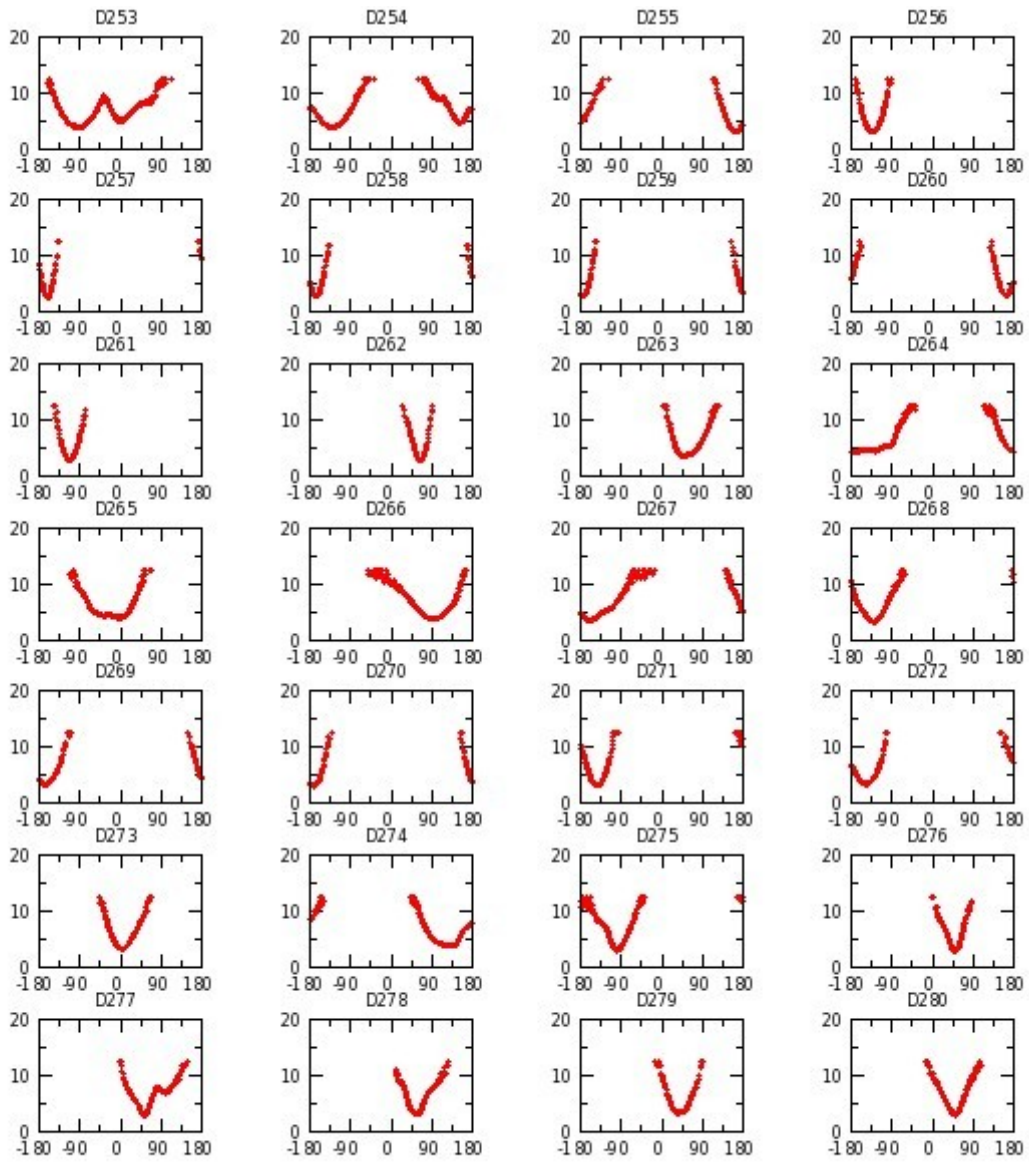


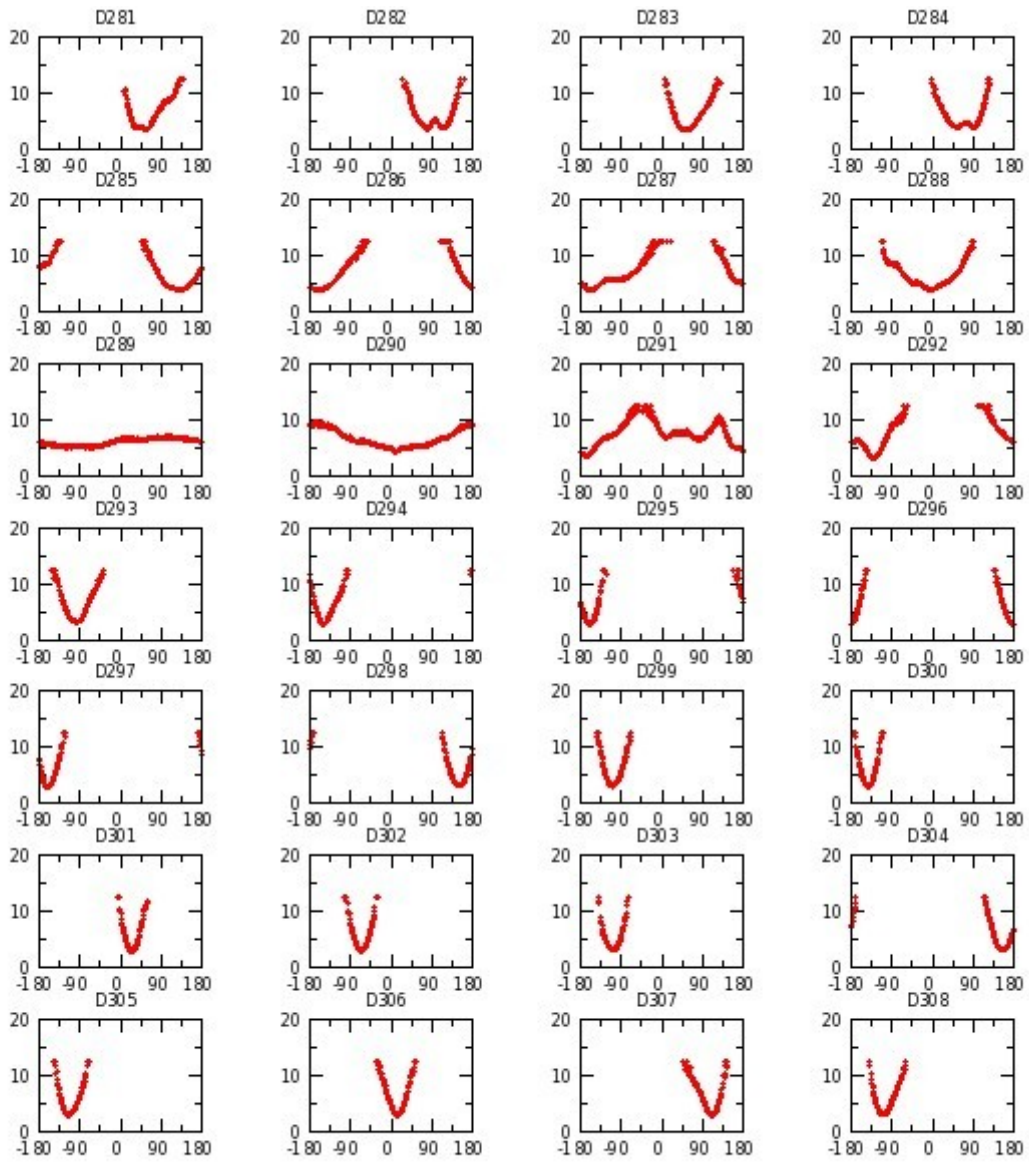


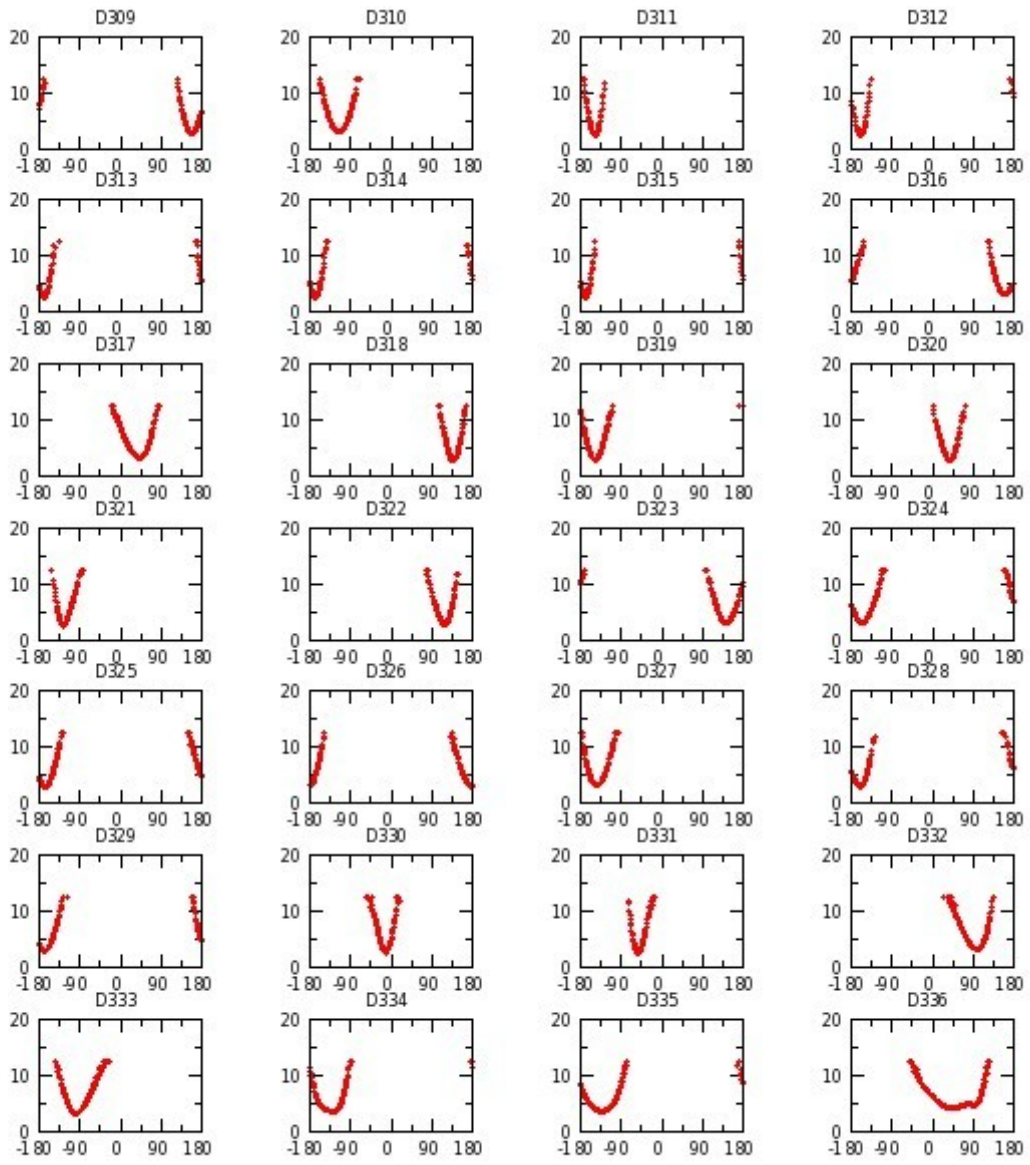


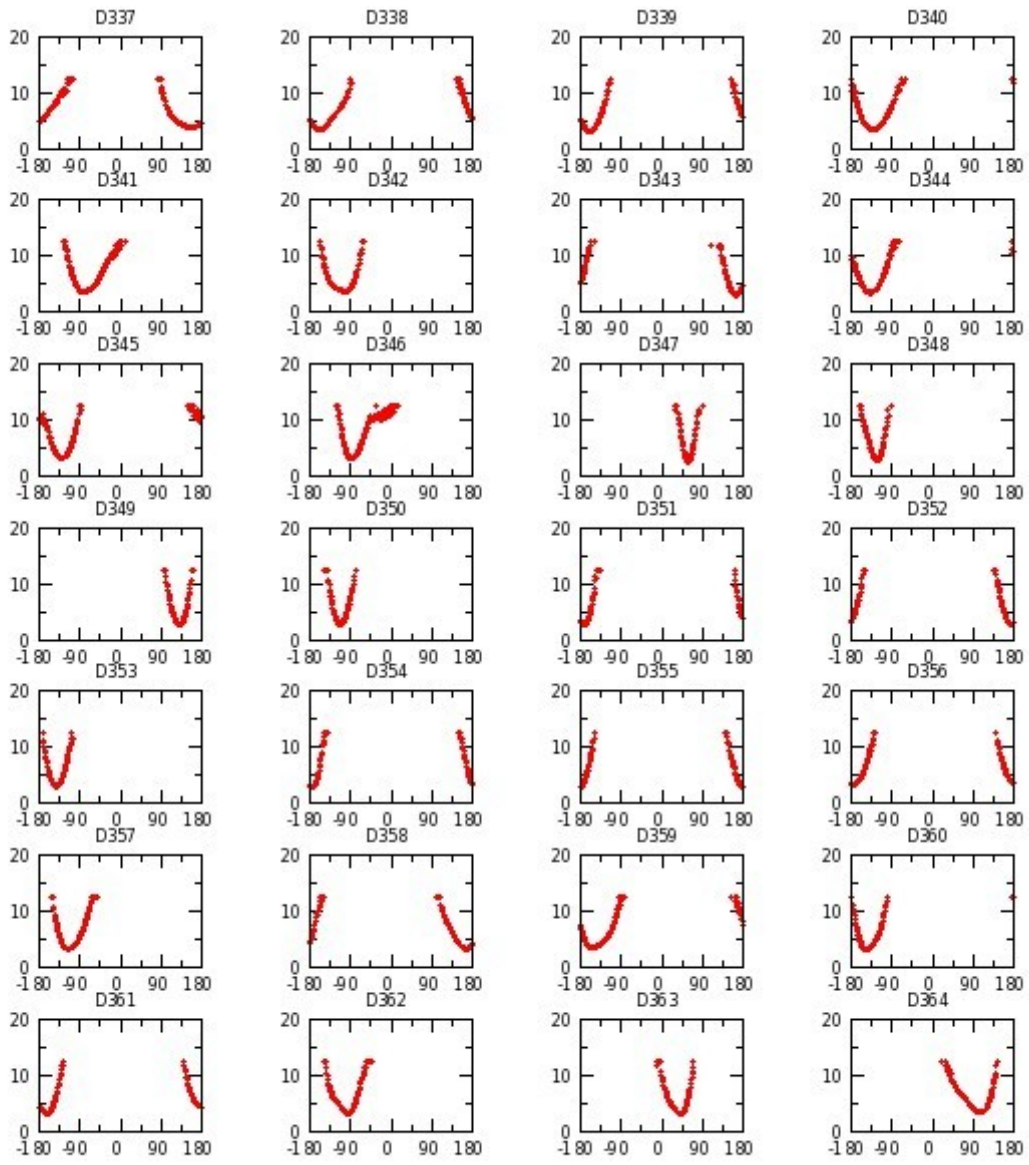


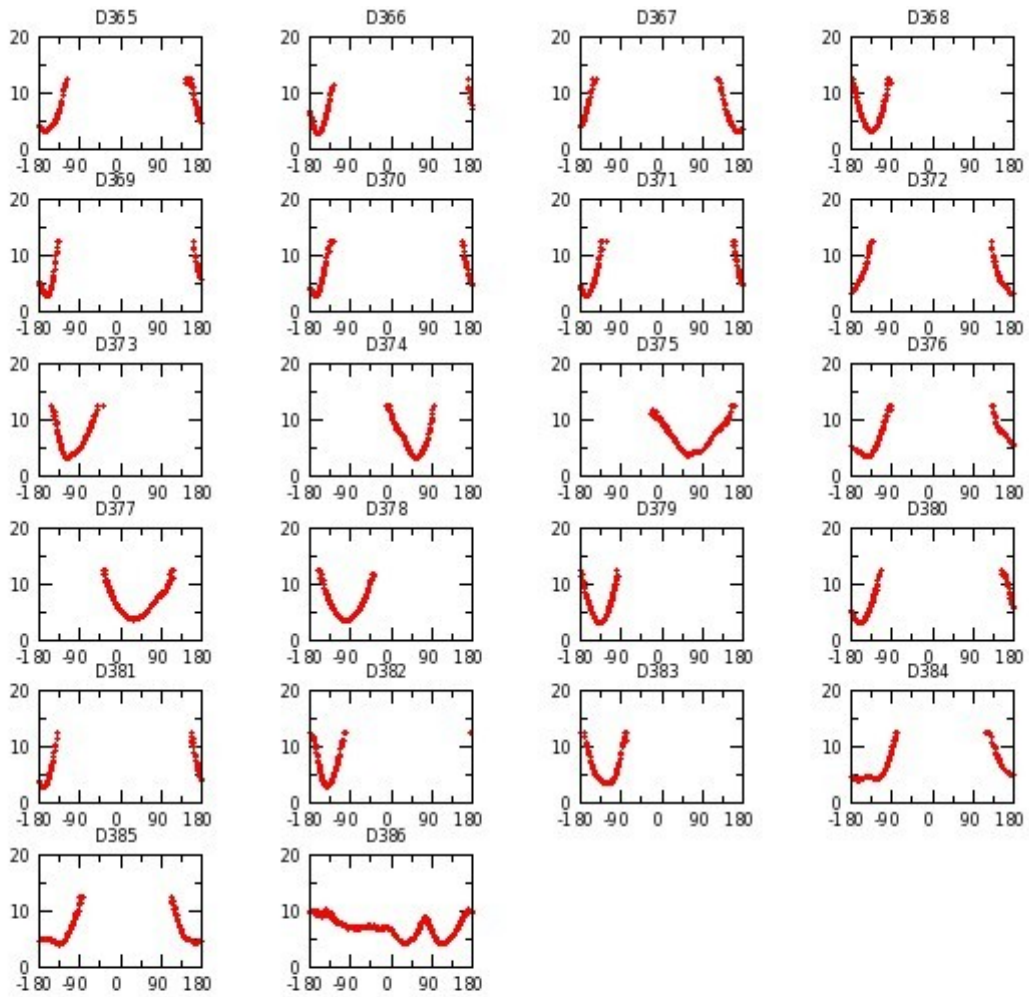




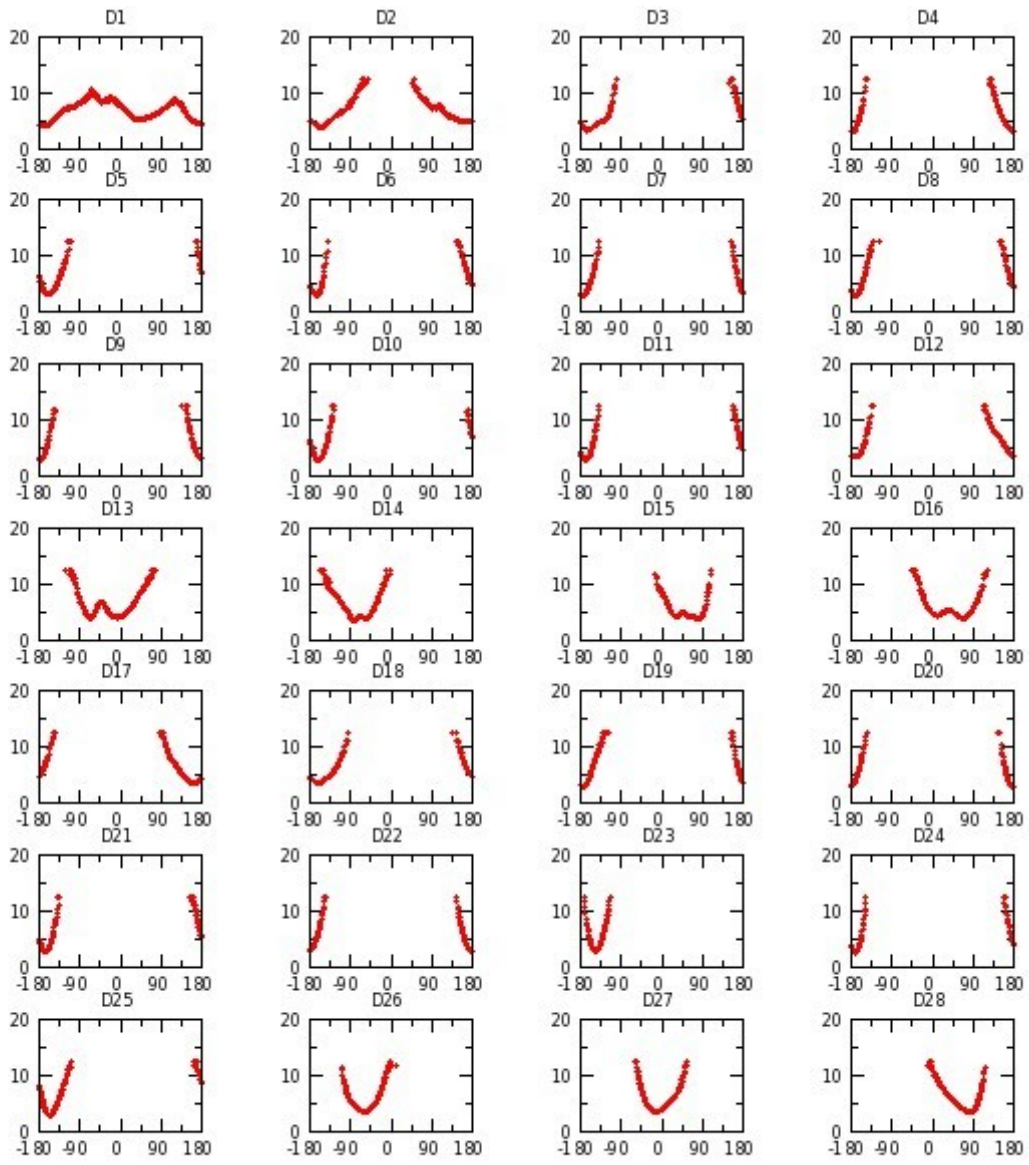


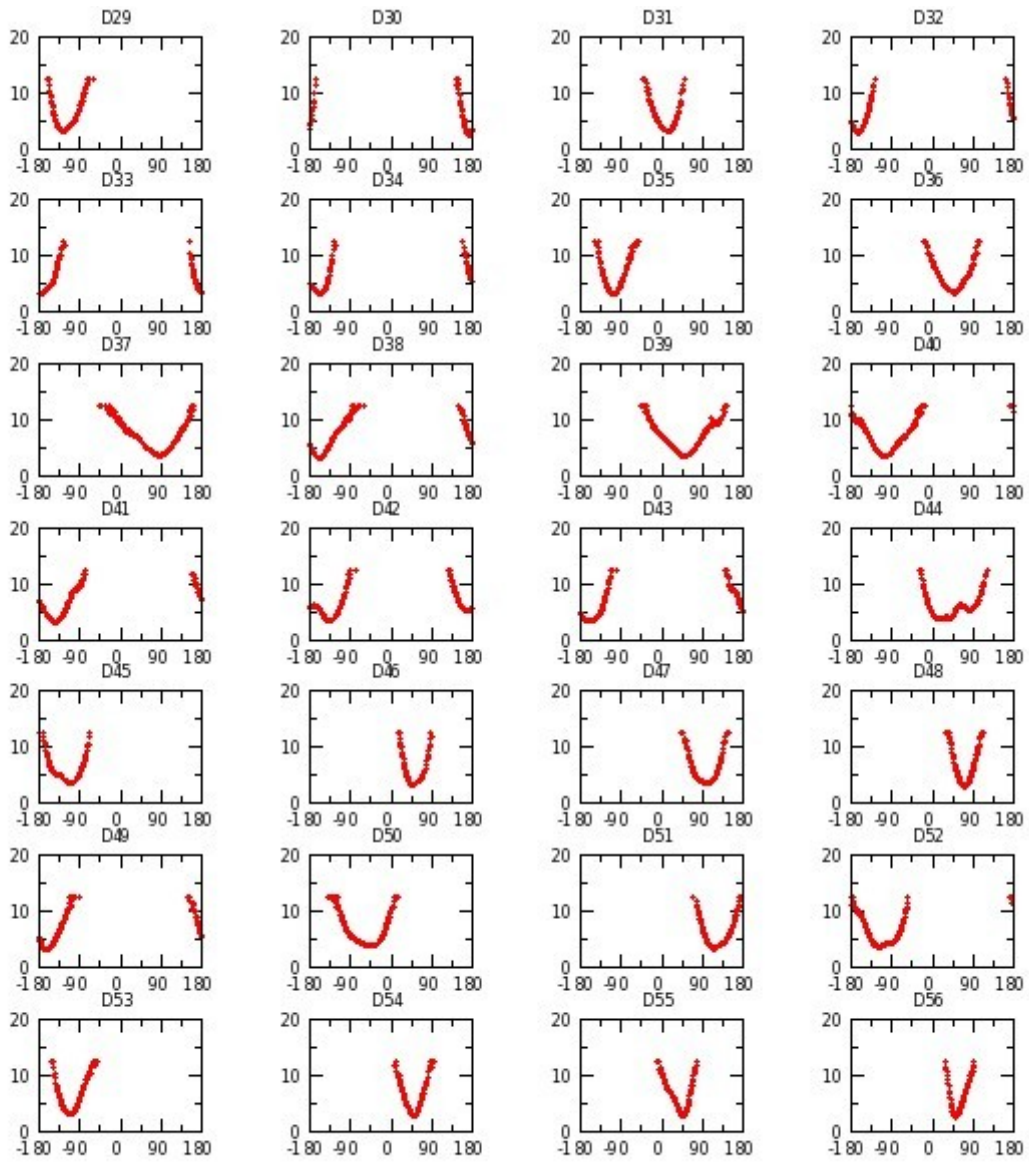


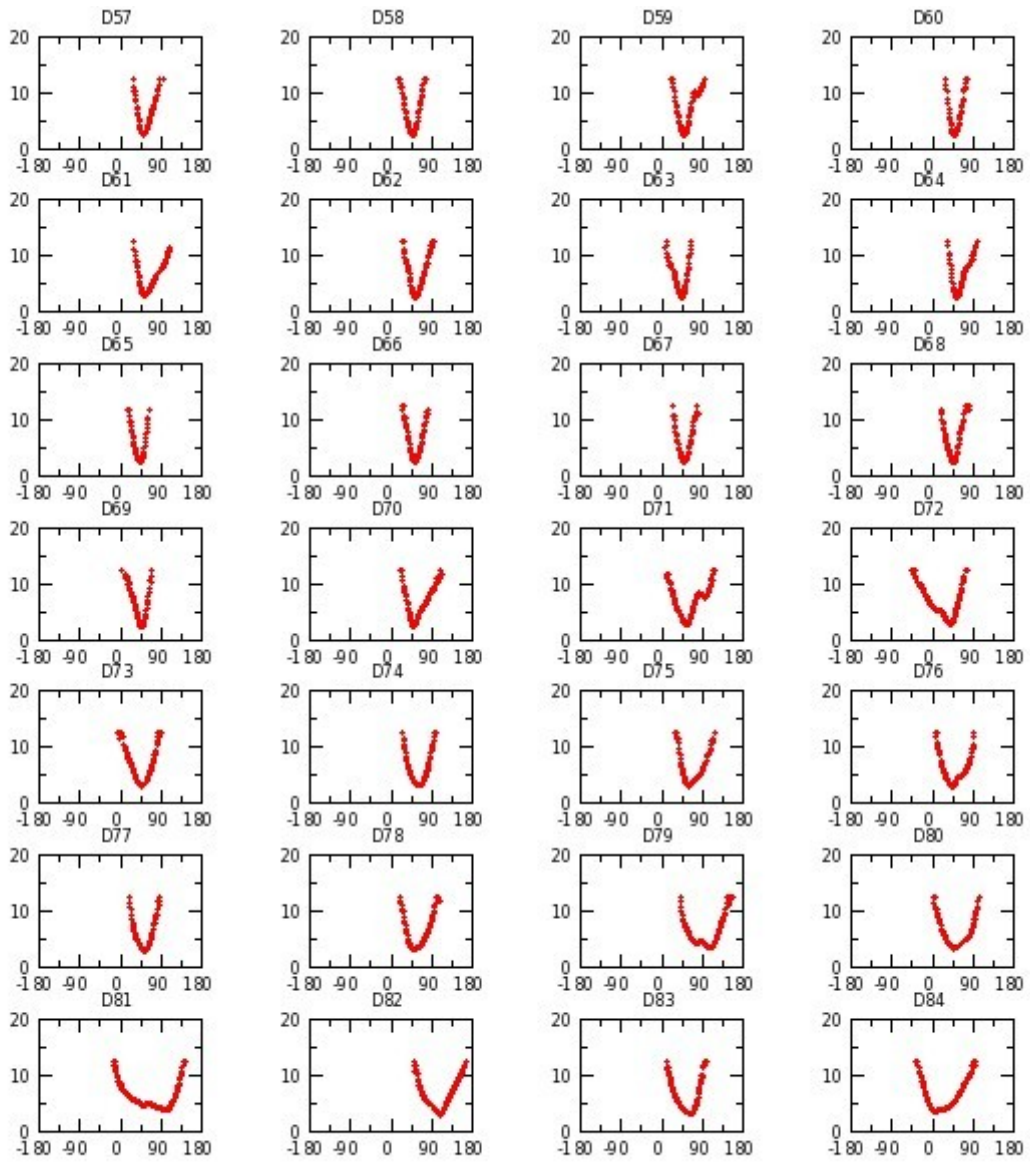


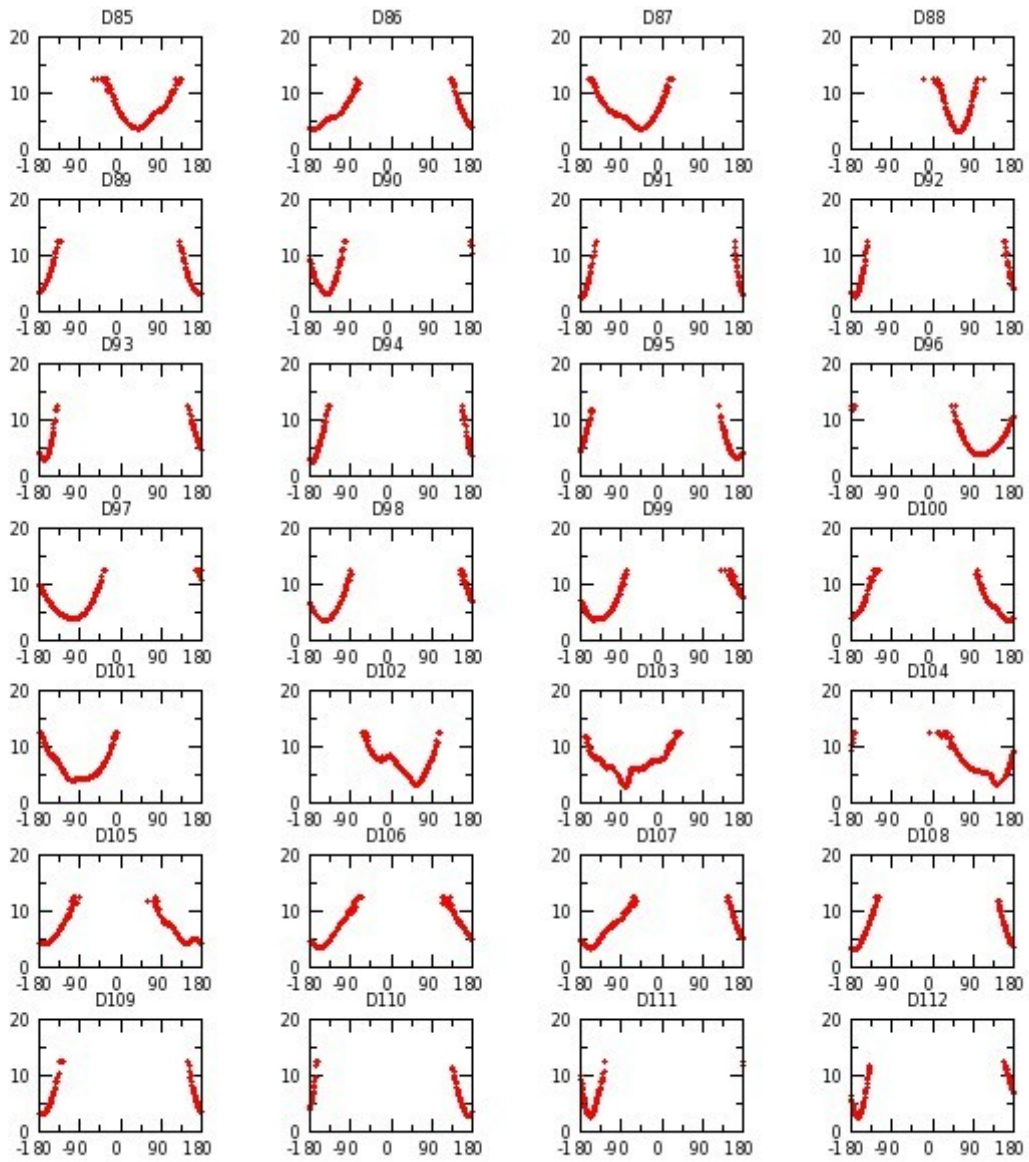


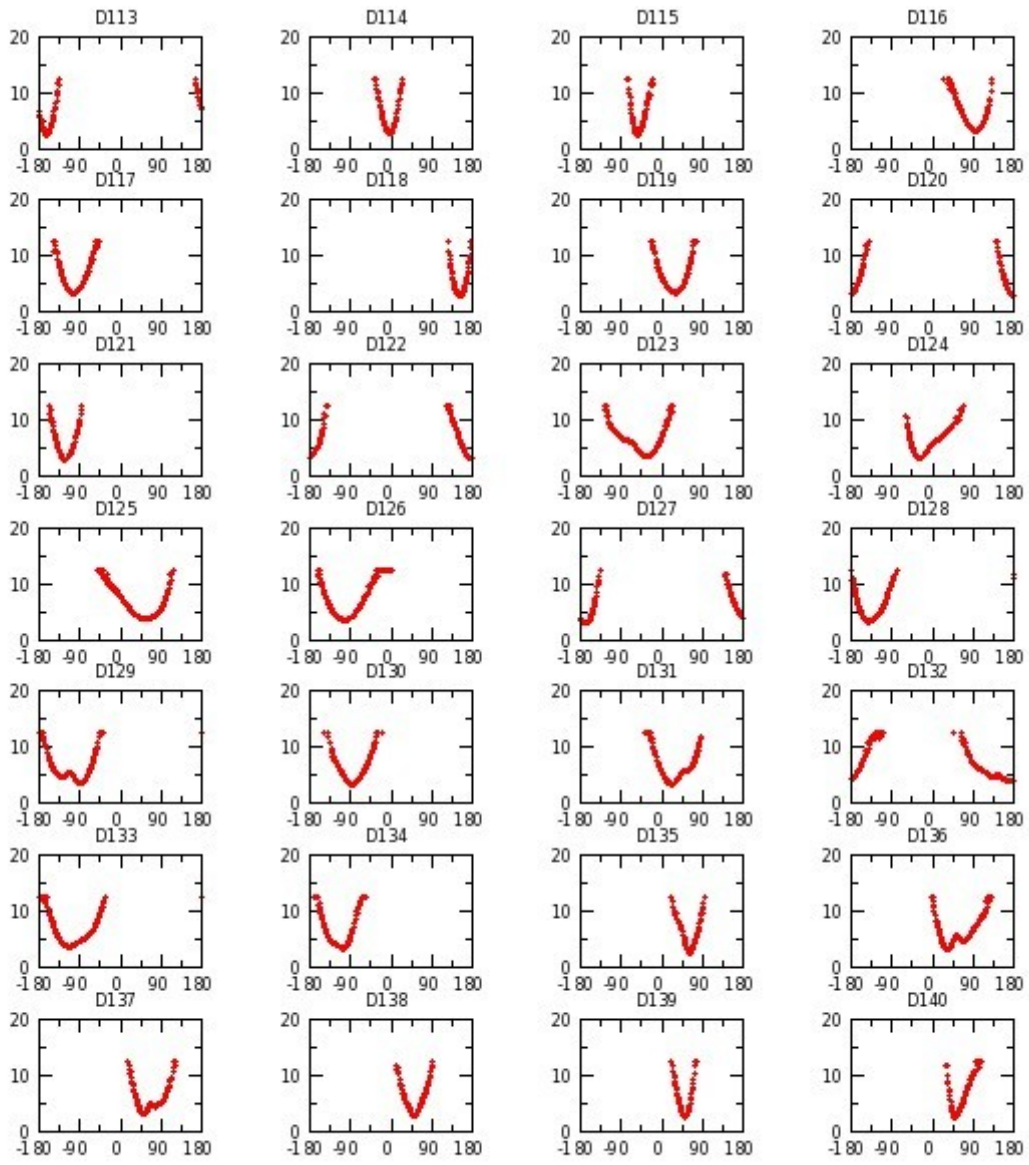
Annexe G 32 : M_aGAL réplique II

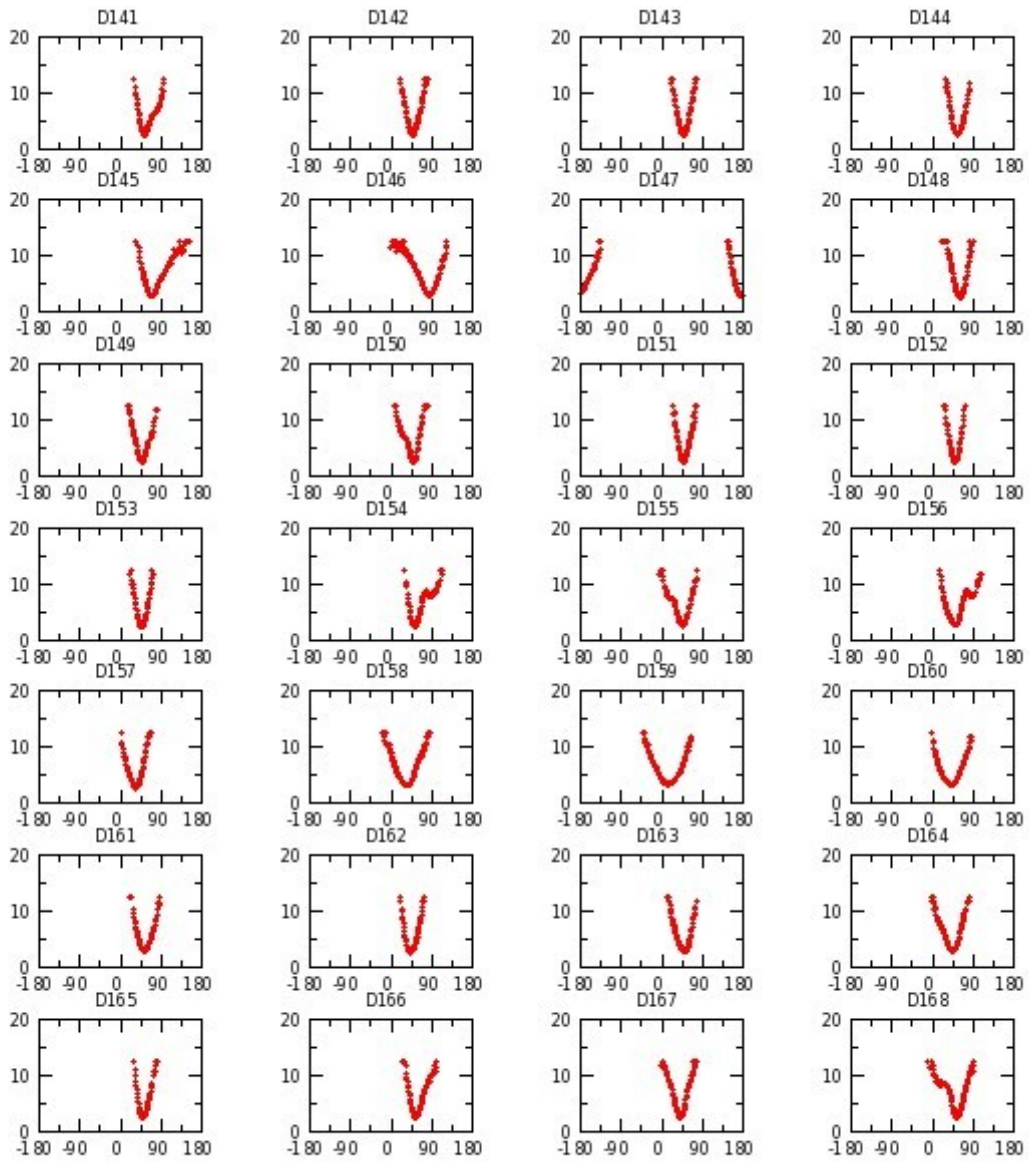


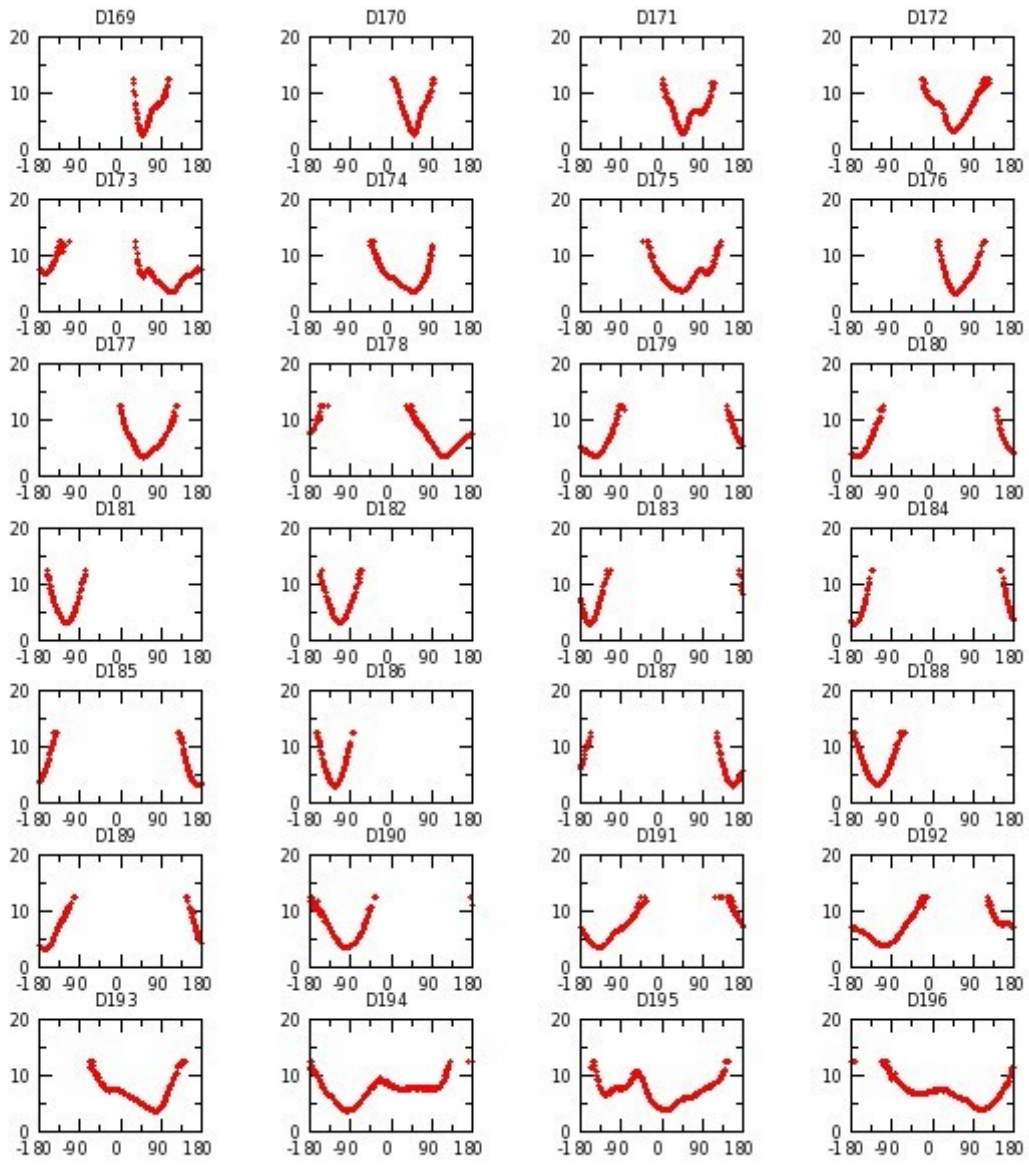


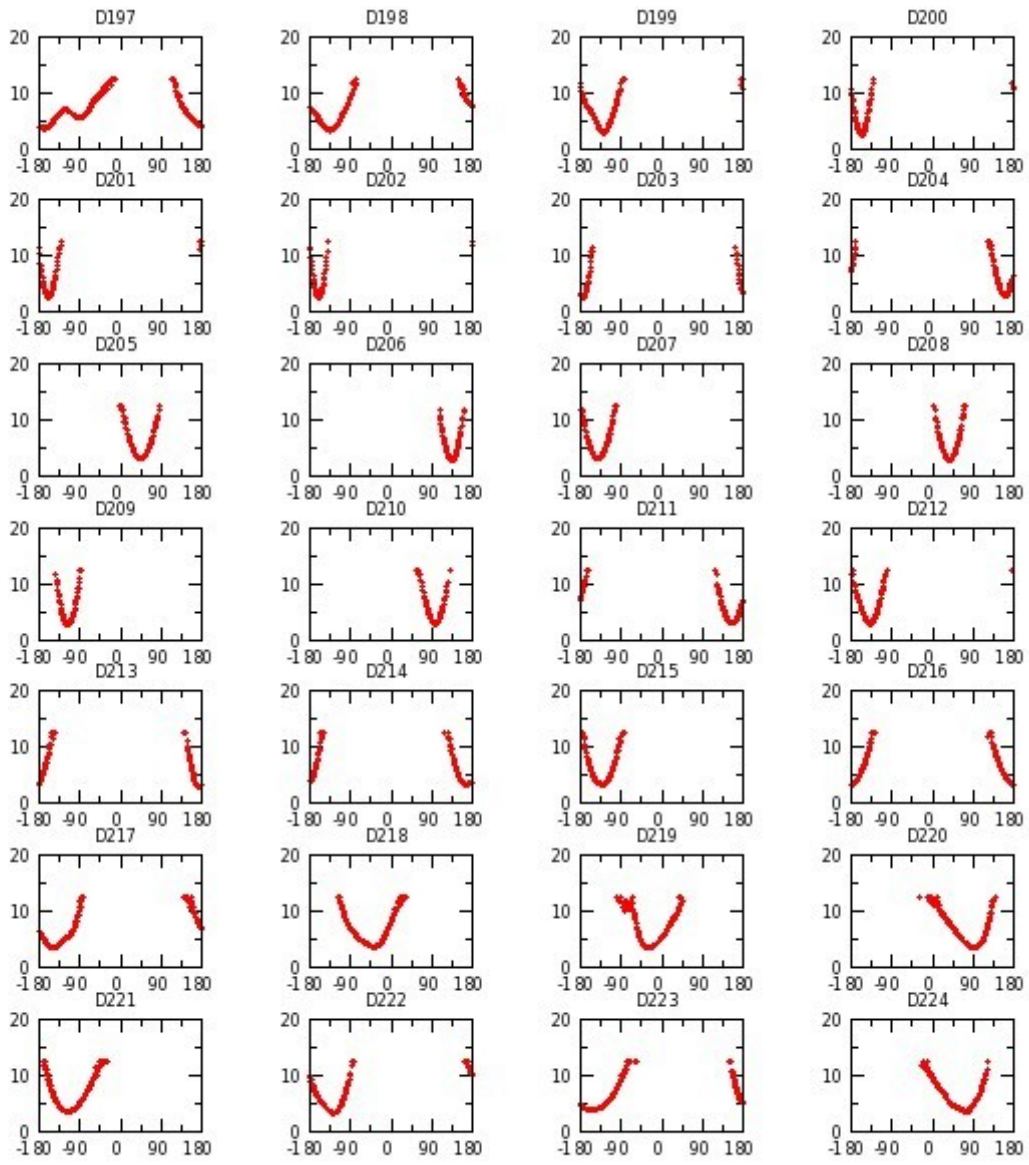


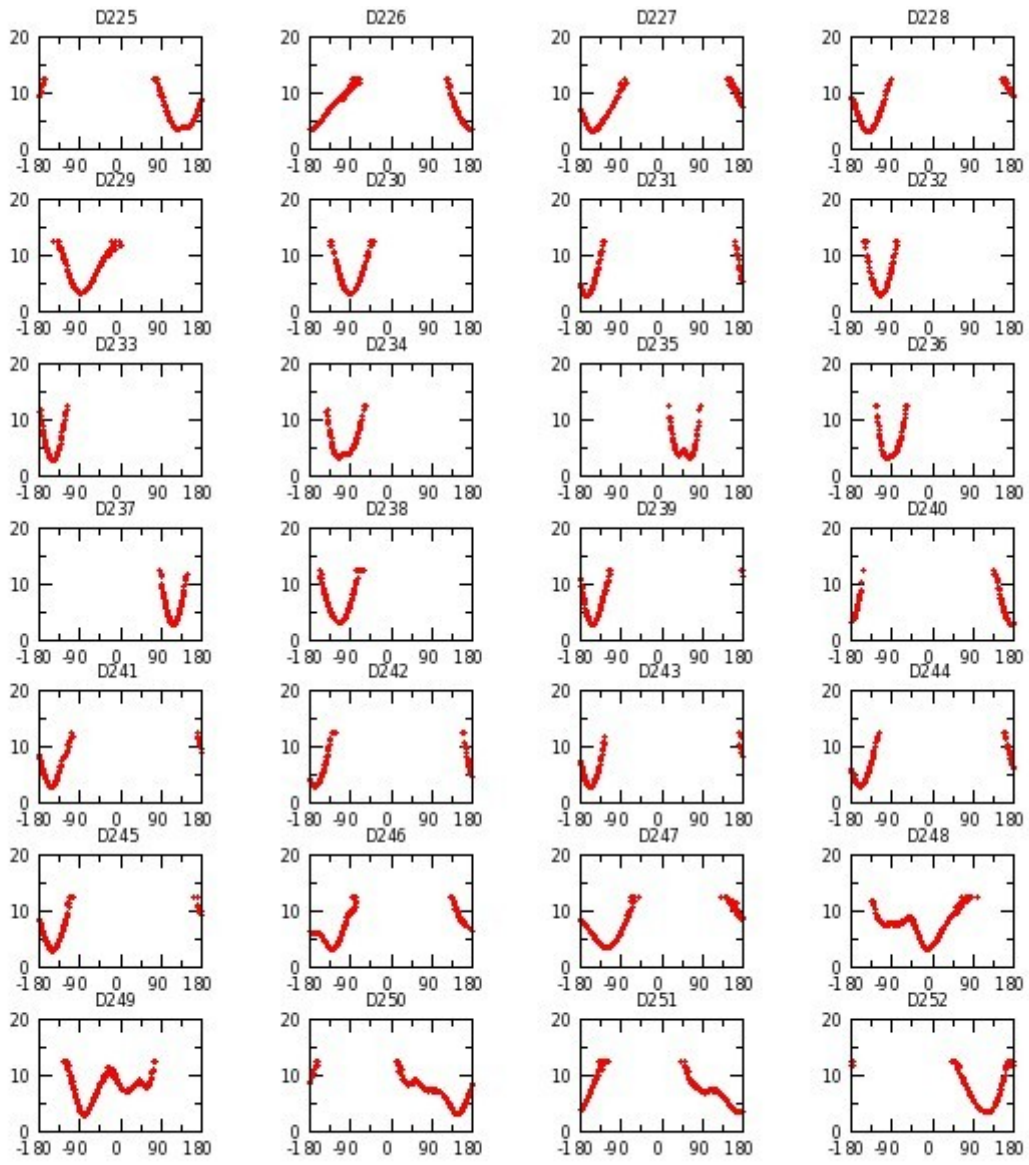


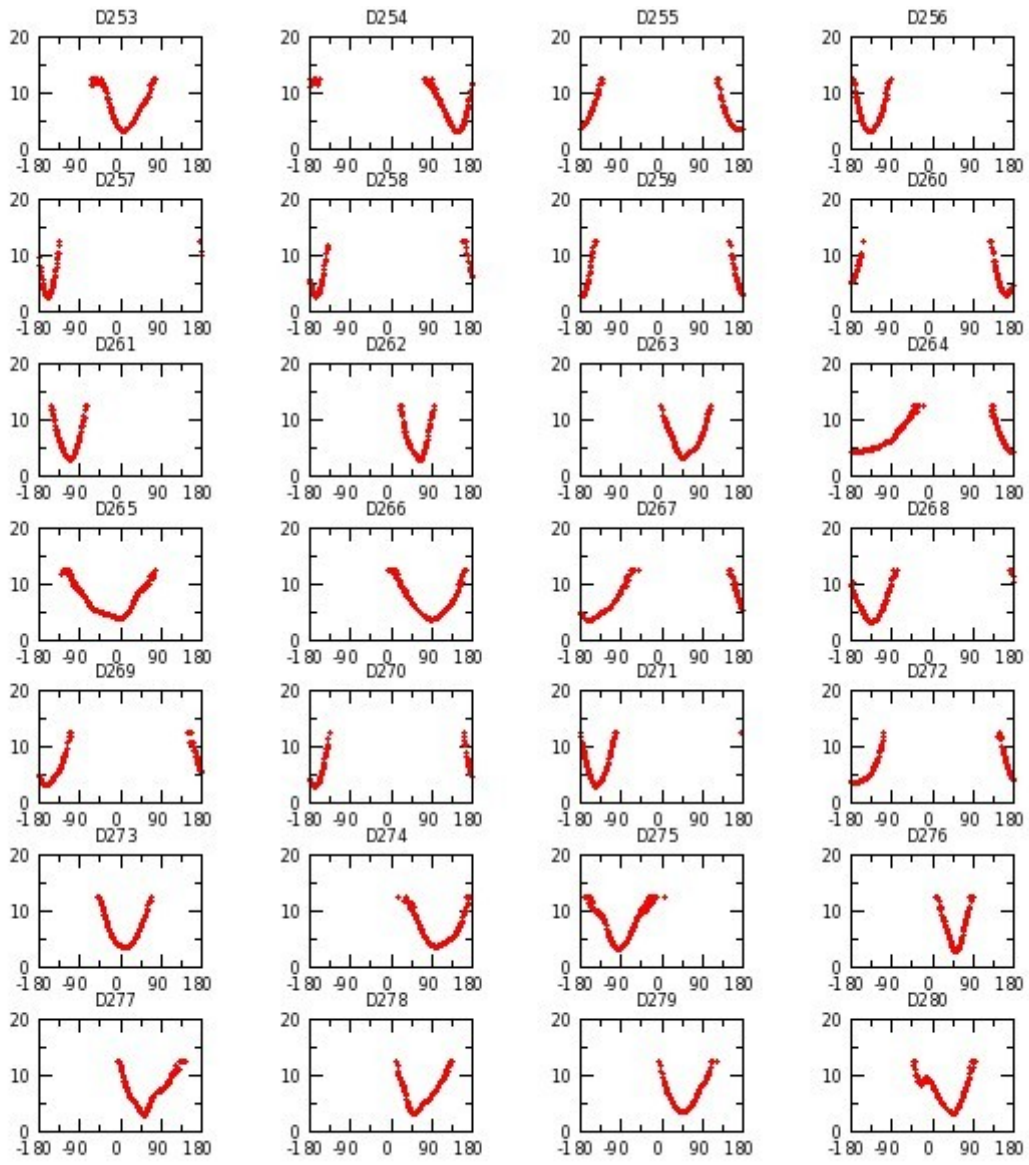


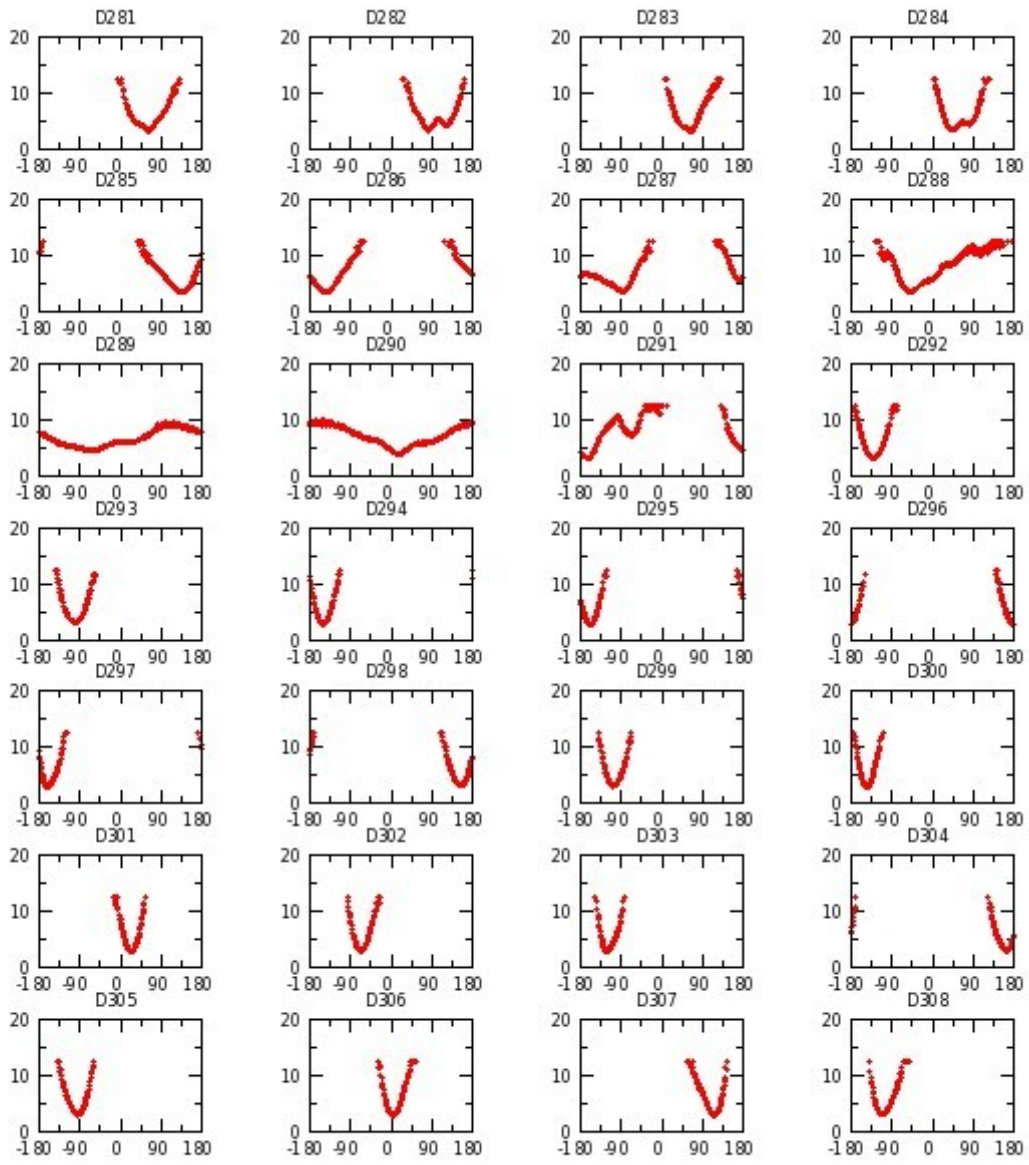


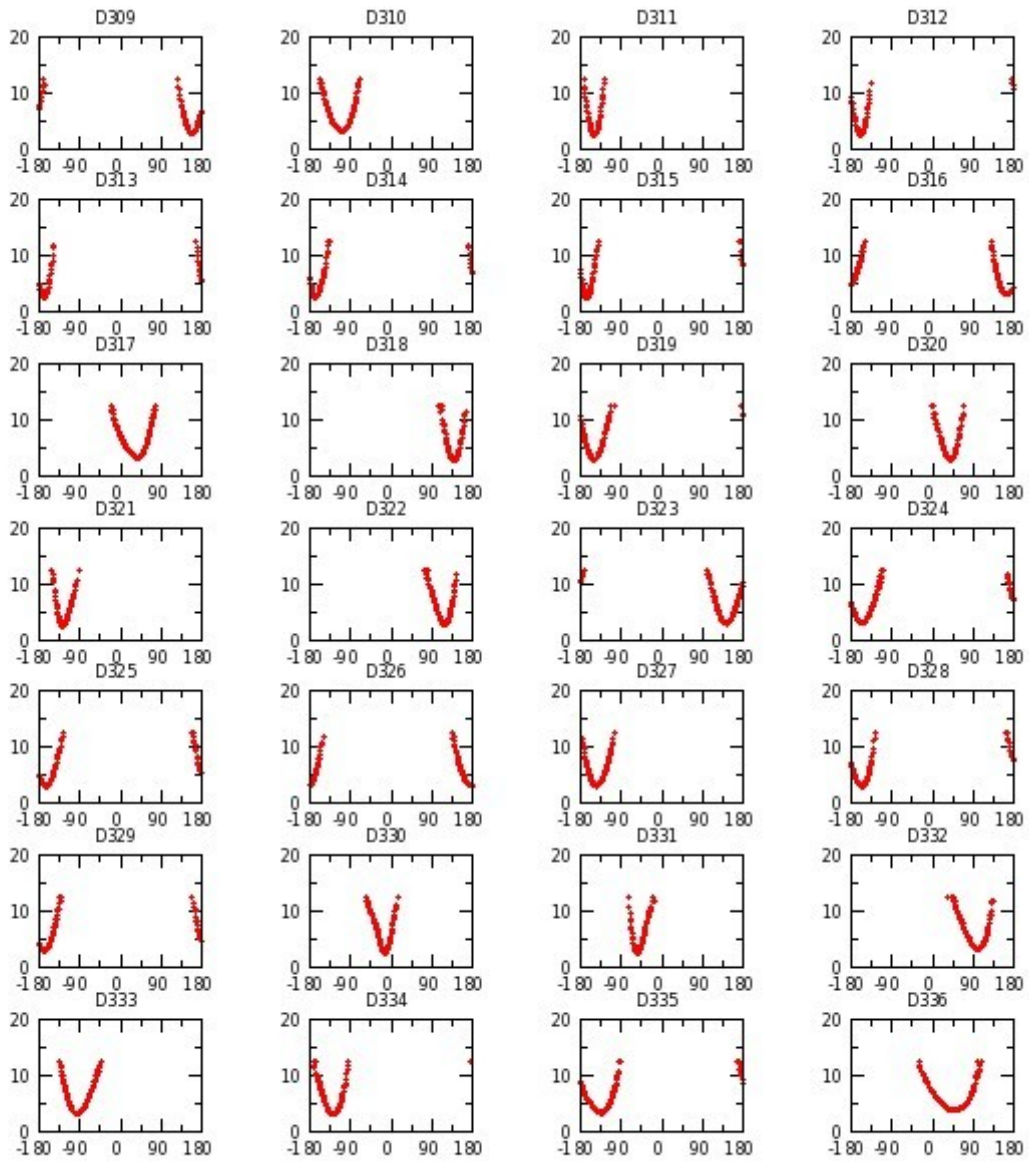


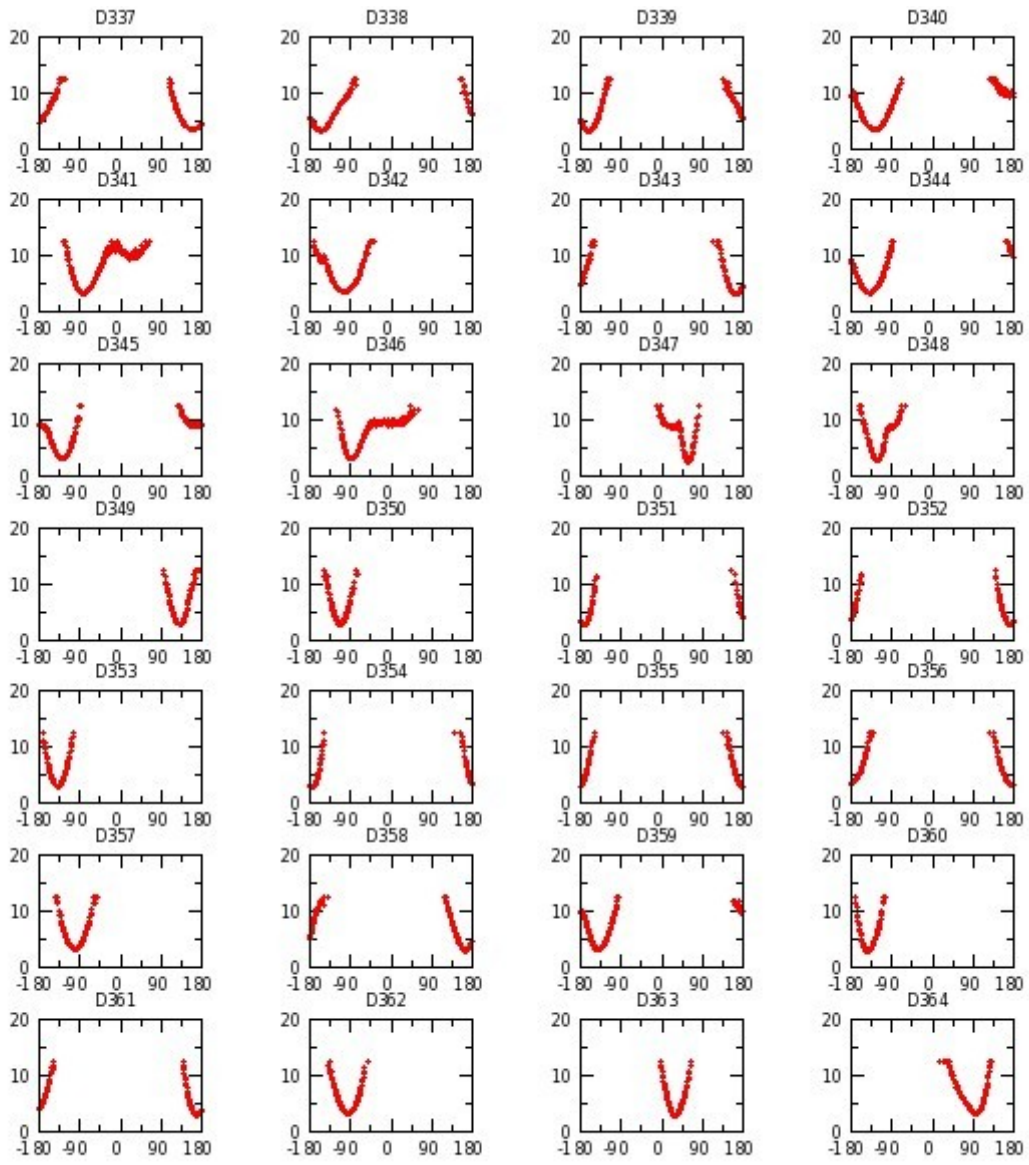


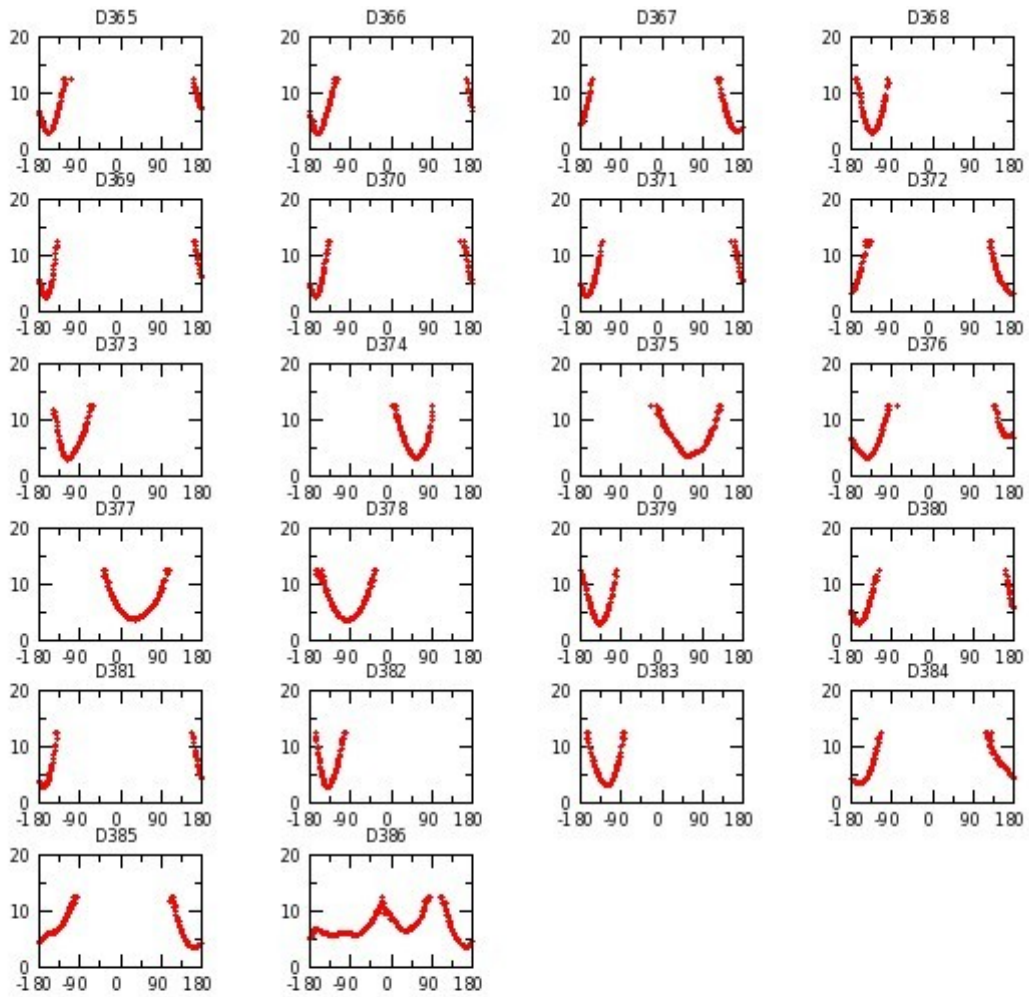




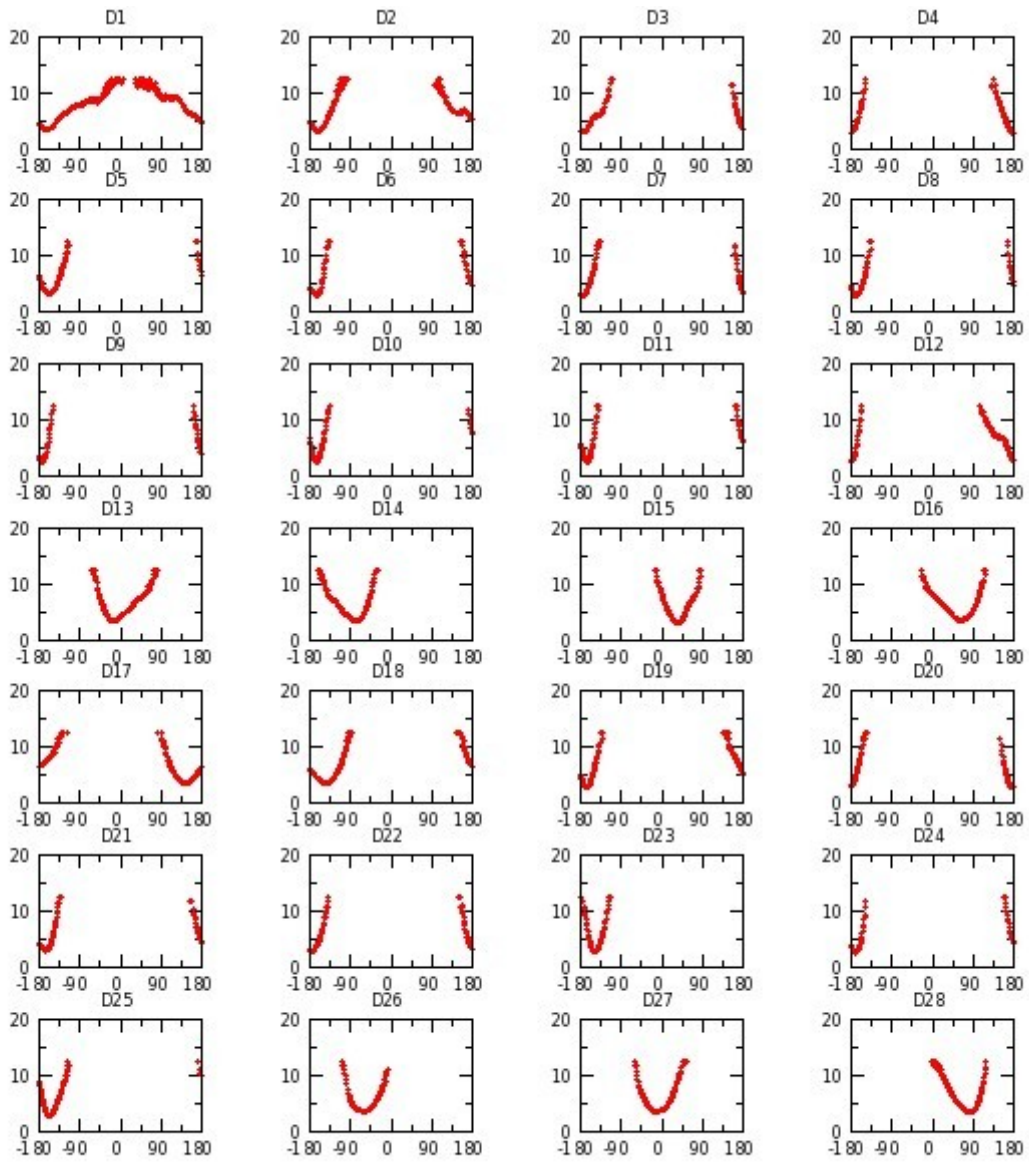


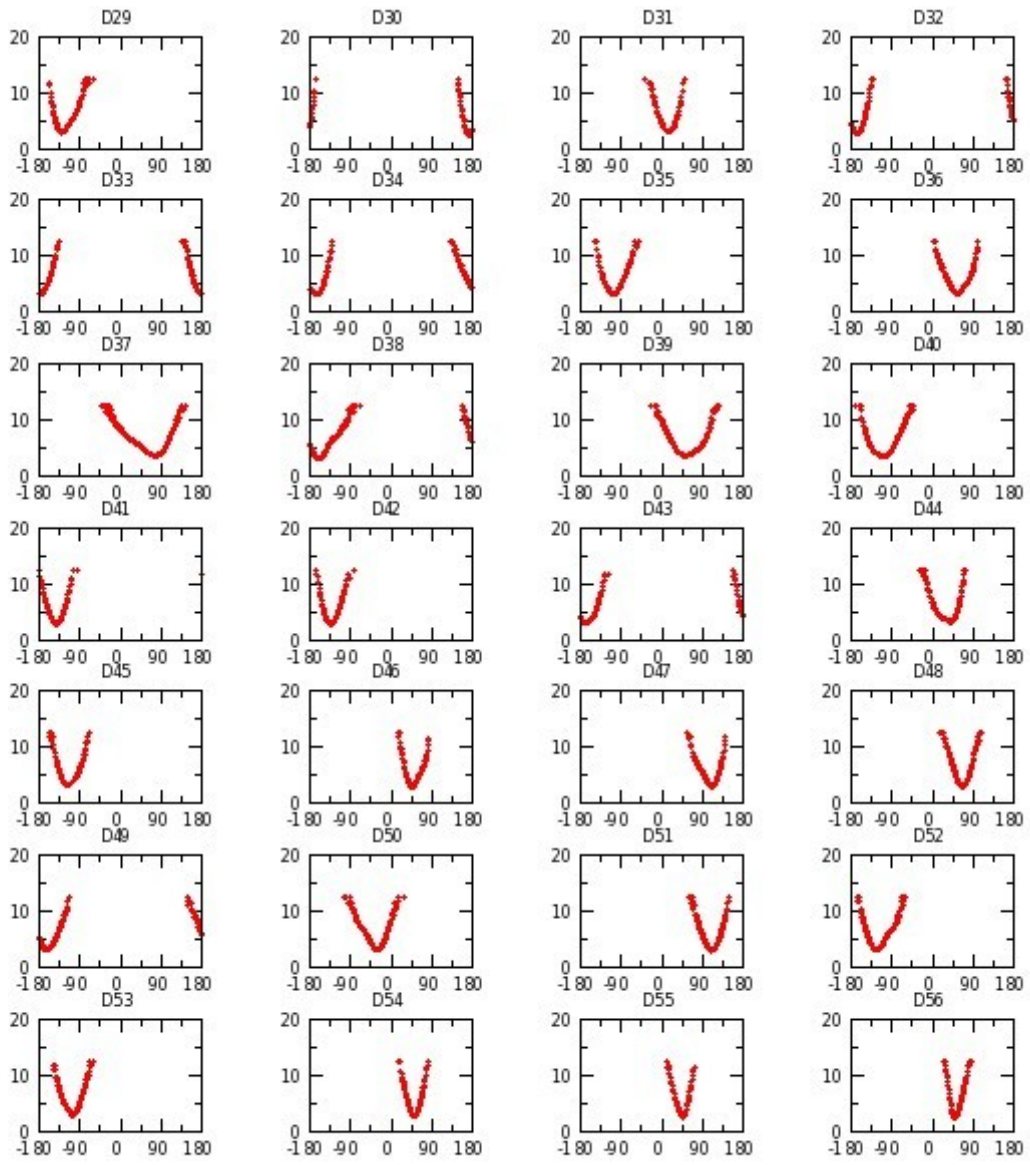


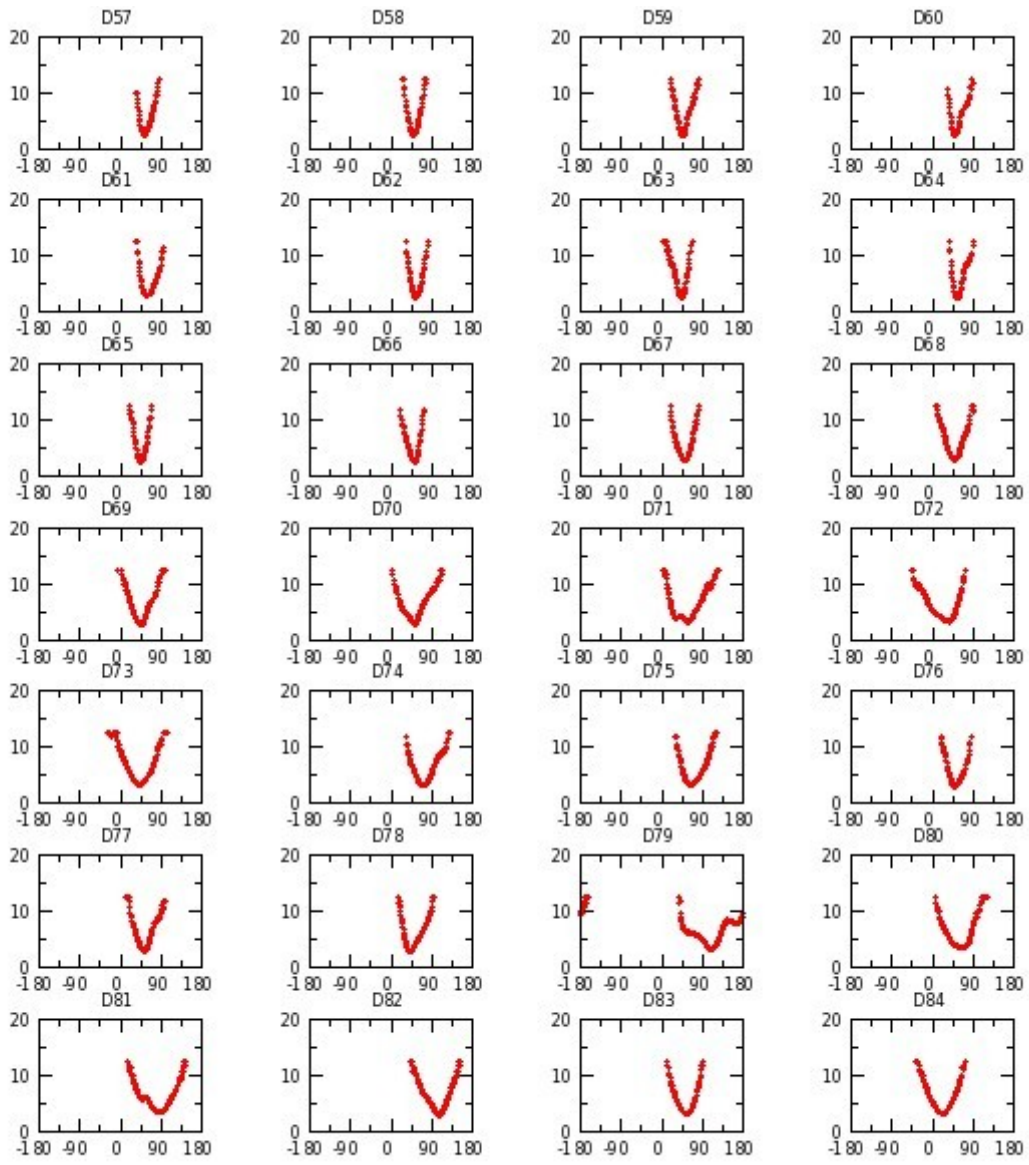


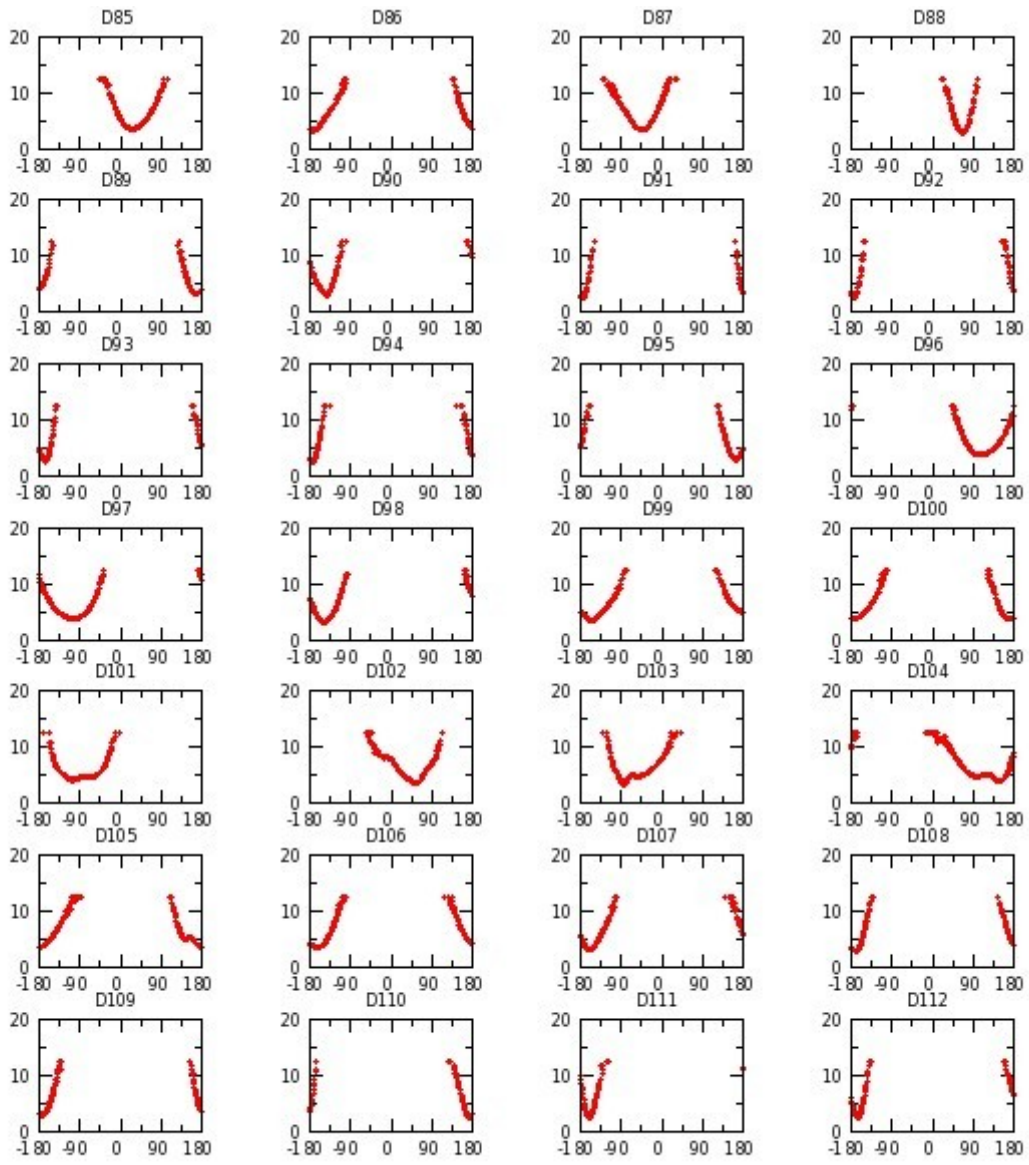


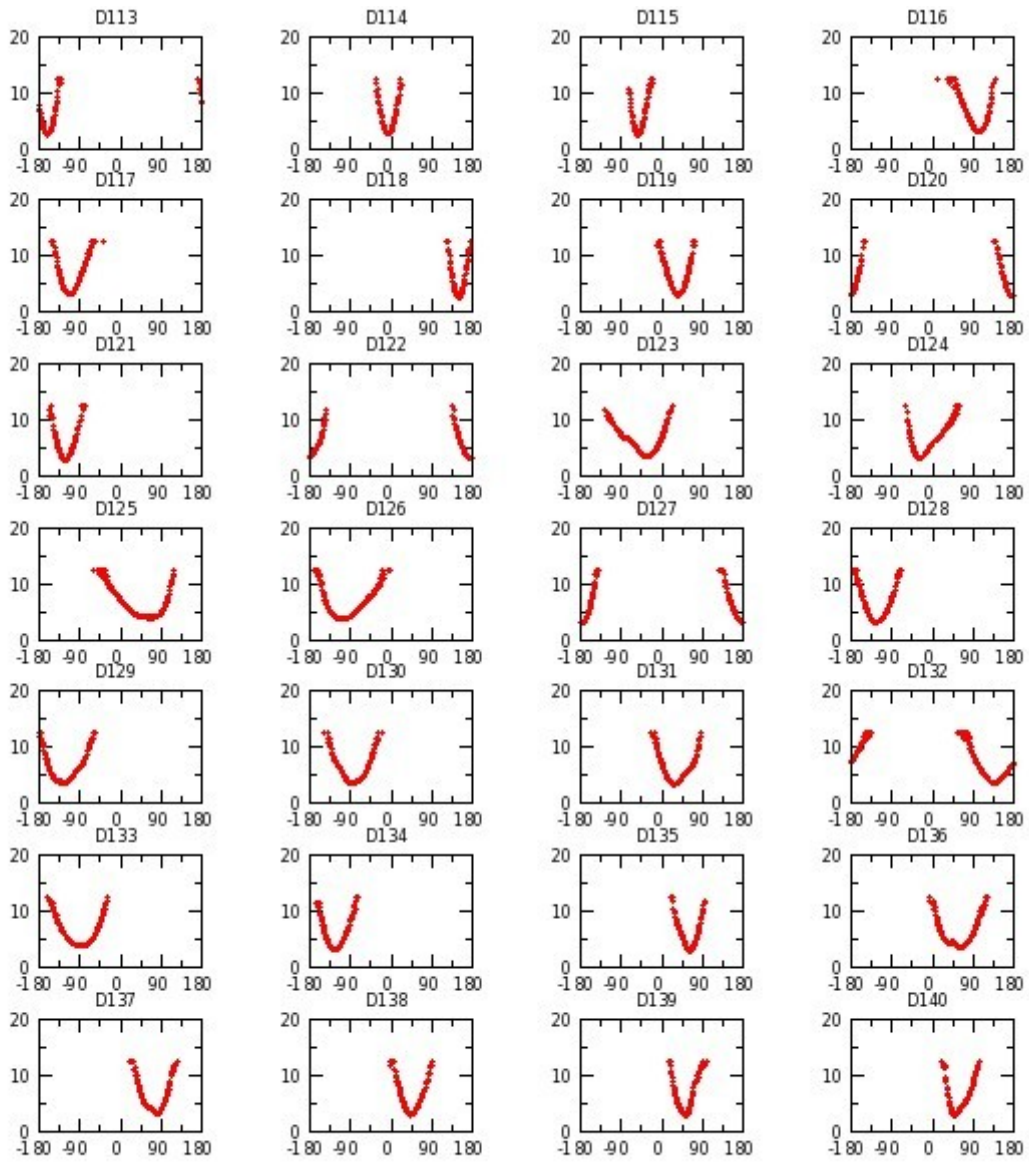
Annexe G 33 : M_aGAL réplique III

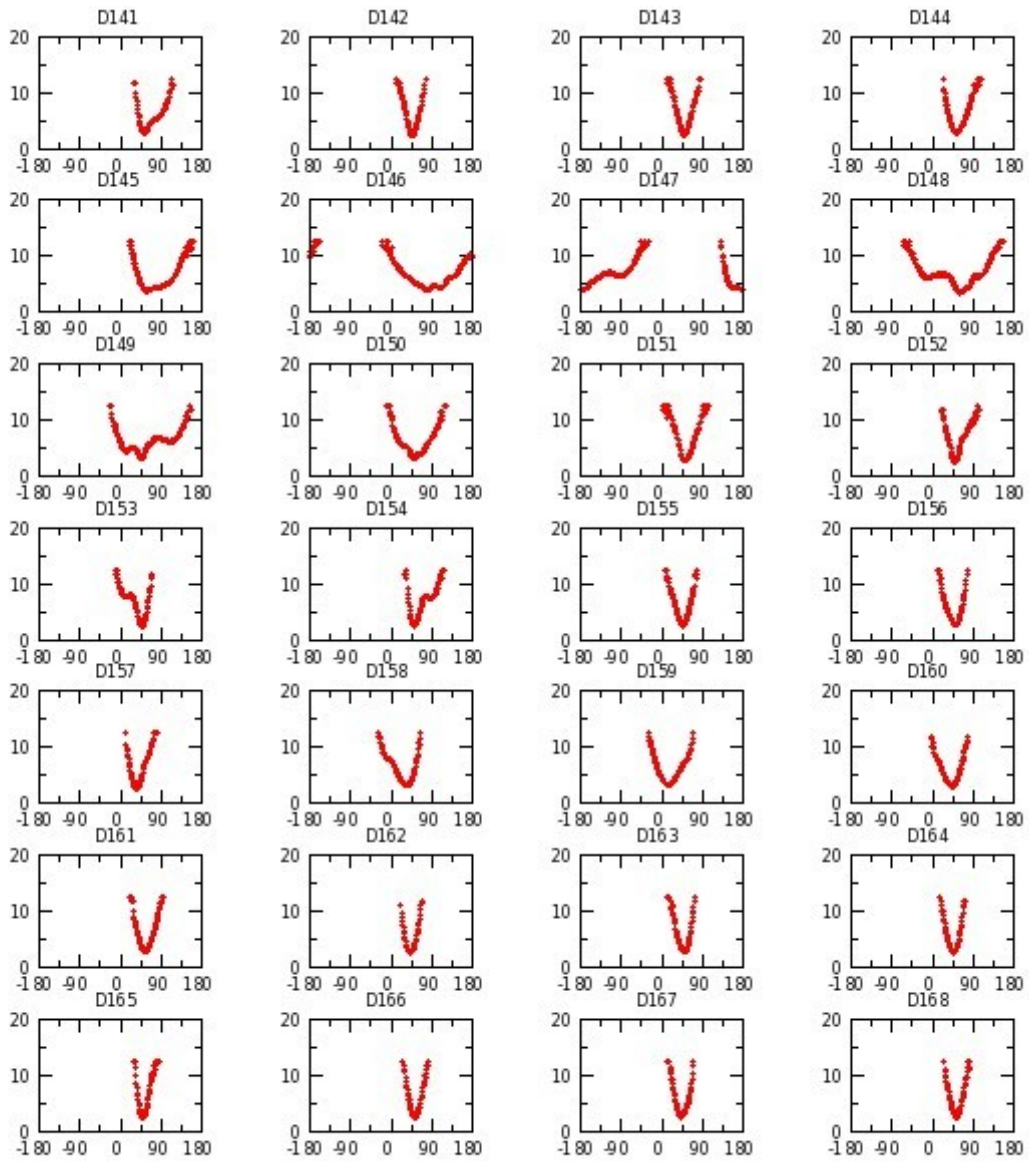


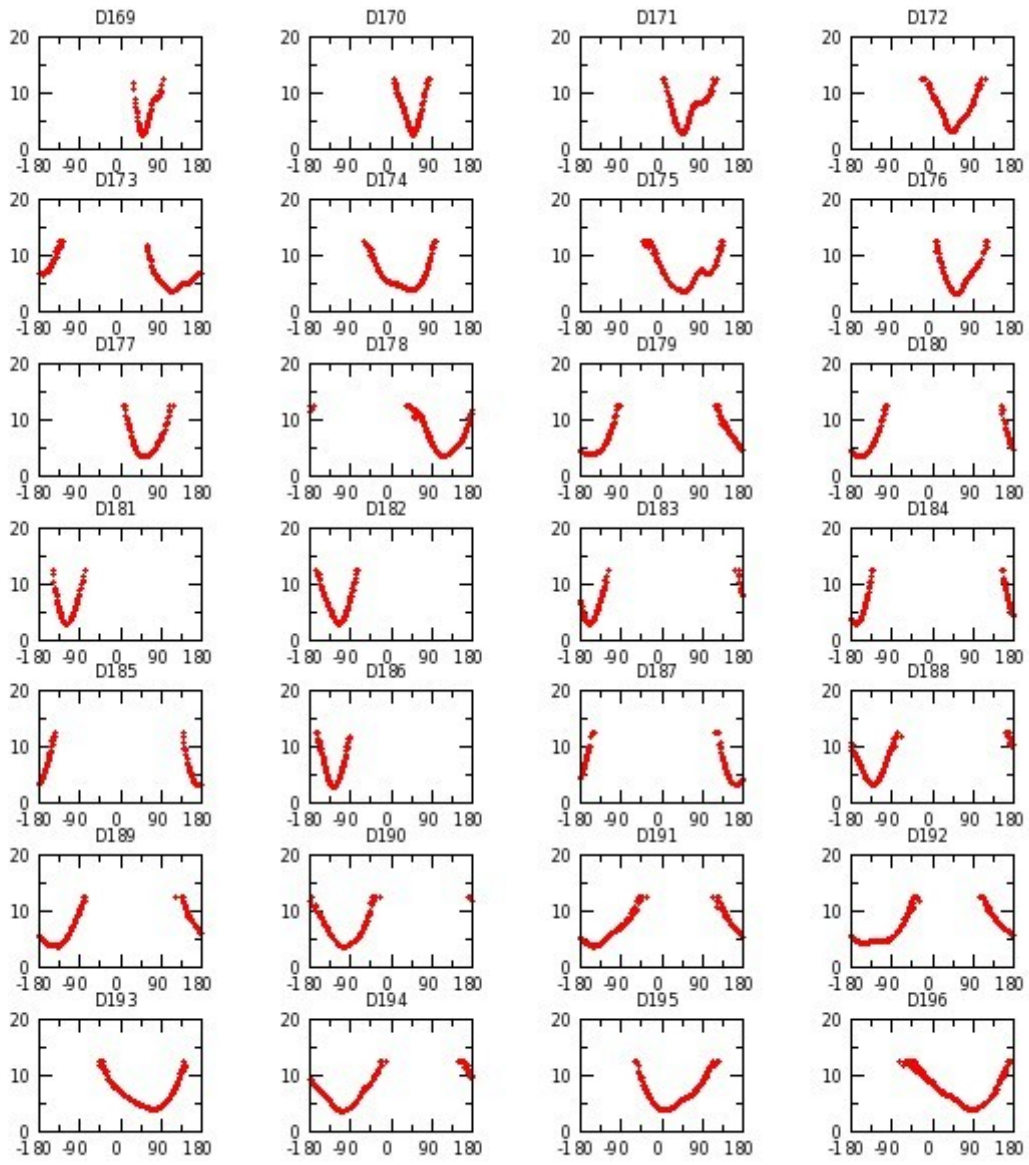


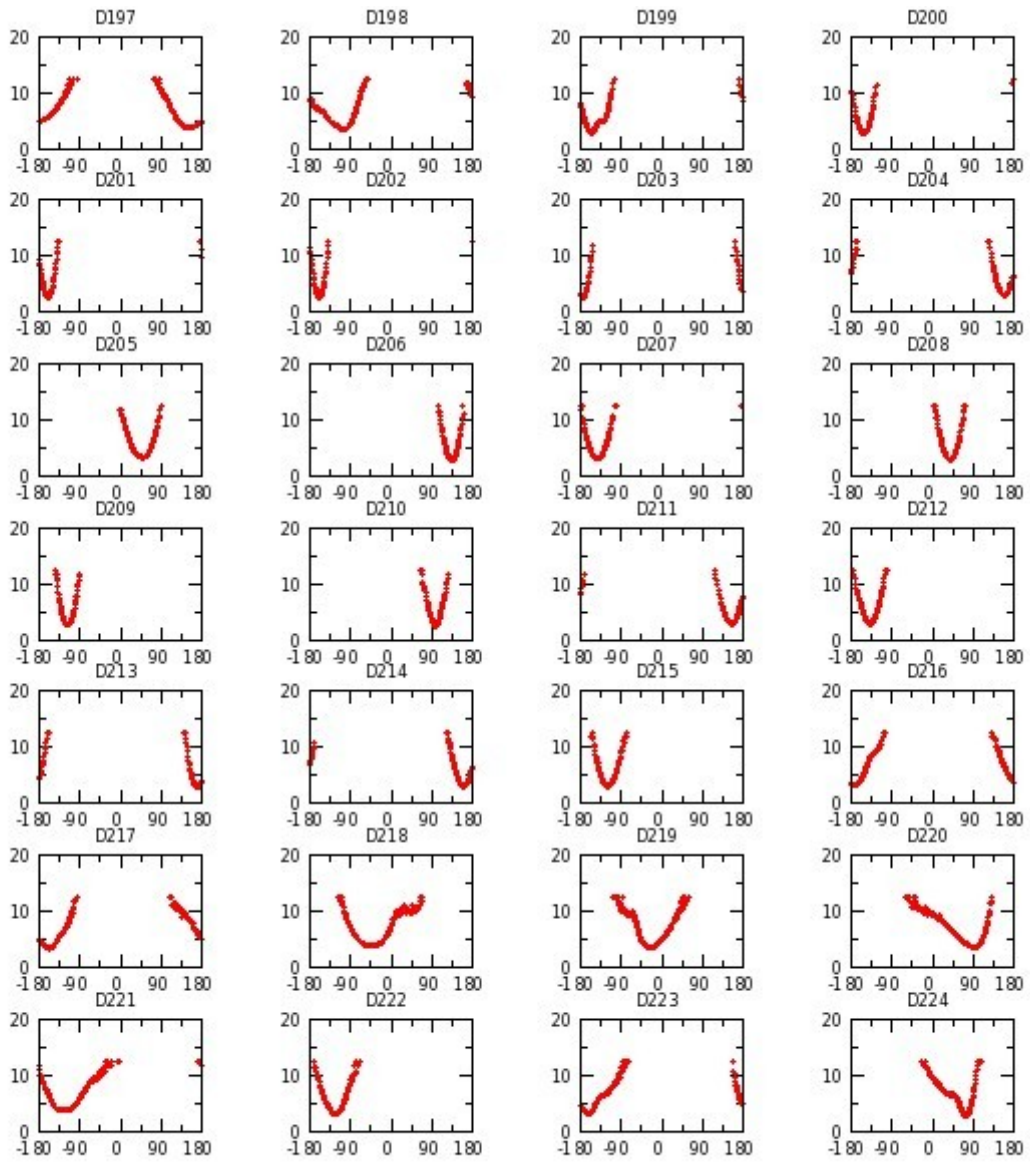


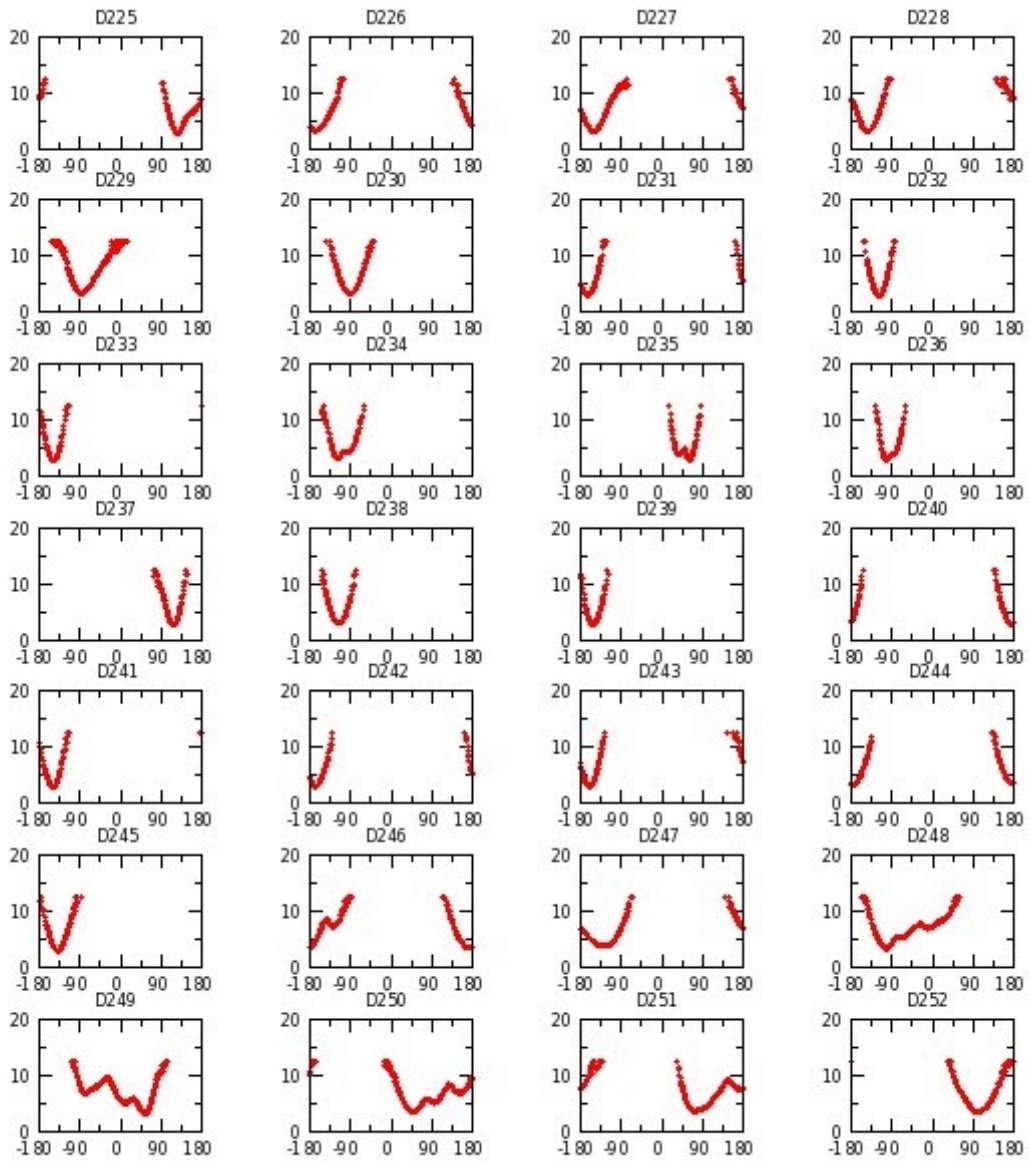


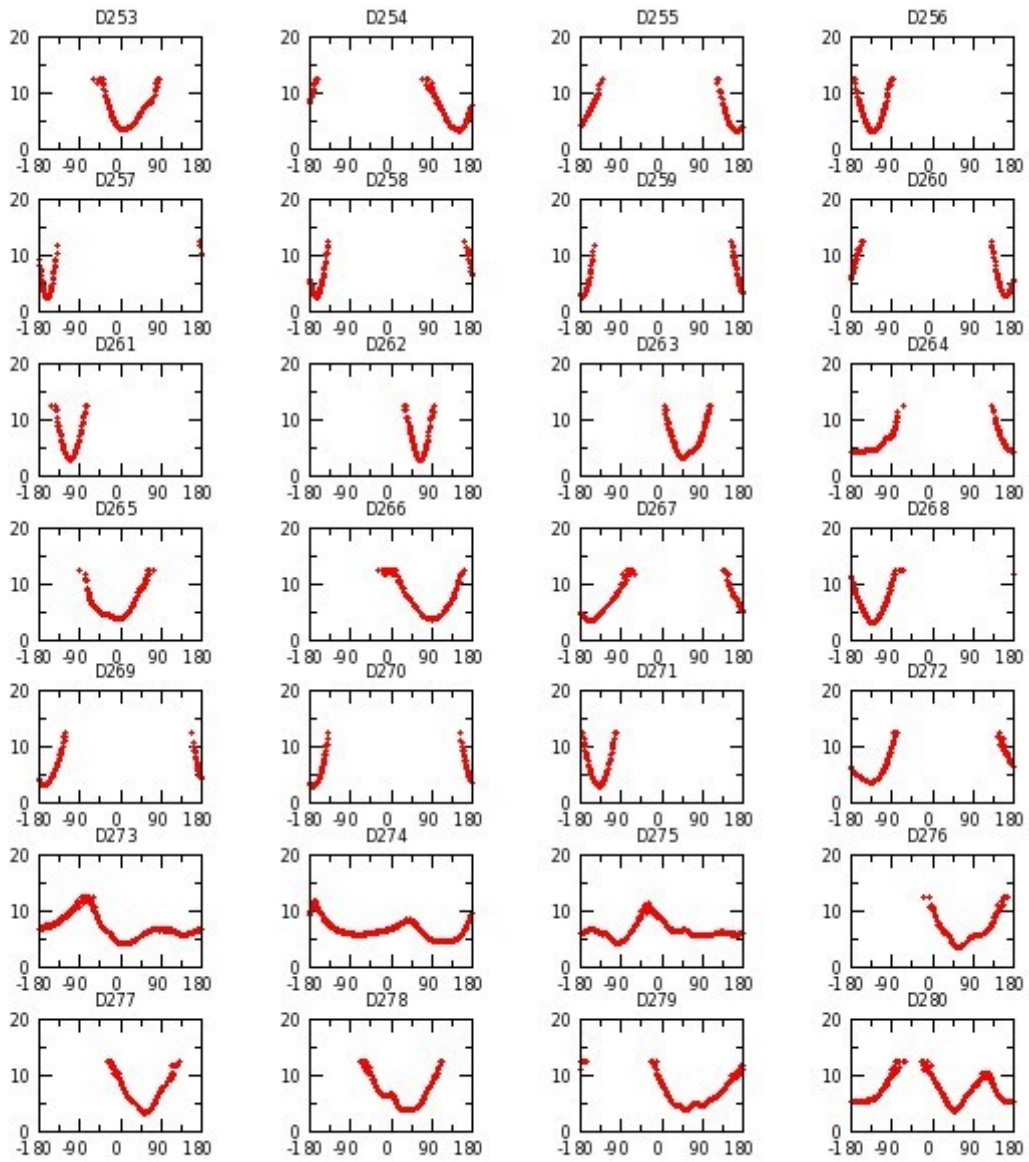


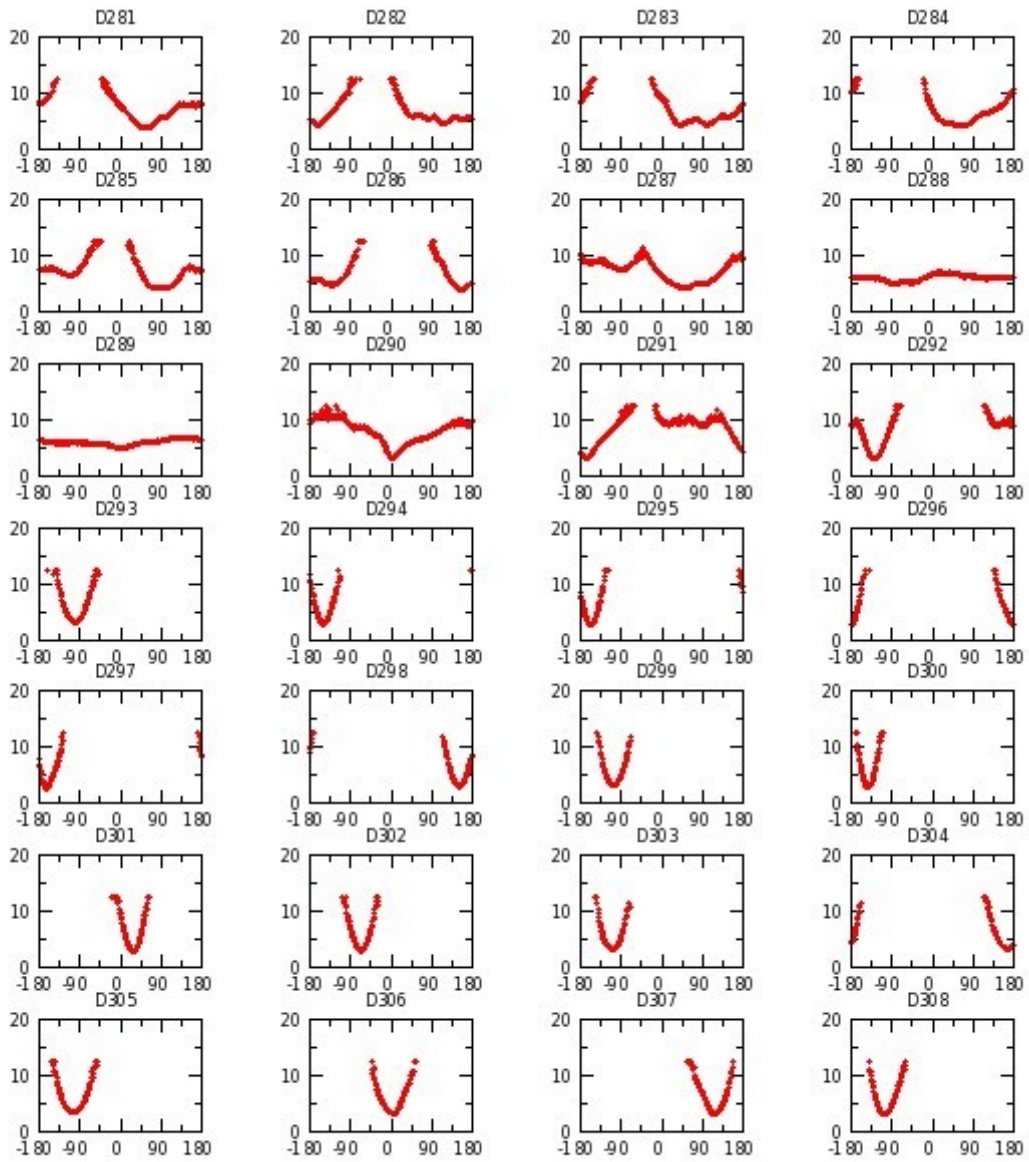


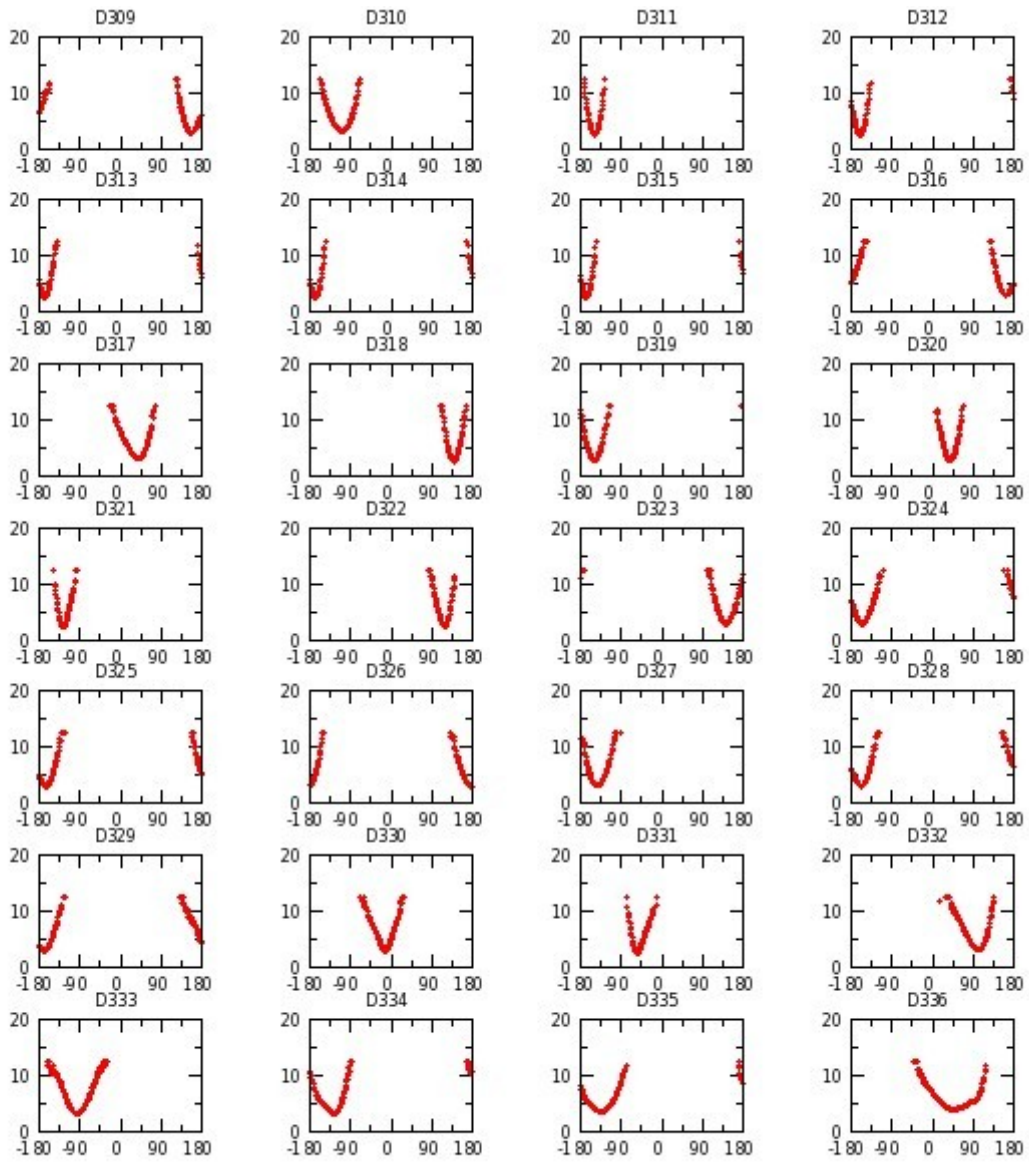


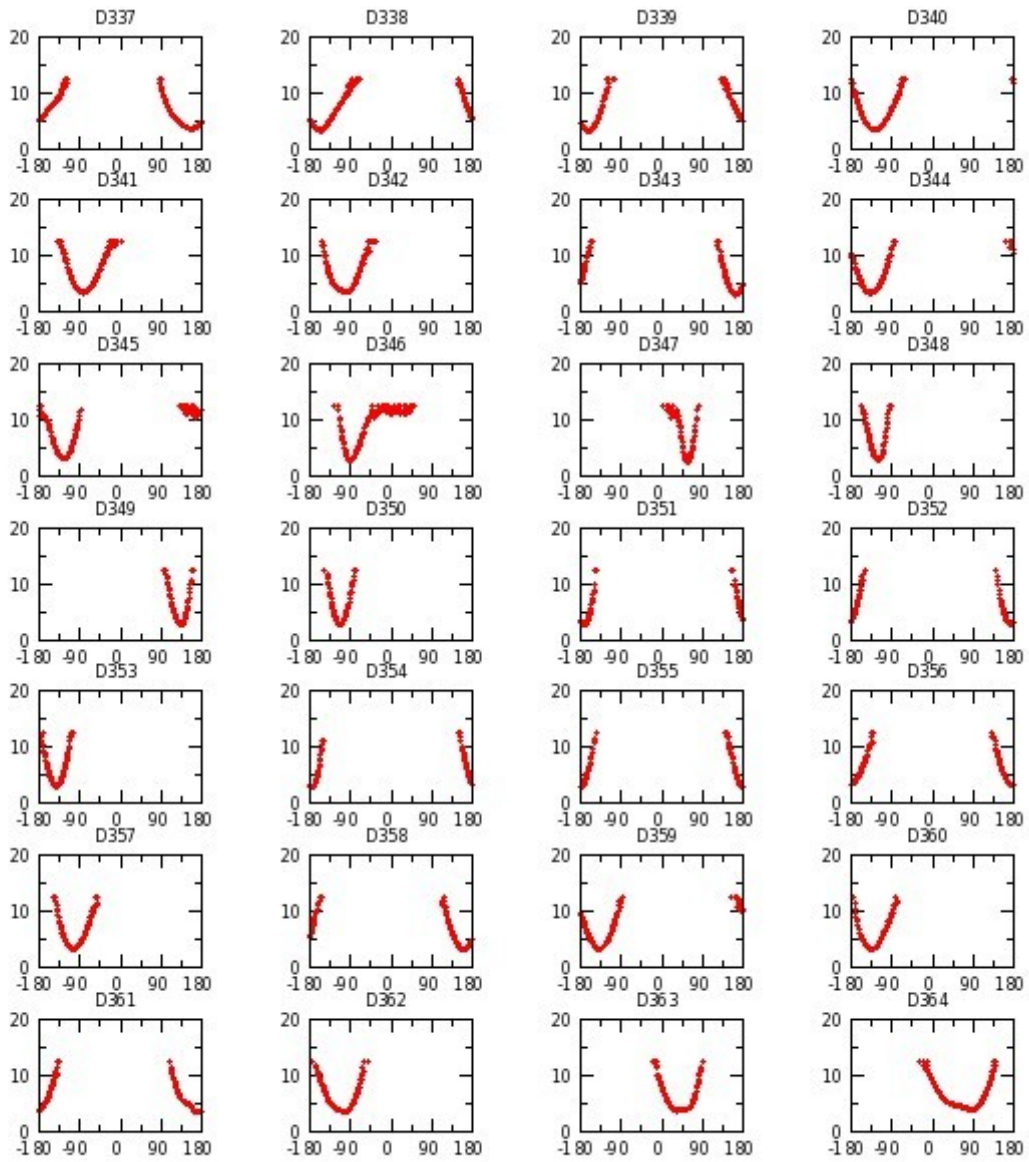


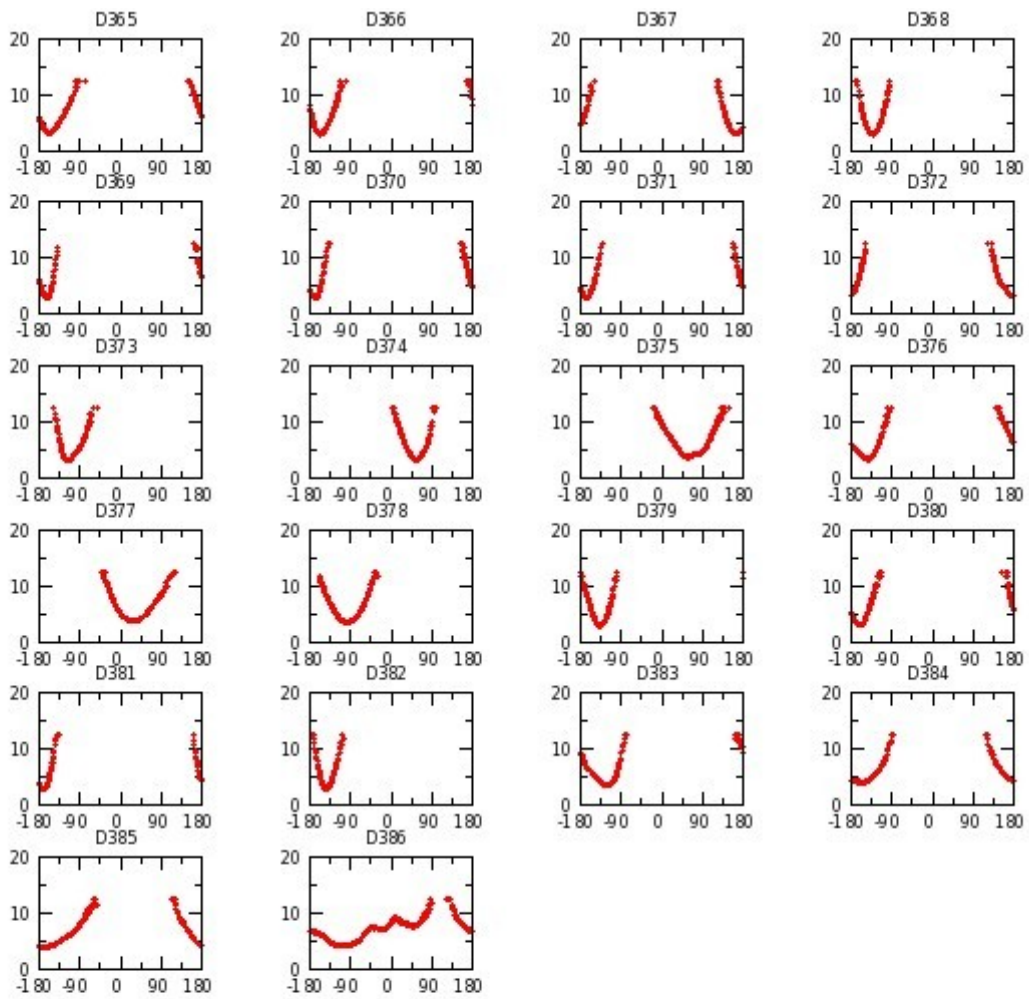




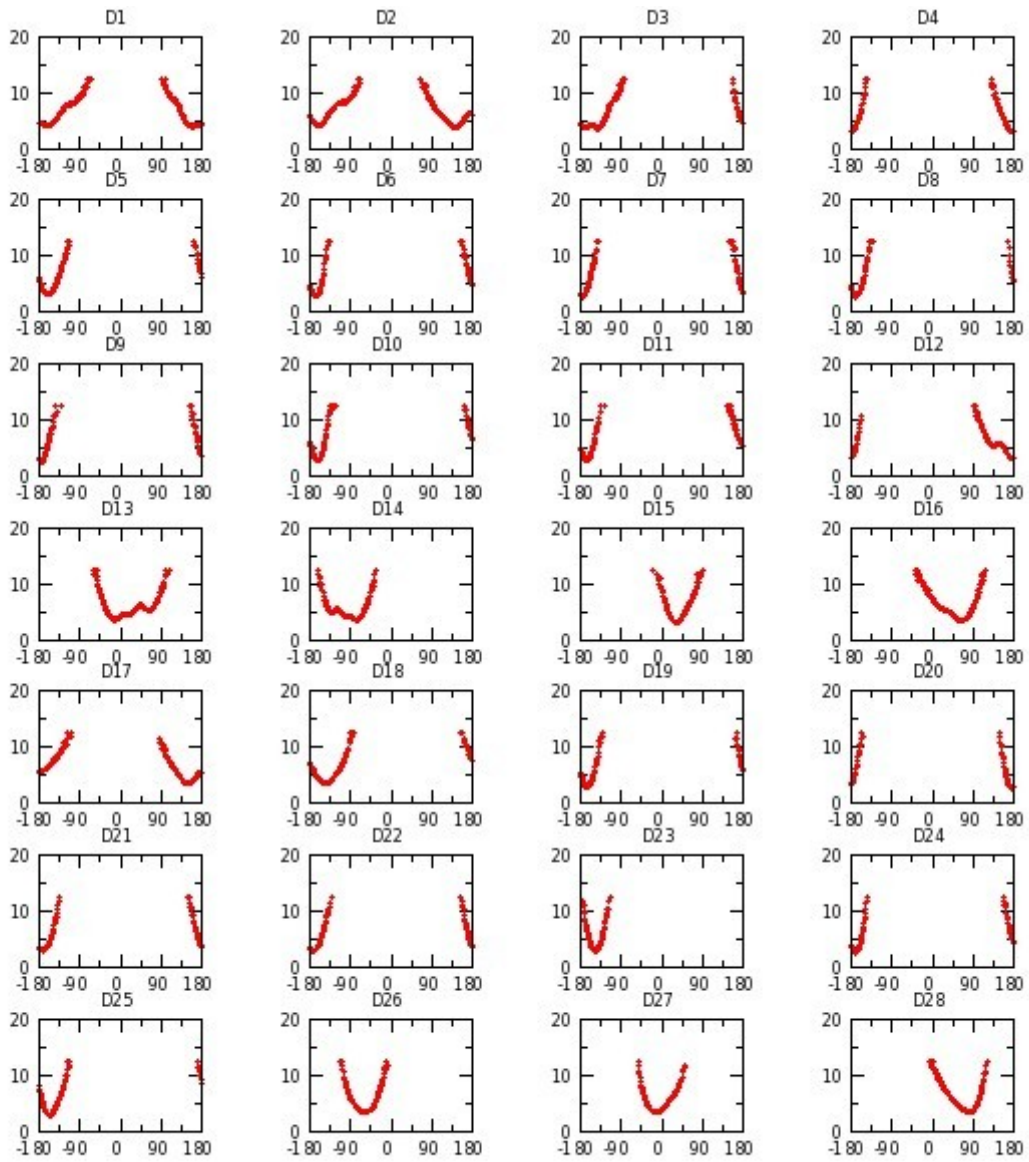


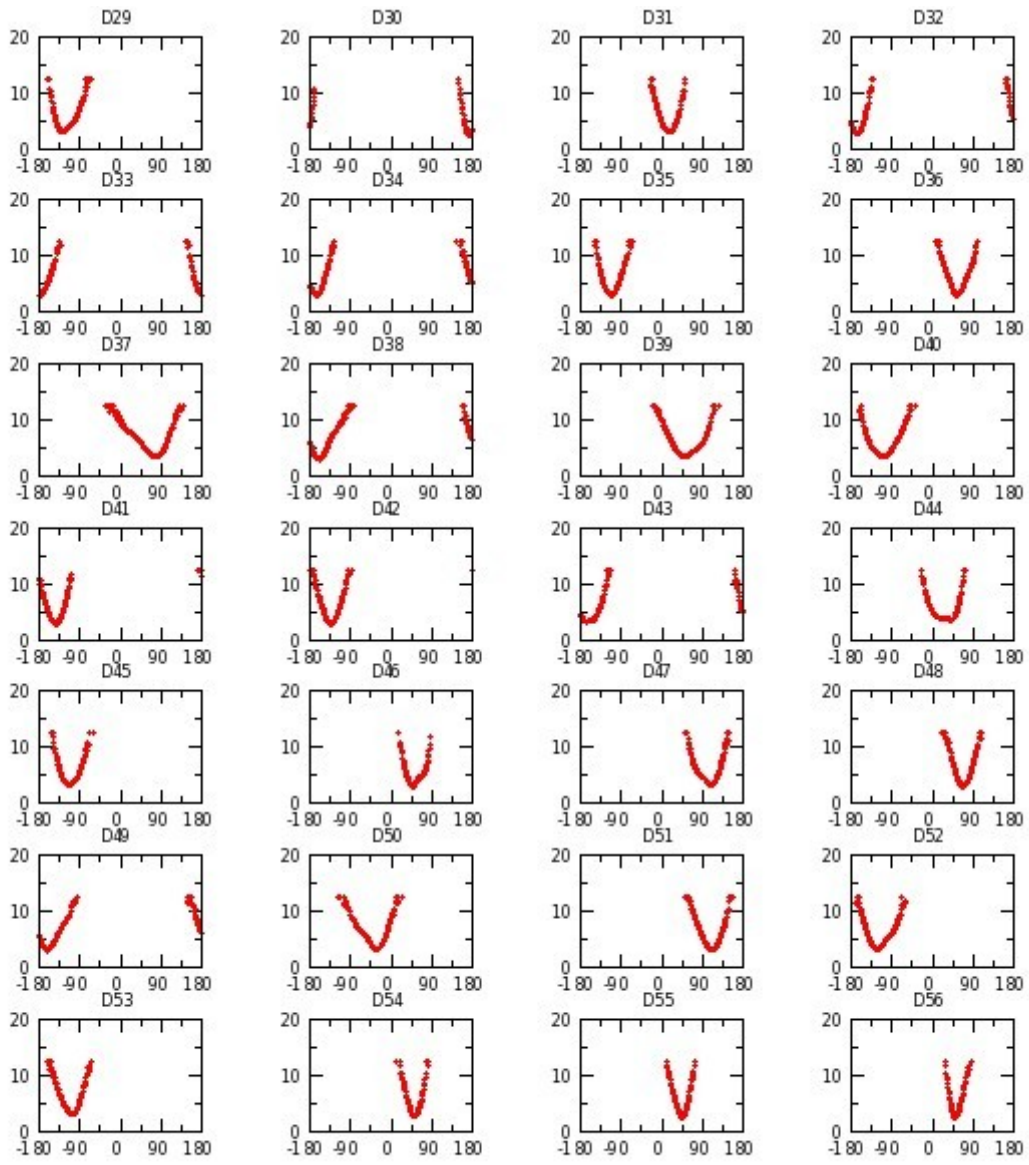


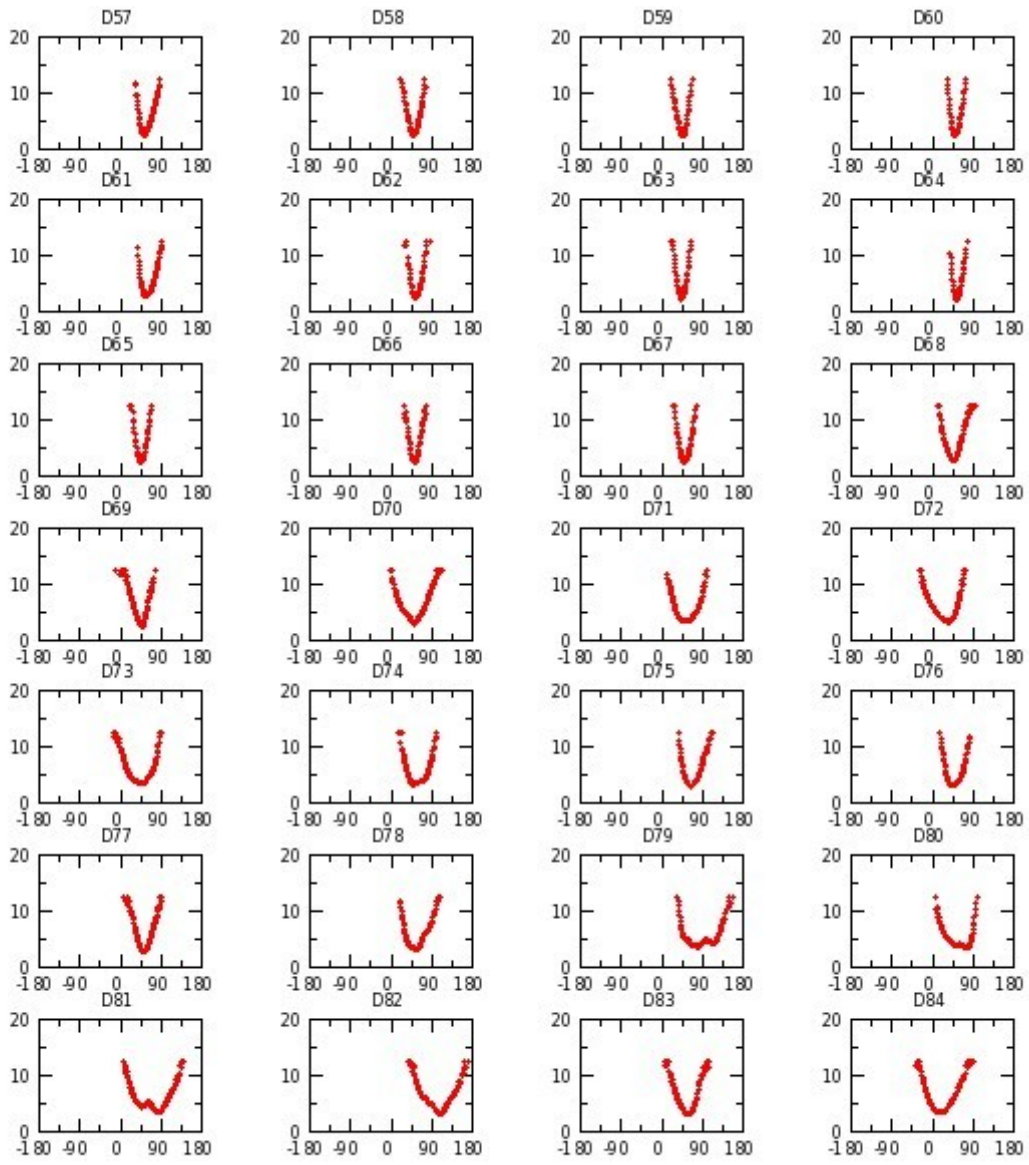


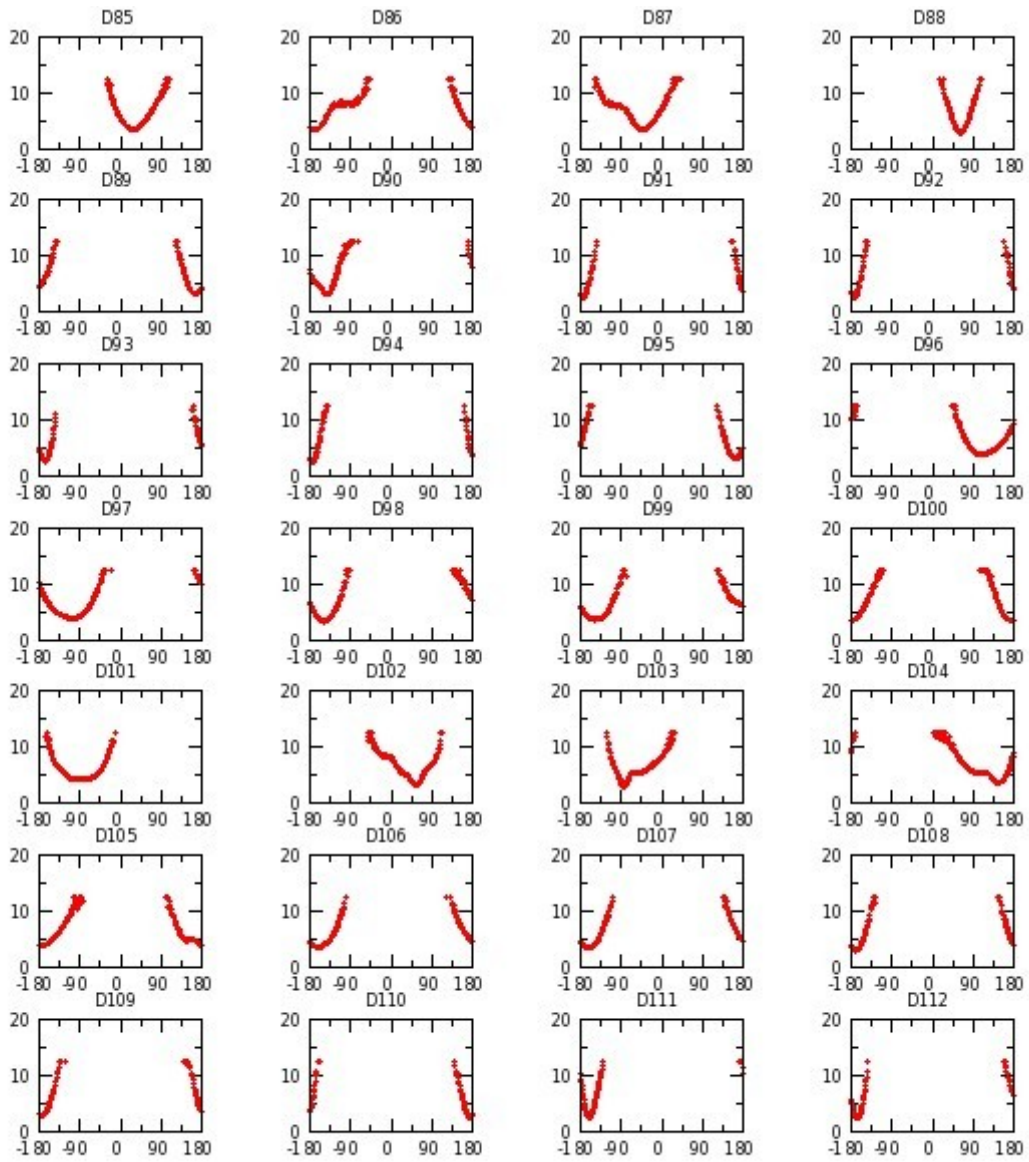


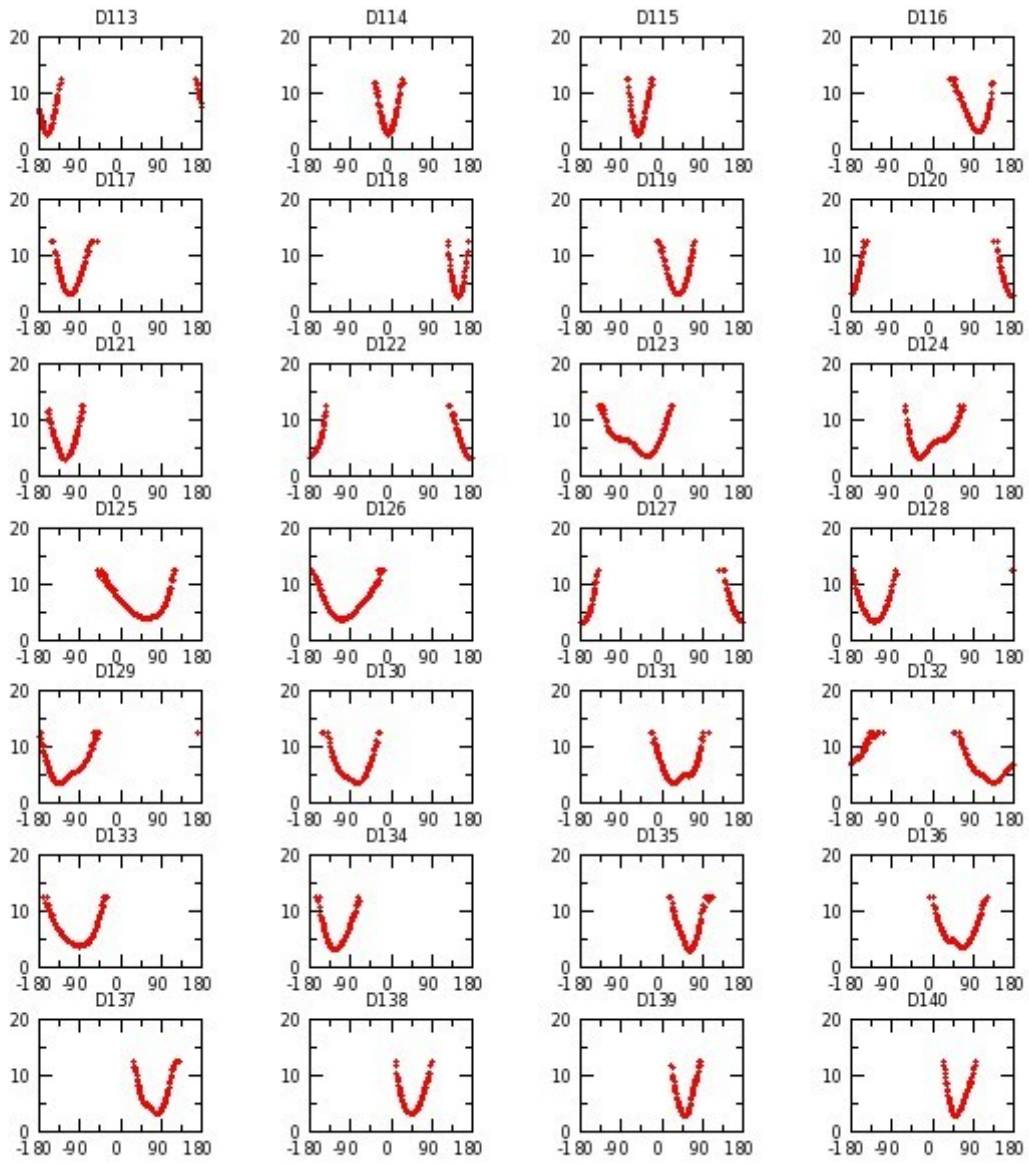
Annexe G 34 : M_AZOL réplique I

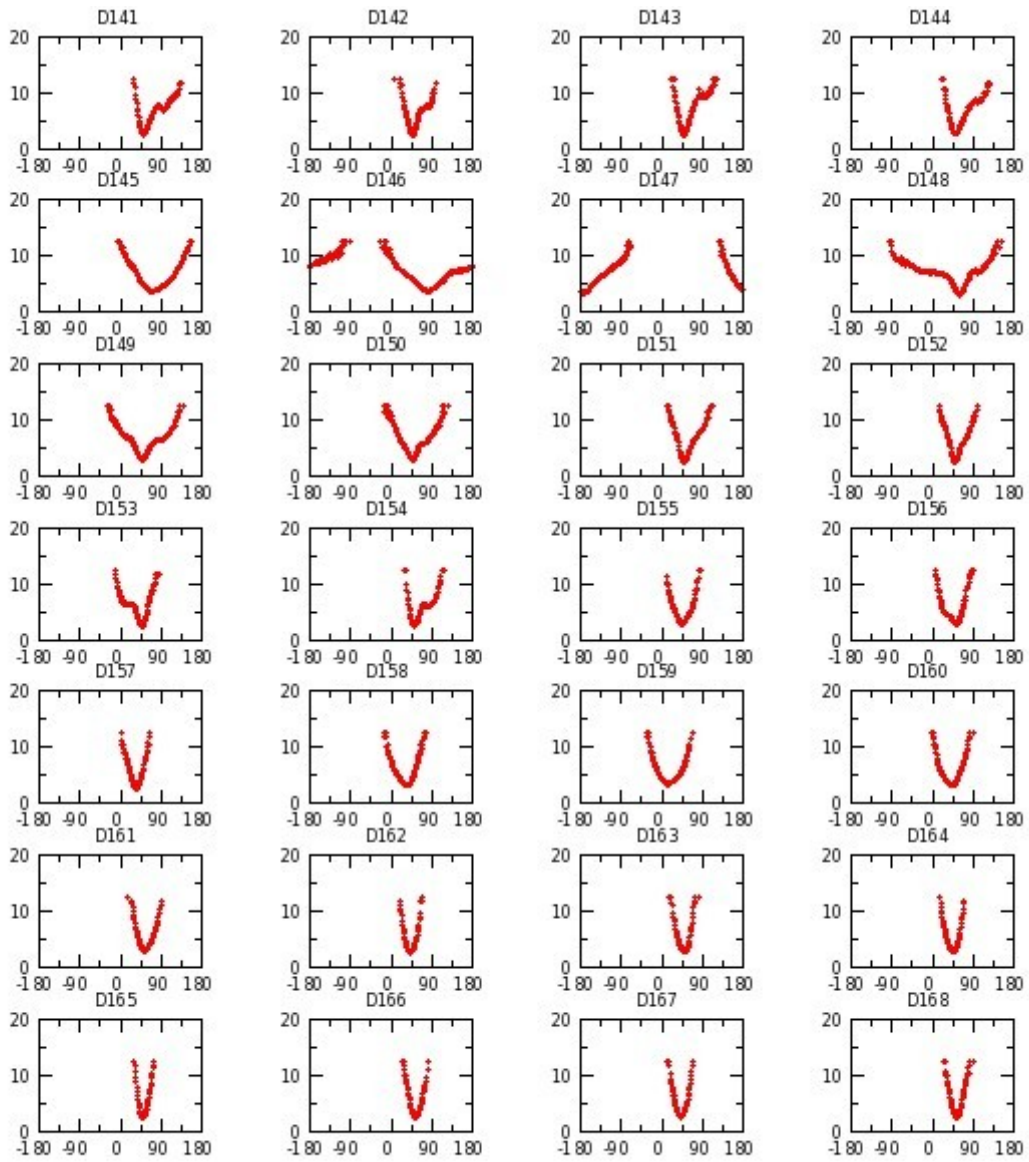


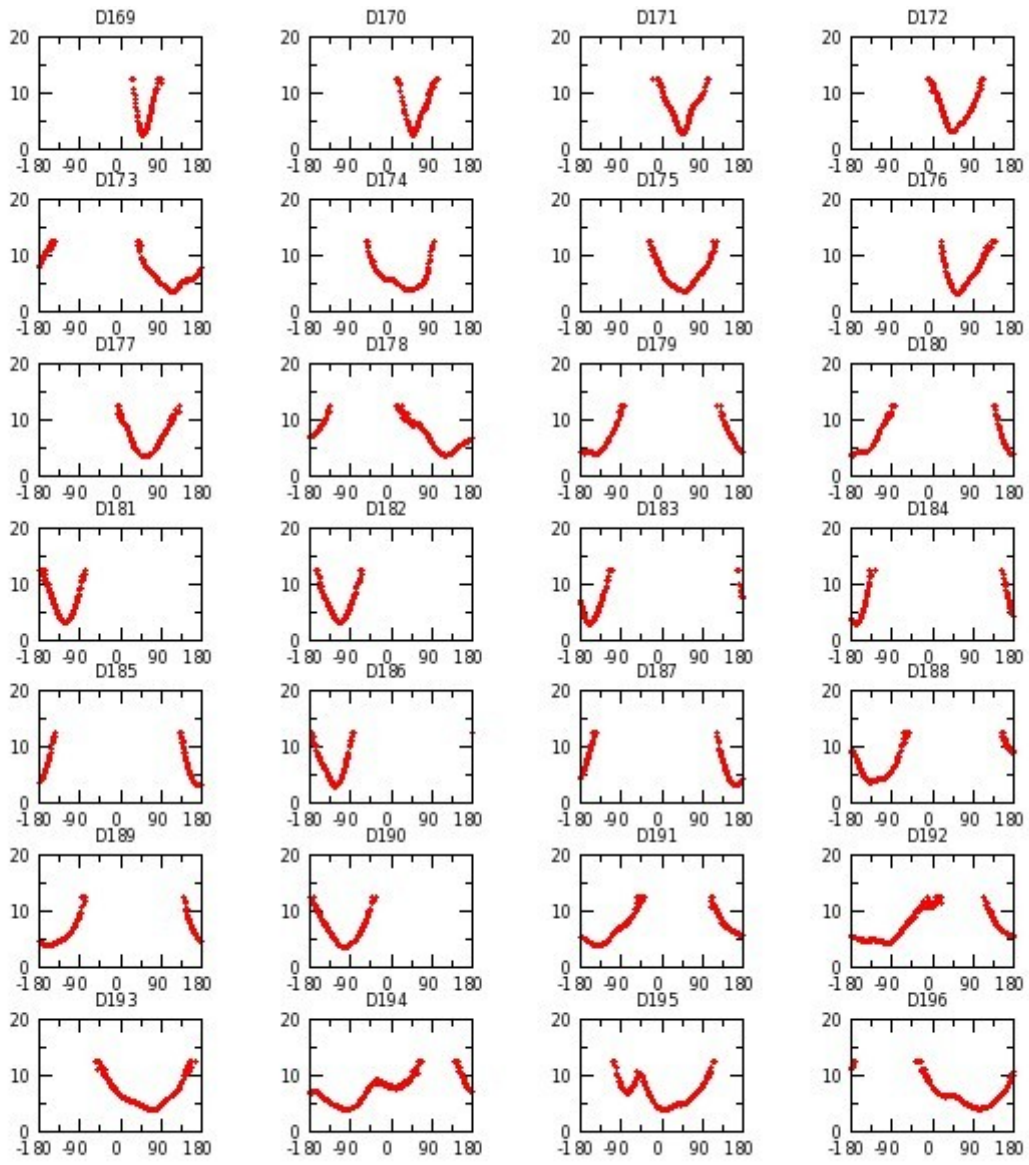


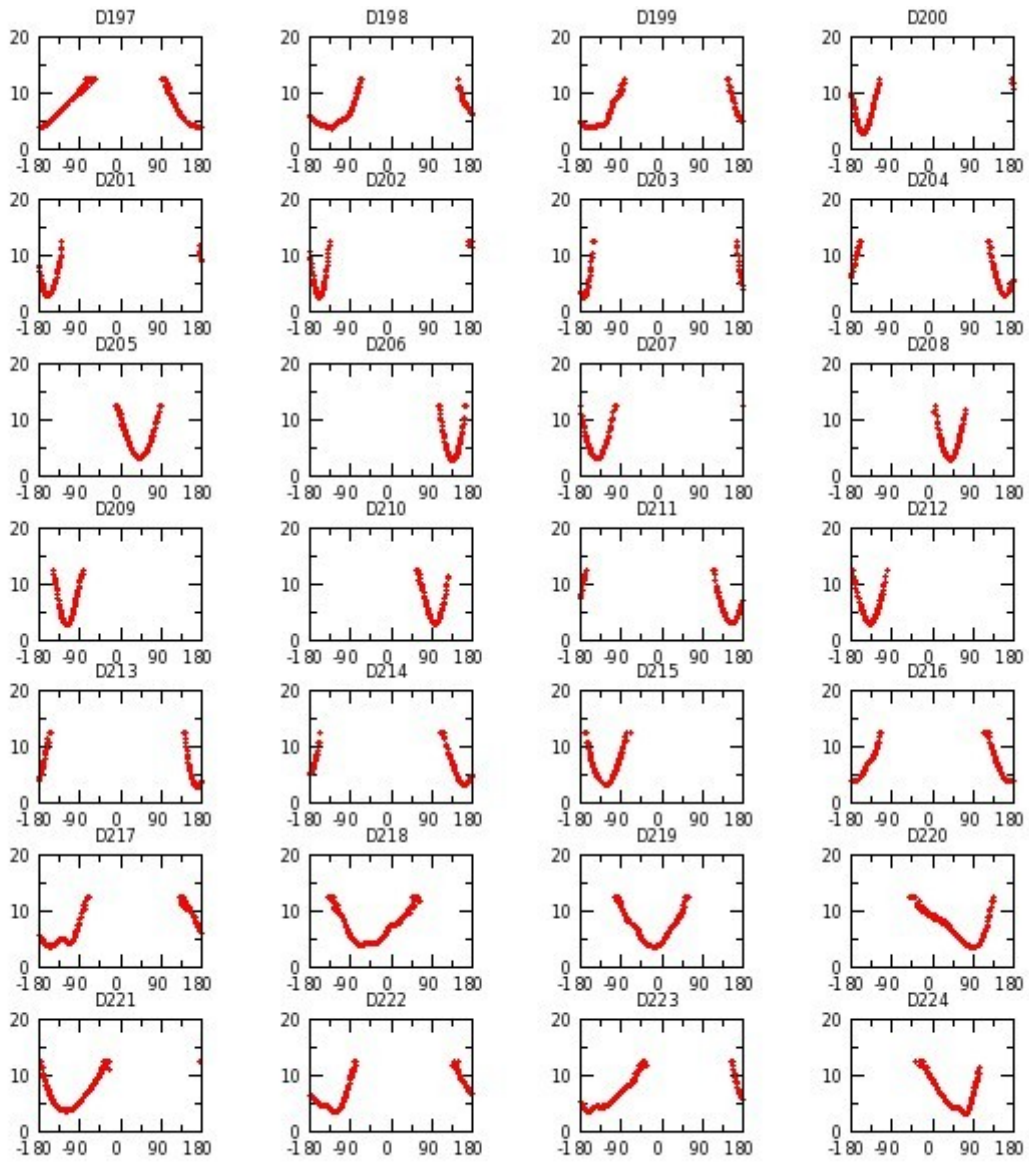


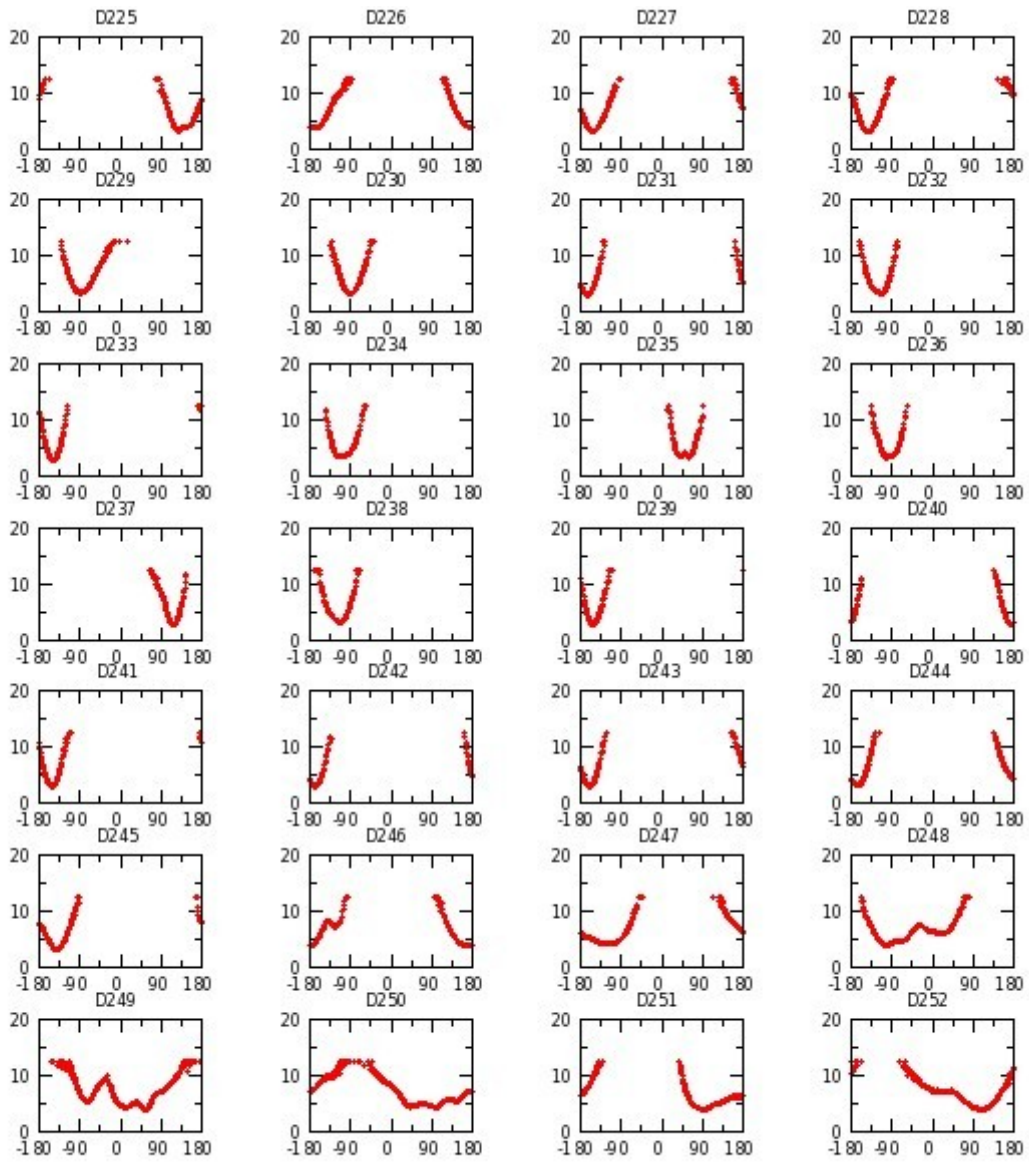


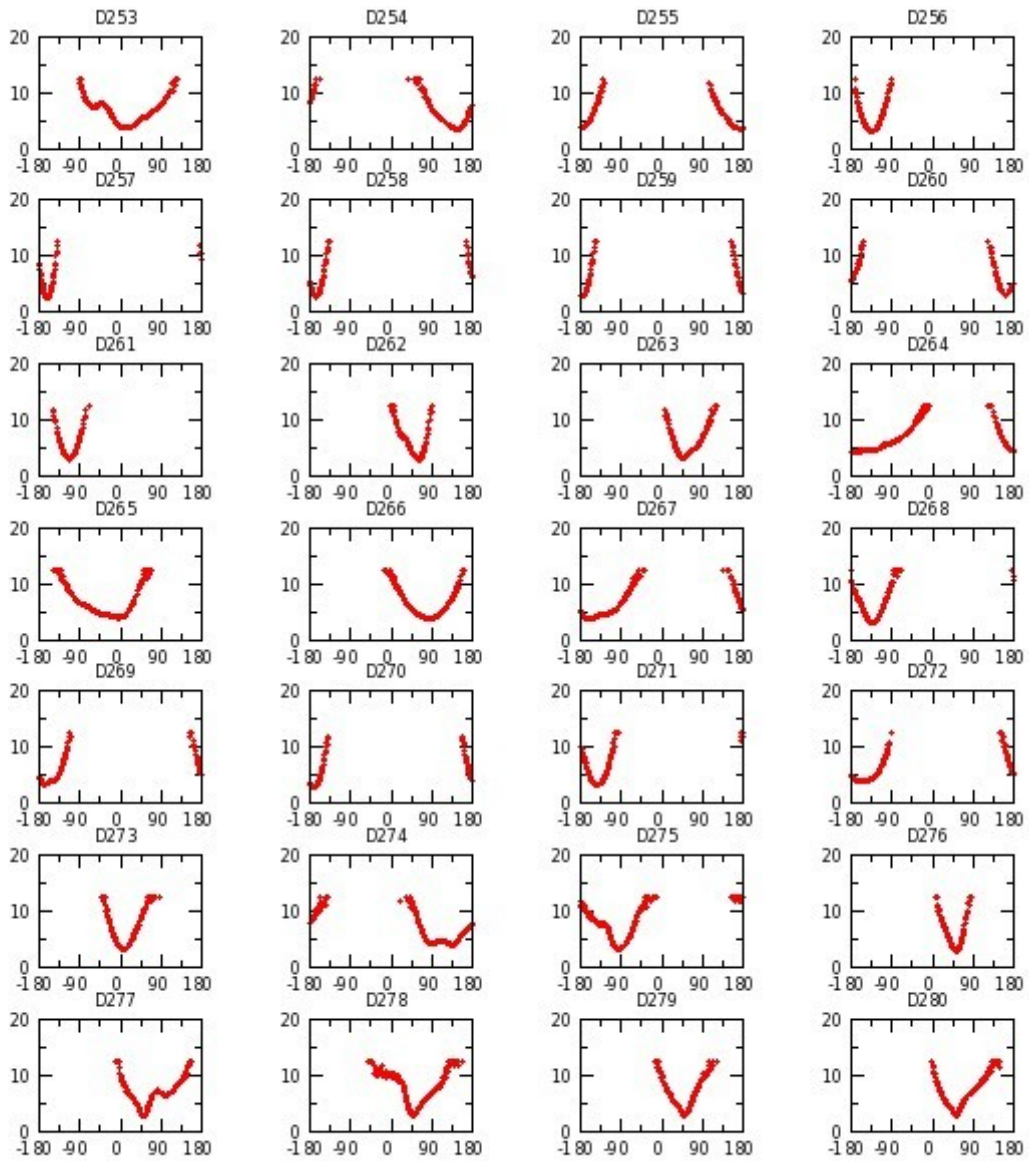


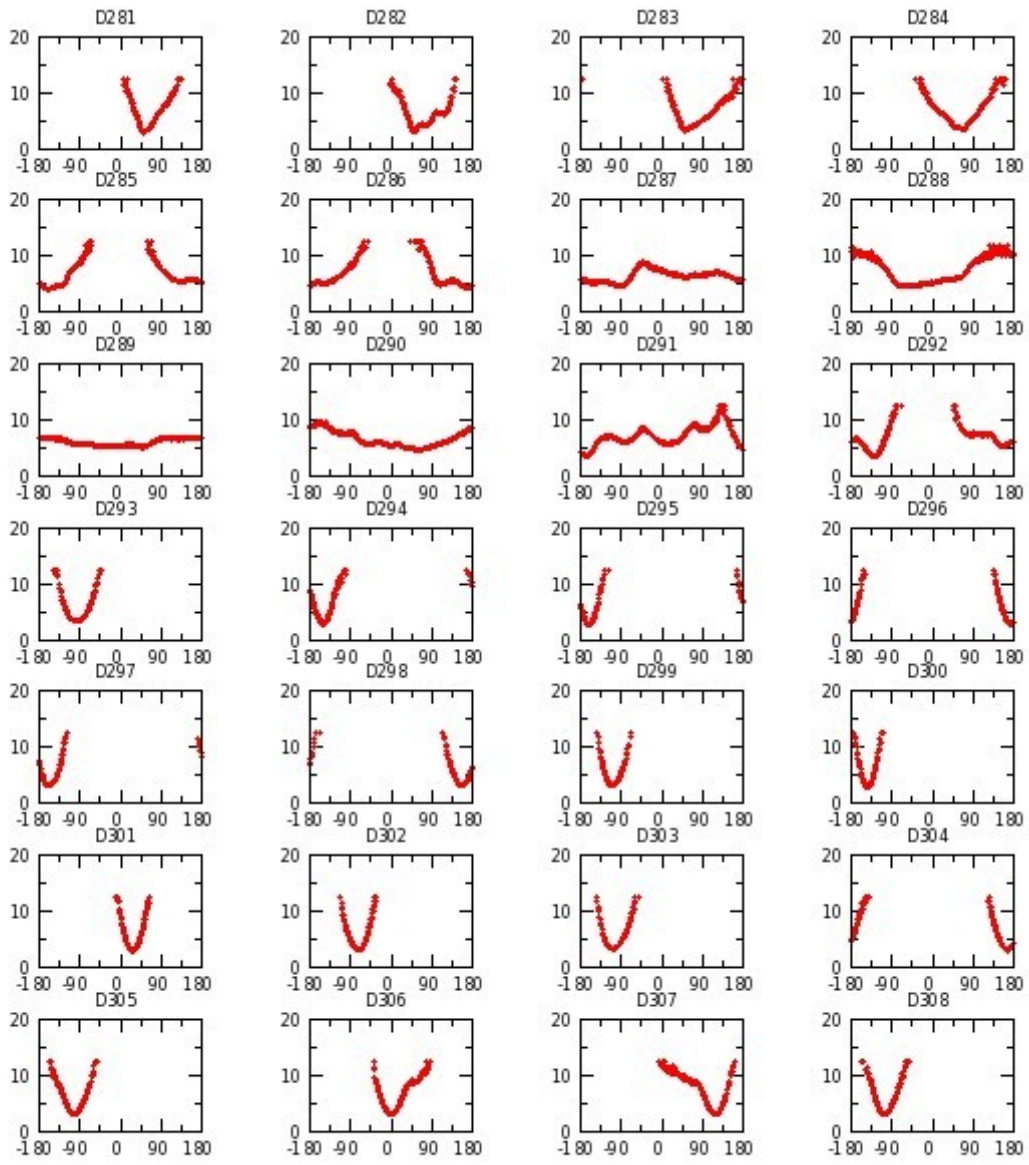


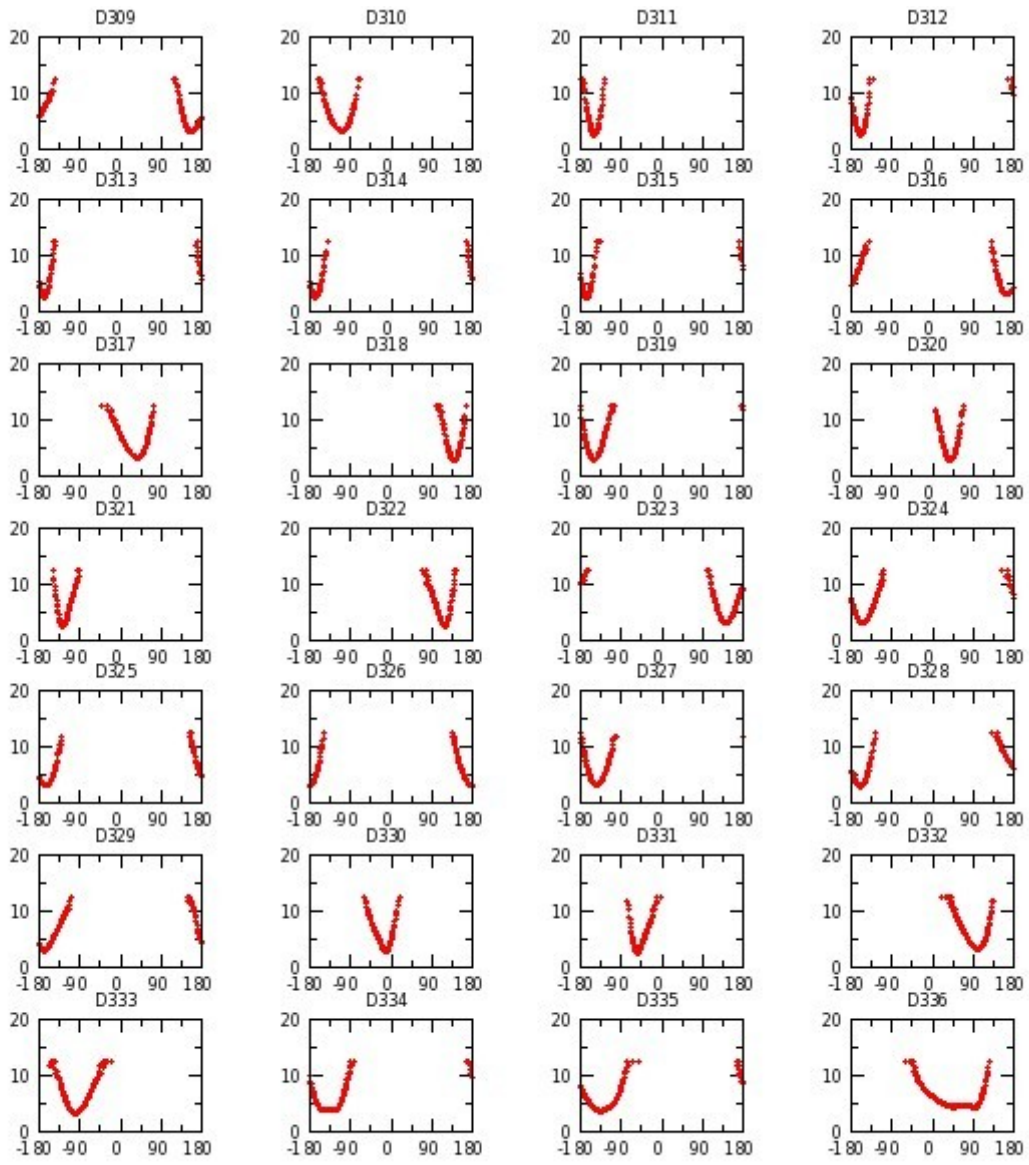


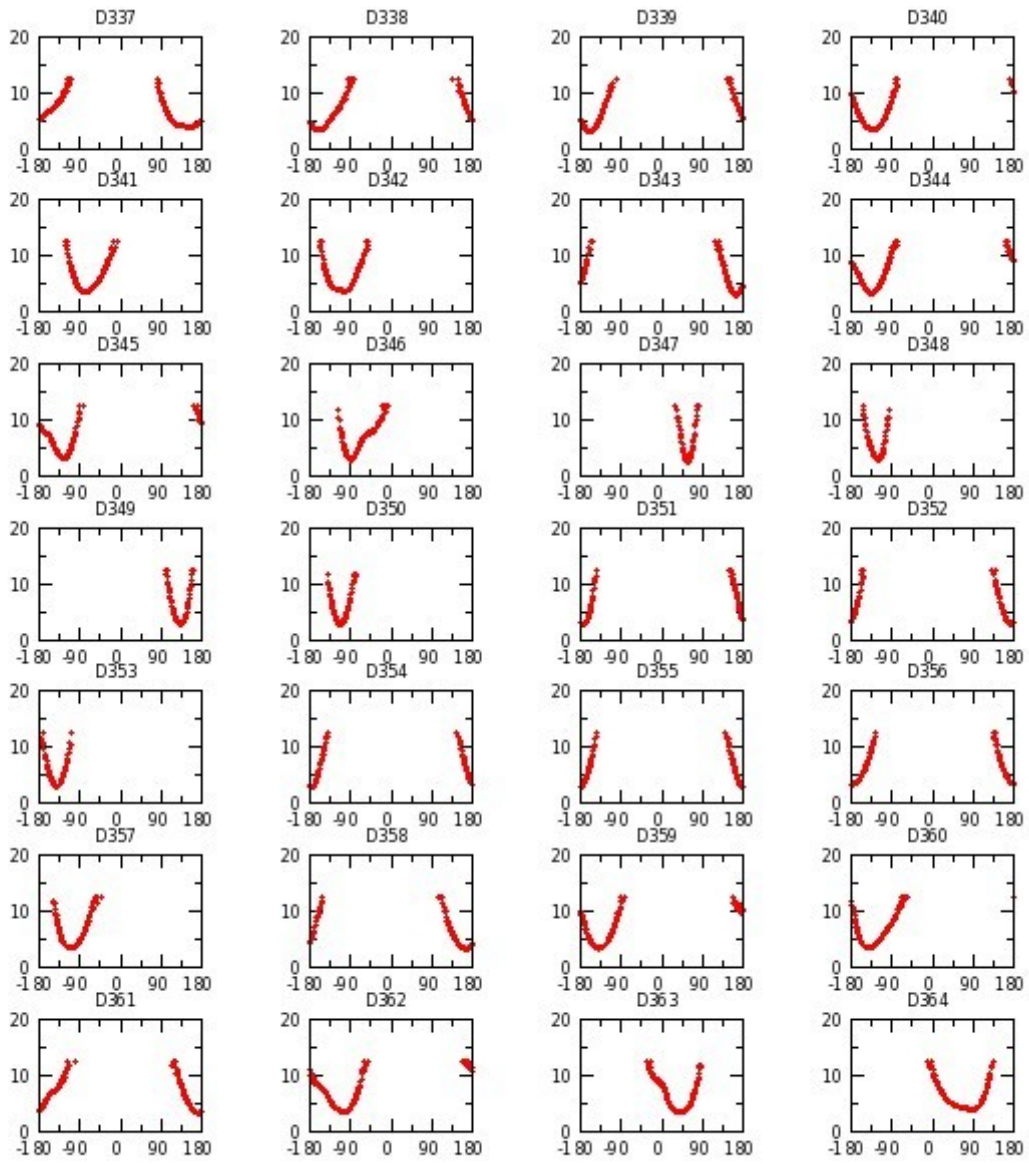


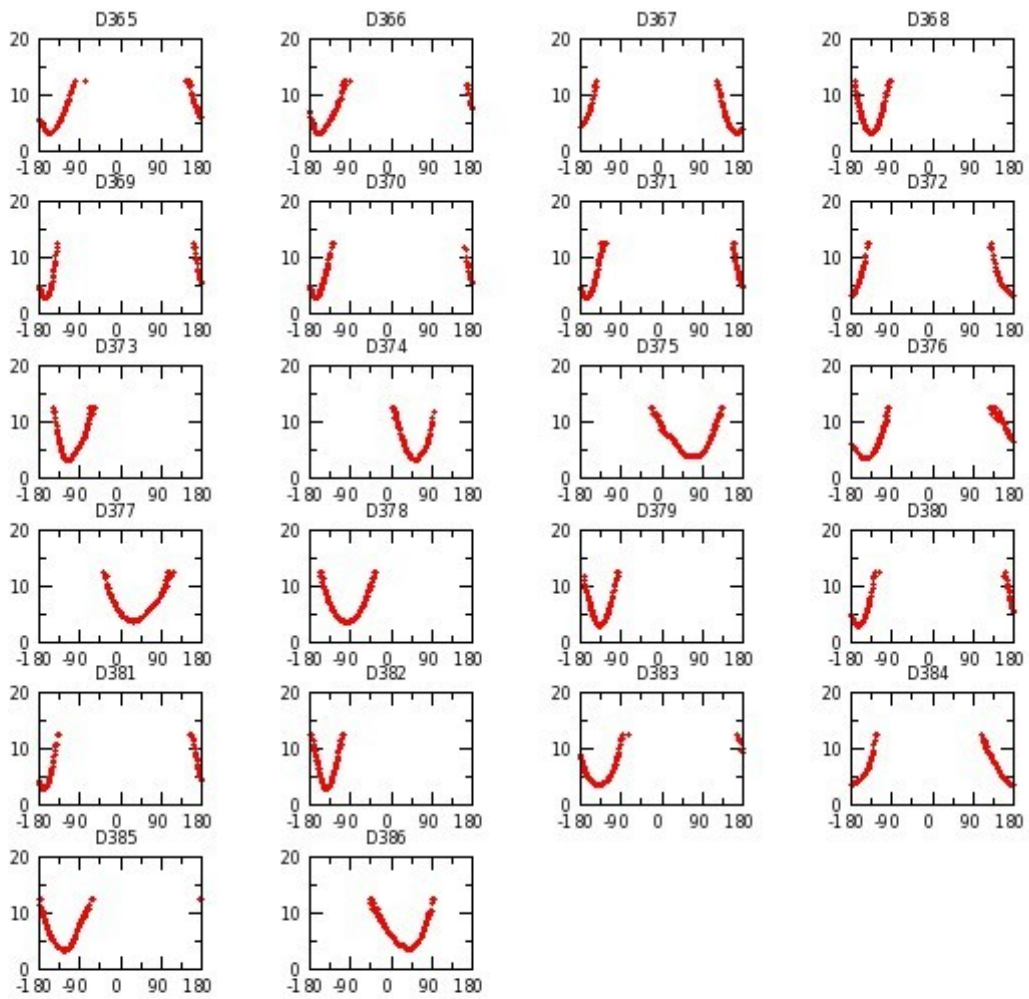




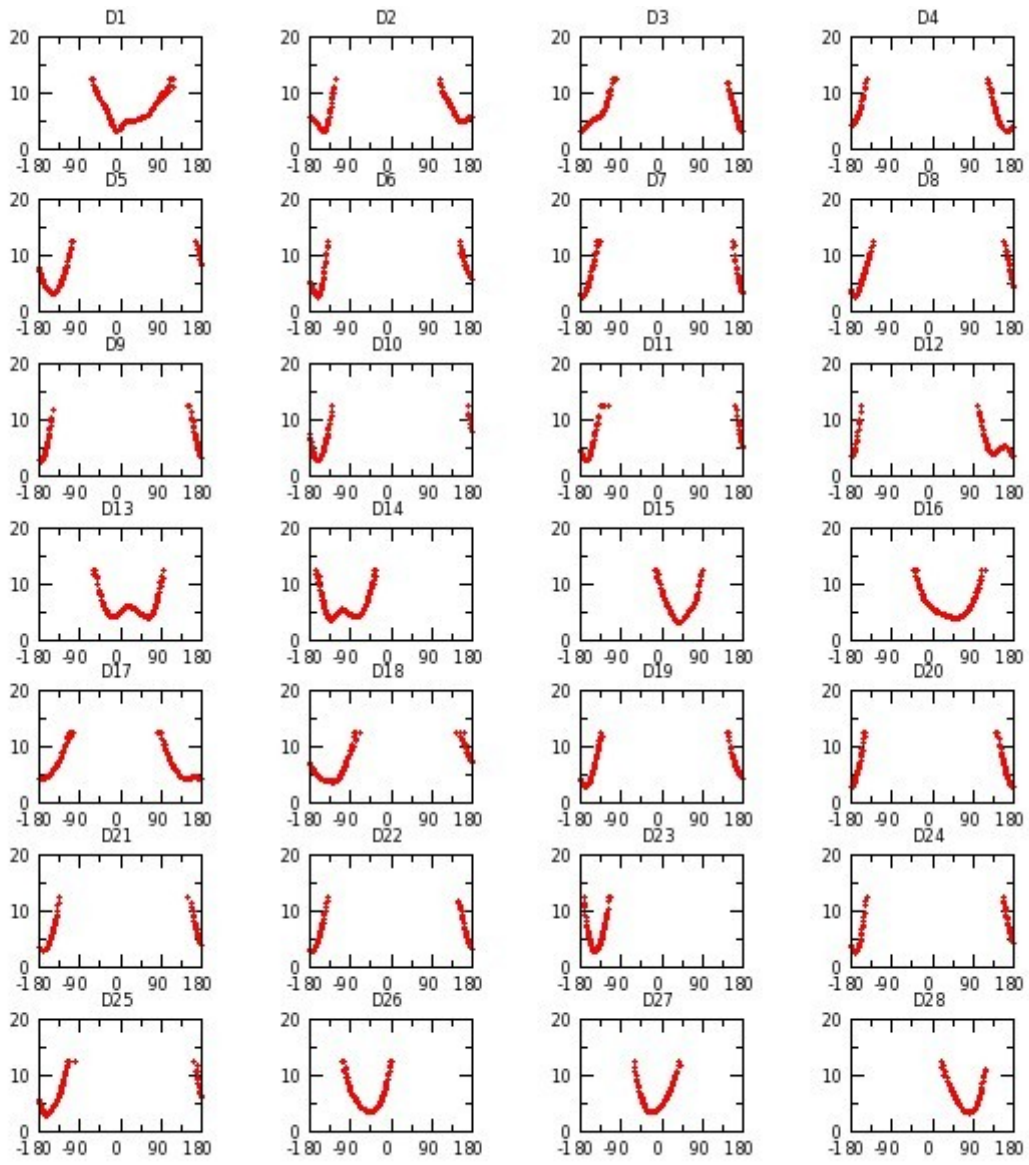


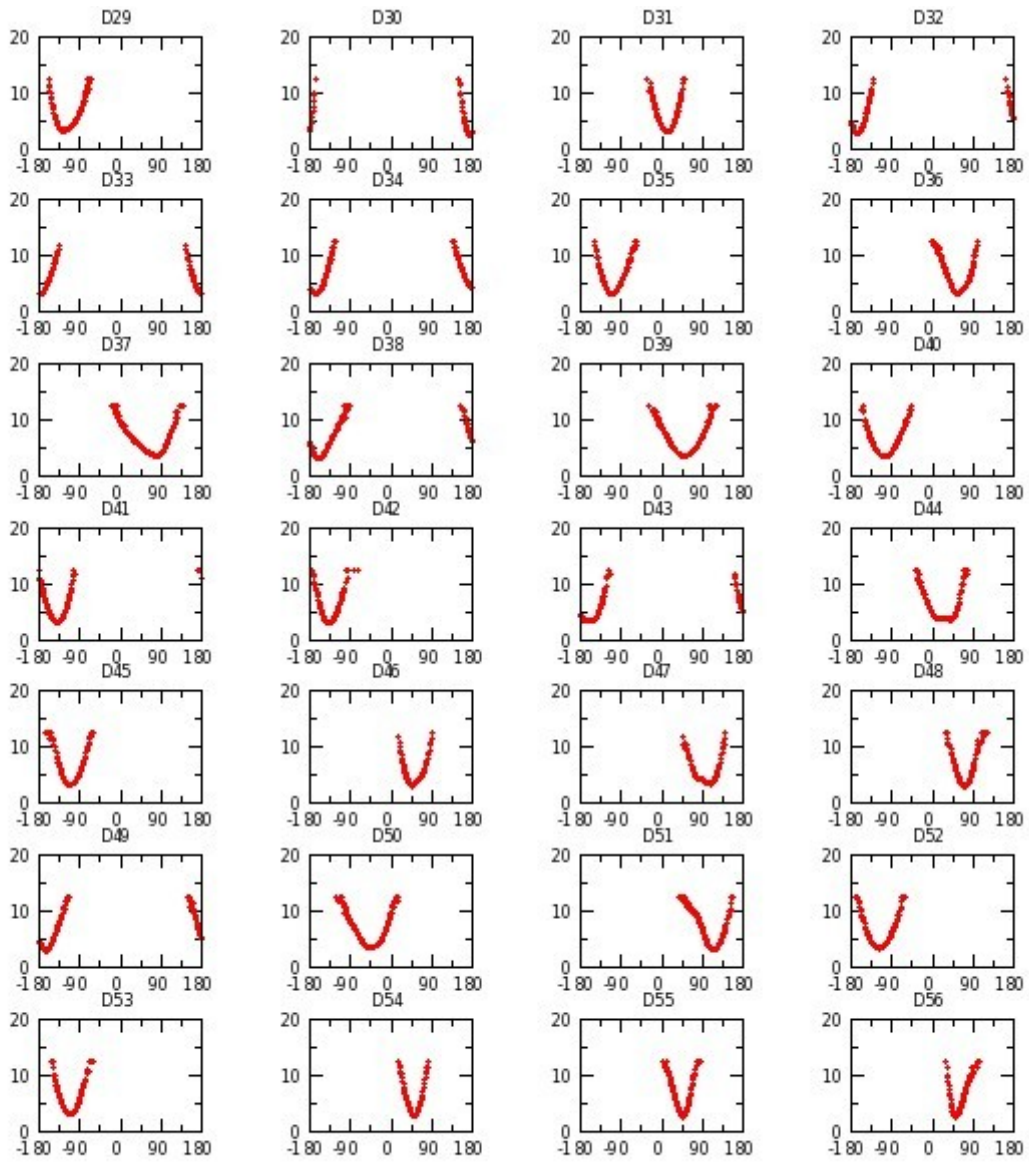


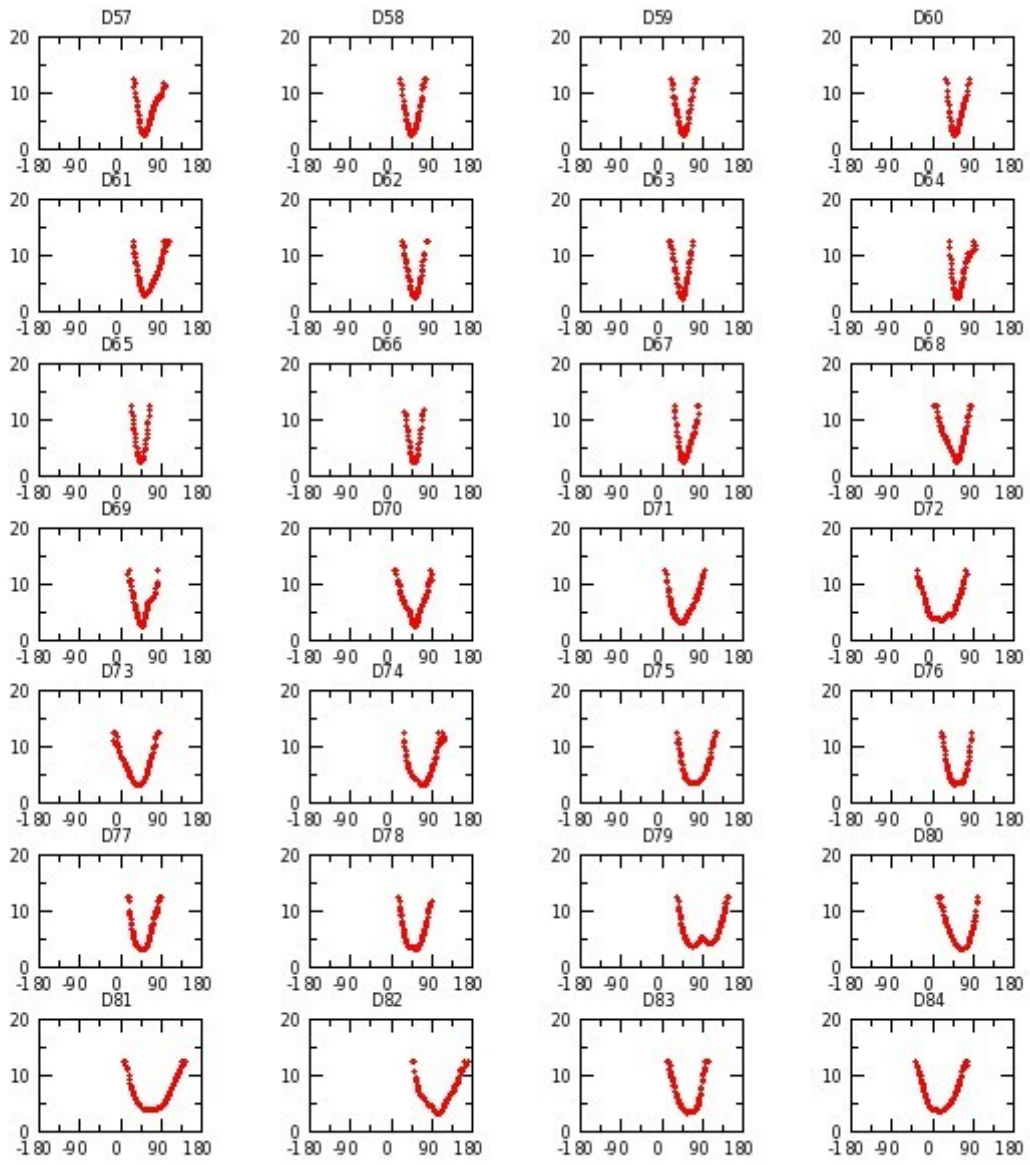


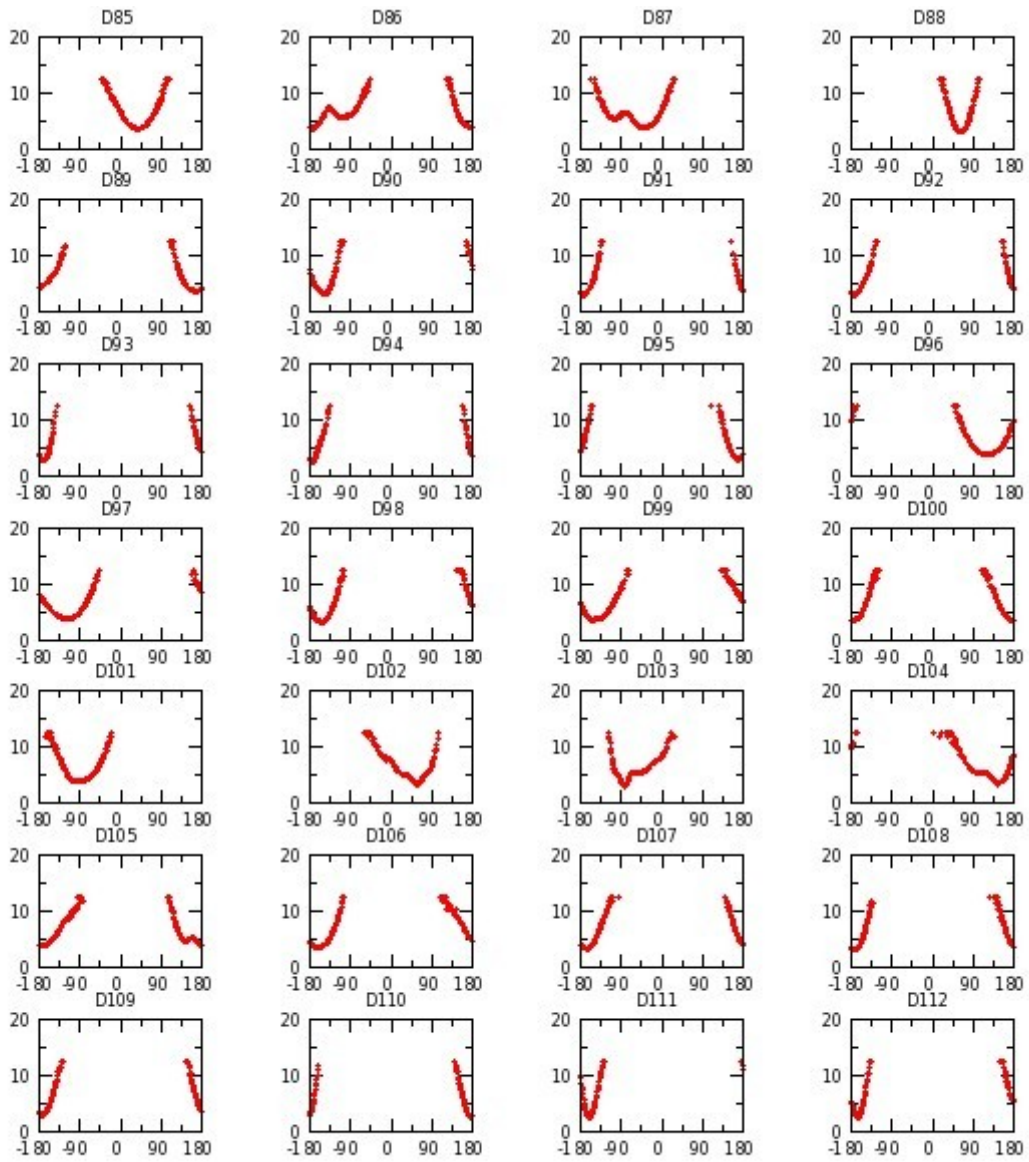


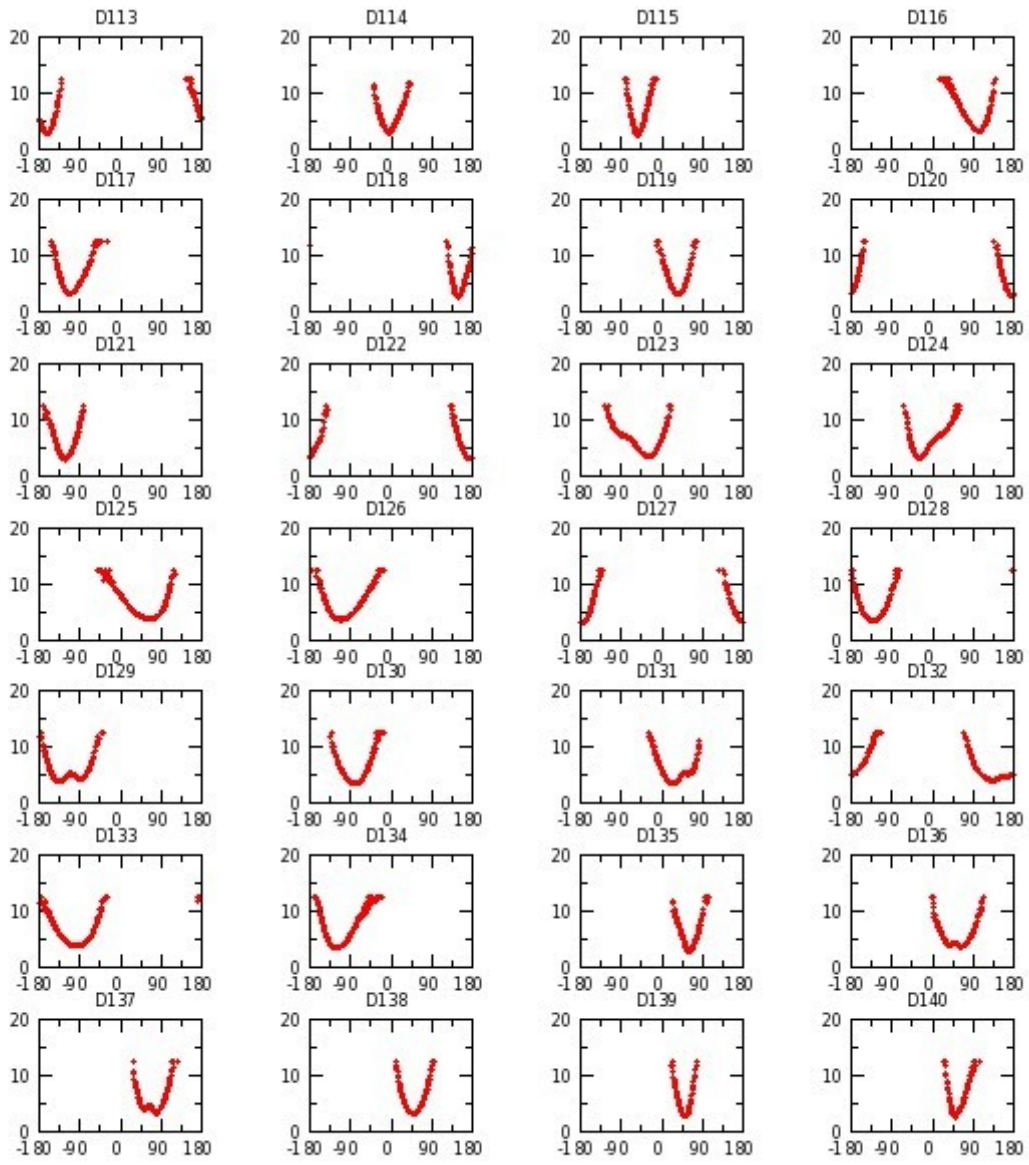
Annexe G 35 : M_AZOL réplique II

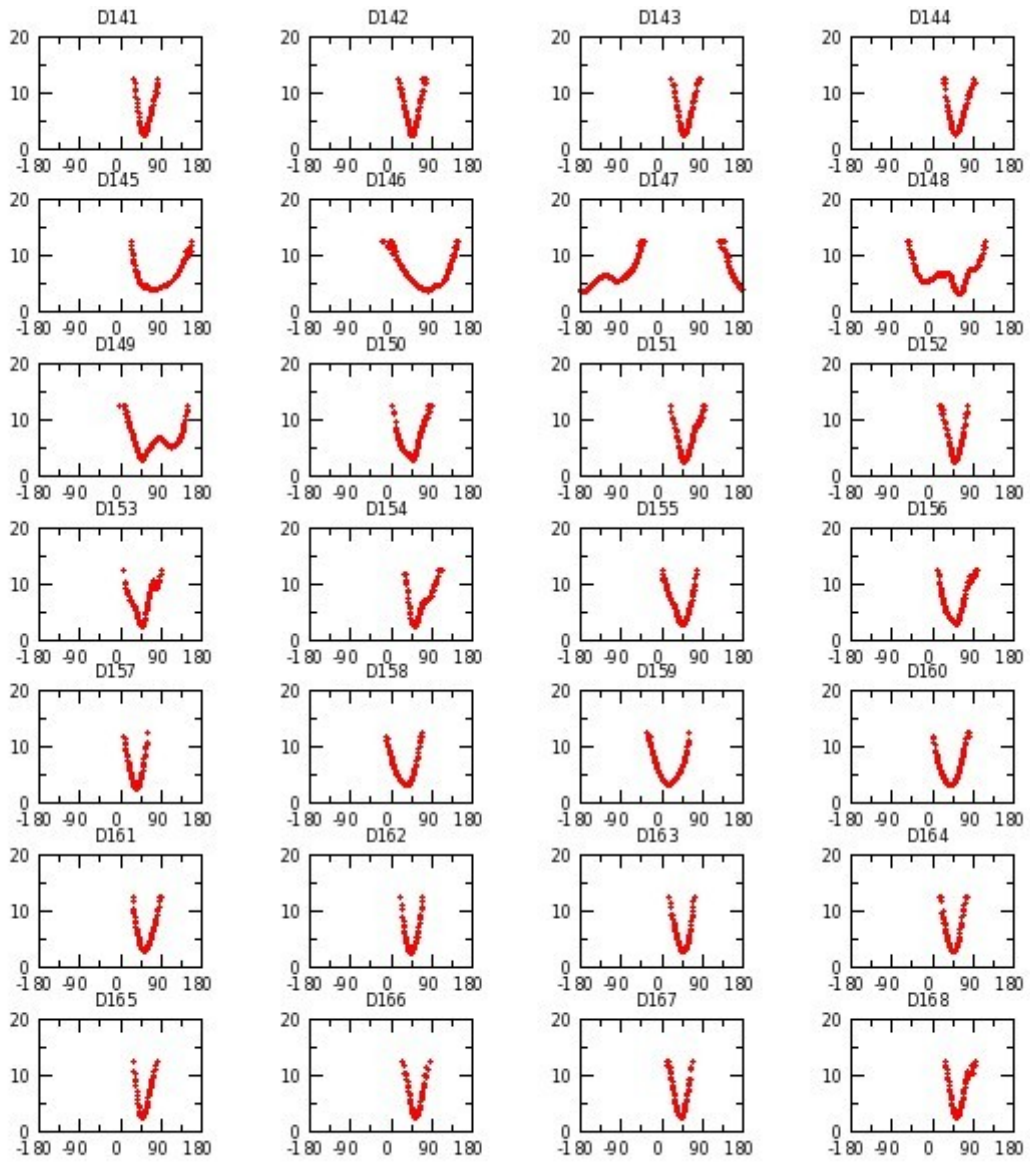


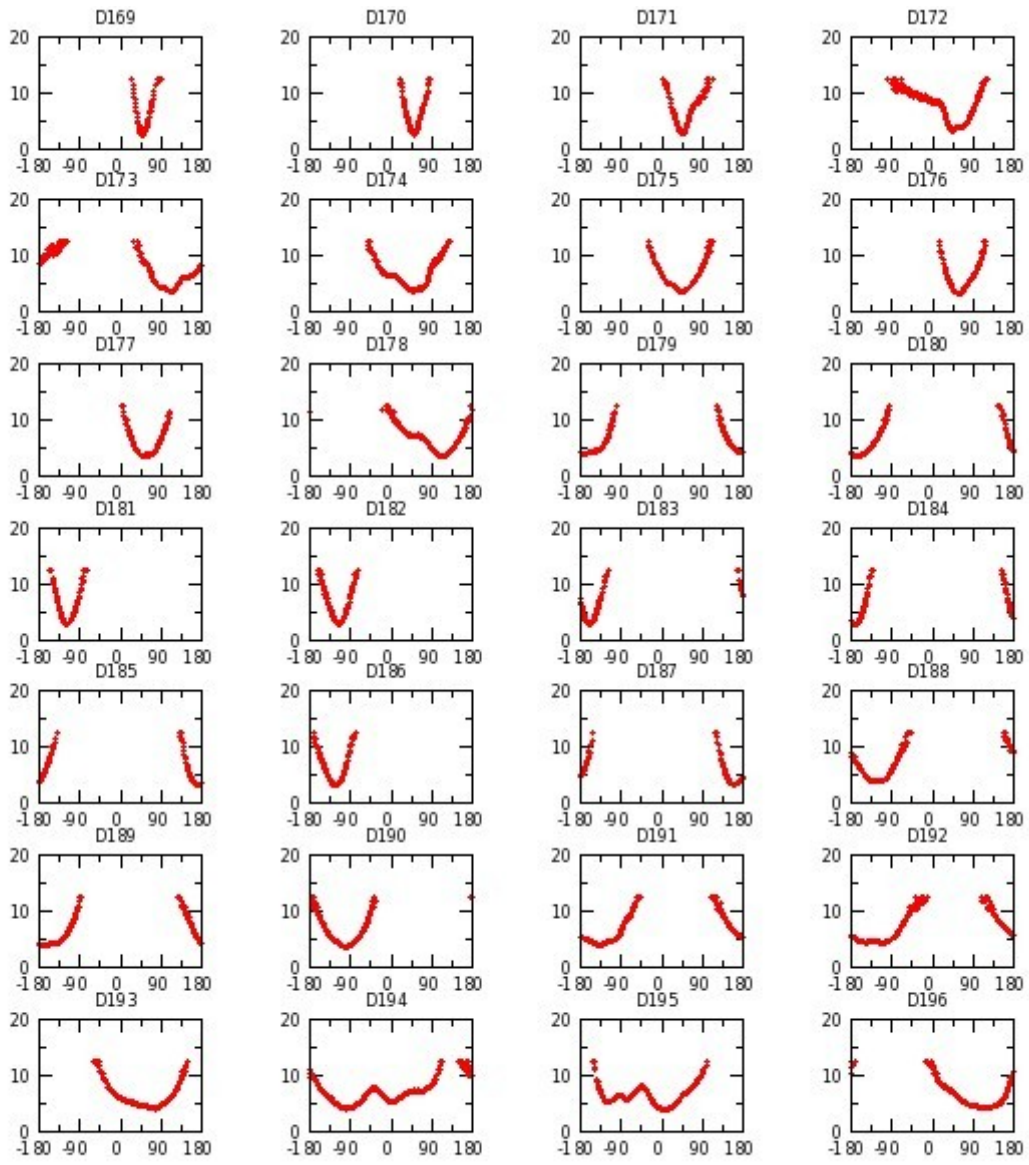


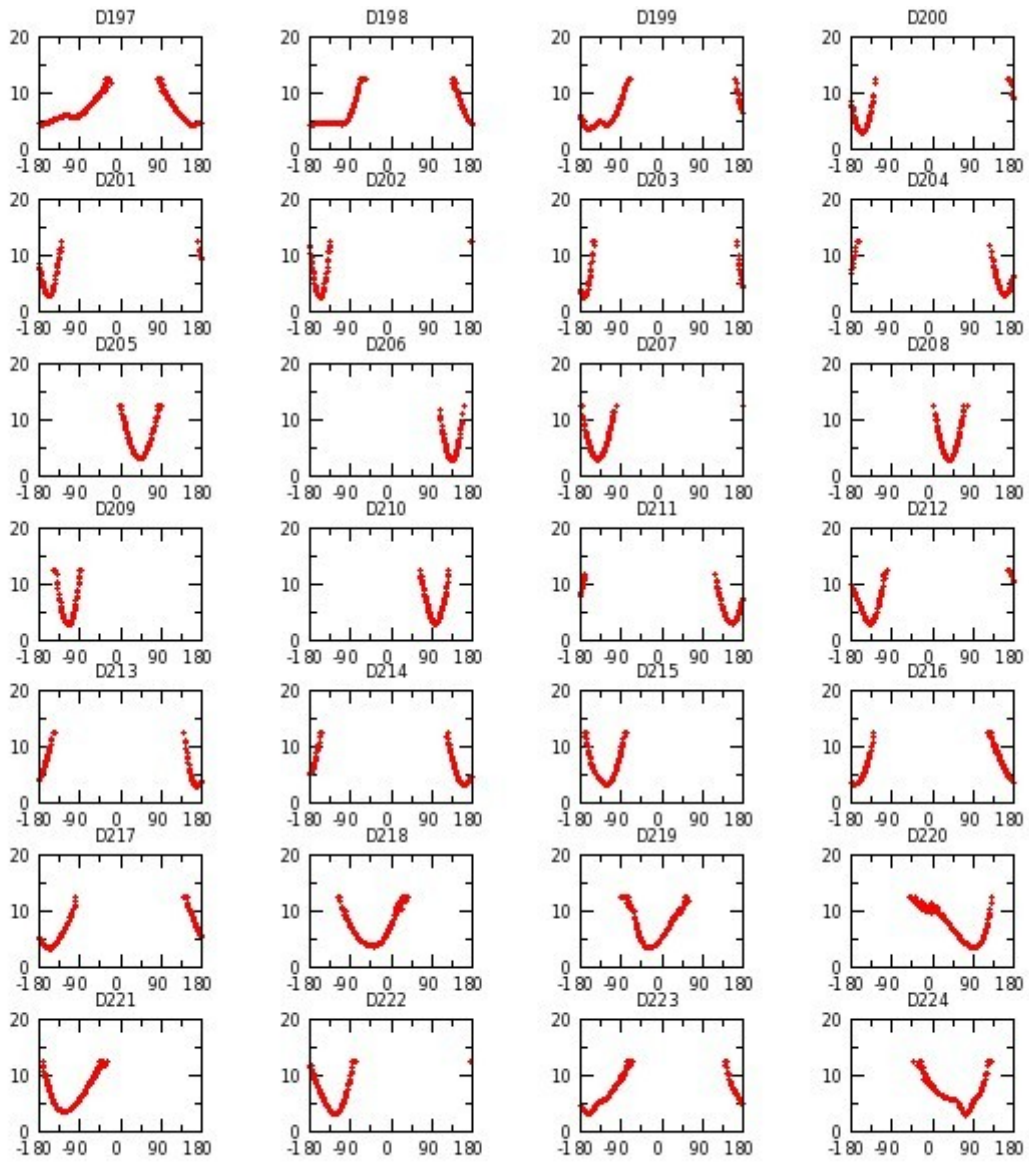


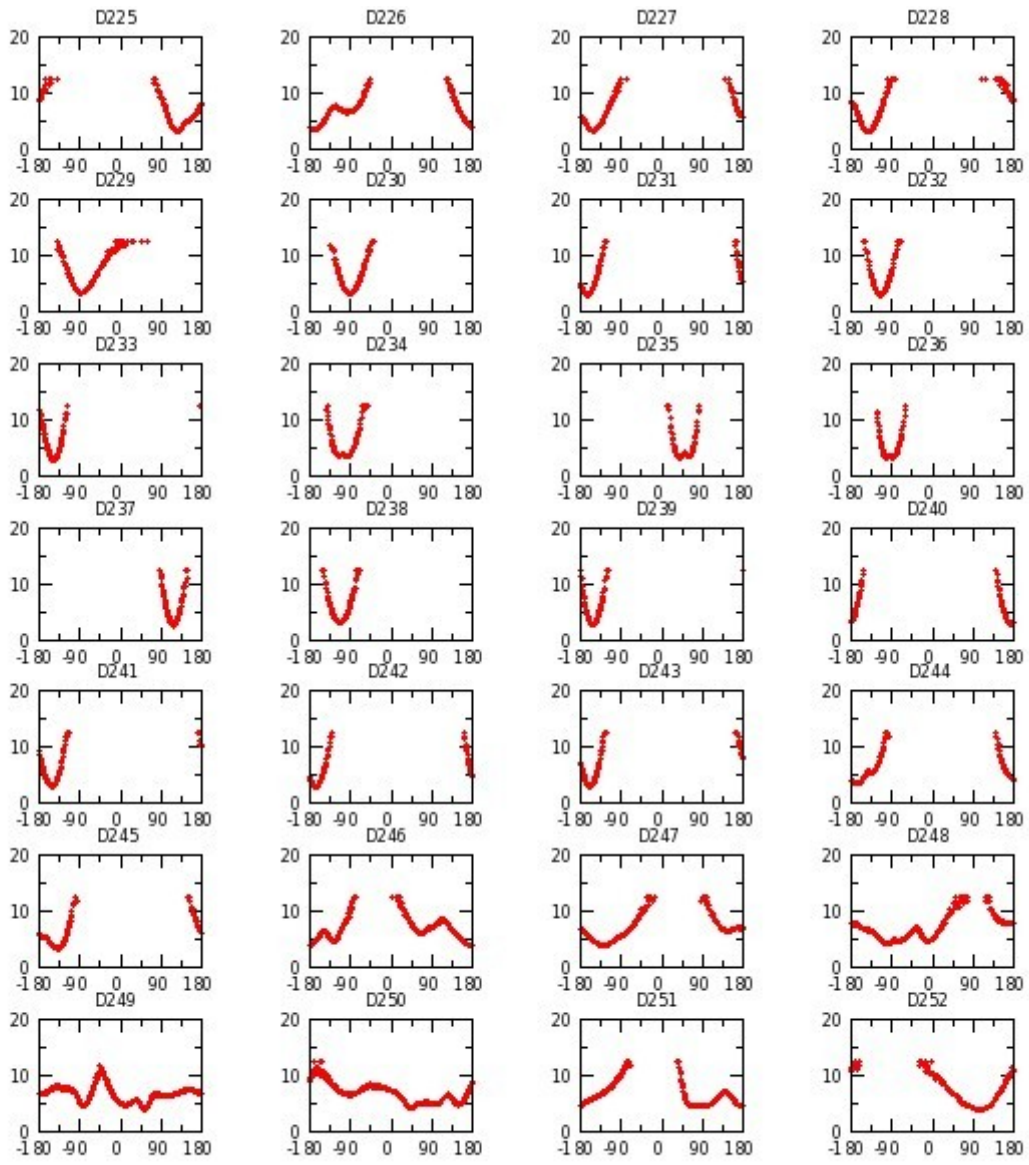


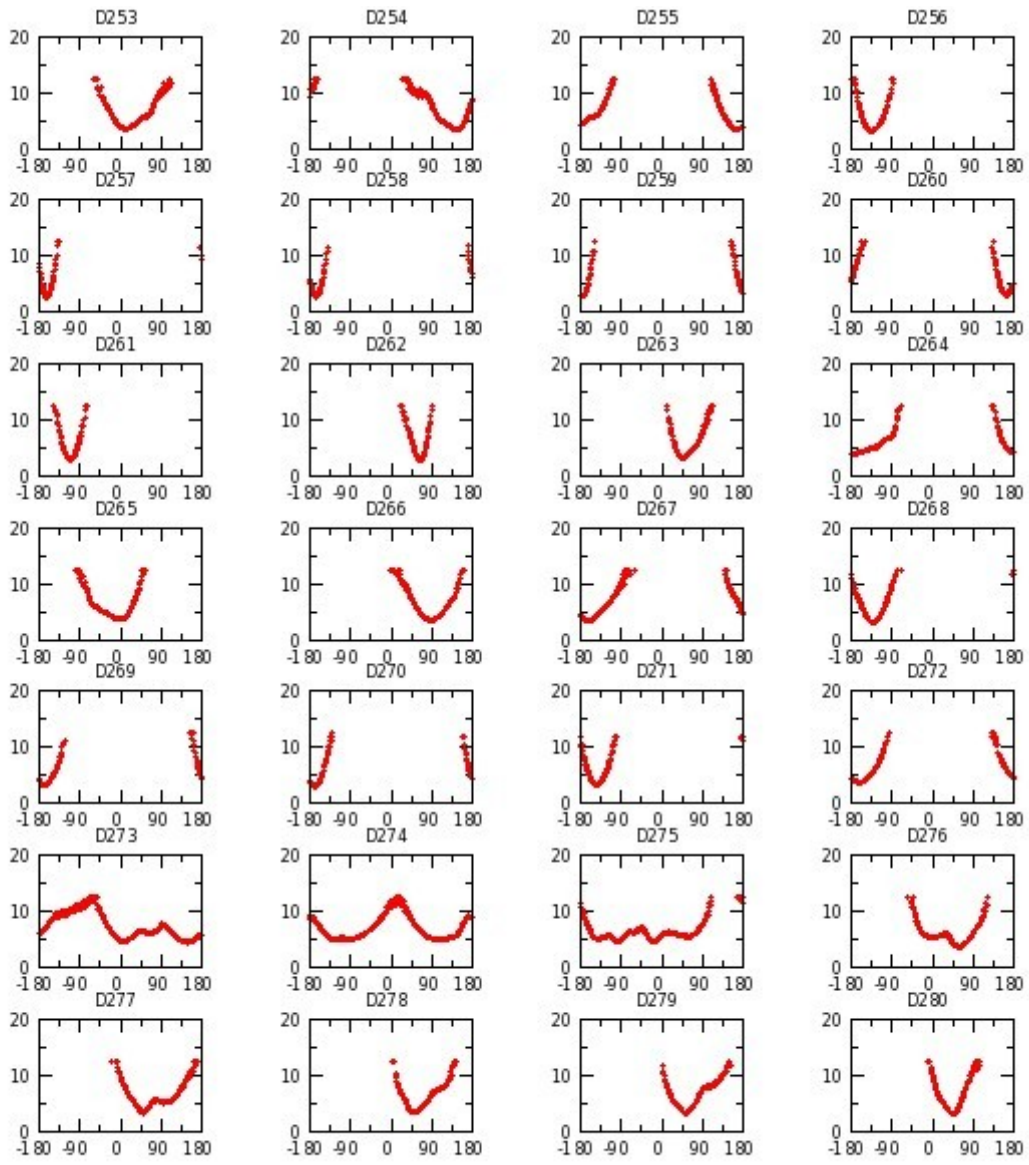


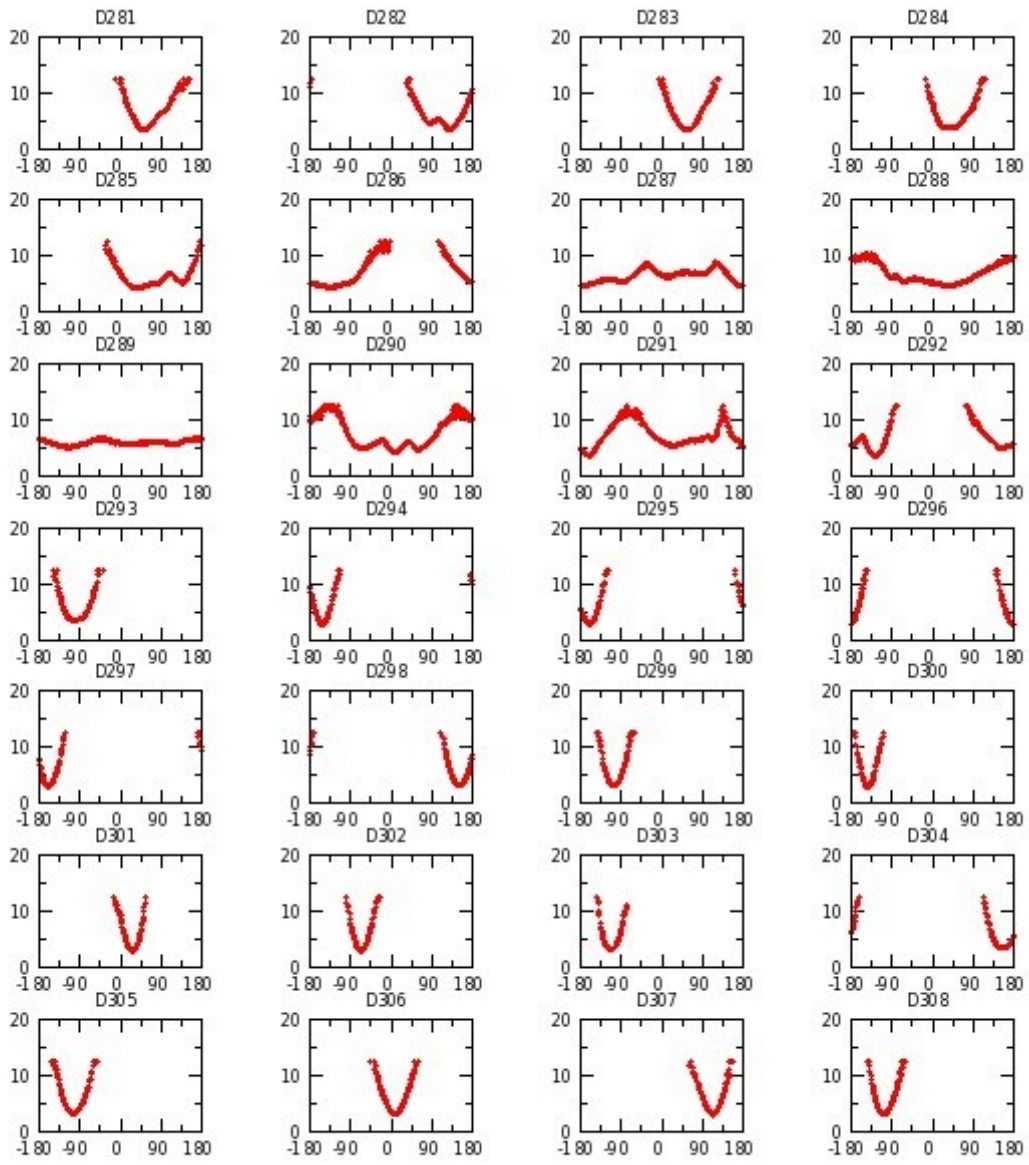


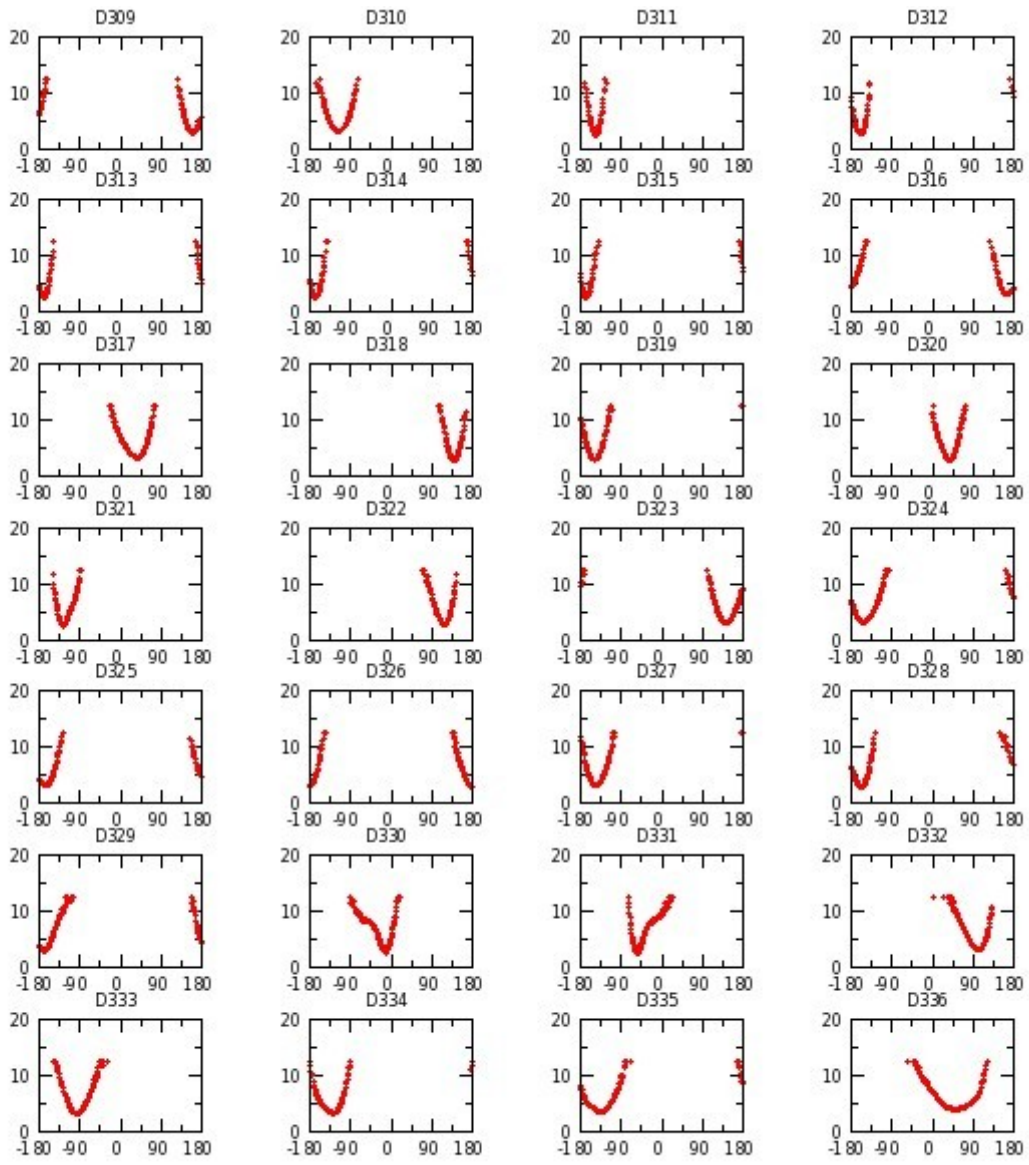


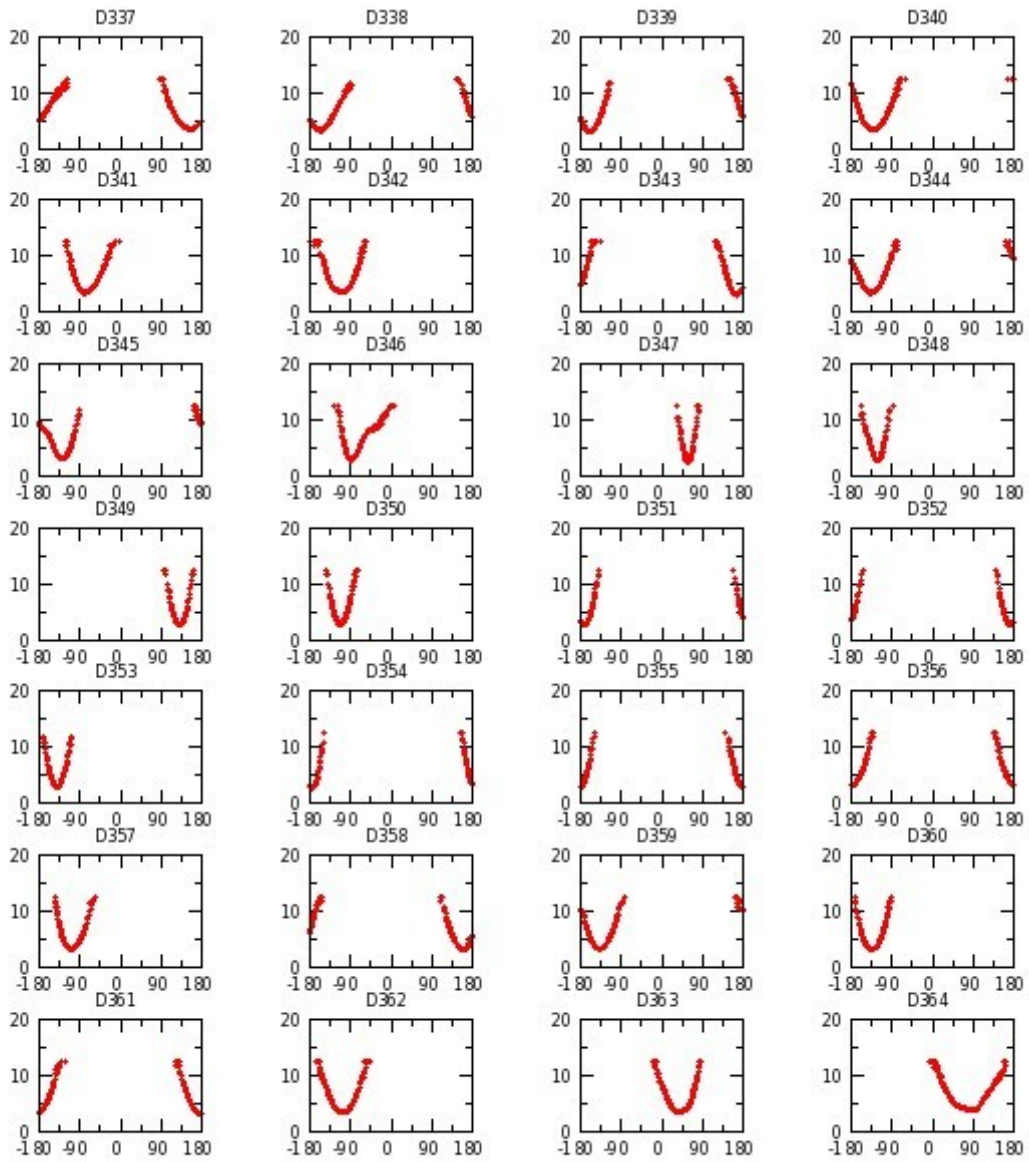


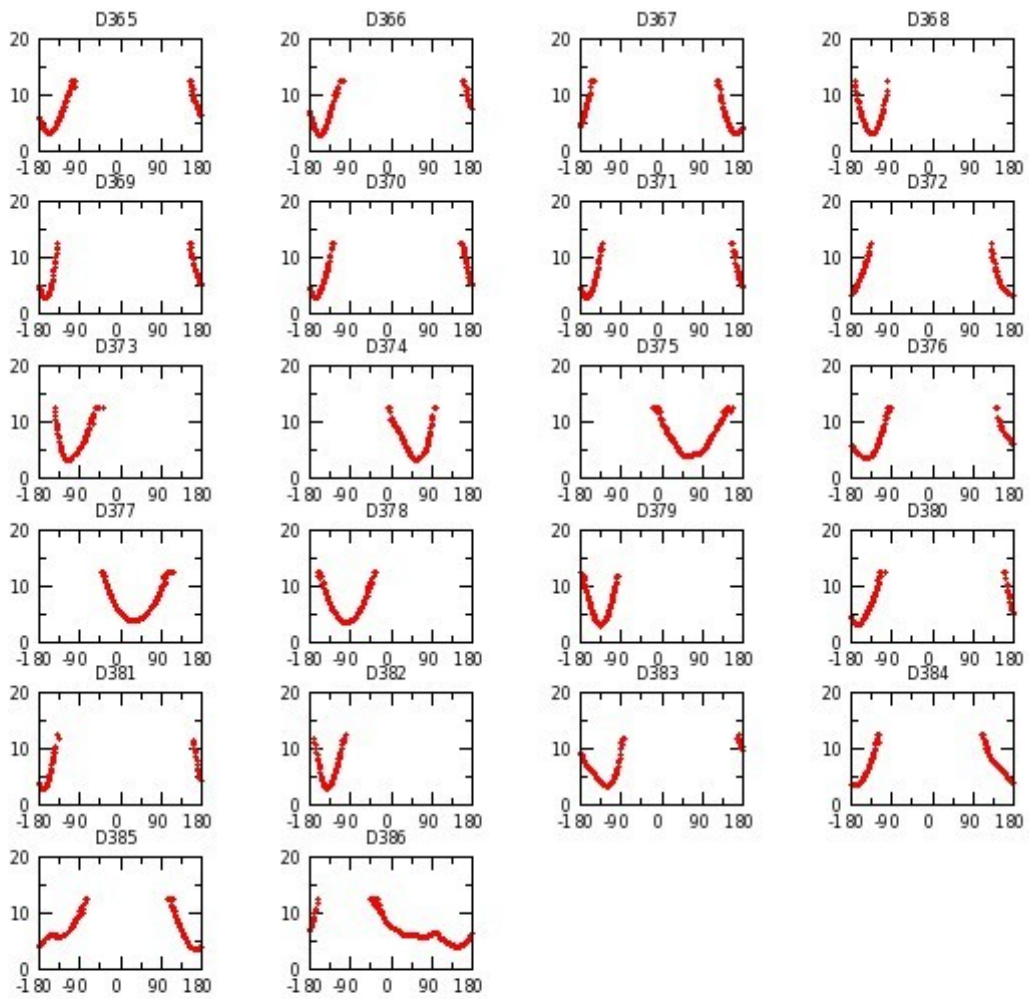




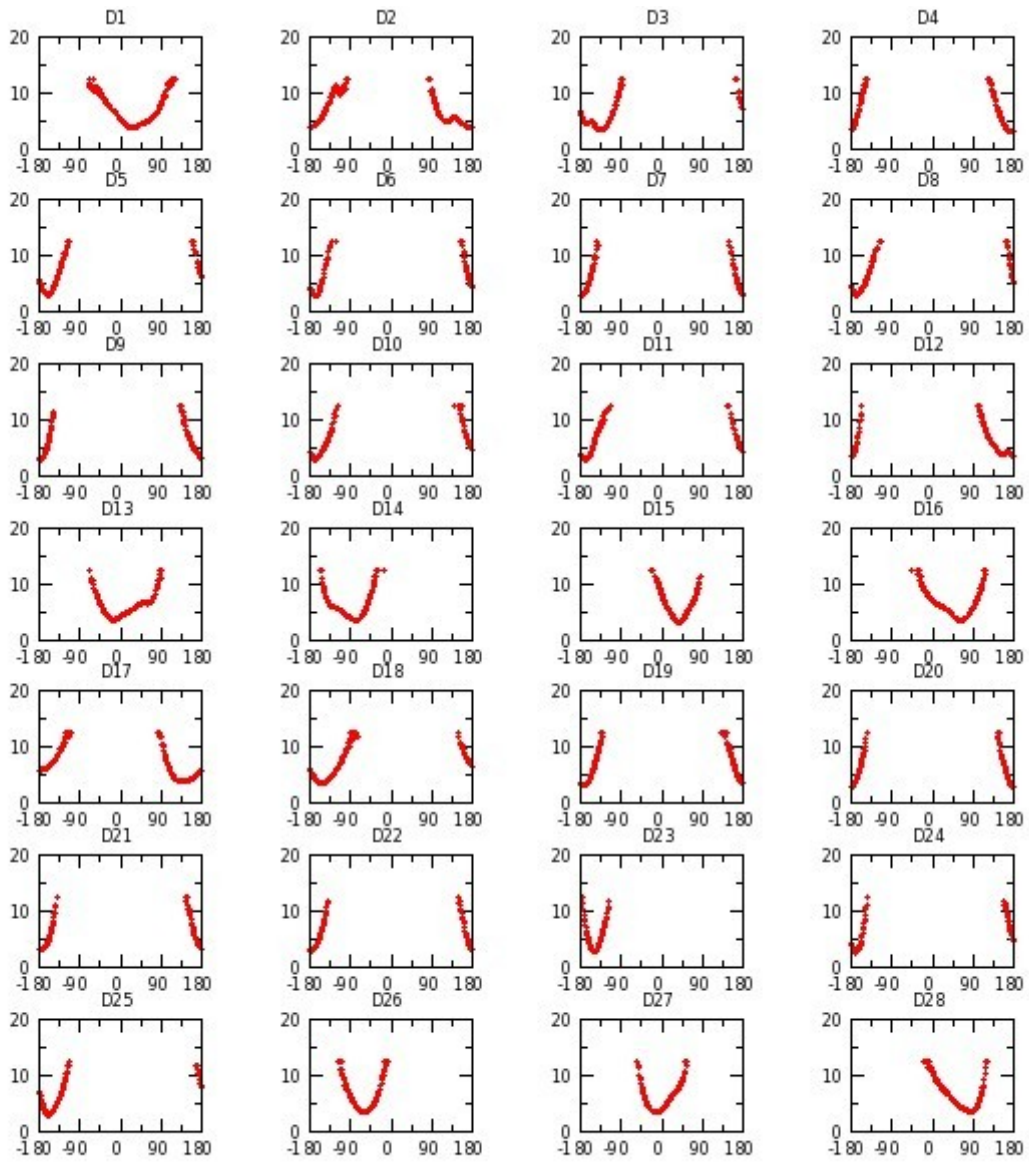


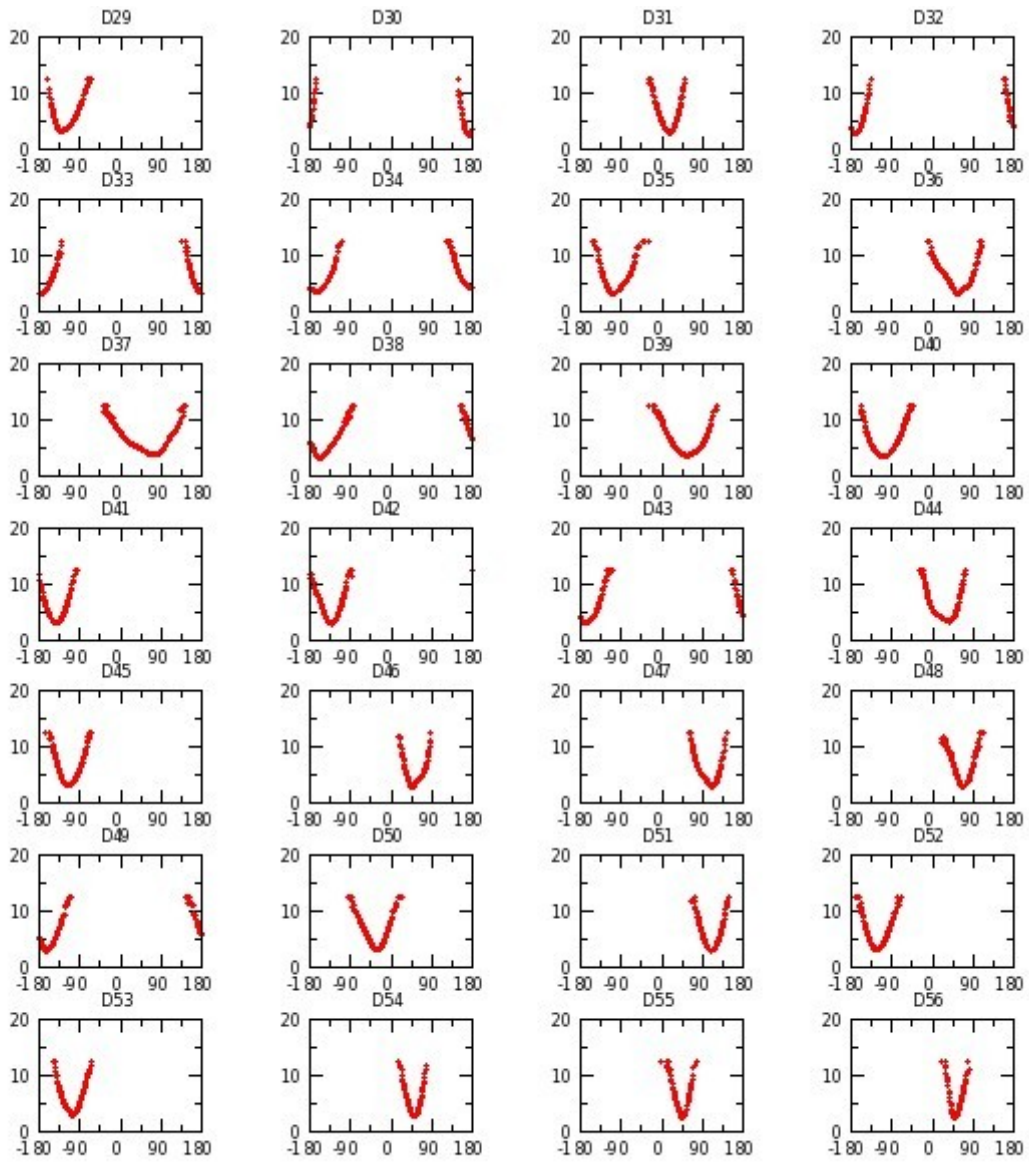


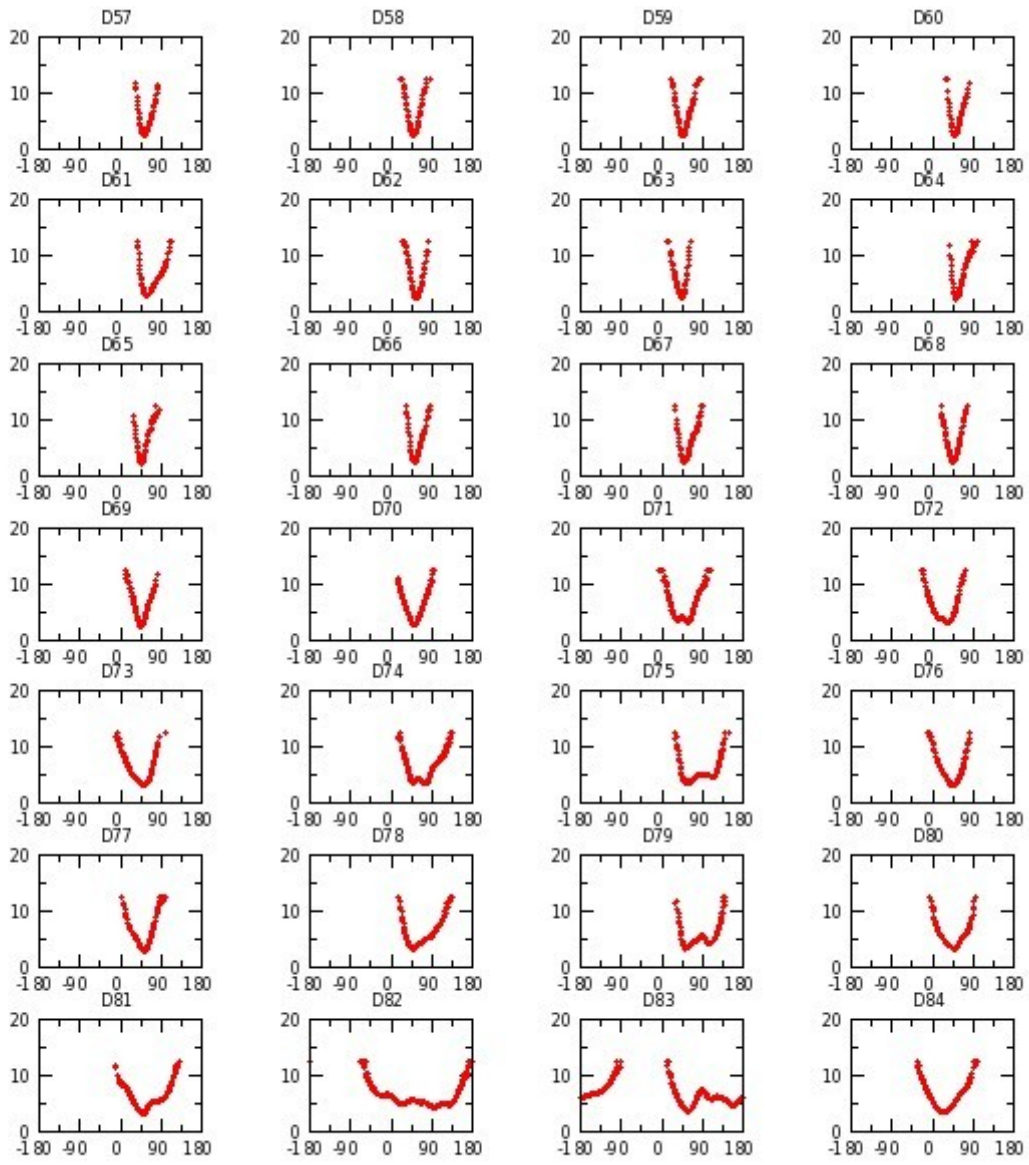


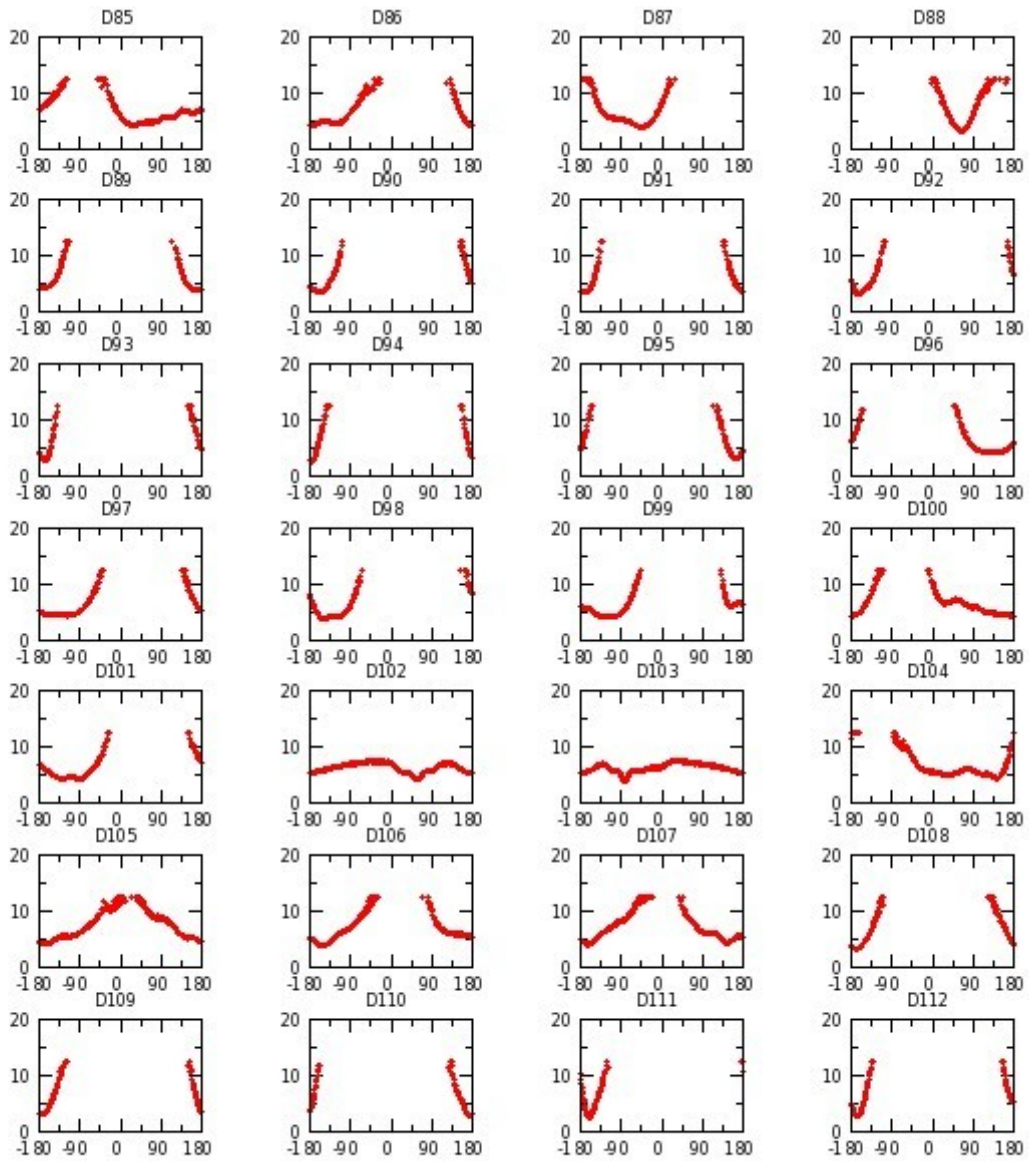


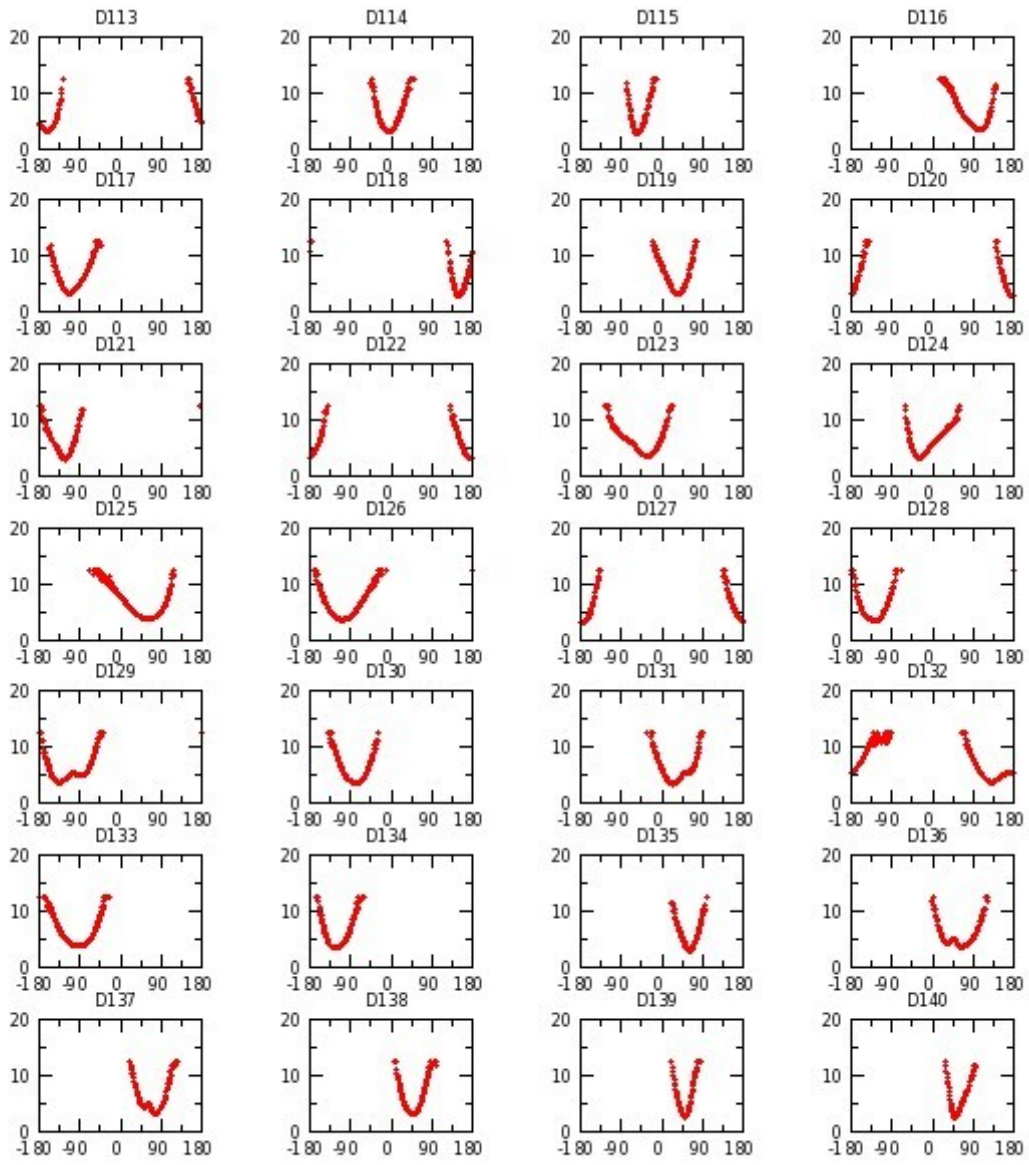
Annexe G 36 : M_AZOL réplique III

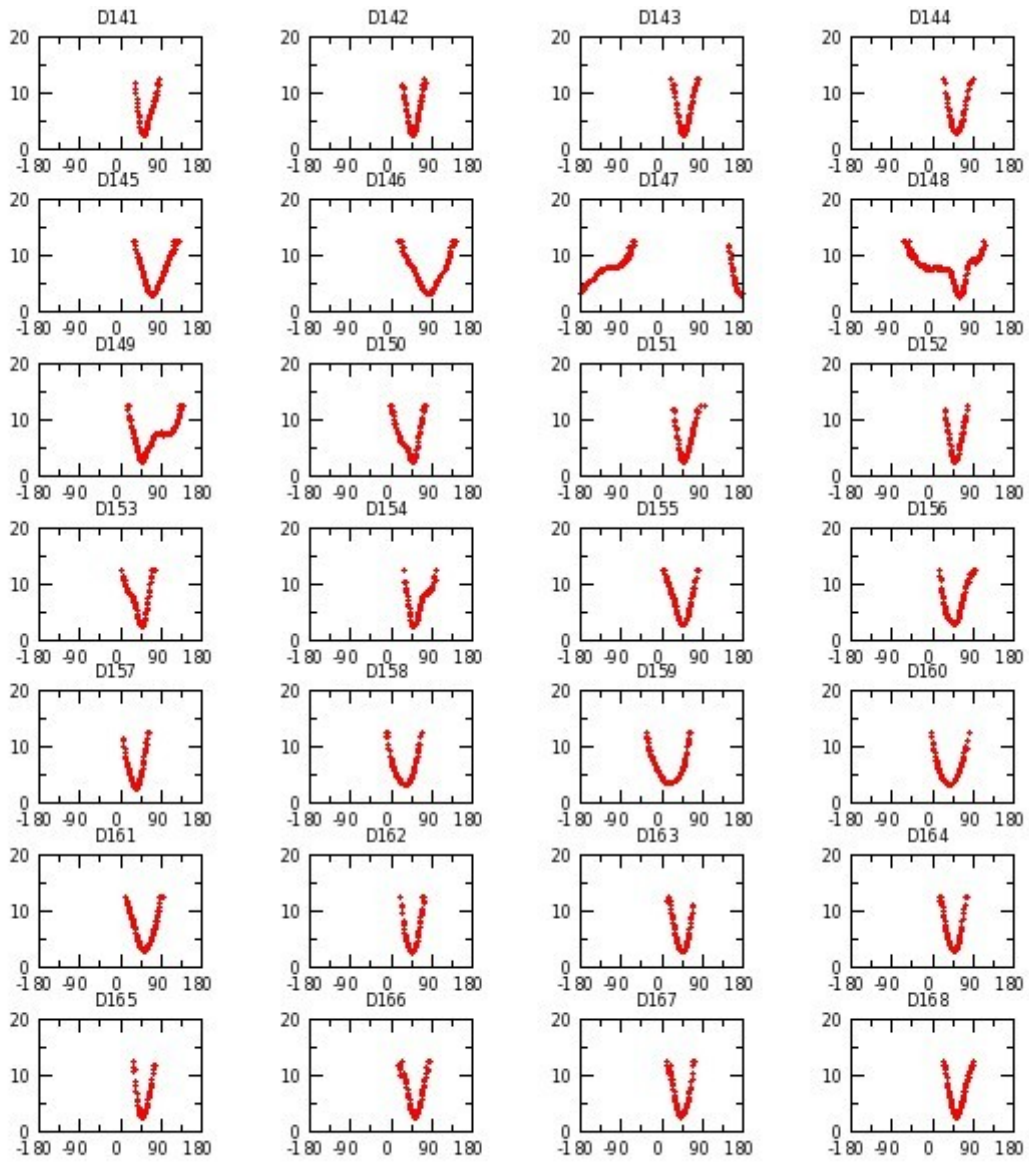


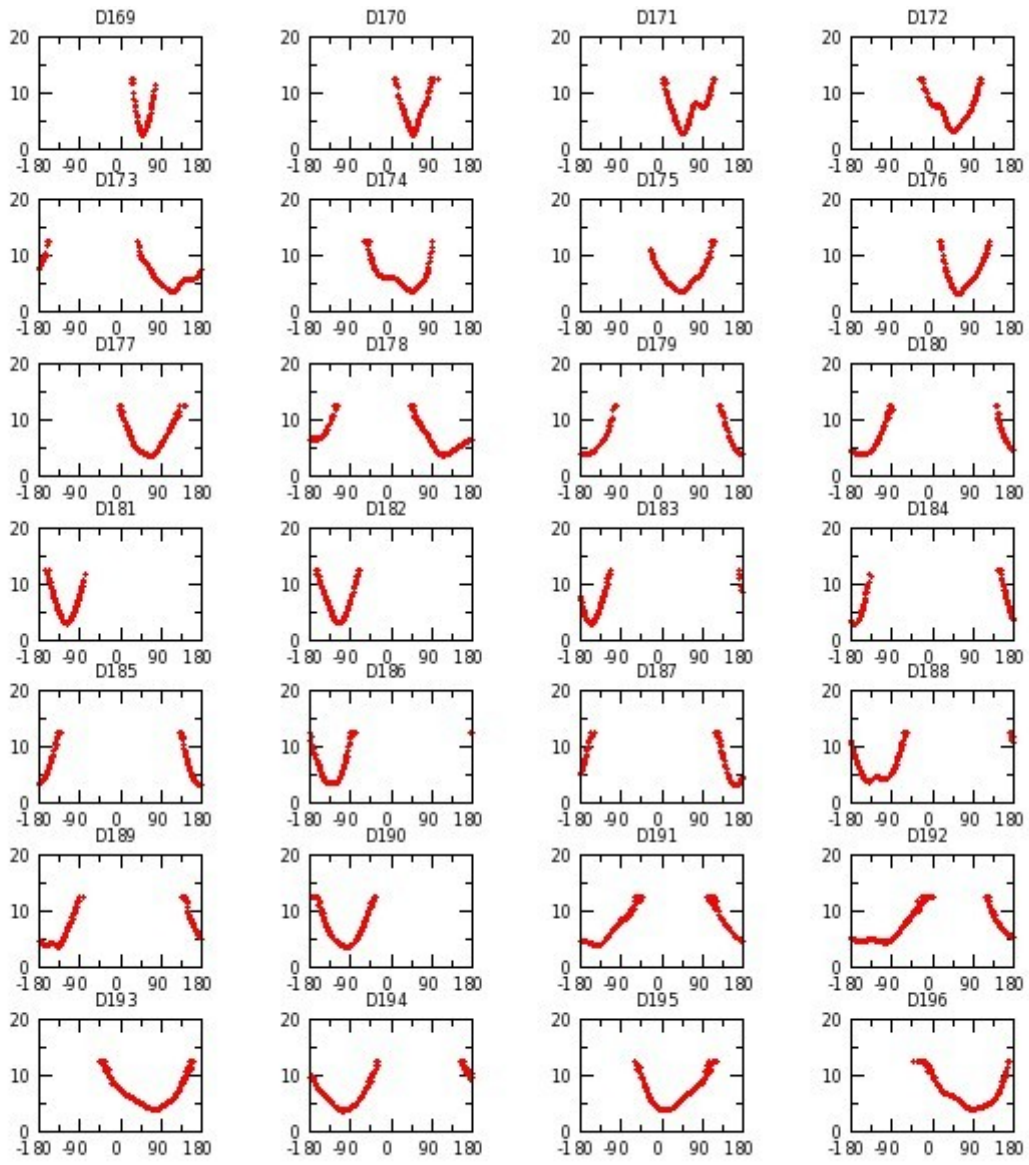


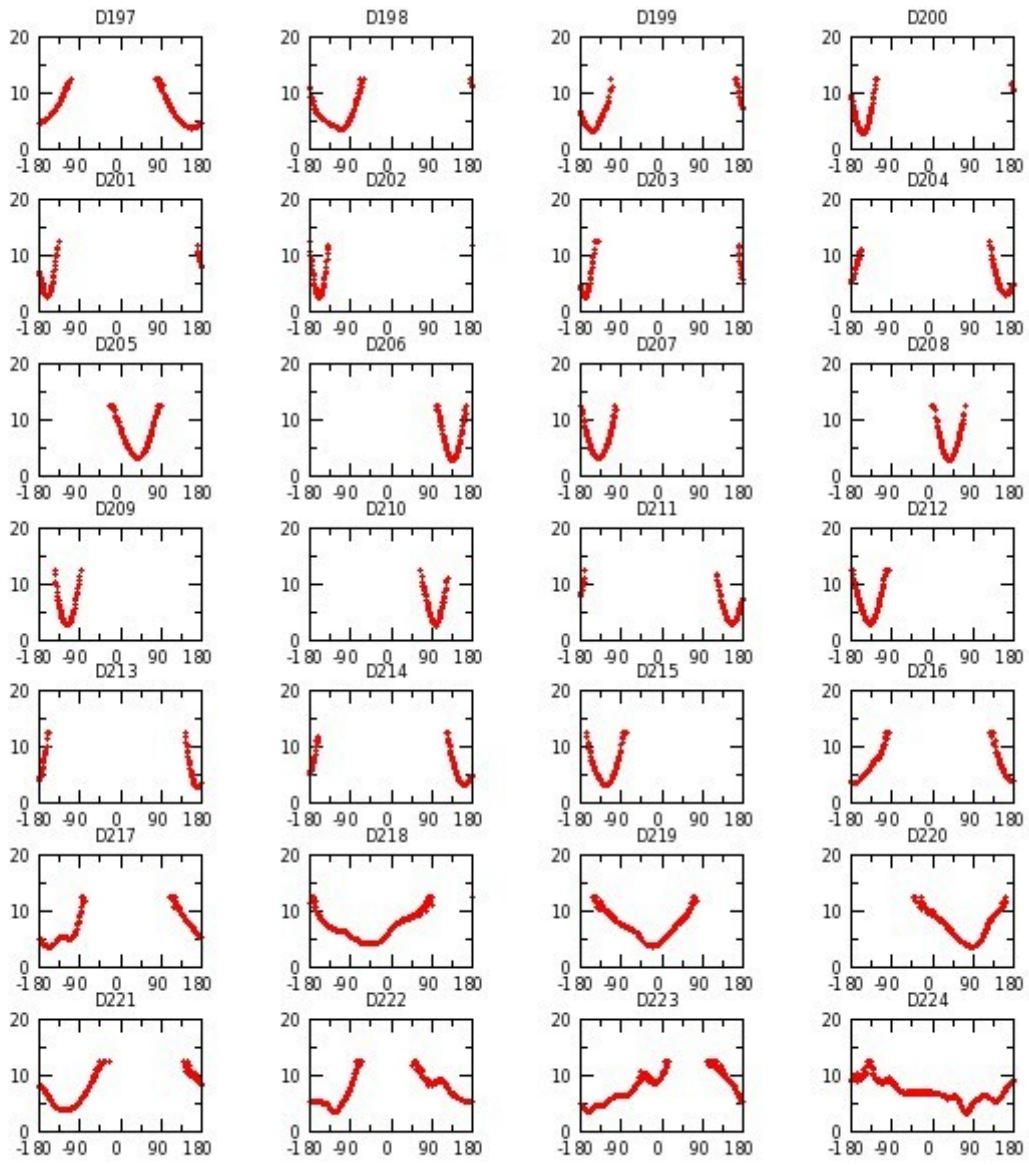


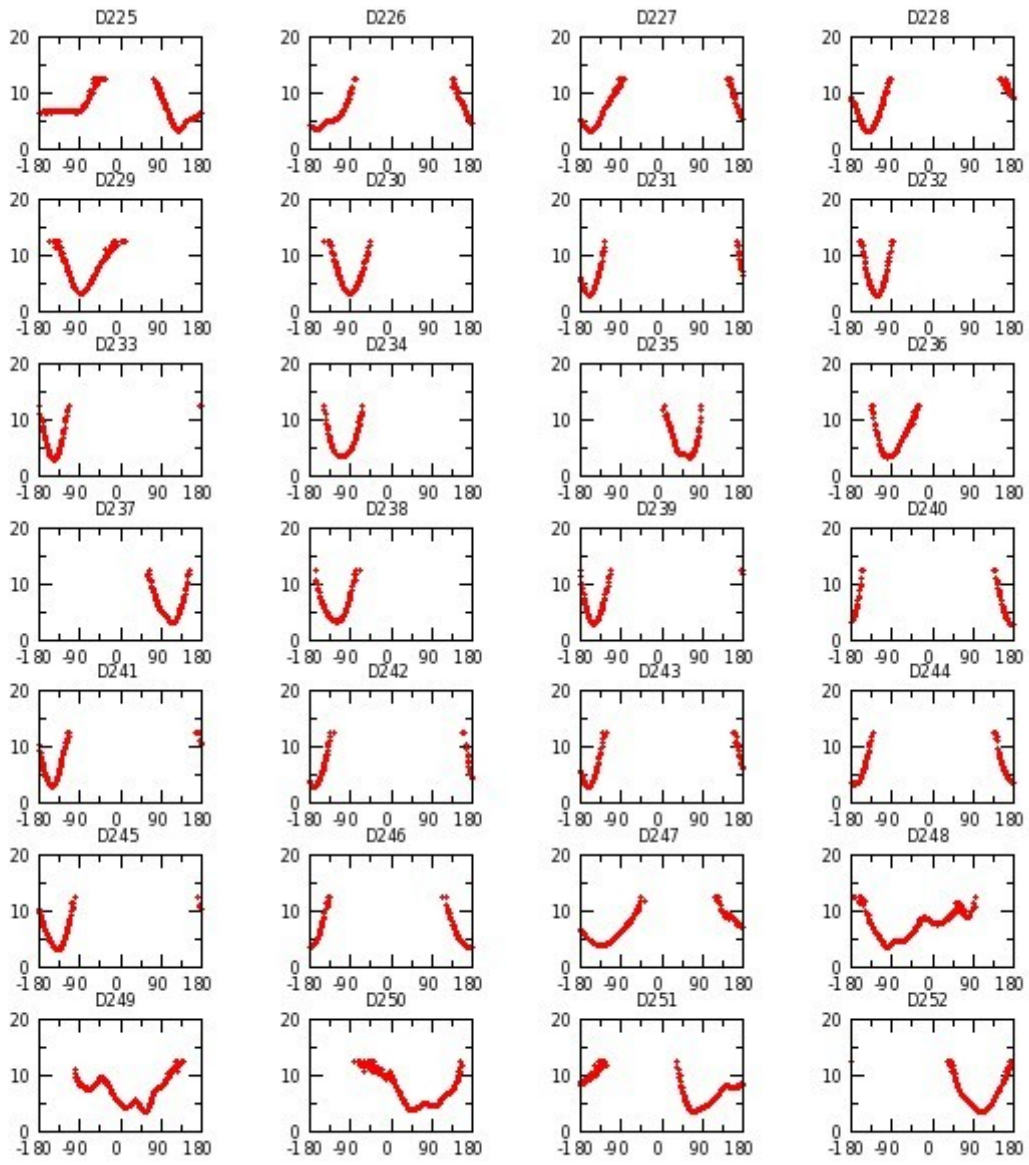


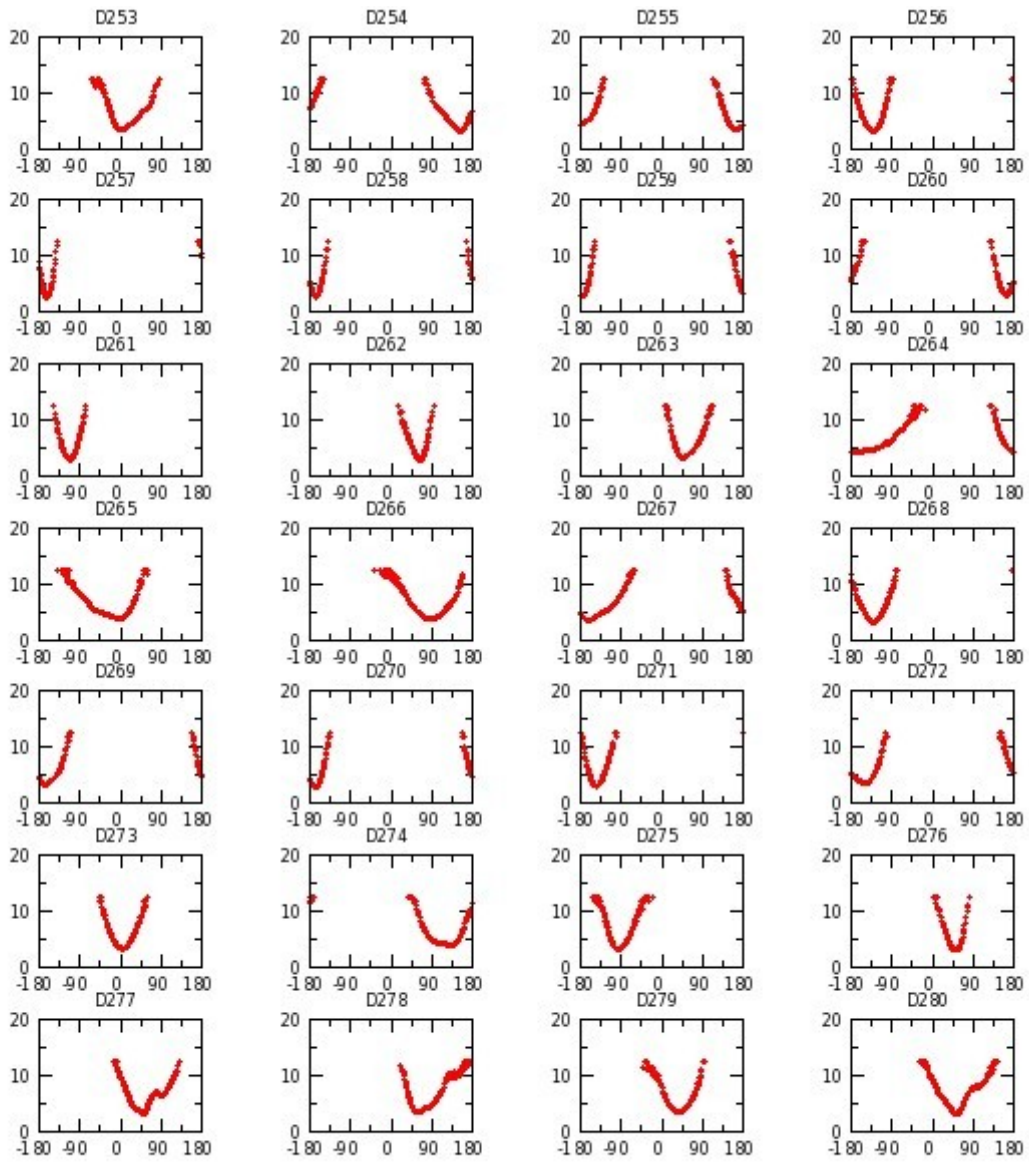


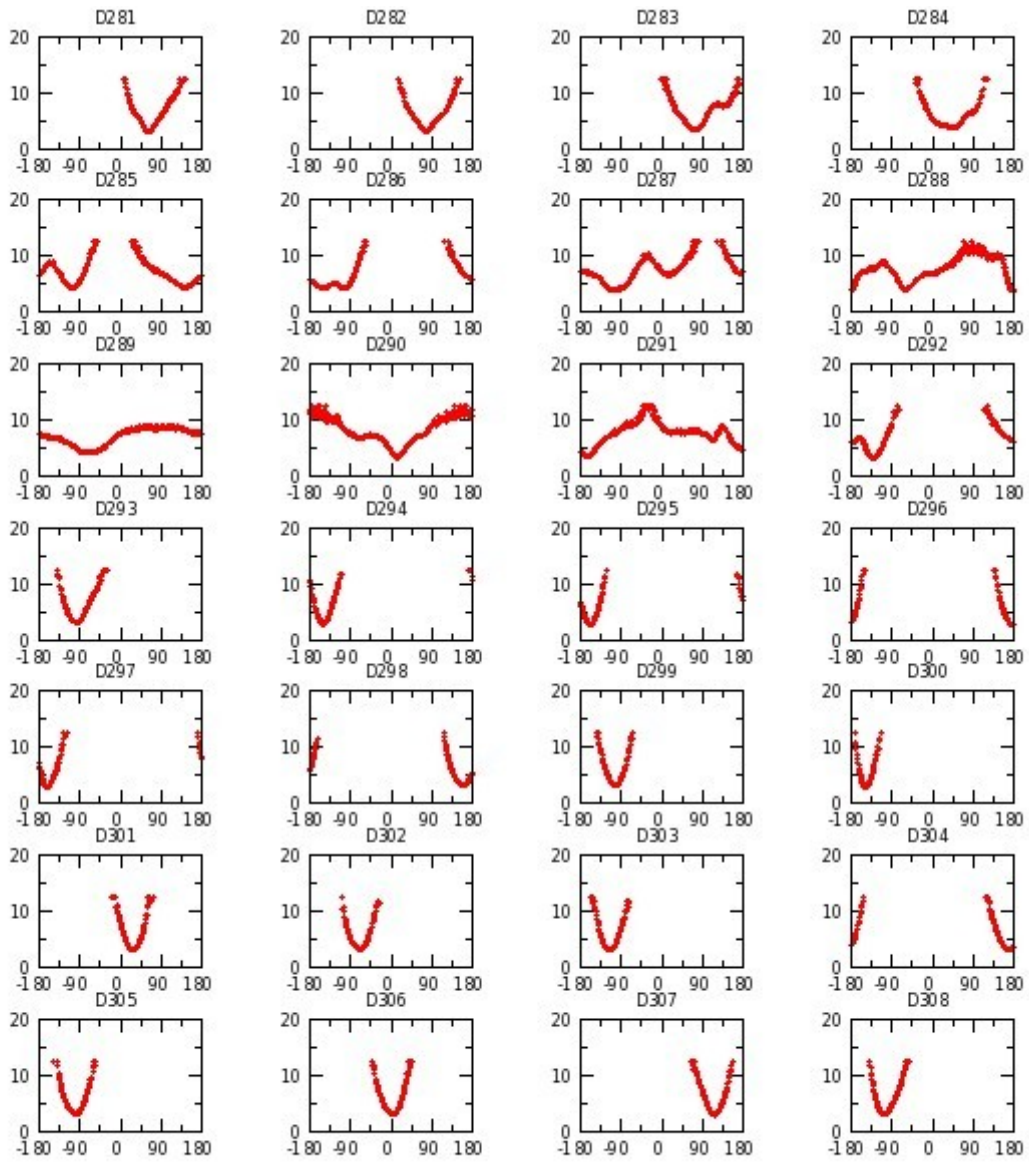


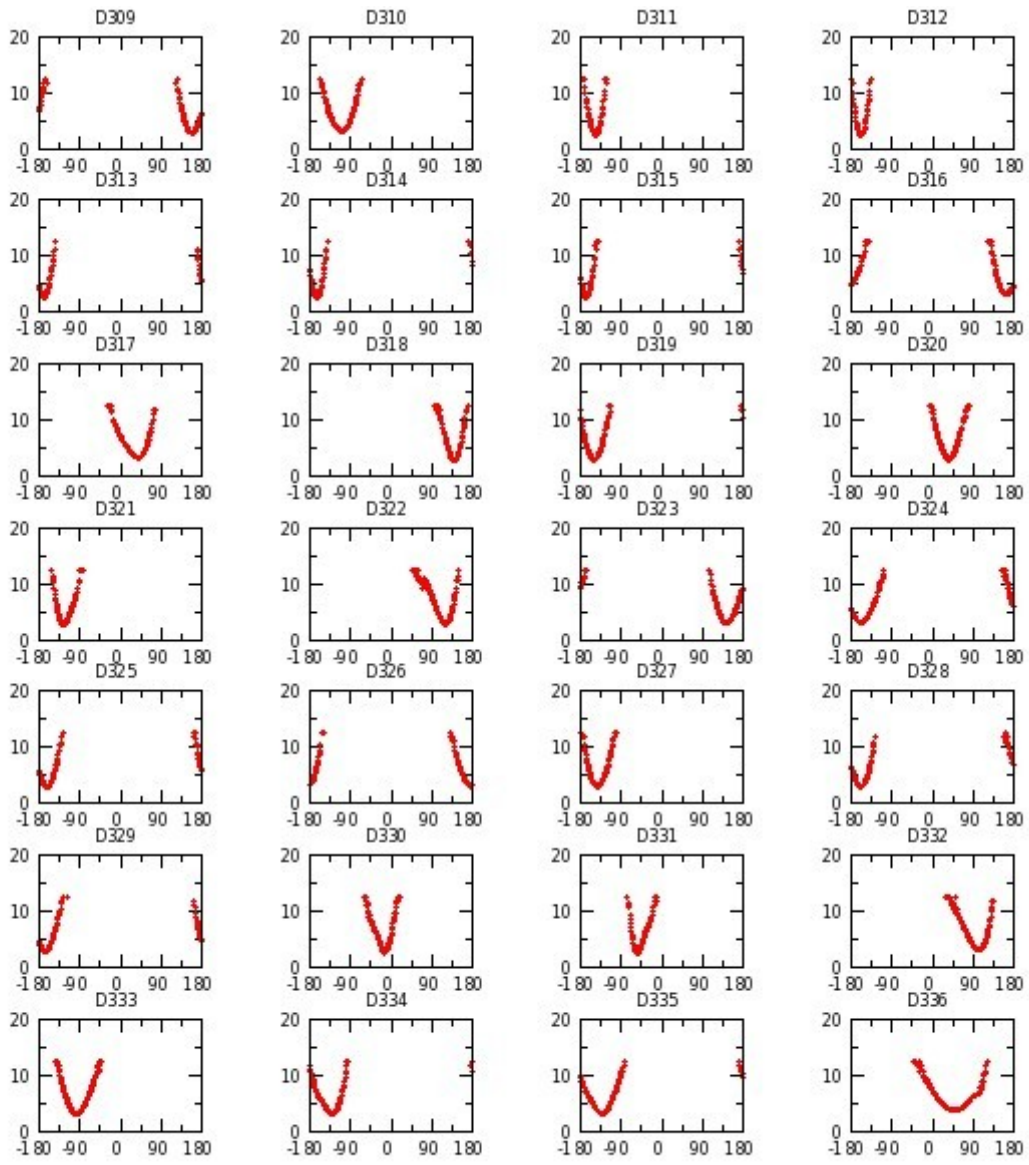


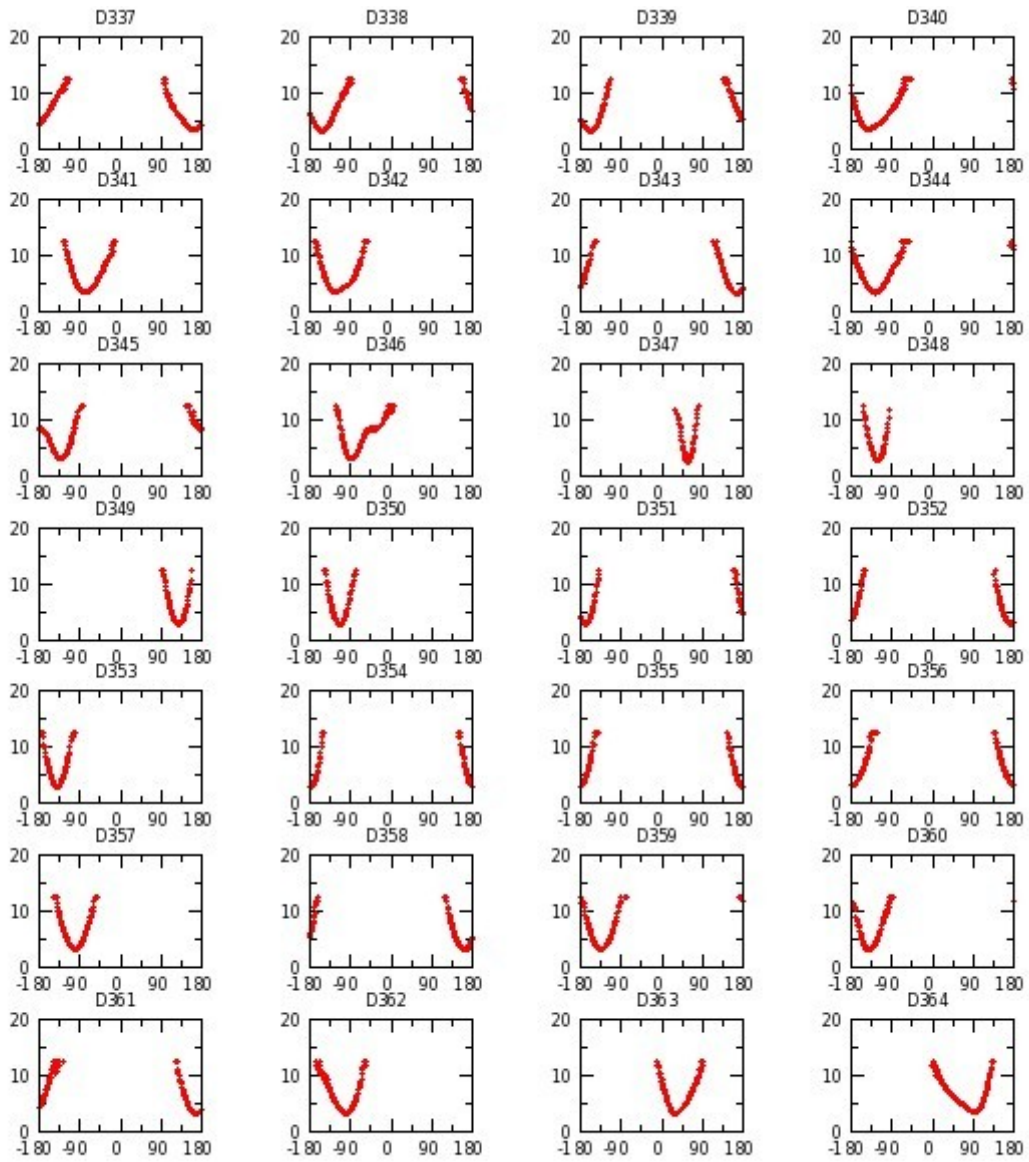


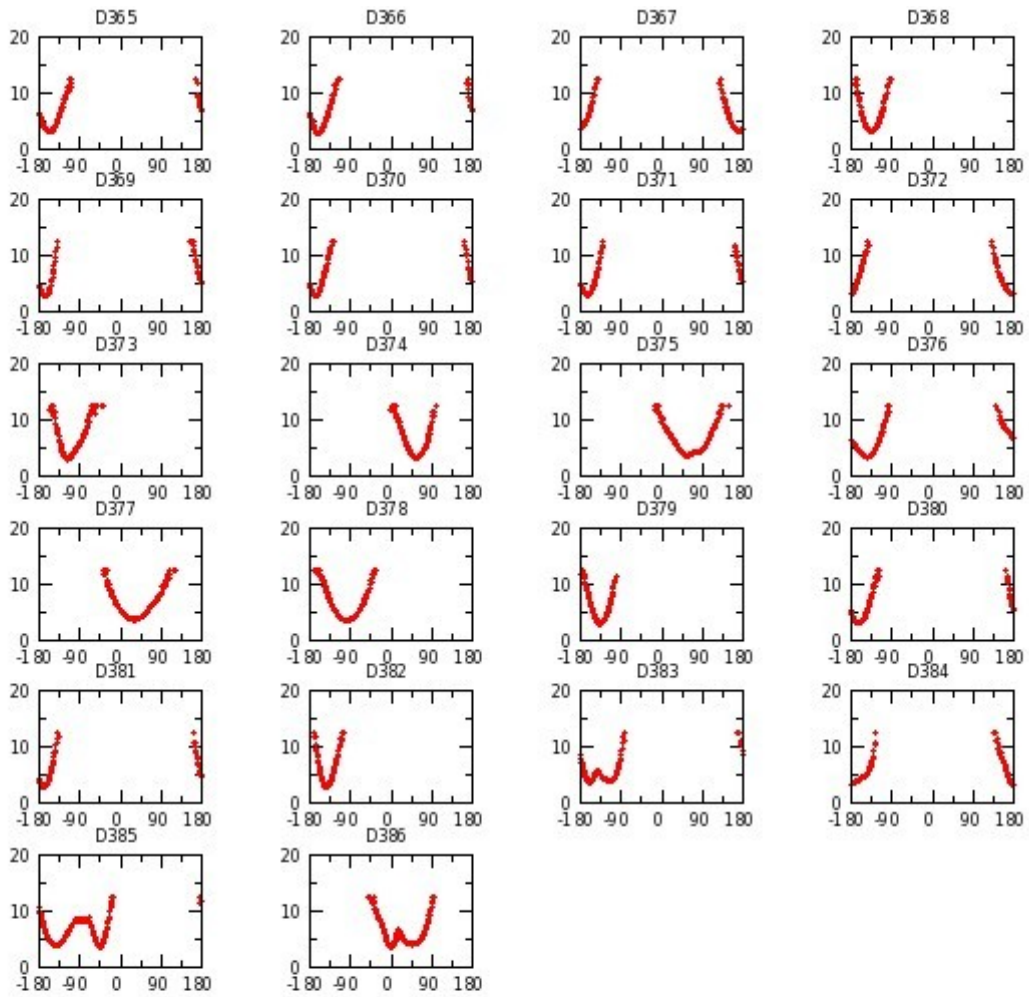




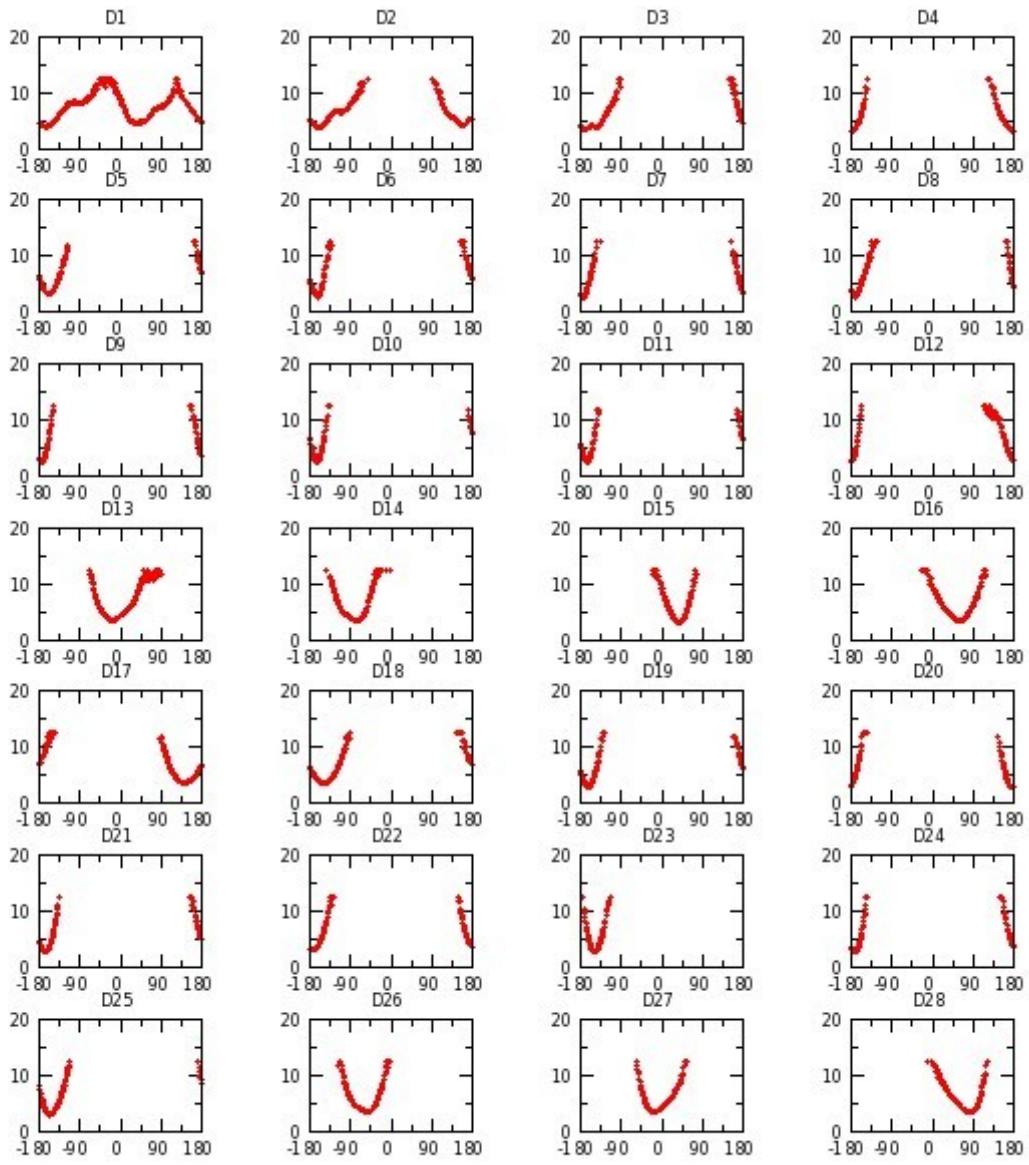


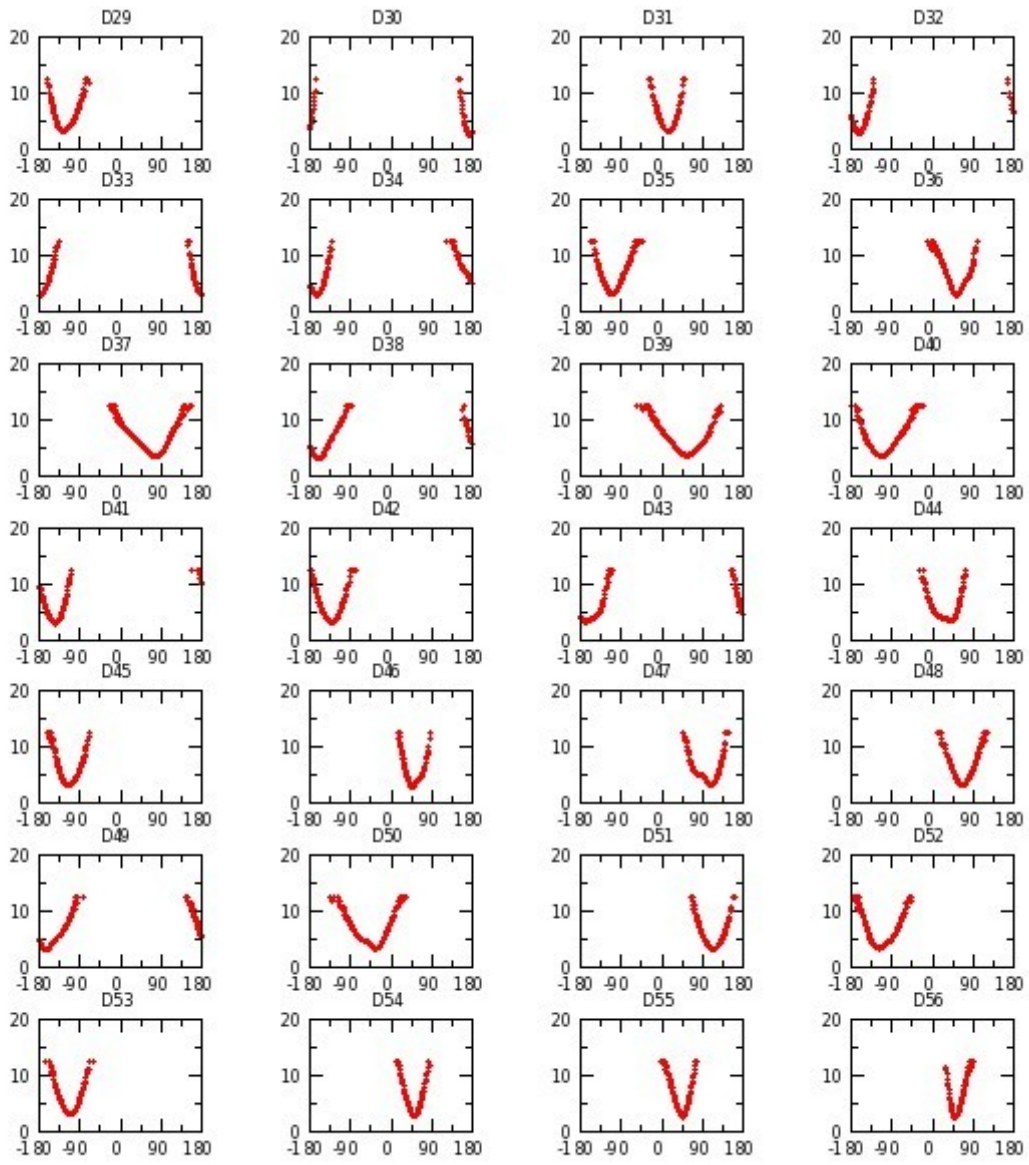


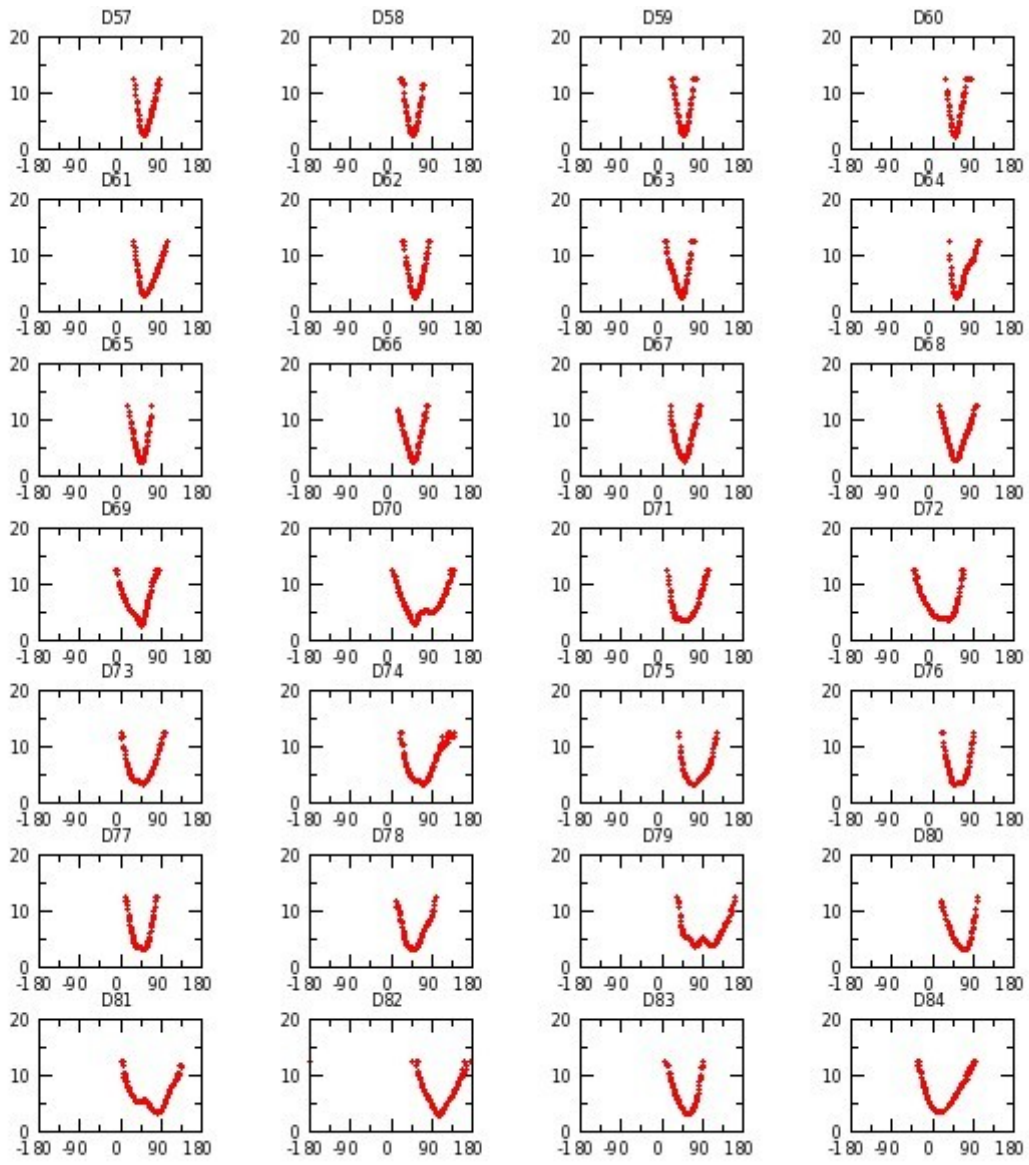


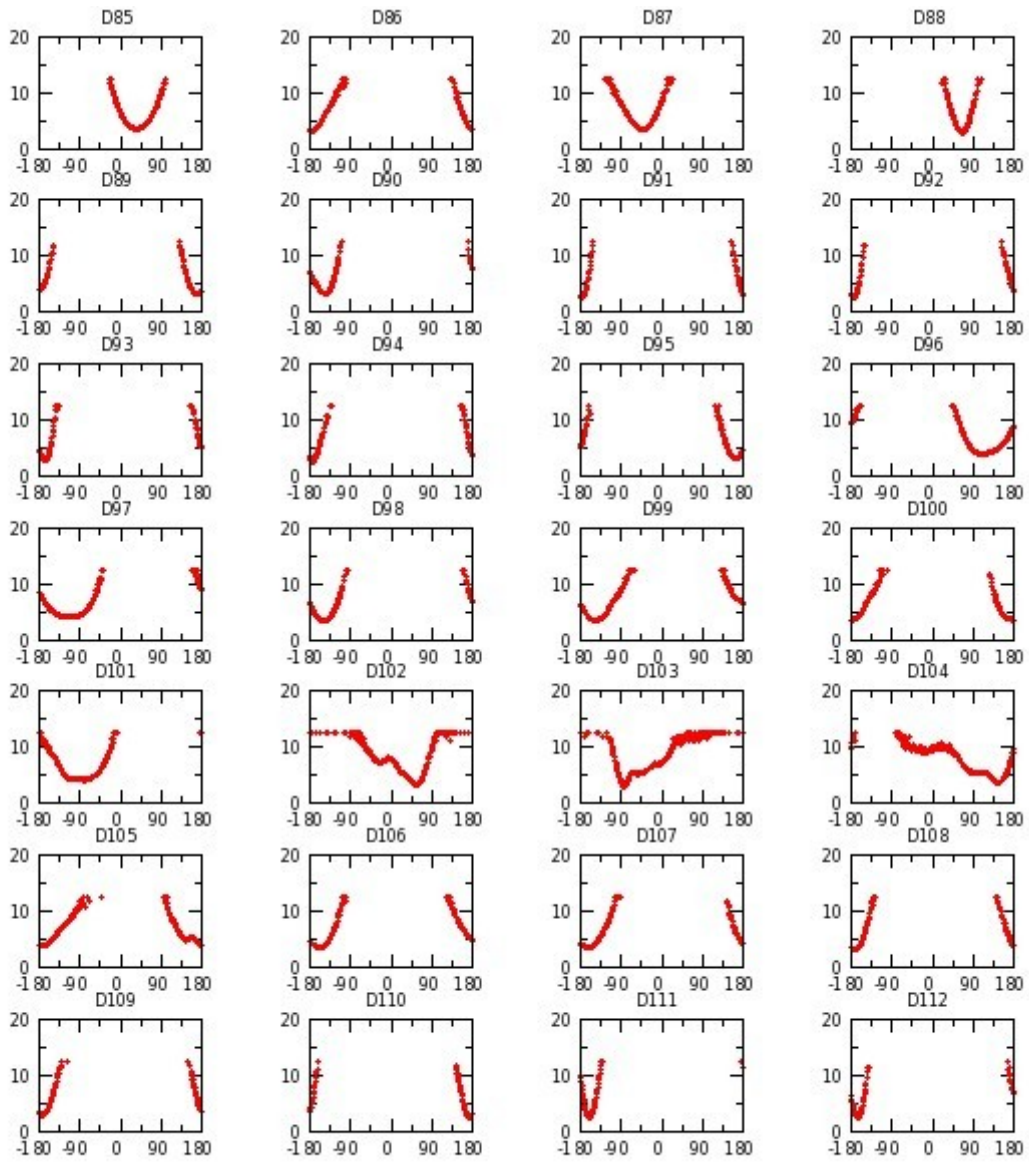


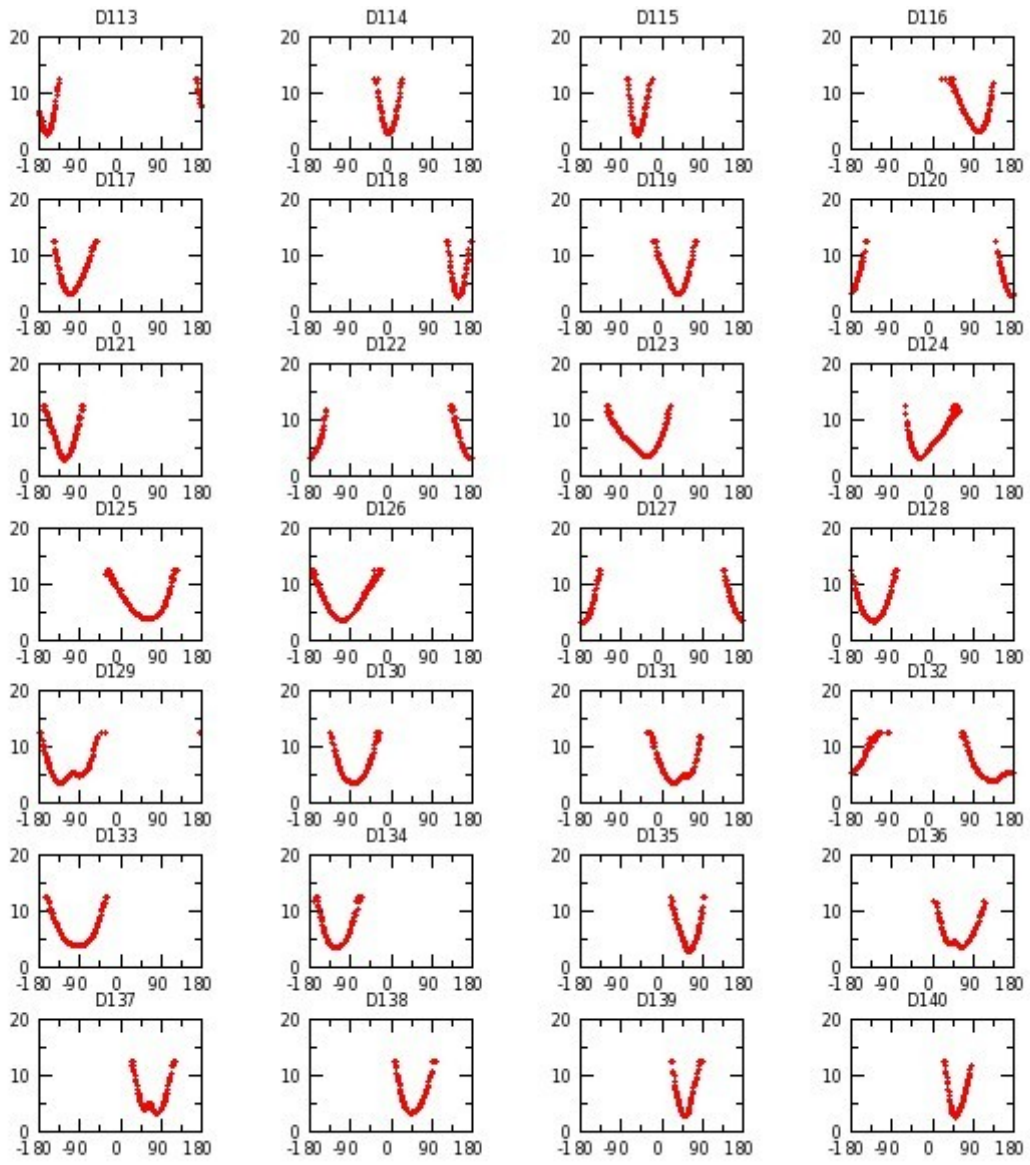
Annexe G 37 : M_GOF réplique I

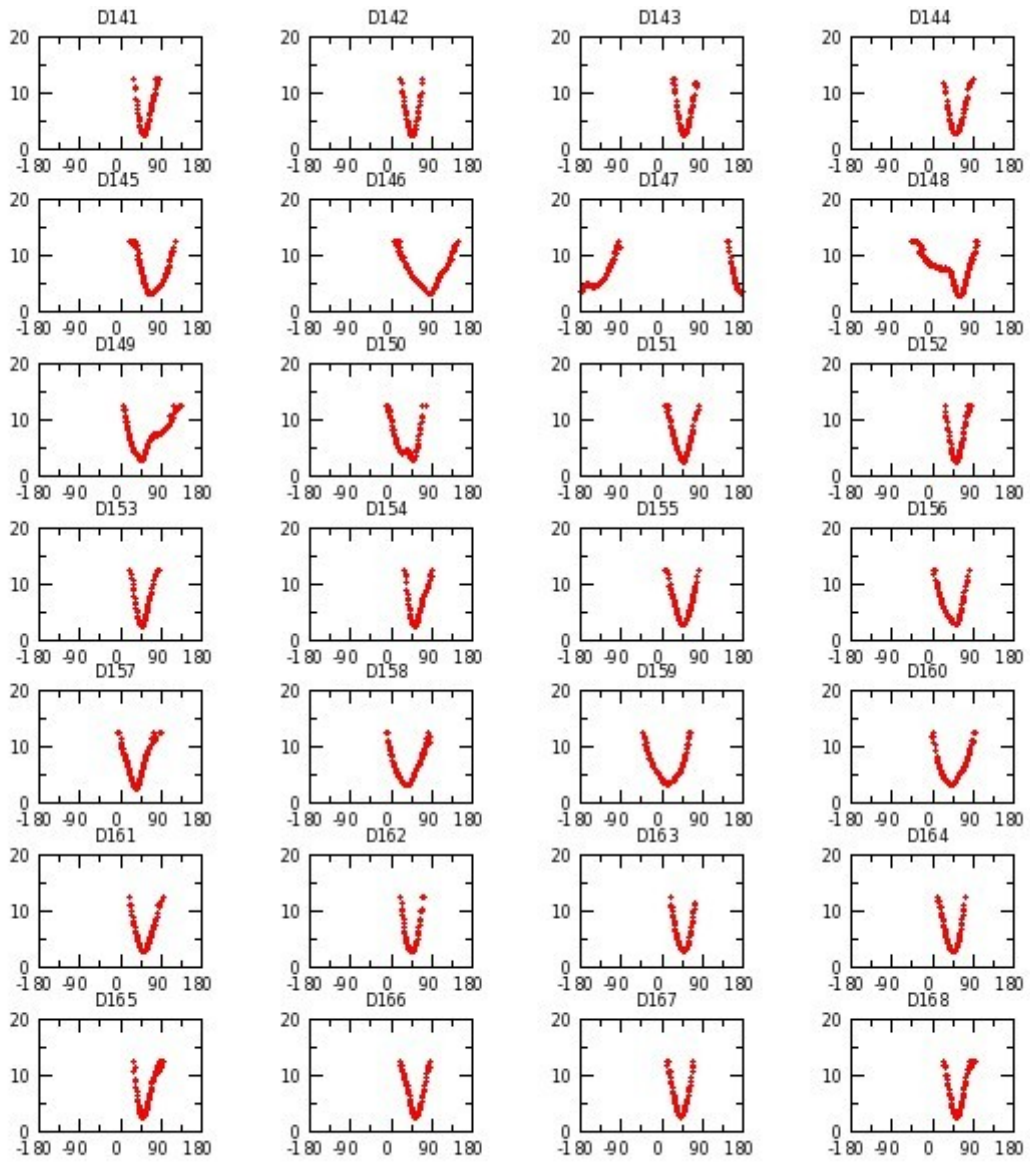


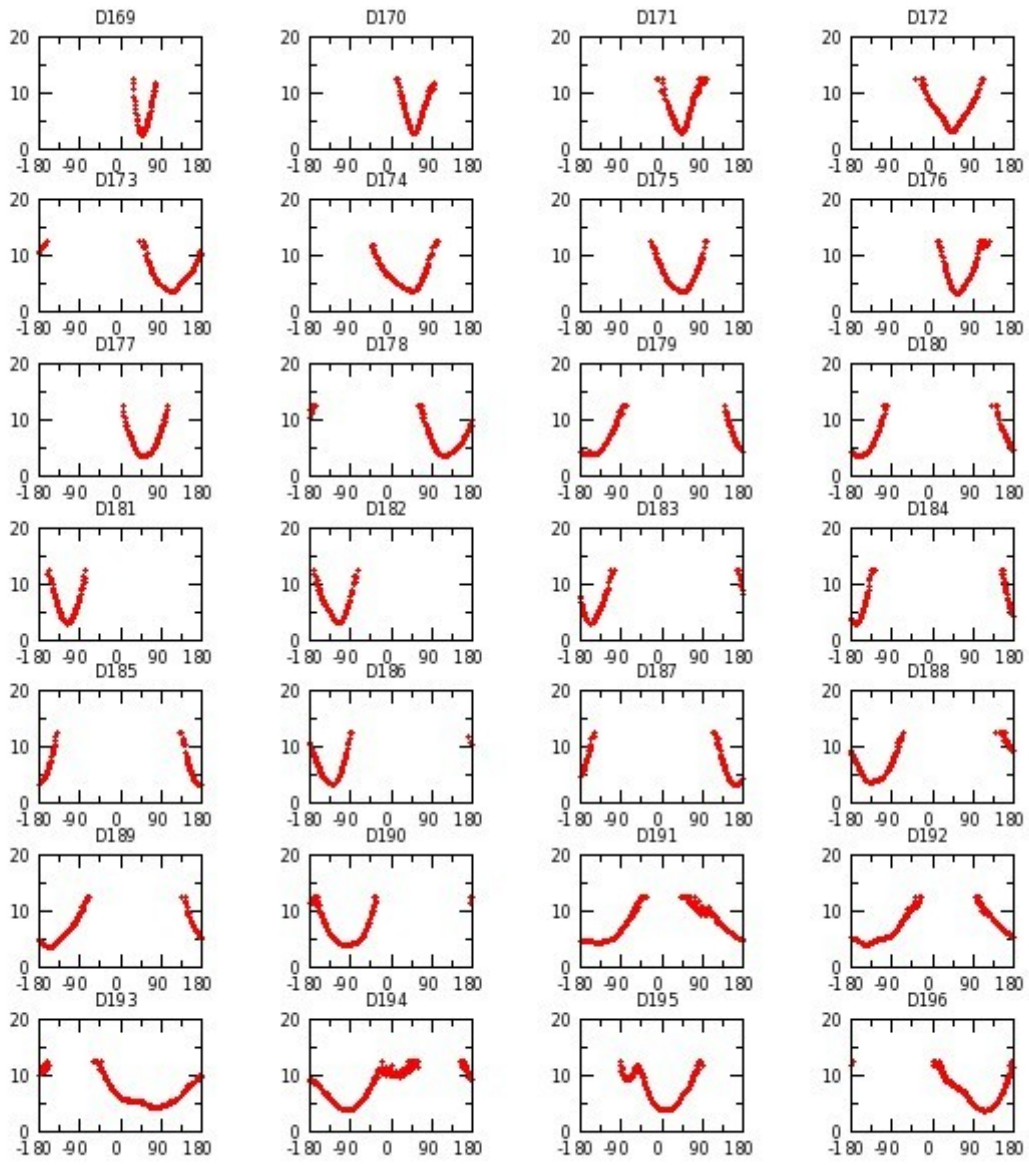


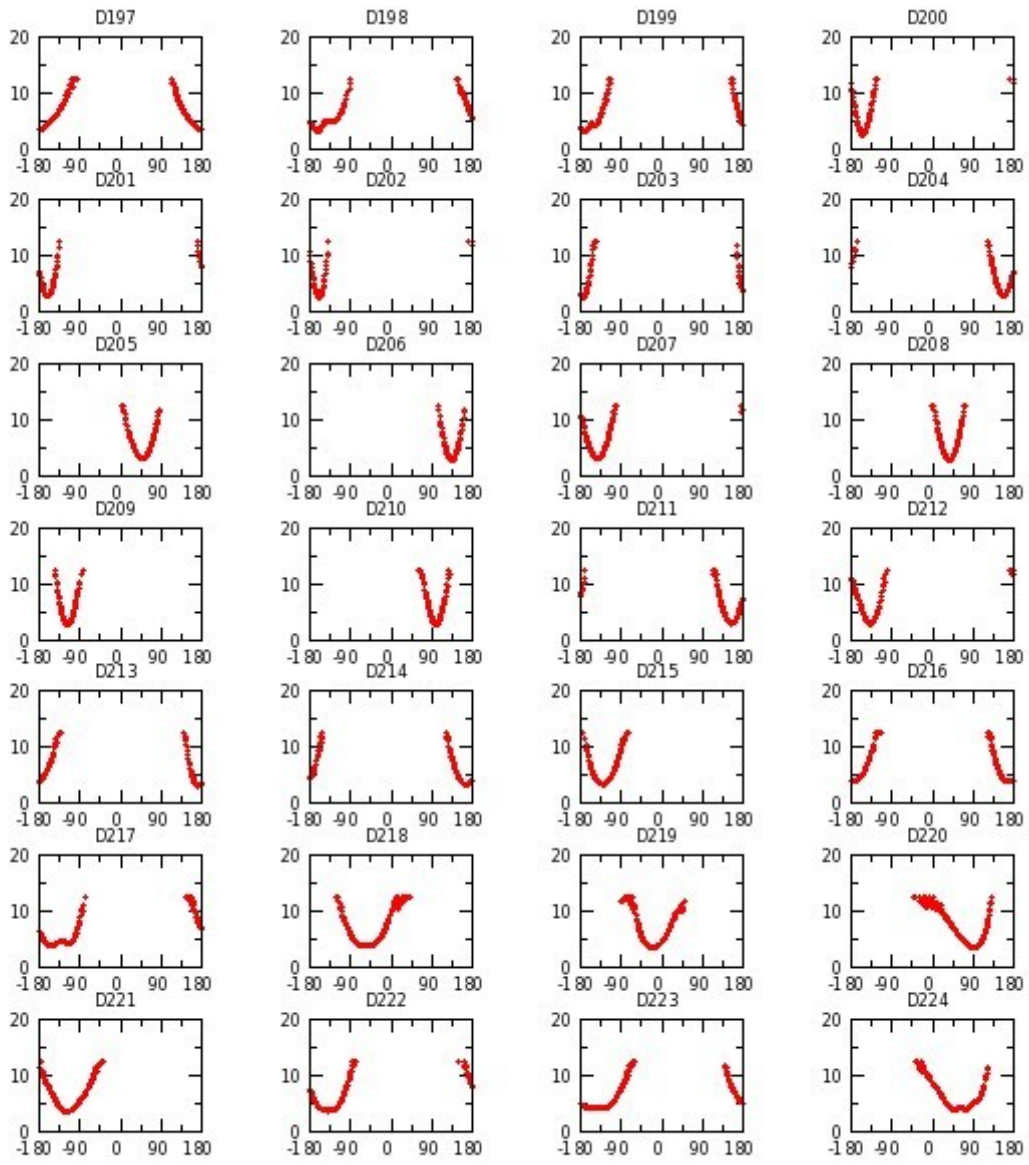


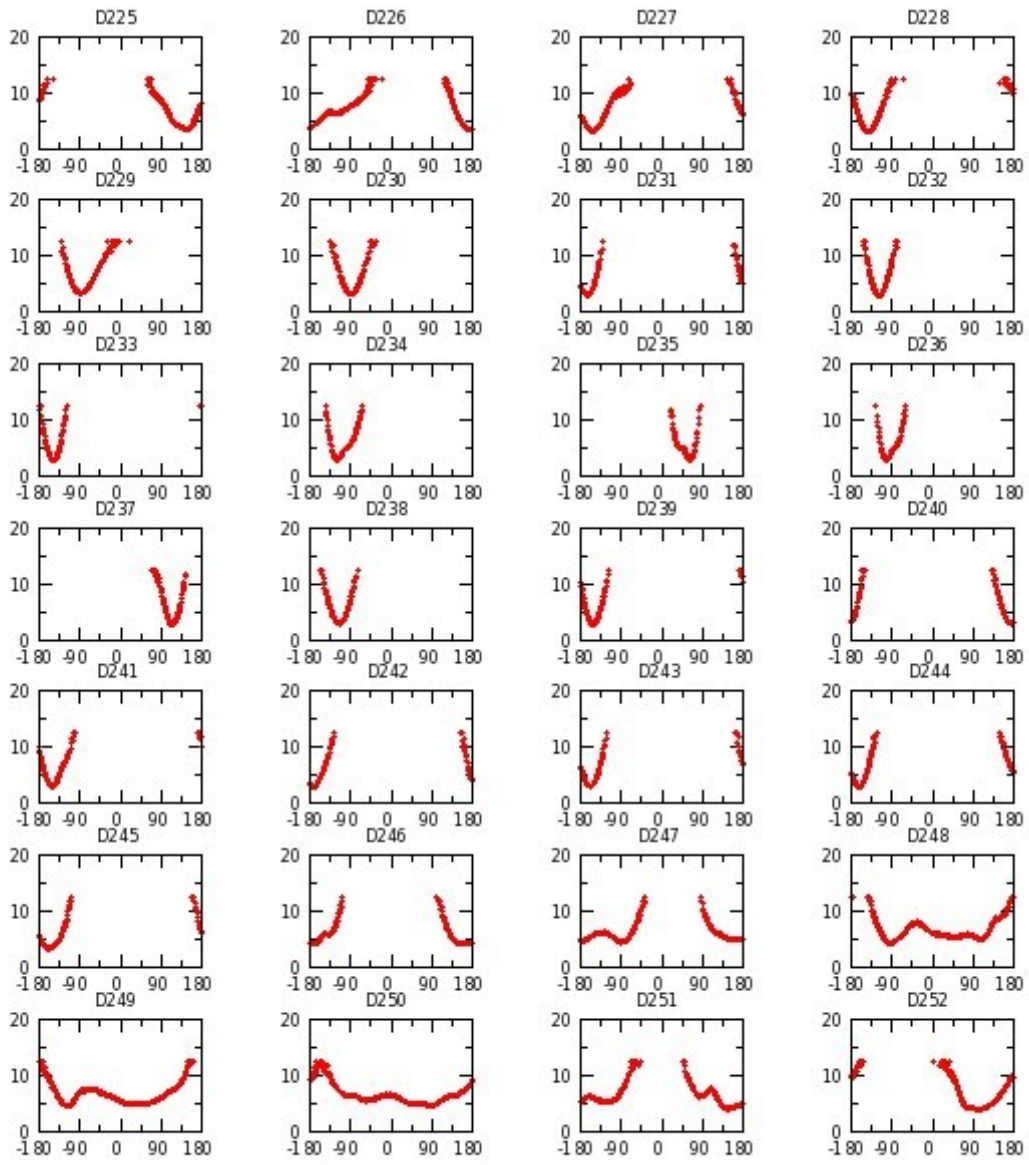


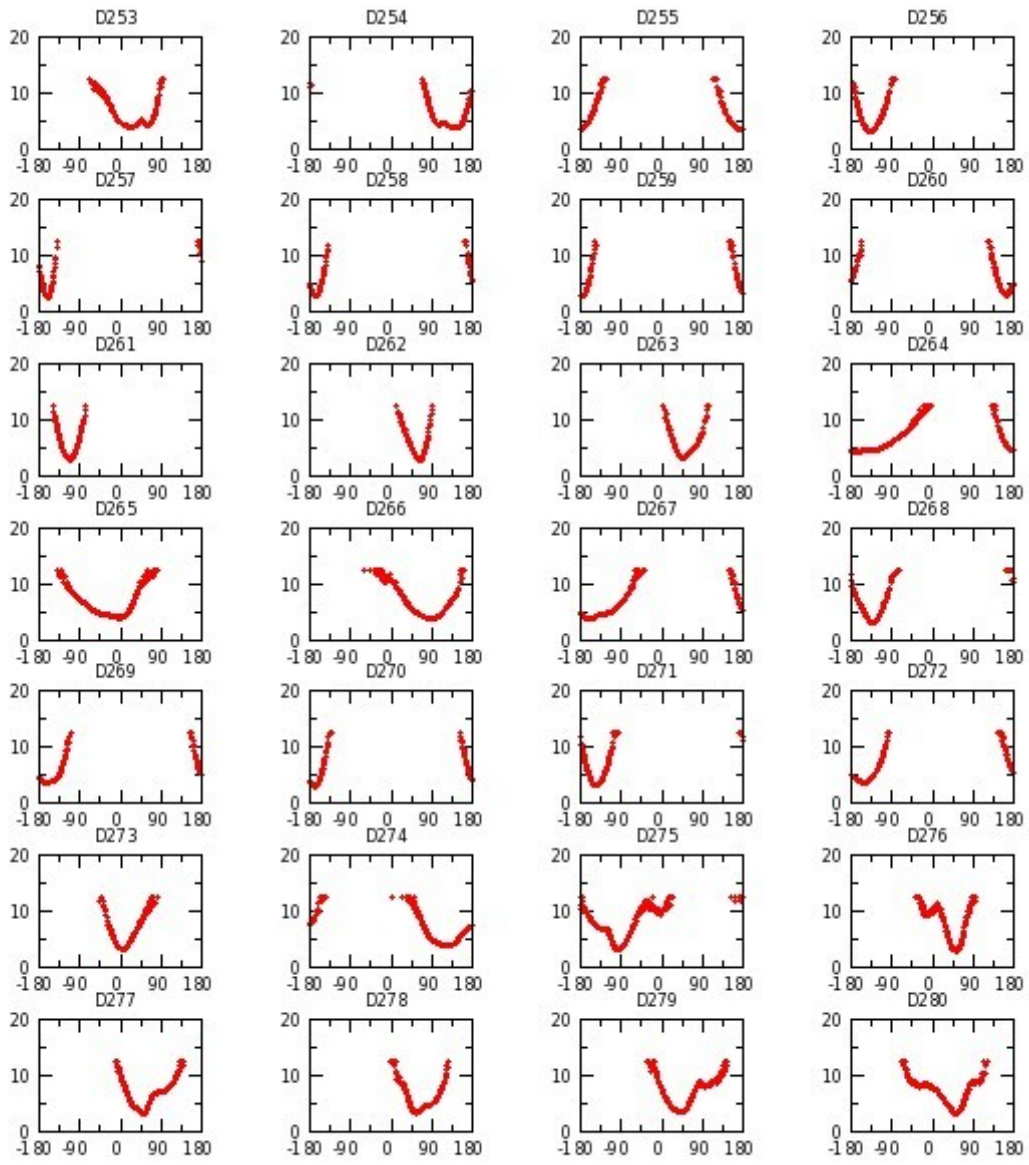


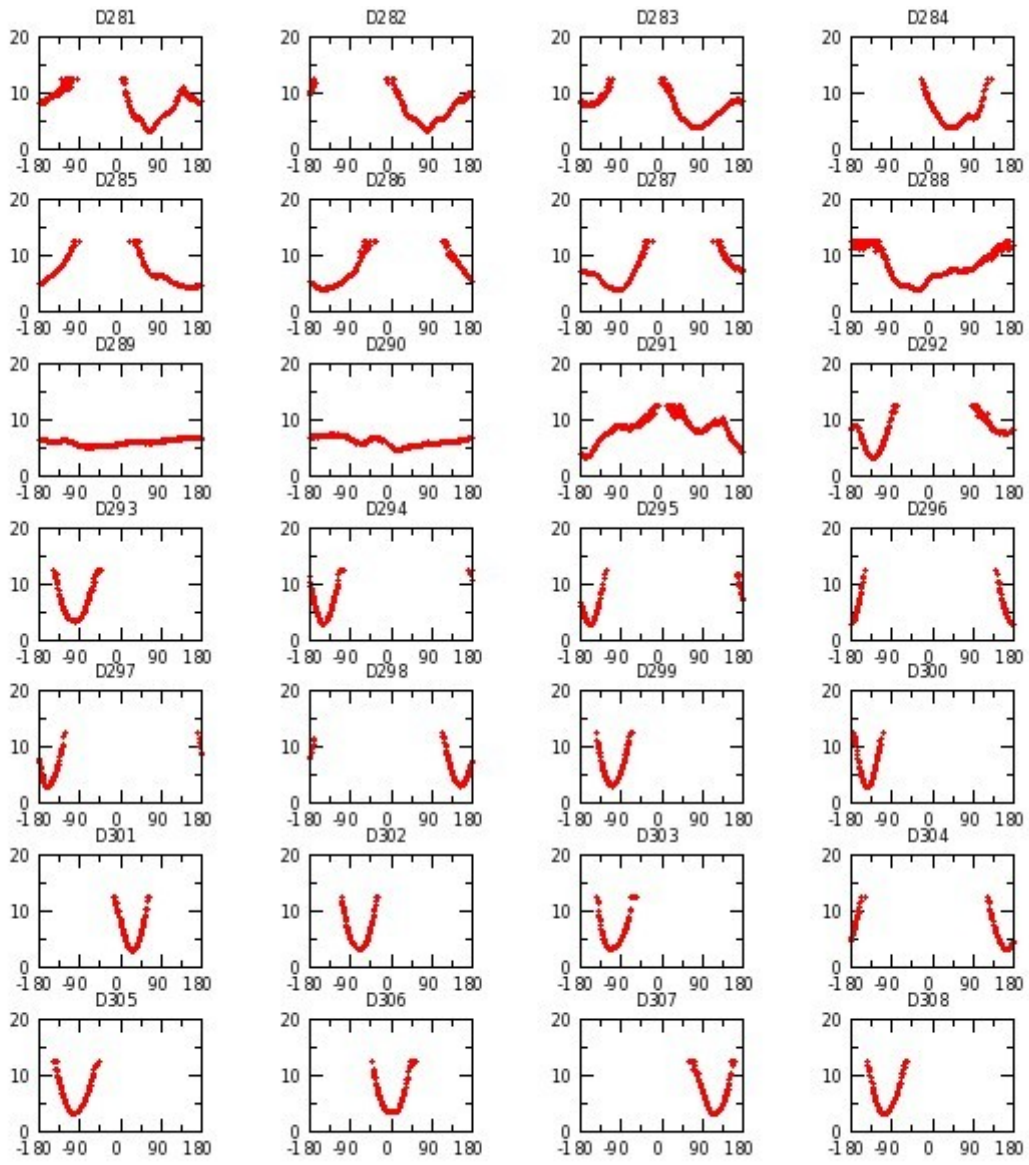


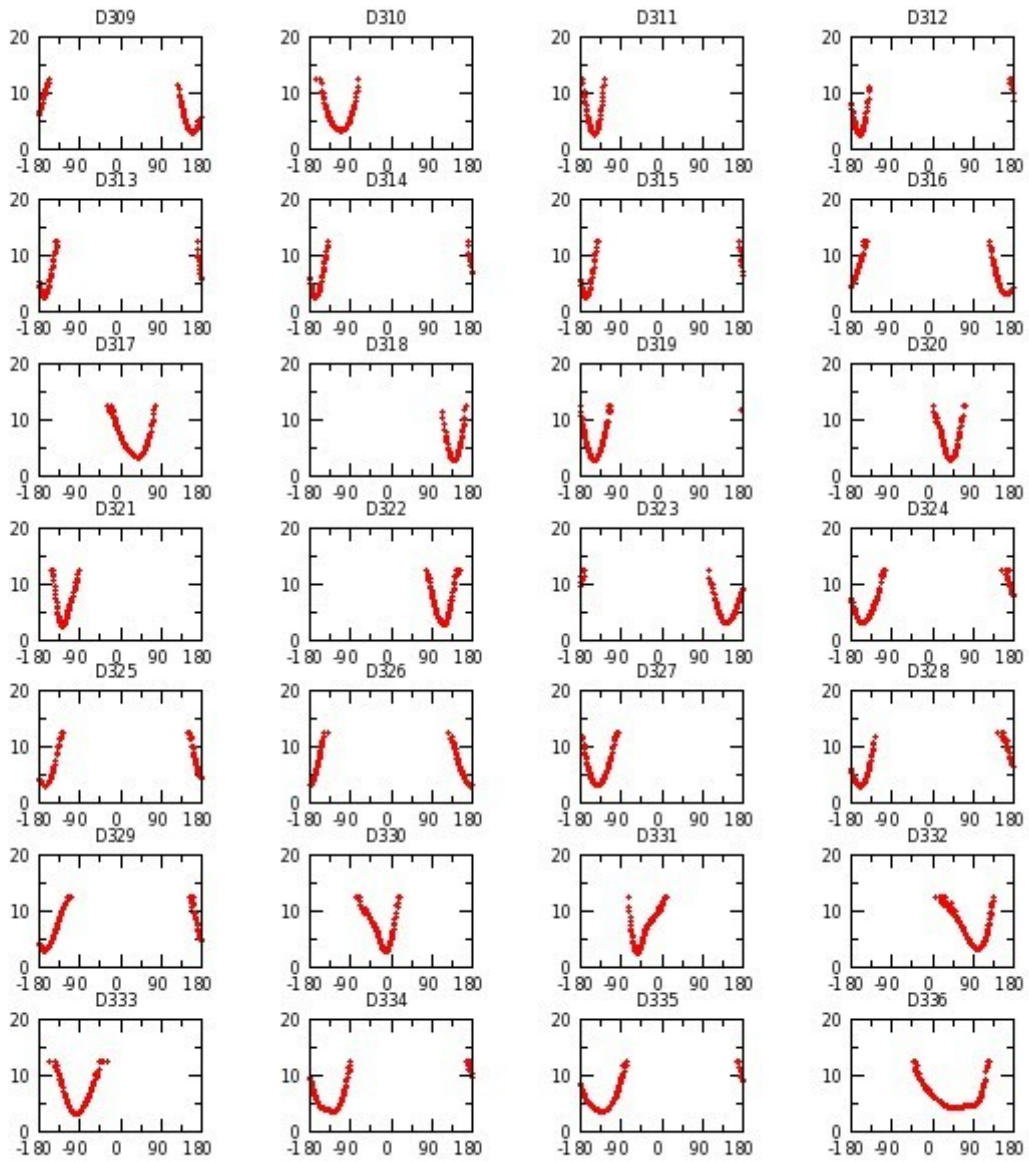


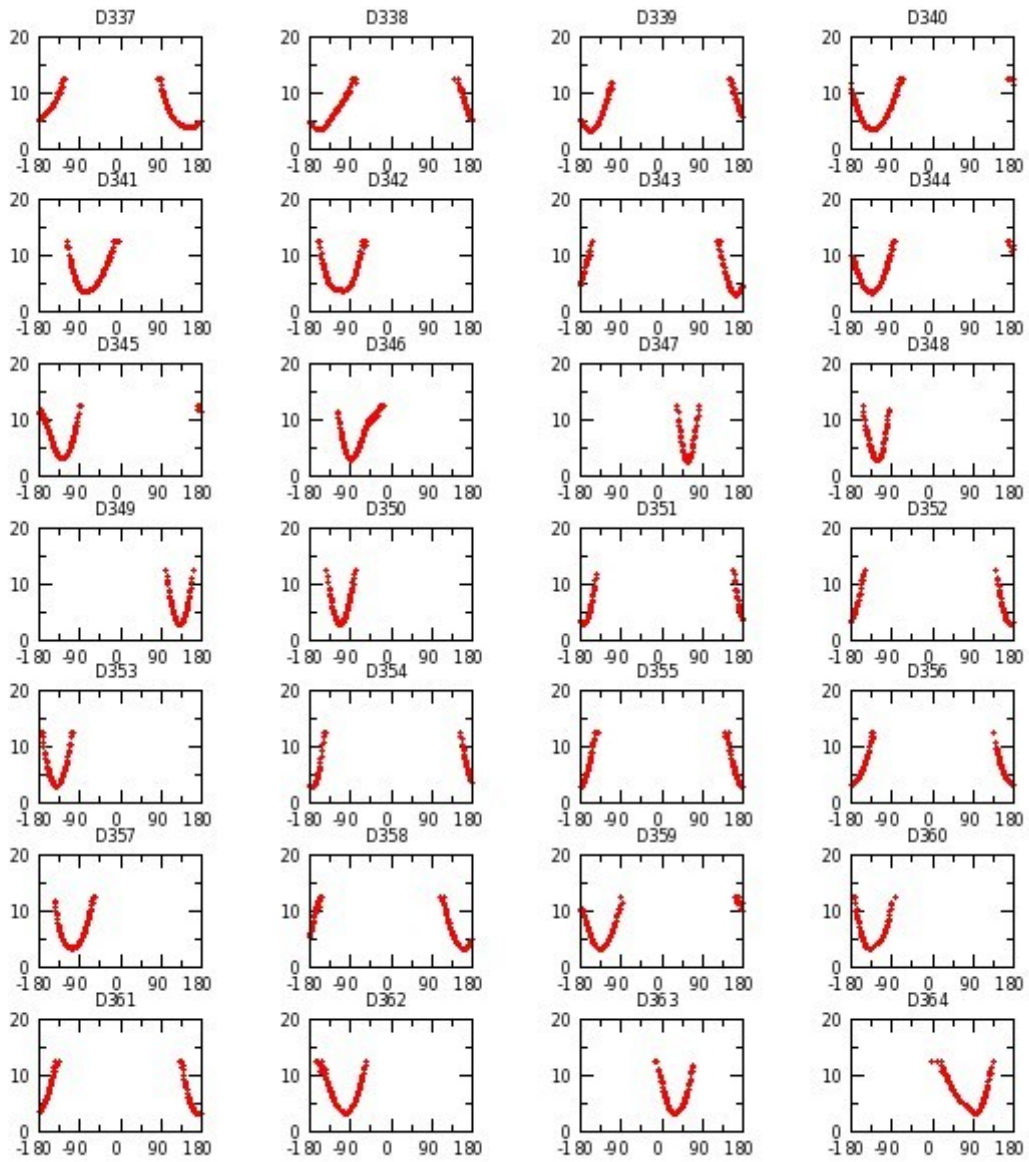


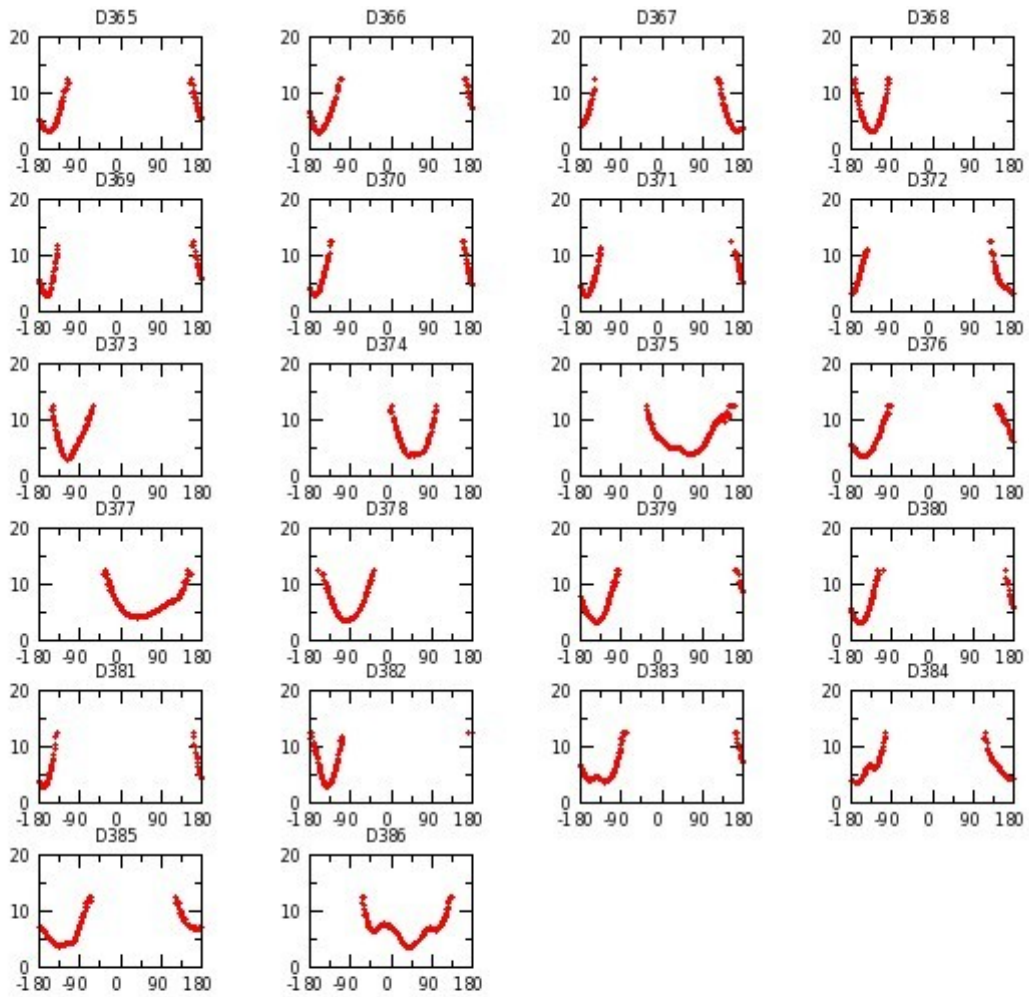




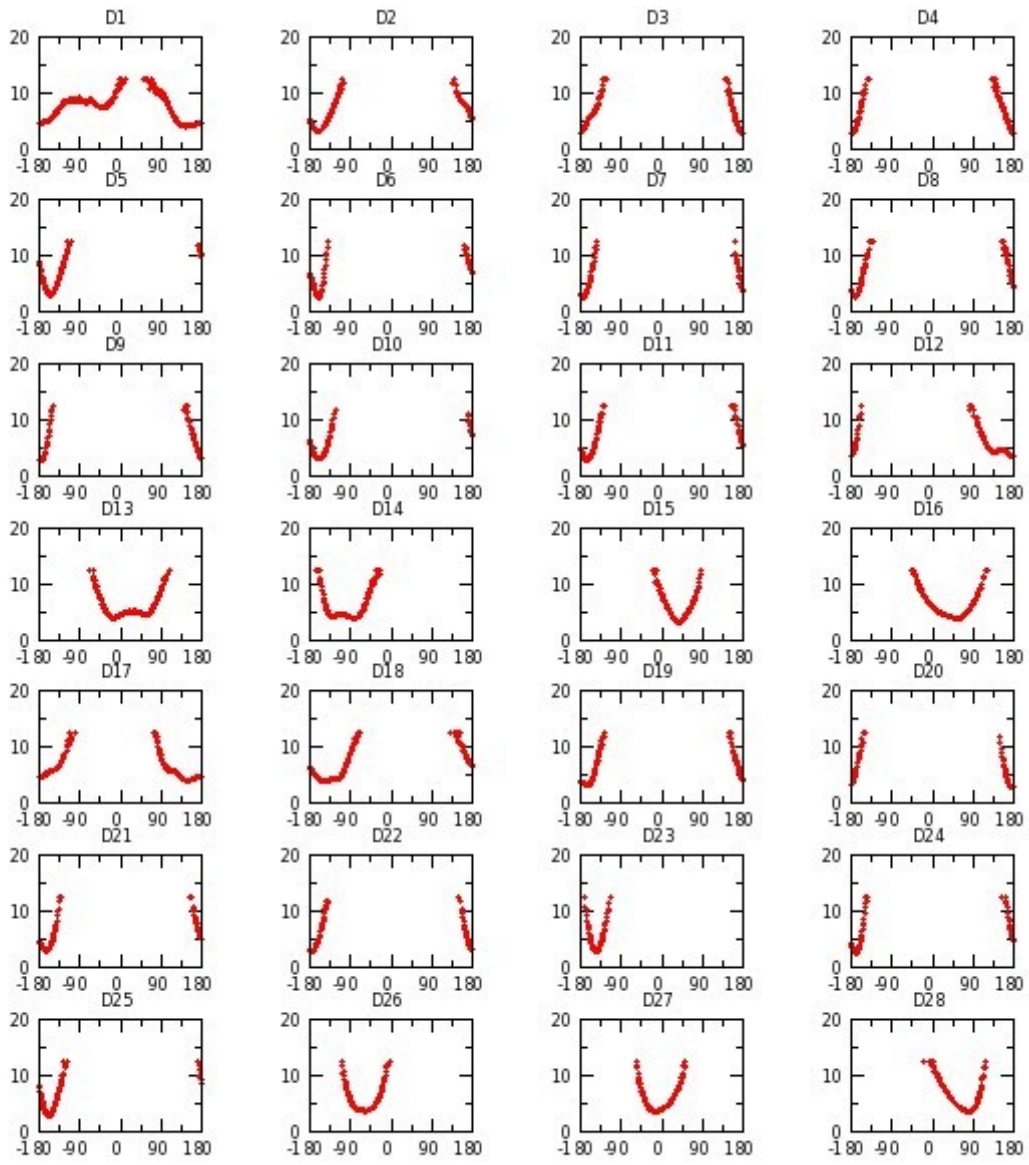


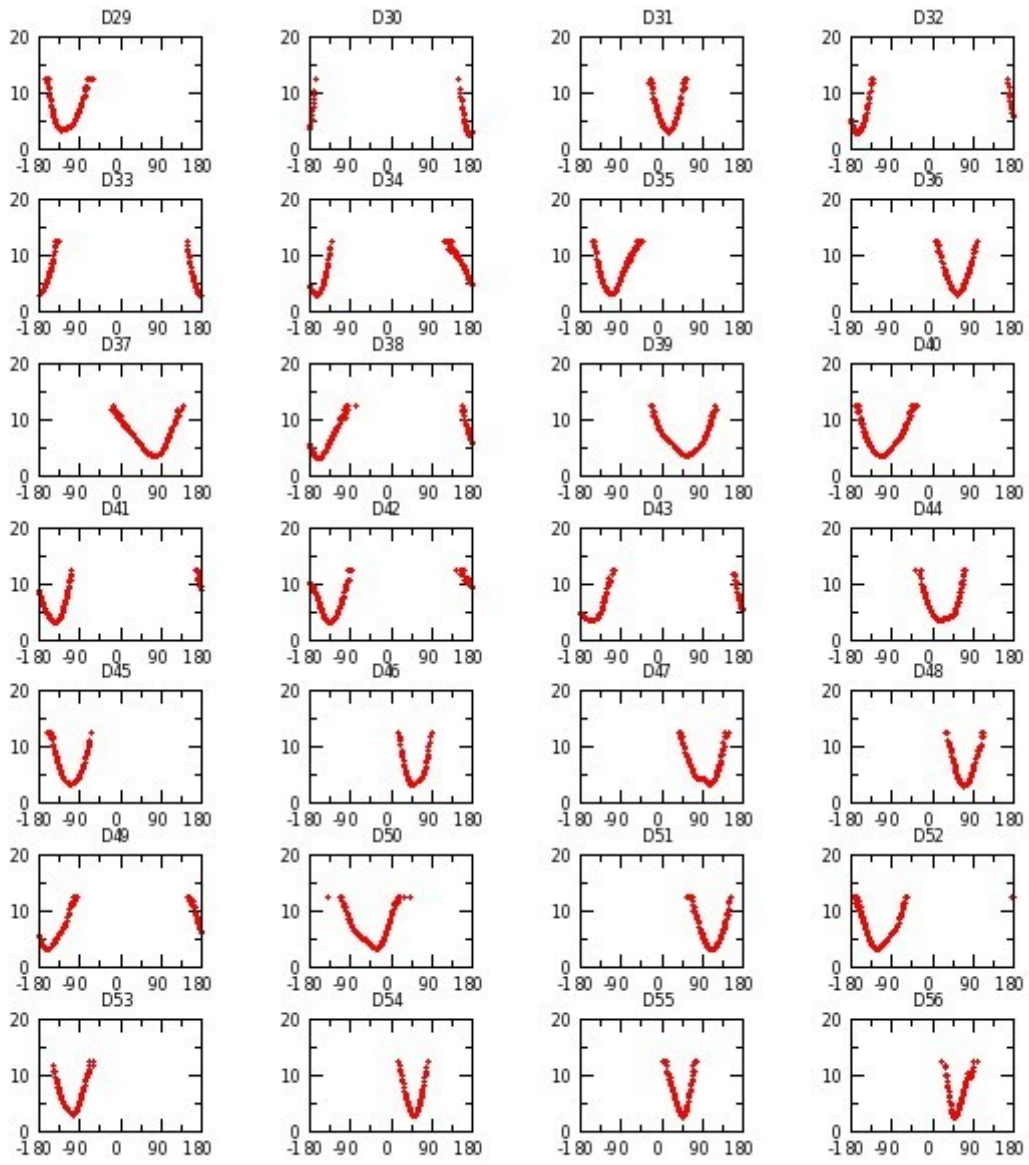


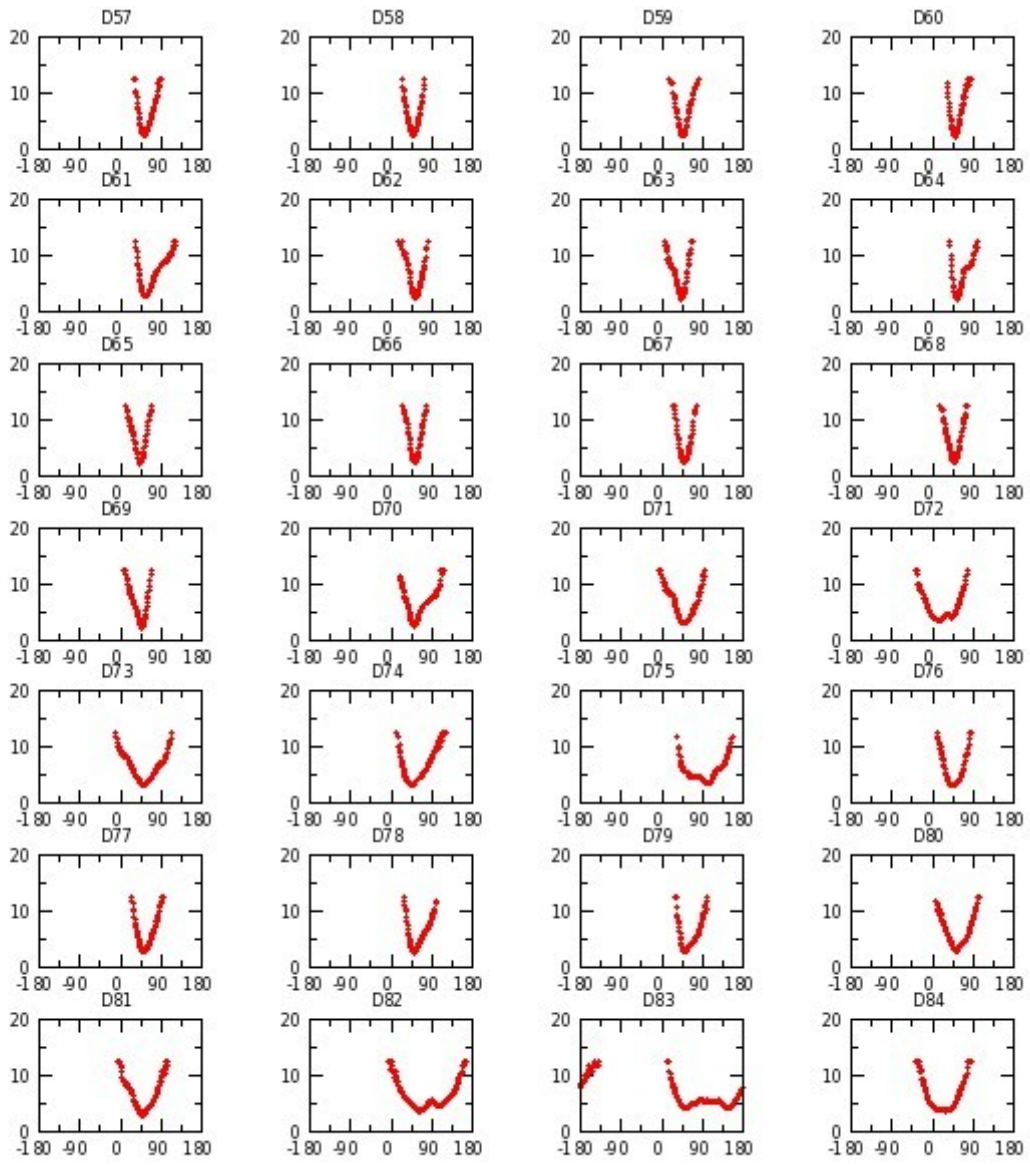


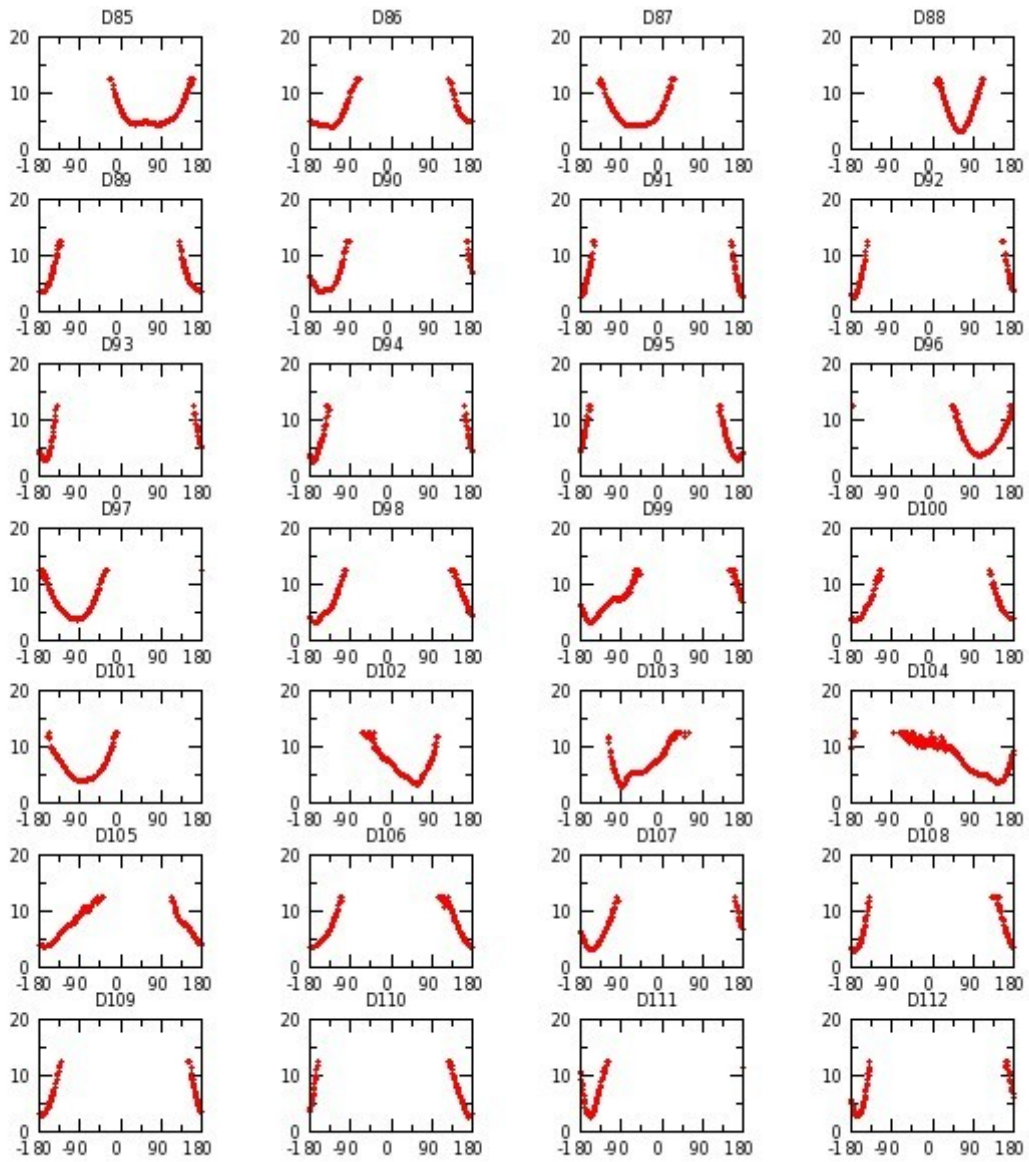


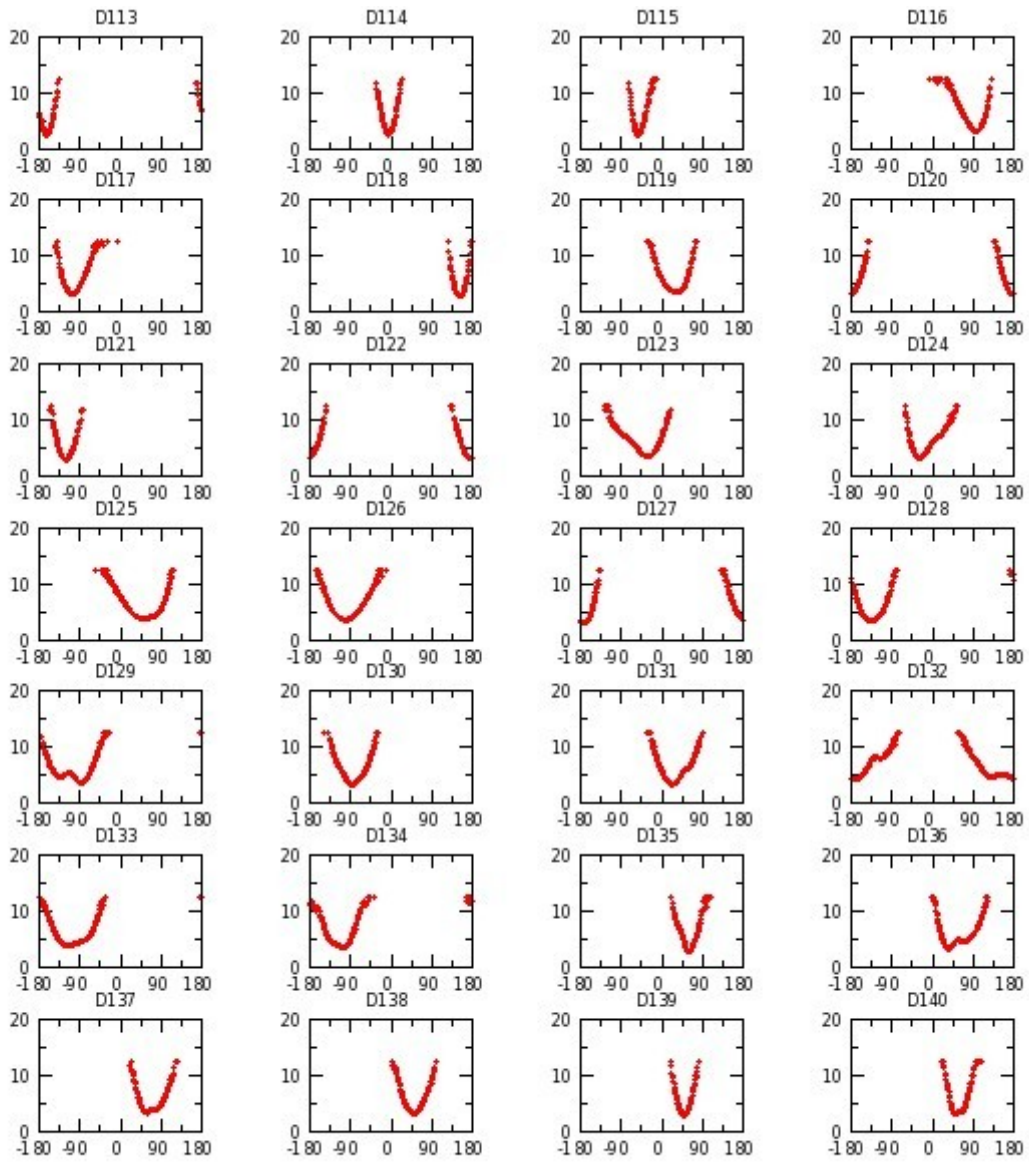
Annexe G 38 : M_GOF réplique II

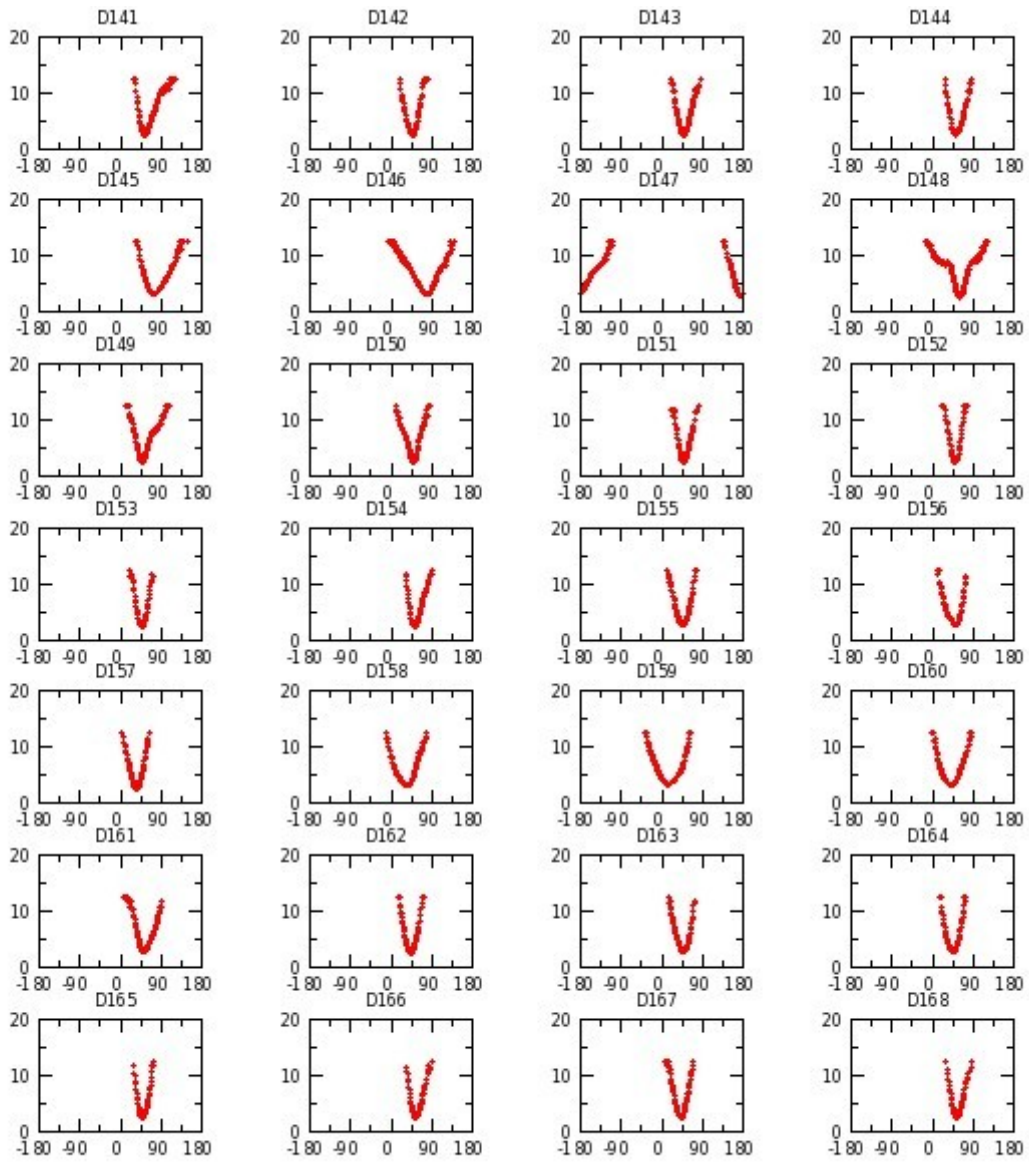


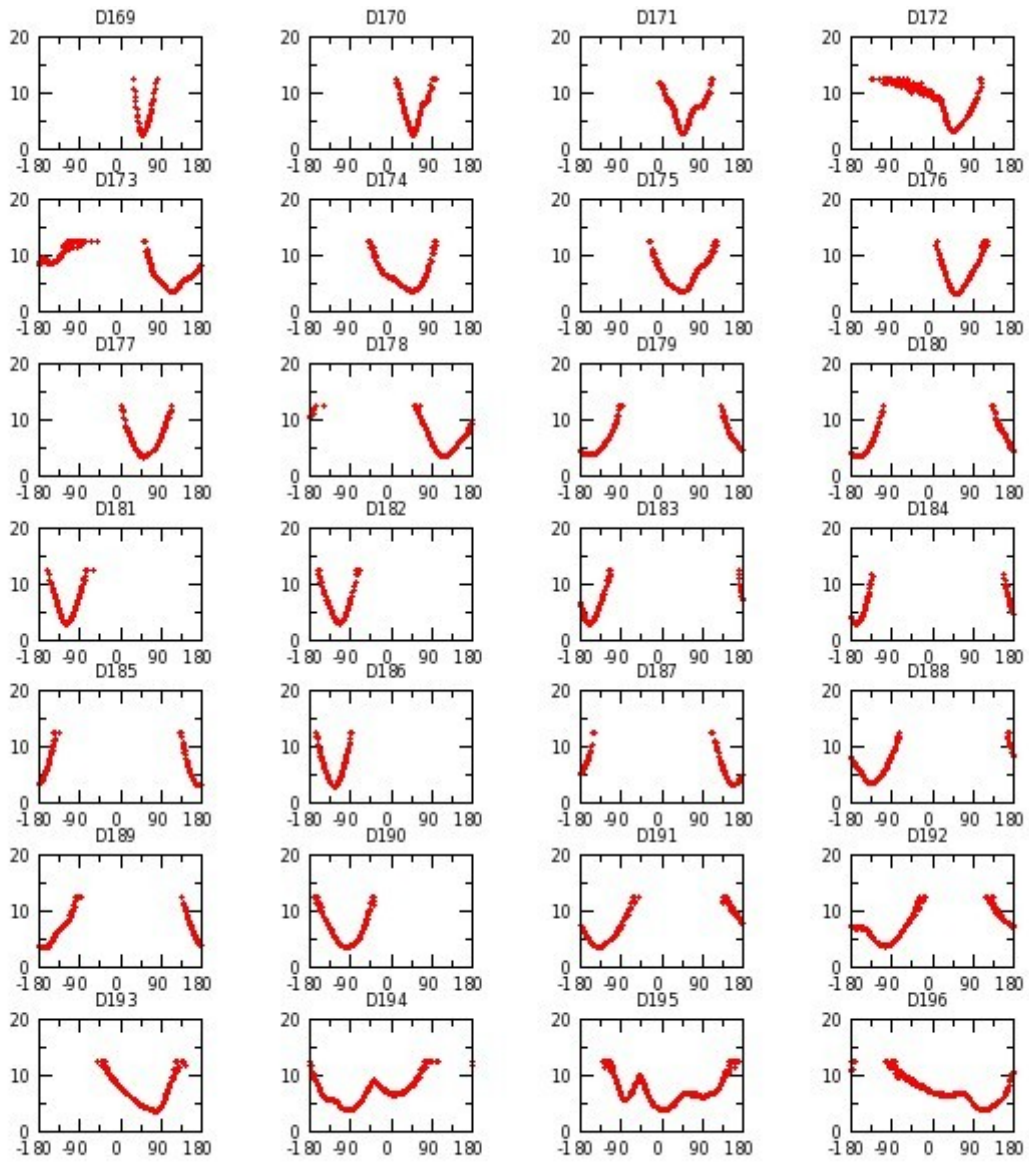


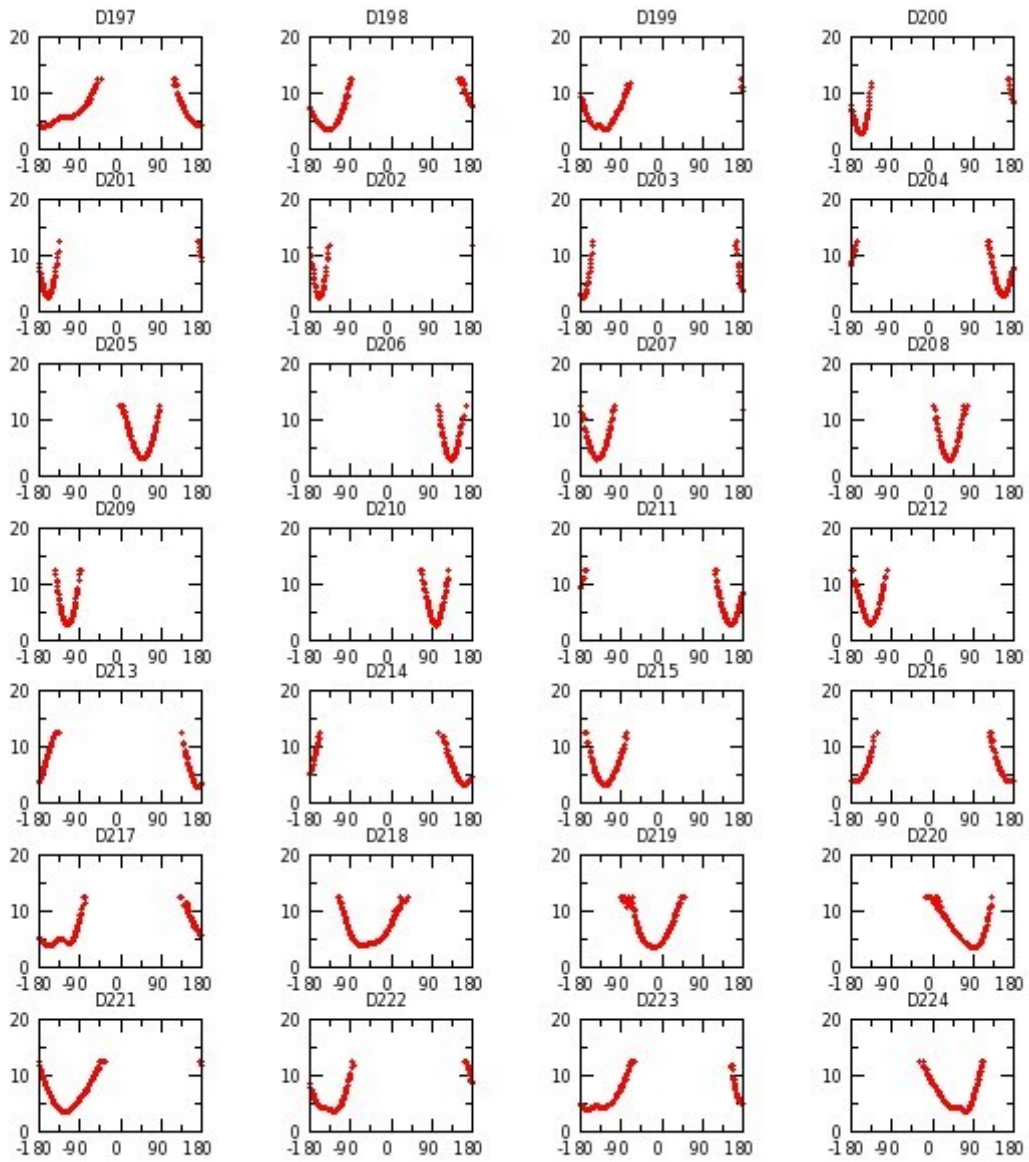


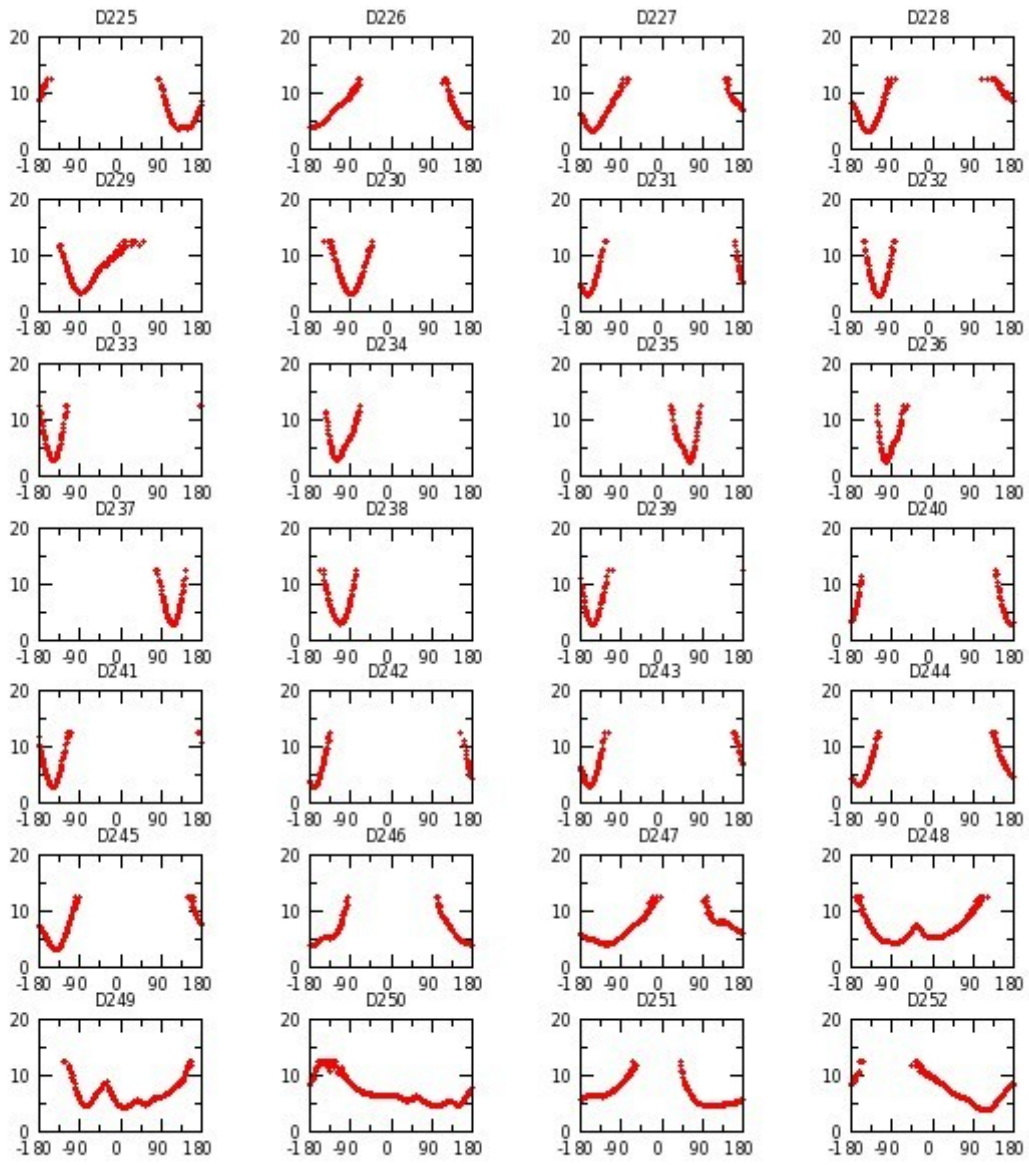


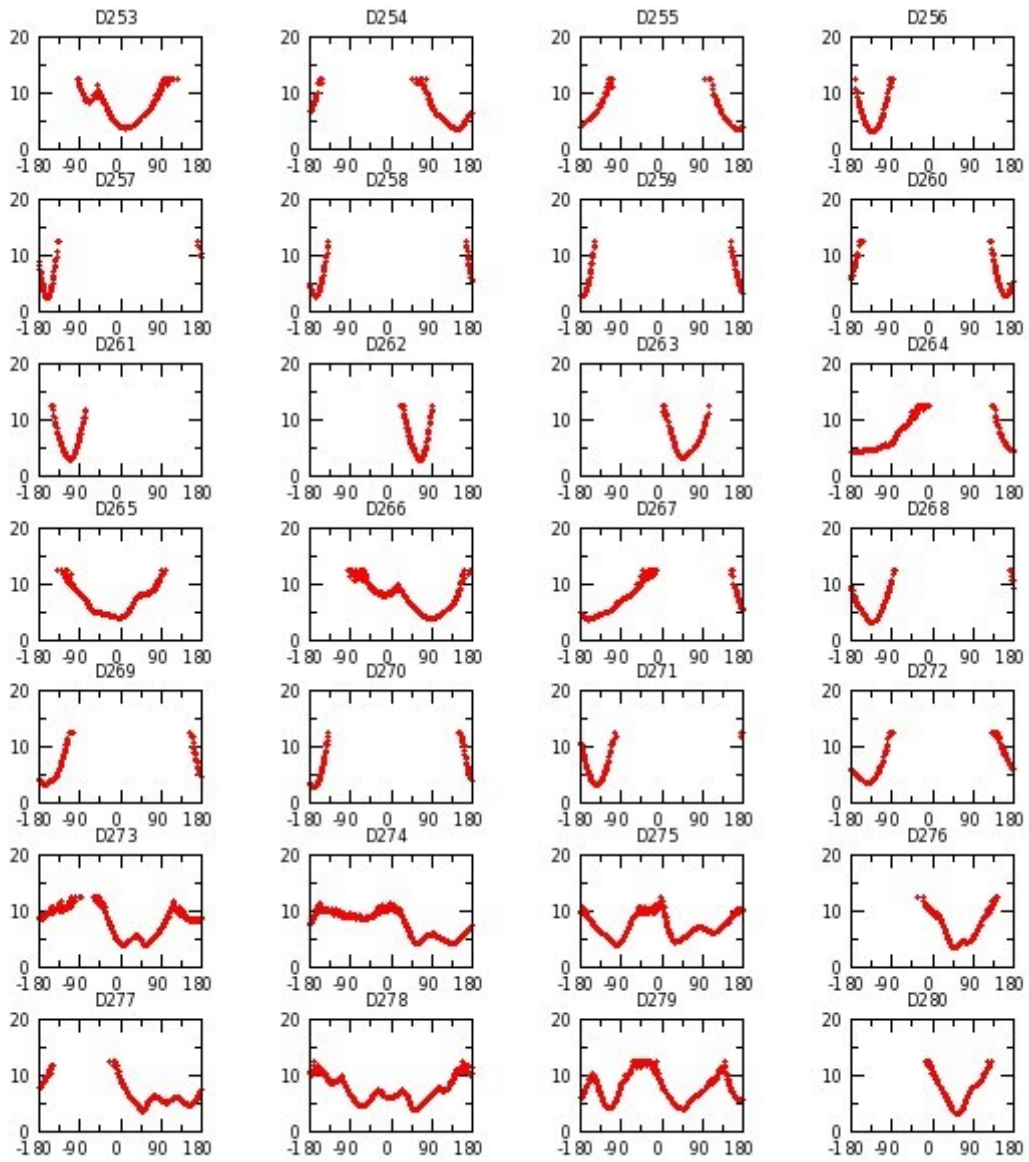


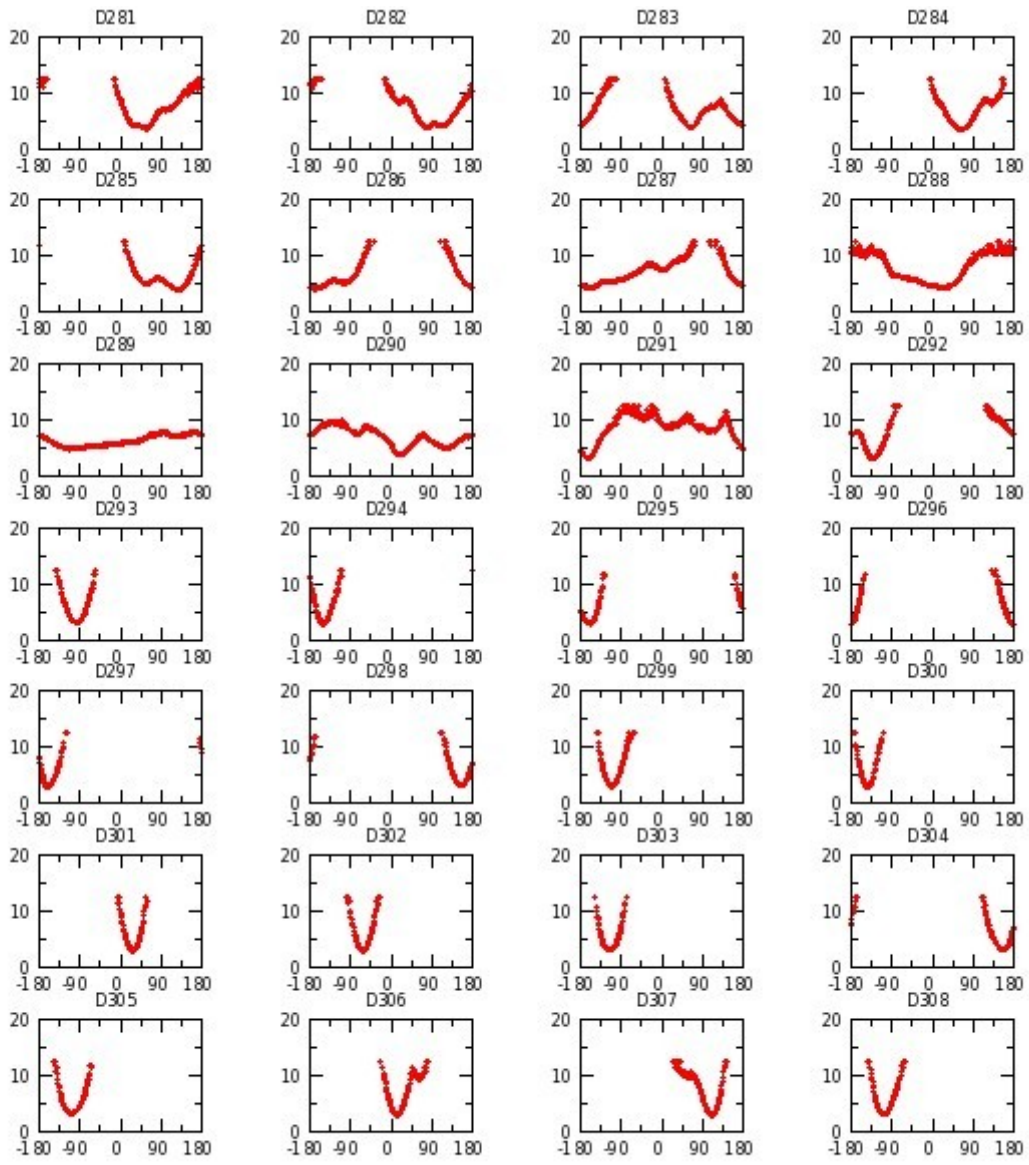


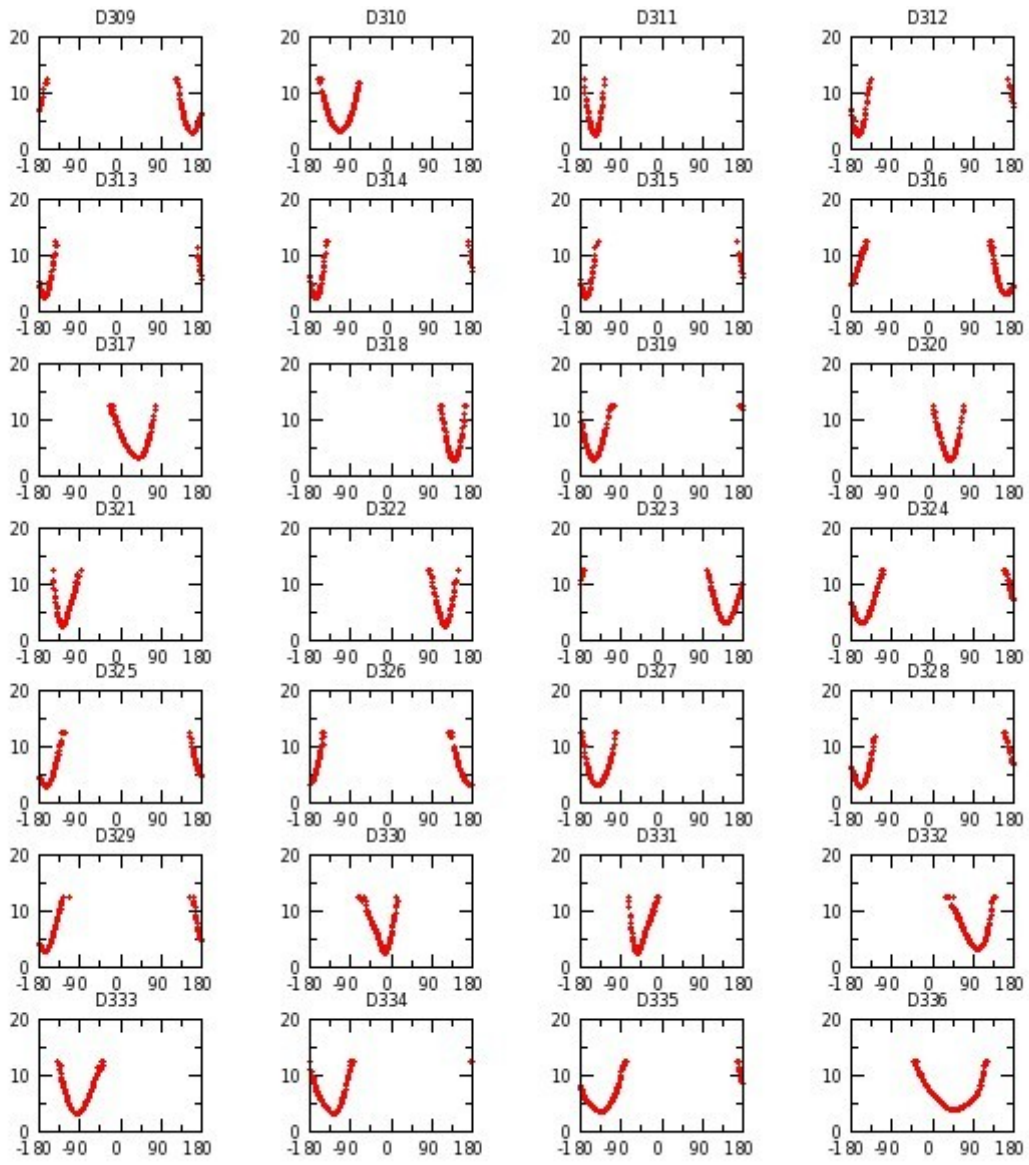


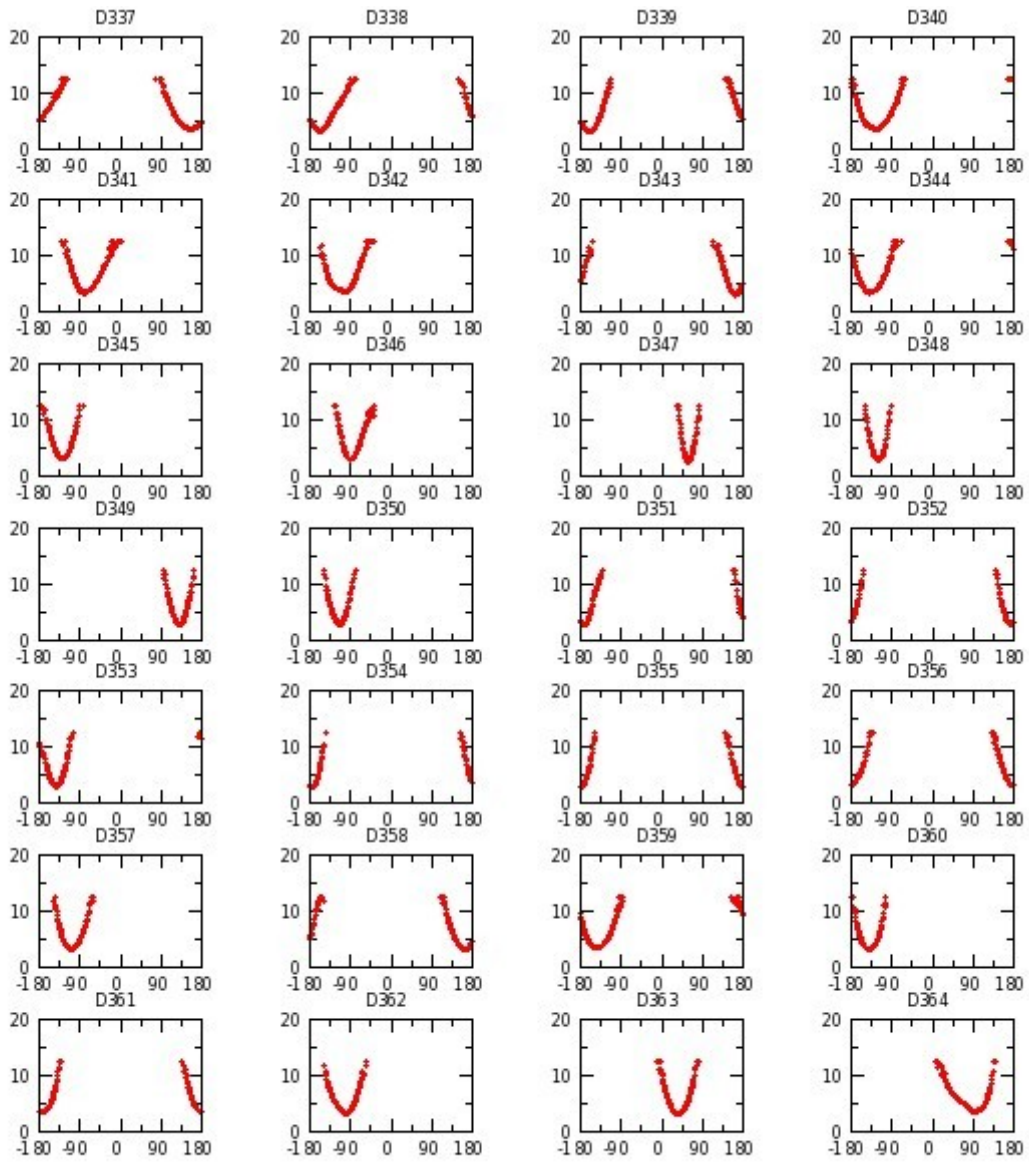


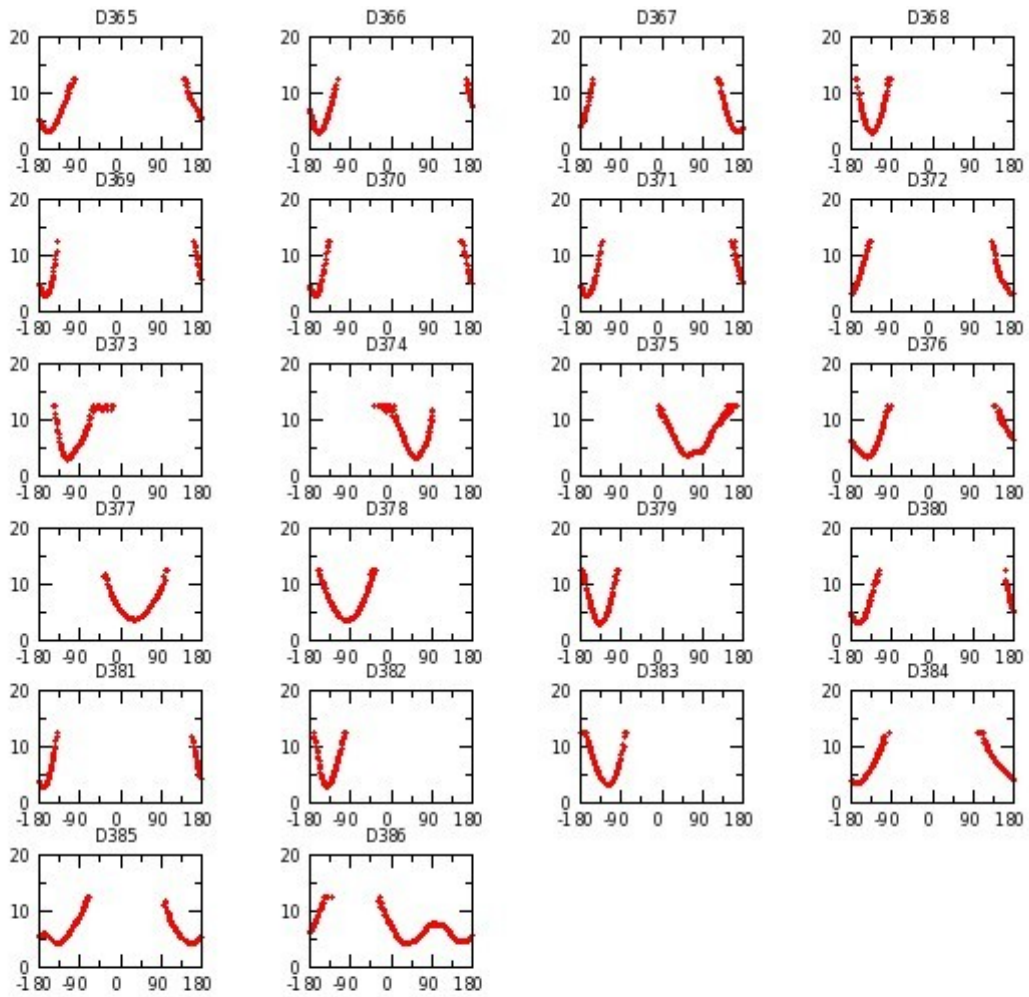




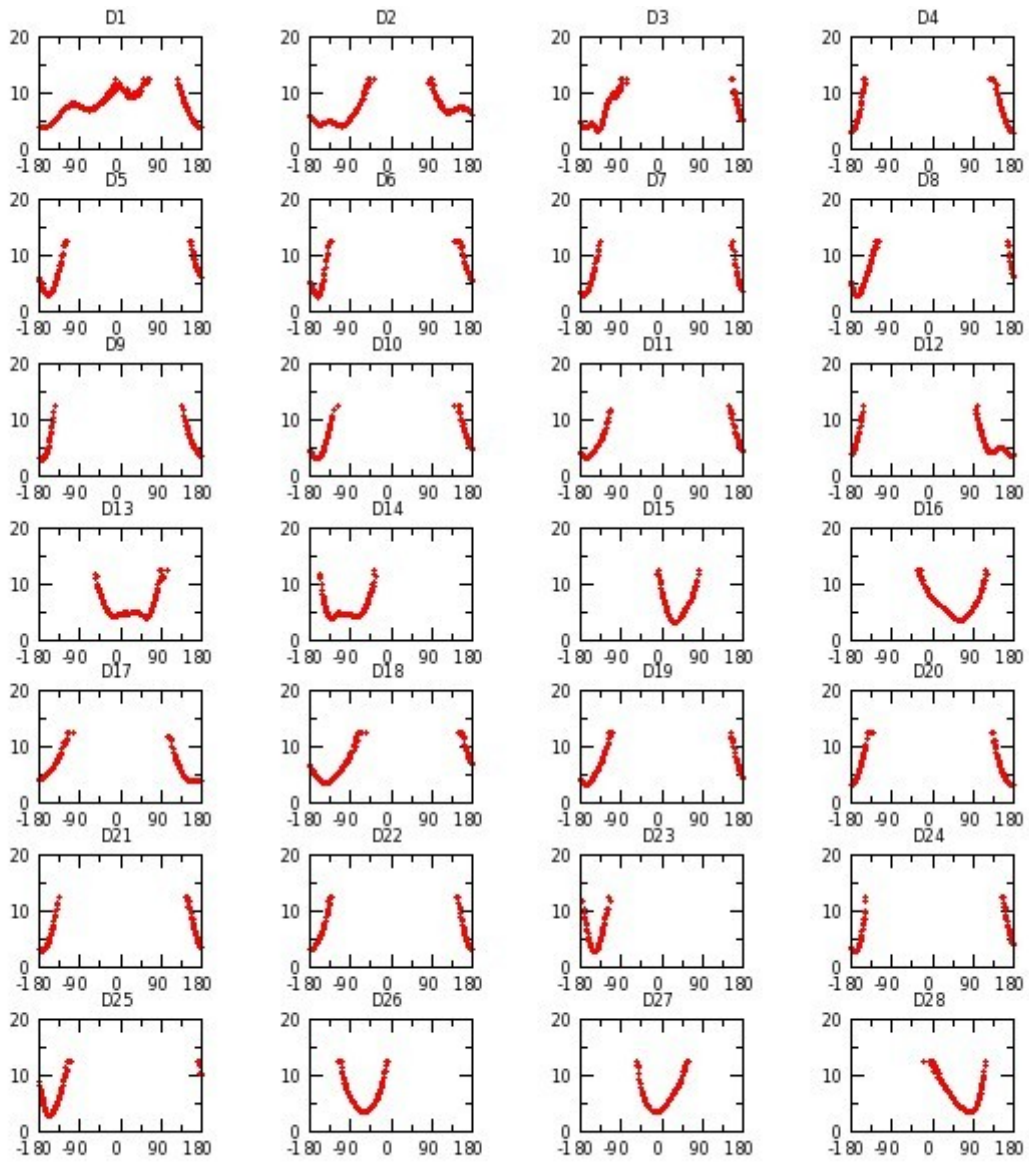


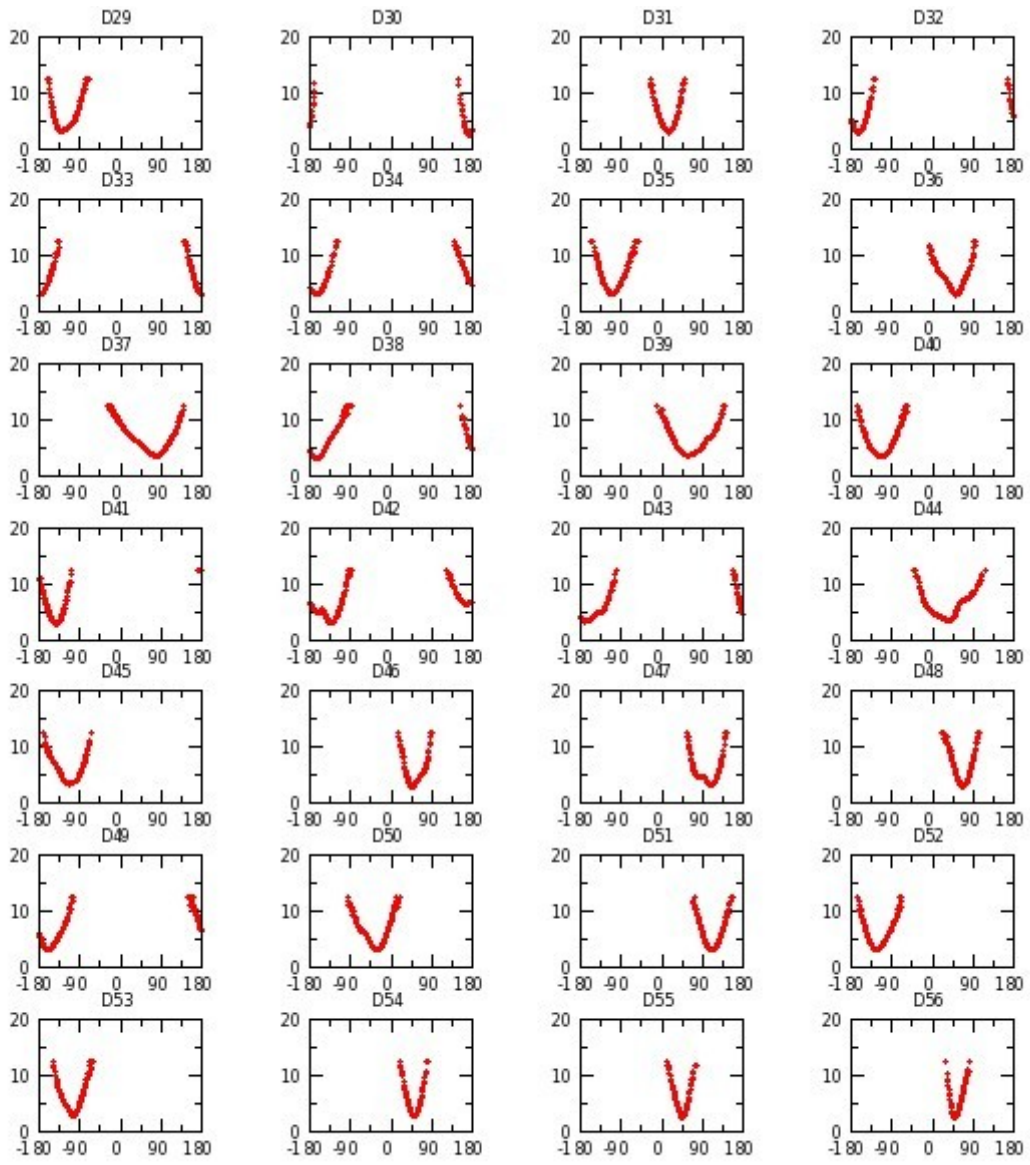


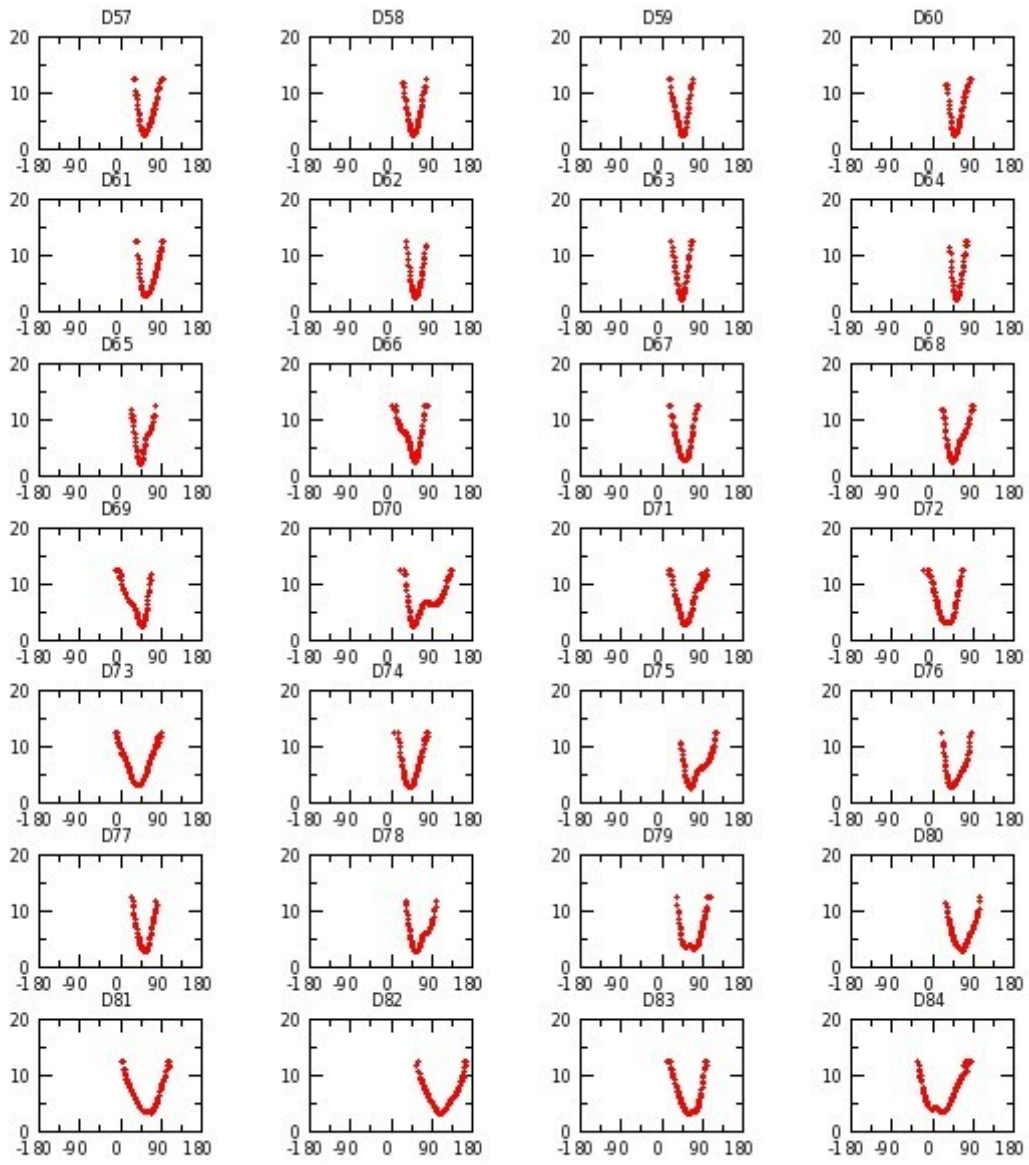


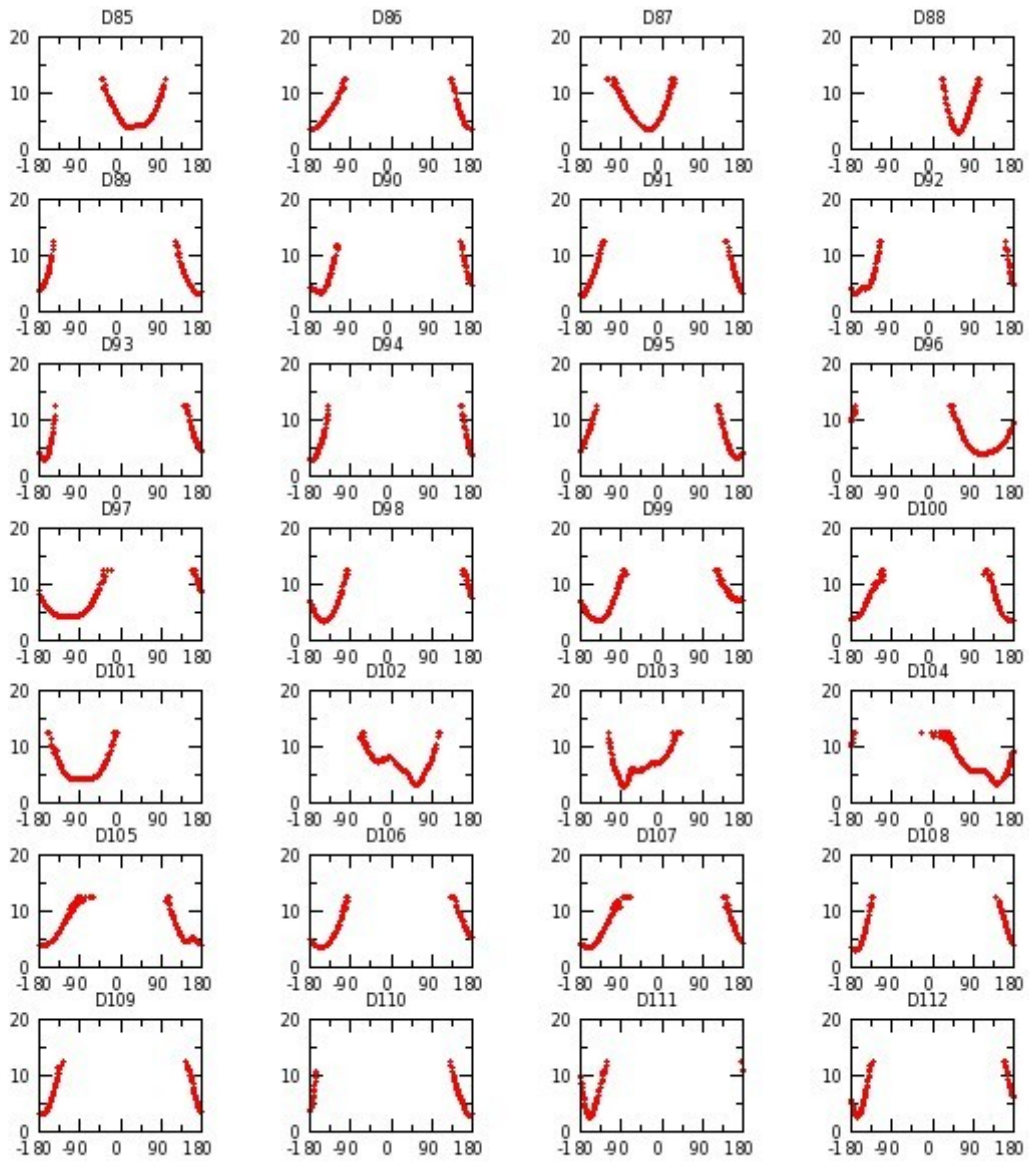


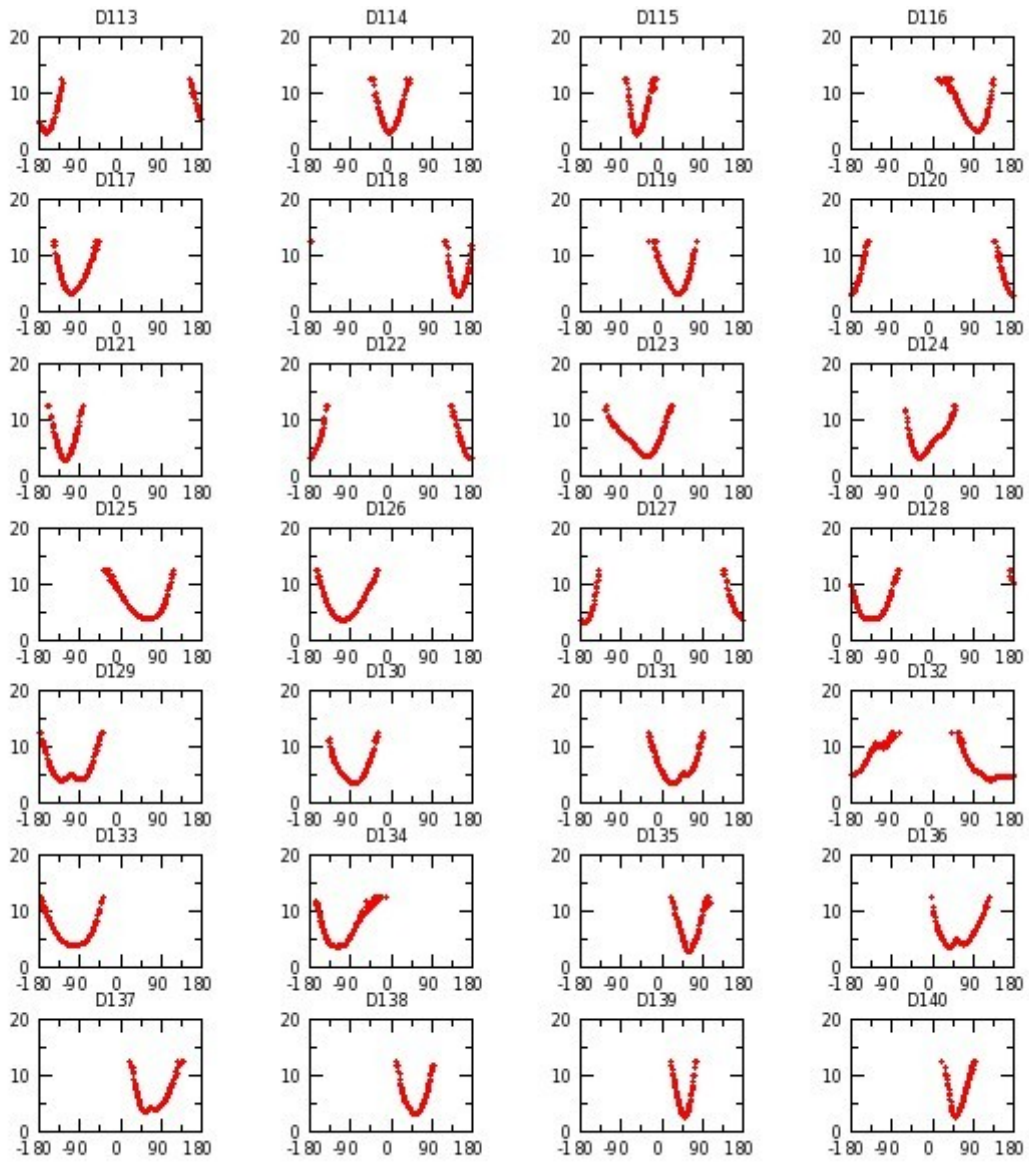
Annexe G 39 : M_GOF réplique III

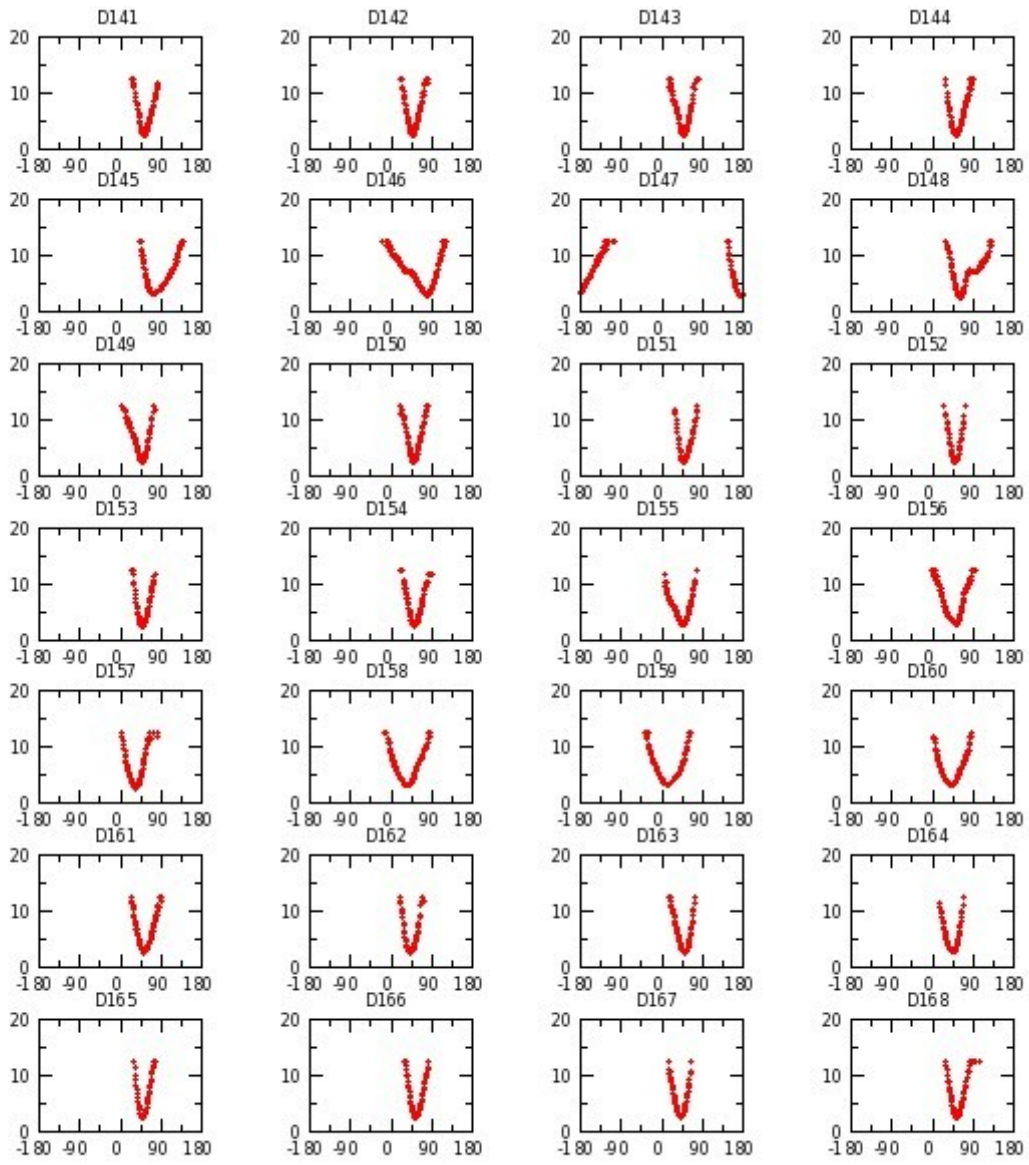


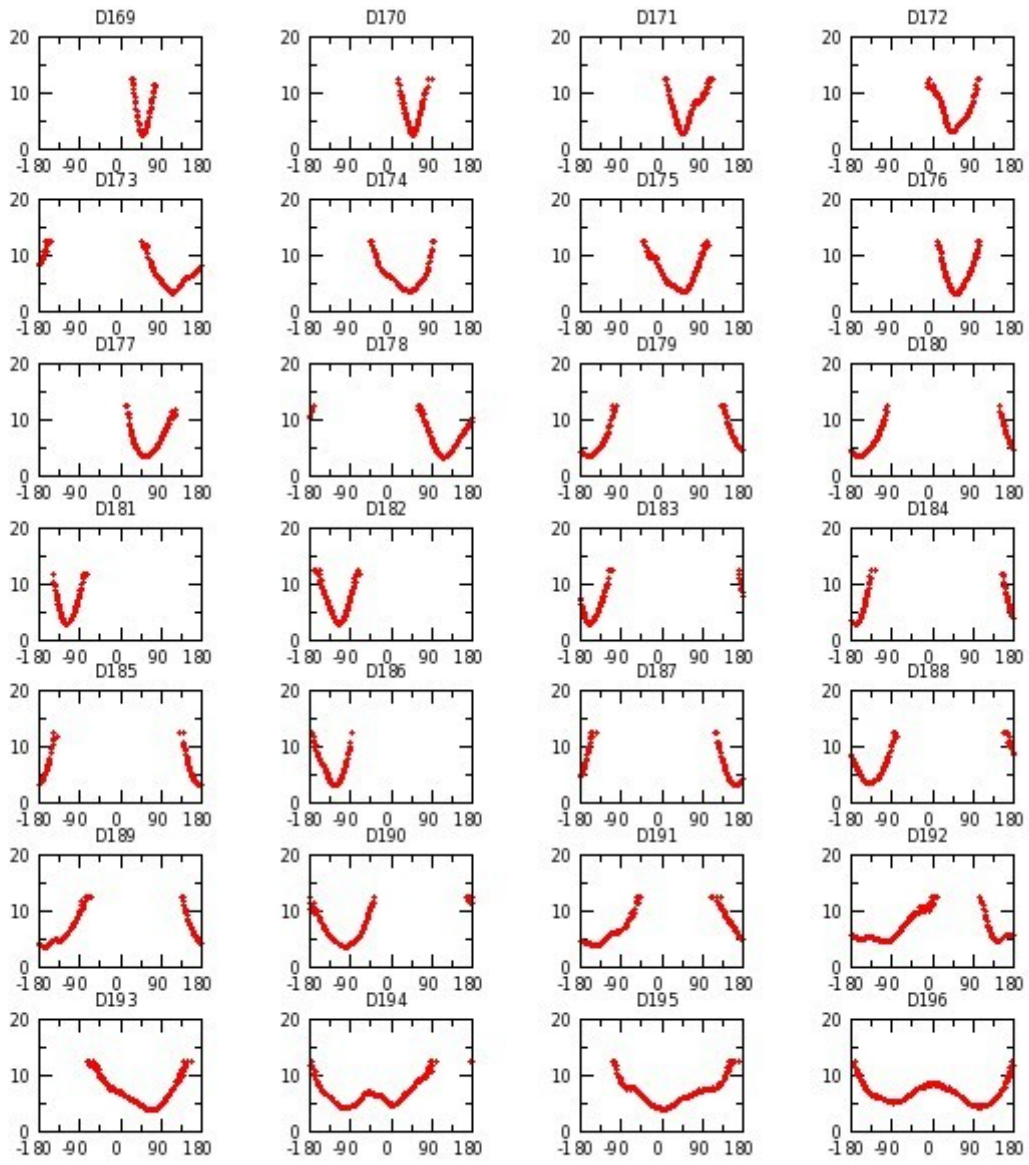


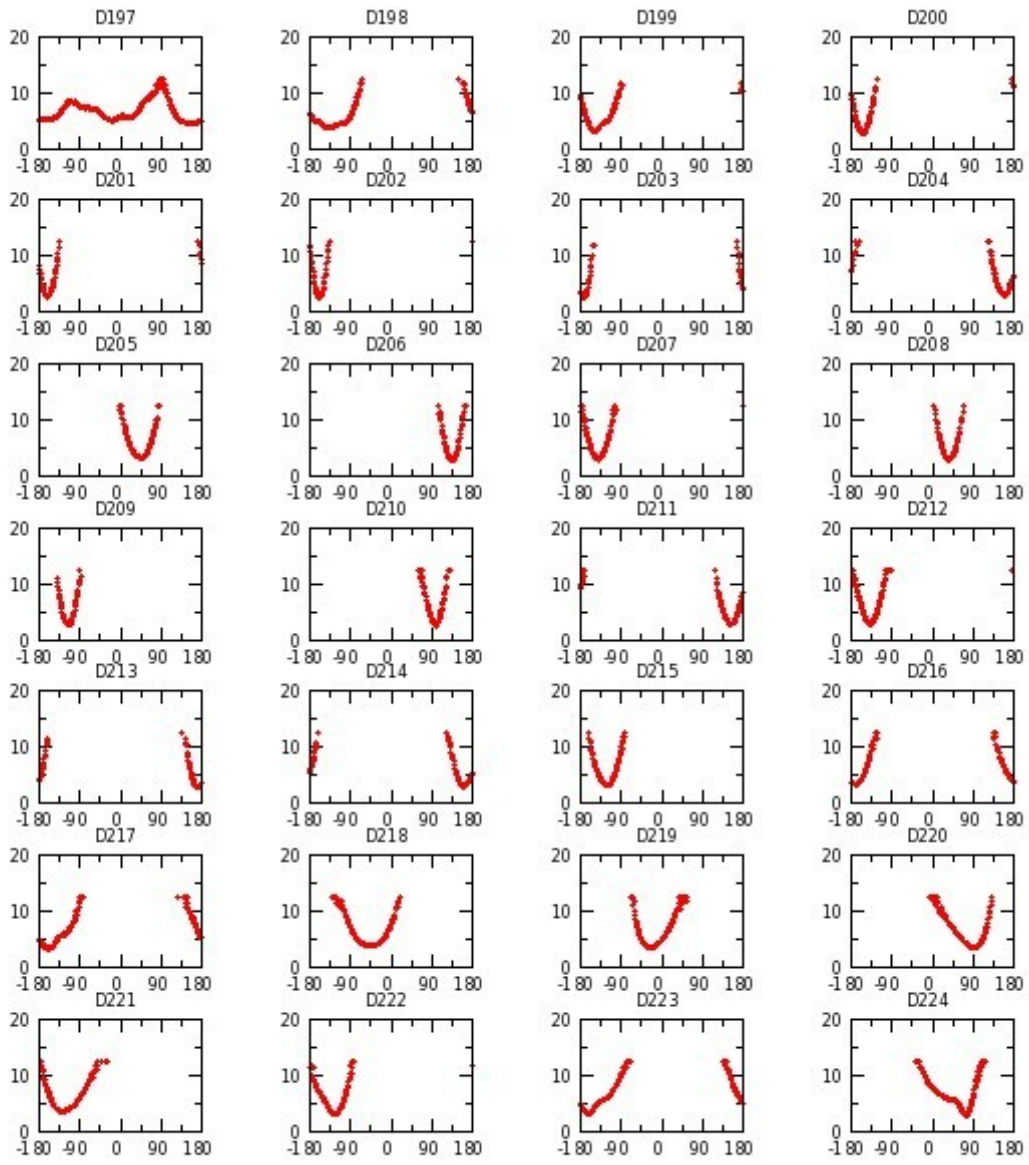


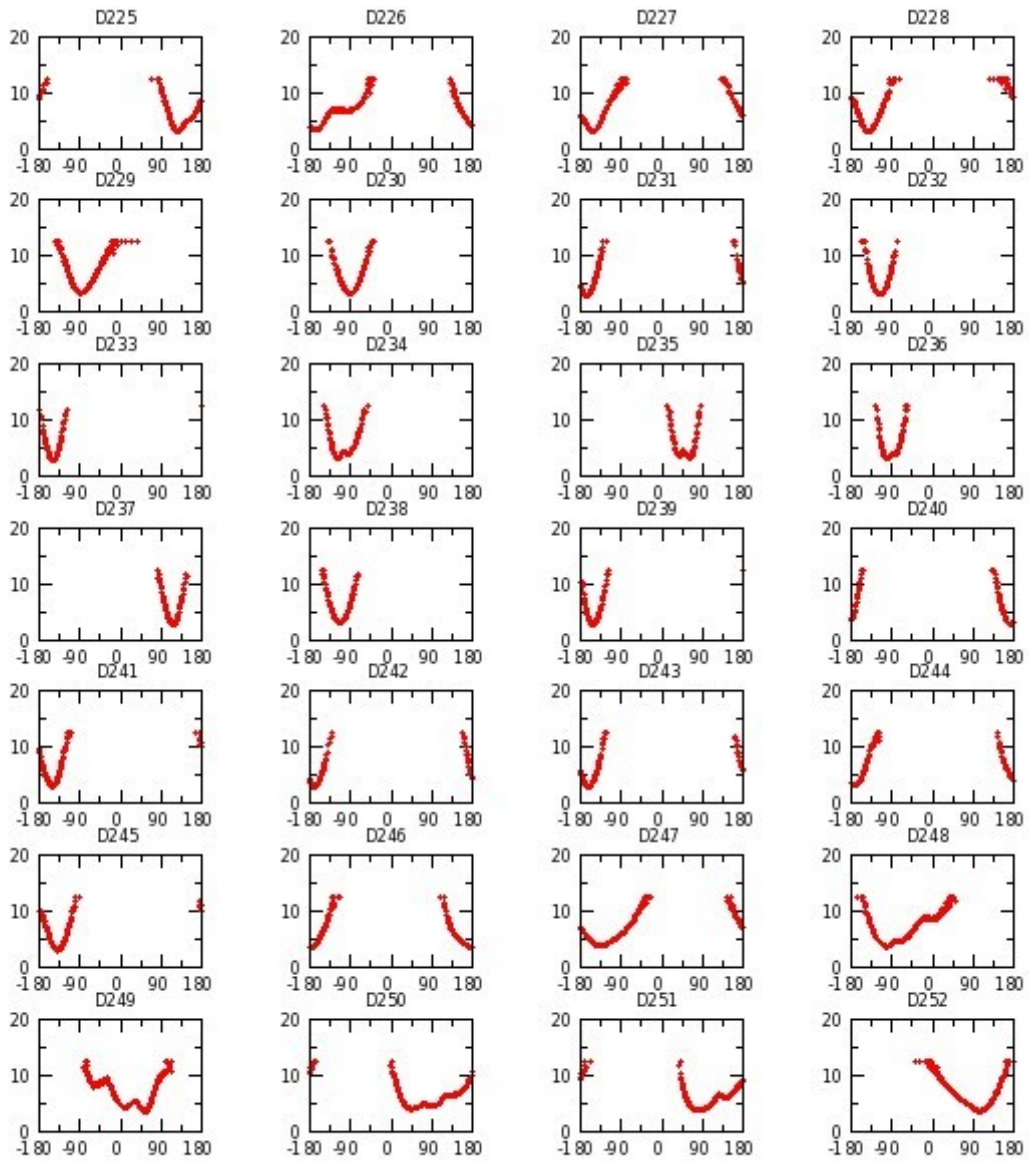


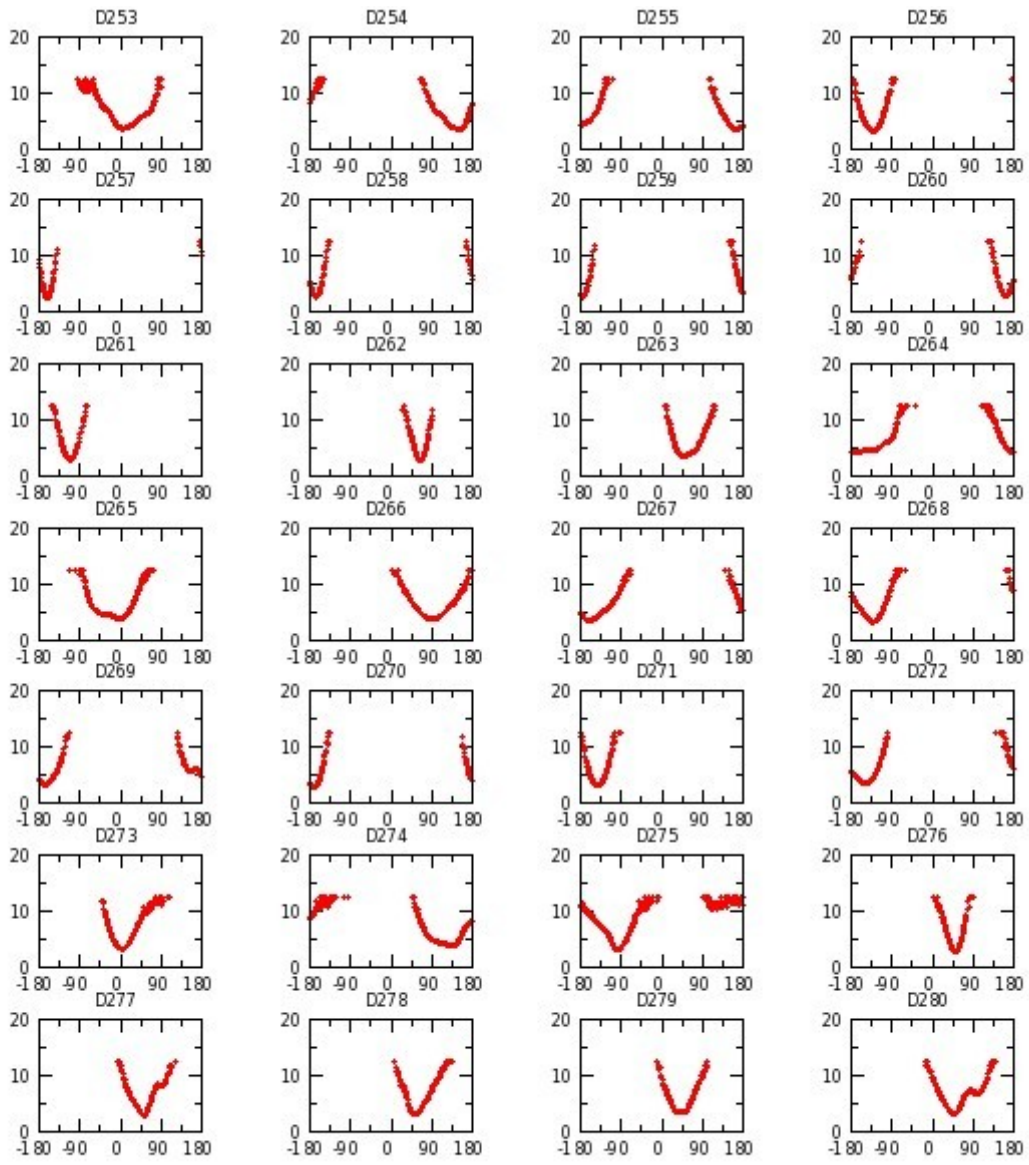


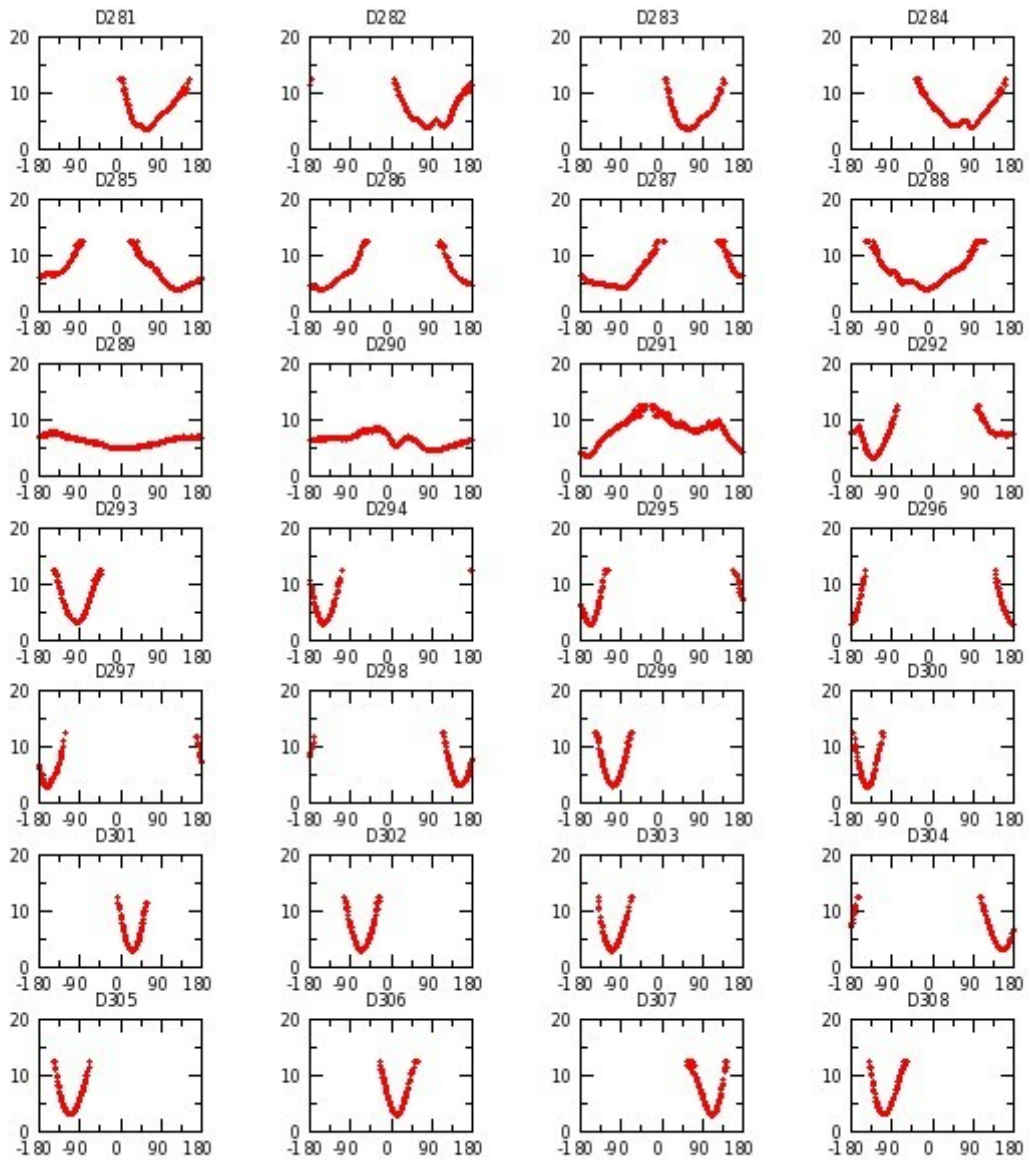


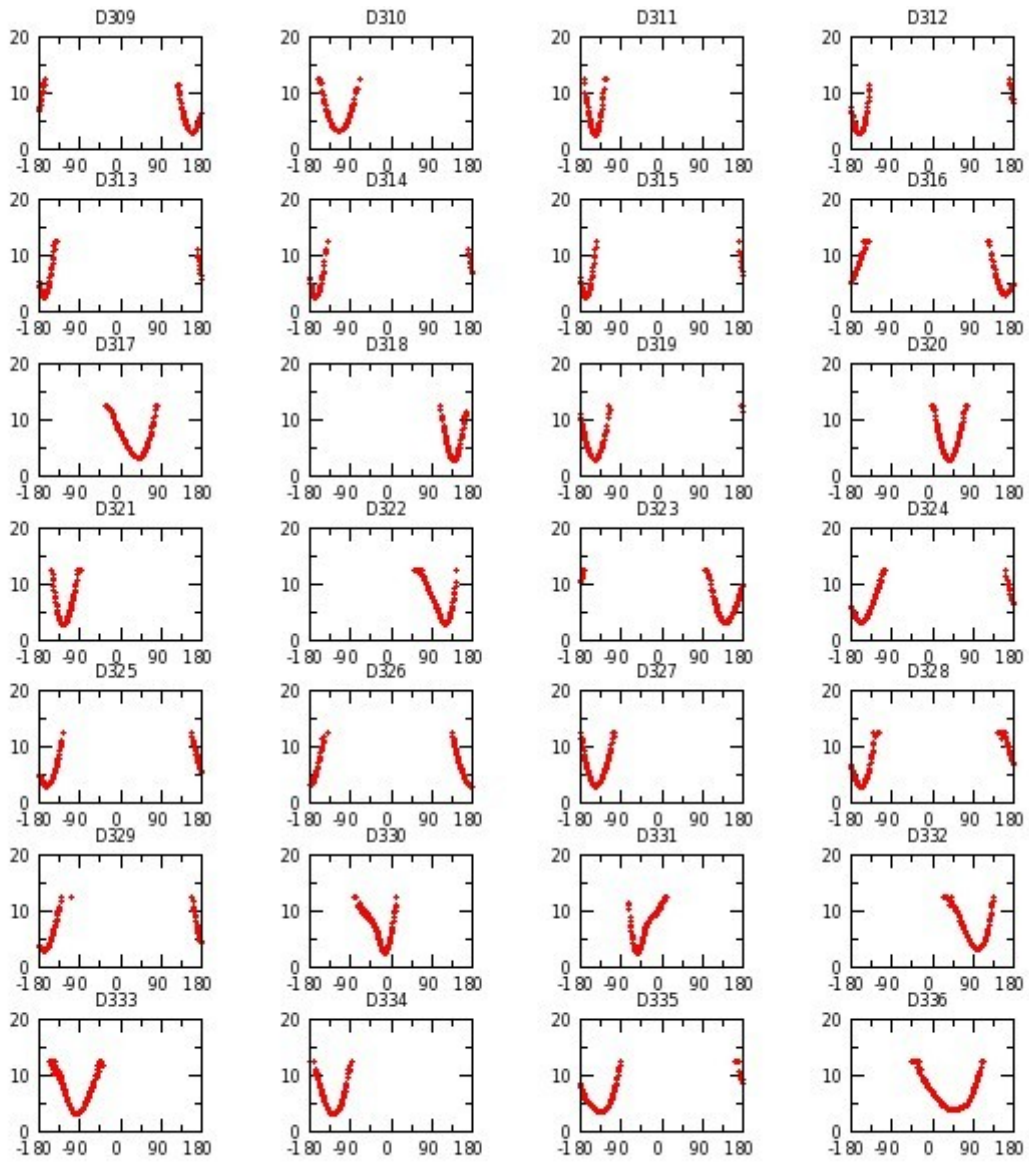


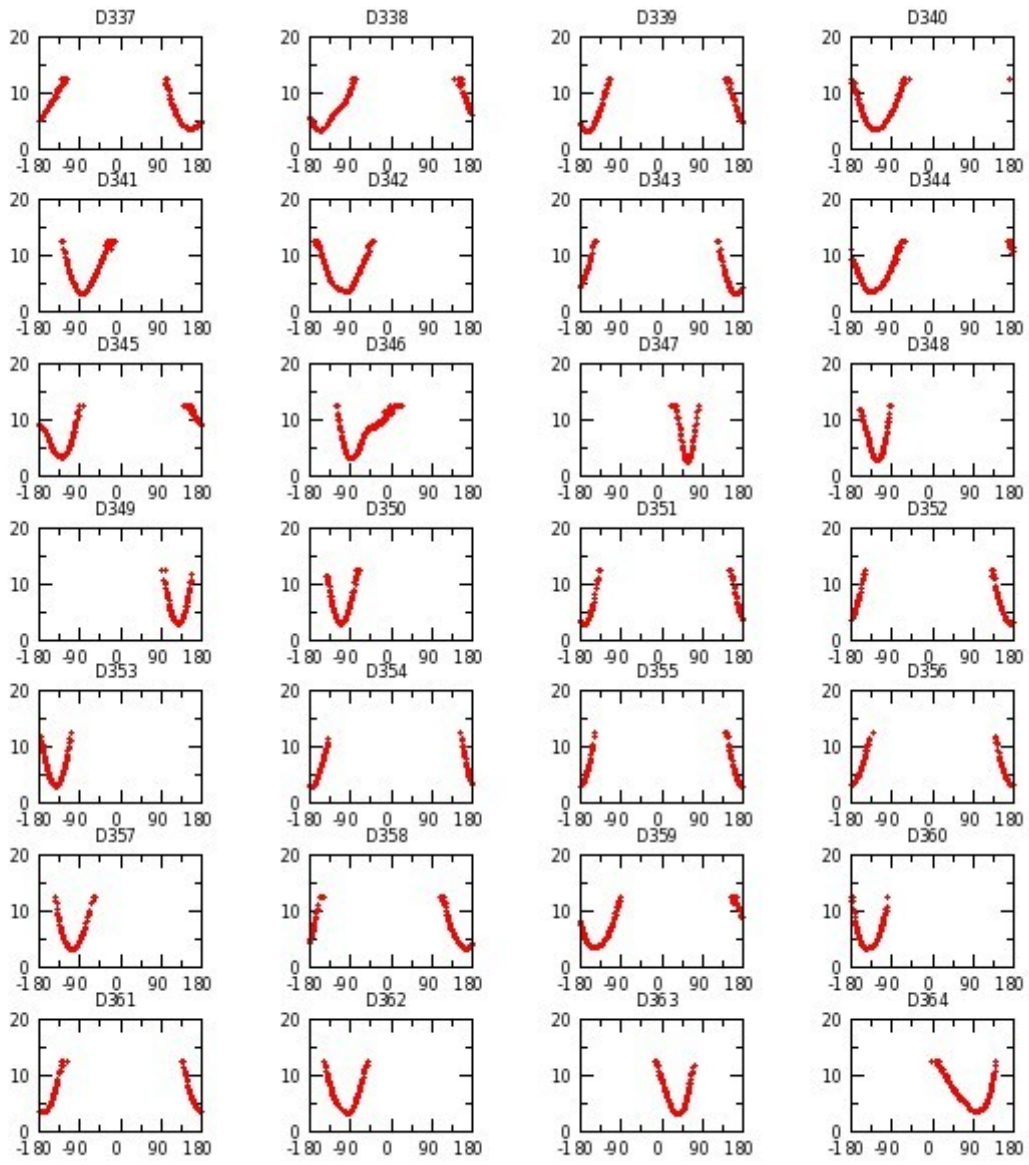


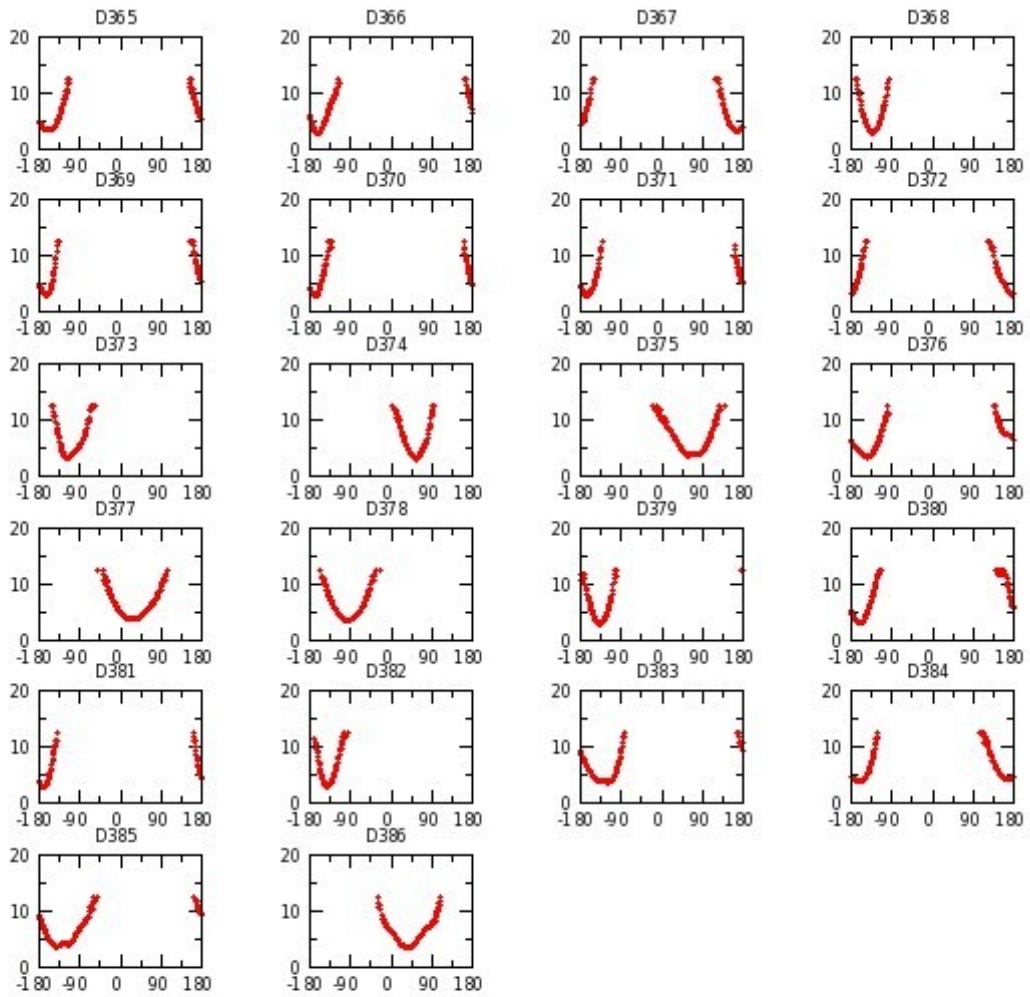




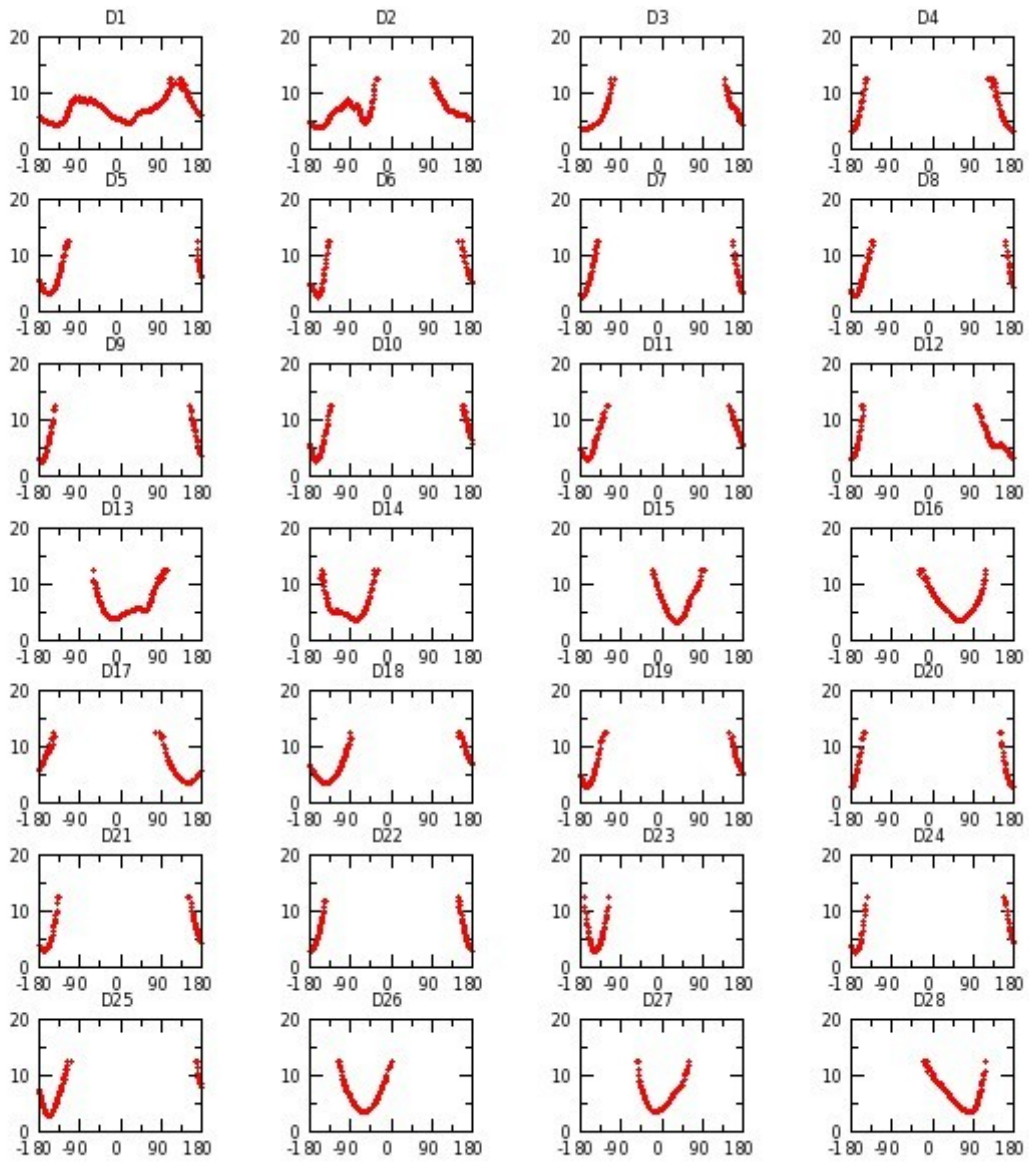


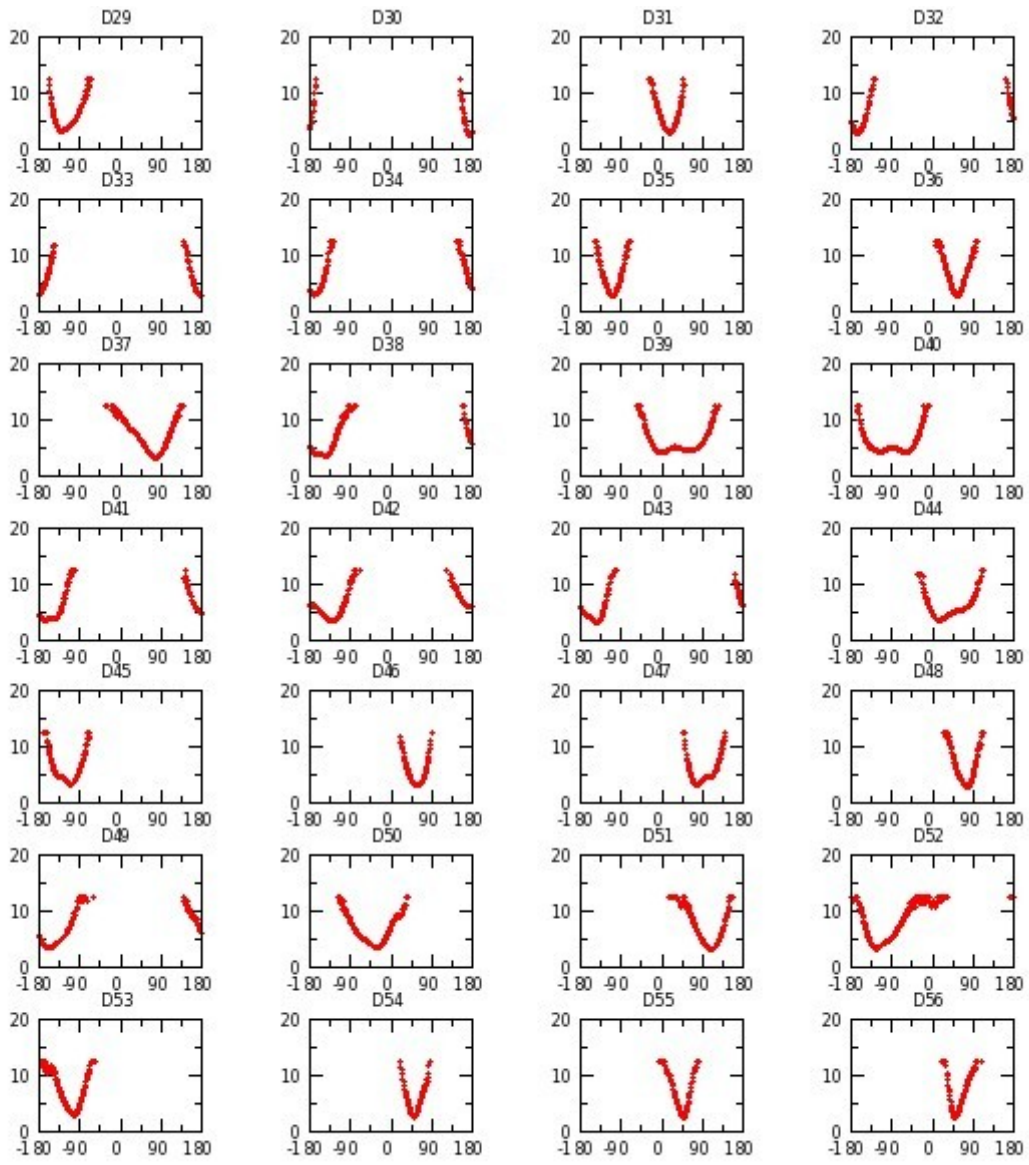


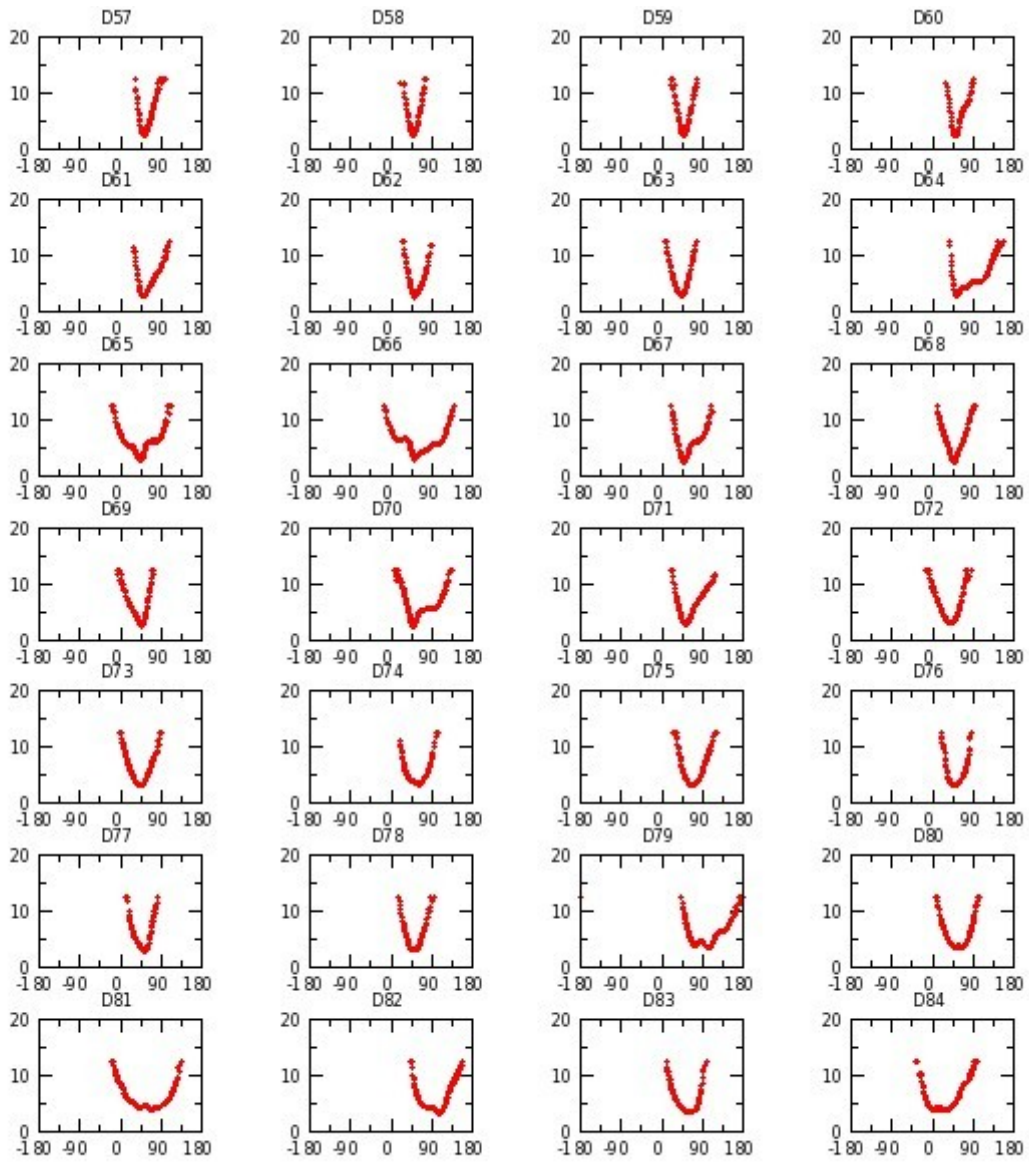


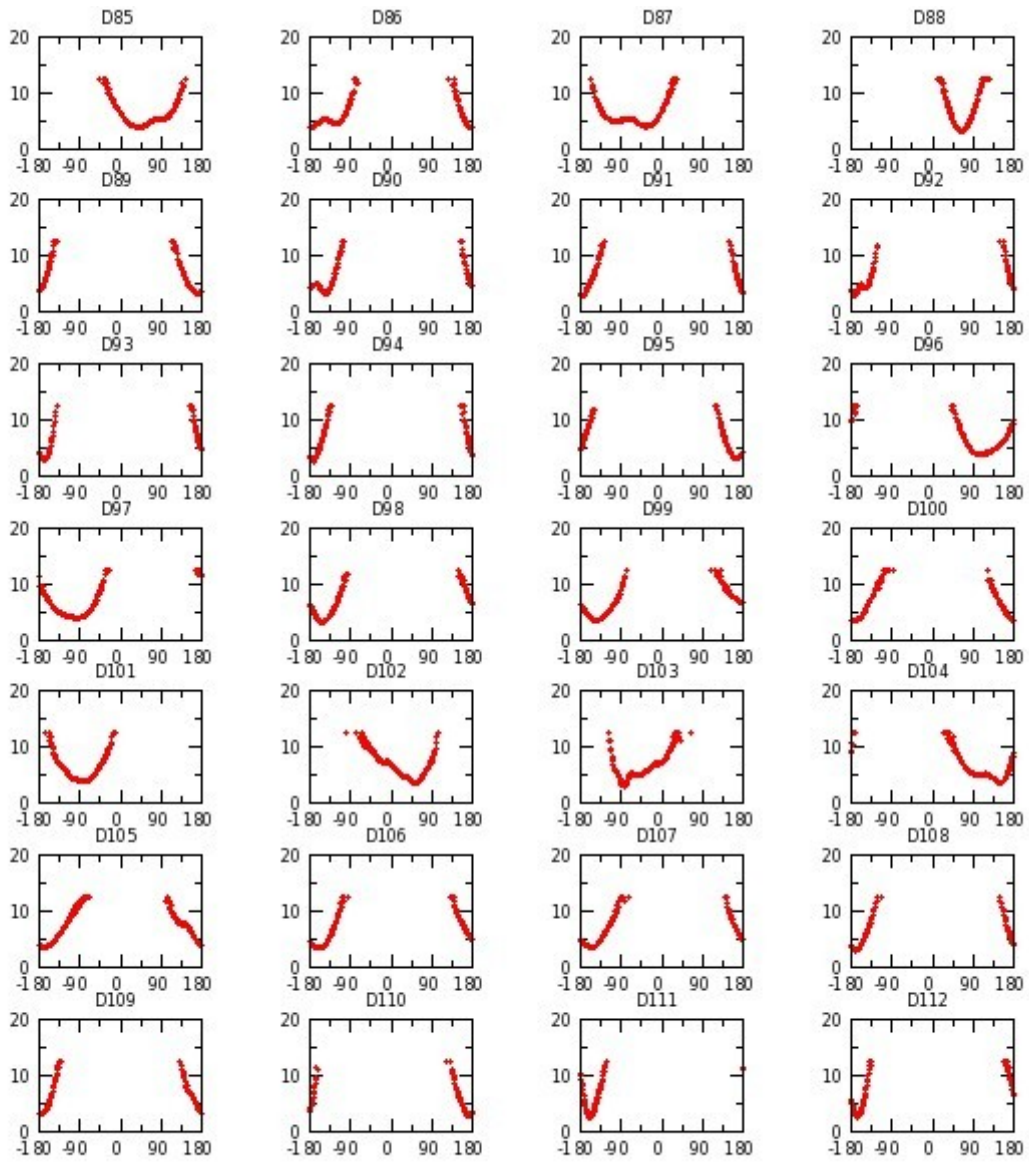


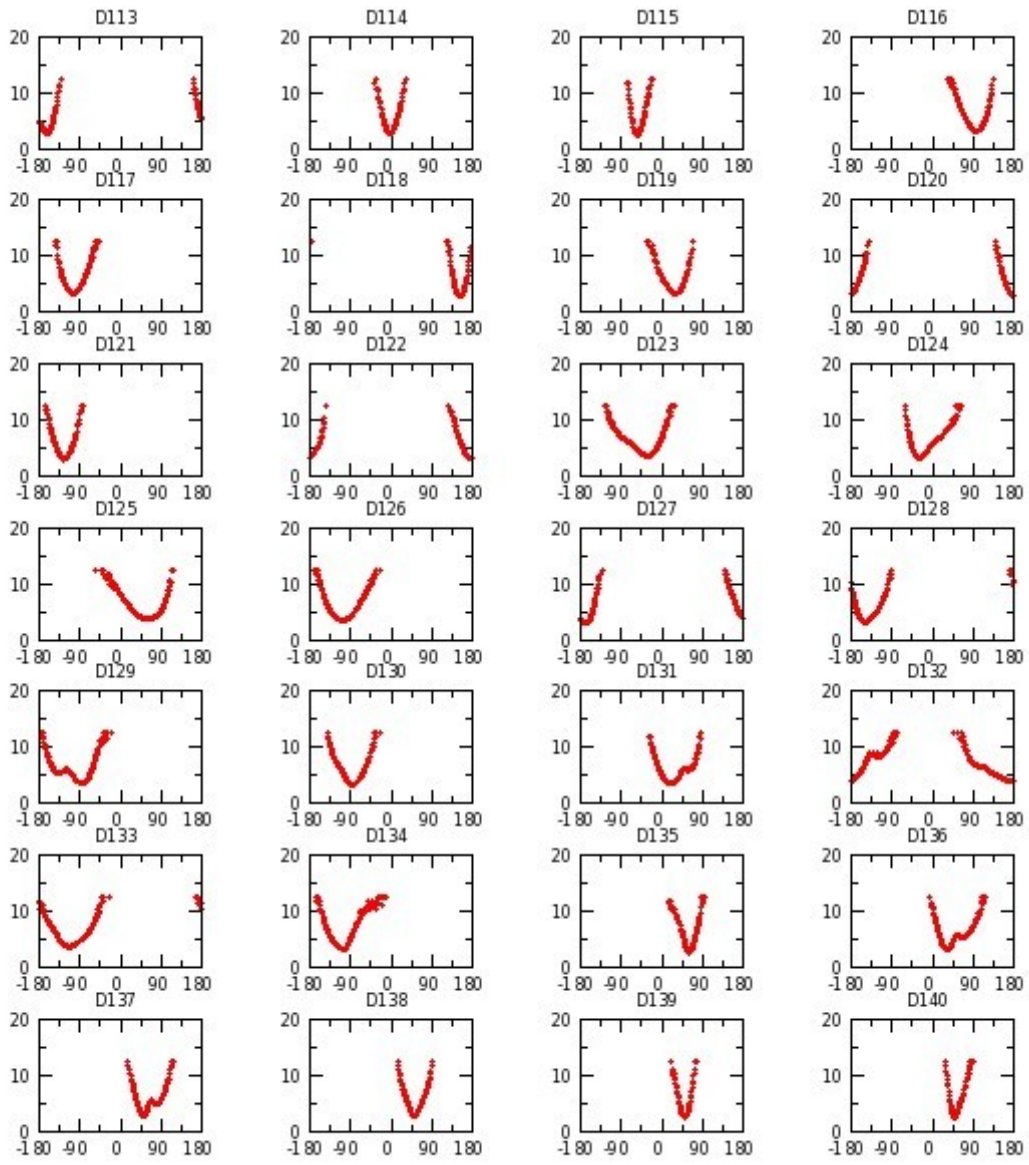
Annexe G 40 : M_NUaGAL réplique I

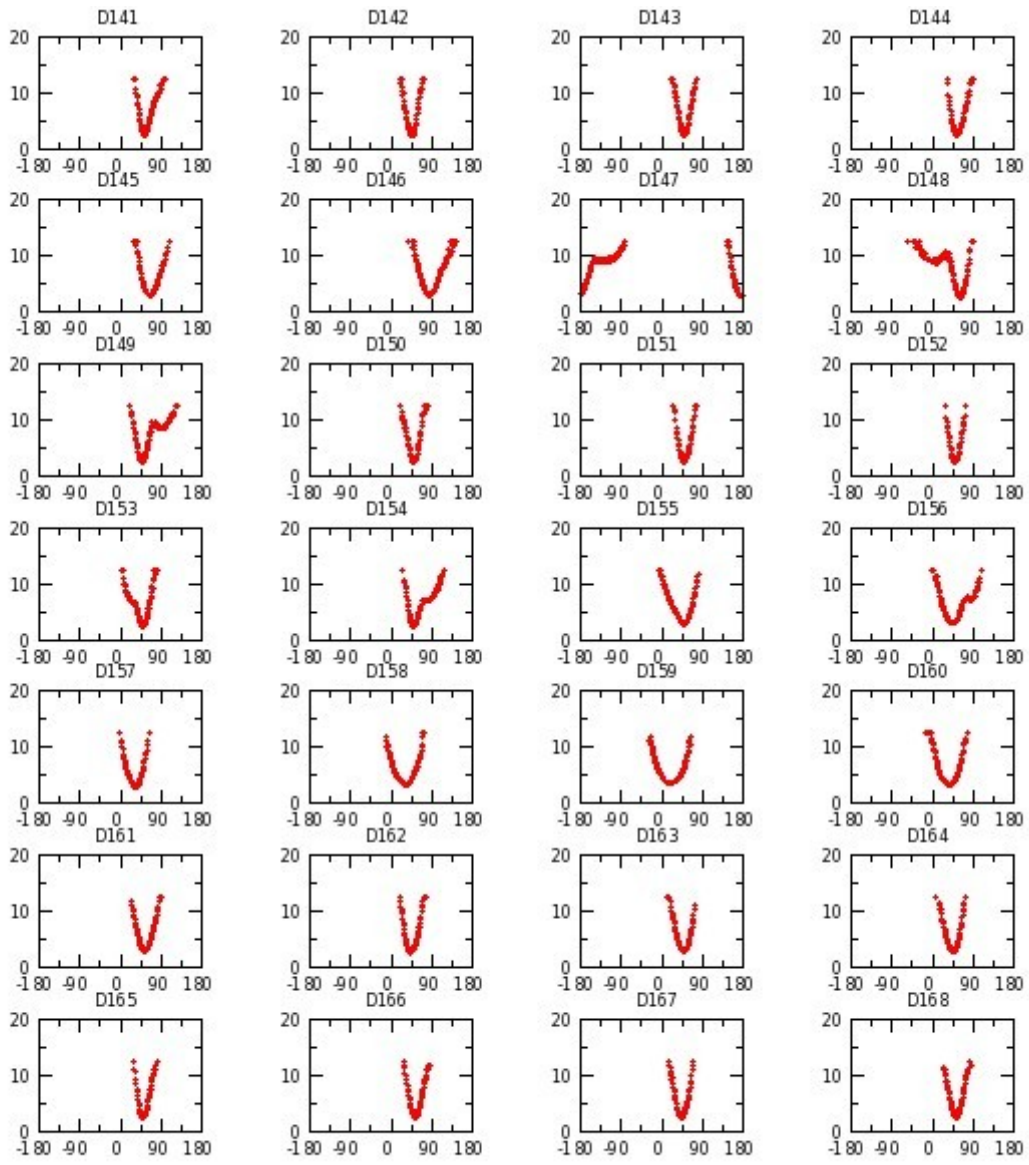


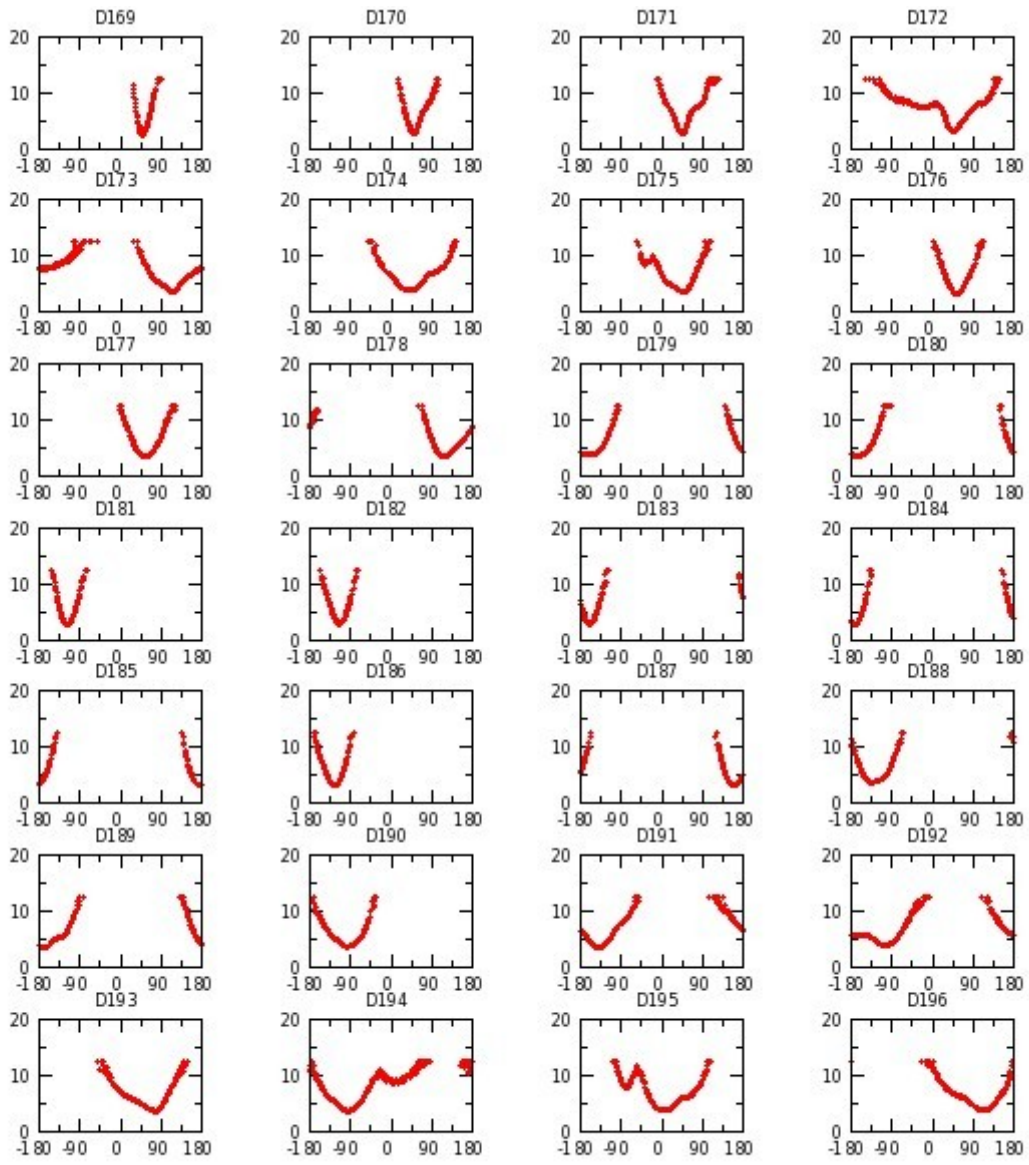


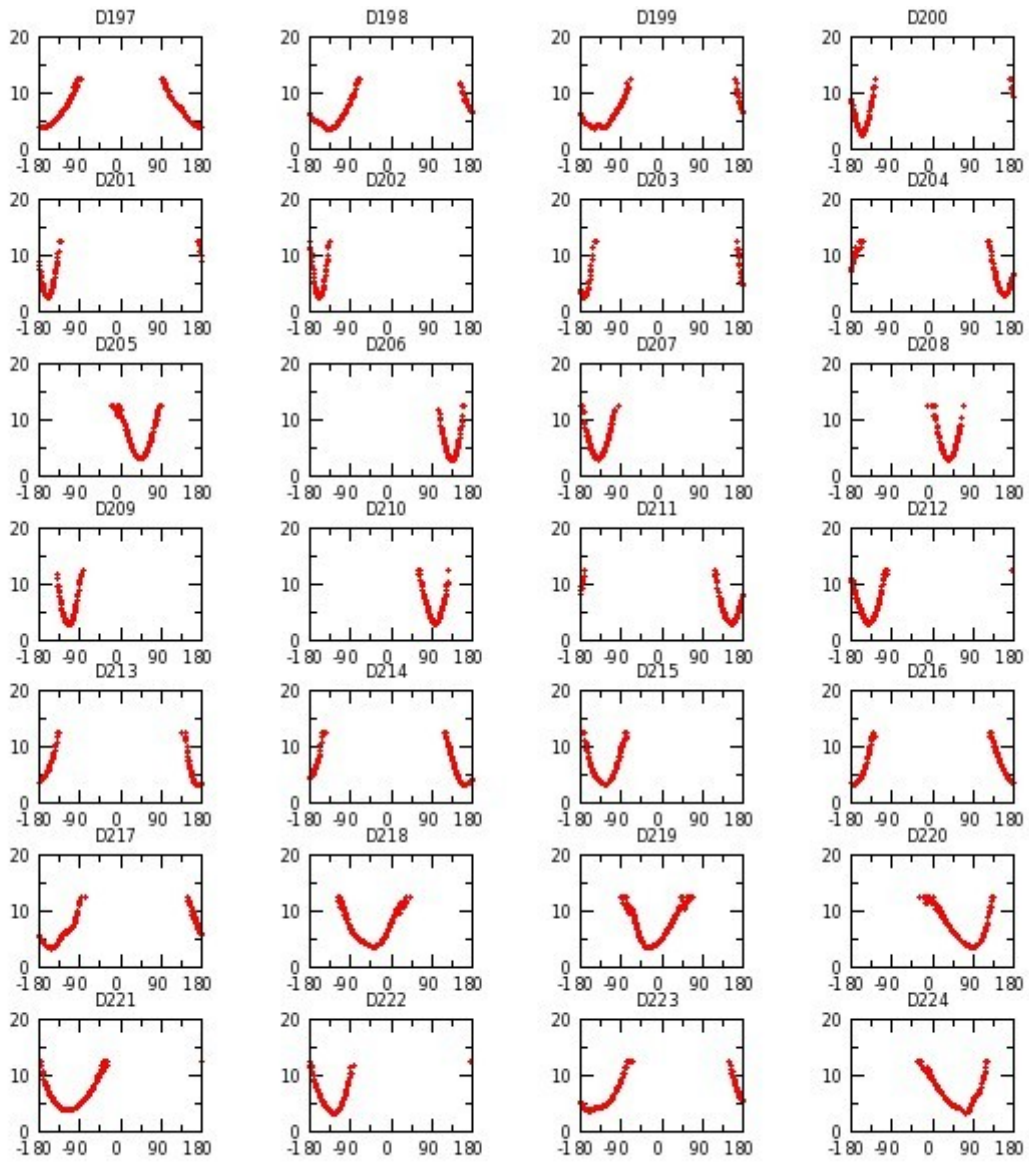


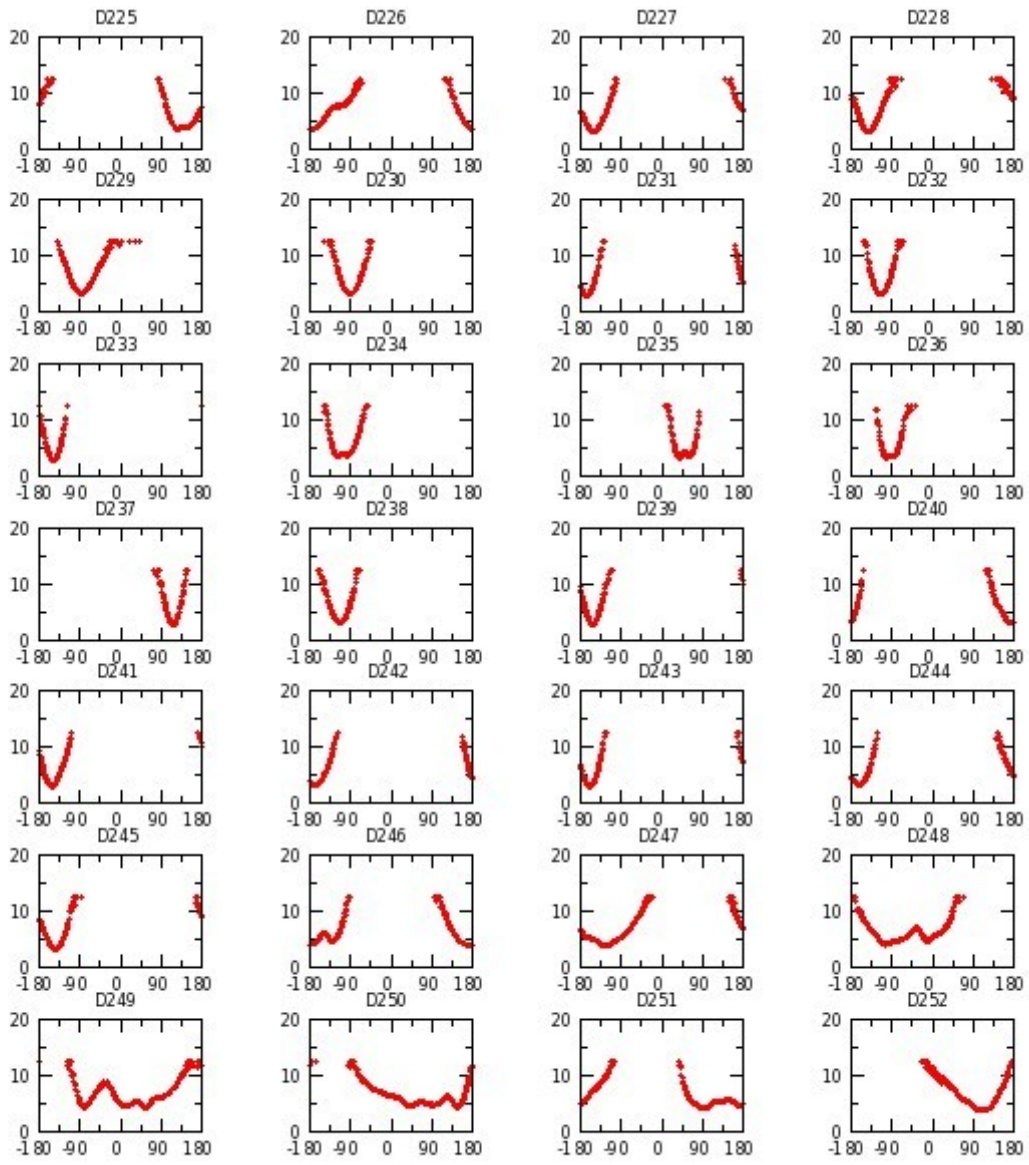


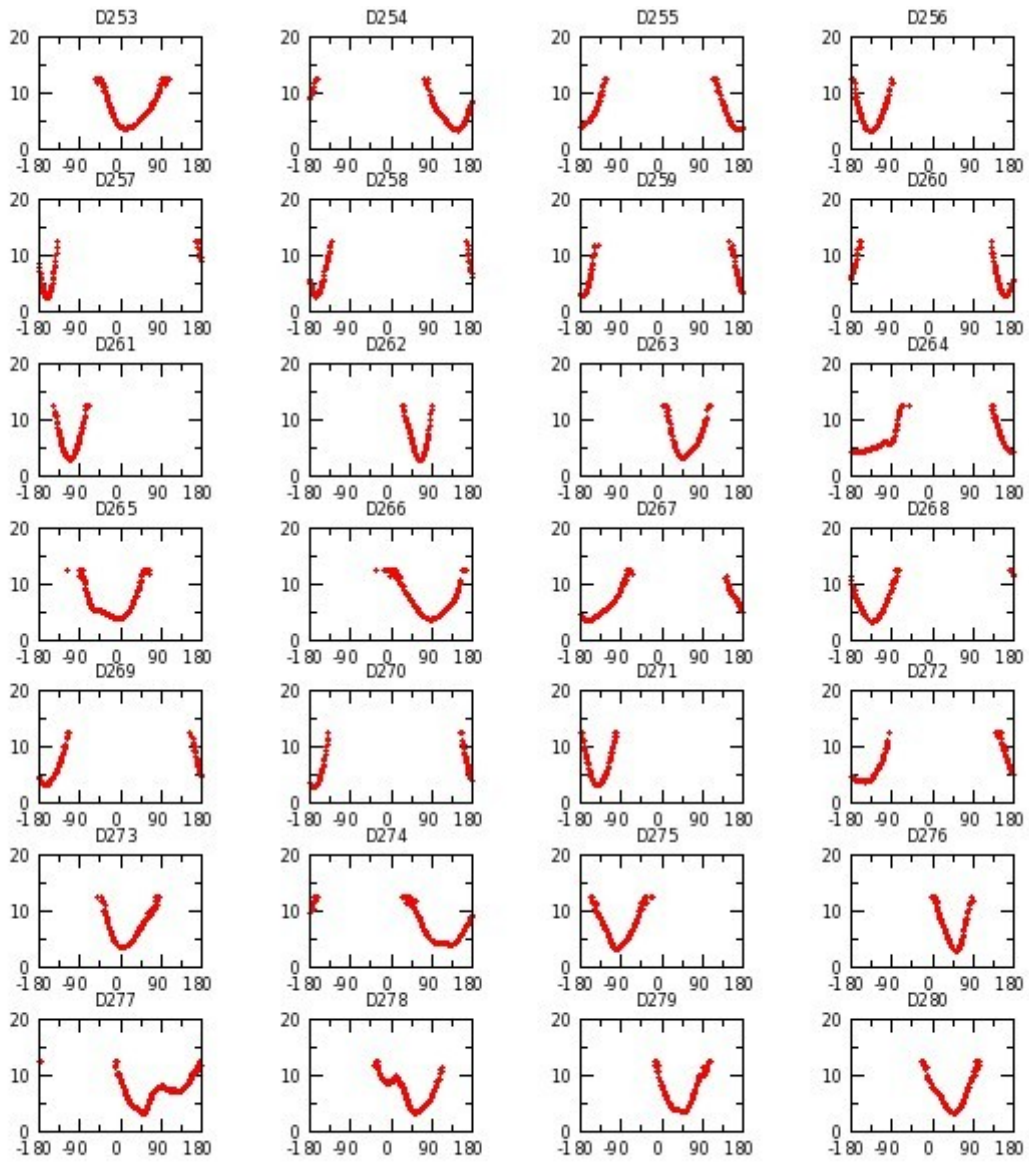


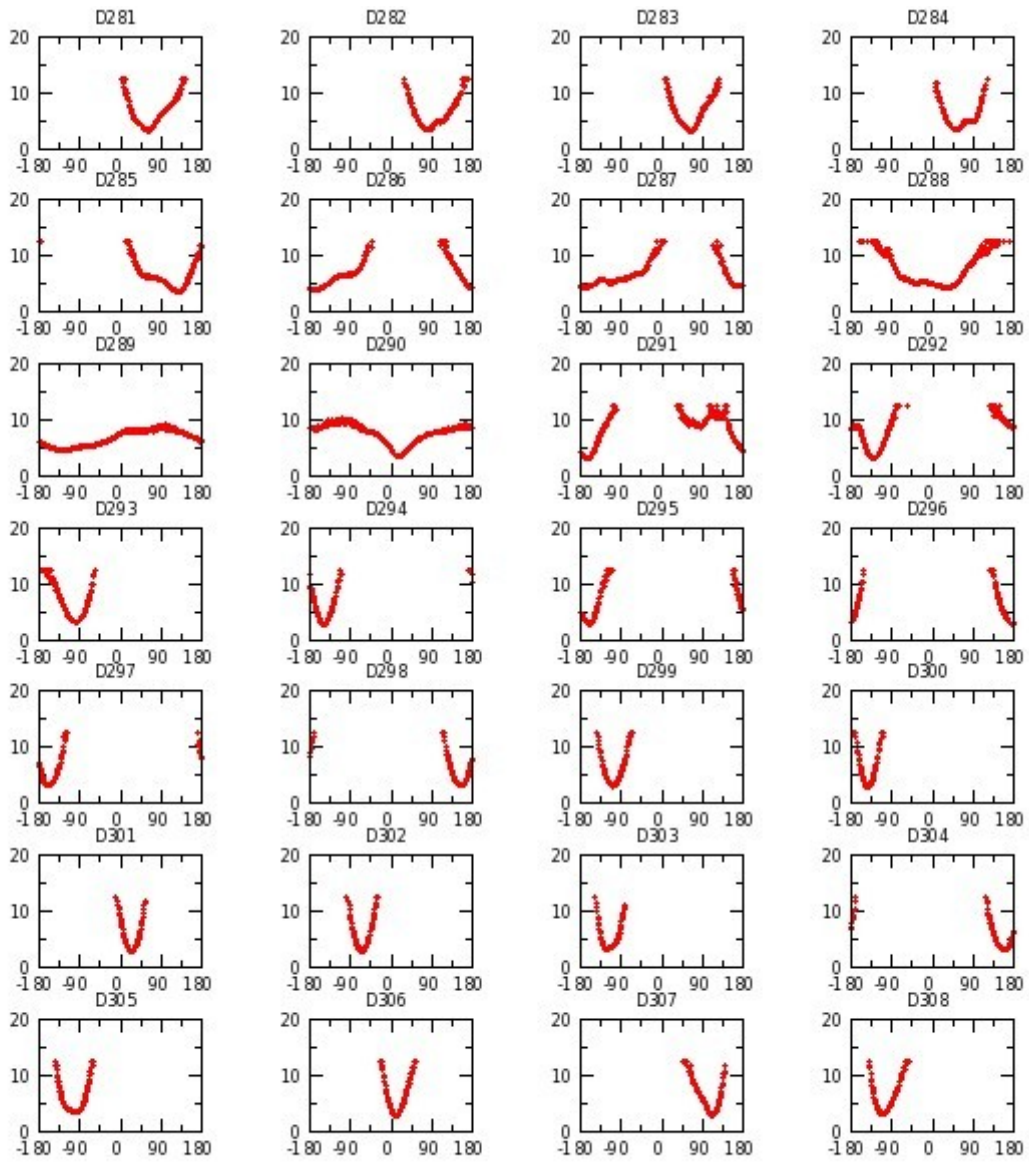


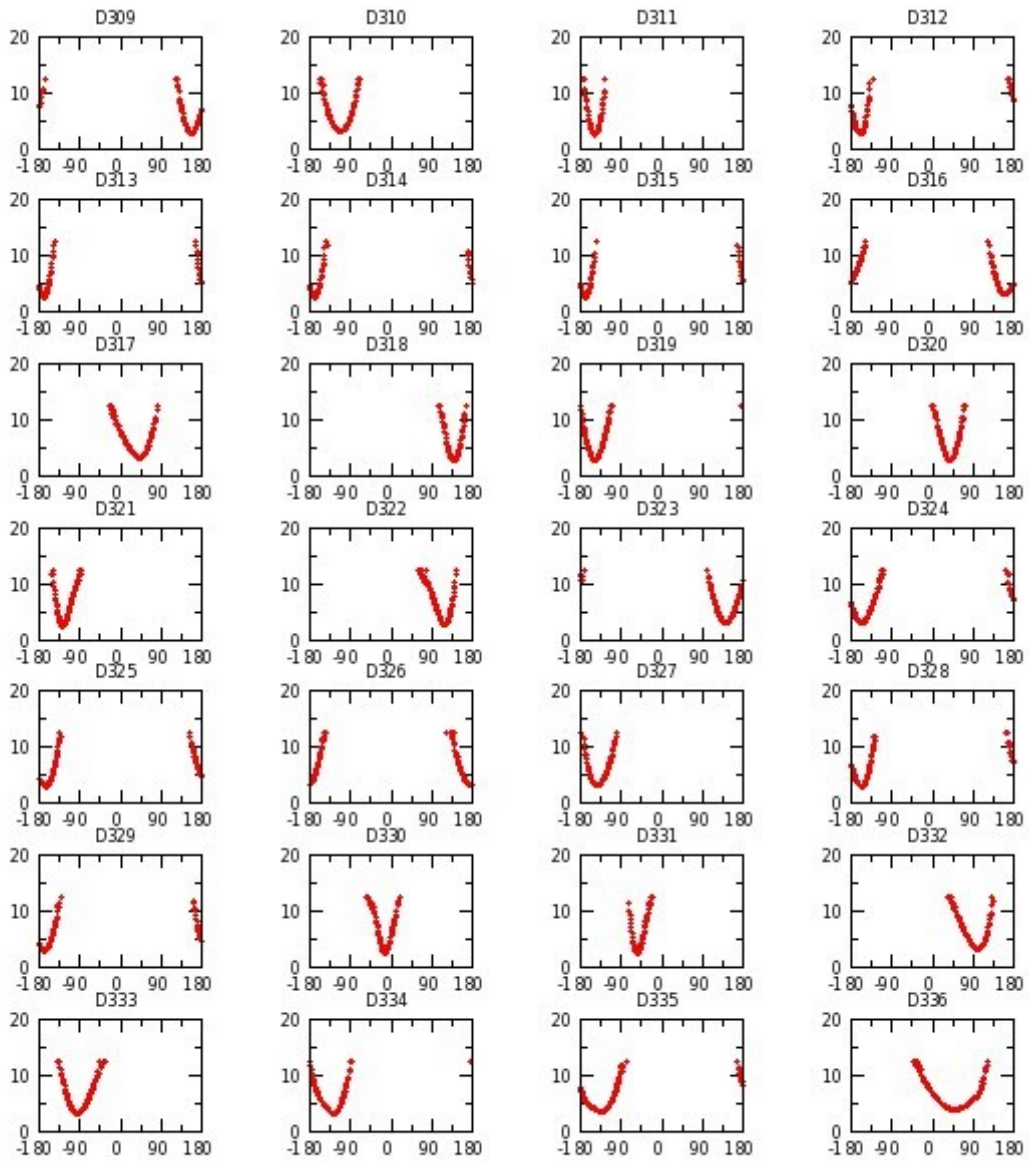


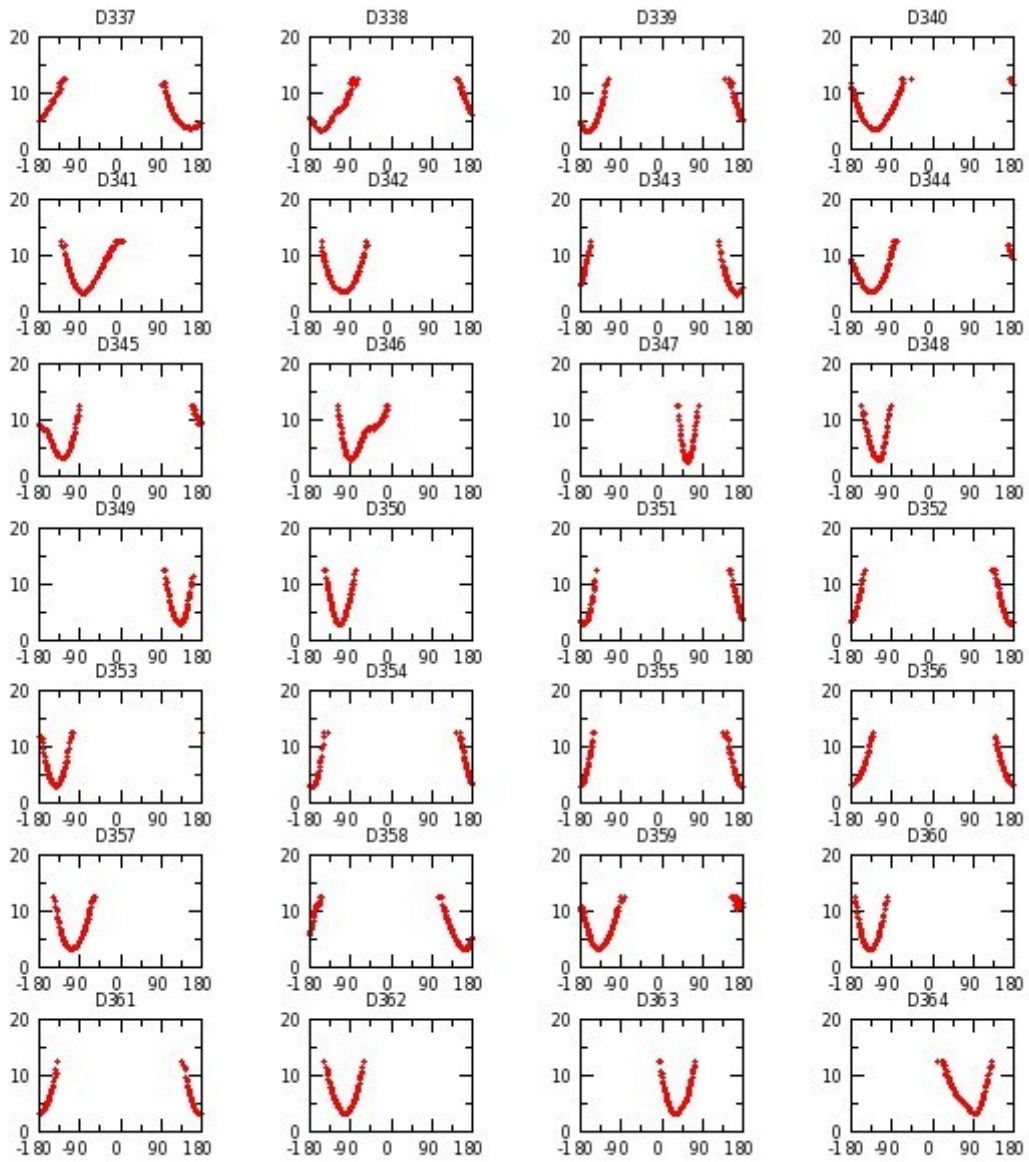


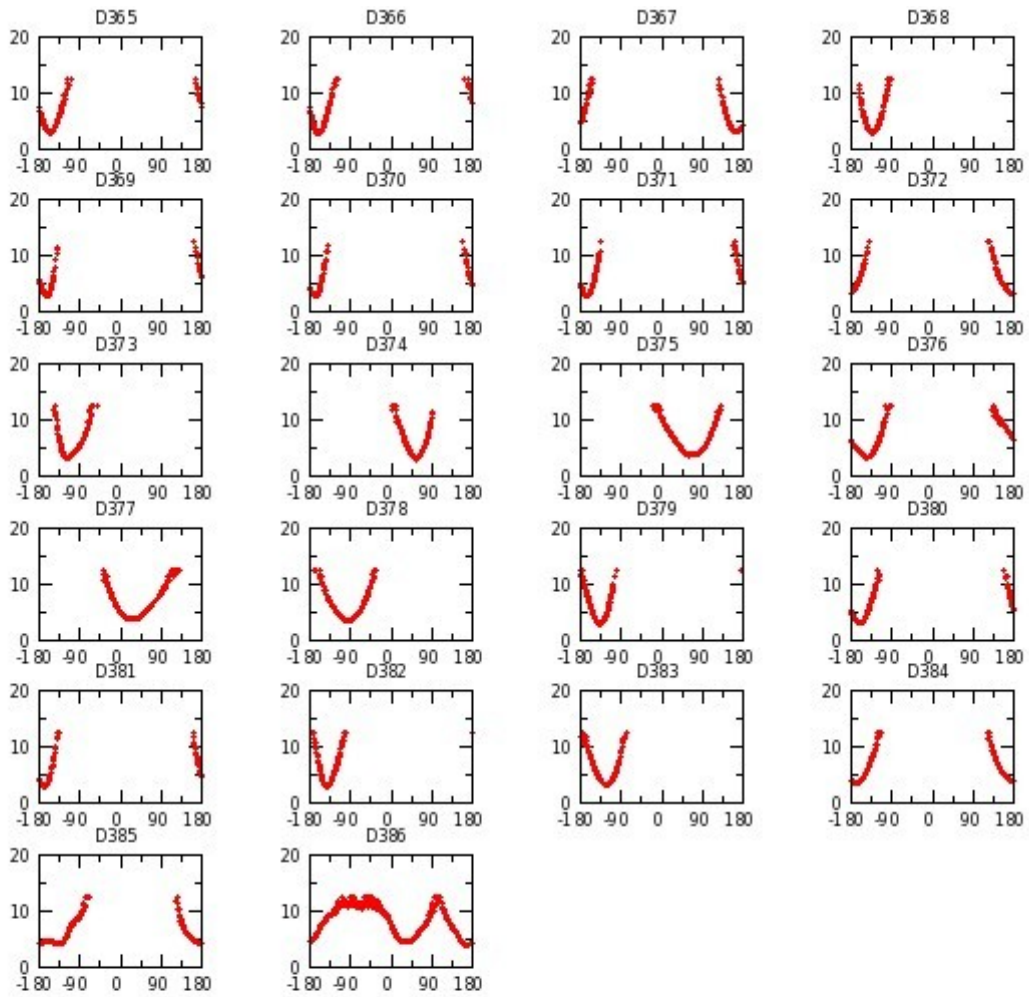




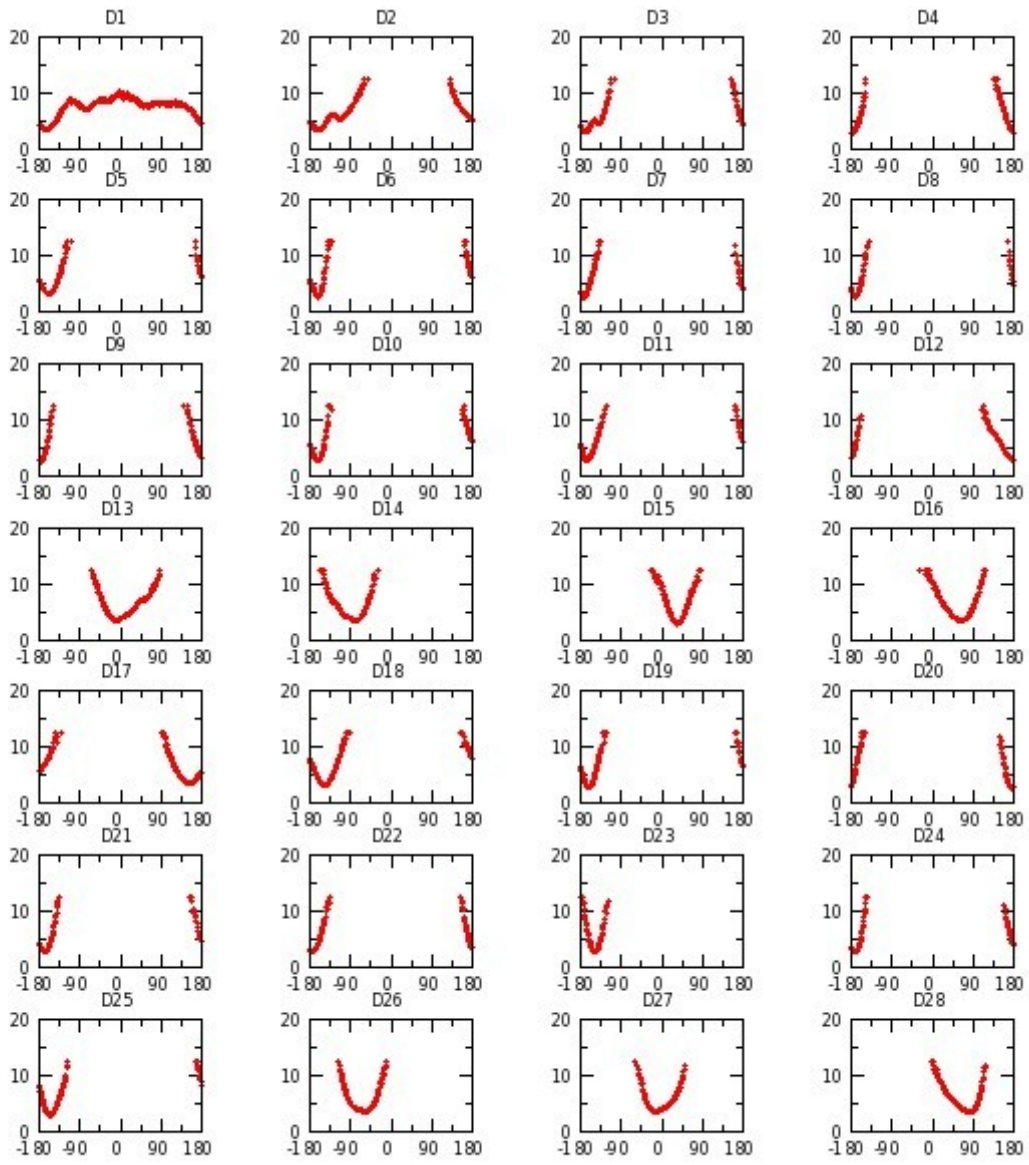


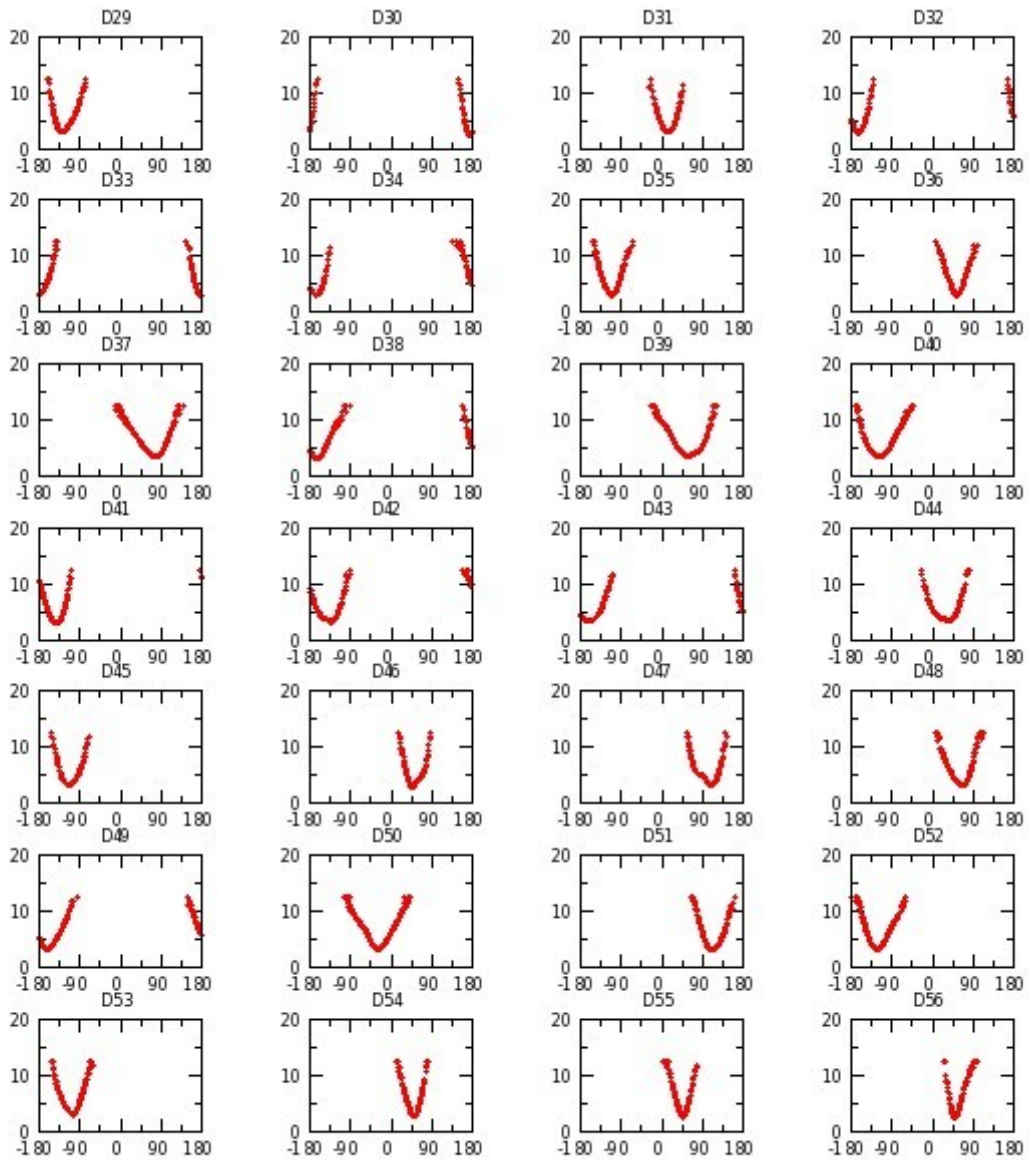


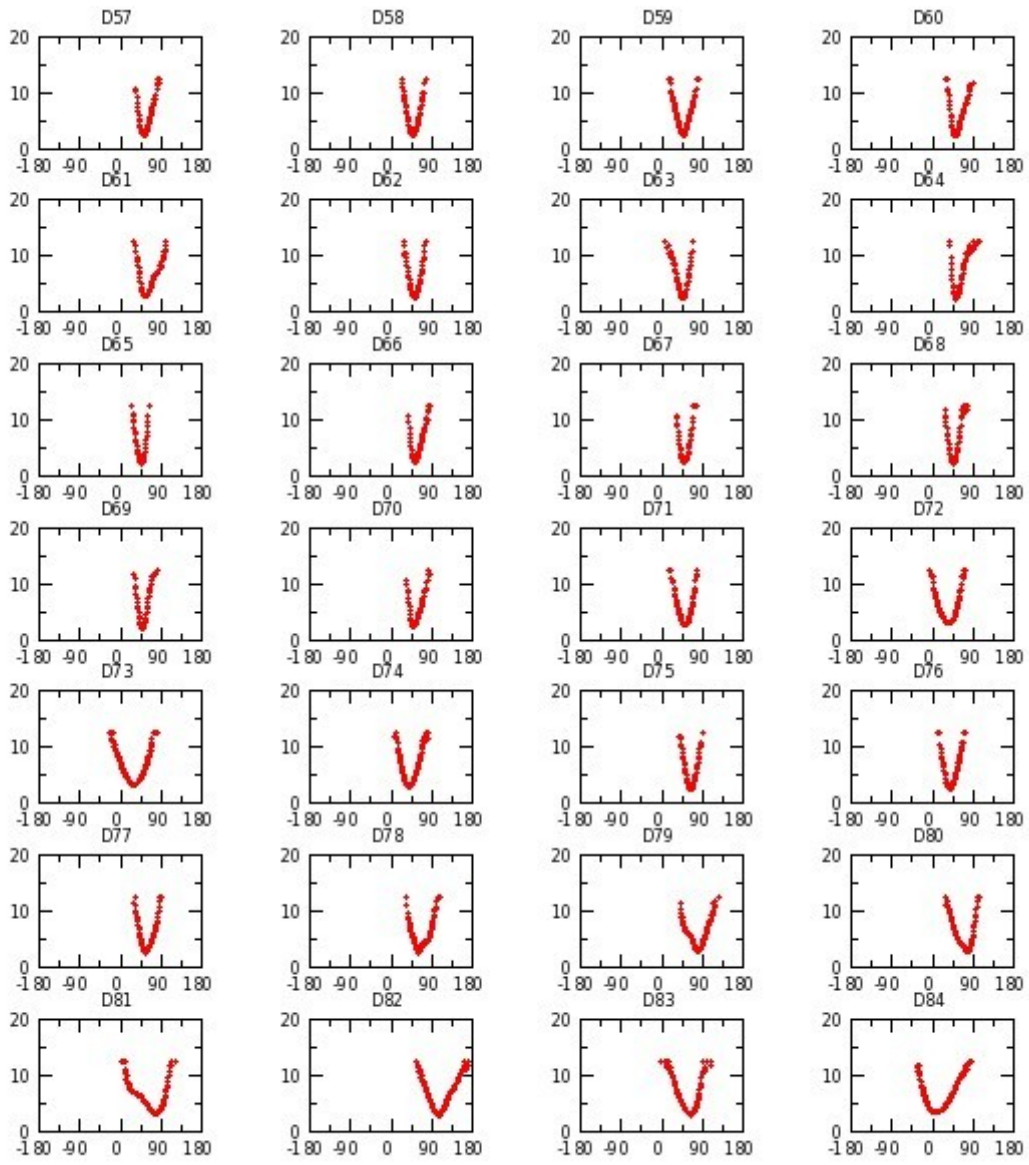


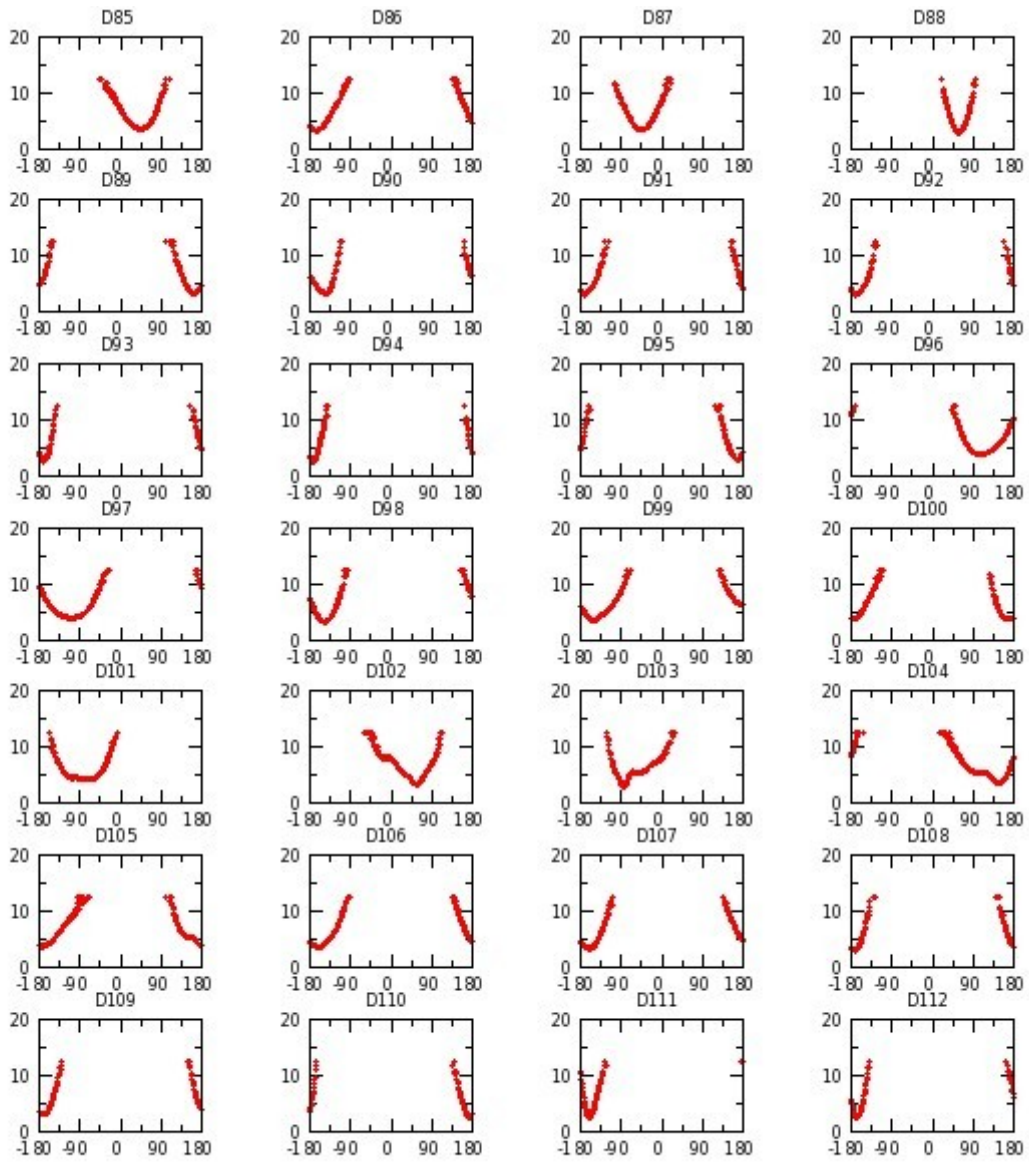


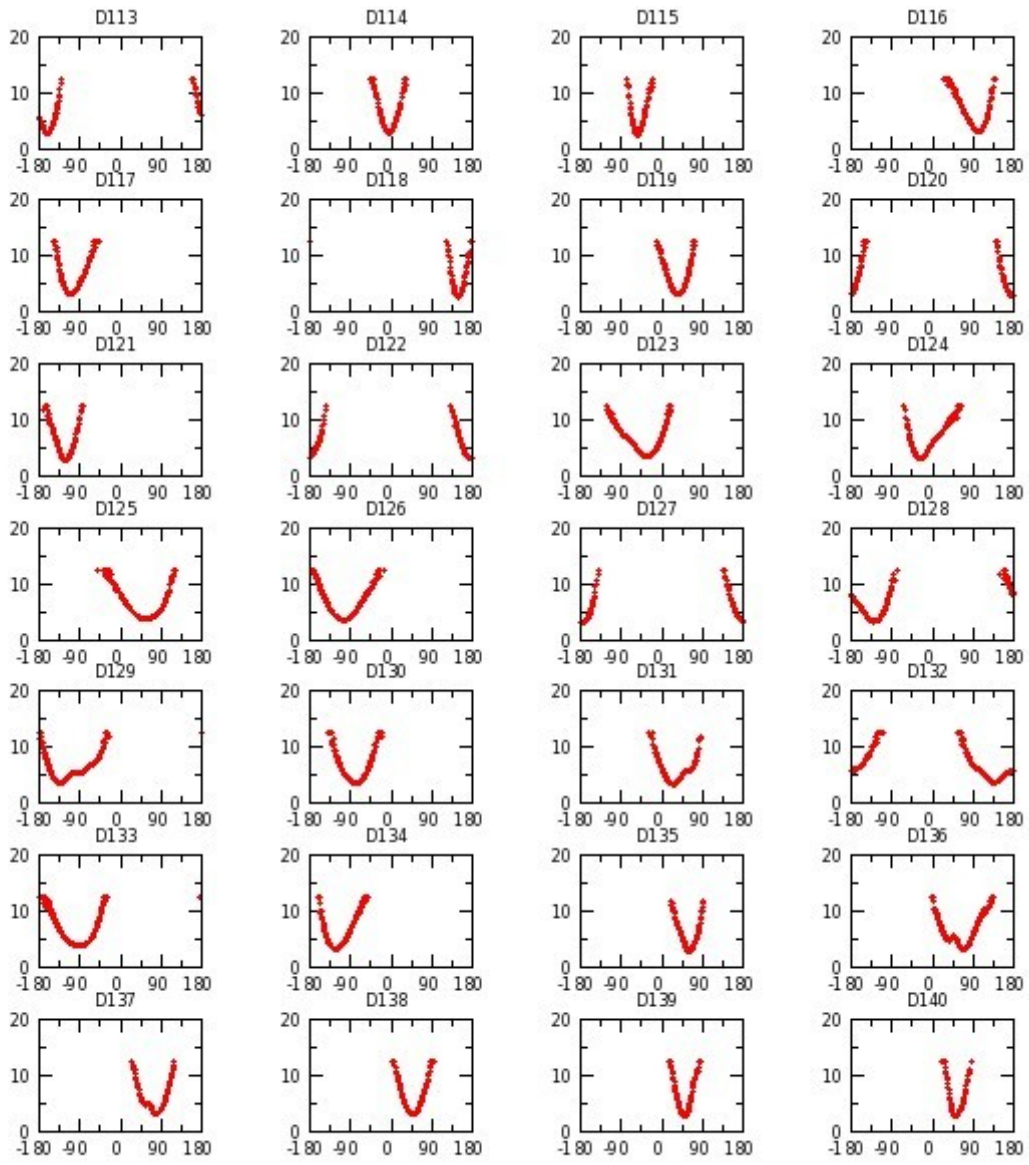
Annexe G 41 : M_NUaGAL réplique II

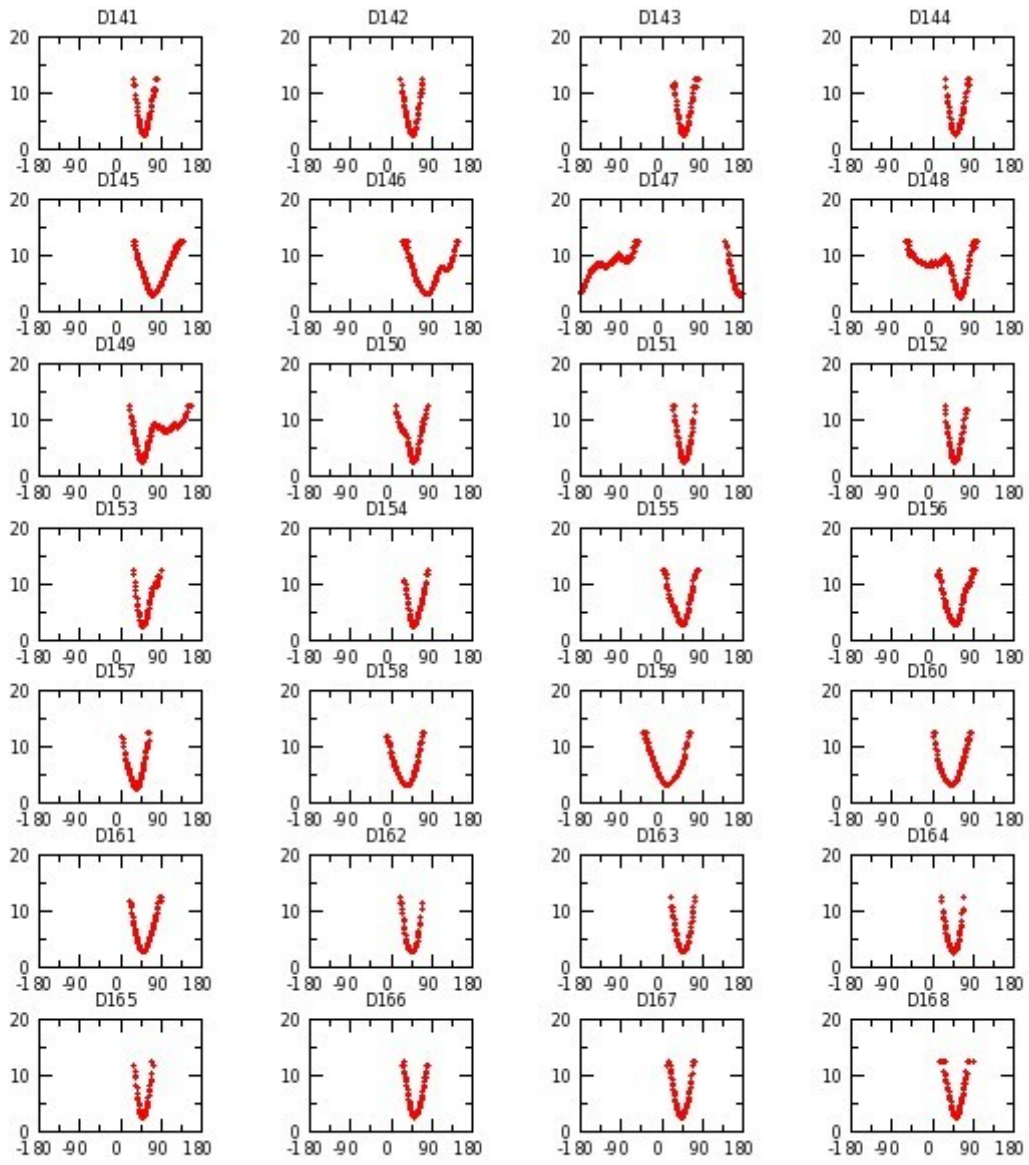


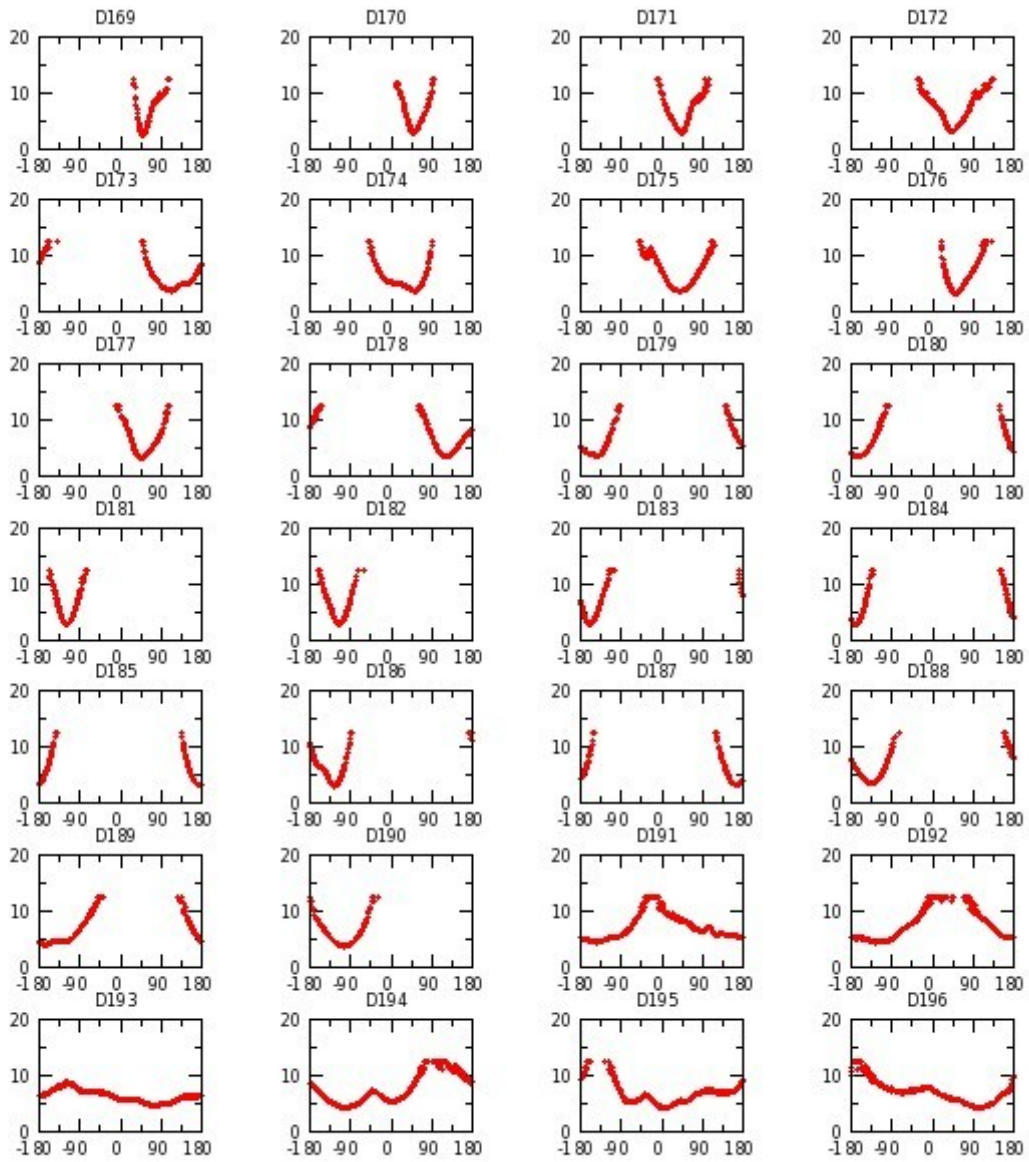


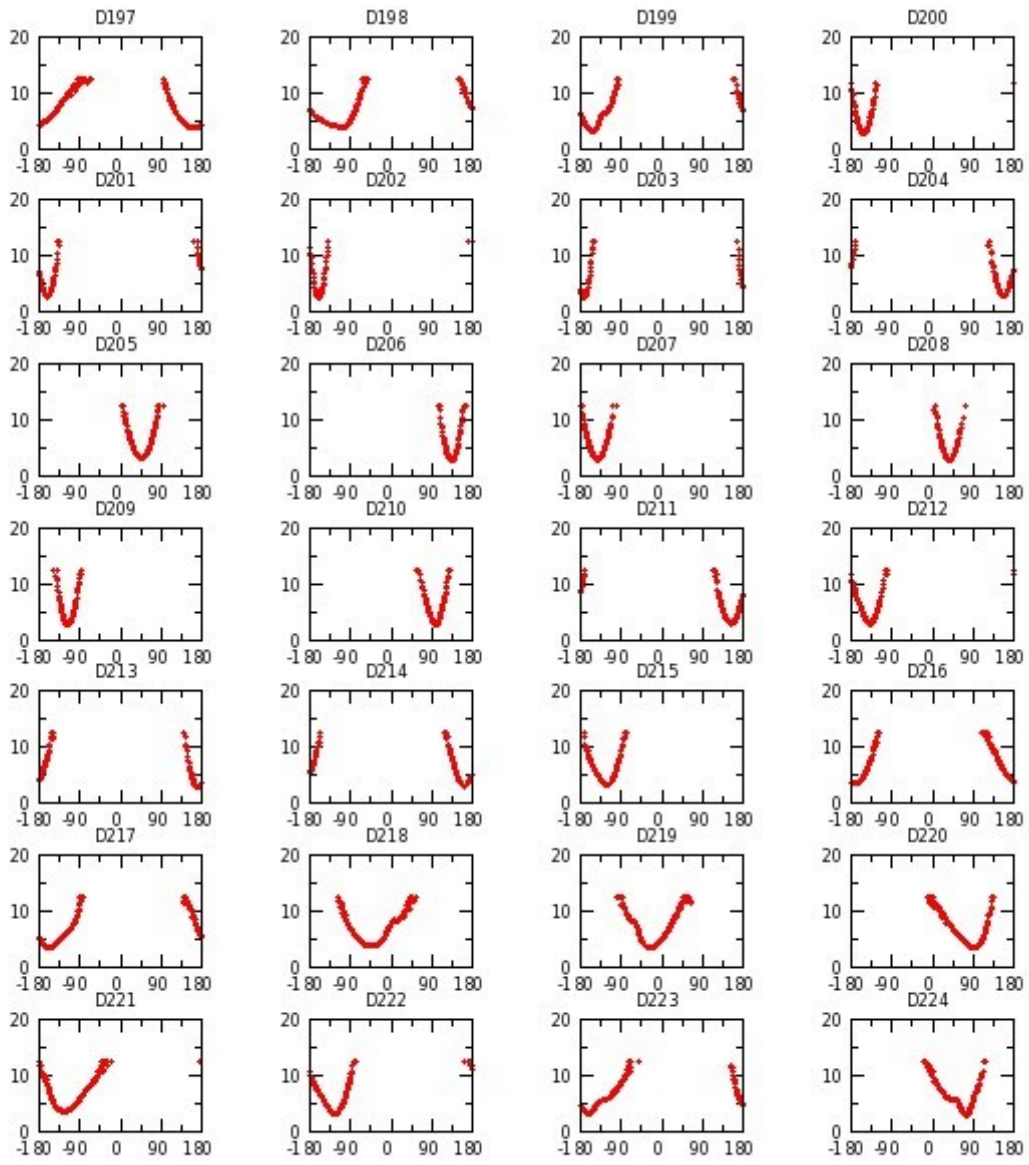


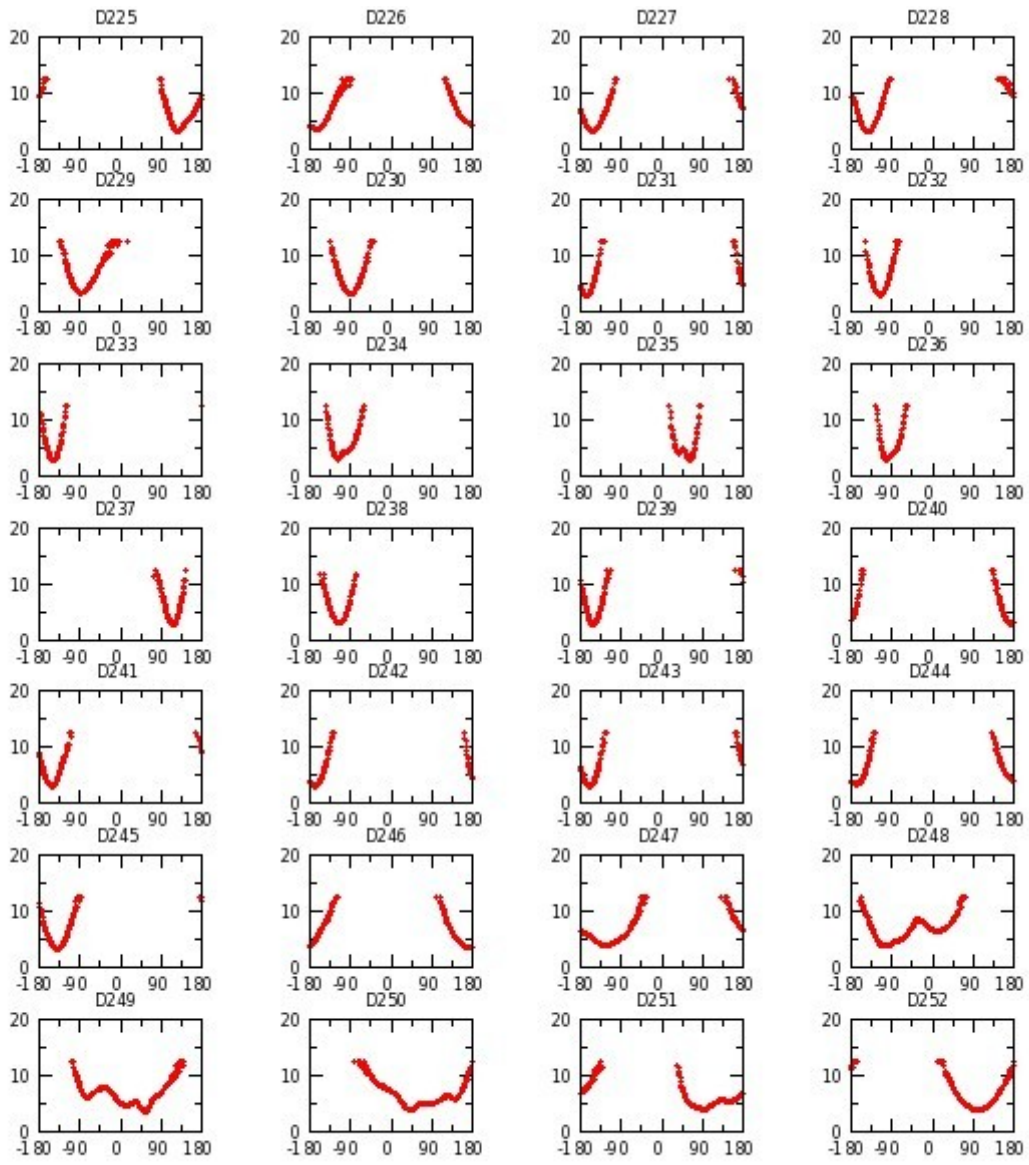


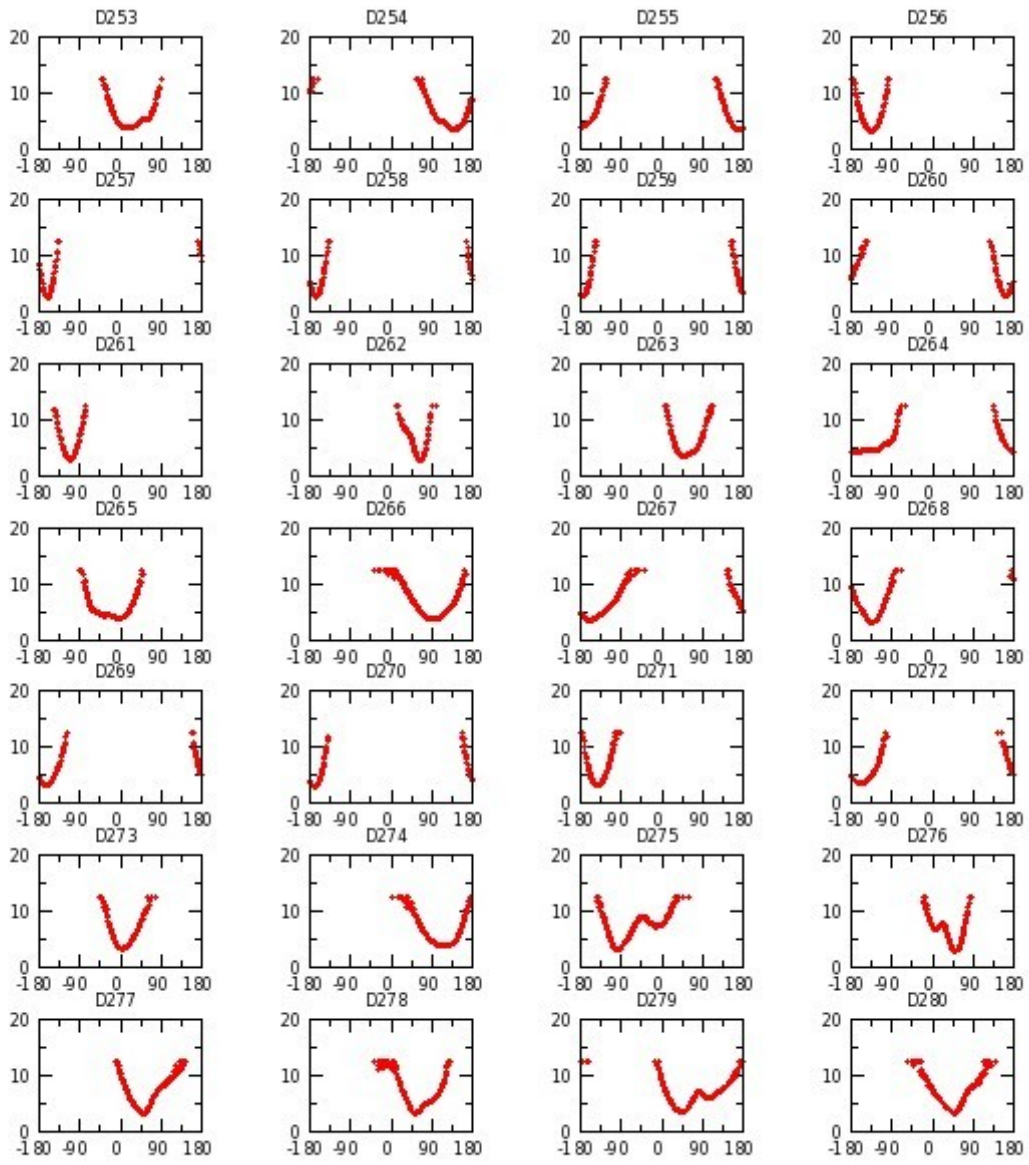


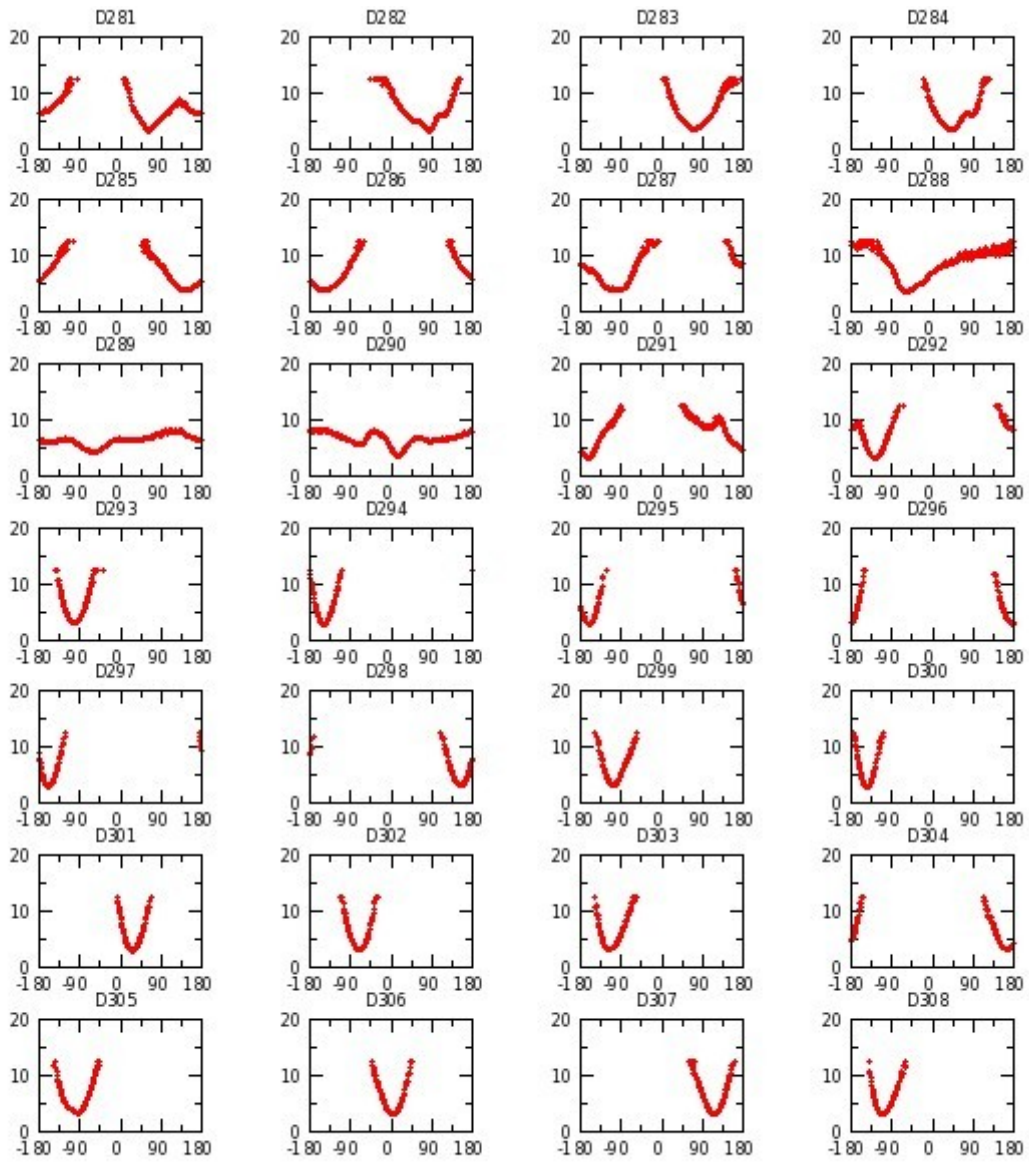


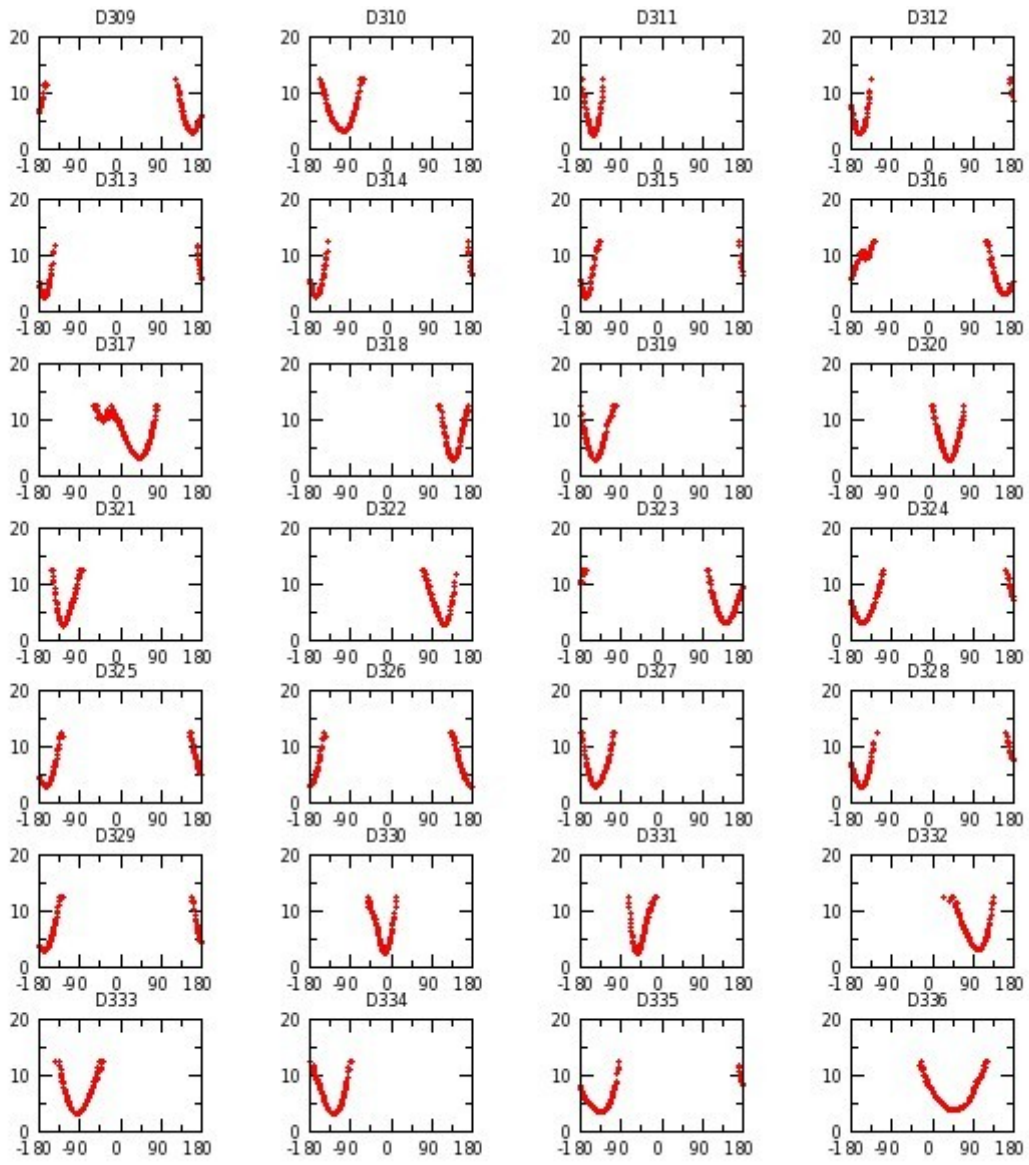


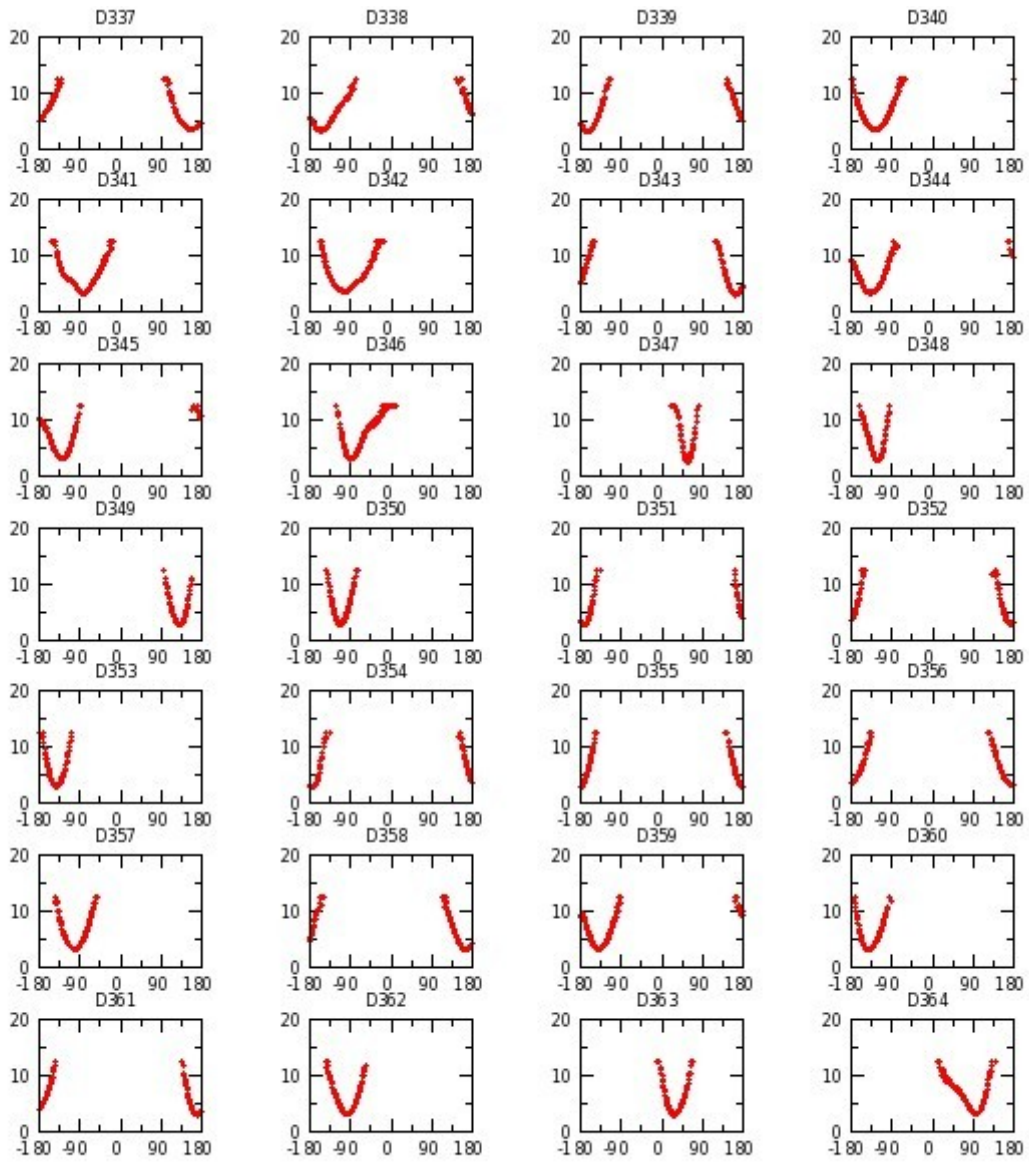


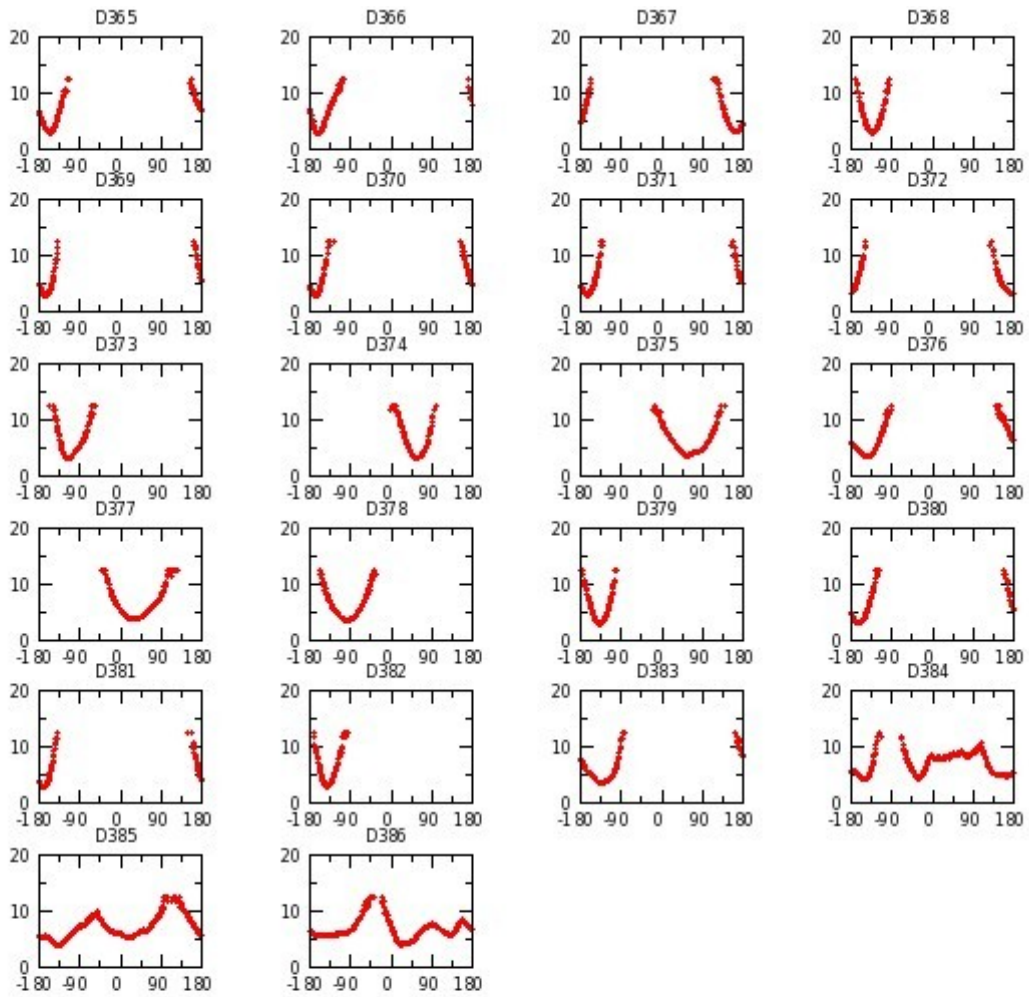




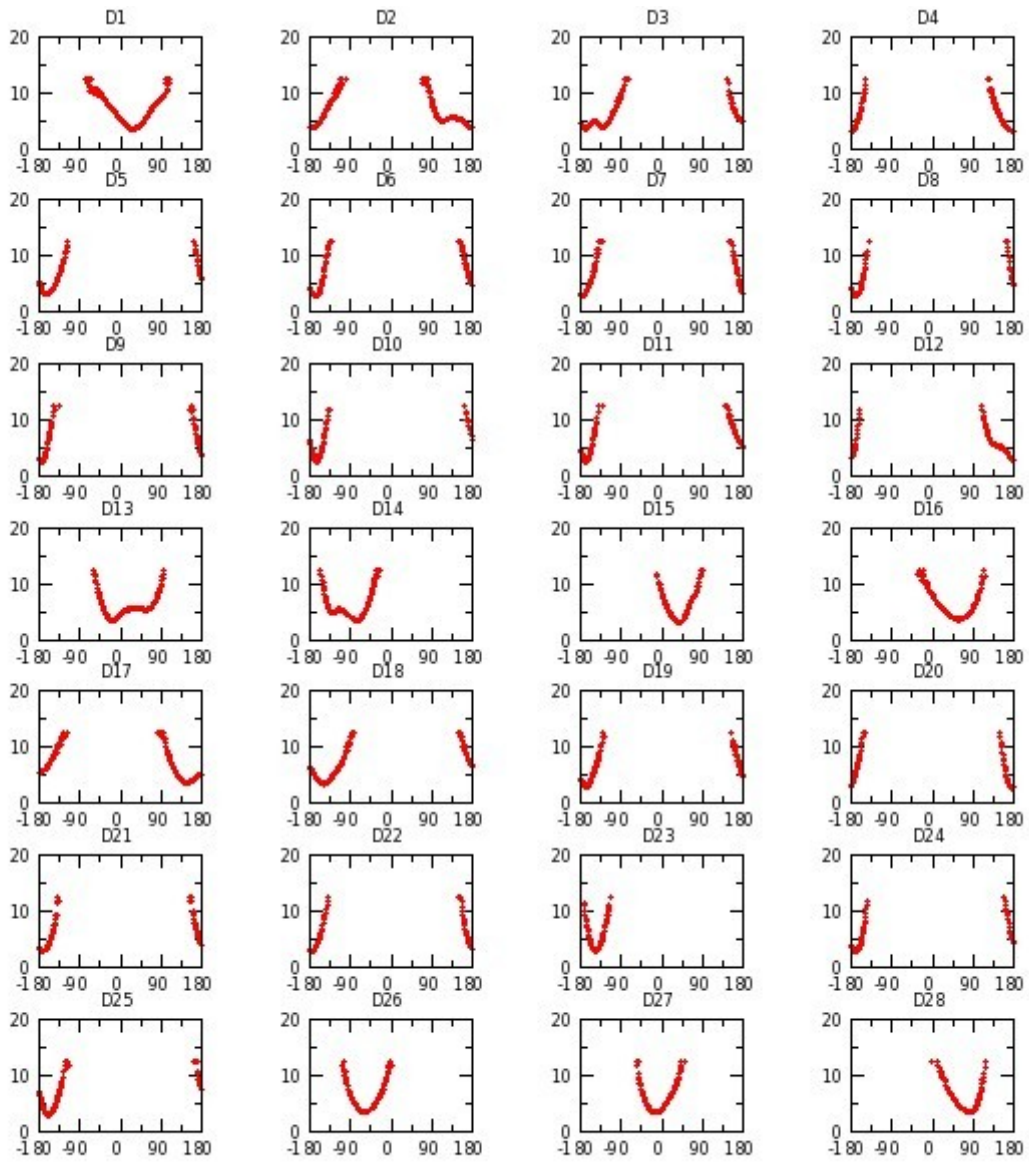


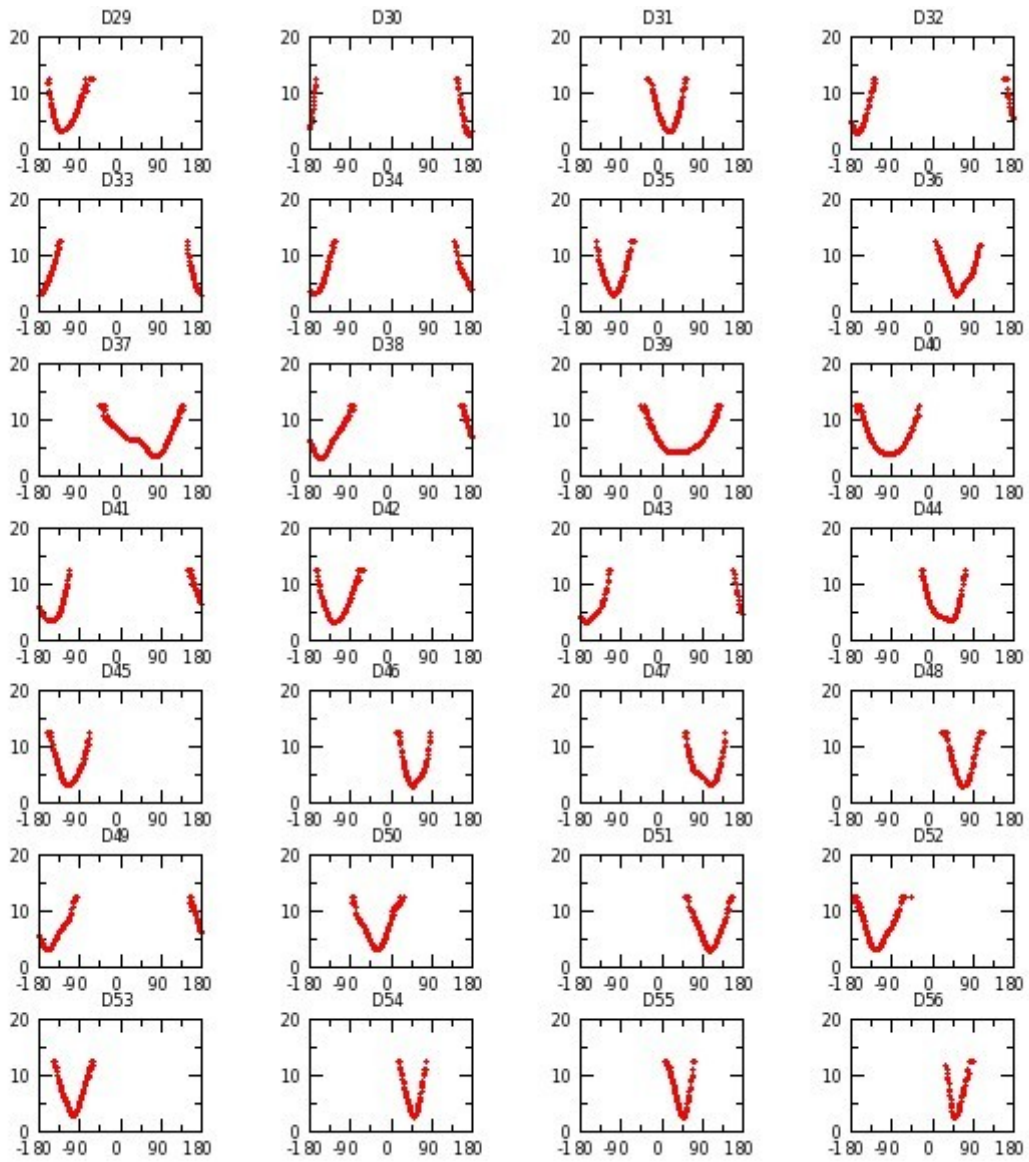


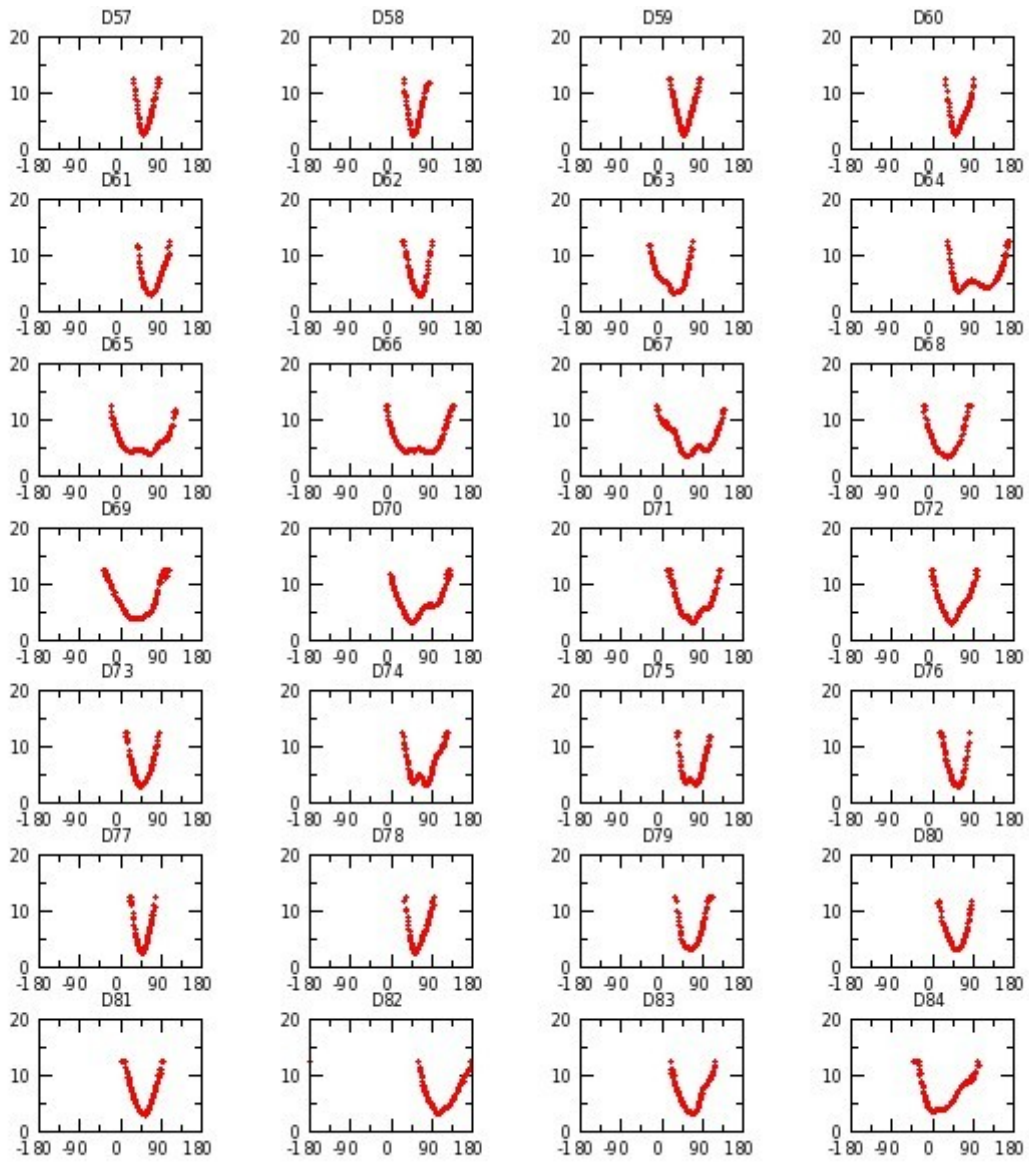


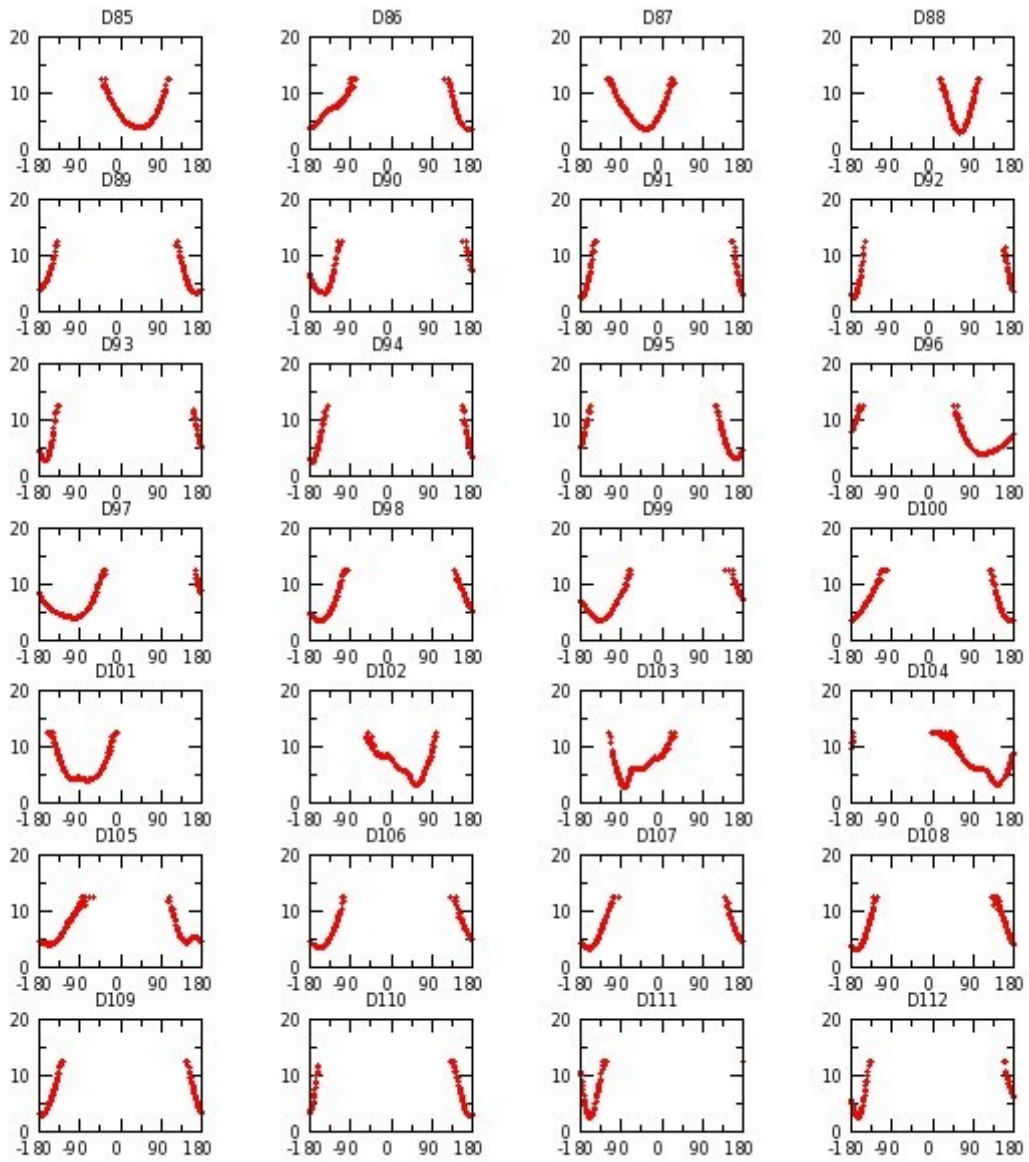


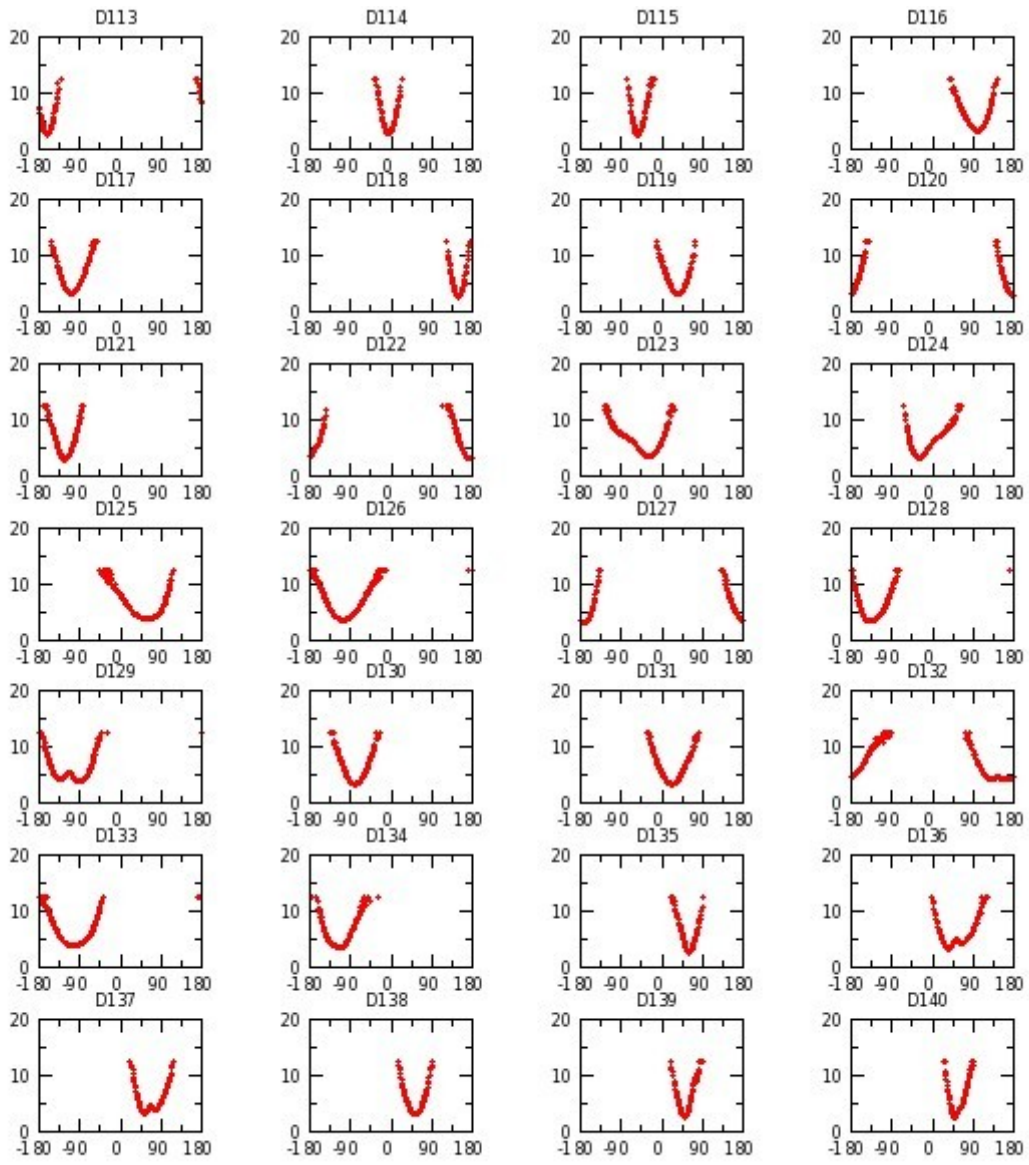
Annexe G 42 : M_NUaGAL réplique III

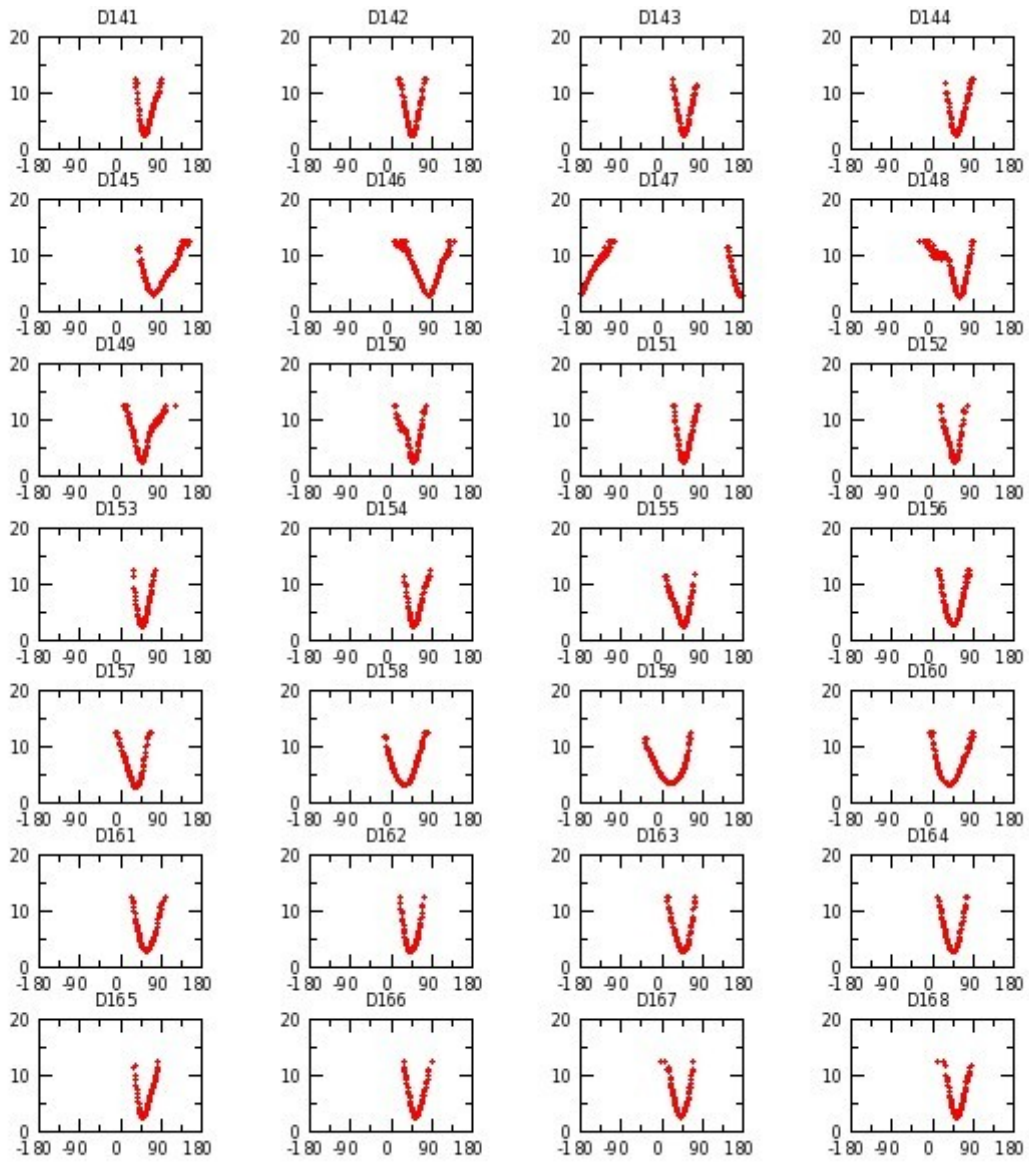


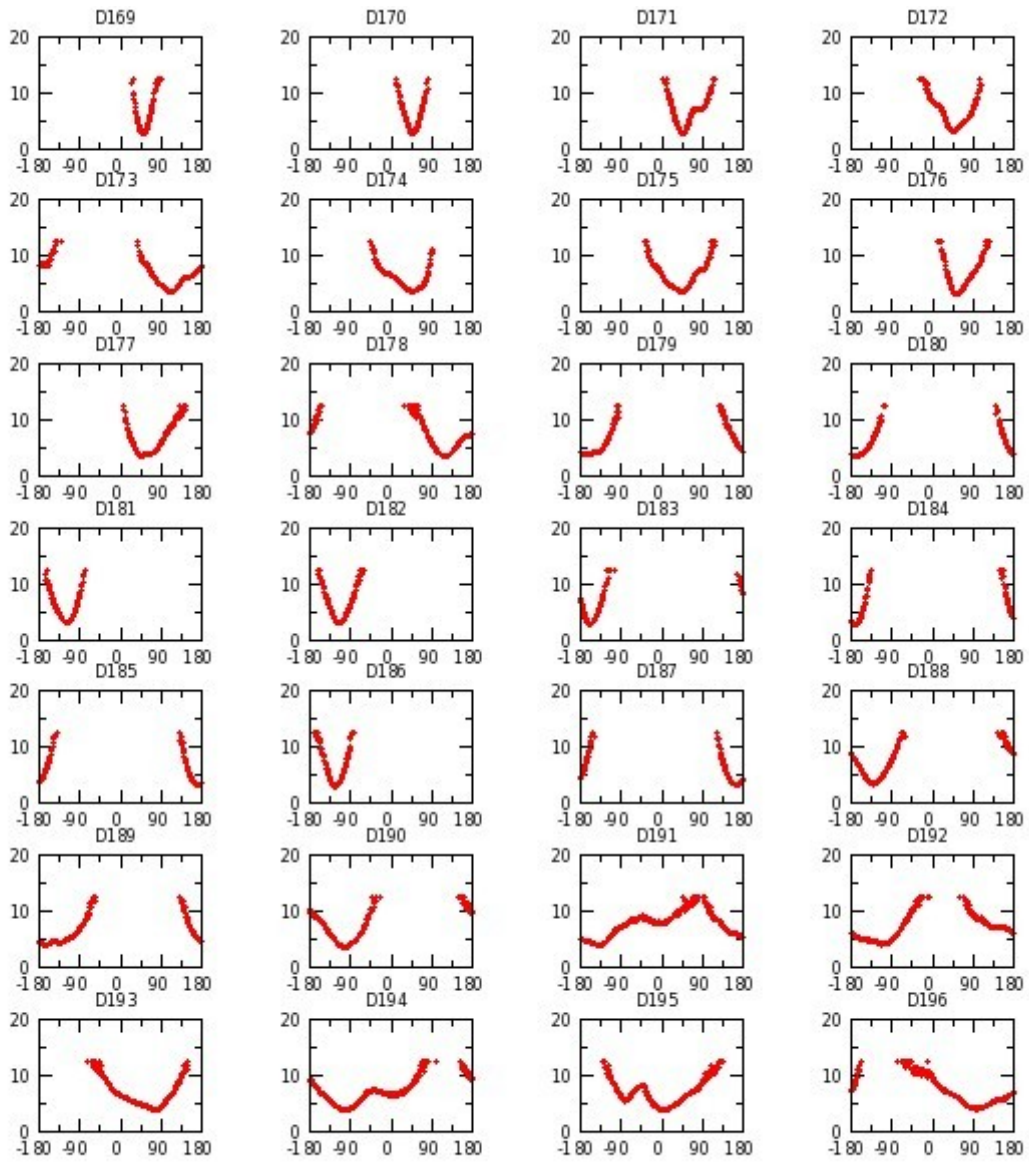


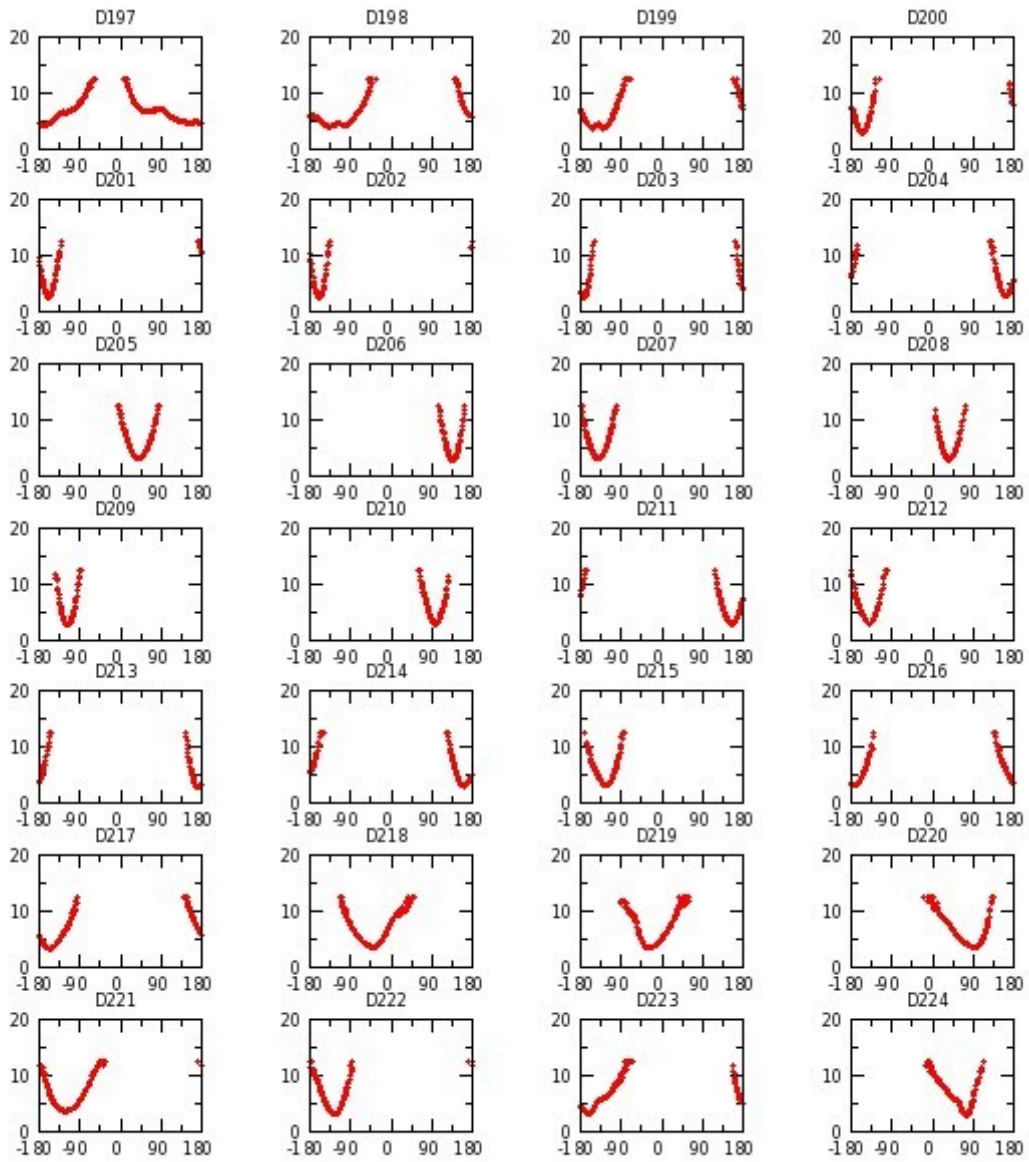


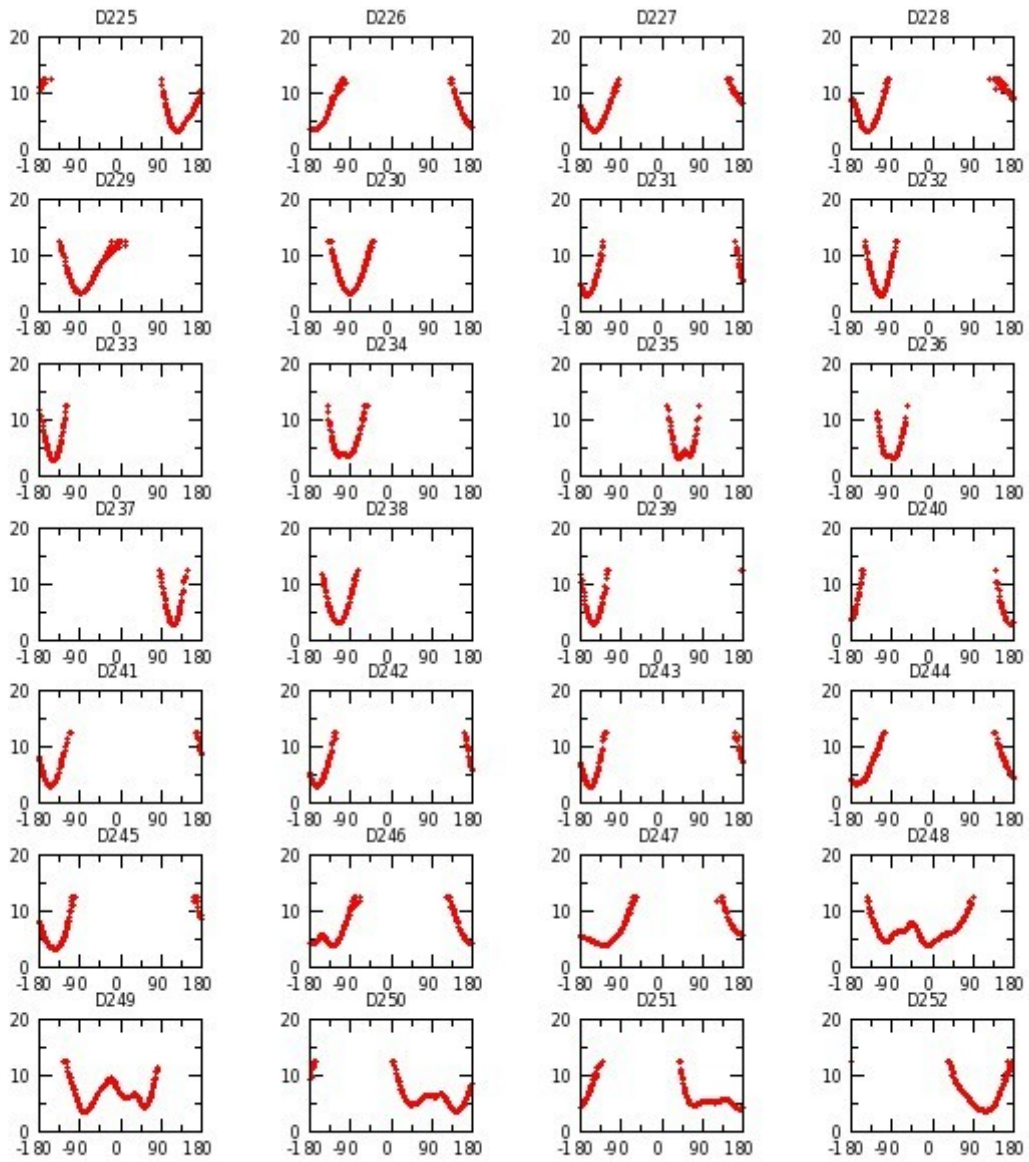


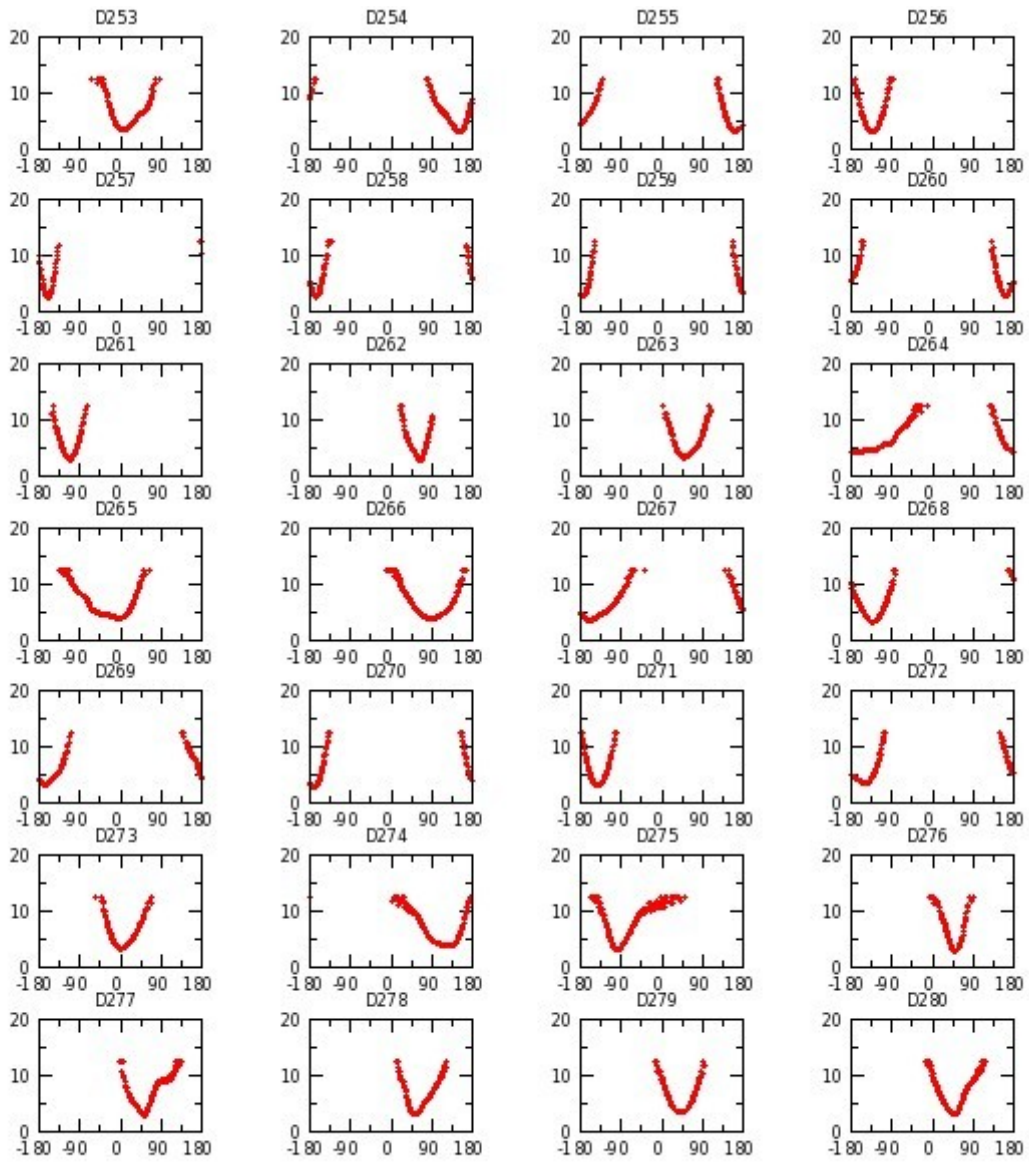


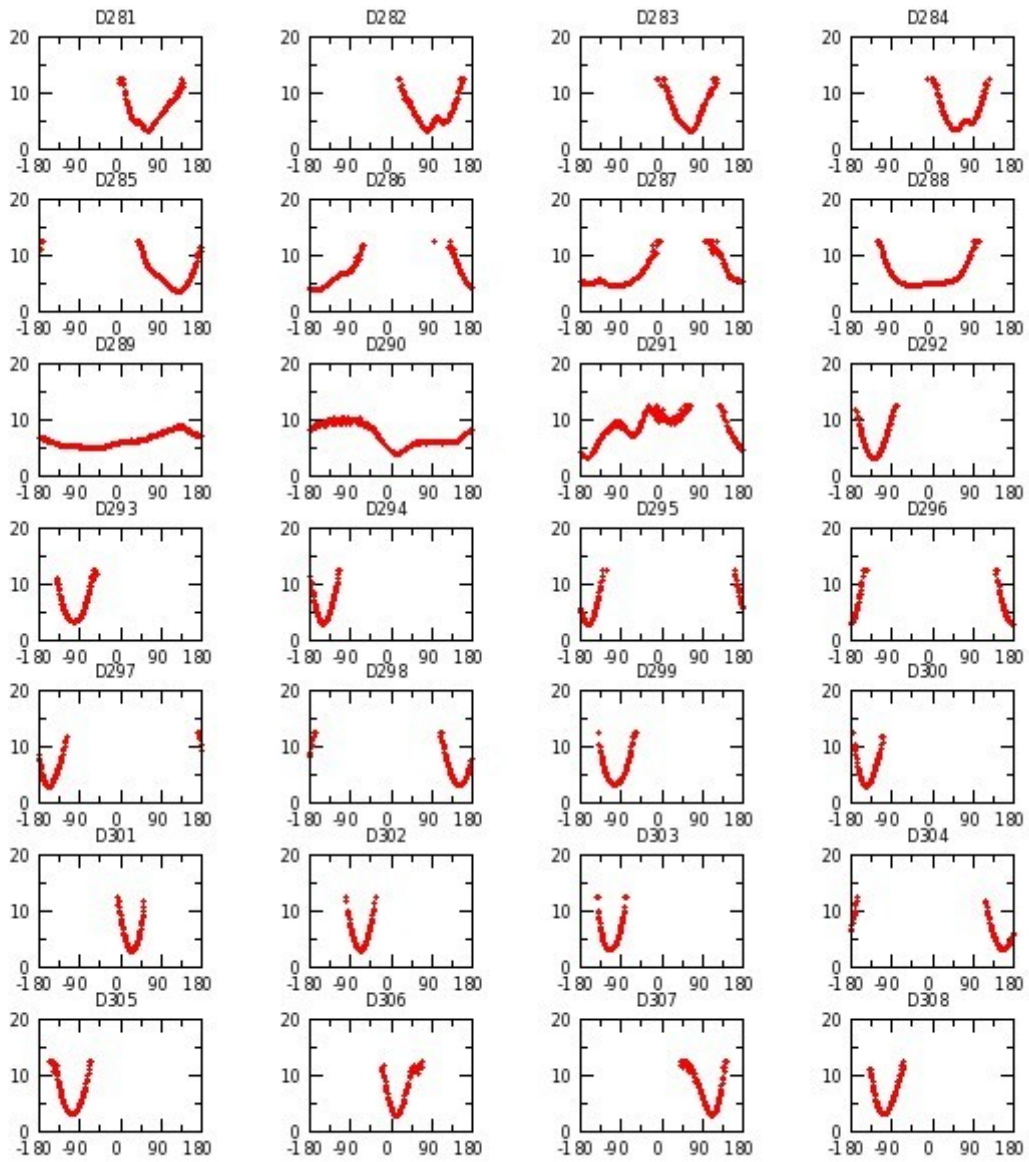


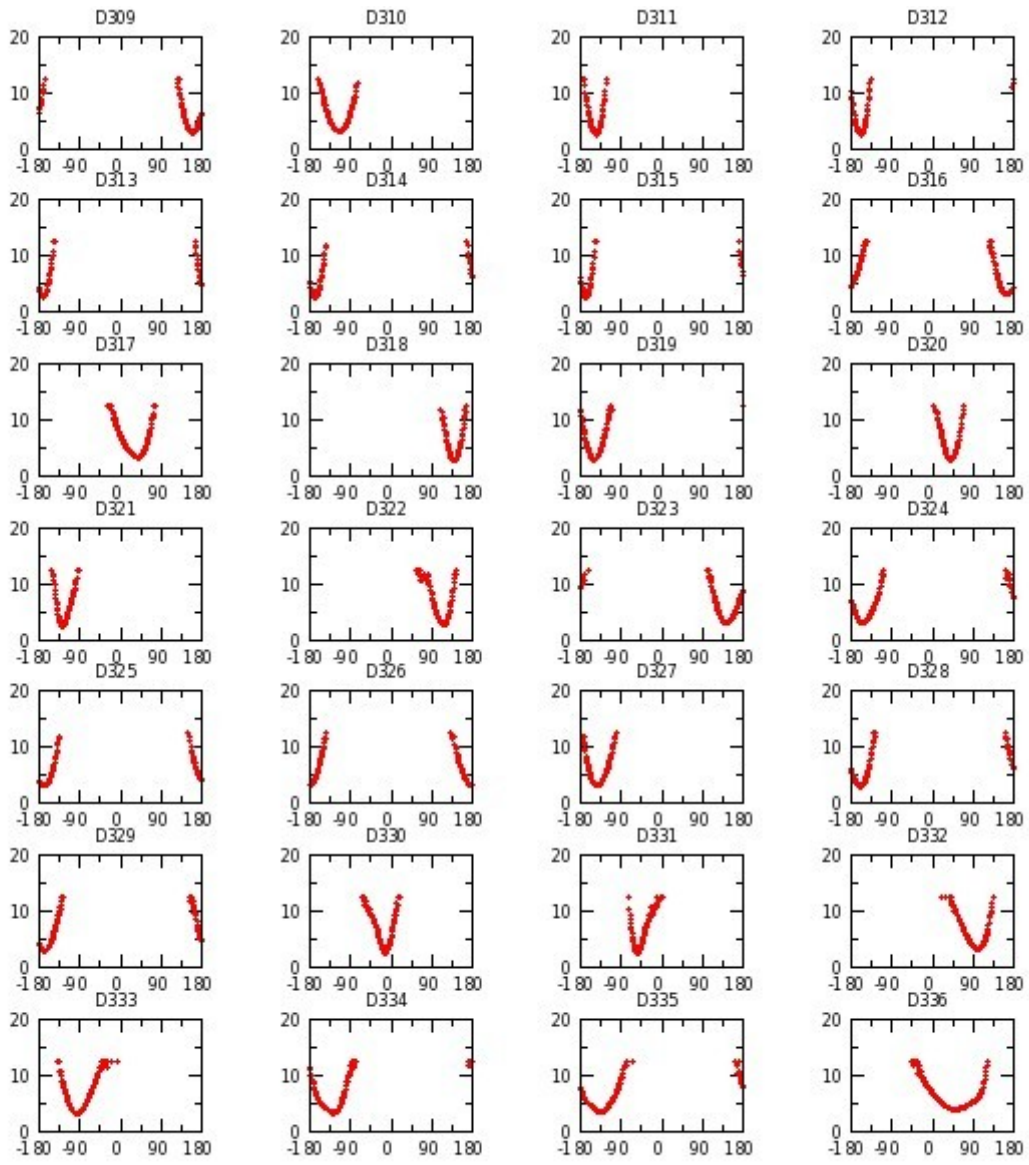


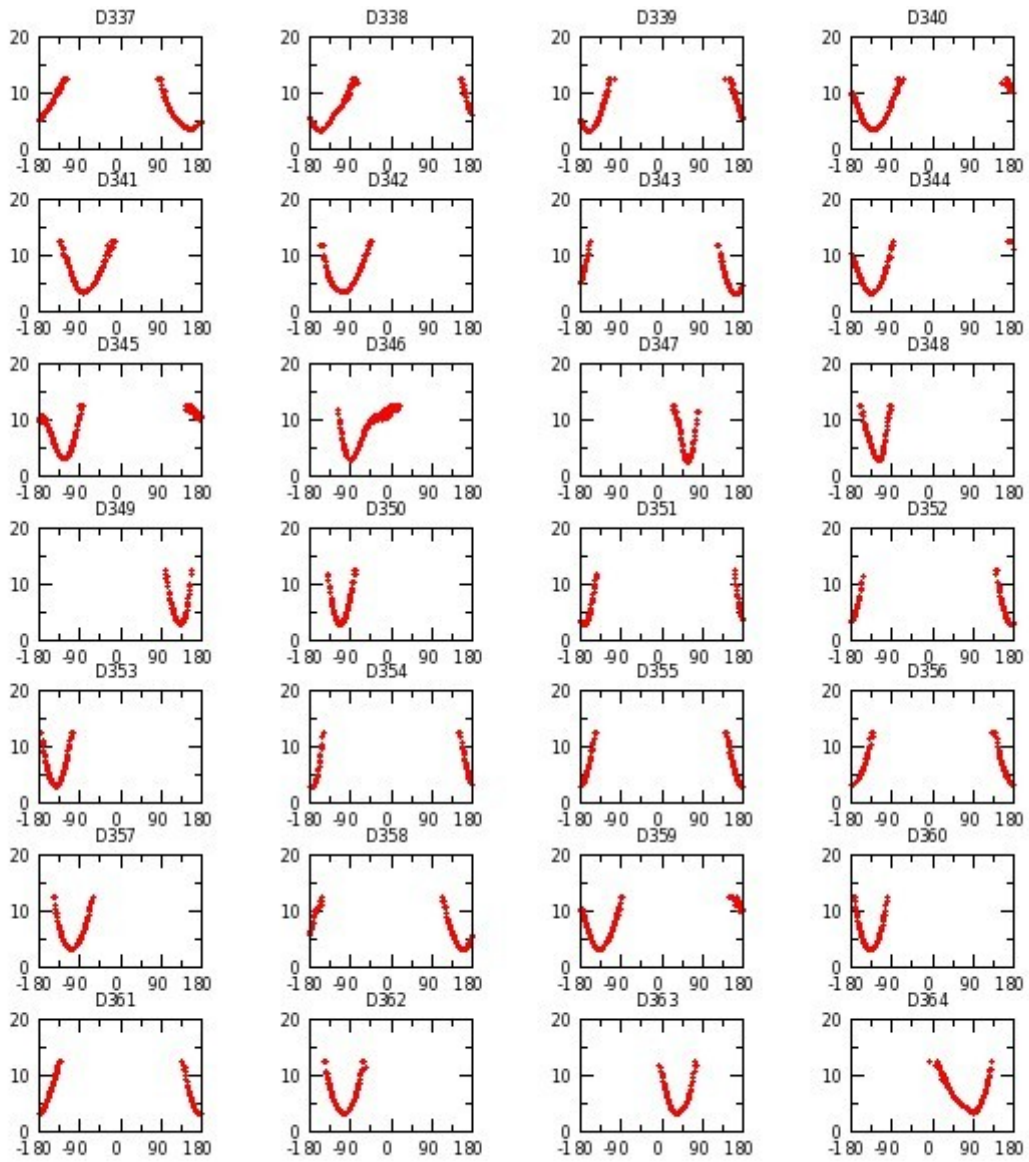


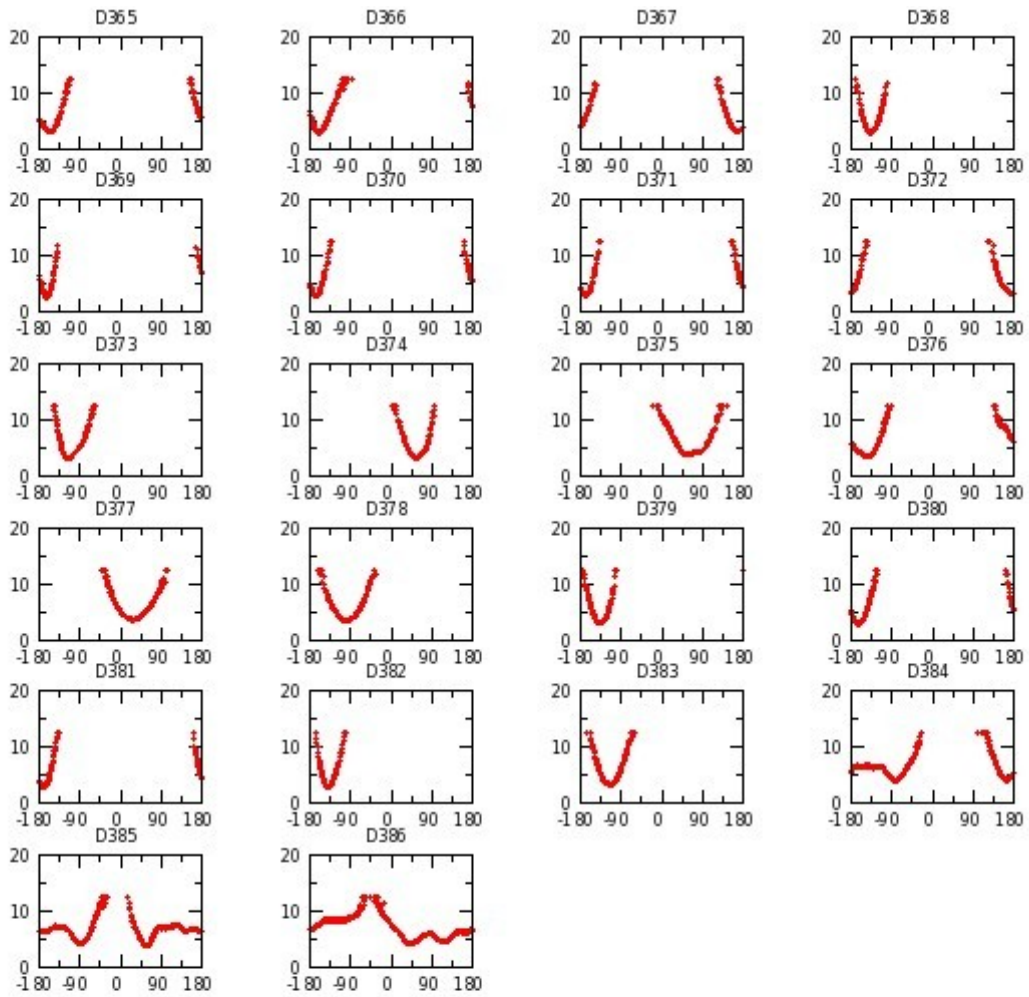




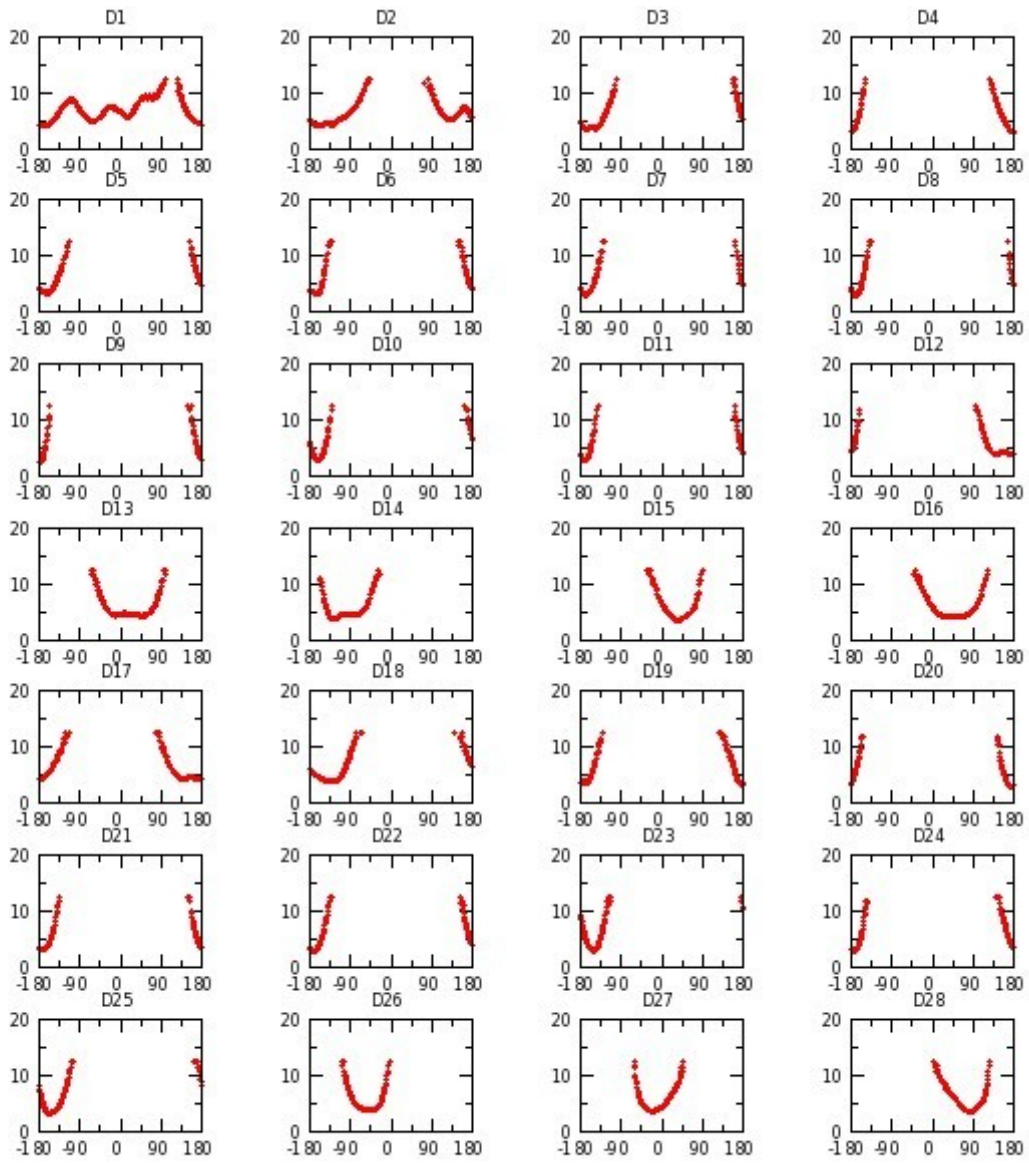


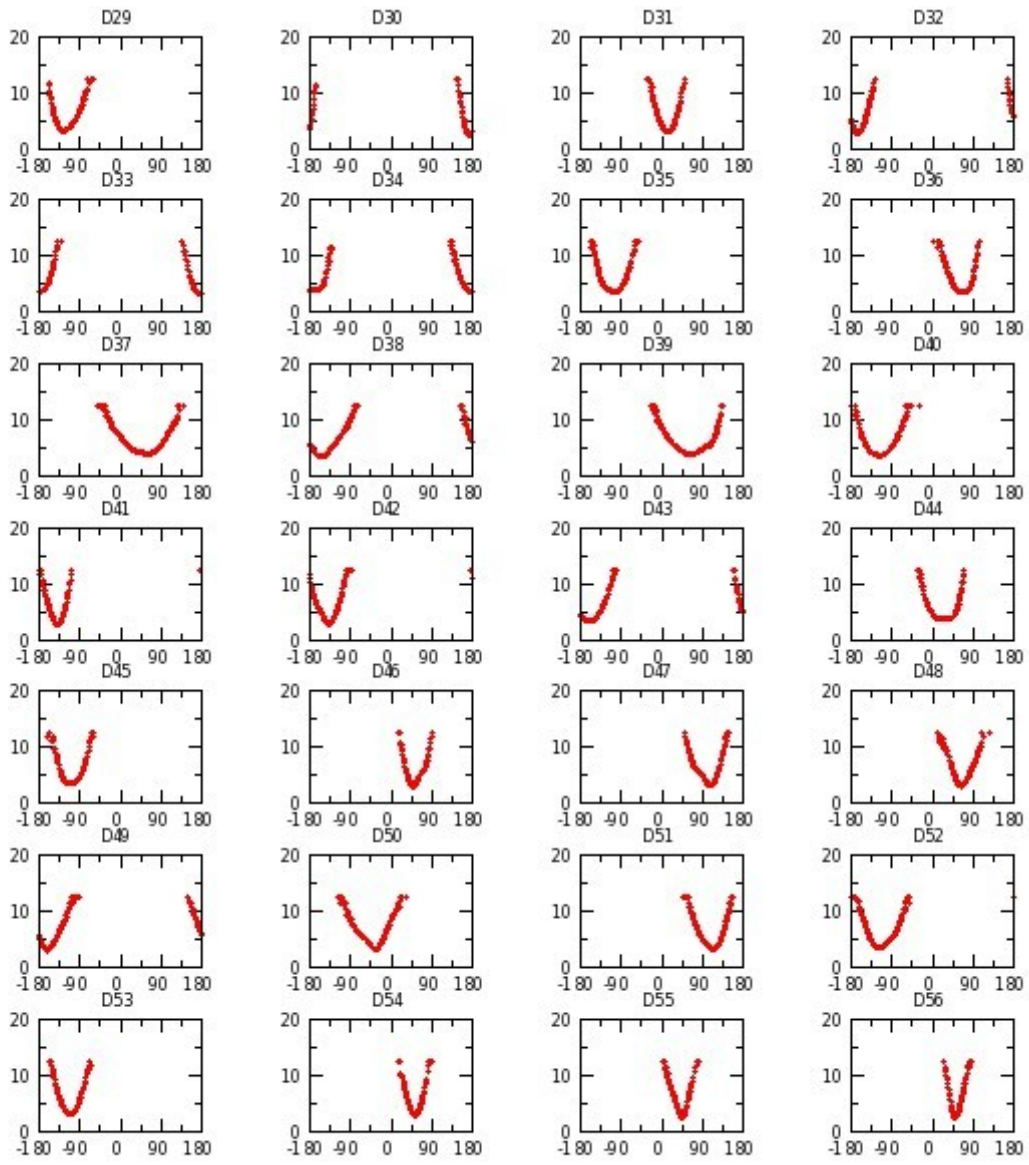


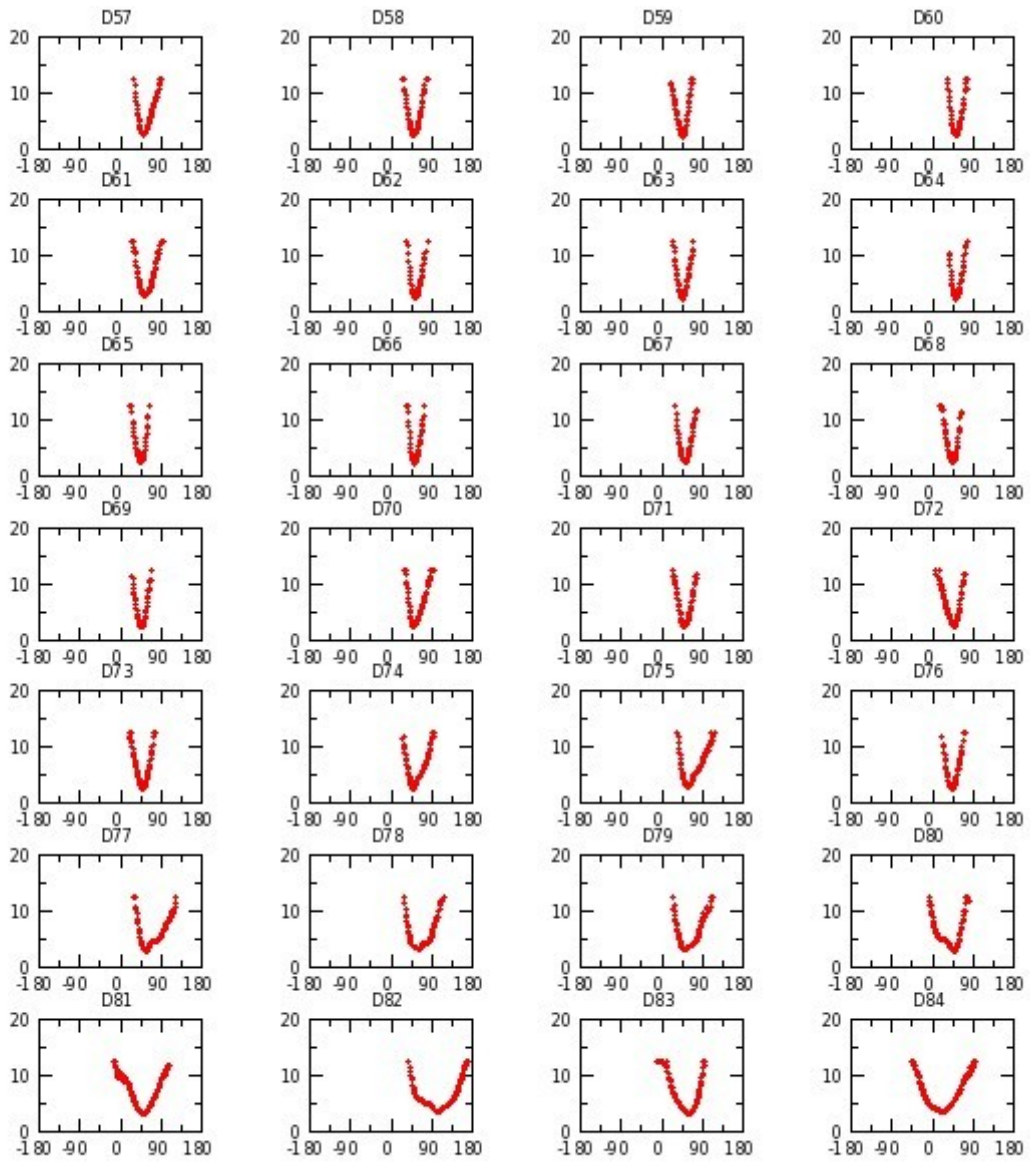


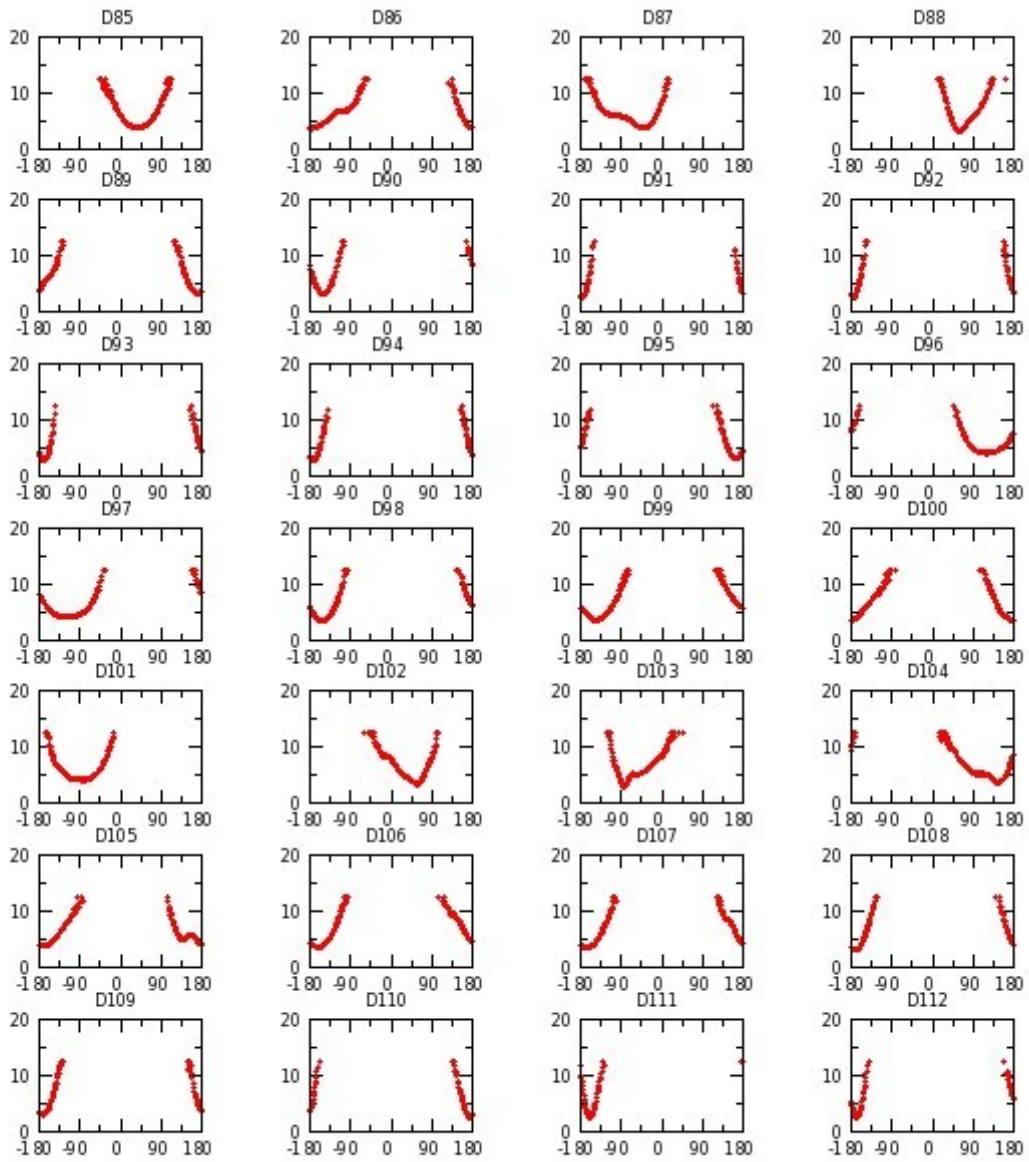


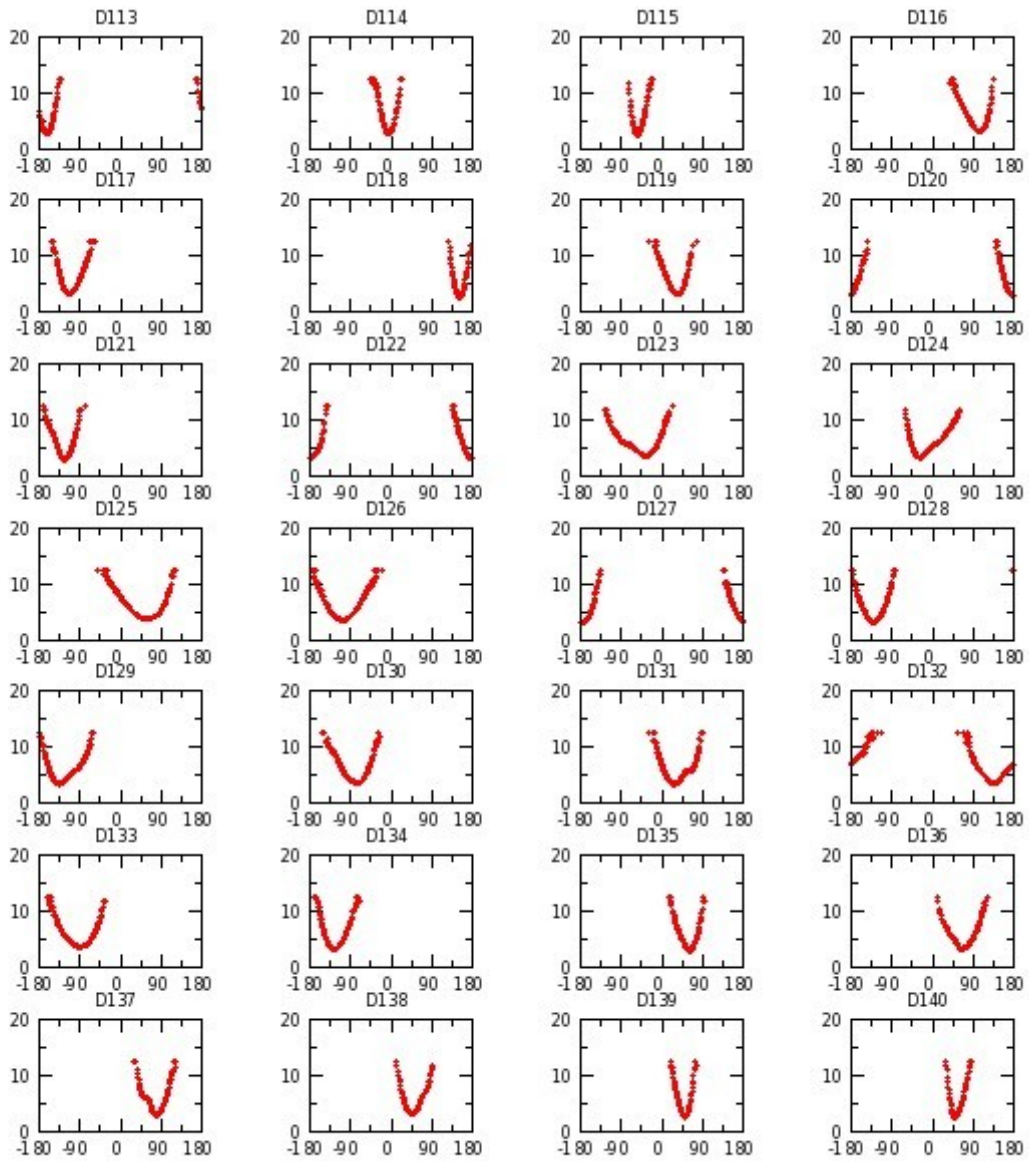
Annexe G 43 : M_OCH réplique I

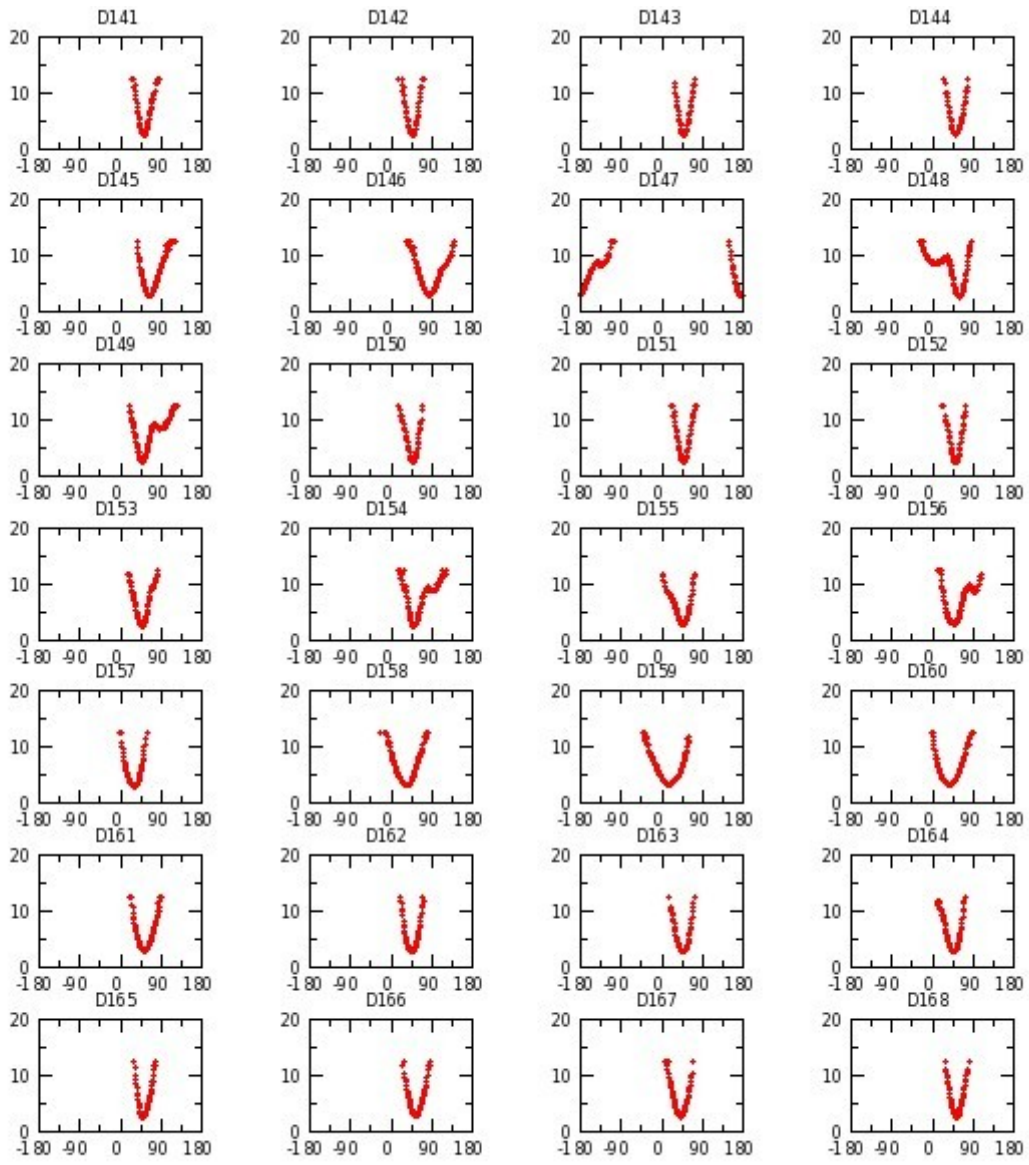


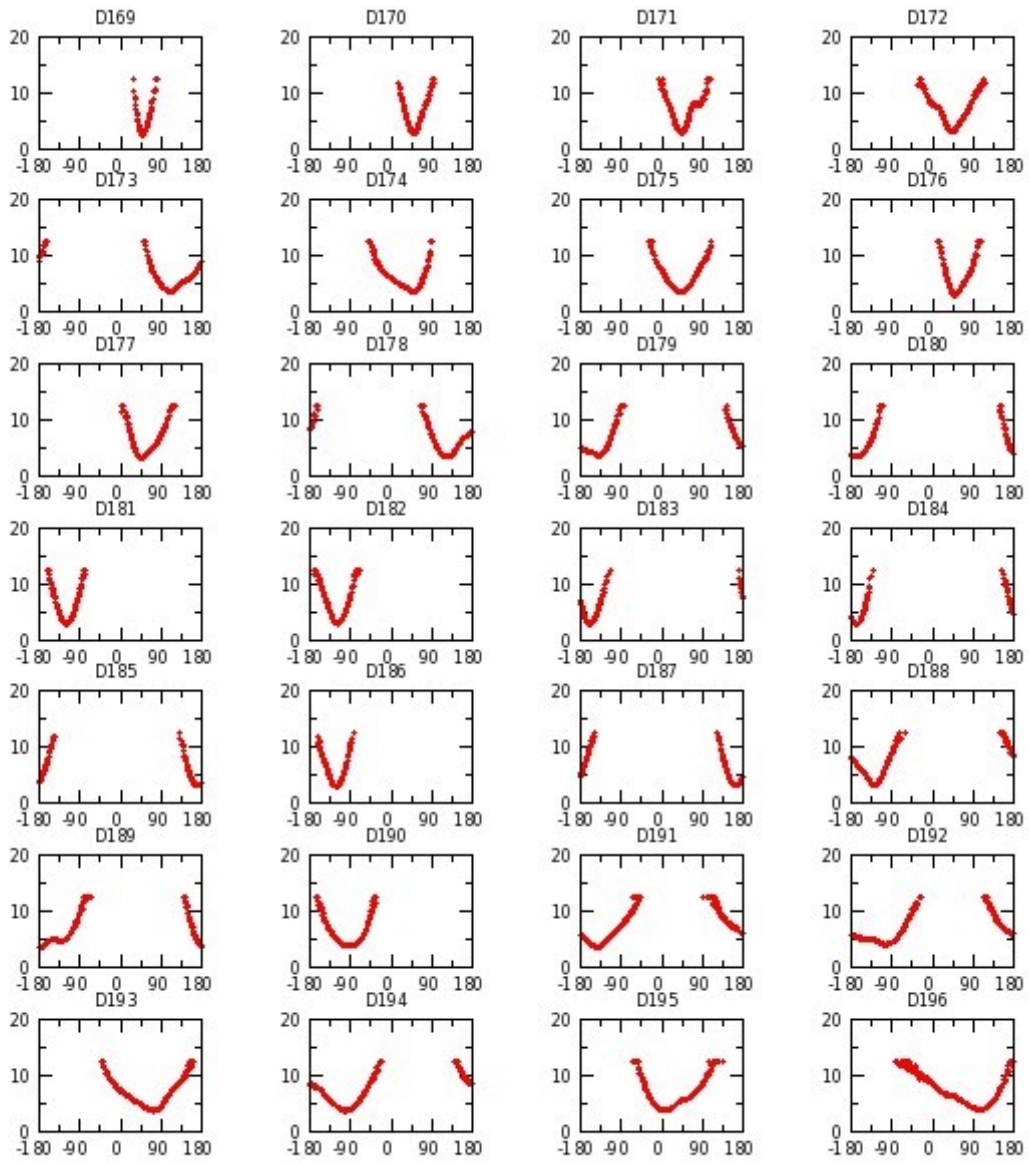


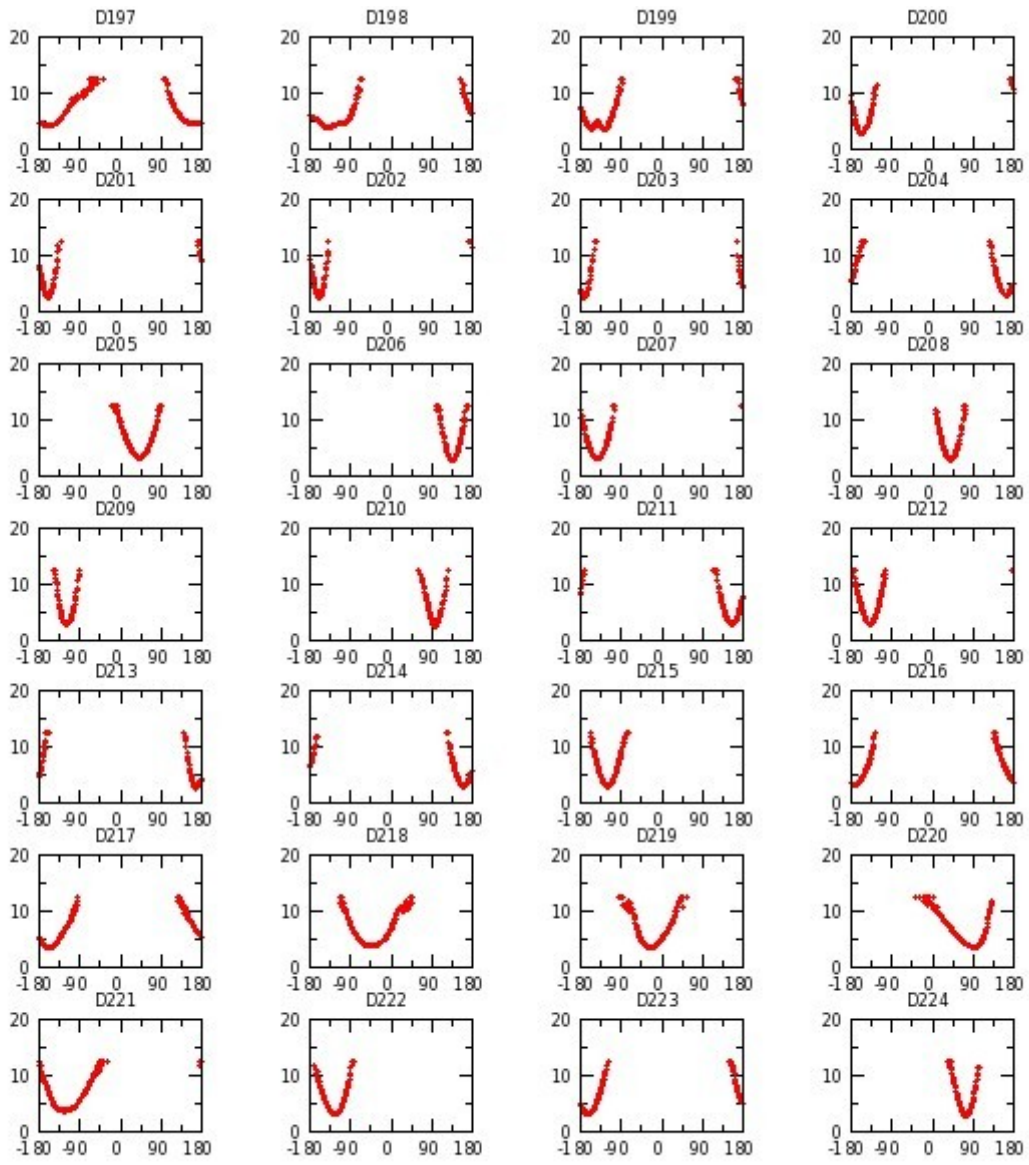


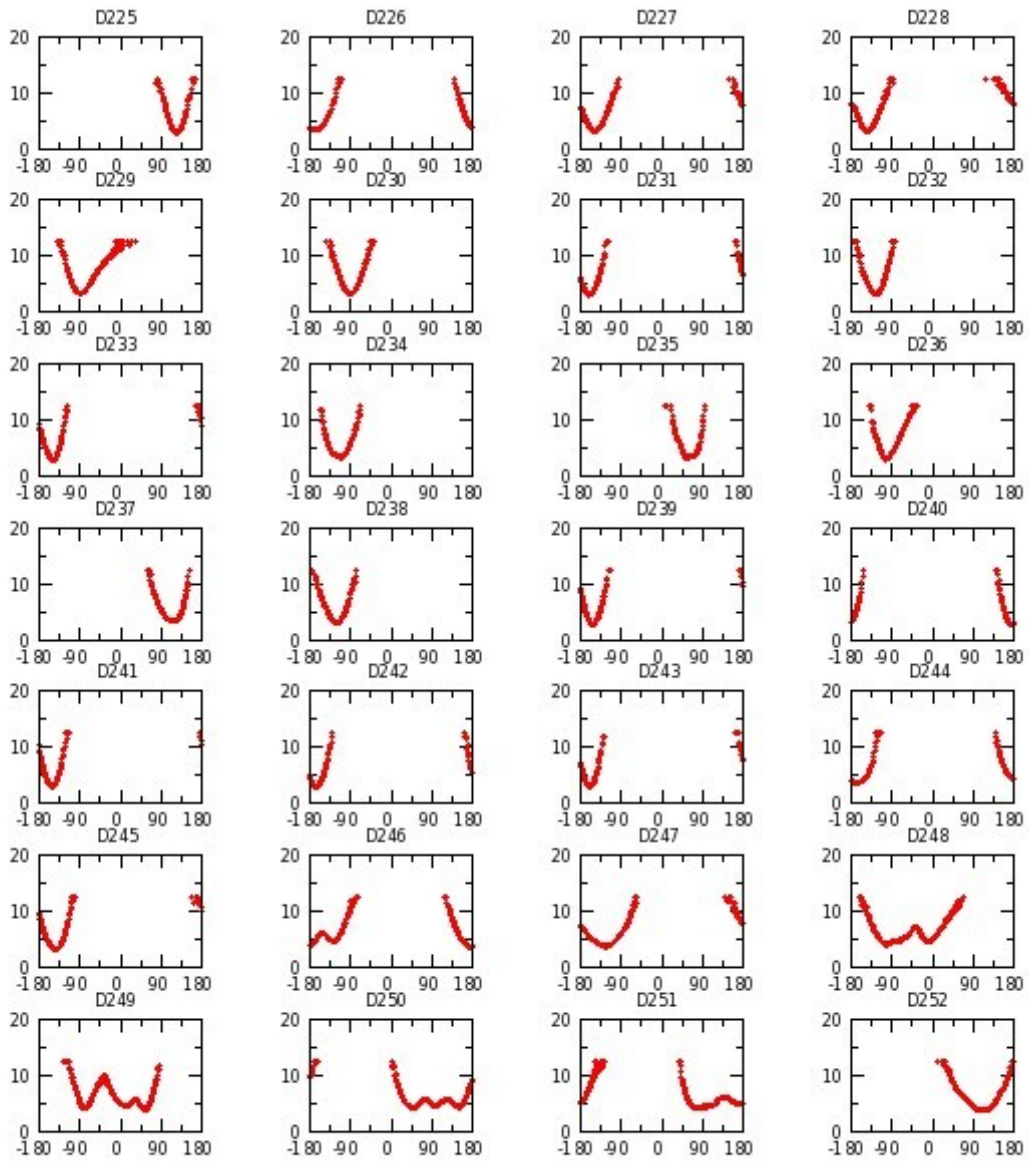


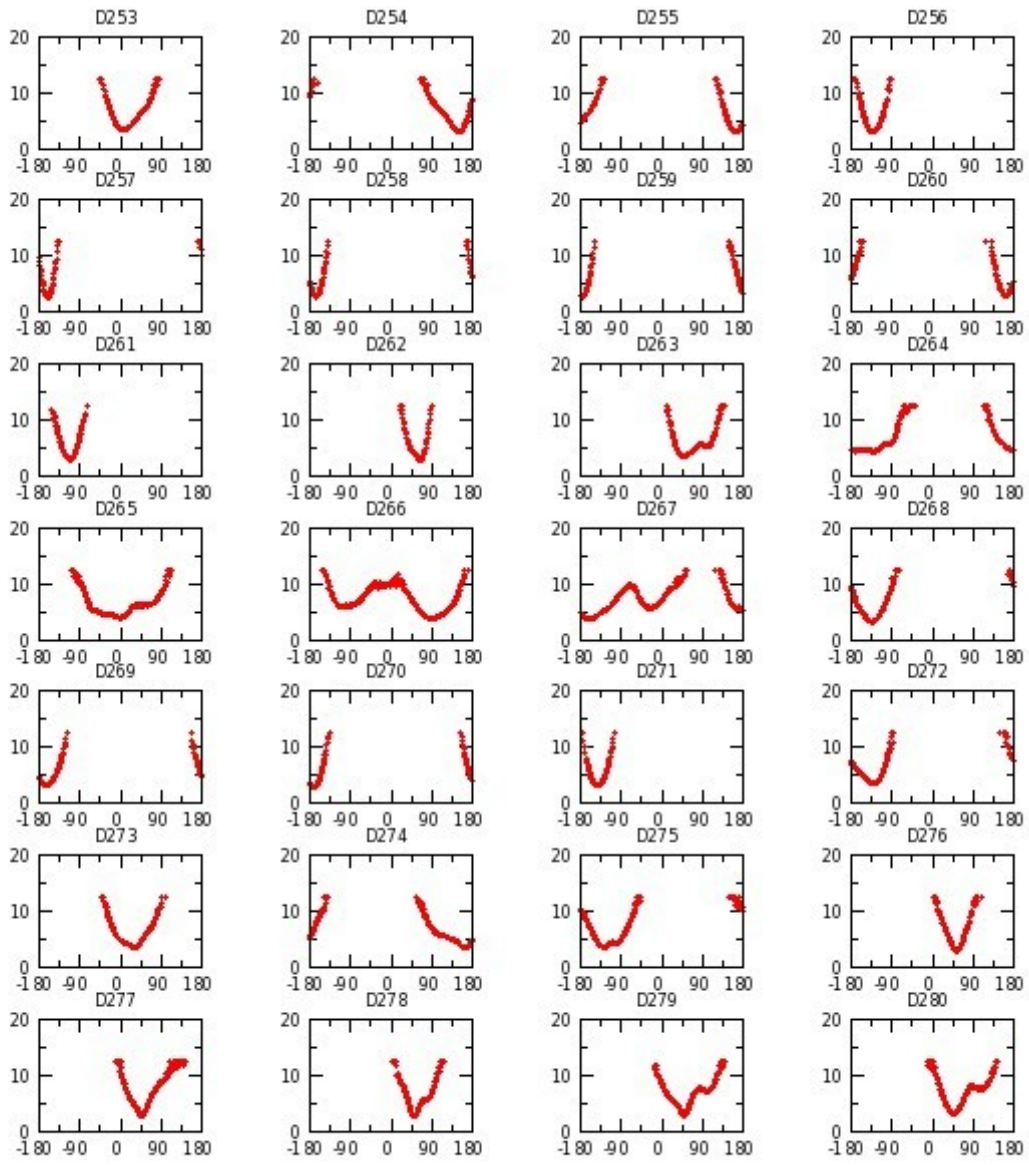


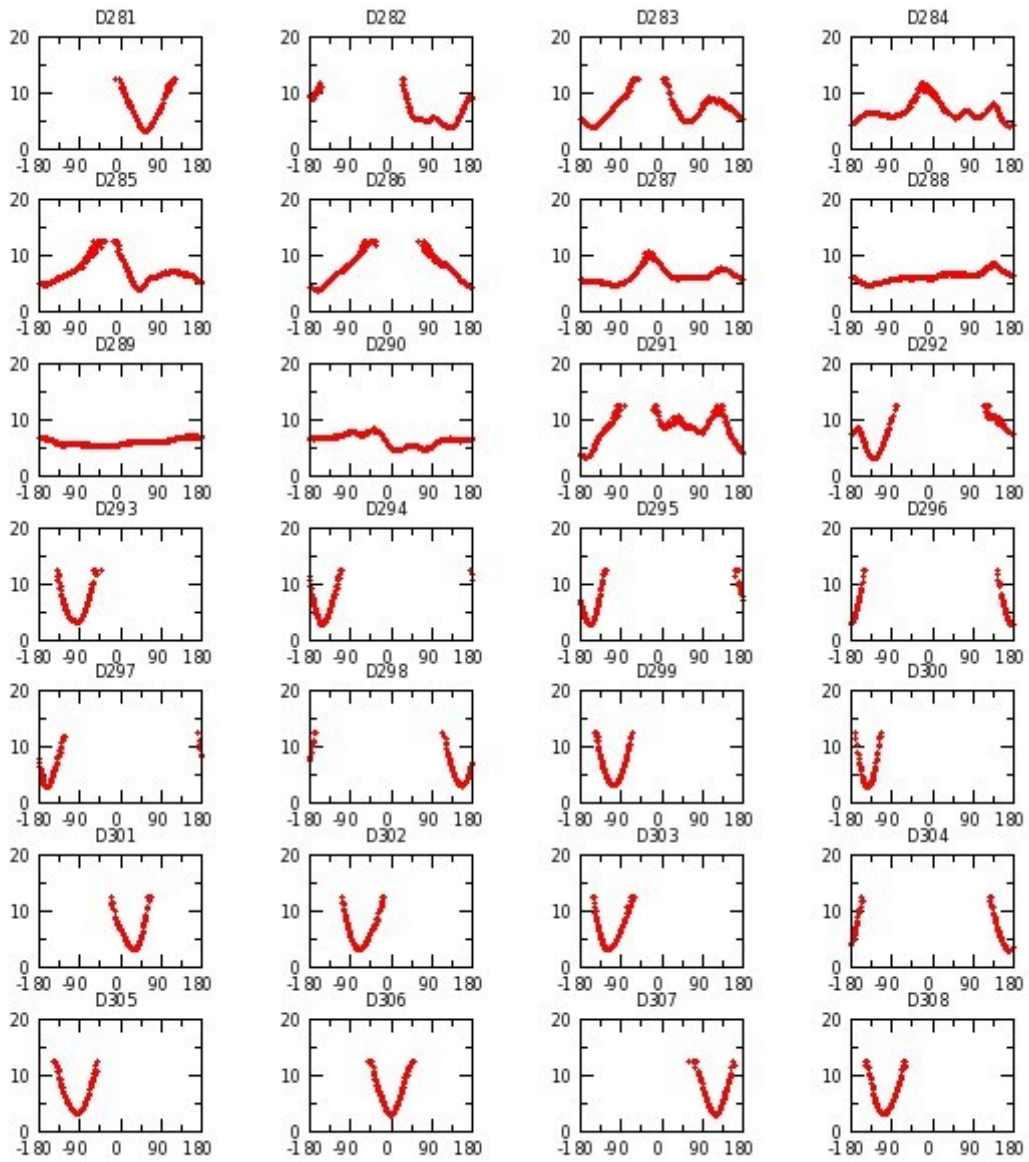


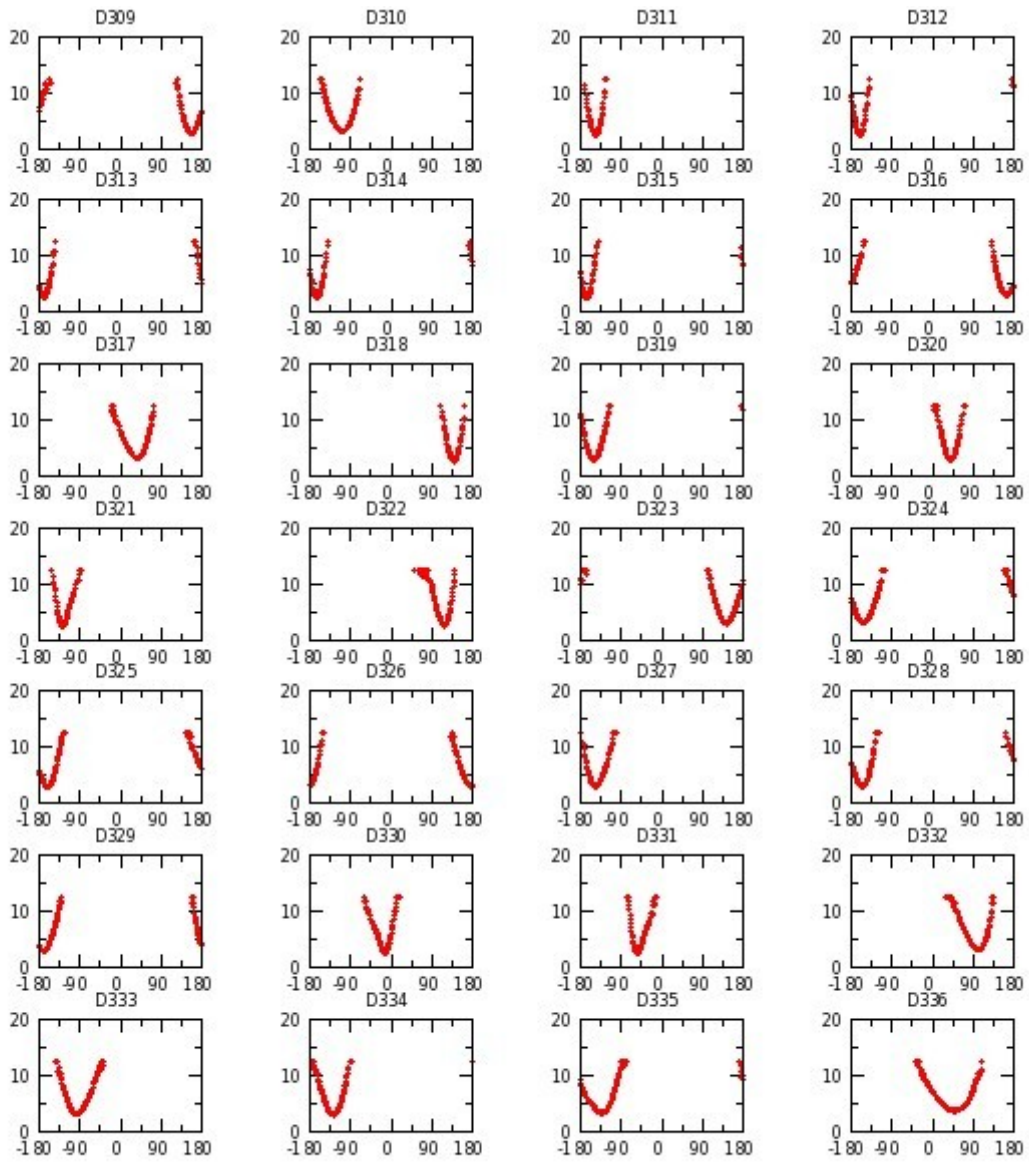


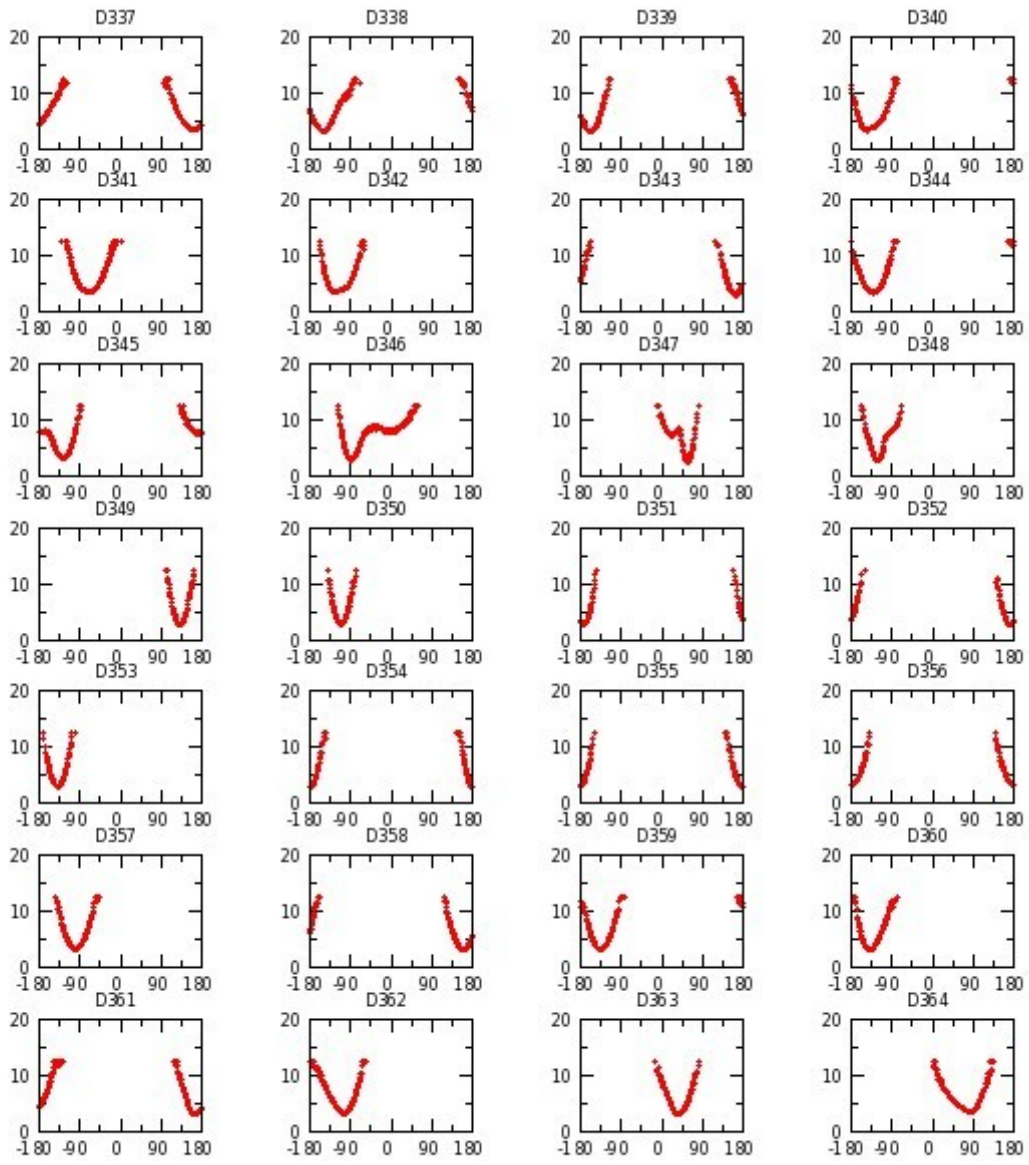


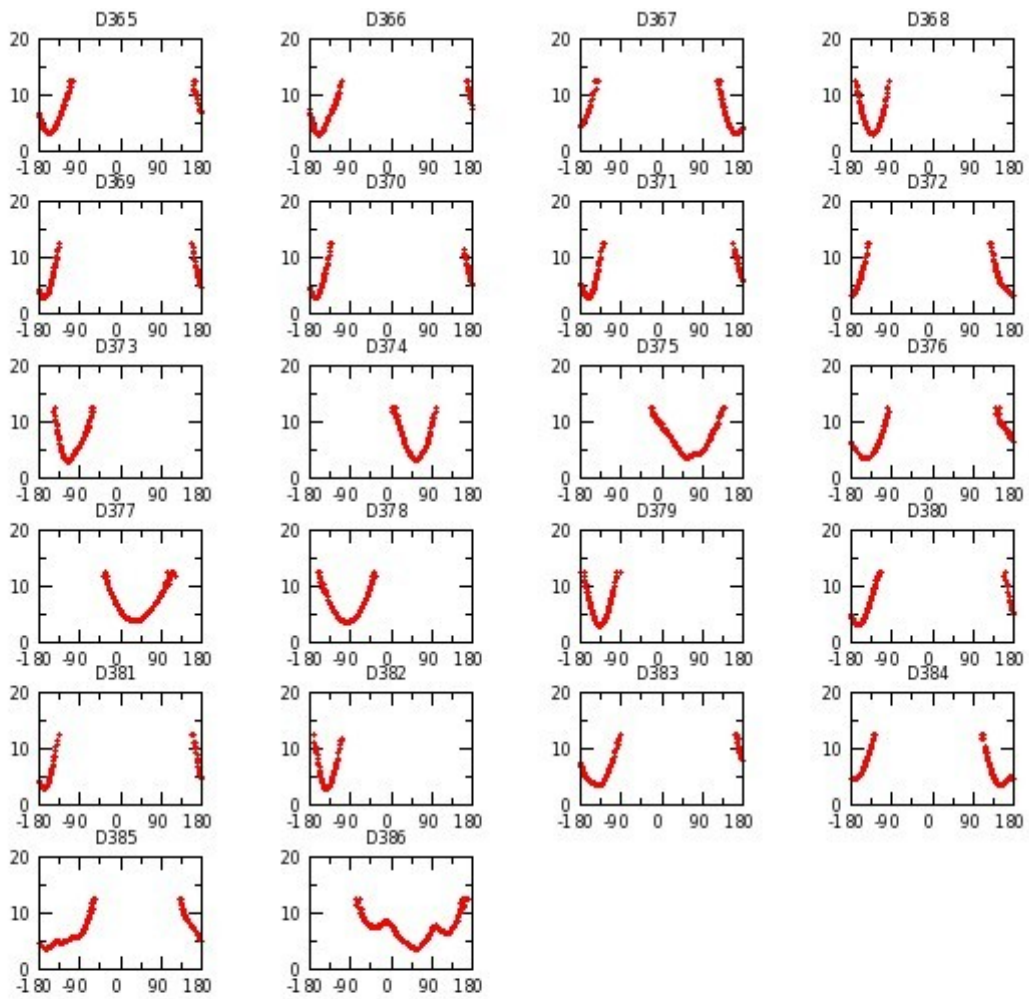




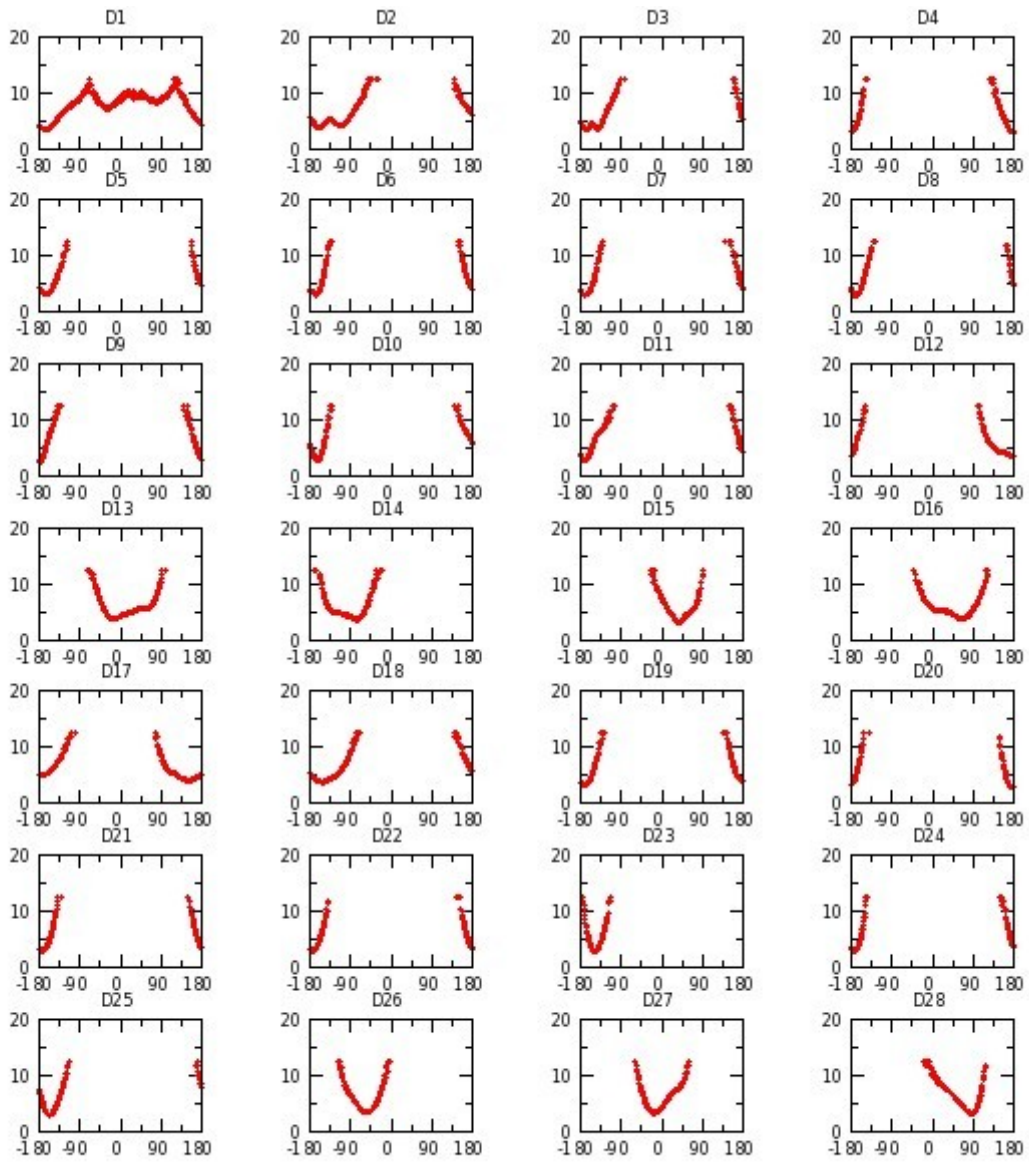


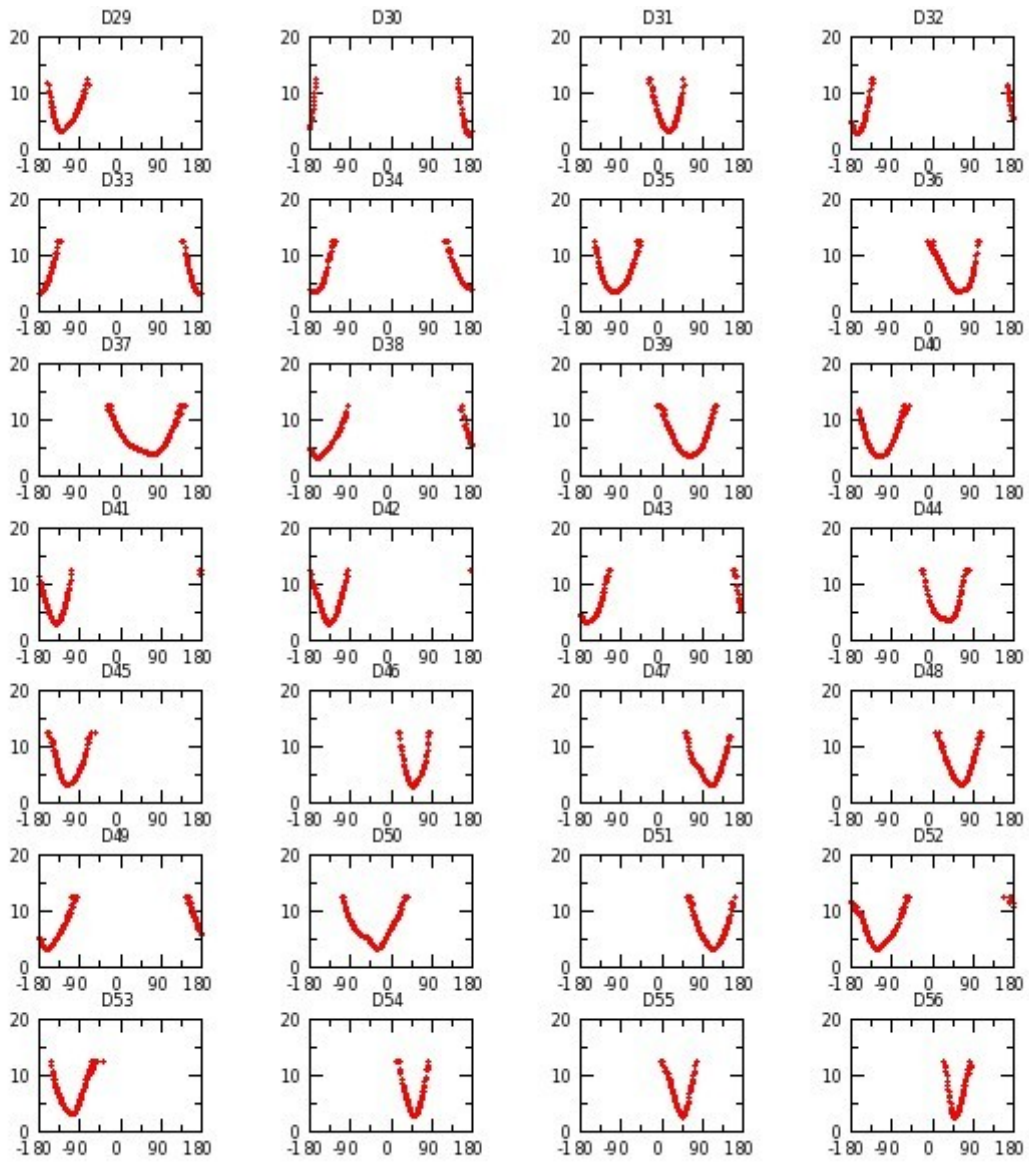


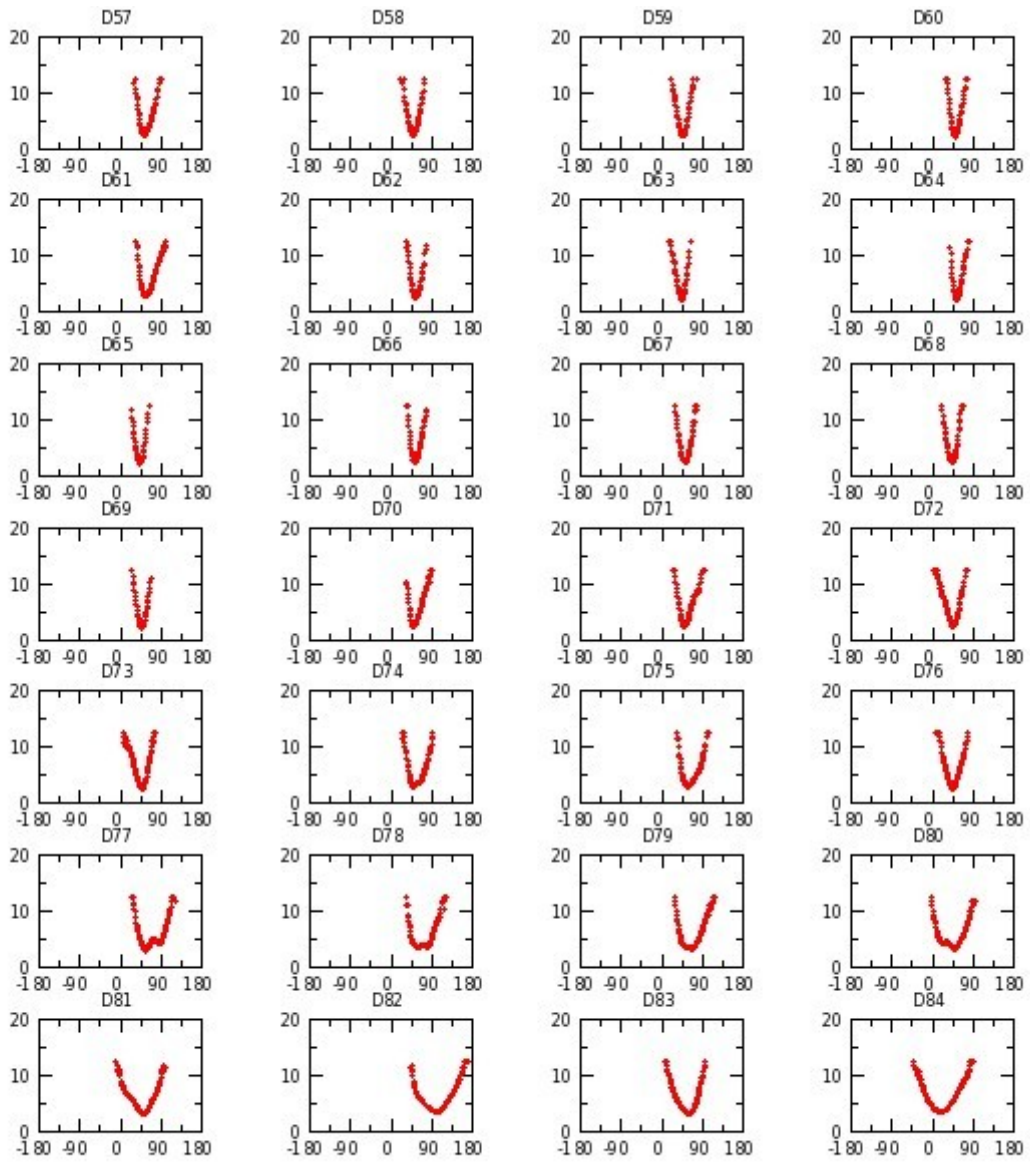


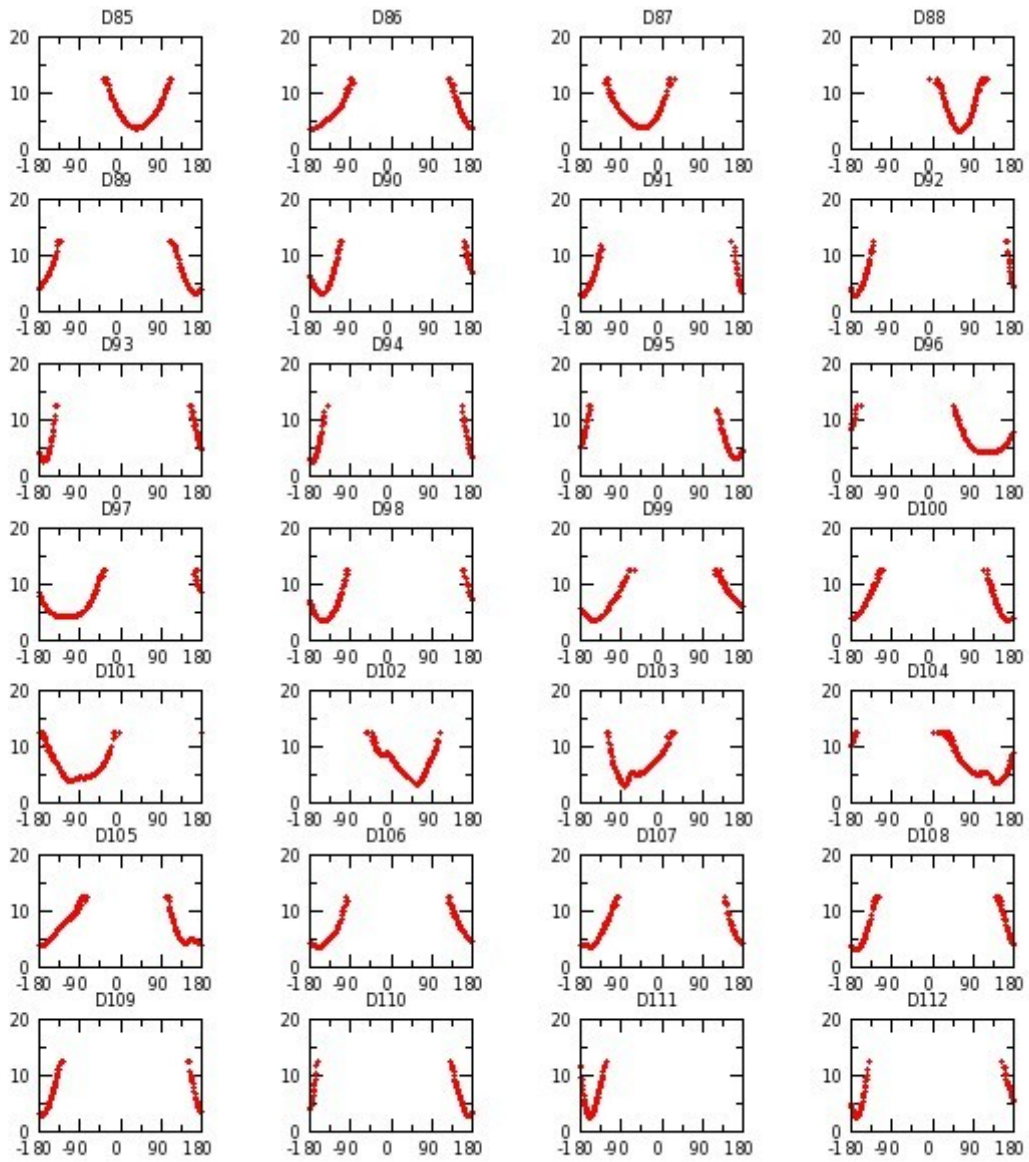


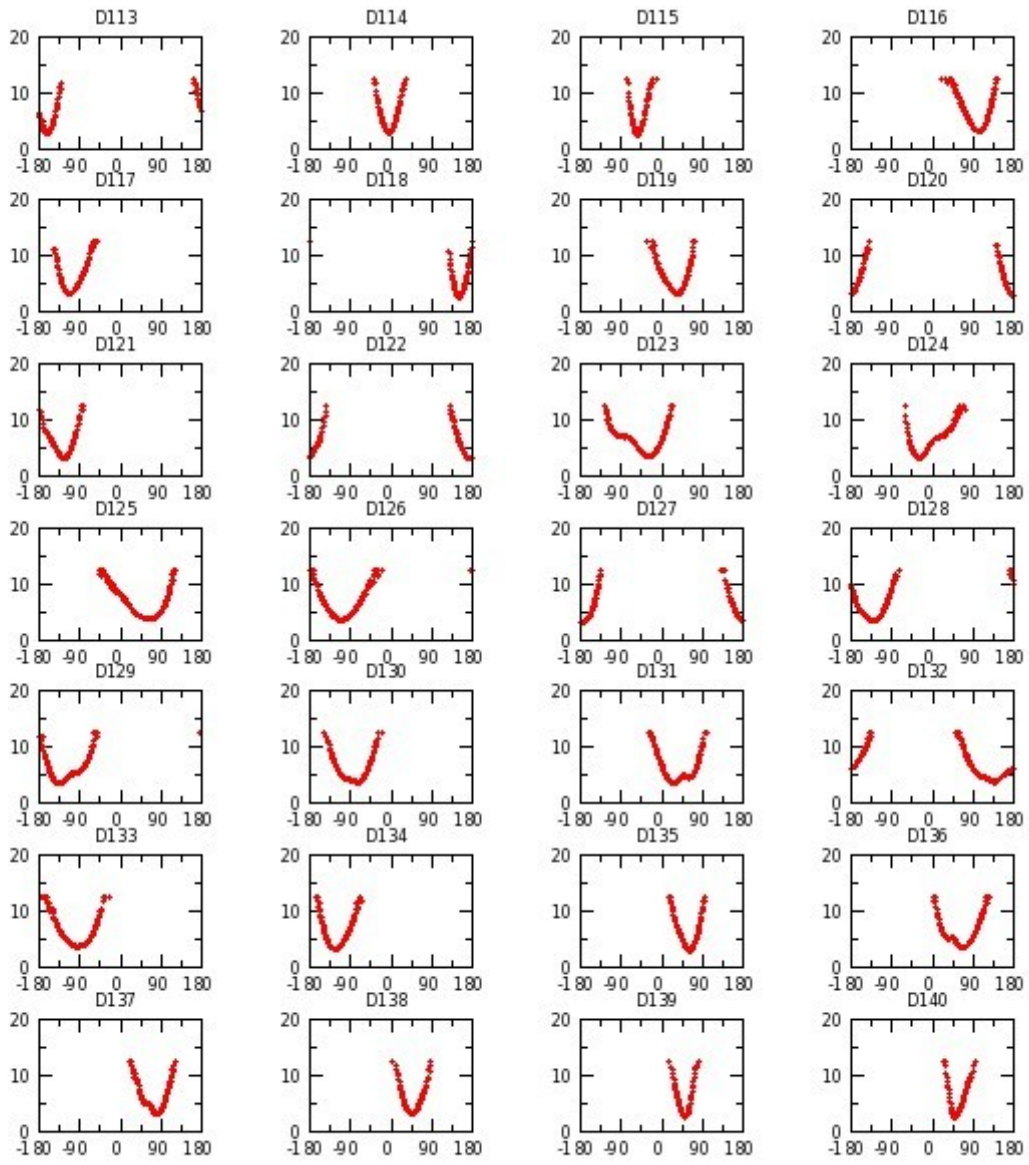
Annexe G 44 : M_OCH réplique II

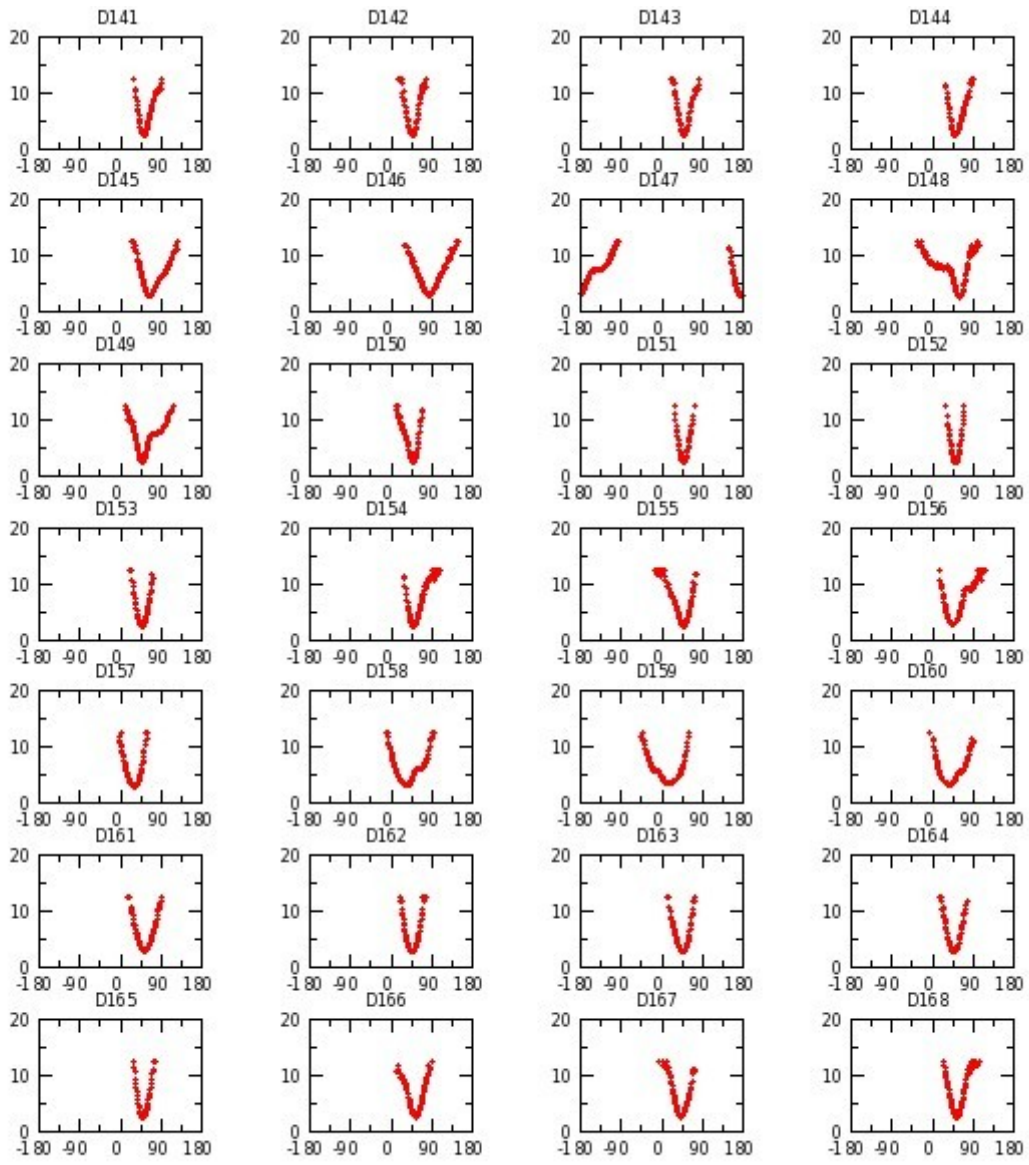


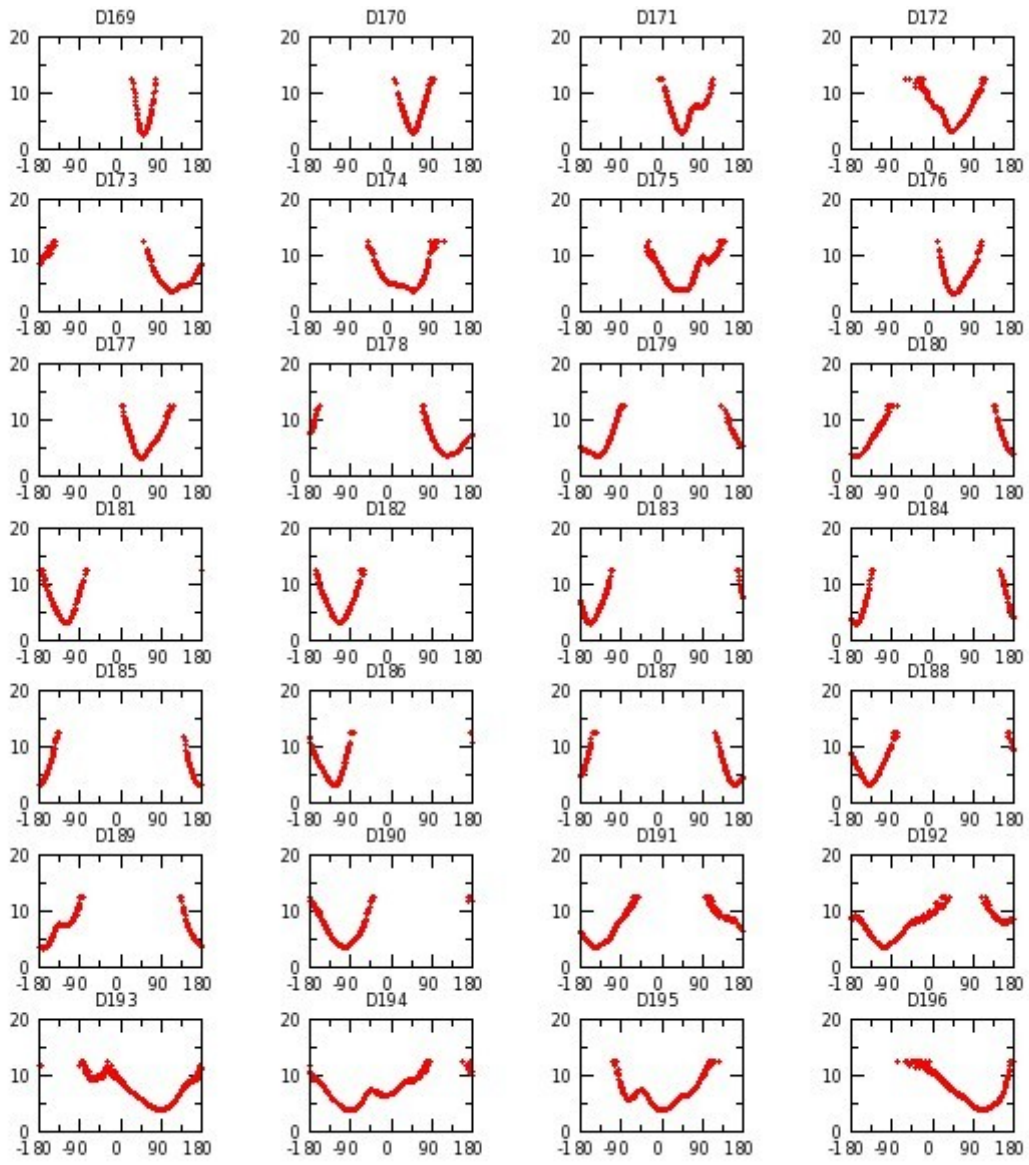


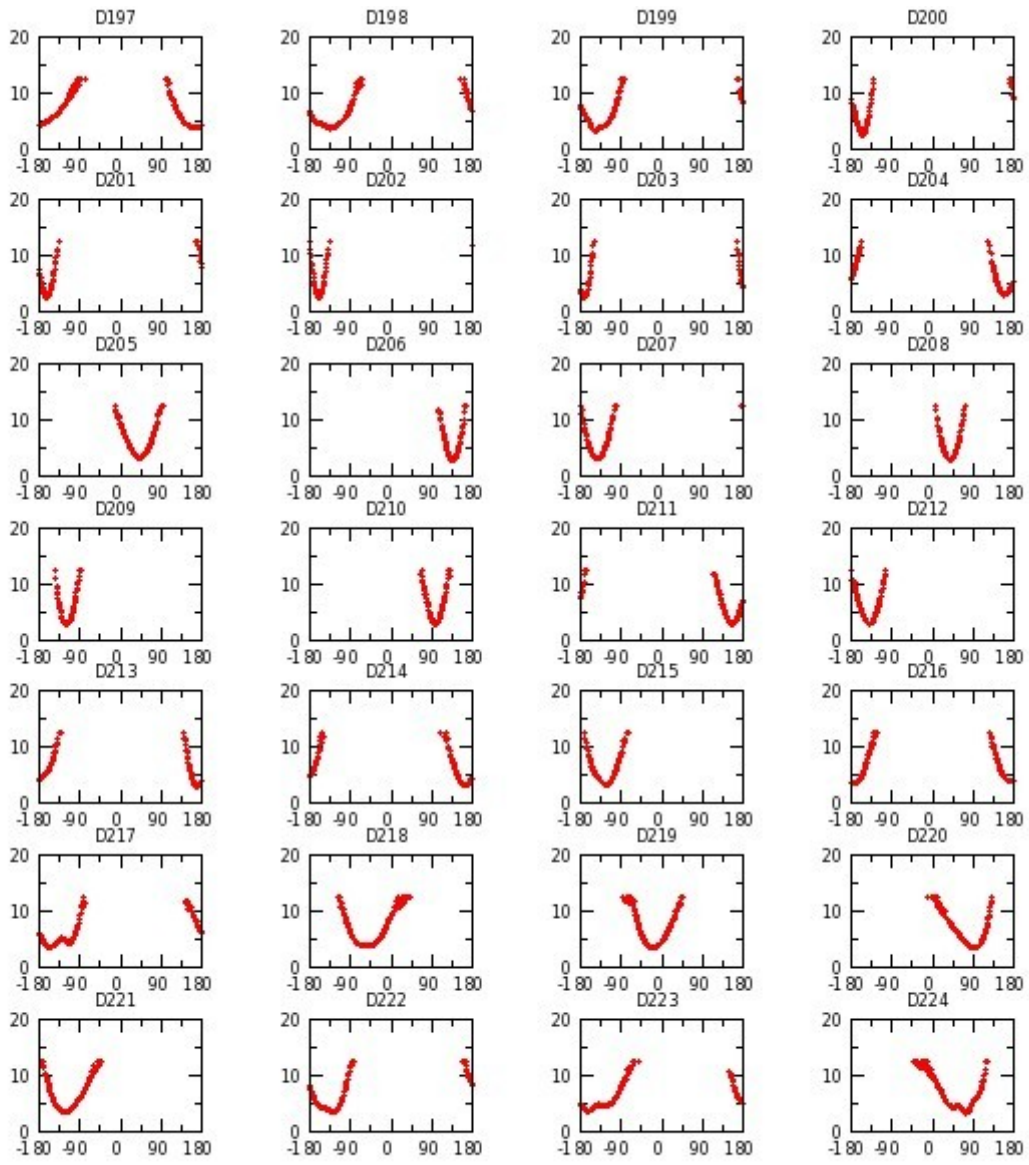


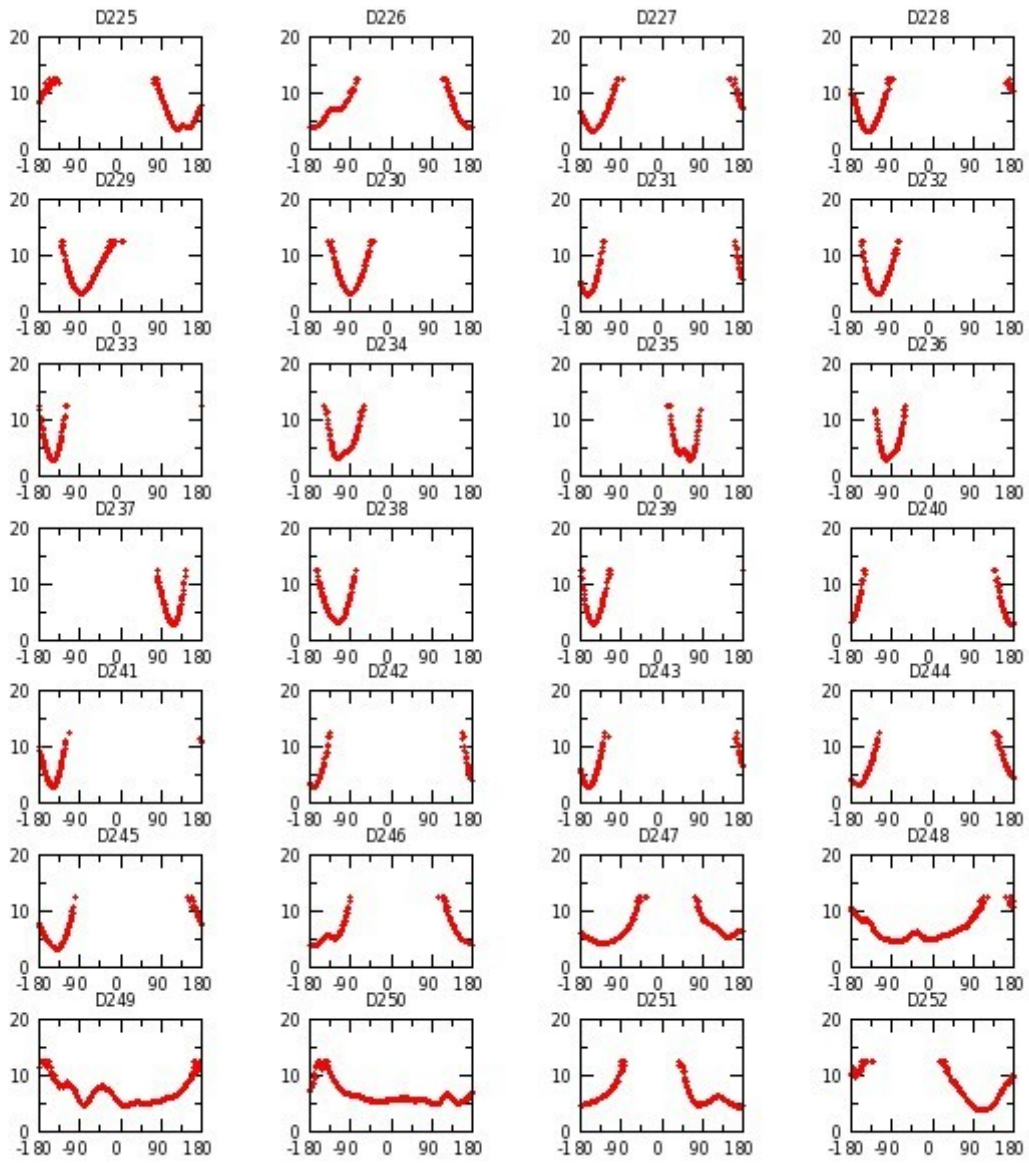


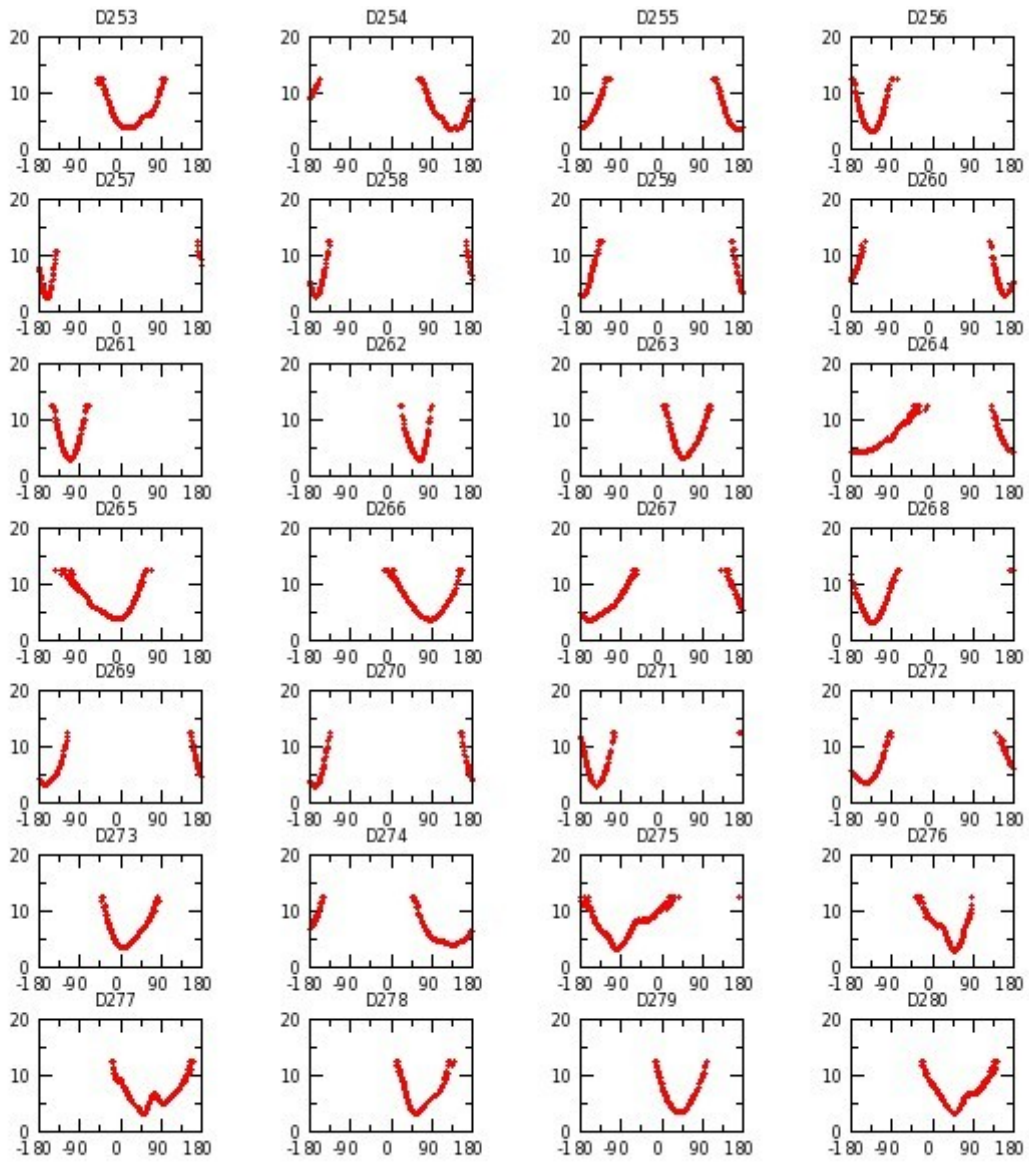


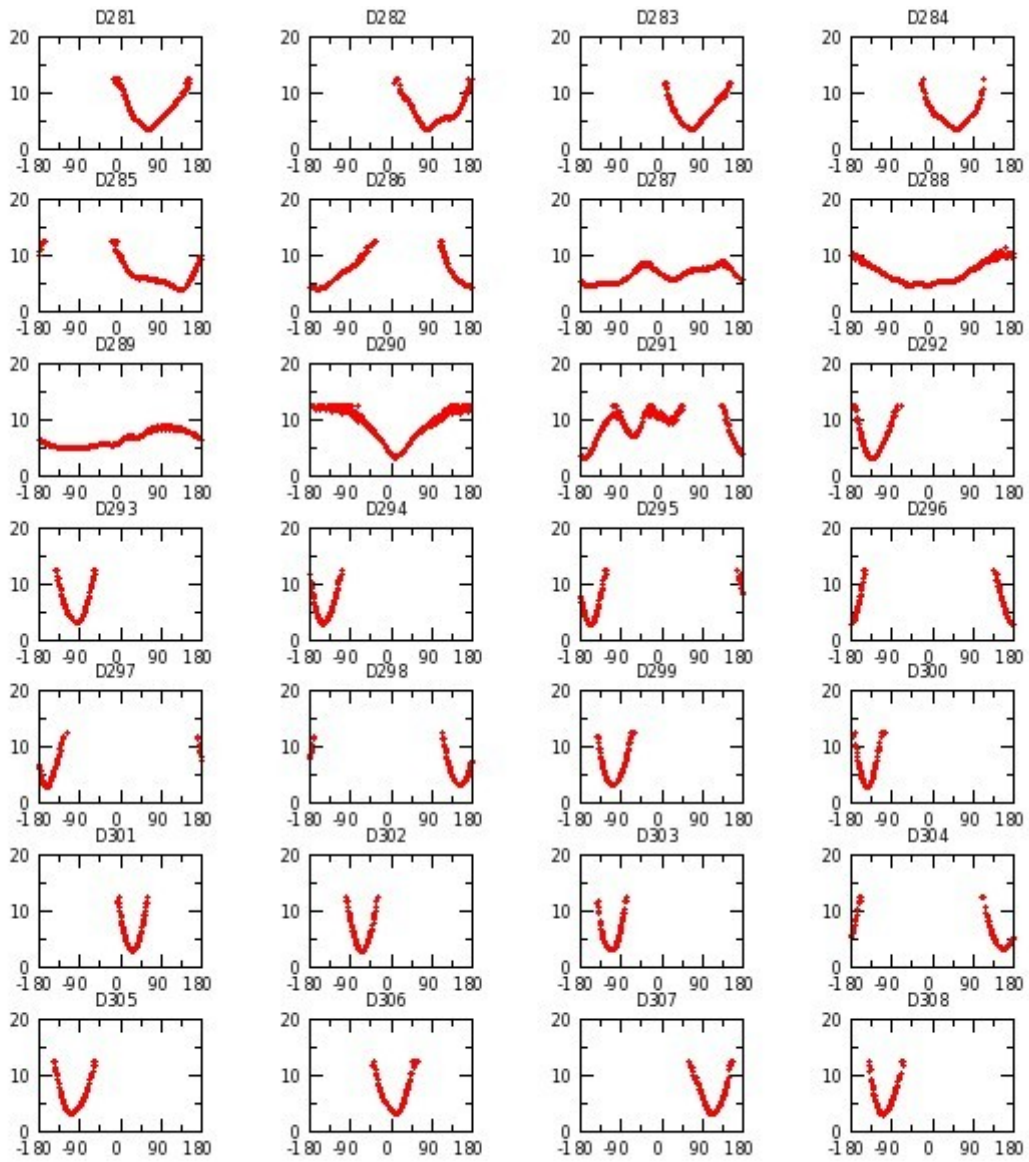


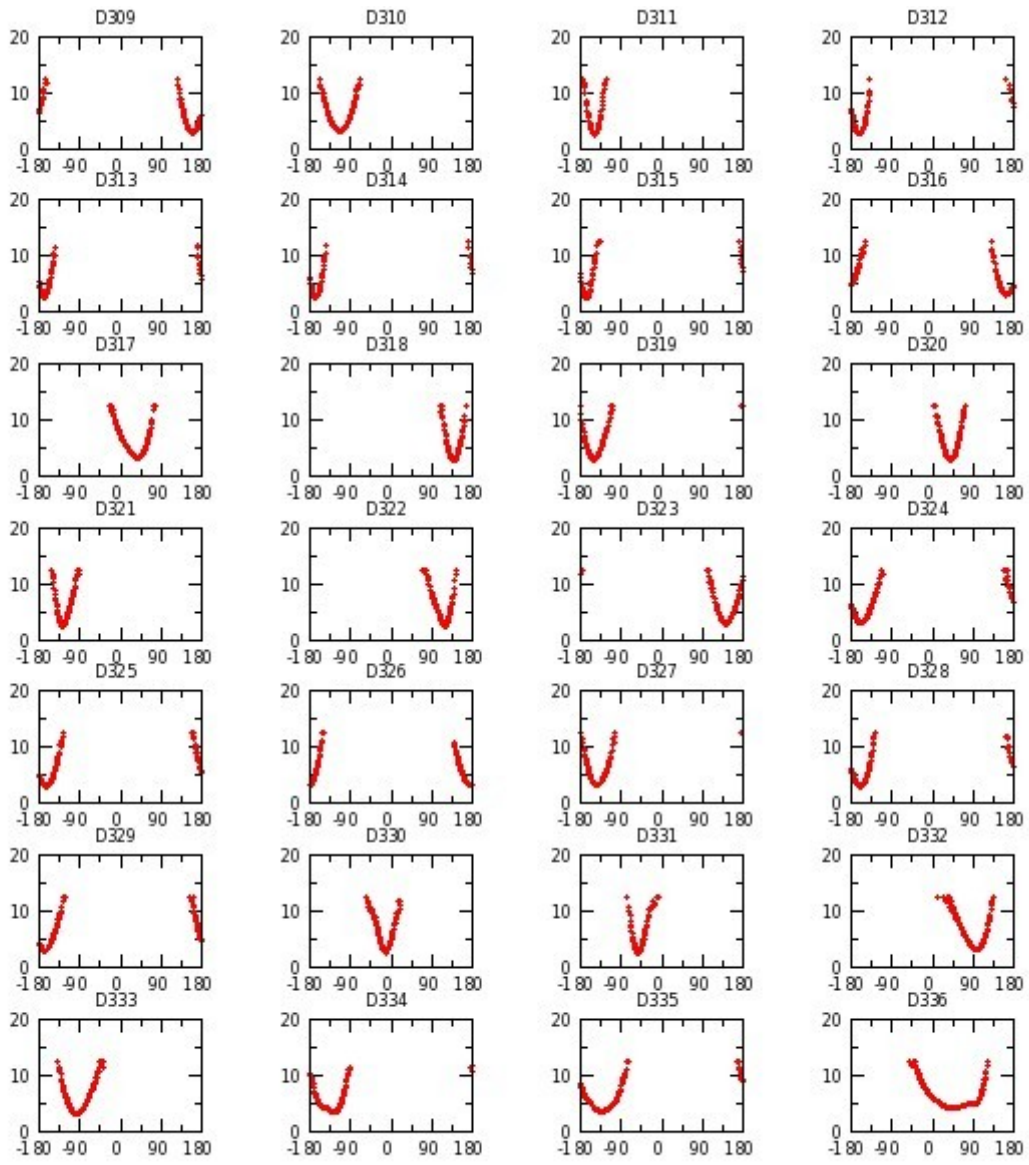


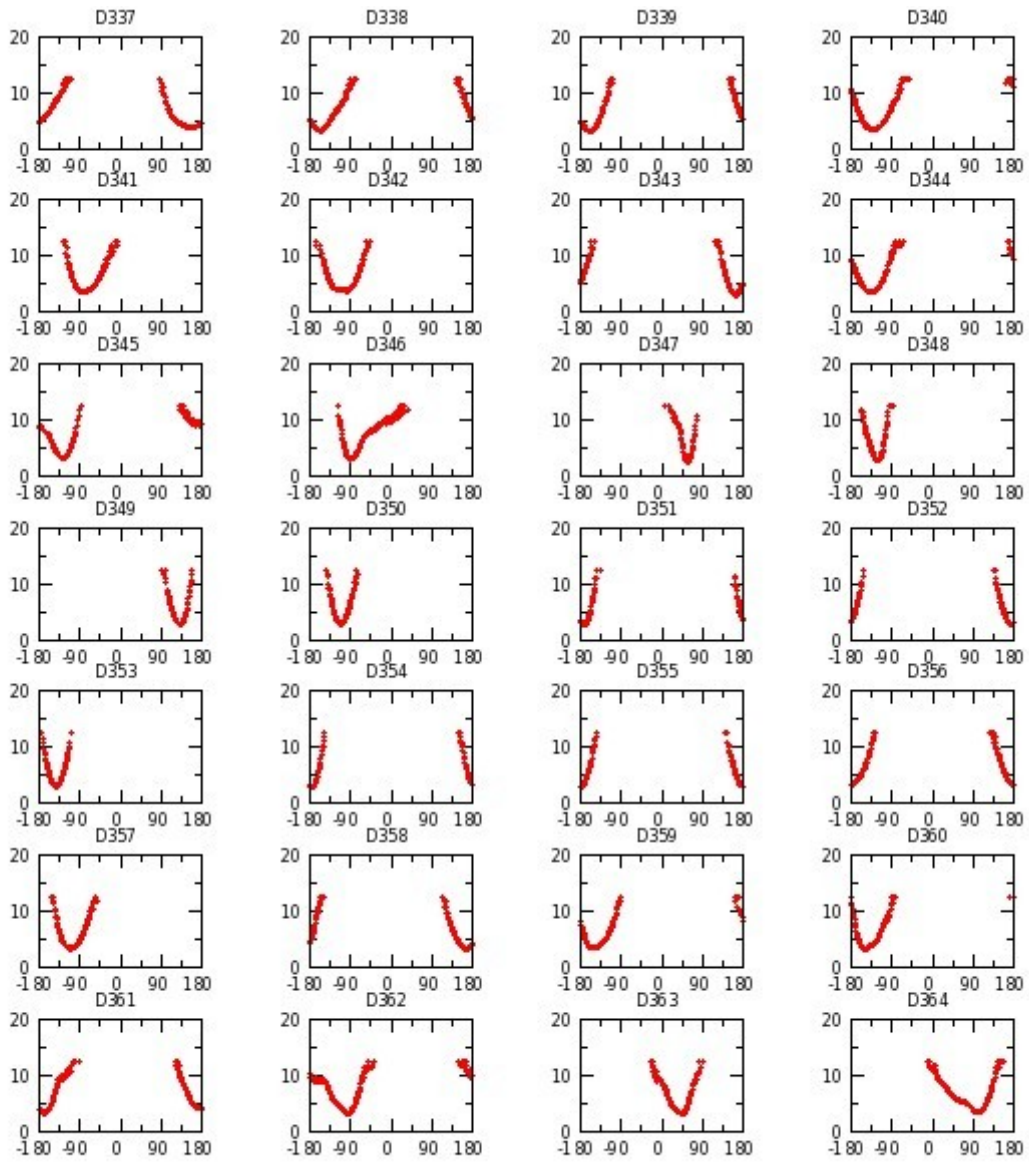


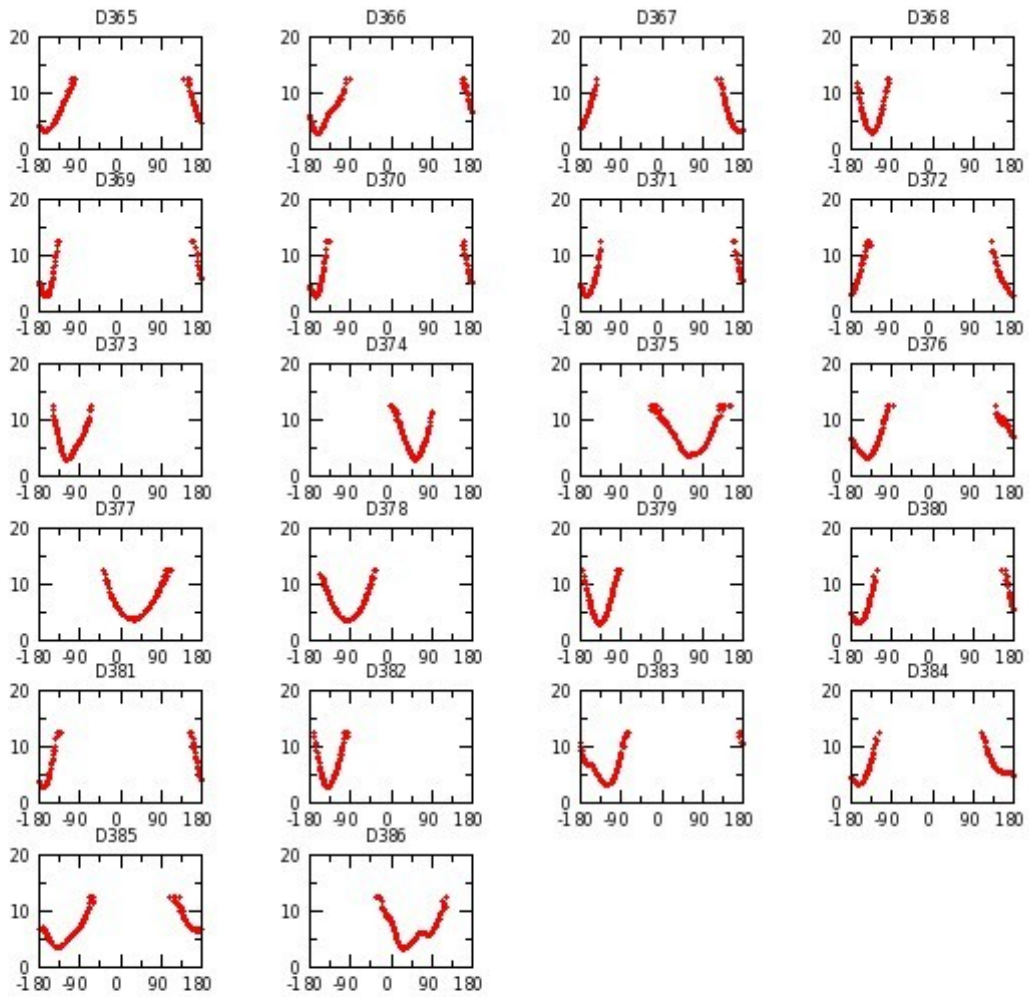




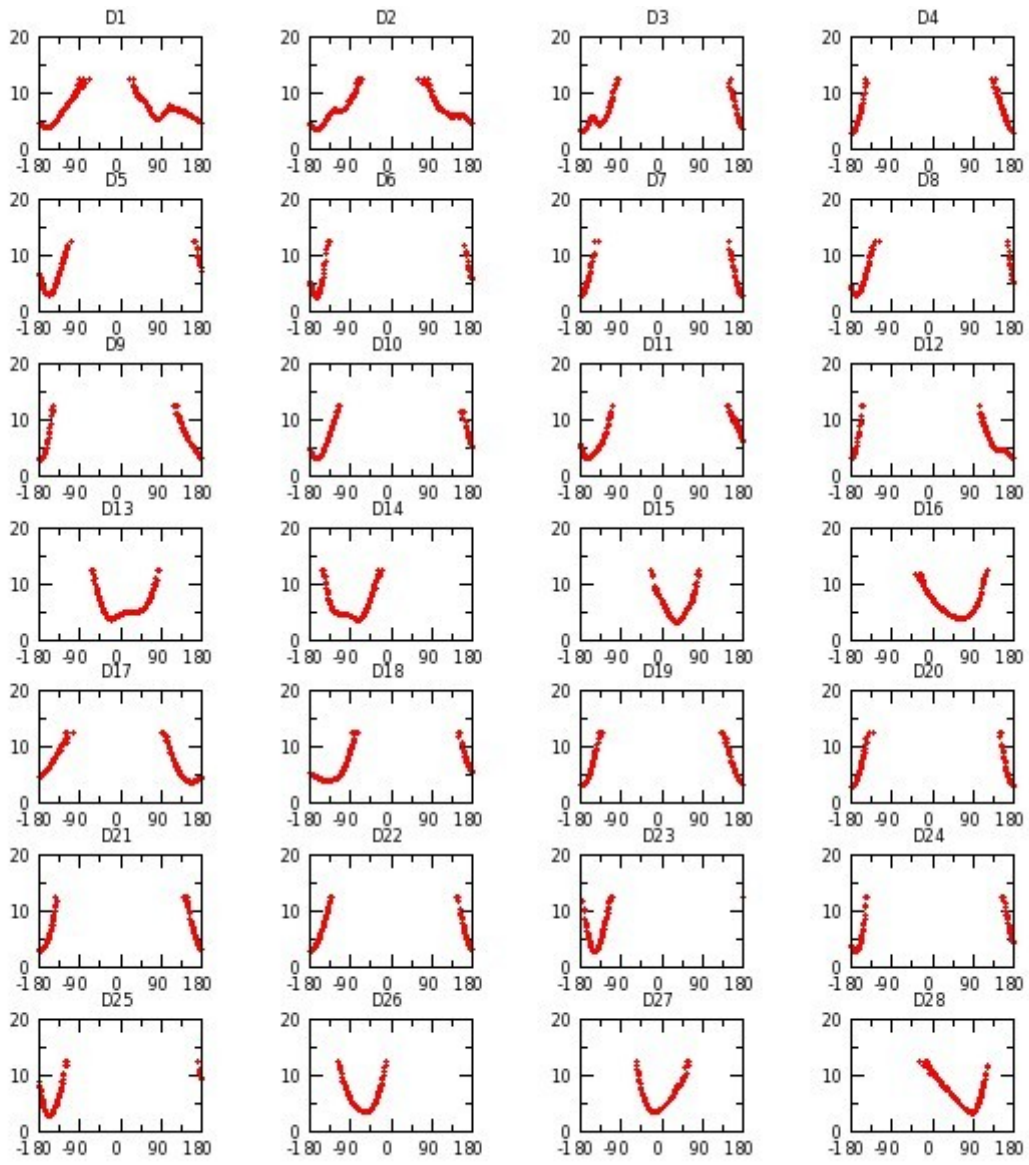


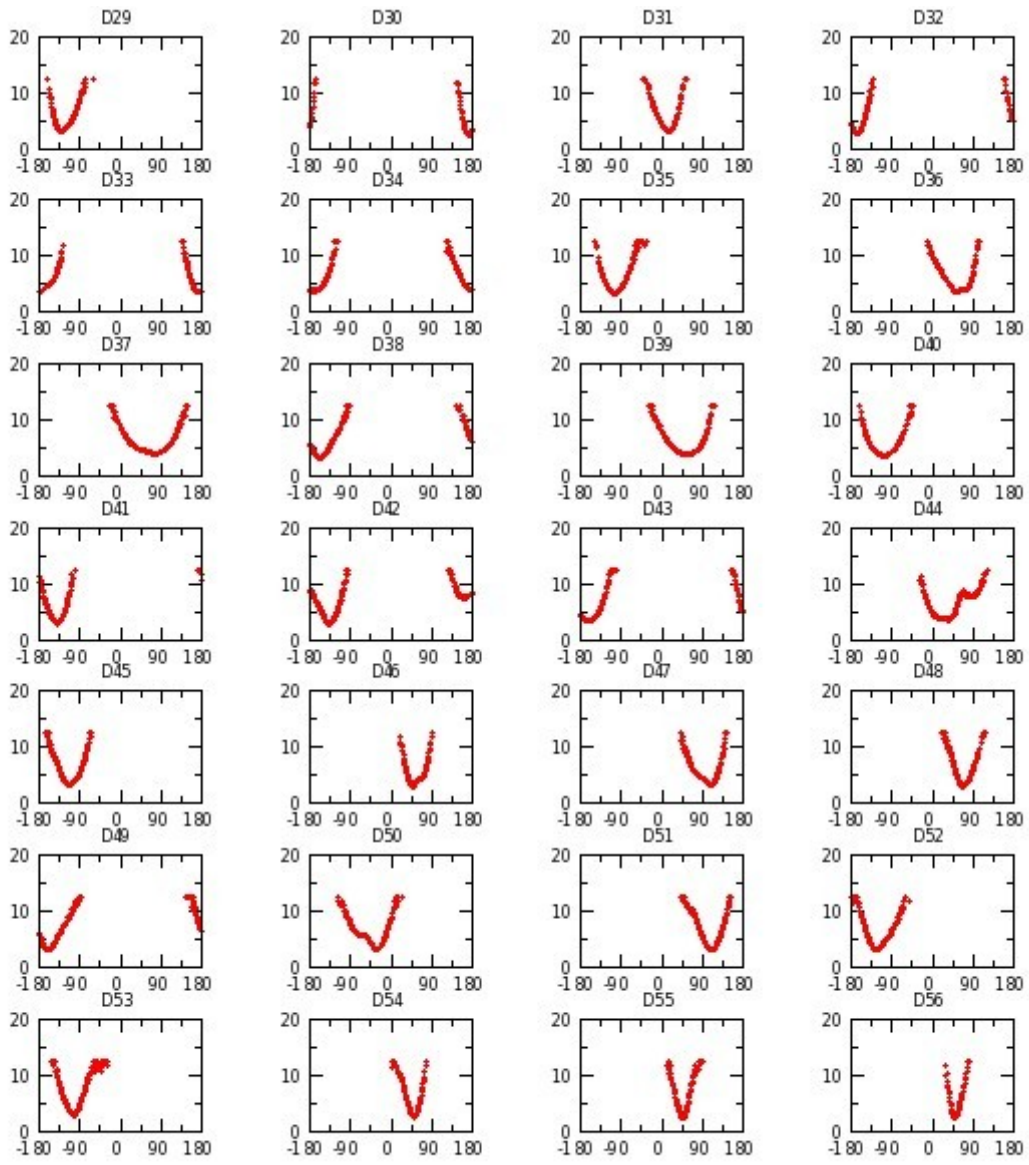


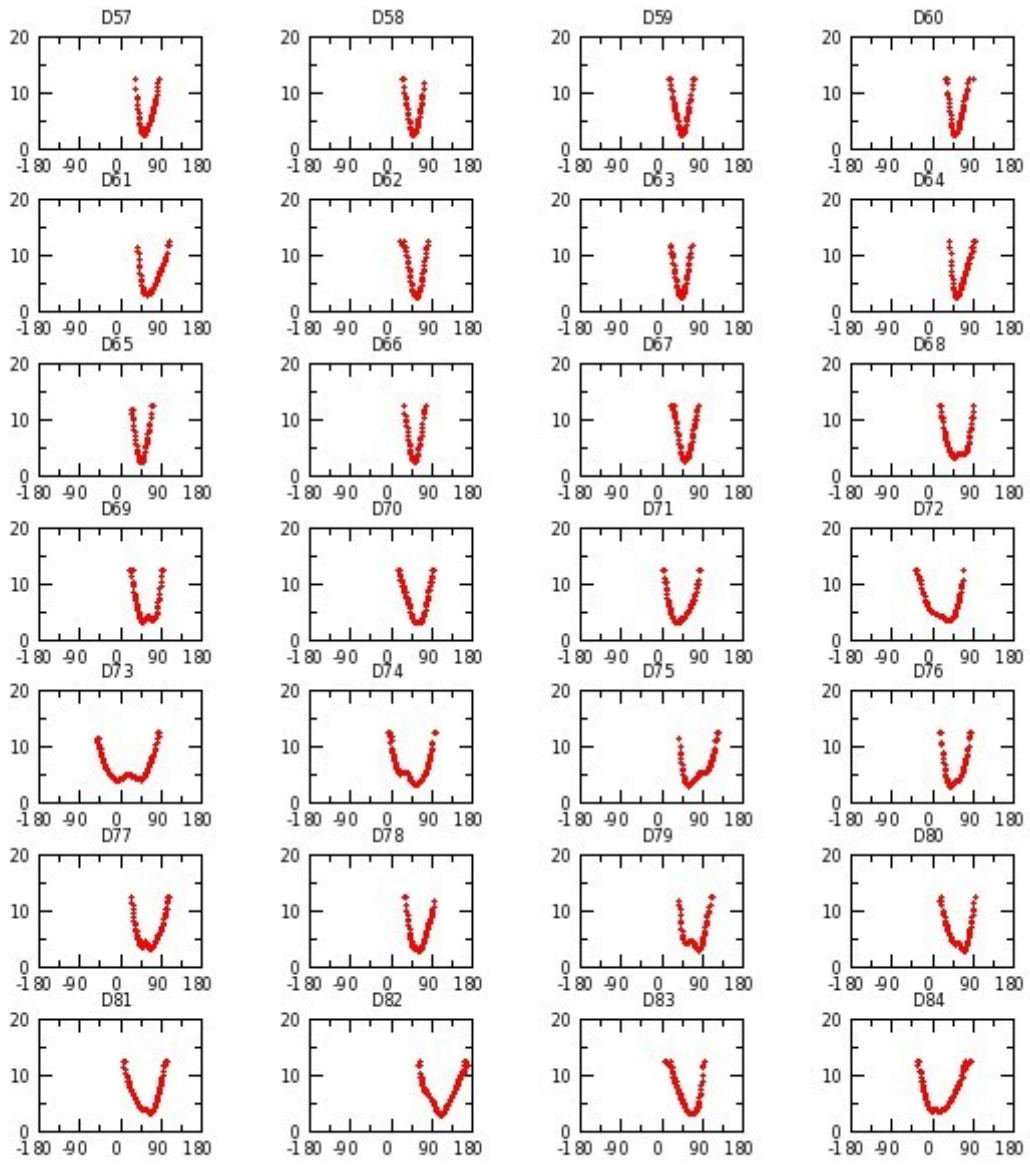


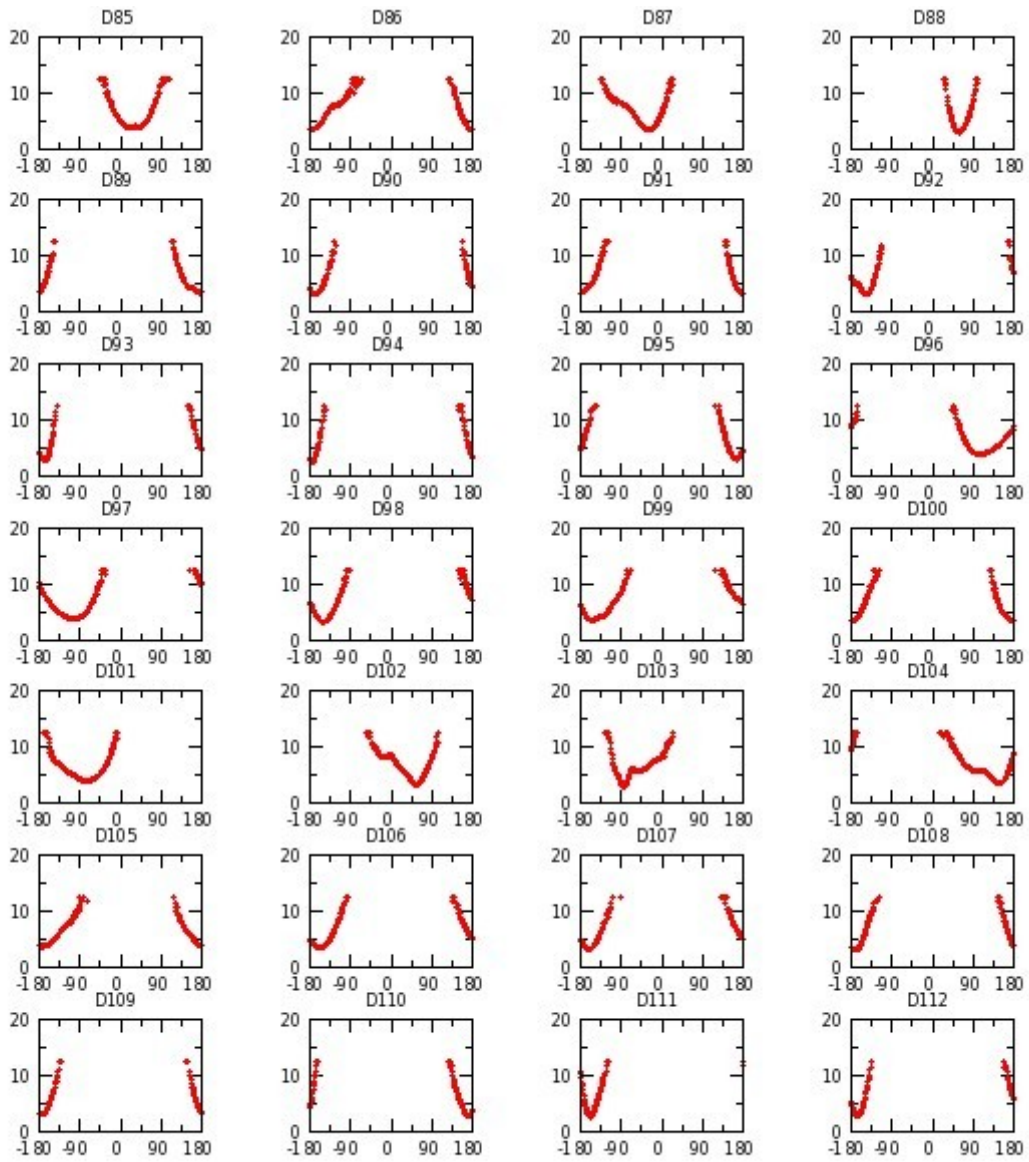


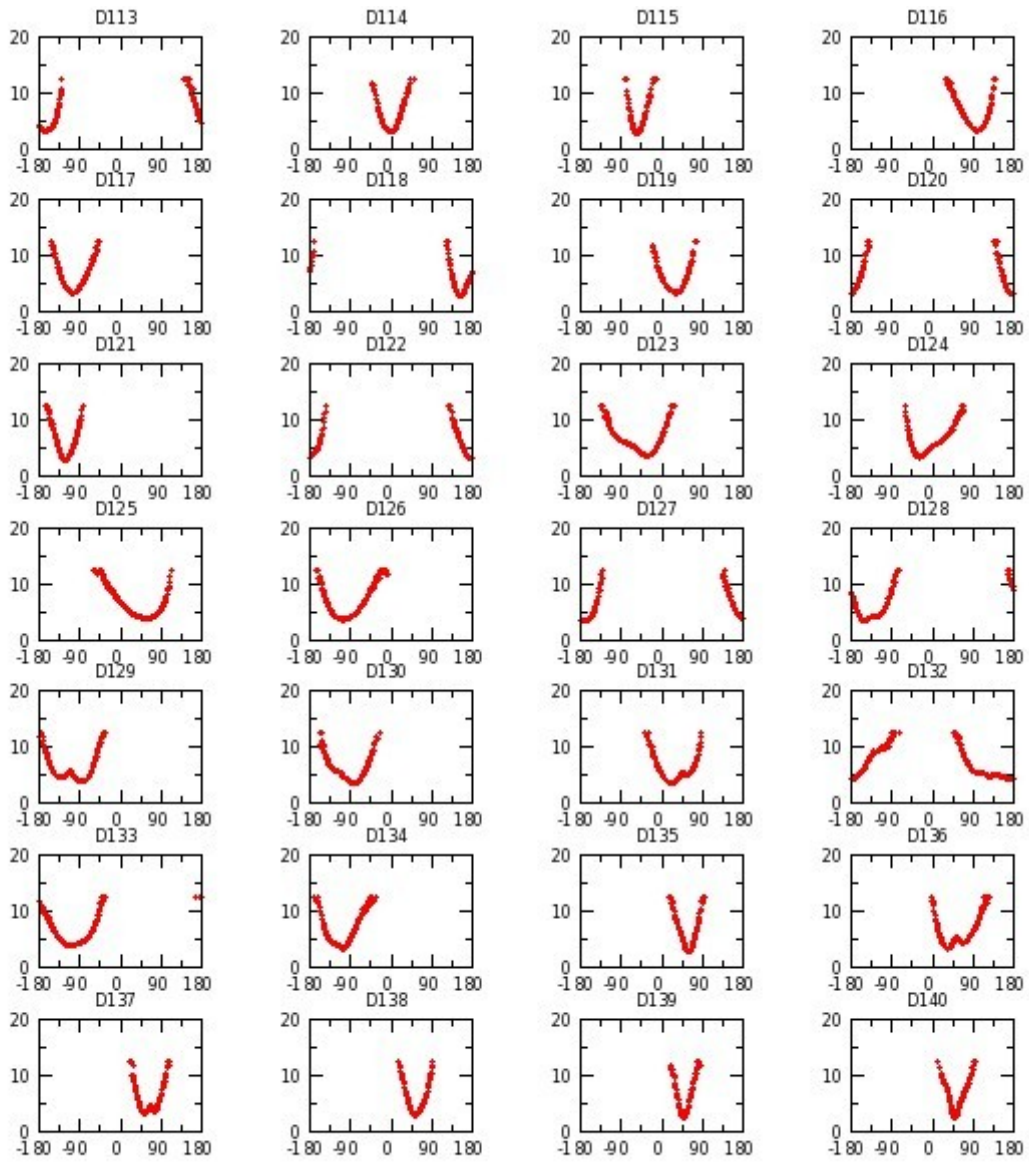
Annexe G 45 : M_OCH réplique III

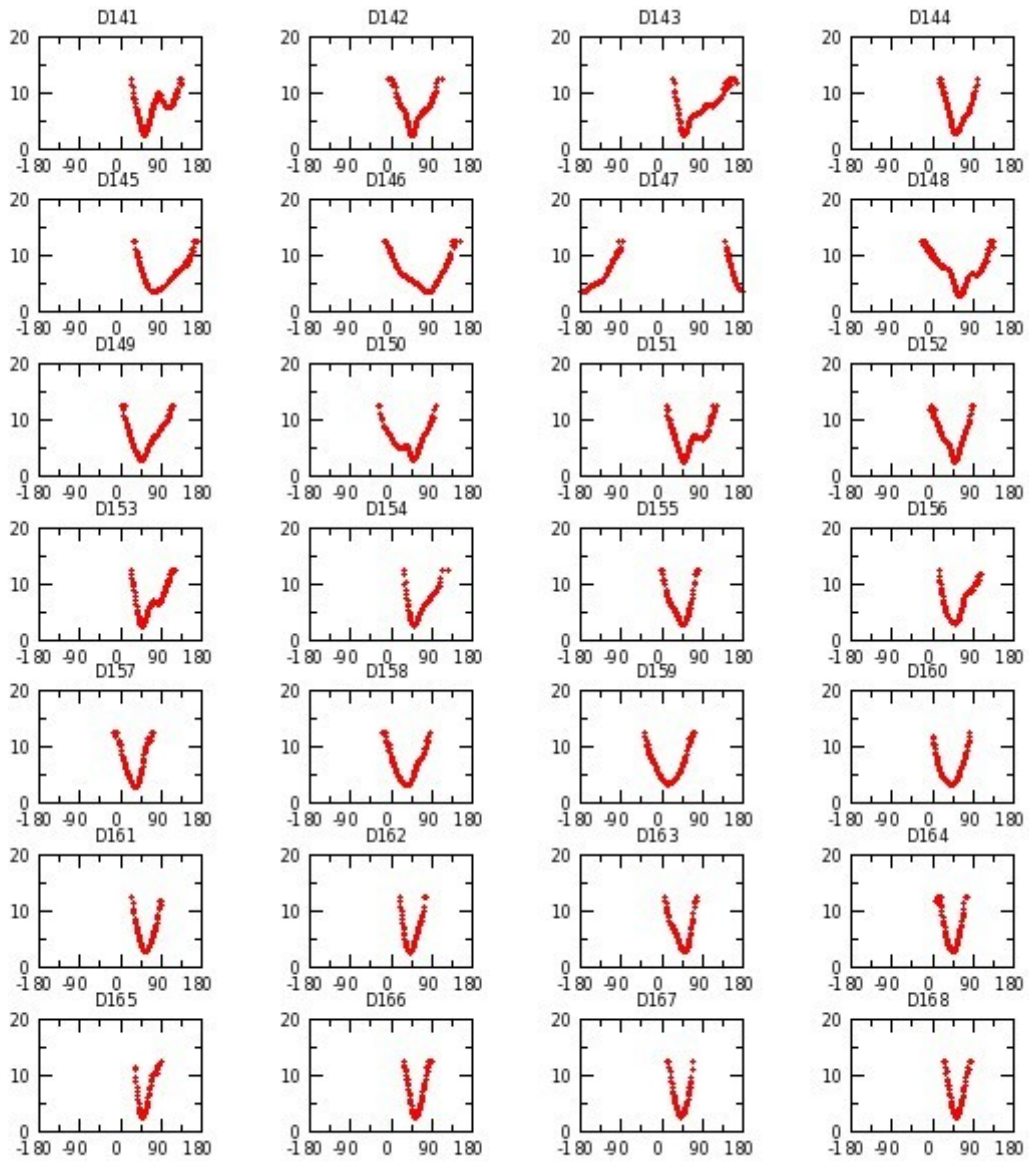


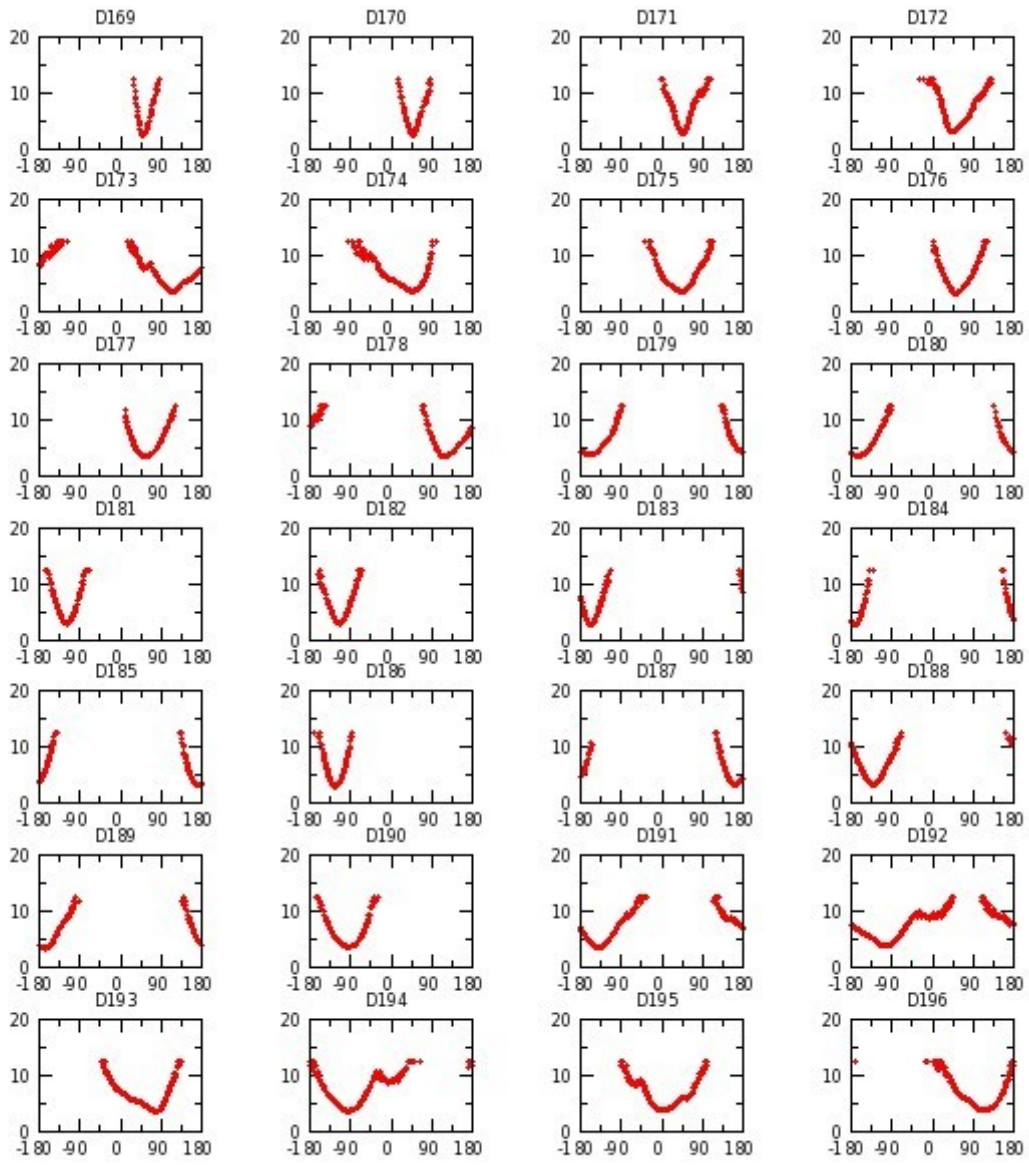


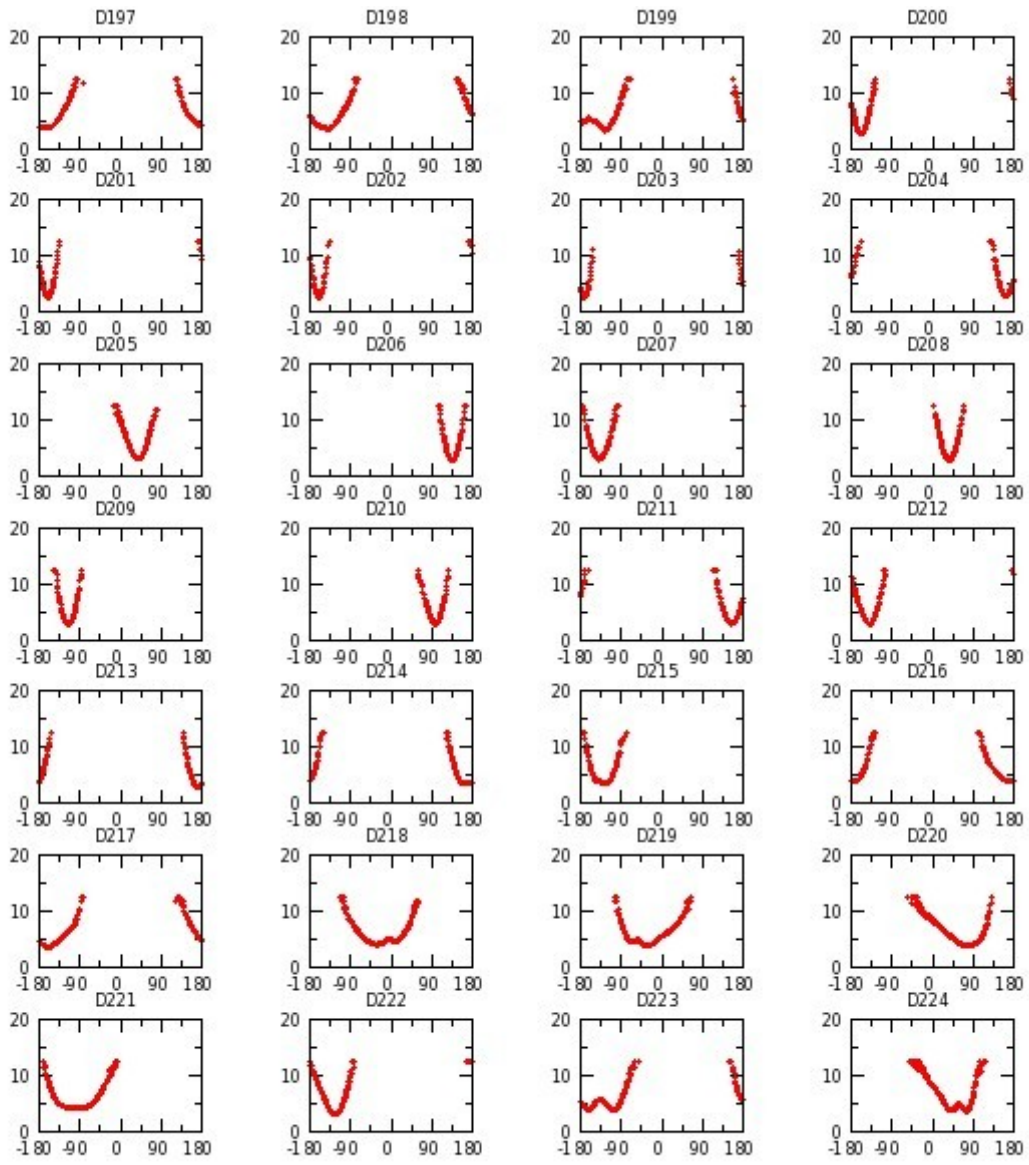


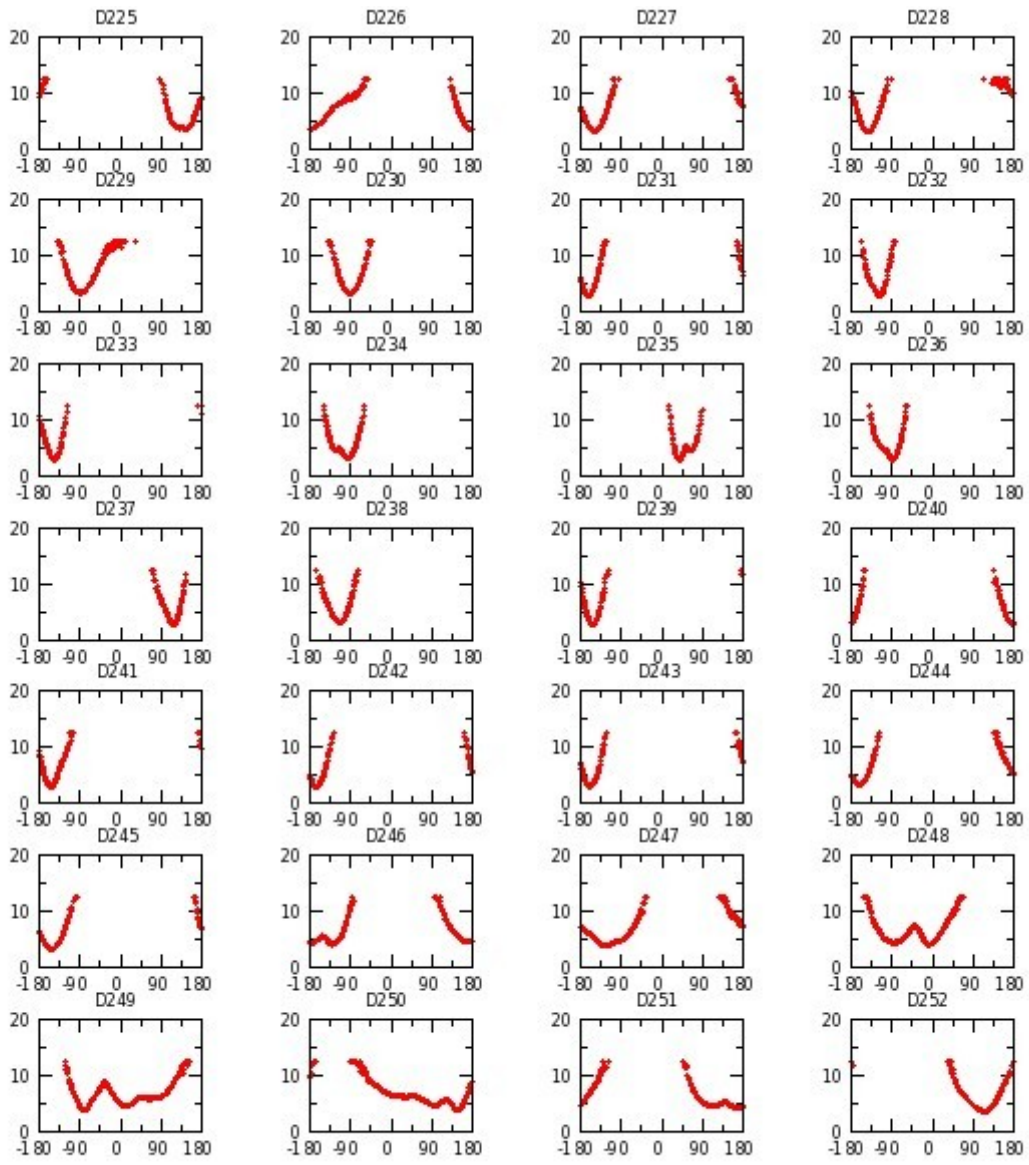


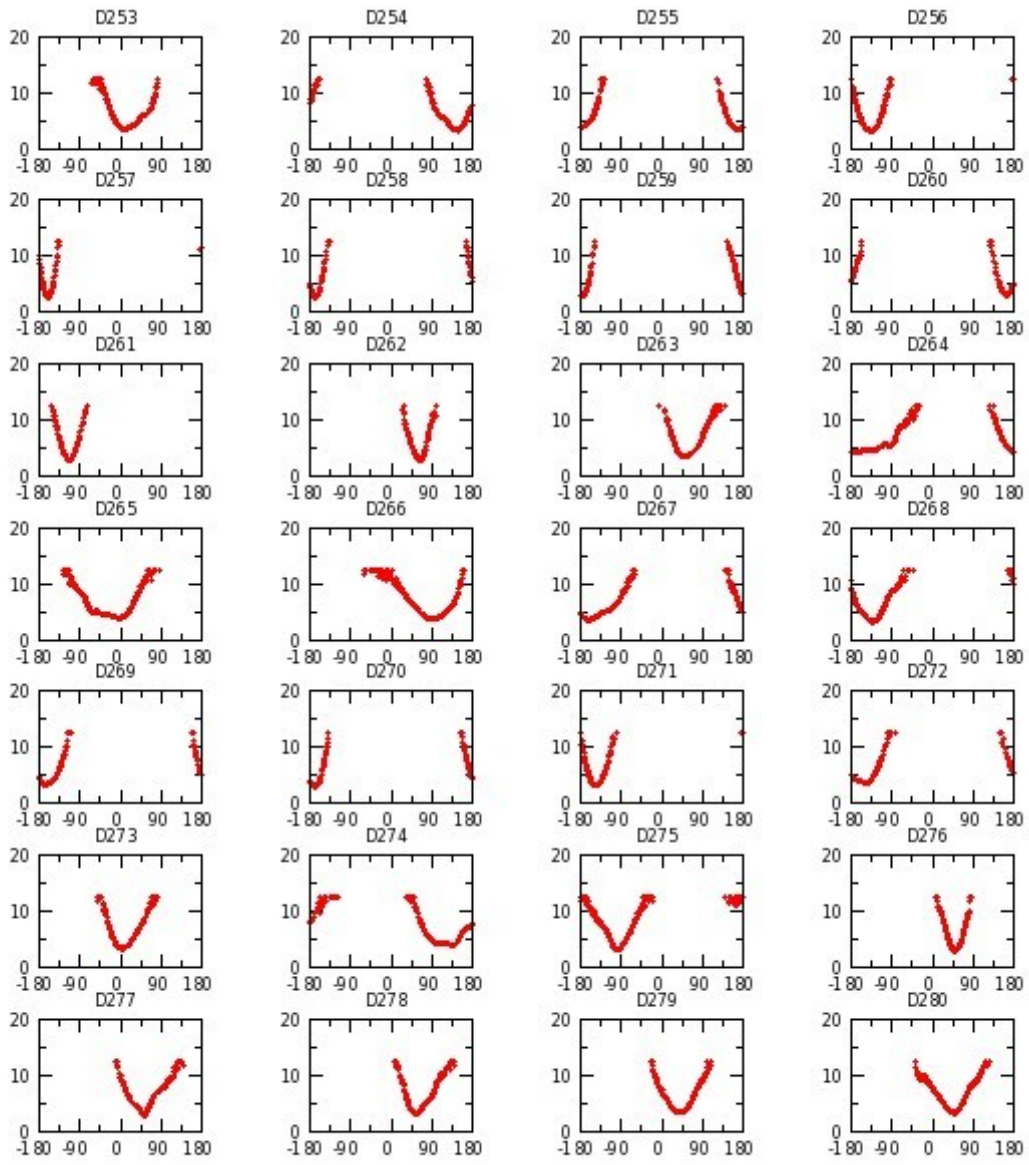


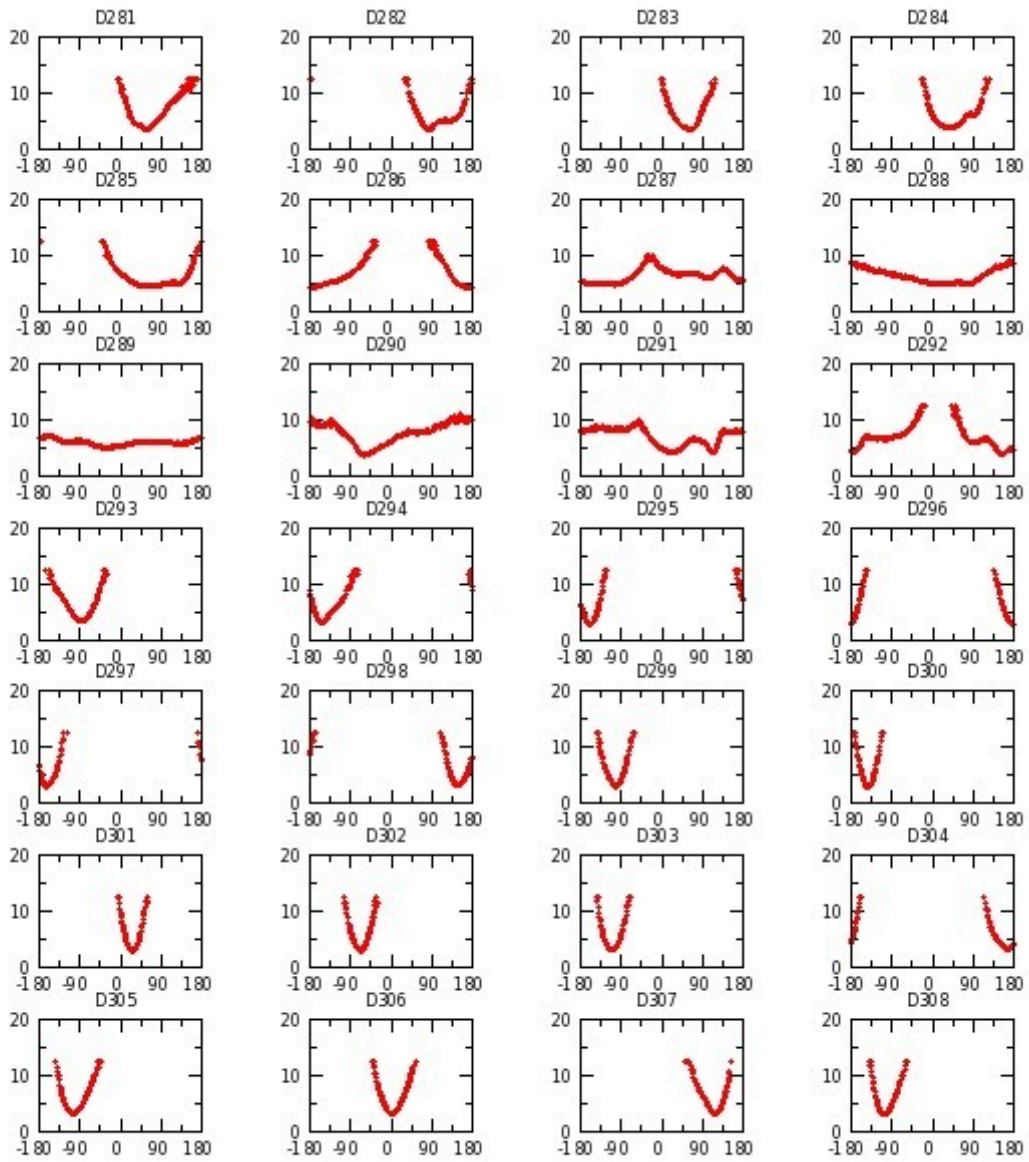


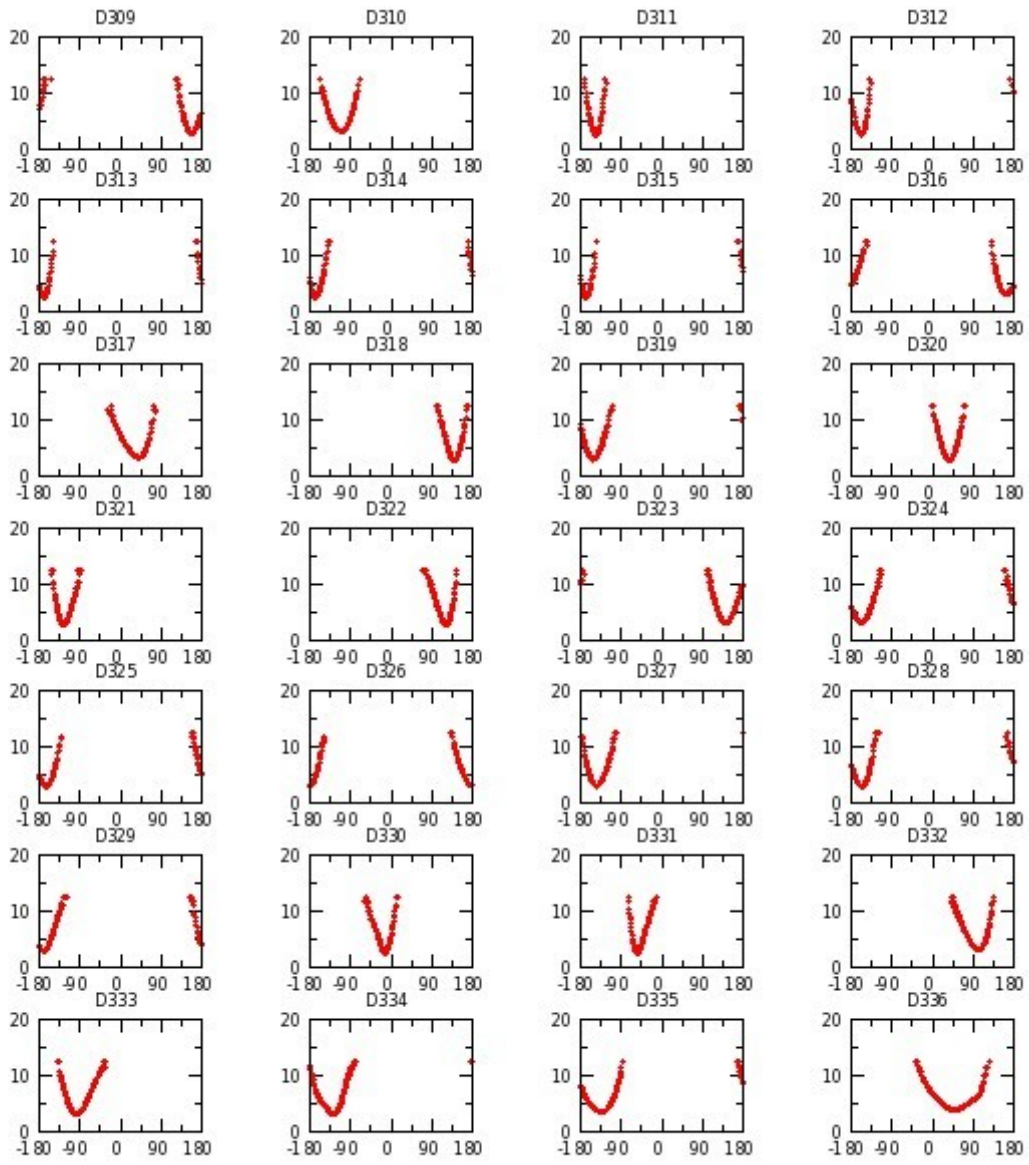


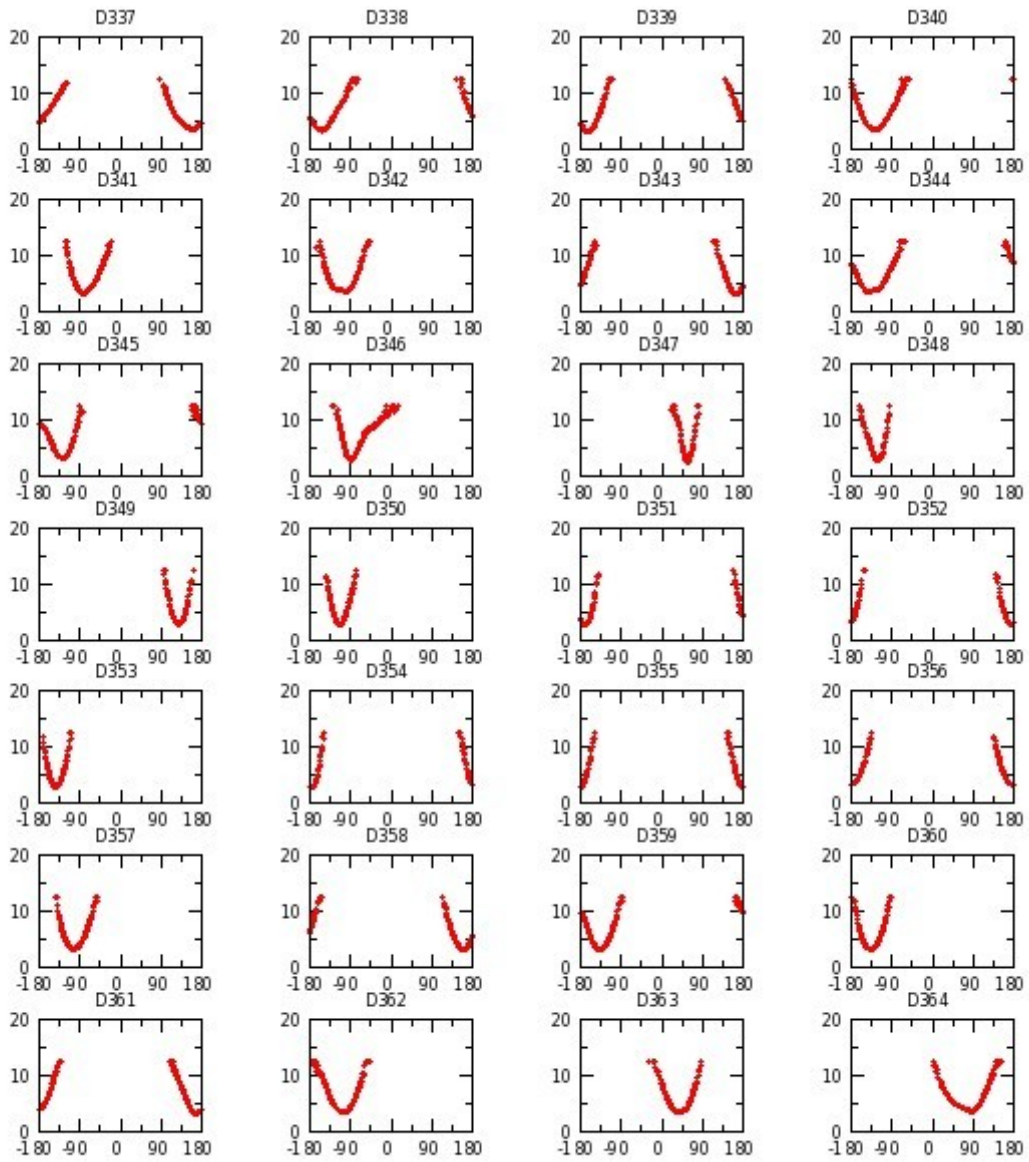


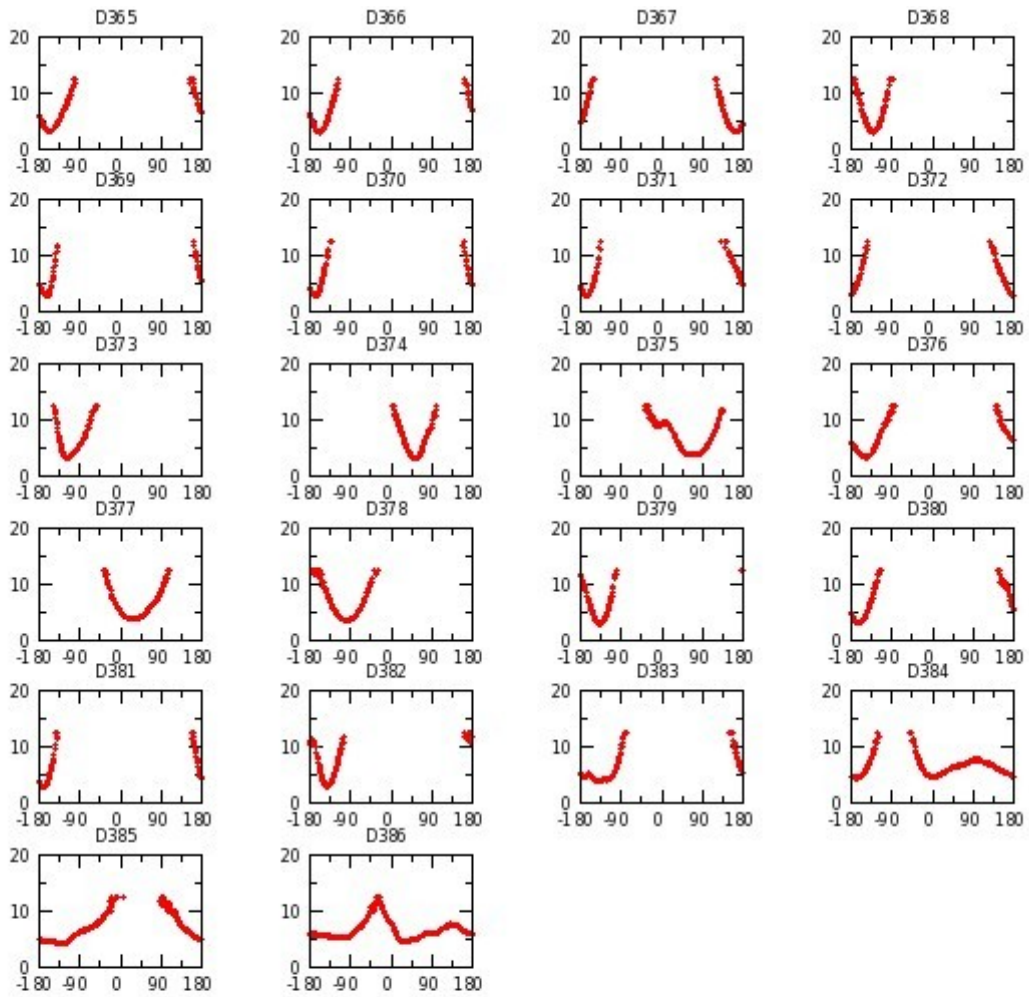




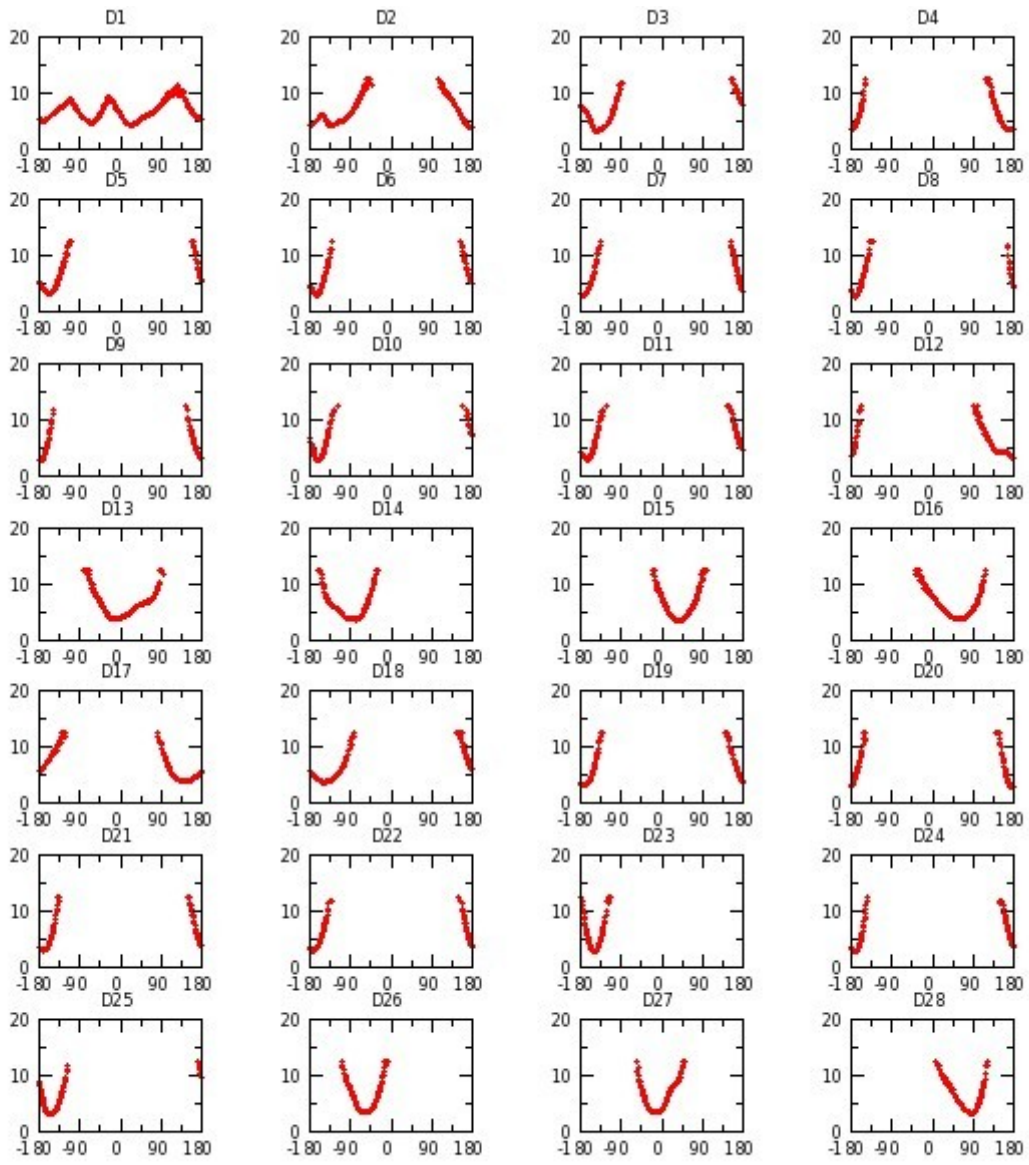


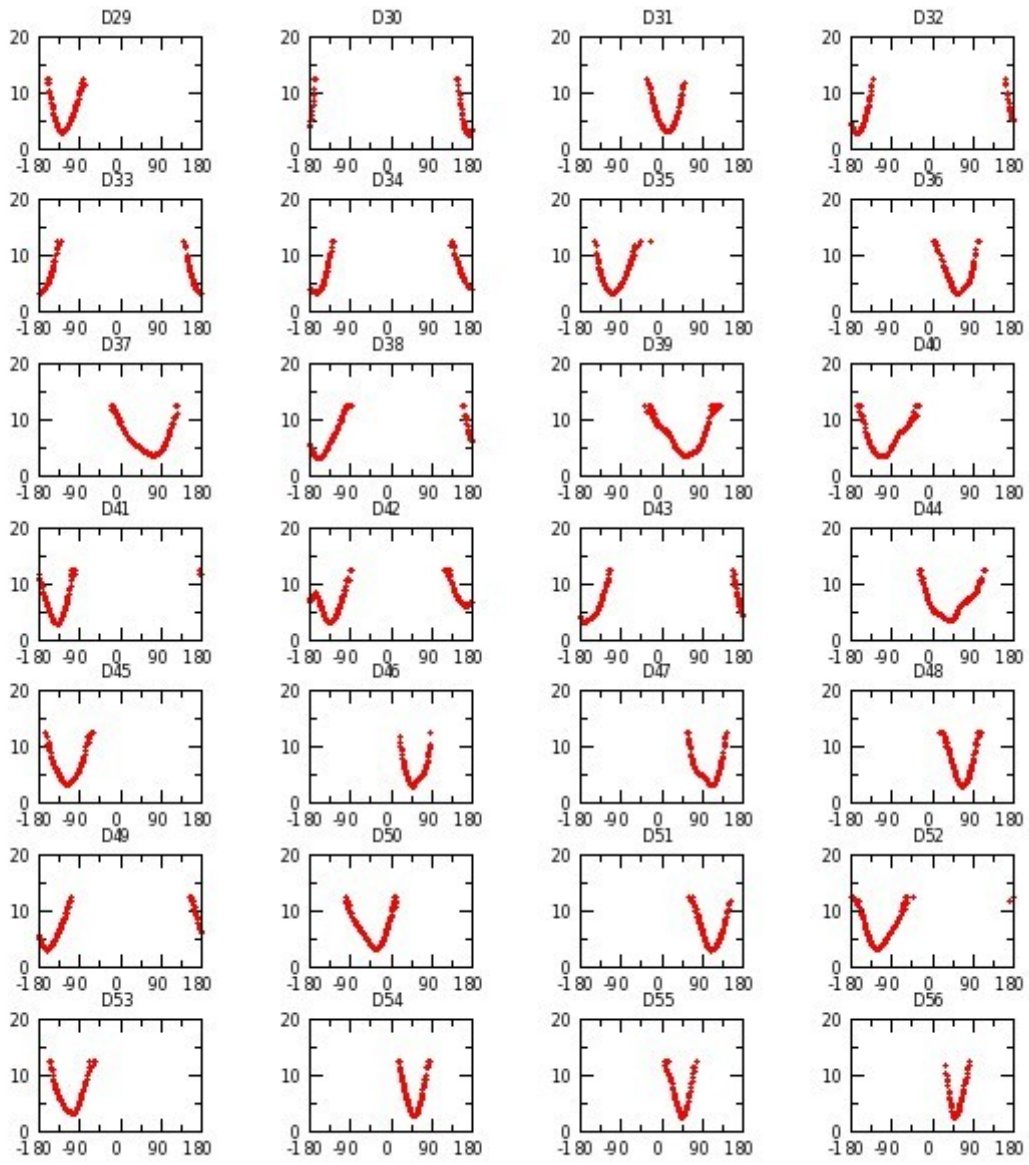


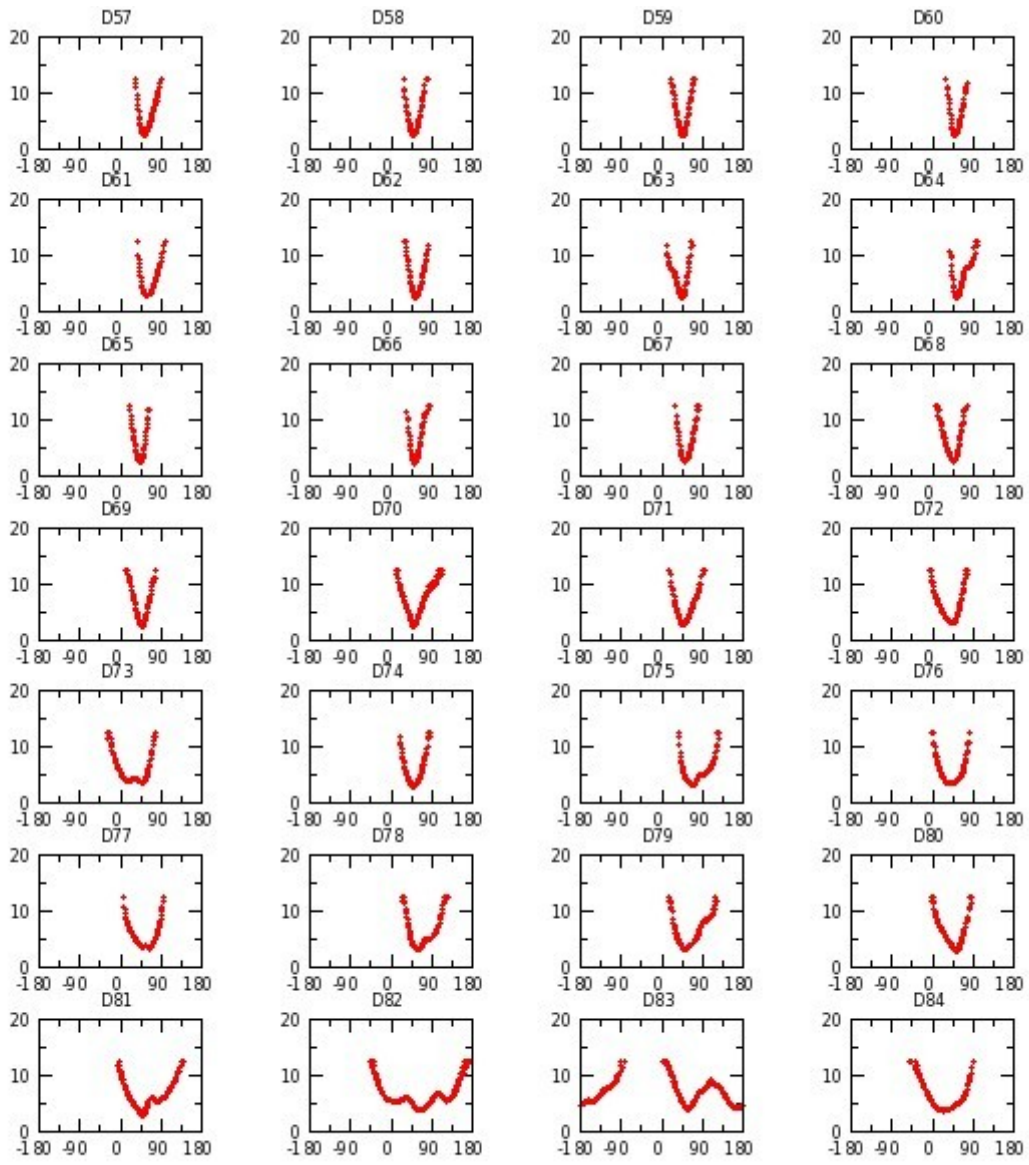


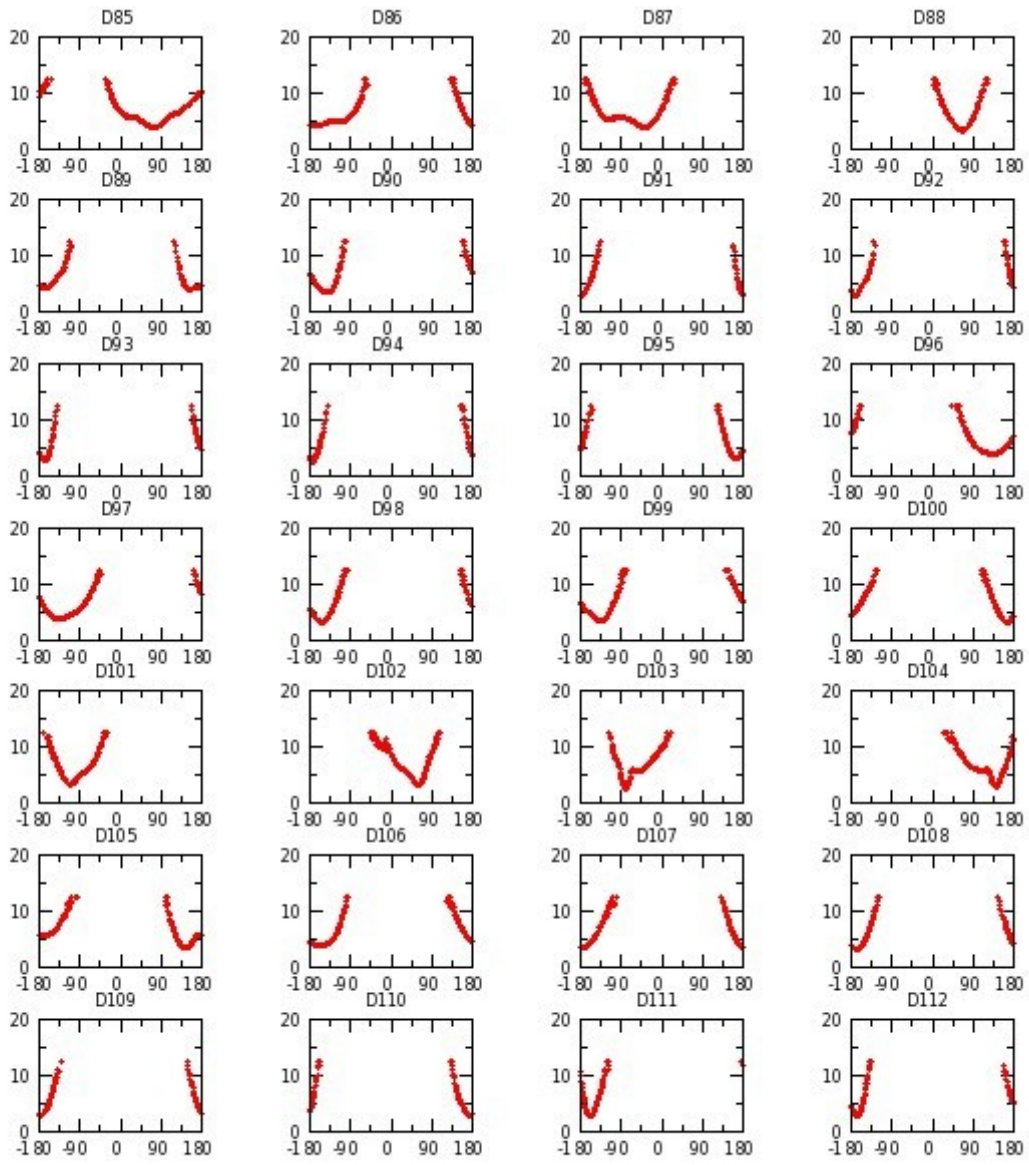


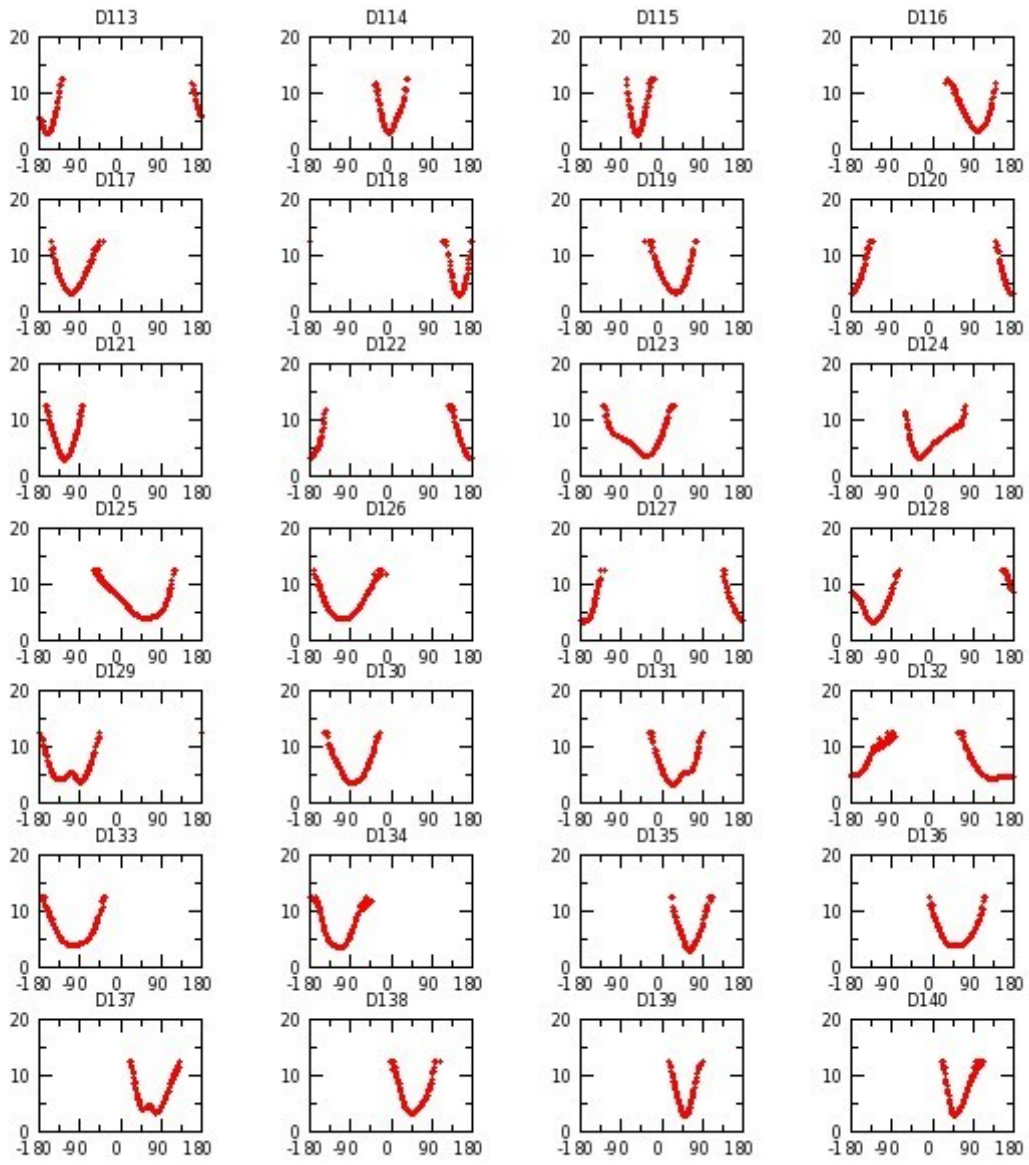
Annexe G 46 : M_SaGAL réplique I

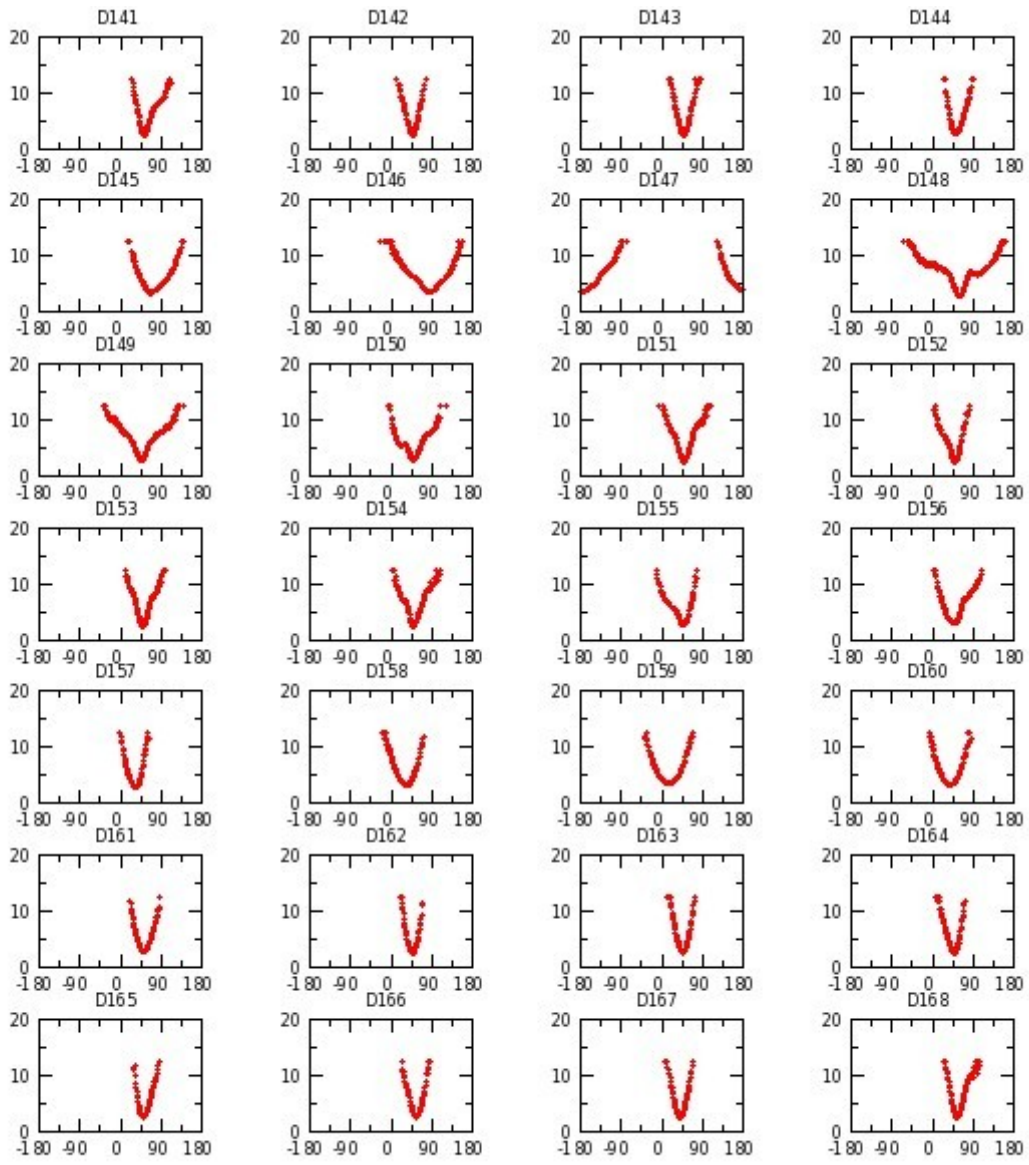


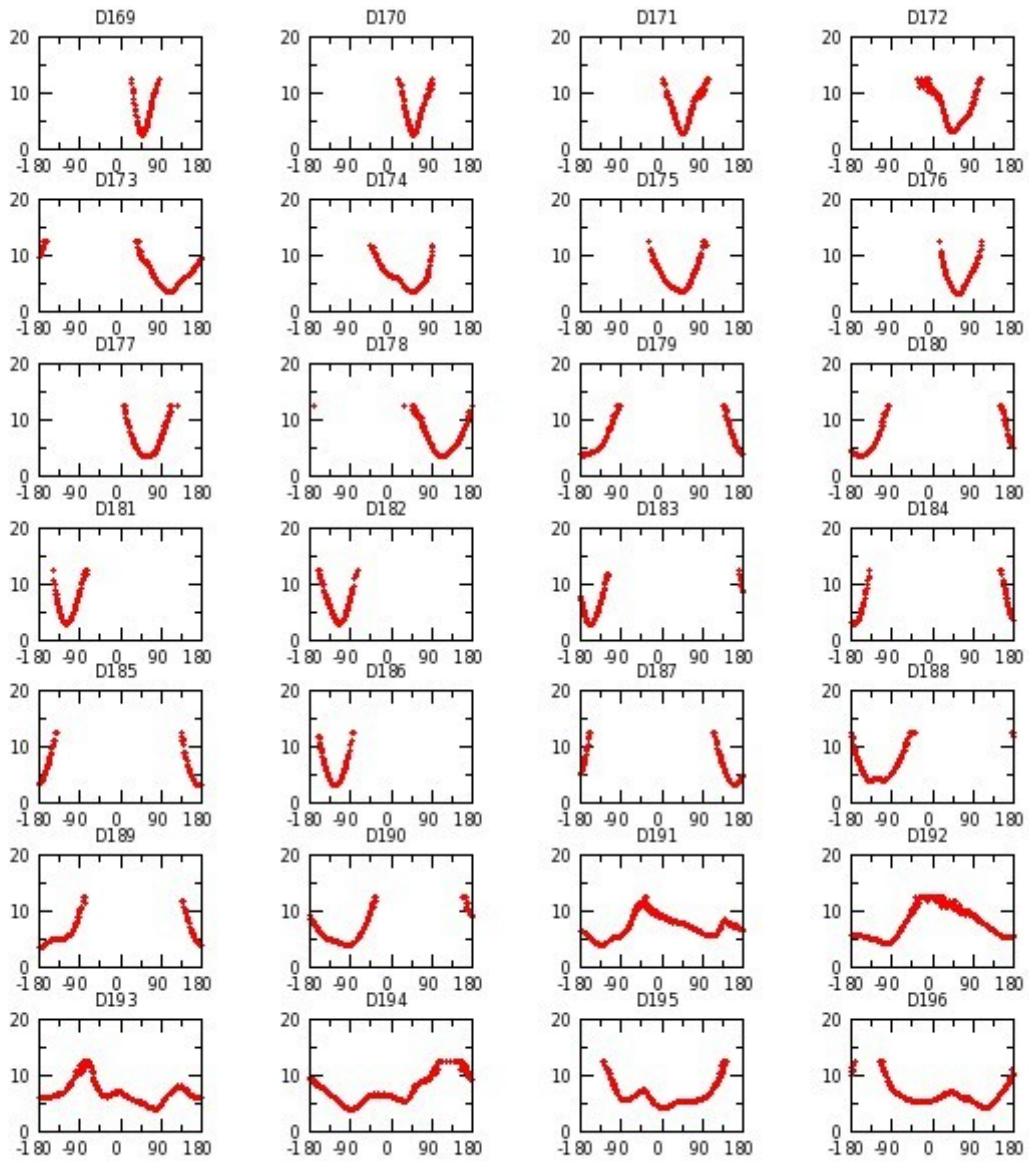


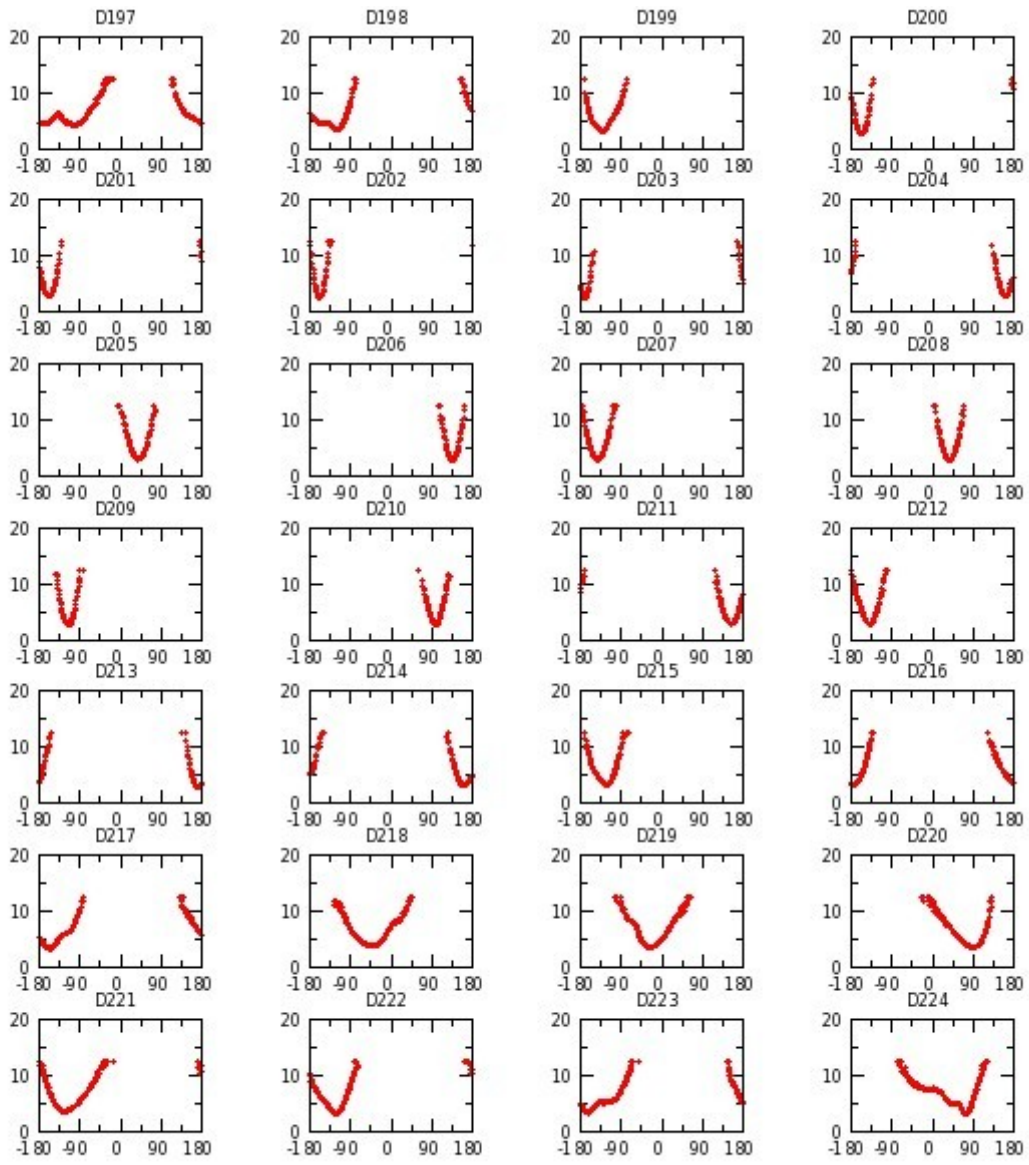


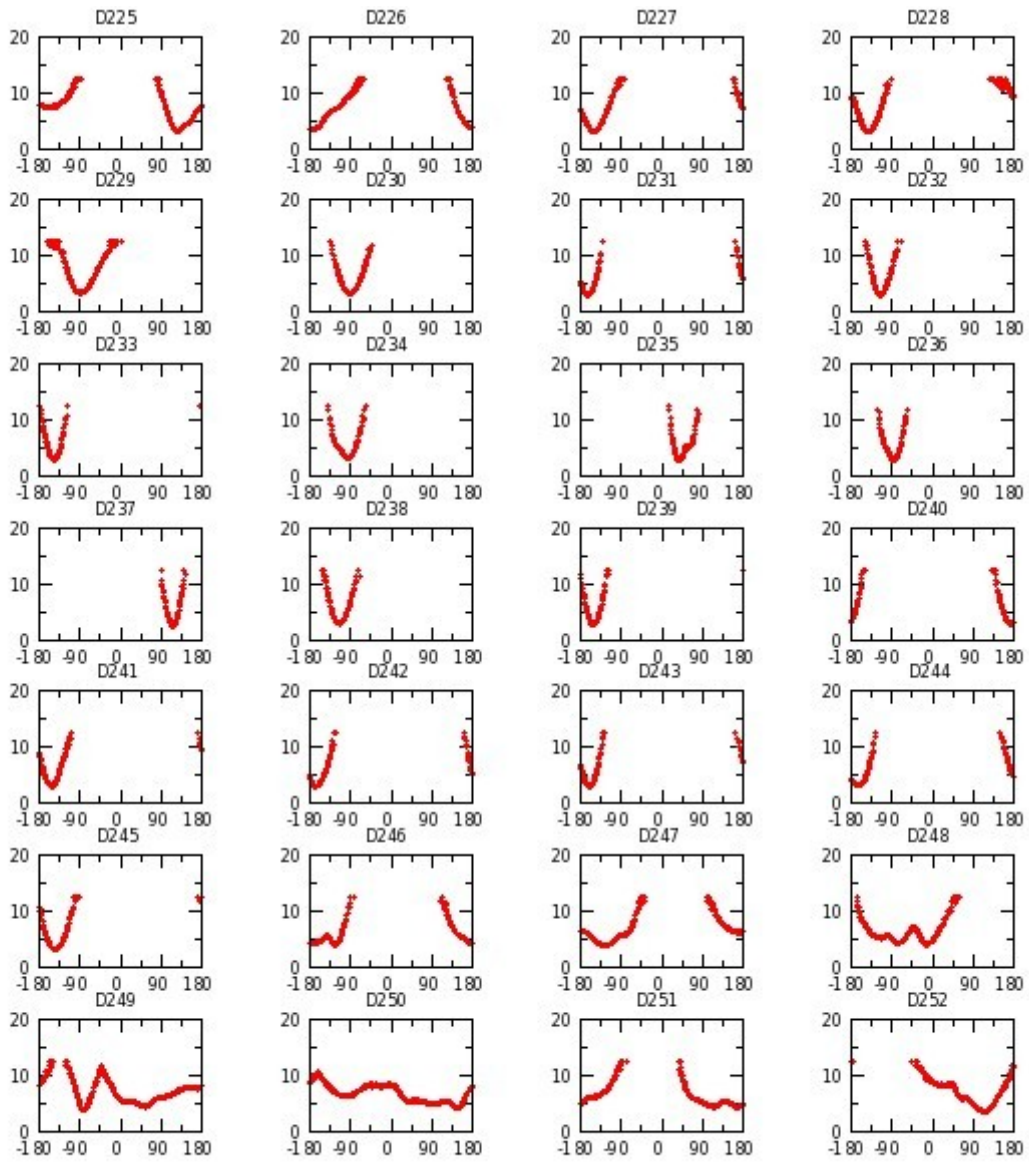


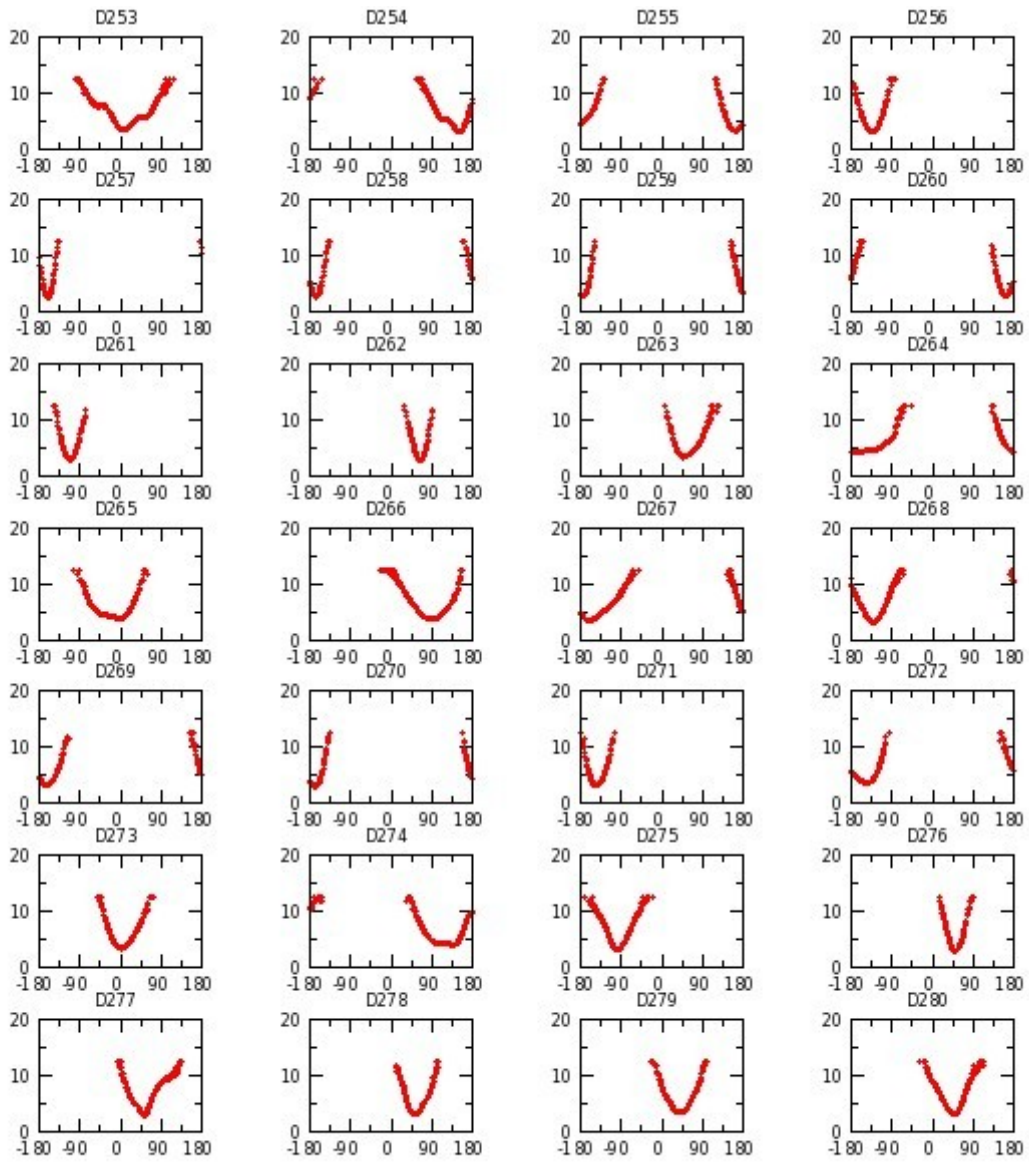


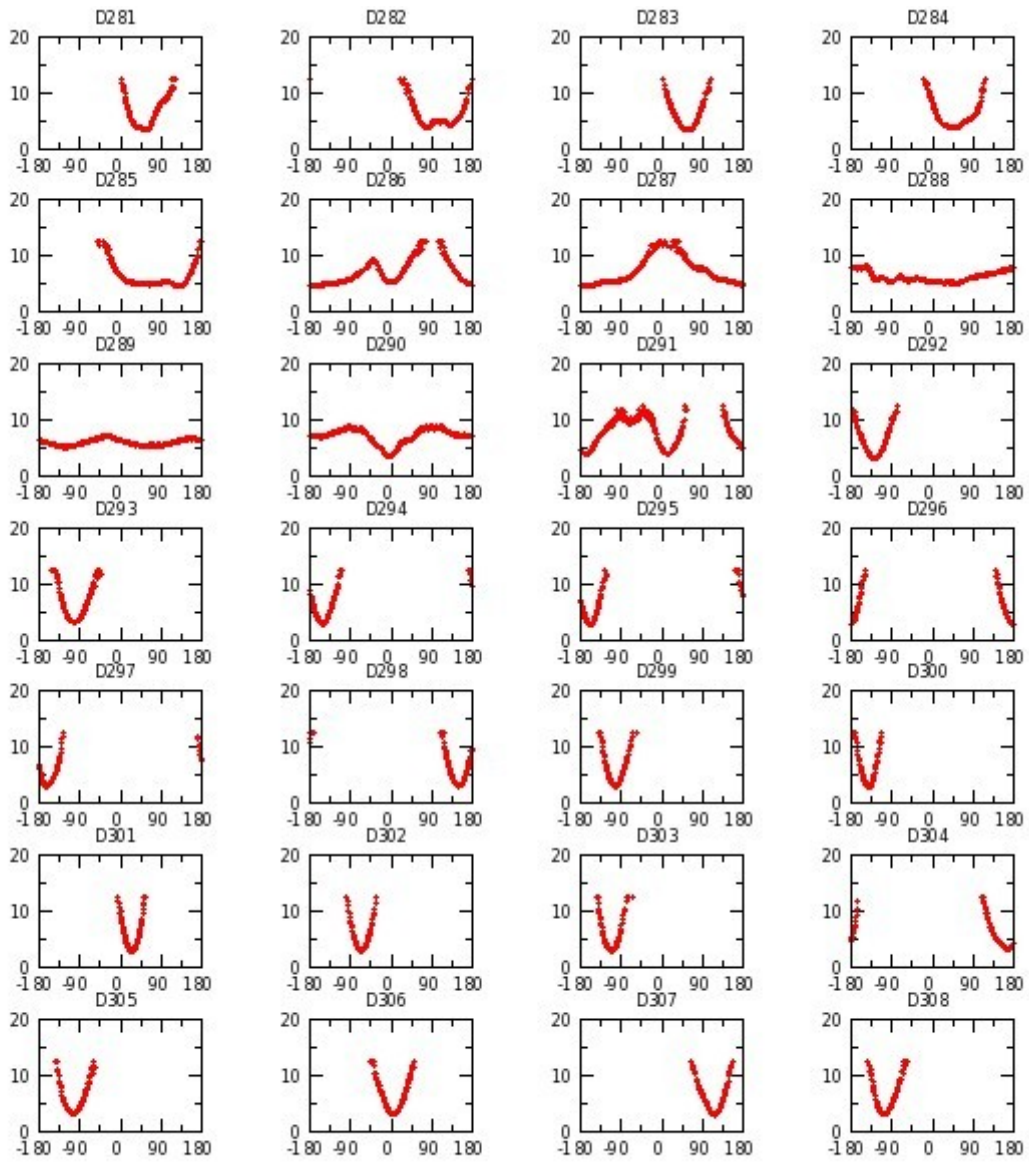


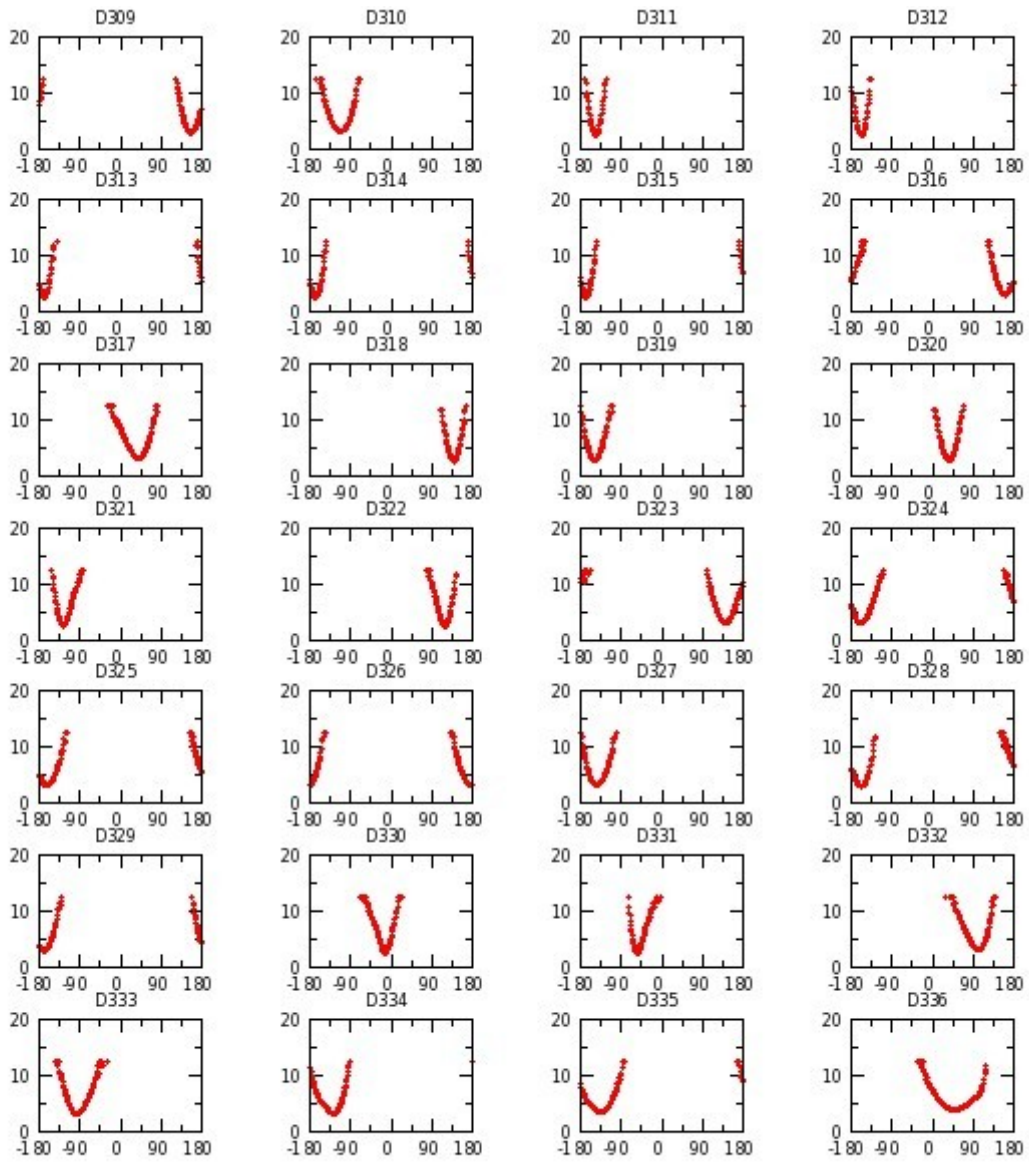


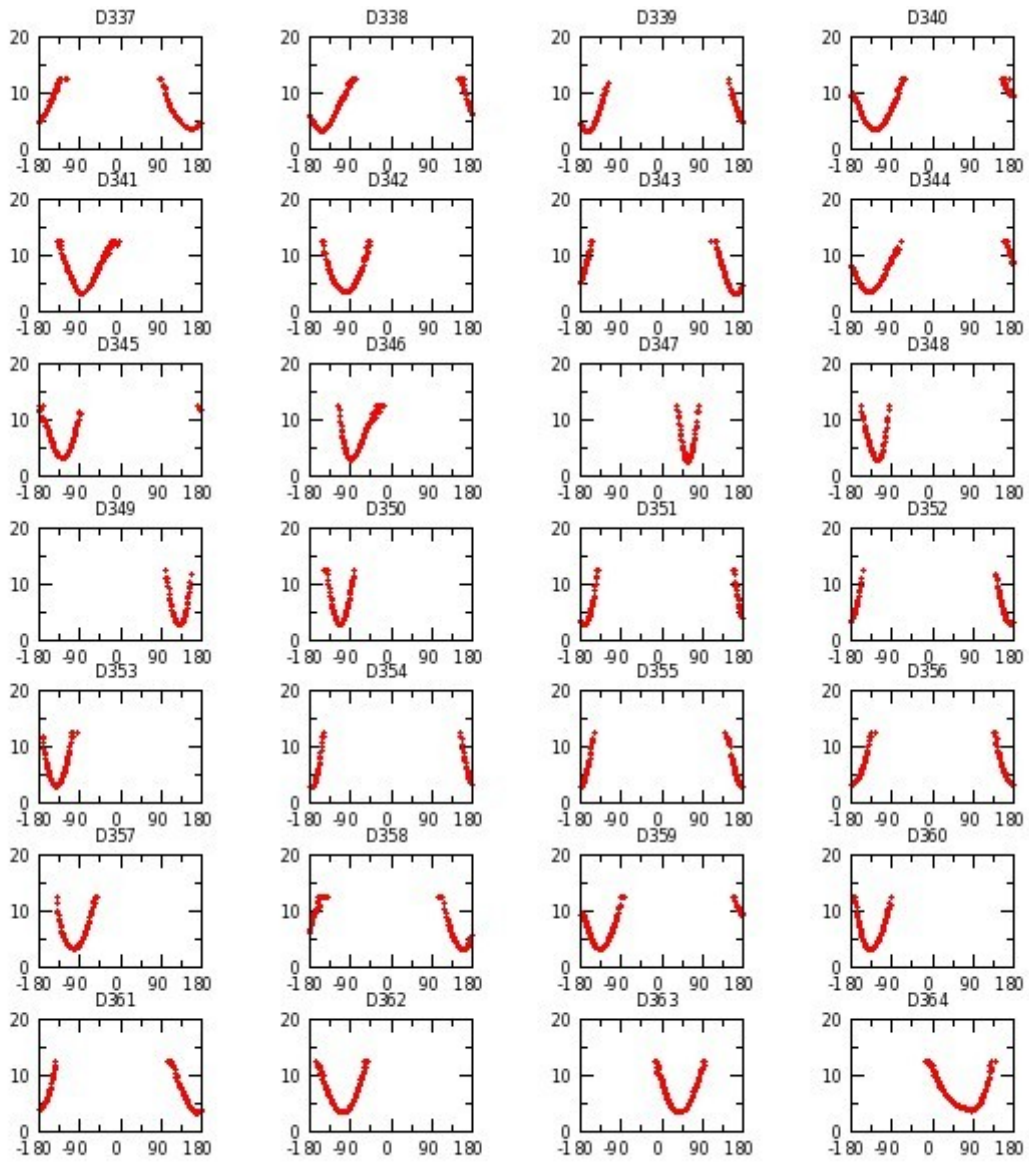


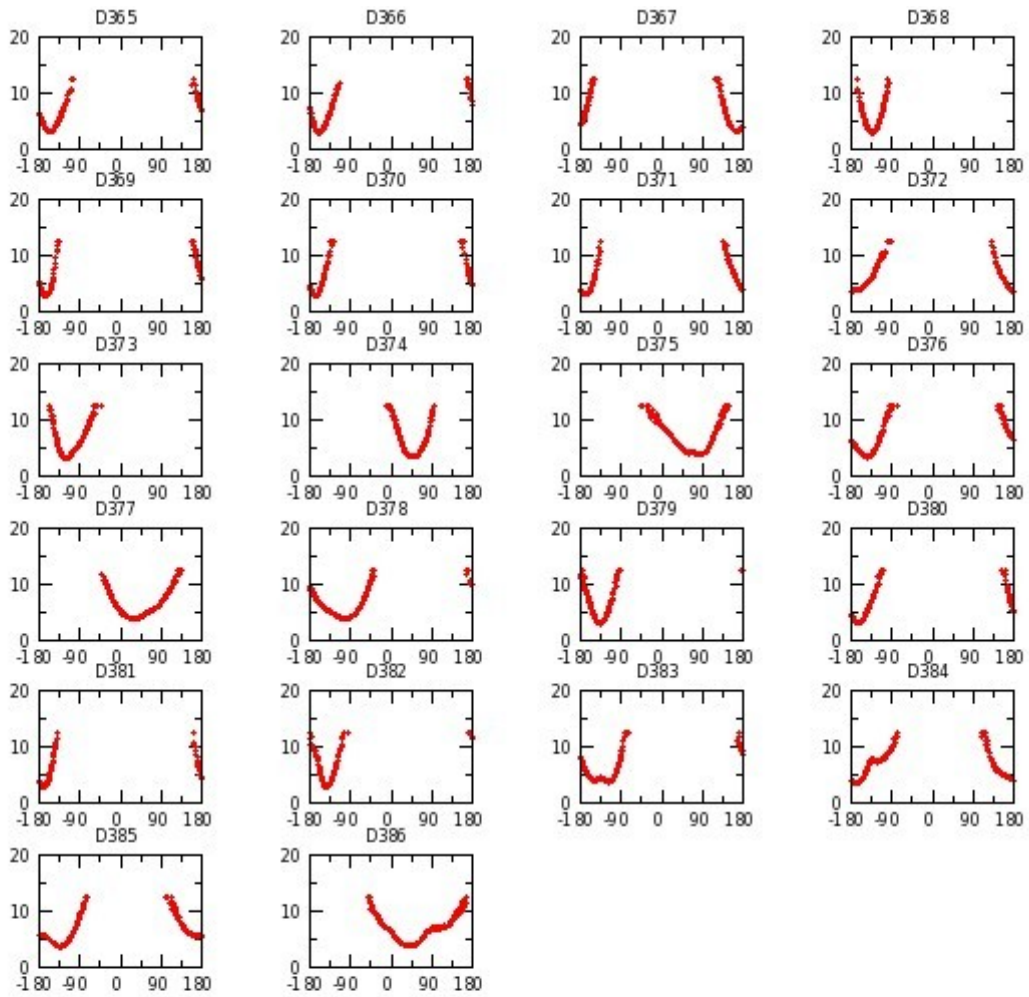




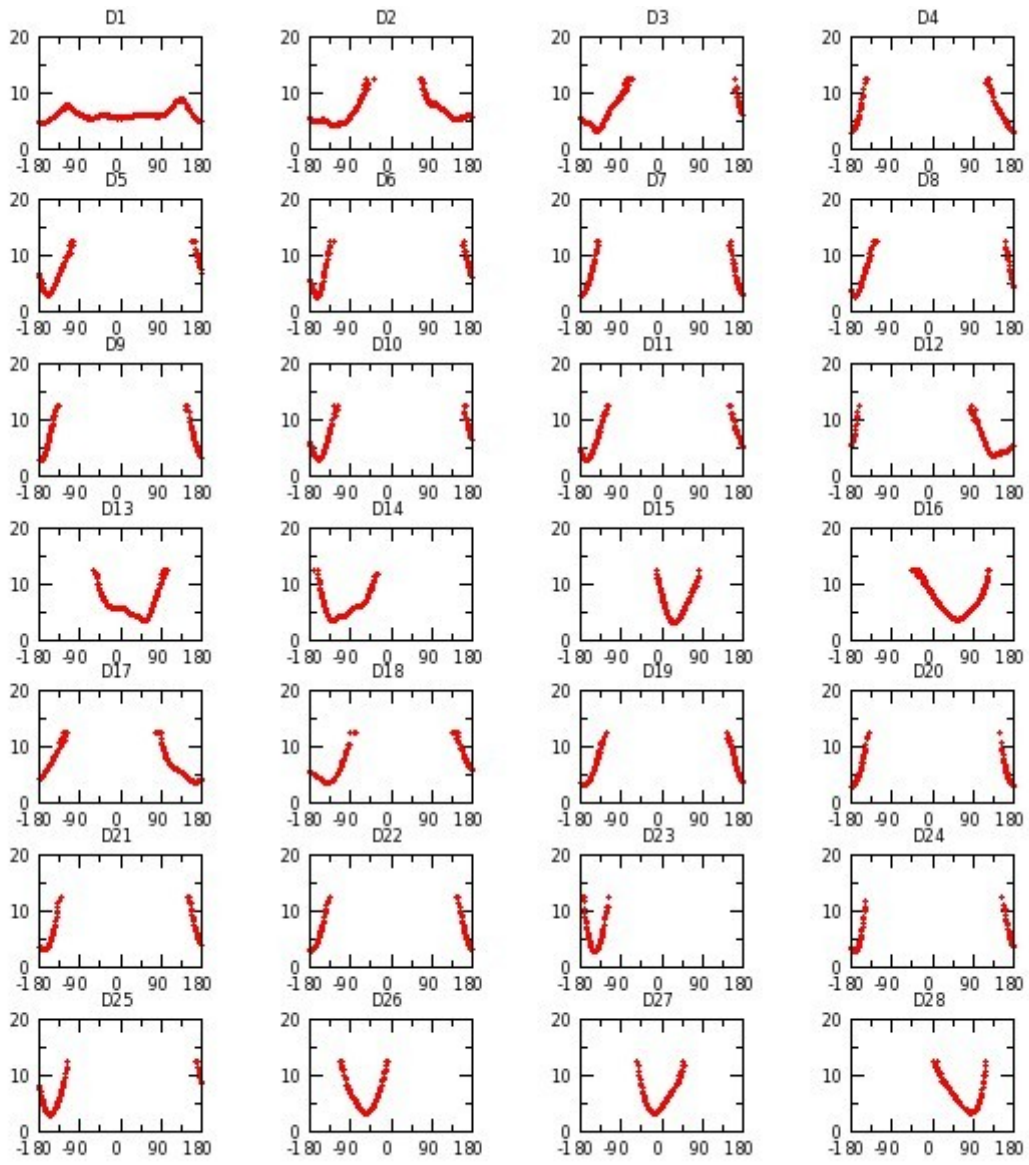


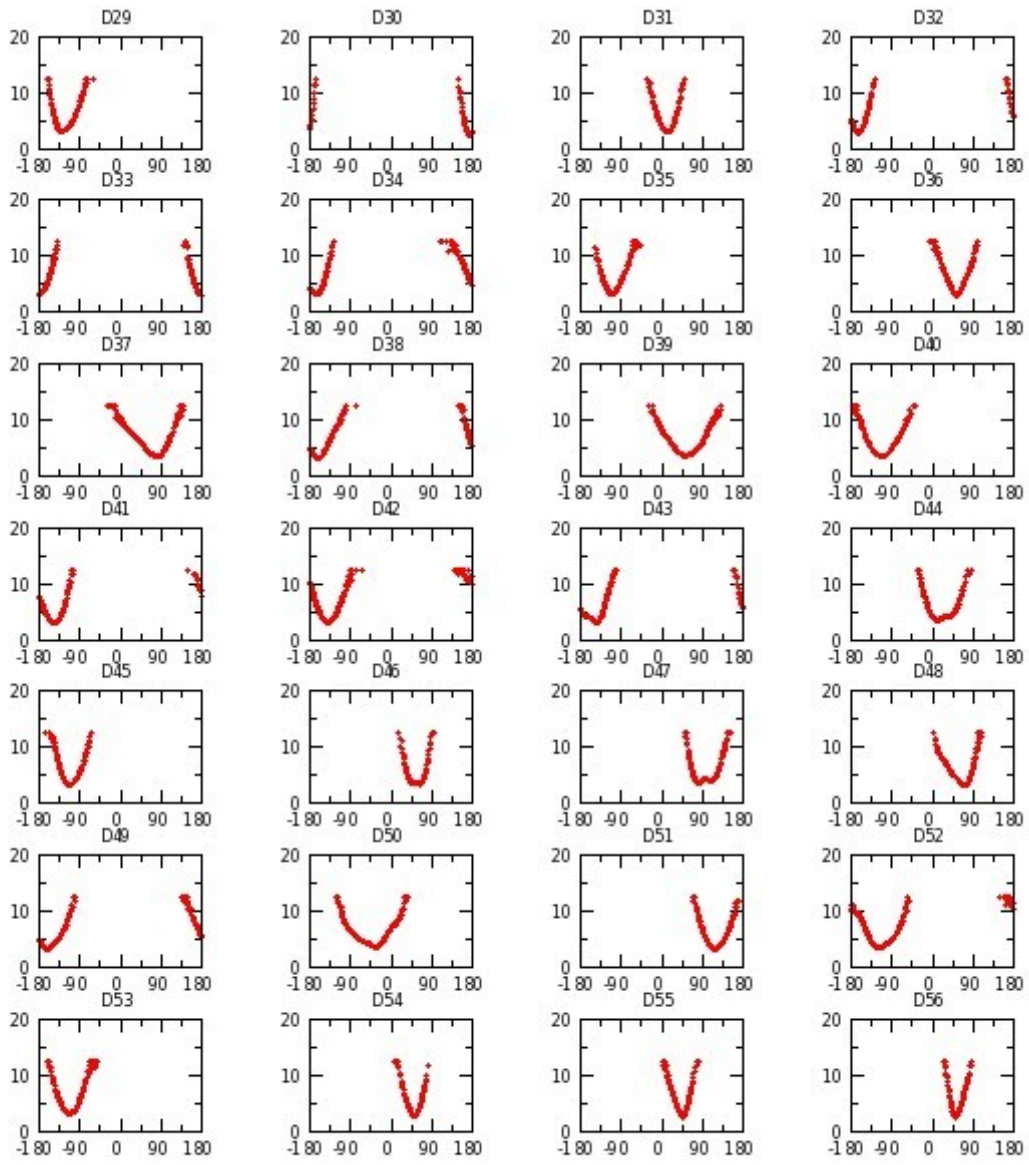


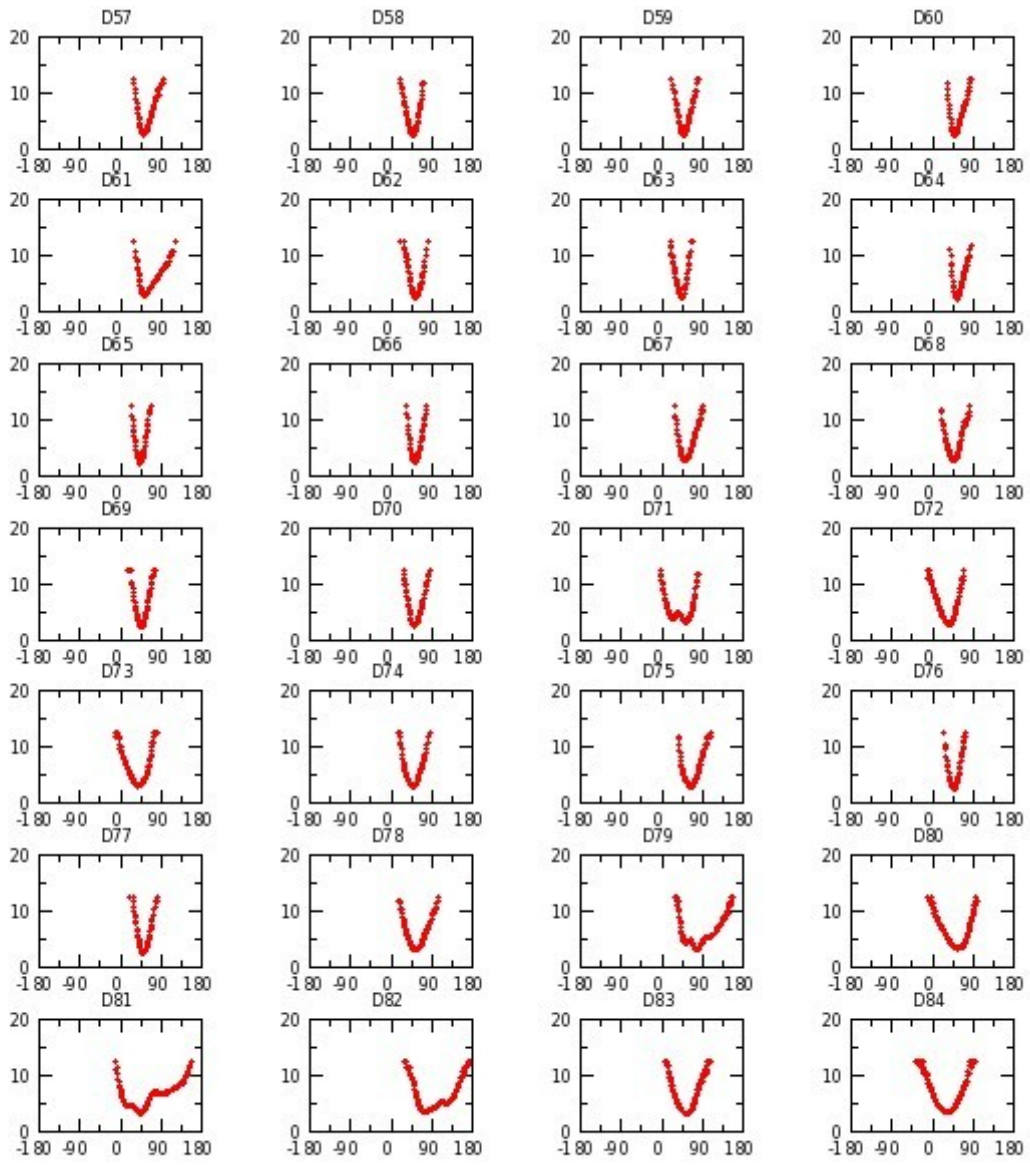


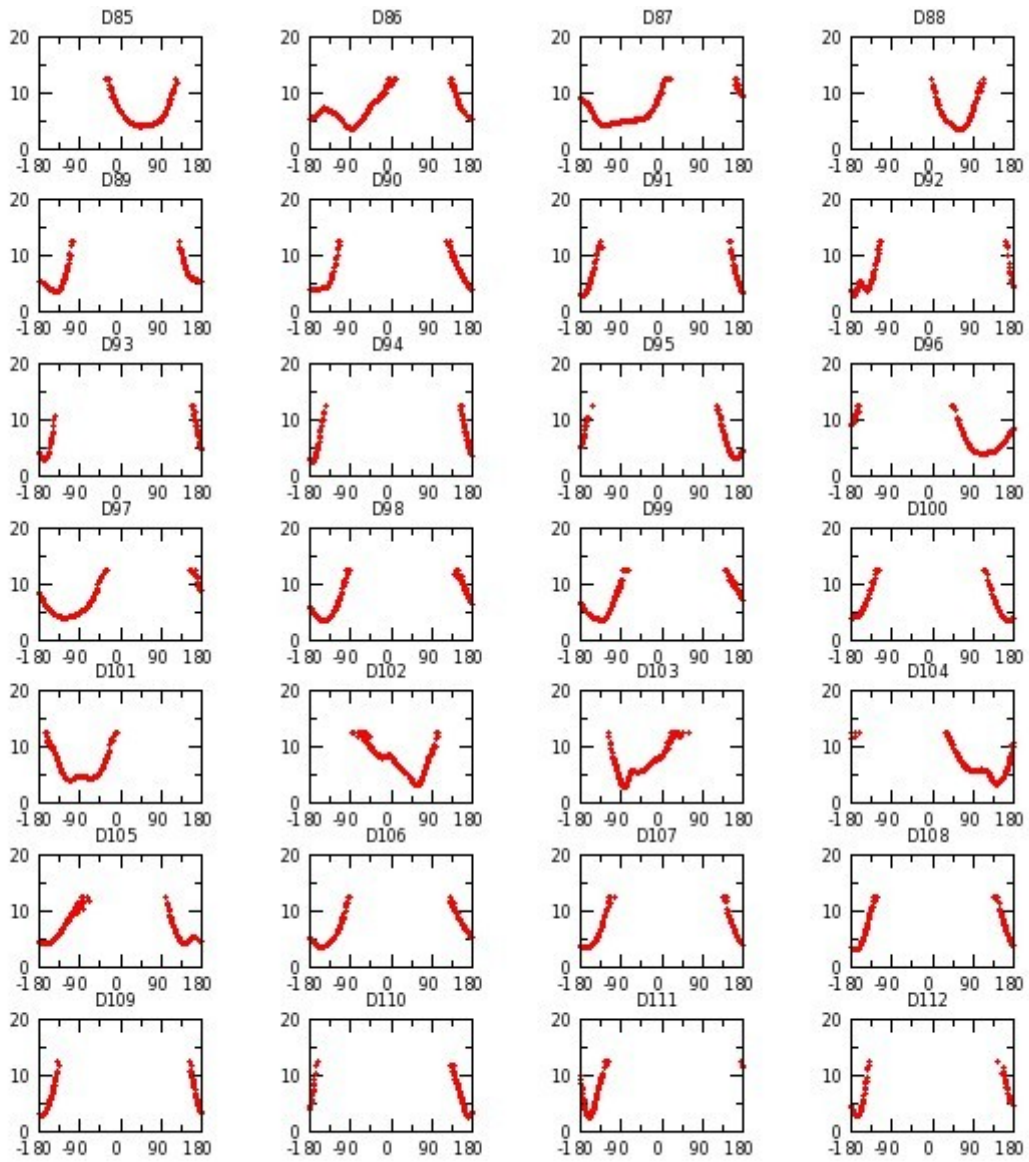


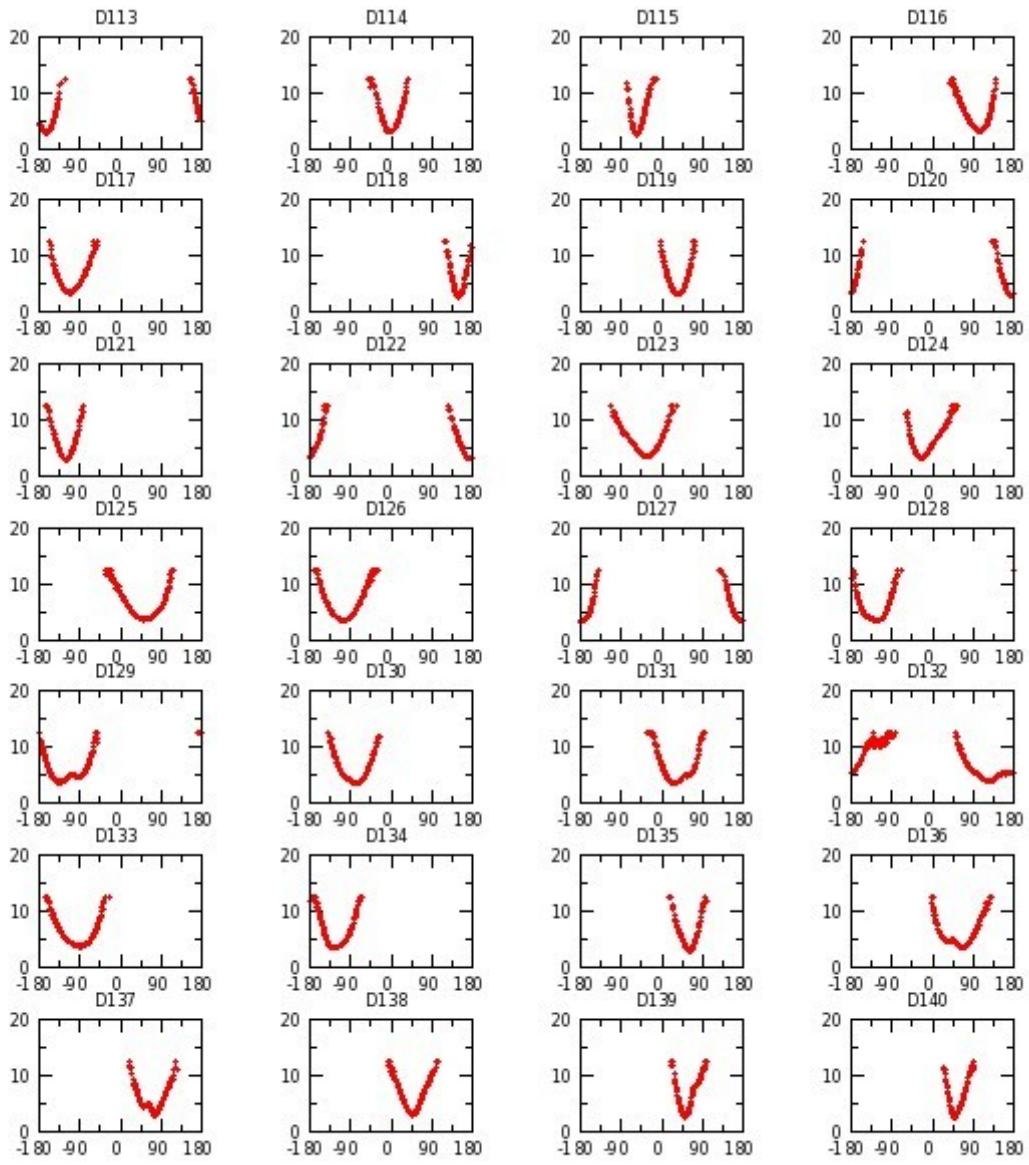
Annexe G 47 : M_SaGAL réplique II

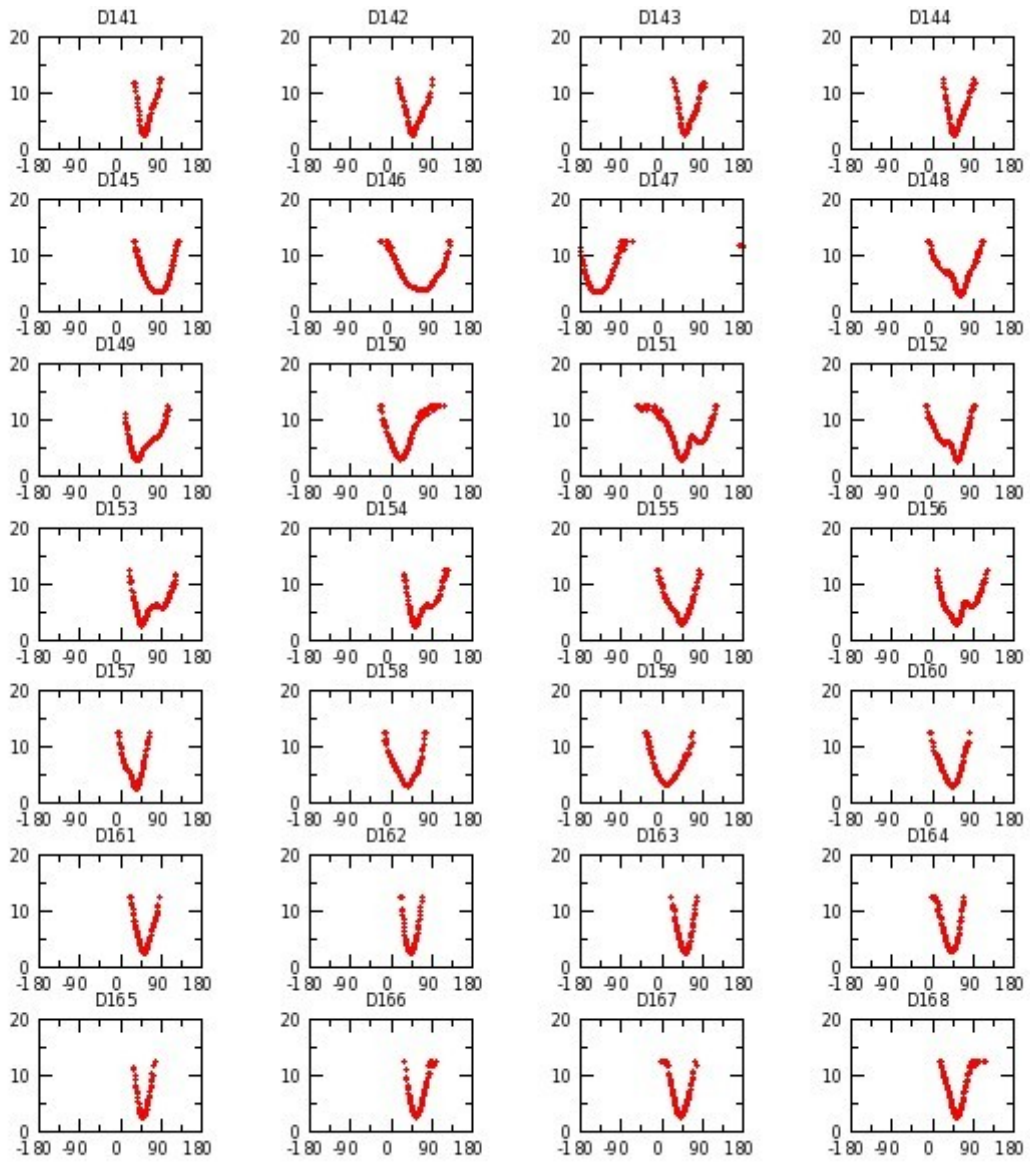


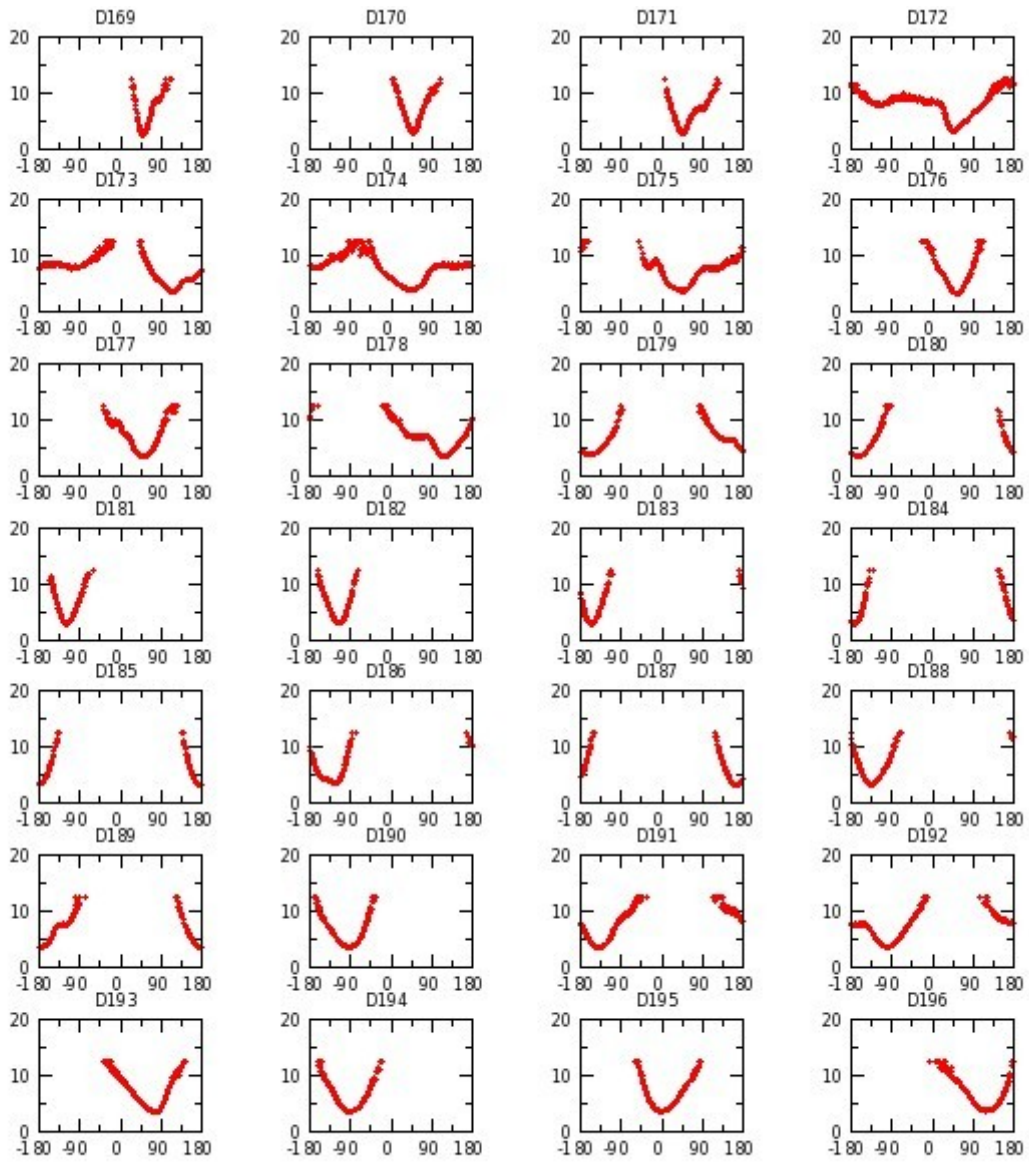


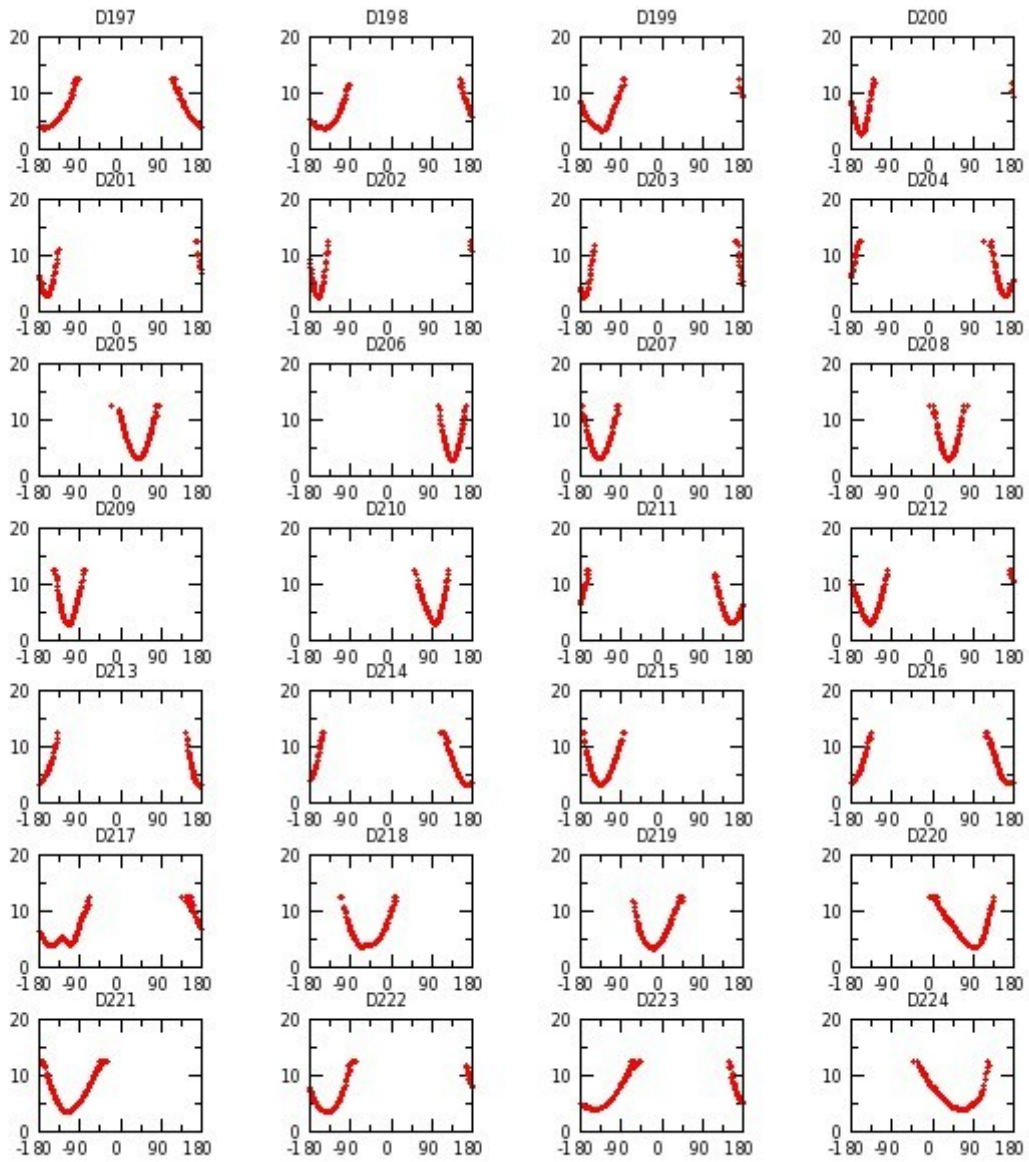


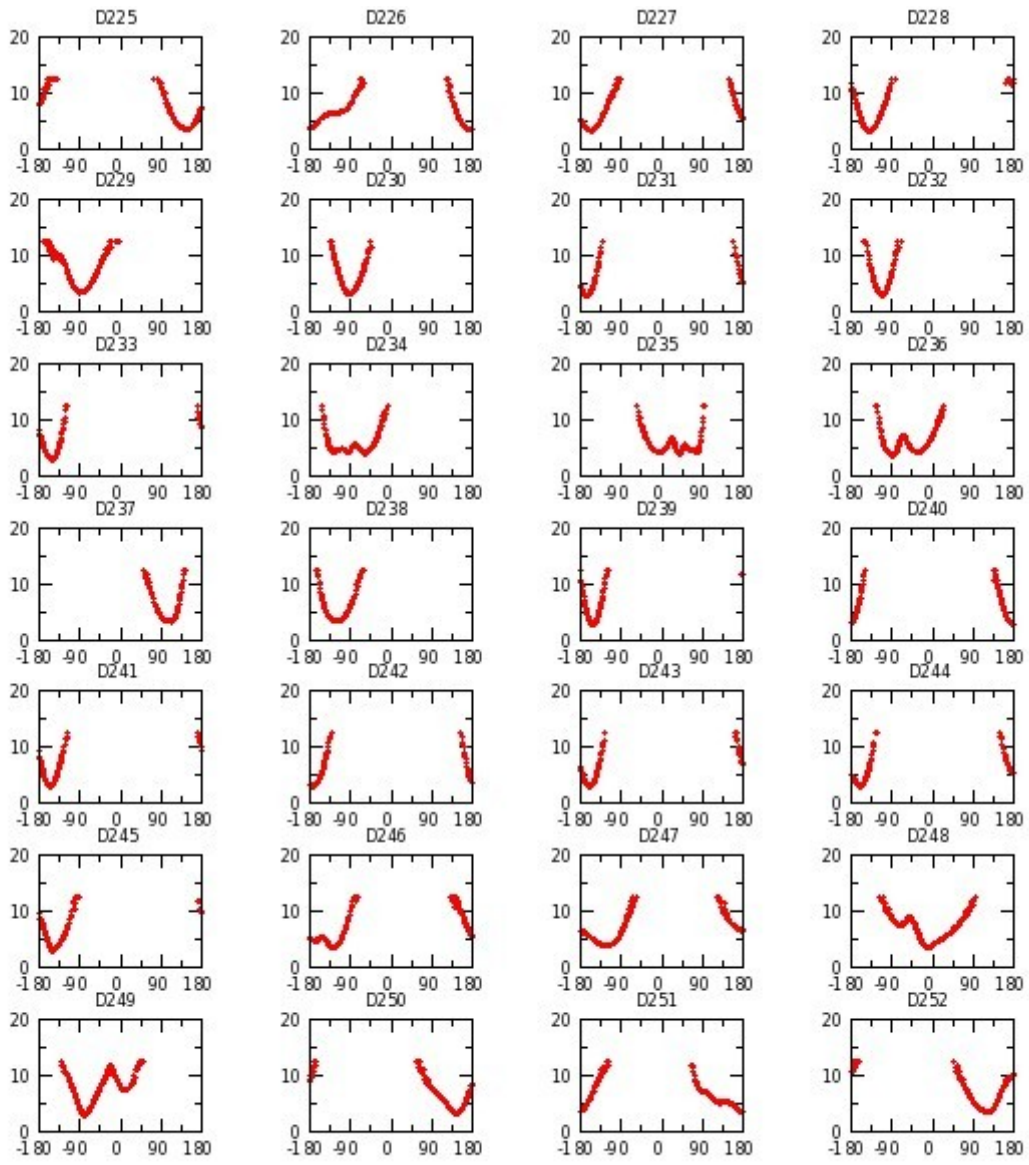


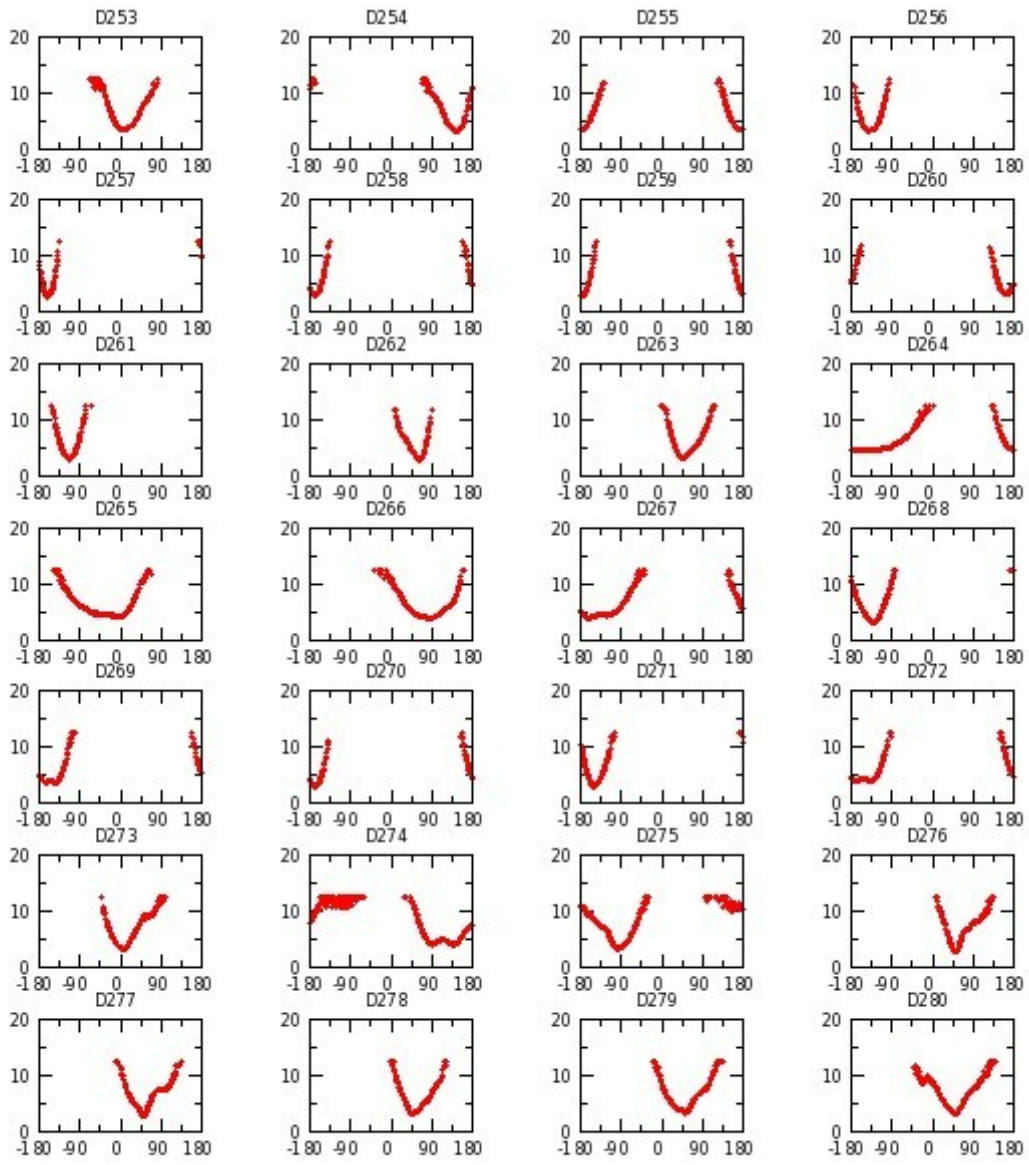


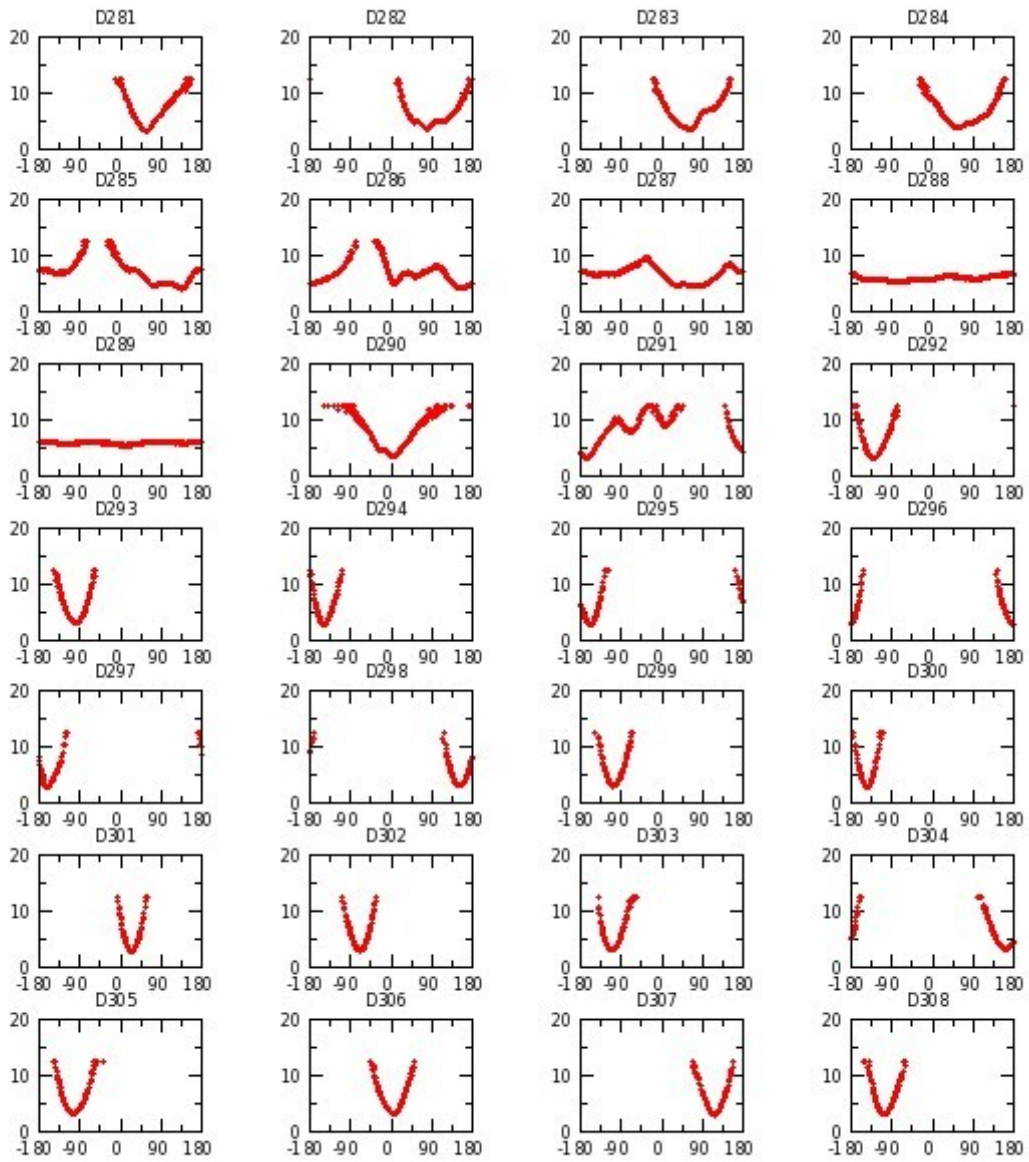


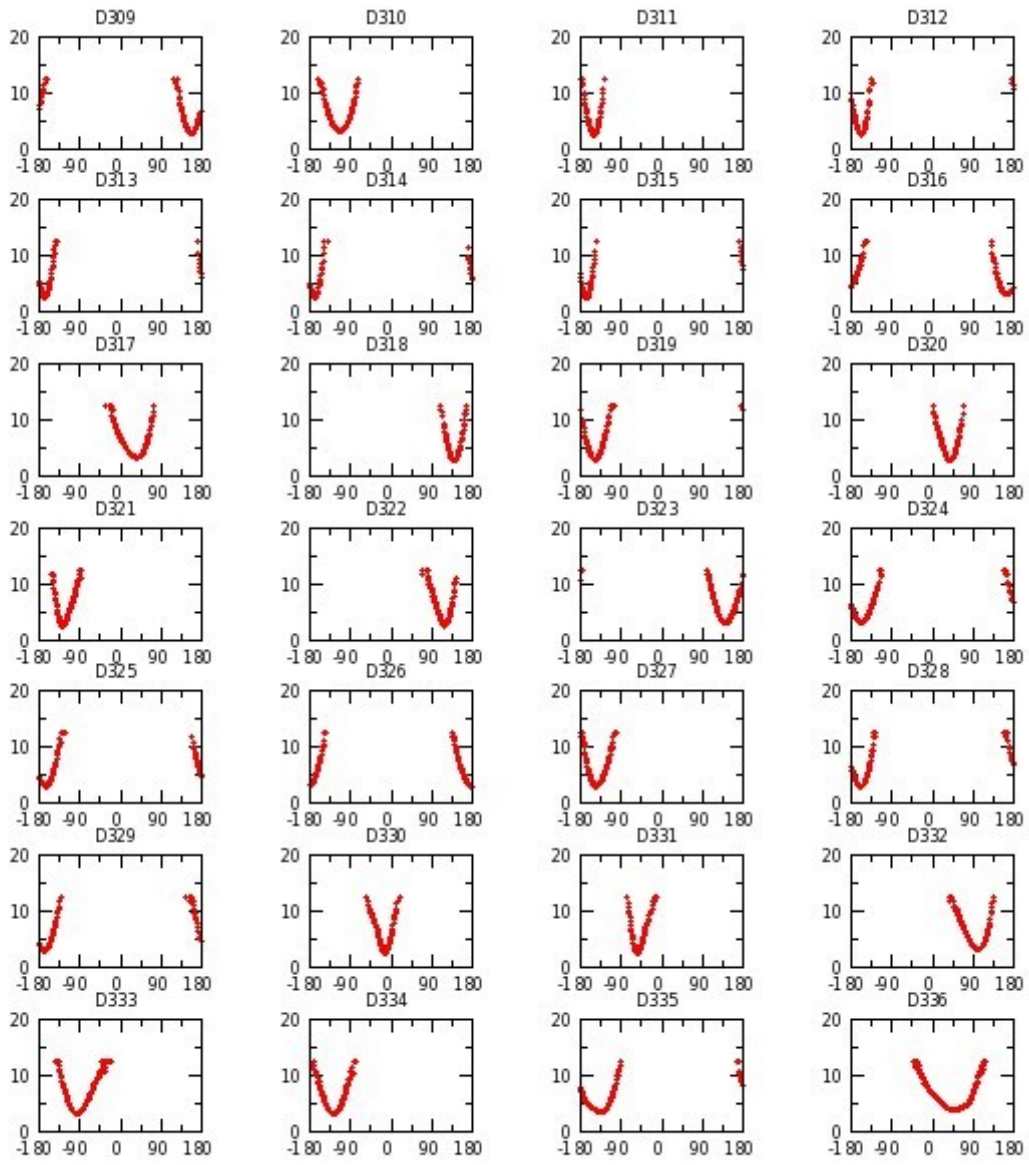


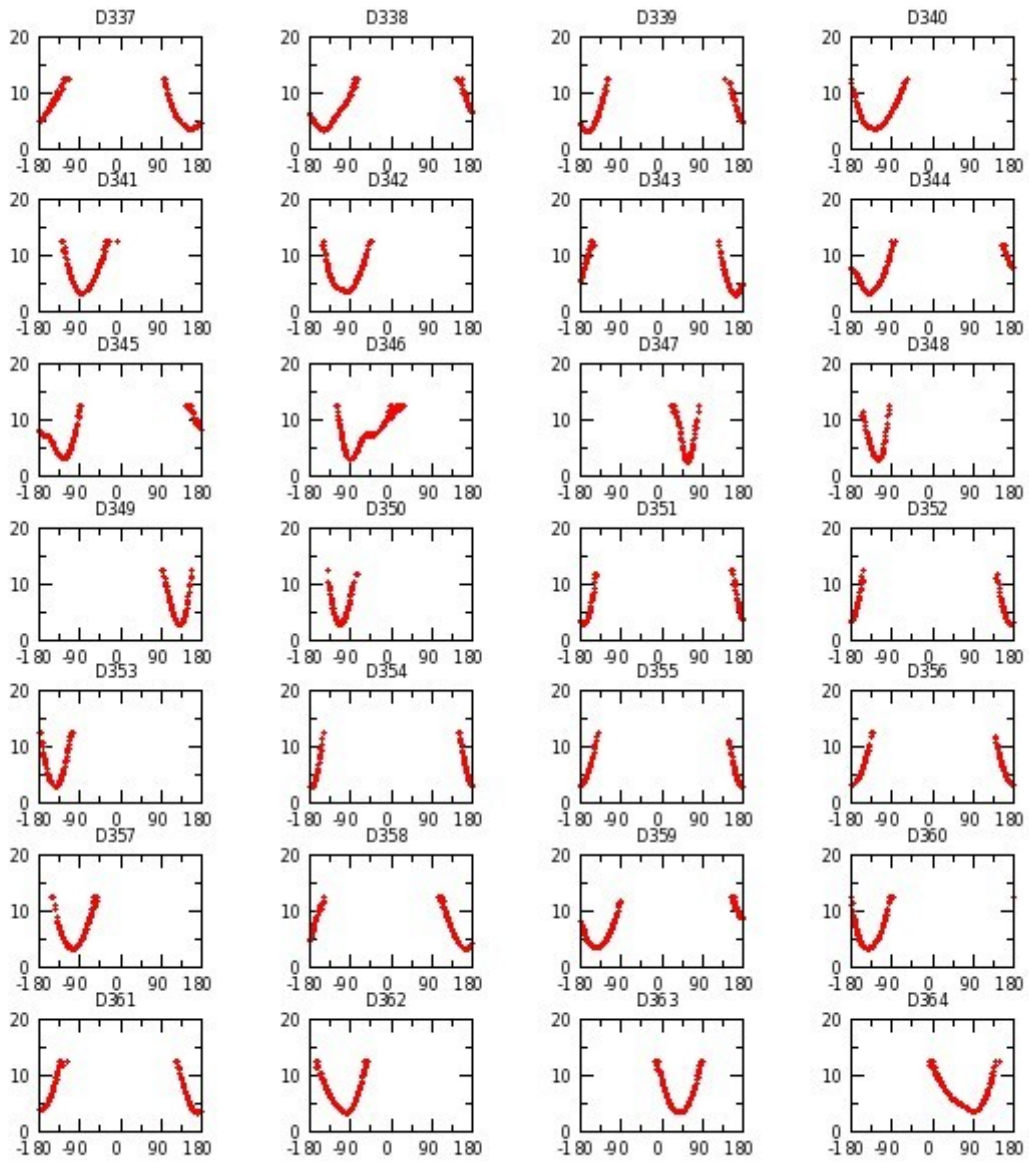


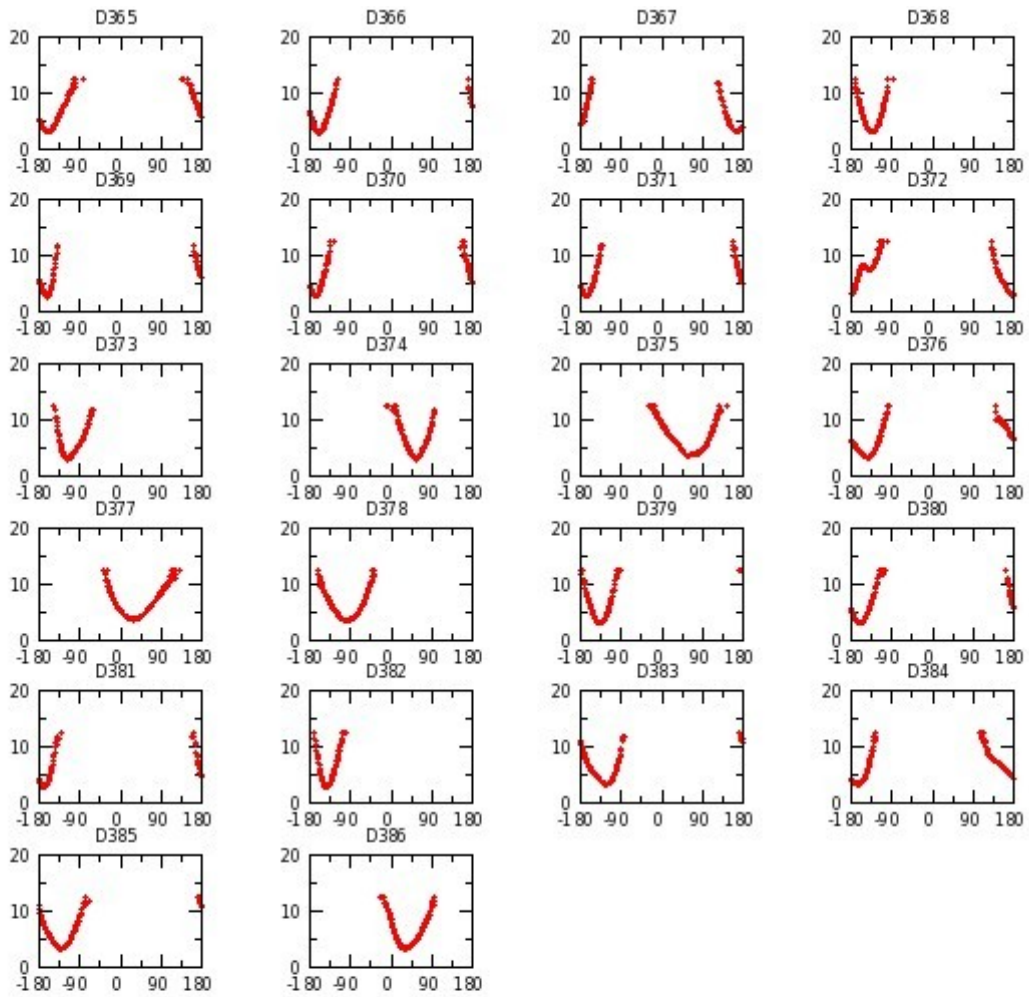










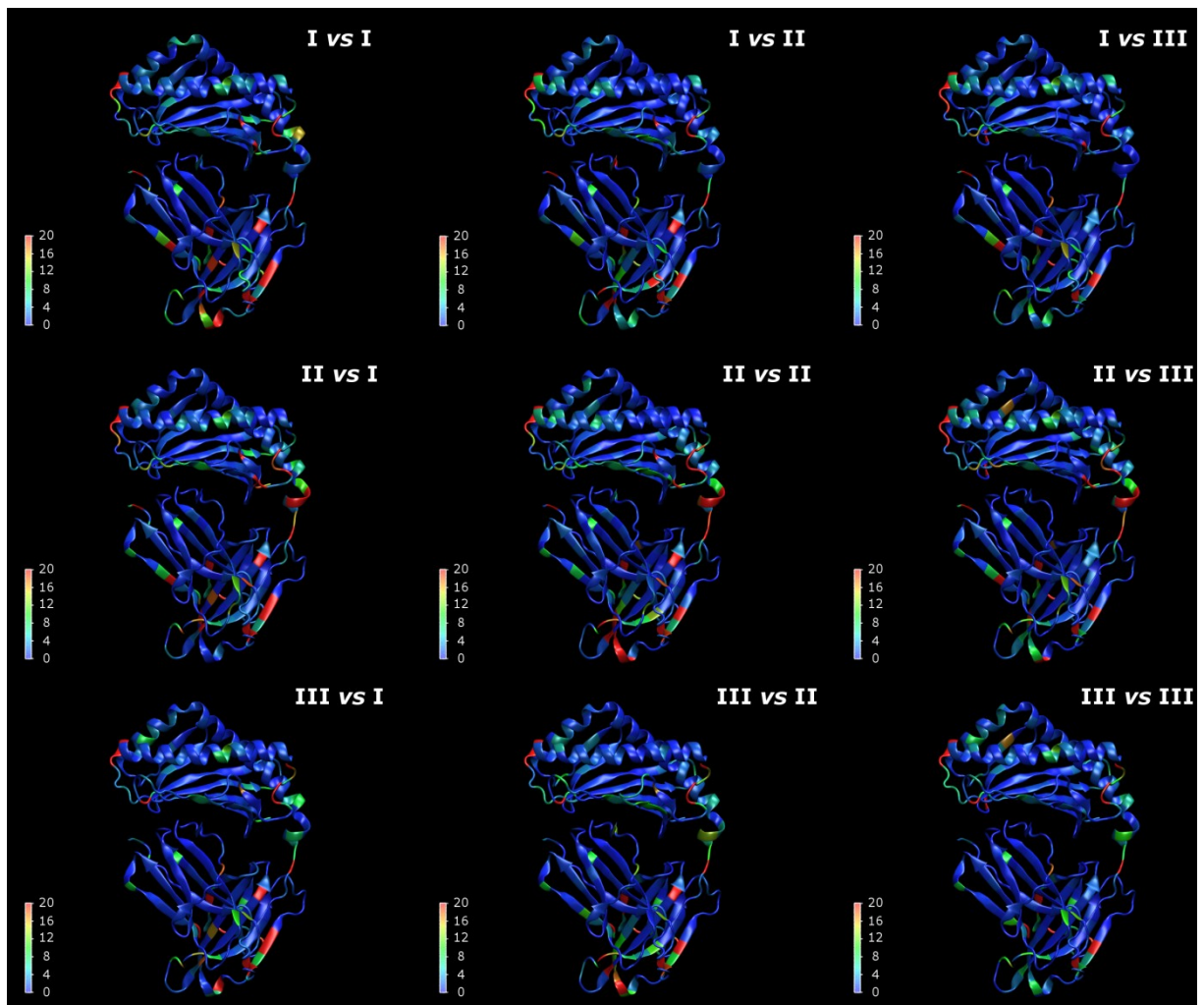


Annexe G 48 : M_SaGAL réplique III

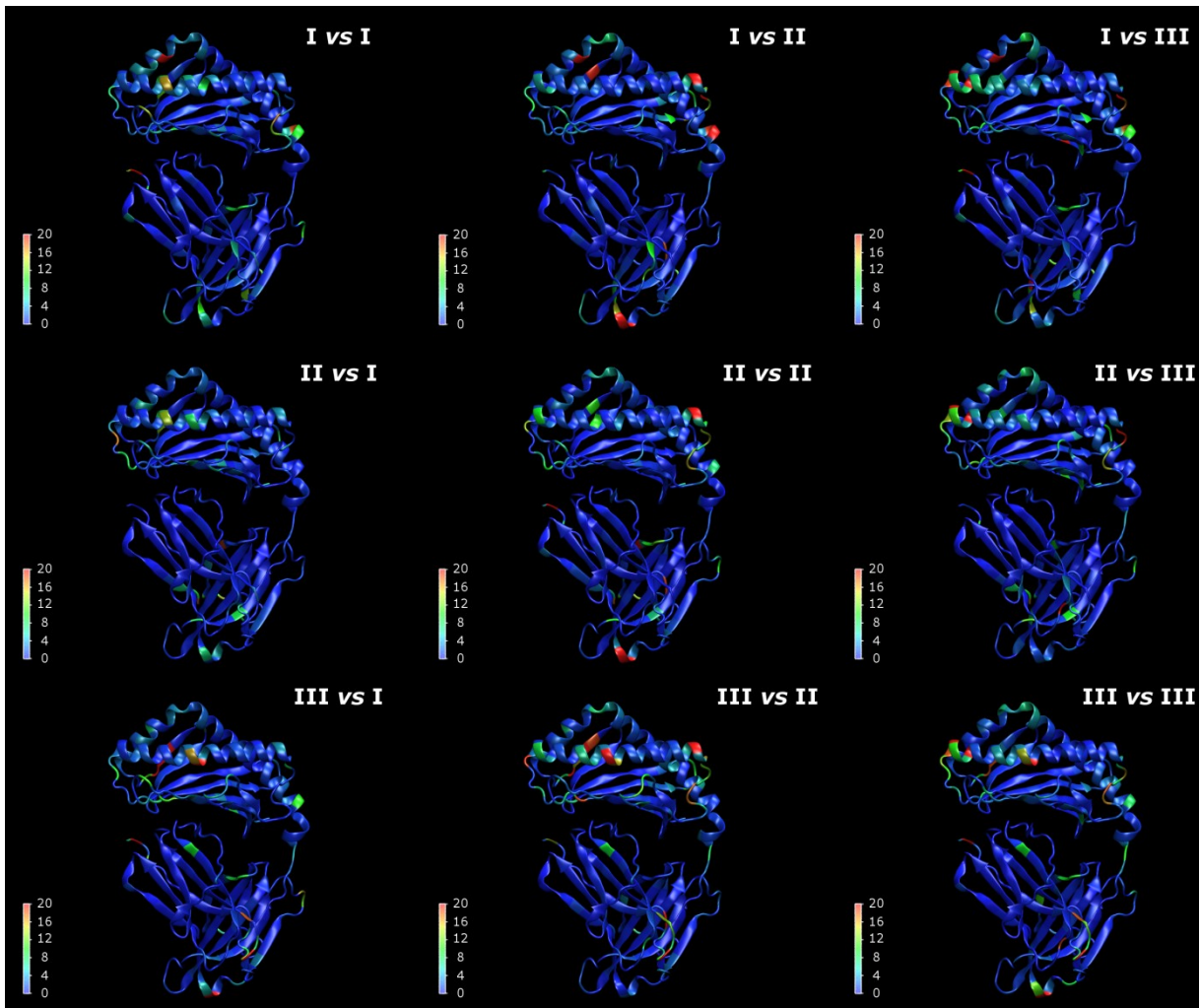
Annexe H – Similarité des FEL-1D

Dans tous les graphes, la similarité des paysages énergétique est exprimée en unité arbitraire.

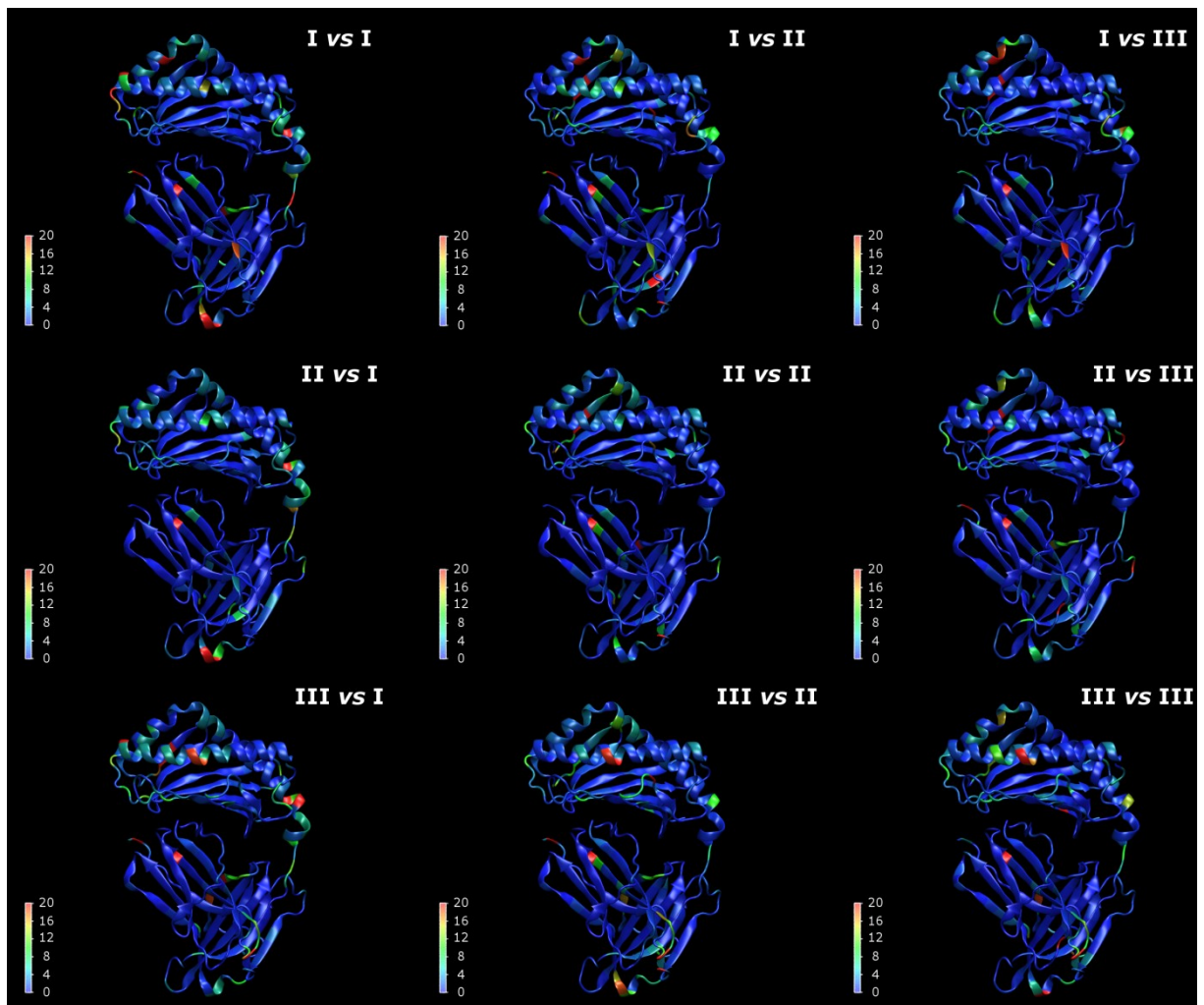
Annexe H 1 : H_7DW vs M_7DW	991
Annexe H 2 : H_aGAL vs H_CD1d	992
Annexe H 3 : H_aGAL vs H_LIP	993
Annexe H 4 : H_aGAL vs H_OCH	994
Annexe H 5 : H_aGAL vs H_OCH9	995
Annexe H 6 : H_aGAL vs M_SaGAL	996
Annexe H 7 : H_aGAL vs M_aGAL	997
Annexe H 8 : H_CD1d vs H_LIP	998
Annexe H 9 : H_NUaGAL vs M_NUaGAL	999
Annexe H 10 : H_OCH9 vs H_OCH	1000
Annexe H 11 : H_OCH vs M_OCH	1001
Annexe H 12 : M_aGAL vs M_AZOL	1002



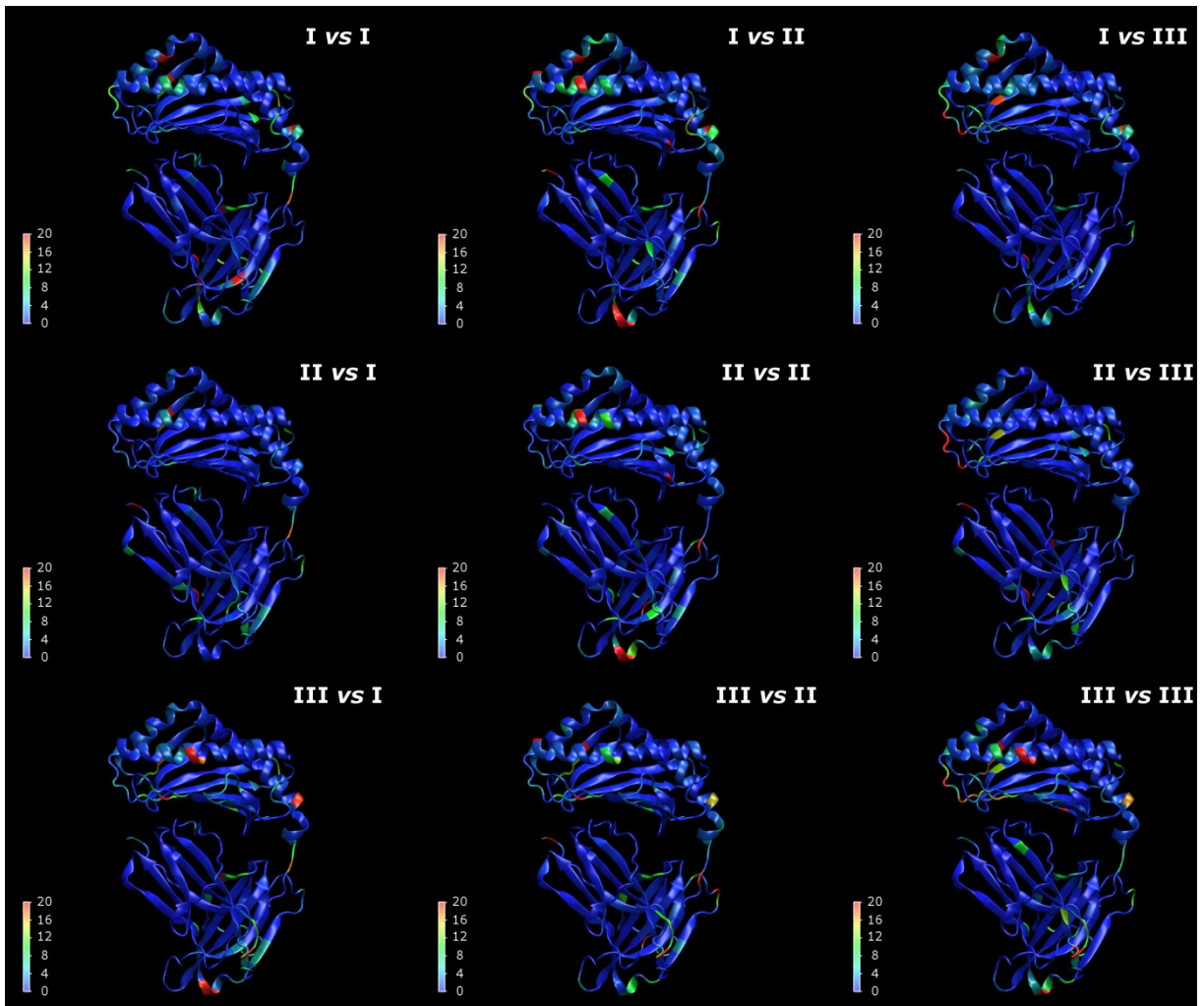
Annexe H 1 : H_7DW vs M_7DW



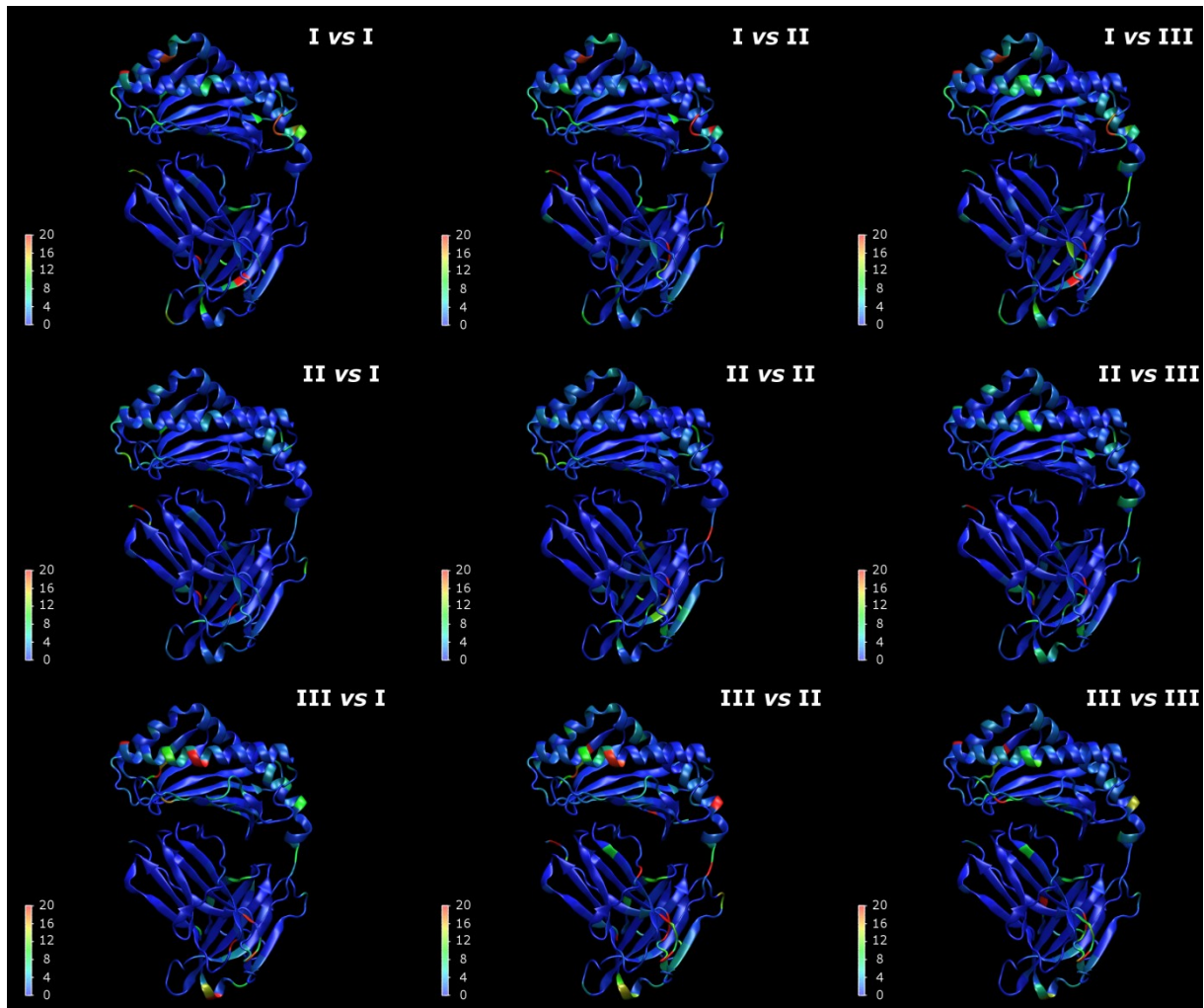
Annexe H 2 : H_aGAL vs H_CD1d



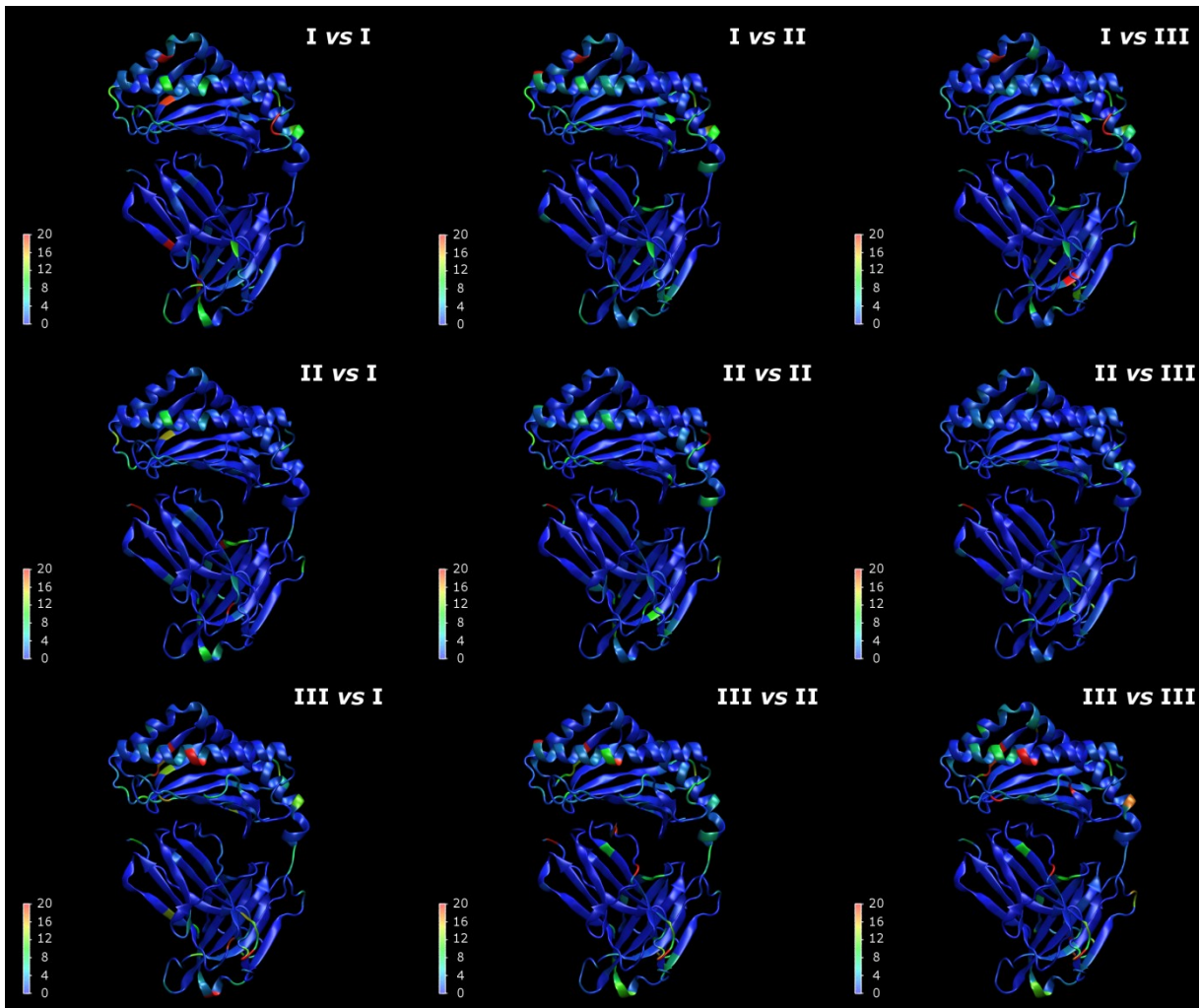
Annexe H 3 : H_aGAL vs H_LIP



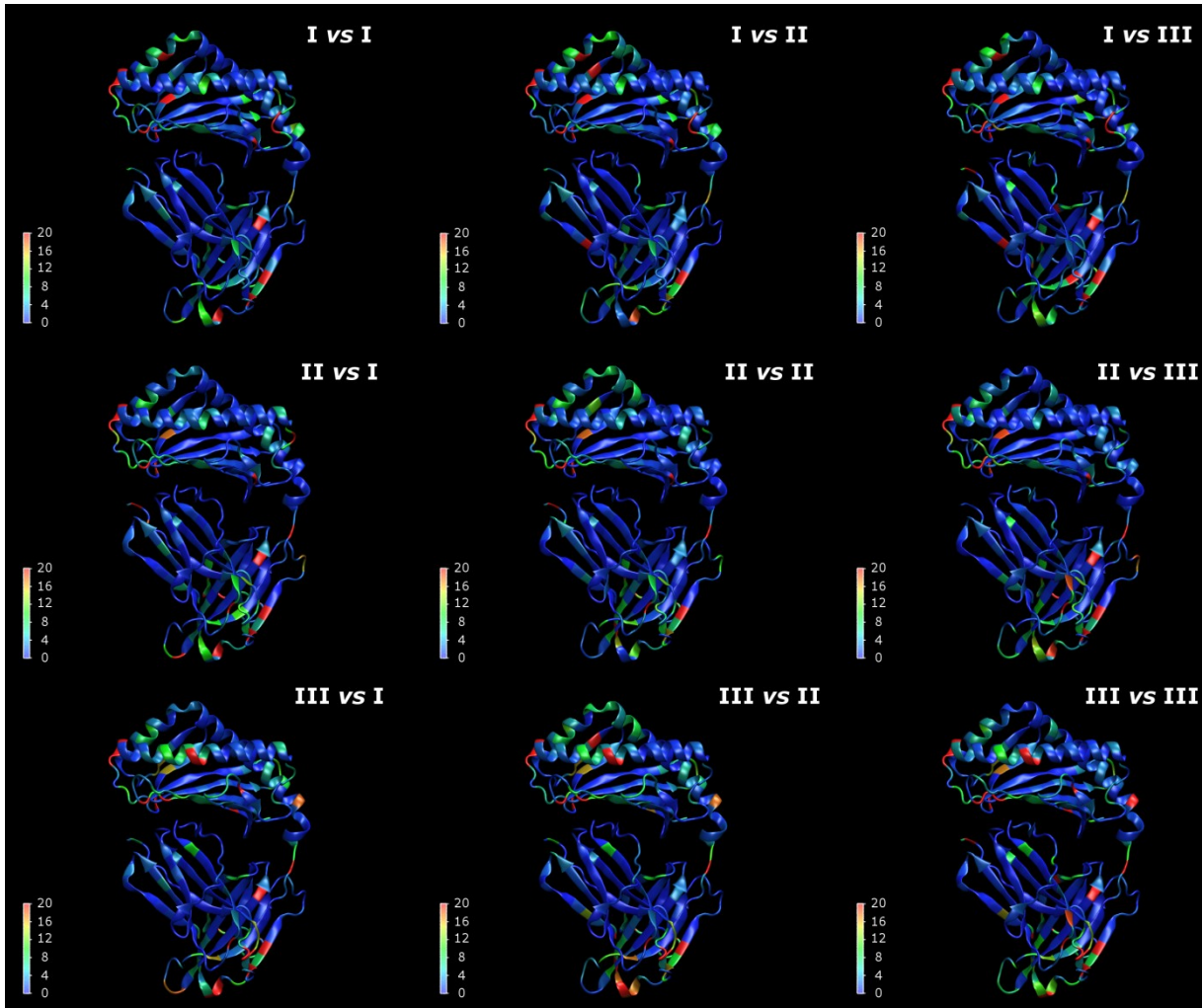
Annexe H 4 : H_aGAL vs H_OCH



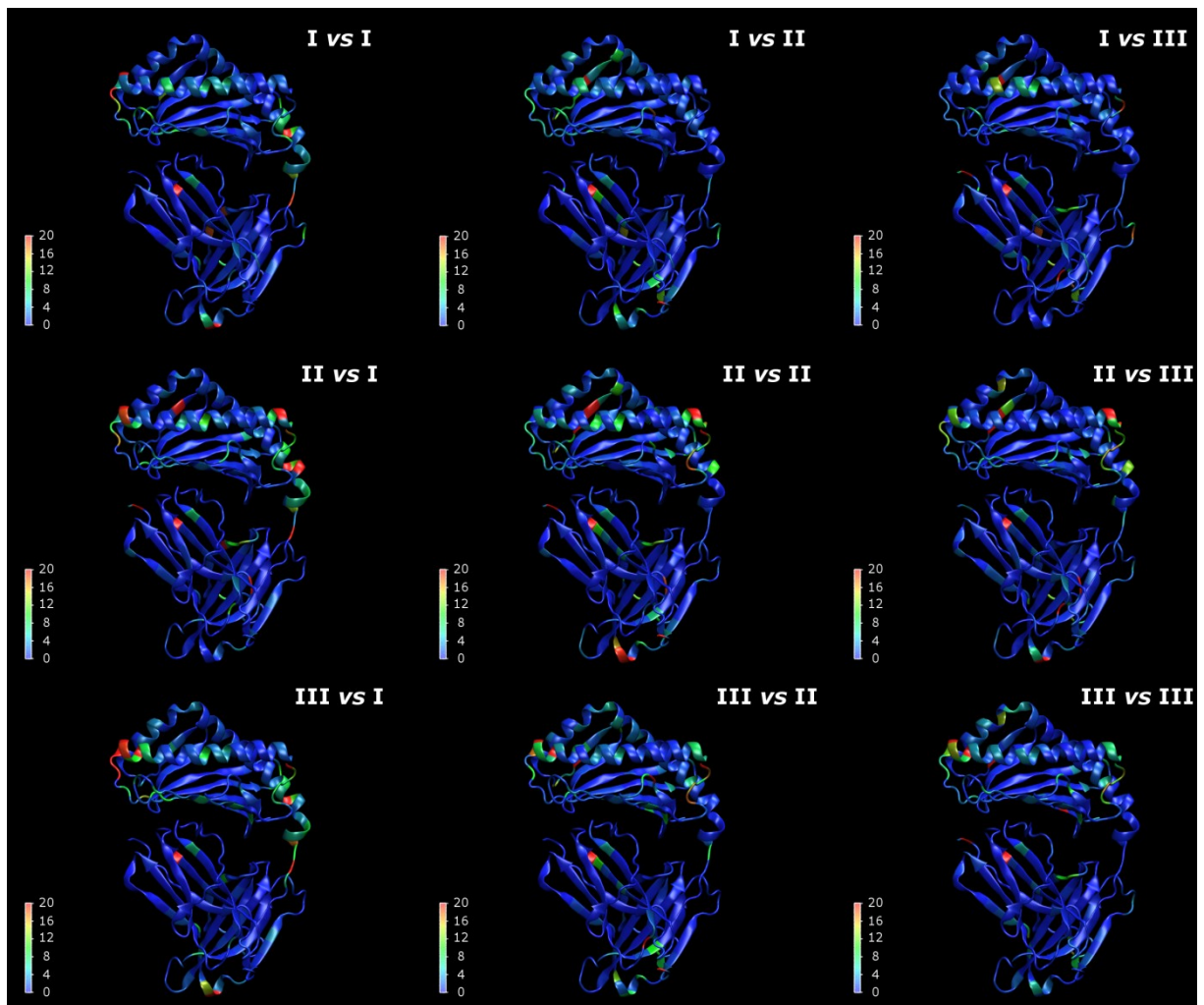
Annexe H 5 : H_aGAL vs H_OCH9



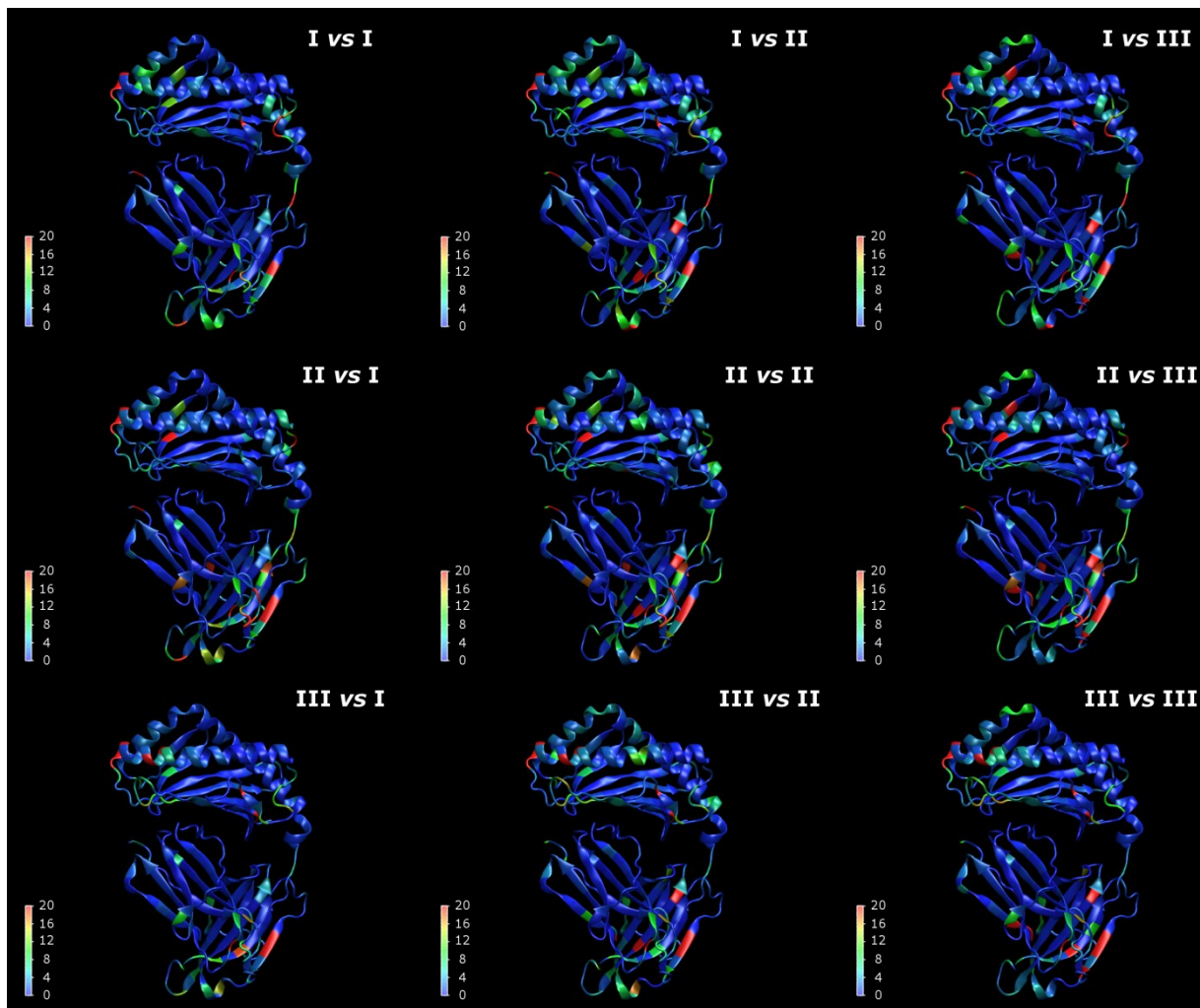
Annexe H 6 : H_aGAL vs M_SaGAL



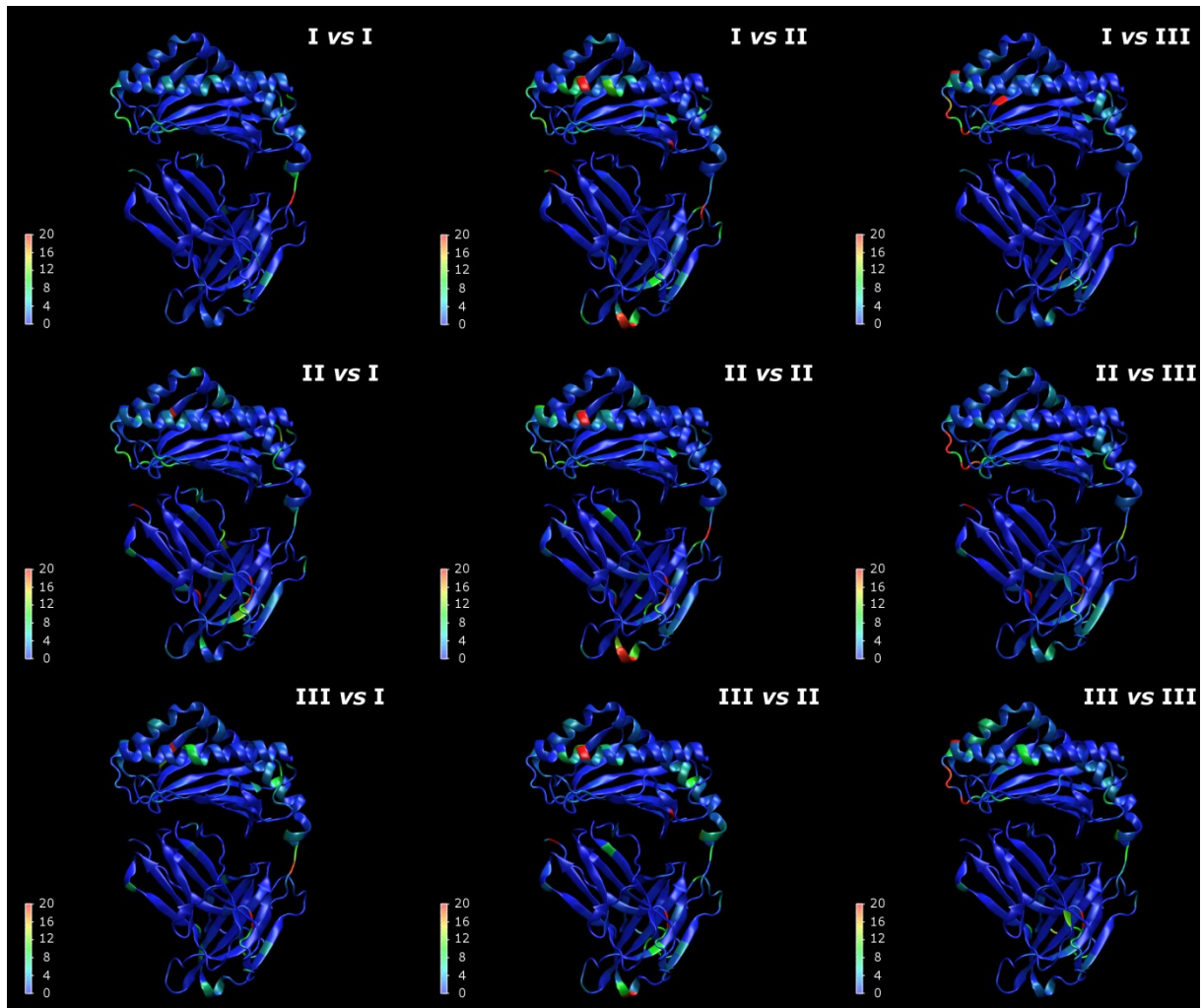
Annexe H 7 : H_aGAL vs M_aGAL



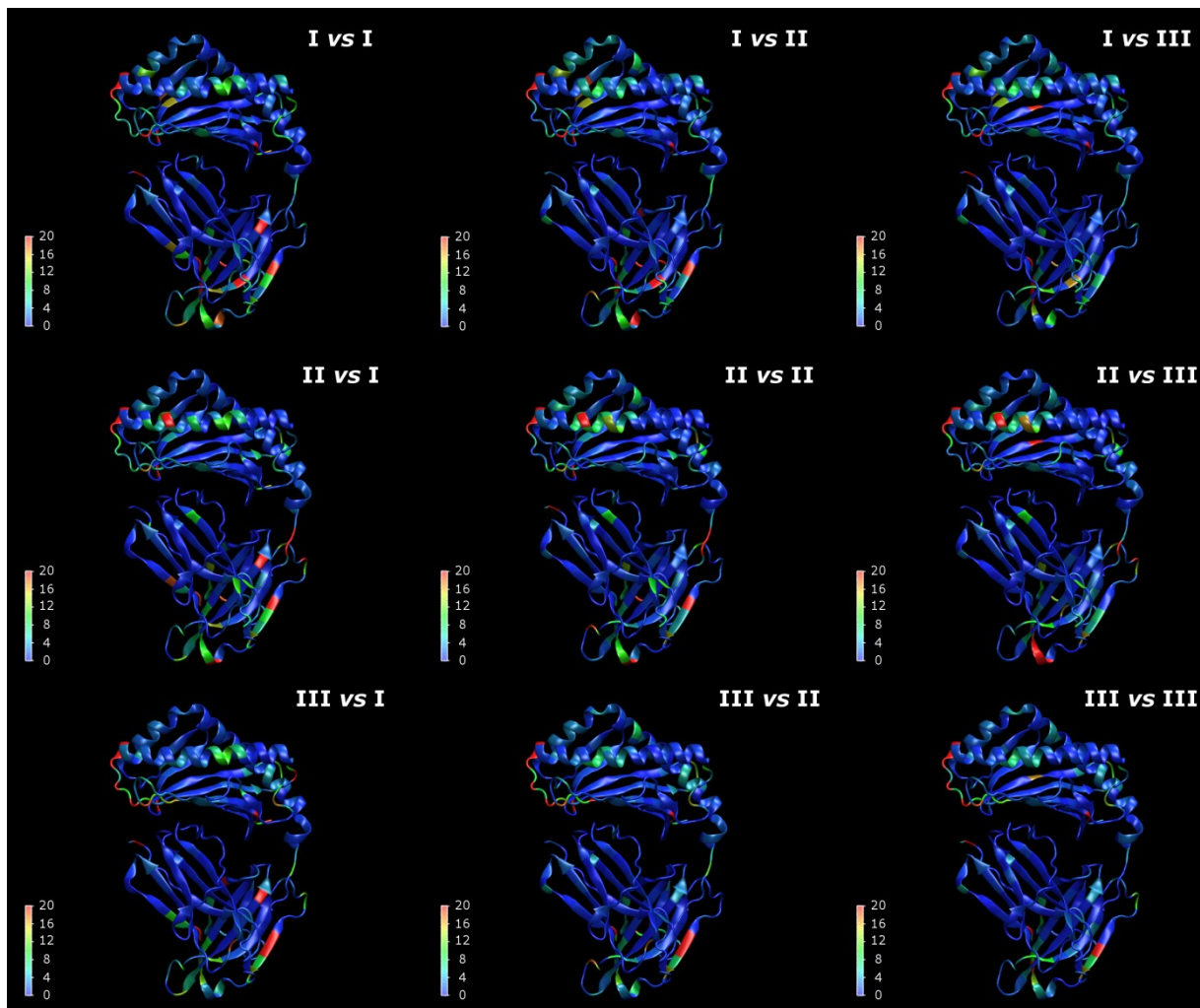
Annexe H 8 : H_CD1d vs H_LIP



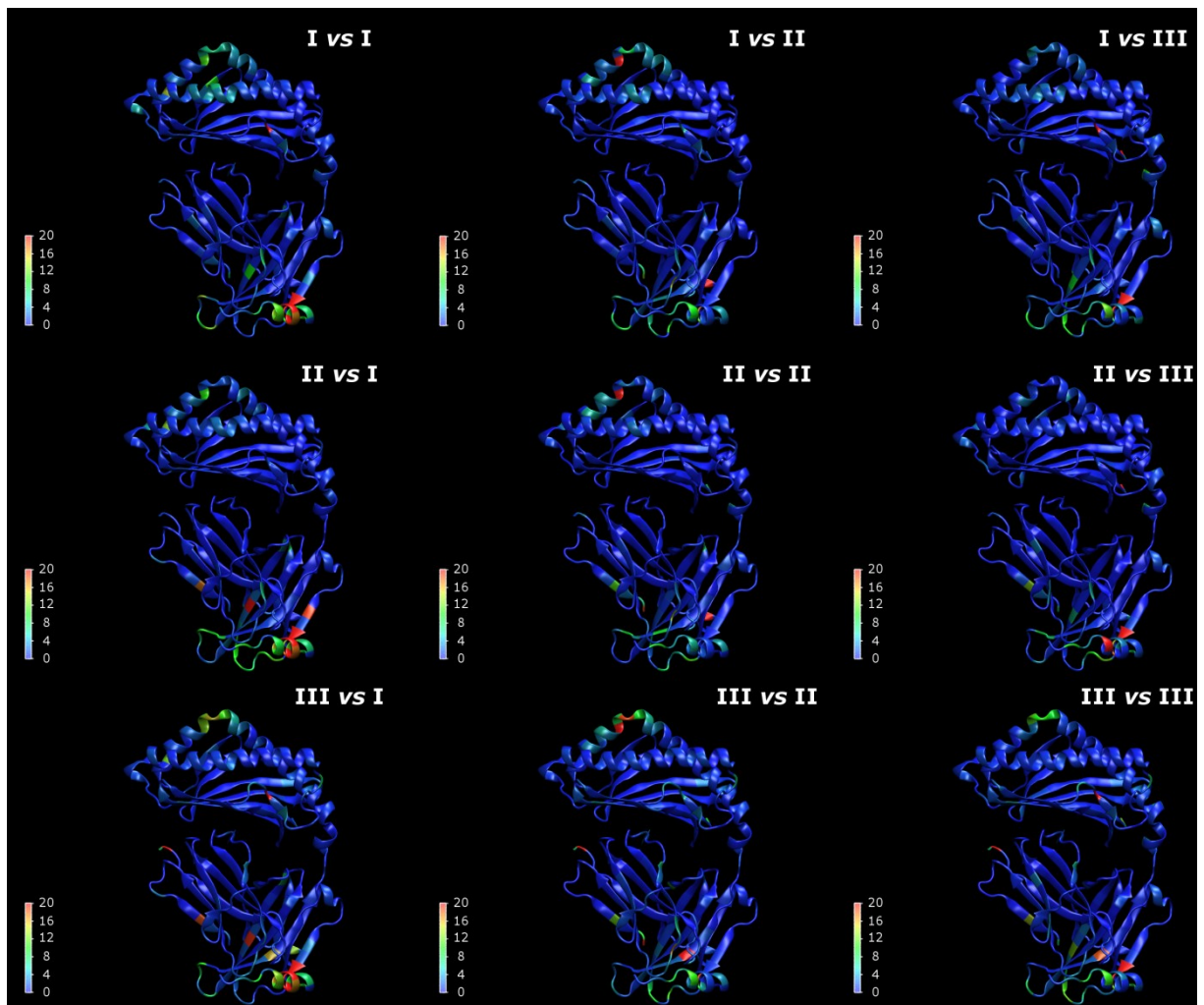
Annexe H 9 : H_NUaGAL vs M_NUaGAL



Annexe H 10 : H_OCH9 vs H_OCH



Annexe H 11 : H_OCH vs M_OCH



Annexe H 12 : M_aGAL vs M_AZOL