



Université de Reims  
Champagne-Ardenne



Università degli Studi della  
Basilicata

**THESE en cotutelle**  
**Présentée en vue de l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS**  
**CHAMPAGNE-ARDENNE ET DE L'UNIVERSITÀ DEGLI**  
**STUDI DELLA BASILICATA DE POTENZA**  
**Spécialité : BIOCHIMIE - MODELISATION**  
**MOLECULAIRE**

**Par**

**Nicolas BELLOY**

**ETUDE DE PEPTIDES AMYLOÏDOGENIQUES  
DERIVES DE LA TROPOELASTINE HUMAINE PAR  
SIMULATIONS NUMERIQUES**

**Soutenue publiquement le 19 juin 2009**

**JURY**

**Pr V Barone, SNS Università de Pisa, Rapporteur**

**Pr P Derreumaux, Université Paris 7 Denis Diderot, Rapporteur**

**Dr R Efremov, Institute of Bioorganic Chemistry, Examineur**

**Dr B Bochicchio, Università de Potenza, Examineur**

**Pr L Martiny, Université de Reims Champagne-Ardenne, co-directeur de thèse**

**Pr A Tamburro, Università de Potenza, co-directeur de thèse**

**Pr M Dauchez, Université de Reims Champagne-Ardenne, co-directeur de thèse**

---

## REMERCIEMENTS

Je ne peux débiter cette page sans avoir une pensée très émue pour le Professeur Antonio Mario Tamburro, disparu quelques jours seulement après la soutenance de thèse. Ma première rencontre avec lui doit dater de Septembre 2005 alors qu'il était à Reims en tant que professeur invité. Je l'avais alors croisé se dirigeant vers le laboratoire une pipe éteinte à la main, vestige de son passé de fumeur. Je garderai le souvenir d'un homme qui pouvait aussi bien vous parler de Science(s), que d'Histoire, de Musique ou des vins du monde. Mais il aura surtout consacré une grande partie de sa vie à nous décrire l'élastine et l'élasticité. Cette thèse ayant été réalisée en cotutelle avec son laboratoire à l'Université de Potenza, j'ai été amené à séjourner en Italie. Les mots me manquent pour décrire l'accueil qui m'a été fait. Bien que le sud de l'Italie soit parfois une joyeuse pagaille, il a pesé de tout son poids pour que je puisse être logé, me déplacer et travailler dans de bonnes conditions. Il a grandement contribué à la réussite de ce travail. Un grand merci à vous *Professore*.

Mes remerciements vont au Professeur Manuel Dauchez. Les liens tissés au cours de ces quatre années dépassent largement les relations doctorant - directeur de thèse, la simple collaboration scientifique. Père spirituel et maître, il m'a transmis son goût de la modélisation moléculaire et m'aura laissé une grande liberté dans ce travail, suggérant quand il le fallait les orientations à suivre. Qu'il reçoive ma profonde reconnaissance pour ces quatre années, pour sa bonne humeur, son caractère entropique qui m'aura souvent fait sourire, sa patience (...).

Je tiens à remercier le Professeur Laurent Martiny, co-directeur de cette thèse. Il aura tout d'abord su canaliser l'individu susmentionné mais m'aura aussi permis de ne jamais perdre de vue que le travail que nous faisons s'inscrit dans un cadre biologique et expérimental, inhérent au laboratoire auquel nous appartenons. Outre nos origines communes, j'ai apprécié les nombreuses discussions que nous avons eues allant de la science à des sujets bien plus légers mais néanmoins sérieux.

Je remercie les membres du jury, le Professeur Vincenzo Barone, le Professeur Roman Efremov, le Professeur Philippe Derreumaux et le Docteur Brigida Bochicchio qui ont acceptés de juger ce travail en faisant pour certains un long déplacement.

Je tiens à remercier plus particulièrement Brigida Bochicchio. Ses grandes qualités scientifiques et sa gentillesse auront contribué à la réussite de cette cotutelle. J'y associerai le Docteur Antonietta Pepe. J'espère que vous réussirez à poursuivre la route tracée jusque là par le Pr. Tamburro.

Un grand, grand merci à Marina Lorusso. Elle aura été bien plus que mon équivalent italien, une petite (par la taille) sœur scientifique. Tant de kilomètres parcourus ensemble, tant de fou rire partagés. Elle m'aura fait découvrir Potenza et l'Italie.

---

Je remercie toutes celles et ceux que j'ai pu rencontrer au cours de mon séjour en Italie. Alessandra, Simona, Monica, Iole, Rocchina, Valentina, Rocco, Francesco, Francesca, Maria-Rosaria ...

Ce travail n'aurait pas été possible sans le projet ROMEO et les personnes qui s'occupent du calculateur. Un grand merci à tous ceux qui développent le calcul scientifique à Reims.

Je souhaite remercier le Professeur Philippe Charpiot, ainsi que les membres de son laboratoire, qui m'ont accueilli à Marseille afin d'initier des tests biologiques sur les cellules musculaires lisses.

La poursuite dans cette voie n'aurait pas été possible sans Anthony Rusciani et Laurent Duca. Merci pour le temps que vous m'avez consacré à me former à des techniques qui ne me sont pas familières.

Un grand merci à Hervé, Dude et Flo, Laetitia et Ben pour leur bonne humeur et les moments extraordinaires partagés dans et en dehors du laboratoire. Et définitivement, je l'écris noir sur blanc, le trash ce n'est pas tout le temps la même chose !

Mes remerciements vont également à Lucie et Bénito. Du métabolisme aux voies de signalisation, que de chemin parcouru depuis le DEUG ! Je vous souhaite à tous les deux de réussir dans tout ce que vous entreprendrez tant sur le plan personnel que professionnel.

Merci à Stéphanie alias the Nanie, pour les discussions autour de la simulation et de l'élastine, les analyses, et pour sa gentillesse hors du commun. Elle n'est pourtant pas ménagée mais garde toujours le sourire.

Je remercie également tous les membres du laboratoire SiRMa qui de près ou de loin auront rendu ces années très agréables : Farid, Benoît et Gwenn, Jérôme et Jess, Stéphanie, Fred et Christelle, Nickétic (je n'oublie pas Clémence), Titof, Olivier et Marie-line, Stéphane, Emmanuelle, Laurent D., Hassan, Francine et Cath.

J'aurai ici une pensée pour Amel qui a un temps partagé notre bureau, pour toutes celles et ceux qui étaient présents ou seront passés par le laboratoire au cours de ces années (Elise, Christelle, Emilie, Charlotte, Géraldine, Brice, Odette, Francine ...).

Mes plus profonds remerciements vont à toute ma famille et plus particulièrement à mes parents. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours soutenu dans mes choix et mes orientations, même si au final tout ceci vous paraît très compliqué.

Je terminerai cette page en remerciant celle qui partage ma vie depuis maintenant plus de 3 ans, Claire.

## Sommaire

BUT DU TRAVAIL.....	1
INTRODUCTION .....	4
I. STRUCTURE DES PROTEINES :.....	5
1. Structure primaire :.....	5
2. Structure secondaire :.....	7
3. Structure tertiaire :.....	13
4. Structure quaternaire :.....	14
II. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE :.....	15
1. La tropoélastine :.....	16
1. Synthèse et assemblage :.....	17
2. Assemblage <i>in vitro</i> :.....	19
3. Assemblage <i>in vivo</i> :.....	20
4. Propriétés structurales :.....	21
5. Elasticité :.....	24
6. Cas particulier des exons 28 et 30 :.....	25
7. Peptides dérivés de l'élastine et concept de matrikines :.....	26
III. LES AMYLOÏDES .....	29
1. Généralités :.....	29
2. Propriétés structurales :.....	31
3. Formation des fibres amyloïdes :.....	33
4. Toxicité des amyloïdes :.....	35
MATERIELS ET METHODES .....	37
I. MODELISATION MOLECULAIRE :.....	38
1. Mécanique moléculaire :.....	39
2. Méthodes de Dynamique Moléculaire (DM) :.....	46
3. Analyse des trajectoires :.....	49
II. METHODES EXPERIMENTALES :.....	51
1. Synthèse chimique :.....	51
2. Chromatographie Liquide Haute Performance :.....	52
3. Dichroïsme circulaire :.....	52

---

4. Turbidimétrie :.....	57
RESULTATS.....	58
I. Etudes des peptides (XGGZG) <sub>1</sub> :.....	59
II. Etude des peptides (XGGZG) <sub>2</sub> : .....	66
III. Etude des peptides (XGGZG) <sub>3</sub> : .....	71
1. Dynamique moléculaire du peptide (VGGVG) <sub>3</sub> à 298 K :.....	71
2. Dynamique moléculaire du peptide (VGGVG) <sub>3</sub> à 333 K :.....	75
3. Simulation du peptide (VGGLG) <sub>3</sub> à 298 K : .....	77
4. Simulation du peptide (LGGVG) <sub>3</sub> à 298 K: .....	80
5. Simulation du peptide (LGGLG) <sub>3</sub> à 298 K :.....	82
IV. Etudes des exons 28 et 30 de la tropoélastine :.....	86
1. Simulation de 50 ns du peptide 30_17 contenant les 17 premiers acides aminés de l'exon 30 à 298 K : .....	86
2. Simulation de 25 ns de l'exon 30 à 298 K : .....	88
3. Simulation de 25 ns de l'exon 28 à 298 K :.....	92
V. Simulations de deux peptides VGGVG sur un feuillet $\beta$ virtuellement infini de poly(VGGVG) :97	
VI. Simulation de 27 chaînes de (VGGVG) <sub>3</sub> à 298 K en absence et présence de cholestérol : 102	
VII. Simulation de 2 peptides VGGLG contraints et comportement de l'eau au cours de la dynamique :.....	108
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	112
BIBLIOGRAPHIE.....	119

Figure 1 : a) Formule générale d'un acide aminé. b) Réaction de formation de la liaison peptidique. c) Forme mésomère de la liaison peptidique. ....	5
Figure 2 : Structure des 20 acides aminés. Par convention, l'oxygène est représenté en rouge, l'azote en bleu, le carbone en gris et l'oxygène en blanc, le soufre en jaune.....	6
Figure 3 : Localisation des angles dièdres $\phi$ , $\psi$ , $\omega$ . ....	7
Figure 4 : Isomérisation de la proline : a) Conformation <i>trans</i> . b) Conformation <i>cis</i> . ....	7
Figure 5 : a) Diagramme de Ramachandran et localisation des structures secondaires (d'après Petsko & Ringe, 2004). b) Tableau reprenant les valeurs des angles $\phi$ et $\psi$ pour les structures secondaires considérées.....	8
Figure 6 : a) Hélice $\alpha$ . b) Hélice $3_{10}$ . c) Hélice $\pi$ . d) Polyproline I. e) Polyproline II. Par souci de clarté les hydrogènes ne sont pas représentés.....	11
Figure 7 : a) Brins en feuillet $\beta$ antiparallèle, b) parallèle, c) mixte. Réseau de liaisons hydrogène dans les feuillets $\beta$ antiparallèles (d à gauche) et dans les feuillets $\beta$ parallèle (d à droite).....	12
Figure 8 : Structure tertiaire de la Green Fluorescence Protein résolue à 1,9 Å (GFP : code PDB : 1GFL). ....	14
Figure 9 : Structure quaternaire dimérique de la triose phosphate isomérase de levure (1WYI).....	14
Figure 10 : Organisation de la matrice extracellulaire. ....	15
Figure 11 : Organisation du gène de l'élastine. En bleu sont représentés les domaines KP, en rouge les domaines KA et en noir les domaines hydrophobes, en vert l'exon 36. ....	18
Figure 12 : Modèle de spirale $\beta$ proposé par Urry. Structures finales obtenues à la fin des trajectoires de dynamique moléculaire menées à 2 températures différentes (Tiré de (Li and Daggett 2002)). ....	22
Figure 13 : Modèle de coude glissant, ici illustré sur le pentapeptide GVGGL. Le coude $\beta$ est formé par la liaison Gly <sub>4</sub> [NH] - Gly <sub>1</sub> [C=O] (à gauche) ou par la liaison Leu <sub>5</sub> [NH] - Val <sub>2</sub> [C=O] (à droite) ; (Tiré de (DeBelle and Tamburro 1999)). ....	22
Figure 14 : structures chimiques des principaux résidus de pontage de la tropoélastine : Desmosine (A), isoDesmosine (B), déhydrolysino-norleucine (C). ....	23
Figure 15 : (A) Représentation d'un cliché de diffraction typique d'une structure en croix $\beta$ . (B) Modèle traduisant le cliché de diffraction observé, tiré de (Nelson and Eisenberg 2006). ...	31
Figure 16 : (A) Structure cristallographique du peptide GNNQQNY provenant de la protéine prion de levure Sup-35 (tiré de Nelson, 2005) (B) Modèle RMN de l'état solide du peptide A $\beta$ 1-40 (Tiré de Petkova, 2002) (C) Deux vues du modèle en hélice $\beta$ proposé par Perutz (2002), tiré de (Harrison, Sharpe et al. 2007) (D) Modèle d'un filament de superoxyde dismutase mutante humaine 1OZU (Tiré de Nelson & Eisenberg, 2006). ....	32
Figure 17 : Etapes et intermédiaires conduisant à la formation de fibres amyloïdes, tiré de (Harrison, Sharpe et al. 2007). ....	33
Figure 18 : Modèle de conversion des monomères et assemblage des fibres amyloïdes, tiré de (Kelly 2000). ....	34
Figure 19 : Coordonnées internes pour les interactions liantes : r liaisons de valences, $\theta$ angles de valences, $\Phi$ angles dièdres valenciels, $\phi$ angles impropres gouvernés par l'angle $\alpha$ hors du plan. ....	40
Figure 20 : Différence entre le cutoff et la distance prenant en compte les voisins de l'atome considéré. Les paires listées sont autorisées à se déplacer au-delà du cutoff sans influencer sur la conservation de l'énergie.....	42

Figure 21 : Potentiel de van der Waals avec ou sans la fonction <i>switch</i> .....	43
Figure 22 : Effet de la fonction <i>shift</i> sur un potentiel électrostatique.....	43
Figure 23 : Principe des conditions périodiques aux limites.....	45
Figure 24 : Onde plane monochromatique sinusoïdale.....	53
Figure 25 : (A) Direction de propagation de la lumière naturelle (B) de la lumière polarisée verticalement (C) de la lumière polarisée horizontalement. (D1) Champ électrique résultant des deux vecteurs équidistants $E_D$ et $E_G$ (D2) Activité optique $\alpha$ et ellipticité $\theta$ de la lumière polarisée dans un plan, émergeant d'un milieu optiquement actif.....	53
Figure 26 : Principe optique du dichroïsme circulaire, différence d'absorbance $\Delta A$ entre les lumières polarisées circulairement à gauche $A_G$ et à droite $A_D$ .....	54
Figure 27 : (a) Orientation des transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ dans la liaison peptidique (b) Spectres caractéristiques de protéines en hélice (rouge, myoglobine) en feuillet $\beta$ (bleu, concanavaline A ; cyan, beta-lactoglobuline), polyproline II (orange, collagène). Tiré de (Whitmore and Wallace 2008).....	55
Figure 28 : Histogrammes des rayons de giration pour les peptides a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.....	60
Figure 29 : Rayon de giration au cours des 5 dernières nanosecondes de la trajectoire. a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.....	60
Figure 30 : Distance bout à bout mesurée au cours des 5 dernières ns de trajectoire. a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.....	61
Figure 31 : Diagrammes de Ramachandran du résidu en position 4 (A) et structuration en polyproline II (B), pour les peptides VGGVG (a), VGGLG (b), LGGVG (c), LGGLG (d).....	62
Figure 32 : Equilibre de conformations pour le peptide VGGVG illustrant le phénomène de coude glissant. La population de chaque conformation est indiquée.....	63
Figure 33 : Structures représentatives des 10 premiers clusters pour chaque peptides a) (VGGVG), b) (VGGLG), c) (LGGVG), d) (LGGLG).....	65
Figure 34 : Rayon de giration mesuré pour chacun des peptides XGGZG.....	66
Figure 35 : a) Résidus en polyproline II au cours des trajectoires. b) nombre d'observation pour chaques résidus. c) nombre total de résidus simultanément en PPII. A) (VGGVG) <sub>2</sub> , B) (VGGLG) <sub>2</sub> , C) (LGGVG) <sub>2</sub> , D) (LGGLG) <sub>2</sub> .....	68
Figure 36 : Structures représentatives des 5 premières famille de conformation pour a) (VGGVG) <sub>2</sub> , b) (VGGLG) <sub>2</sub> , c) (LGGVG) <sub>2</sub> , d) (LGGLG) <sub>2</sub> .....	69
Figure 37 : a) Rayon de giration et b) distance mesurée bout a bout au cours de la simulation du peptide (VGGVG) <sub>3</sub> à 298 K.....	71
Figure 38 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, a) quantification et b) résidus simultanément dans cette conformation.....	72
Figure 39 : Structures secondaires observées, détail entre 40 et 47 ns, analyse des liaisons hydrogène. .....	74
Figure 40 : Structures représentatives des conformations observées au cours de la dynamique du peptide (VGGVG) <sub>3</sub> à 298K.....	74
Figure 41 : Rayon de giration et distance mesurée bout a bout au cours de la simulation du peptide (VGGVG) <sub>3</sub> à 333 K.....	75
Figure 42 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.....	76

Figure 43 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.....	76
Figure 44 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout au cours de la simulation du peptide (VGGLG) <sub>3</sub> à 298 K.....	77
Figure 45 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.....	77
Figure 46 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.....	79
Figure 47 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.....	80
Figure 48 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.....	80
Figure 49 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.....	81
Figure 50 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.....	82
Figure 51 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.....	82
Figure 52 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.....	83
Figure 53 : Structures représentatives des cinq premiers clusters du peptide (LGGLG) <sub>3</sub> .....	84
Figure 54 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.....	86
Figure 55 : Résidus en polyproline II et proportion correspondante.....	87
Figure 56 : Analyses des structures secondaires observées au cours de la trajectoire. ....	88
Figure 57 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.....	89
Figure 58 : Résidus en polyproline II et proportion correspondante.....	90
Figure 59 : Analyse des structures secondaires de l'exon 30 lors d'une simulation à 298 K. ....	91
Figure 60 : Familles de conformation occupées lors de la dynamique.....	91
Figure 61 : Structures représentatives des 10 premières familles de conformation.....	92
Figure 62 : rayon de giration et distance mesurée bout à bout.....	93
Figure 63 : résidus en polyproline II et proportion correspondante.....	93
Figure 64 : famille de conformations occupées lors de la dynamique.....	95
Figure 65 : structure représentatives des 10 premières familles de conformation.....	95
Figure 66 : Système de départ pour une simulation des deux peptides VGGVG au voisinage d'un plancher $\beta$ virtuellement infini. ....	97
Figure 67 : Surface accessible au solvant calculée pour le peptide VGGVG seul (a) et le peptide simulé en présence du feuillet $\beta$ (b). ....	98
Figure 68 : Trajectoire suivi par le centre de masse du peptide au cours des 50 ns de dynamique. ...	98
Figure 69 : Position moyenne occupée par le peptide 1 au cours de la trajectoire (vue à 90° selon y). ....	99
Figure 70 : Résidus du peptide 1 en PPII au cours de la trajectoire.....	99
Figure 71 : Carte de Ramachandran des résidus a) G <sup>2</sup> , b) G <sup>3</sup> , c) V <sup>4</sup> .....	100
Figure 72 : Intermédiaires observés au cours de la dynamique sans cholestérol. ....	103
Figure 73 : Evolution du nombre de liaisons hydrogène peptide-peptide au cours de la trajectoire sans cholestérol. ....	103
Figure 74 : Nombre de contacts peptide-peptide au cours de la dynamique sans cholestérol et images de la trajectoire au point A, B et C.....	104
Figure 75 : Surface accessible au solvant au cours de la trajectoire sans cholestérol.....	105
Figure 76 : Nombre de contacts peptide-peptide au cours de la dynamique avec cholestérol. ....	105

Figure 77 : Nombre de contact peptide-peptide mettant en jeu les chaines latérales des résidus valine en absence de cholestérol. ....	106
Figure 78 : Nombre de contact peptide-peptide mettant en jeu les chaines latérales des résidus valine en présence de cholestérol.....	106
Figure 79 : contenu en conformation $\beta$ au cours des trajectoires a) sans et b) avec cholestérol. ....	107
Figure 80 : a) Densité d'occupation de l'espace inter-peptidique par les molécules d'eau au cours de la trajectoire, b) c) d) vues comportant les molécules d'eau et liaisons hydrogène e) f) vue à $180^\circ$ .....	108
Figure 81 : Liaisons hydrogène formées entre les peptides et les molécules d'eau à moins de $4 \text{ \AA}$ des deux peptides.....	109
Figure 82 : Densité d'occupation calculée à partir de la trajectoire et superposition au modèle initiale proposé par Tamburro et collaborateurs. ....	109
Figure 83 : a) Nombre de liaison H formées entre l'eau et les peptides au cours de la trajectoire dans l'espace inter-peptidique b) distribution correspondante. ....	110

Tableau 1 : Valeurs des angles dièdres des résidus centraux des différents type de coudes $\beta$ .....	13
Tableau 2 : Exemple de polypeptides et pathologies associés à des dépôts amyloïdes.....	30
Tableau 3 : code couleur correspondant aux structures secondaires sous VMD. ....	51
Tableau 4 : Statistiques des rayons de giration et distances mesurées bout à bout (bab) .....	59
Tableau 5 : Attribution des coudes $\beta$ pour chacun des peptides XGGZG. ....	62
Tableau 6 : Attribution des coudes $\beta$ pour chacune des répétitions (XGGZG) <sub>2</sub> . ....	67
Tableau 7 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	73
Tableau 8 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	76
Tableau 9 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	78
Tableau 10 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	81
Tableau 11 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	83
Tableau 12 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	87
Tableau 13 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	90
Tableau 14 : Attribution des coudes $\beta$ au cours de la trajectoire. ....	94

---

# BUT DU TRAVAIL

---

L'élastine reste à l'heure actuelle une molécule difficile à étudier par les méthodes expérimentales. Les outils de modélisation moléculaire se révèlent alors très utiles pour dégager des informations structurales et dynamiques tant à l'échelle atomique qu'à l'échelle du résidu et du peptide.

L'étude par bloc de la tropoélastine a ouvert un champ d'application très large permettant d'envisager notamment l'utilisation de motifs d'élastine comme biomatériau ou son implication dans des voies de signalisations cellulaires dans des processus pathologiques. La mise en évidence d'un comportement amyloïde des séquences du type XGGZG, X, Z=Val, Leu, a encore élargi les facettes de la molécule mais soulève aussi de nouvelles hypothèses quant à son rôle au cours du vieillissement. La caractérisation expérimentale des exons 28 et 30 de la tropoélastine nous a incités à nous focaliser sur le motif XGGZG par une approche de dynamique moléculaire. Ce travail a consisté dans un premier temps à étudier le motif initial XGGZG avec toutes les permutations possibles de résidus valine et leucine. L'objectif est alors d'évaluer le comportement des peptides isolés en solution, de vérifier le comportement caractéristique de la tropoélastine en coude glissant, phénomène qui est de première importance dans les mécanismes d'élasticité, et de comparer si possible avec des données expérimentales comme le dichroïsme circulaire ou la turbidimétrie. De plus, sur la base d'un modèle tridimensionnel du peptide VGGLG proposé par Del Mercato et coll (Del Mercato, Pompa et al. 2007), nous avons simulé ce système en appliquant des contraintes sur le peptide afin d'étudier le comportement de molécules d'eau autour de ce peptide. En effet, le modèle proposé ne comporte que 10 molécules d'eau, nous avons ainsi voulu vérifier la validité d'un tel modèle.

La suite de ce travail était d'étudier le comportement de ces mêmes peptides en répétant le motif consensus (2 et 3 fois), les peptides étudiés faisant alors 10 ou 15 résidus. L'objectif était alors d'évaluer l'impact de l'allongement de la séquence sur la dynamique du peptide et de se rapprocher des conditions nécessaires (une vingtaine de résidus) mais non suffisantes à l'obtention d'agrégats de type amyloïde. Sur la base des résultats que nous avons obtenus, il a été décidé d'effectuer des simulations d'un système contenant 27 copies du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> en présence ou non de cholestérol, facteur favorisant l'apparition *in vitro* d'agrégats de type amyloïde.

Notre attention s'est aussi portée sur l'étude des exons 28 et 30 entiers tout en sachant que la tropoélastine appartient à la famille des protéines peu structurées, que pour de nombreux exons les structures observées sont locales, transitoires et en équilibre. De plus, le repliement *in silico* de tels exons n'apparaît pas envisageable. Enfin, la taille même des exons (24 et 25 résidus respectivement) approche les limites des méthodes de dynamique moléculaire employées pour des systèmes étendus.

L'agrégation des peptides quel qu'ils soient, inclue l'apparition d'un noyau stable présentant une structuration en feuillettes  $\beta$ . Dans le but d'évaluer l'effet d'un environnement  $\beta$  sur la dynamique du peptide VGGVG, nous avons réalisé une simulation de ce peptide en présence d'un plancher virtuellement infini de poly(VGGVG).

D'un point de vue biologique, nous avons voulu étudier l'impact d'agrégats formés à partir de l'exon 30 sur la prolifération de cellules musculaires lisses issues d'aortes humaines. En effet, quelles voies de signalisation pourraient être mises en jeu au cours d'une agrégation hypothétique d'élastine dans des cellules en contact permanent avec cette macromolécule ? Cette partie du travail n'a pas permis d'obtenir de résultats concluants et fait surtout l'objet de perspectives.

---

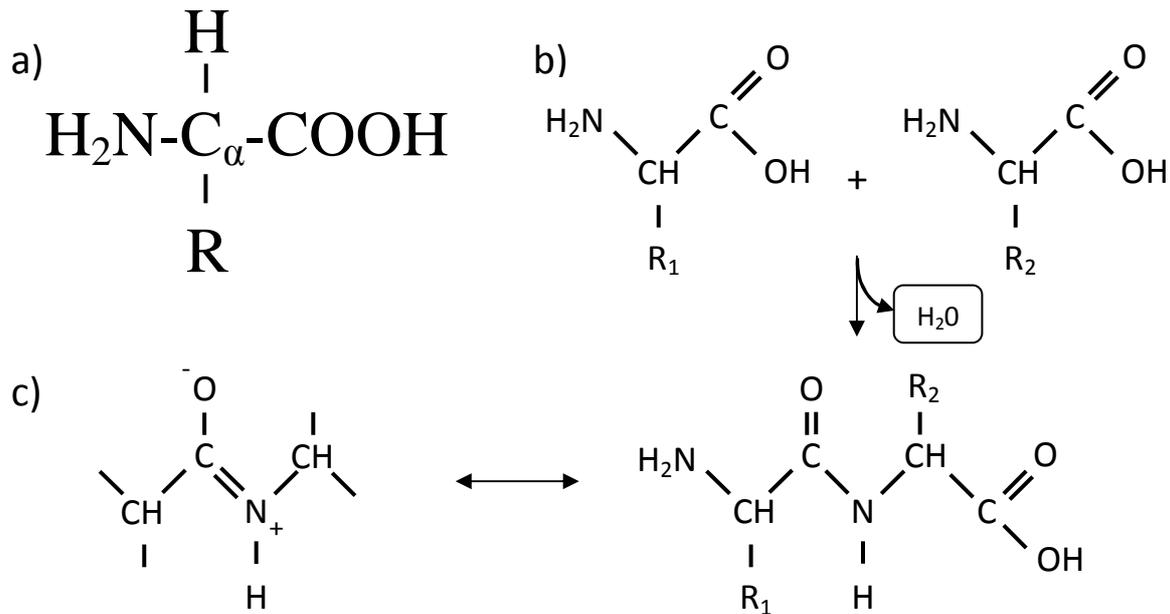
# INTRODUCTION

---

# I. STRUCTURE DES PROTEINES :

## 1. Structure primaire :

La structure primaire (ou séquence) des protéines correspond à l'enchaînement successif des acides aminés (ou résidus) reliés entre eux par une liaison covalente, la liaison peptidique. La formule générale est la suivante :

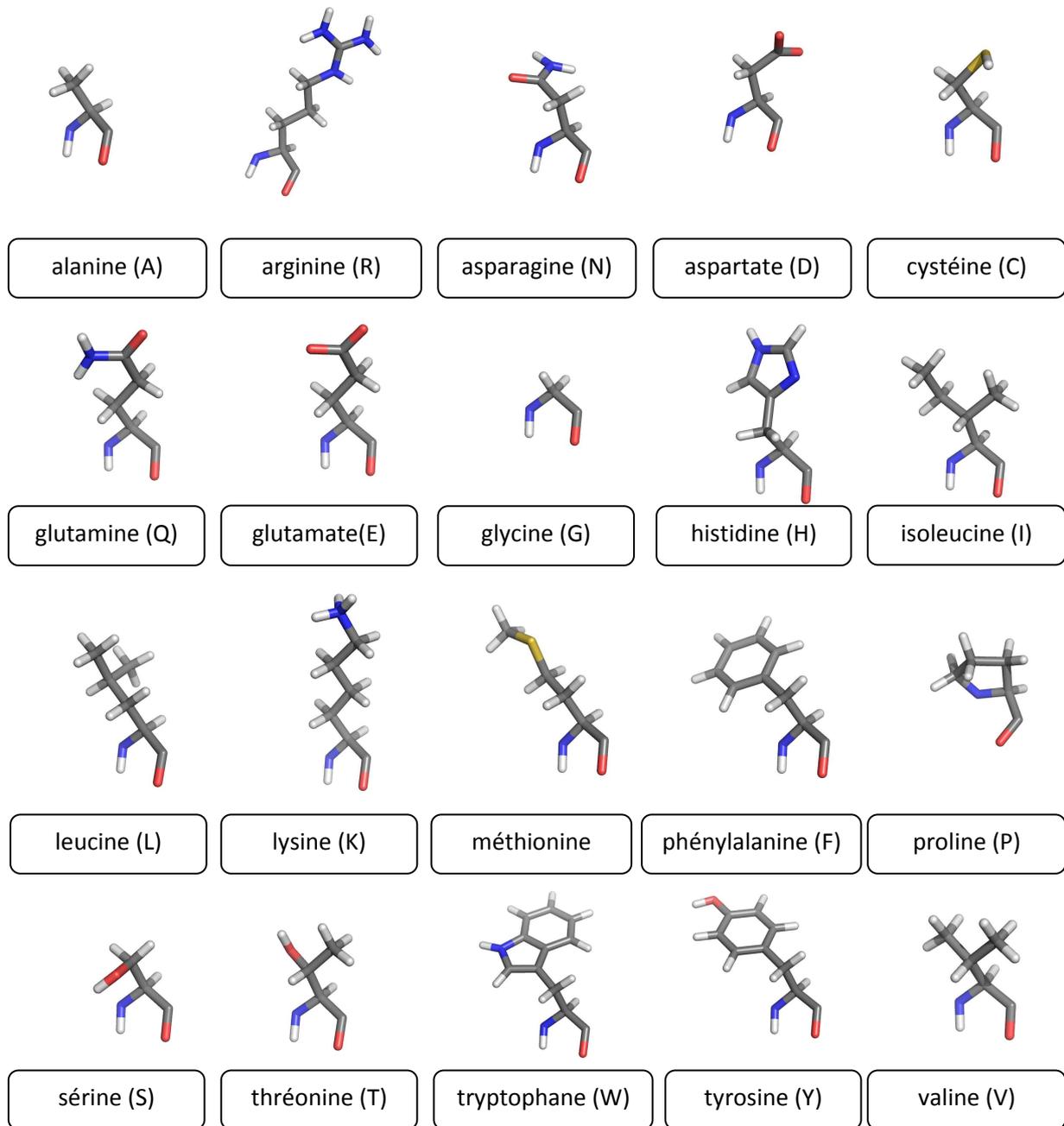


**Figure 1 : a) Formule générale d'un acide aminé. b) Réaction de formation de la liaison peptidique. c) Forme mésomère de la liaison peptidique.**

La formation de la liaison peptidique résulte de la réaction entre la fonction acide carboxylique du premier résidu et la fonction amine du deuxième résidu en libérant au passage une molécule d'eau.

Les acides aminés sont au nombre de vingt (Figure 2) et diffèrent par la nature de la chaîne latérale R portée par le C<sub>α</sub> : apolaire, polaire, ionisable ou non. Par convention, l'écriture d'une séquence protéique se fait dans le sens N-terminal vers C-terminal.

La résonance entre la double liaison C=O et la liaison simple C-N confère à la liaison peptidique un caractère partiel (~40%) de liaison double et un aspect plan pour les six atomes qui la compose.

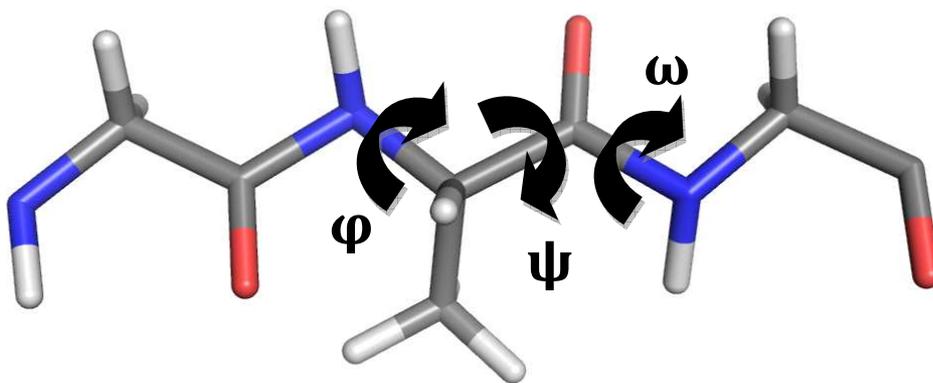


**Figure 2 : Structure des 20 acides aminés. Par convention, l'oxygène est représenté en rouge, l'azote en bleu, le carbone en gris et l'oxygène en blanc, le soufre en jaune.**

## 2. Structure secondaire :

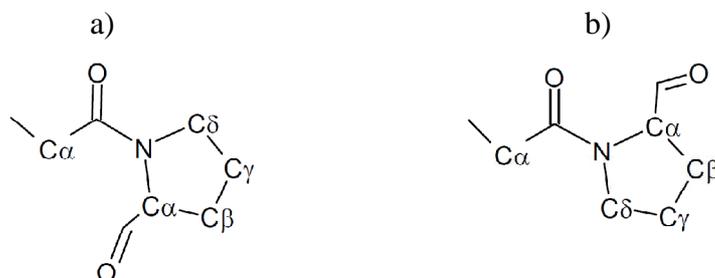
### a. Introduction :

La structure secondaire décrit le repliement local des résidus au sein de la séquence protéique. Cet agencement se fait via les rotations des acides aminés autour de la liaison peptidique, résulte d'interactions stérique et électrostatique, tout en étant stabilisé par des liaisons hydrogène. On définit autour de la liaison peptidique les angles dièdres  $\varphi$  (C-N-C $\alpha$ -C),  $\psi$  (N-C $\alpha$ -C-N), et  $\omega$  (C $\alpha$ -C-N-C $\alpha$ ) (Figure 3).



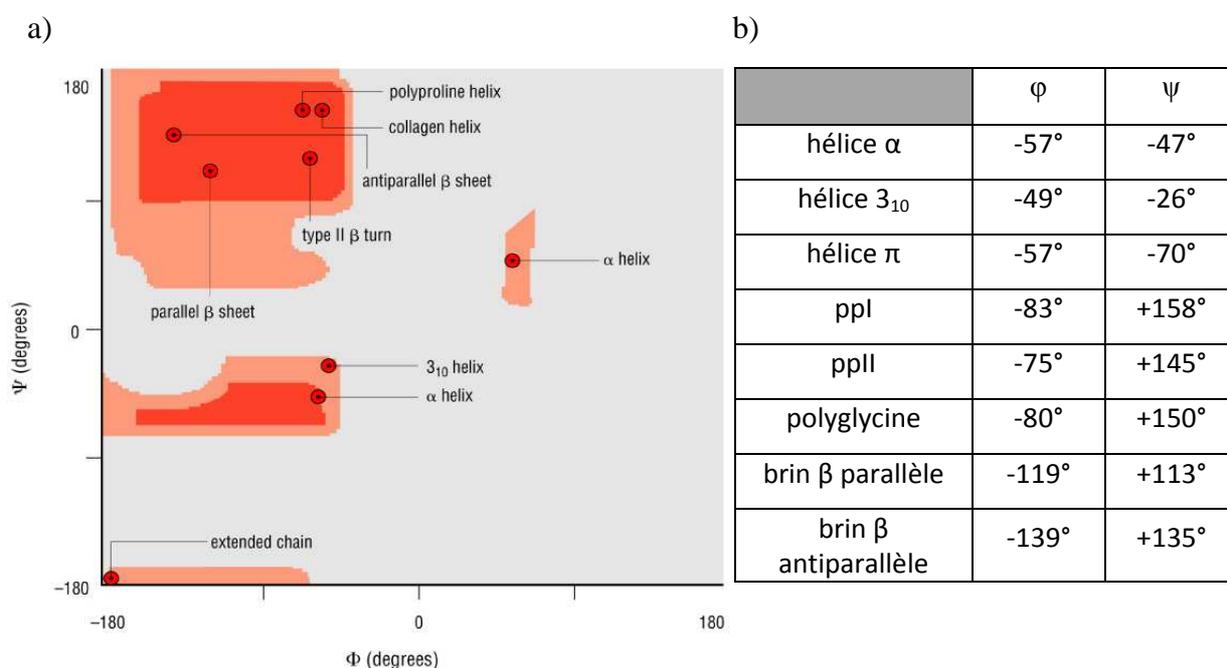
**Figure 3 : Localisation des angles dièdres  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$ .**

La liaison peptidique étant plane,  $\omega$  ne peut prendre que des valeurs proches de  $+180^\circ$  ; on parlera alors de configuration *trans*. Cette conformation est la plus favorable d'un point de vue énergétique de par la moindre répulsion entre les groupes portés par le C $\alpha$ . Dans de rares cas,  $\omega$  adopte une valeur proche de  $0^\circ$ , on parlera alors de configuration *cis*. Le cas de la proline est un peu particulier (Figure 4) car la liaison C $\alpha$ -N fait partie du cycle et les configurations *cis* et *trans* sont proches en énergie. Ainsi on retrouve environ 6% de *cis*-proline dans les protéines globulaires.



**Figure 4 : Isomérisation de la proline : a) Conformation *trans*. b) Conformation *cis*.**

La rotation autour des angles  $\varphi$  et  $\psi$  s'effectue librement (de  $-180^\circ$  à  $+180^\circ$ ) mais seuls quelques couples de valeurs sont explorés notamment en raison de l'encombrement stérique dû aux chaînes latérales défavorable en énergie. La glycine constitue à ce titre un cas à part car la nature de sa chaîne ( $R=H$ ) autorise une plus grande latitude et donc une grande flexibilité. La représentation en deux dimensions de  $\varphi$  en fonction de  $\psi$  définit un diagramme de Ramachandran (Ramachandran, Ramakrishnan et al. 1963) (Figure 5). Principalement 2 zones sont explorées et permettent de décrire la majeure partie des conformations adoptées par les résidus dans les protéines : les hélices  $\alpha$  ( $\varphi=-47^\circ$ ) et les feuillets  $\beta$  ( $\varphi=+113^\circ$  ou  $+135^\circ$ ).



**Figure 5 : a) Diagramme de Ramachandran et localisation des structures secondaires (d'après Petsko & Ringe, 2004). b) Tableau reprenant les valeurs des angles  $\varphi$  et  $\psi$  pour les structures secondaires considérées.**

Les différents niveaux d'organisation d'une protéine requièrent un ensemble d'interactions faibles permettant la stabilisation de l'édifice protéique aux niveaux secondaires, tertiaires et quaternaires. Seul le pont disulfure constitue une liaison covalente forte qui s'établit par oxydation des groupements thiols de deux cystéines lors du repliement d'une protéine (structure tertiaire) ou au cours de l'association de sous-unités protéiques.

#### ✓ Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont des liaisons non covalentes résultant de la mise en commun d'un atome d'hydrogène lié de façon covalente à un groupement donneur D fortement

électronégatif et un atome accepteur A. La longueur de la liaison est définie par la distance entre les centres des atomes D et A et est généralement comprise entre 2.7 et 3.1 Å. De plus, l'angle formé entre les trois atomes doit être supérieur à 120°, l'interaction (donc l'énergie) étant maximale lorsque les trois atomes sont colinéaires. Dans les protéines, D et A sont principalement les atomes d'azote et d'oxygène intramoléculaires (parfois l'atome de soufre) mais aussi les oxygènes de l'eau.

Les liaisons hydrogène sont d'une grande importance dans les structures secondaires en stabilisant et favorisant l'établissement de certaines conformations (boucles, hélices, feuilletts ...). D'autre part, les protéines établissent de nombreuses liaisons hydrogène avec les molécules d'eau qui les entourent ce qui a pour effet d'augmenter leur solubilité. Bien que de faible énergie (12 kJ/mol), les liaisons hydrogène contribuent à la stabilité des protéines grâce au nombre très important des liaisons qui peuvent s'établir.

#### ✓ Interactions ioniques

Ces interactions peuvent se produire entre des chaînes latérales ayant des charges opposées : par exemple entre un groupement carboxylique ( $-\text{COO}^-$ ) d'un résidu d'acide glutamique et un groupement amine ( $-\text{NH}_3^+$ ,  $=\text{NH}_2^+$ ) d'un résidu de lysine. La localisation d'un résidu chargé dans le cœur de la protéine n'est pas énergétiquement favorable, les résidus chargés sont donc souvent retrouvés à la surface de la molécule. Ainsi, les interactions ioniques sont souvent mises en jeu dans les interactions protéines-protéines.

#### ✓ Interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes apparaissent lorsque les chaînes latérales non polaires de certains acides aminés (valine, leucine par exemple) fuient un environnement polaire. Elles tendent à s'associer à l'intérieur de la structure pour former un cœur hydrophobe en minimisant leurs contacts avec les molécules polaires et sont donc énergétiquement favorables. En présence de résidus hydrophobes, l'eau s'organise autour et forment des clathrates qui sont des cages où le réseau de liaisons hydrogène est optimisé.

#### ✓ Interactions de van der Waals

Ces interactions regroupent à la fois des forces de répulsion et d'attraction. Lorsque deux atomes se rapprochent, une attraction réciproque se manifeste entre le noyau de l'un et les

électrons de l'autre jusqu'à une certaine distance. Au delà de cette limite, l'encombrement électronique et les force de répulsion entre charge de même signe vont à l'encontre de cette attraction, il s'établit alors un équilibre. Cette distance d'équilibre est caractéristique de chaque atome : il s'agit du rayon de van der Waals.

#### **a. Hélices :**

L'hélice  $\alpha$  est définie pour le couple  $\varphi=-57^\circ$   $\psi=-47^\circ$  (Figure 6a). La chaîne polypeptidique s'enroule en une hélice avec un pas à droite. Cette hélice possède 3,6 résidus par tour avec une translation de 1,50 Å. Ces caractéristiques permettent l'établissement de liaisons hydrogène C=O H-N entre les résidus  $i$  et  $i+4$  qui rendent l'hélice très stable.

L'hélice  $\alpha$  gauche est parfois retrouvée dans de courts segments contenant notamment des glycines. Les valeurs des angles dièdres ( $\varphi=-57^\circ$   $\psi=-47^\circ$ ) sont en effet dans une zone du diagramme de Ramachandran peu accessible aux autres résidus. Cet enroulement provoque par ailleurs une trop grande proximité entre les chaînes latérales et les C=O de la chaîne principale.

L'hélice  $3_{10}$  est définie pour des rotations  $\varphi=-49^\circ$   $\psi=-26^\circ$  (Figure 6b), qui induisent une hélice présentant 3 résidus par tour et une translation, de 2 Å par résidu. Une liaison hydrogène ferme un cycle comprenant 10 atomes entre les résidus  $i$  et  $i+3$ . Cette hélice est moins stable que l'hélice  $\alpha$  et est donc moins fréquente.

Pour des valeurs d'angles  $\varphi=-57^\circ$   $\psi=-70^\circ$ , on parlera d'hélice  $\pi$  (Figure 6c). Ce type d'hélice est très compact avec 4,4 résidus par tour, 1,15 Å de translation par résidu et des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les résidus  $i$  et  $i+5$  venant fermer un cycle comprenant 16 atomes.

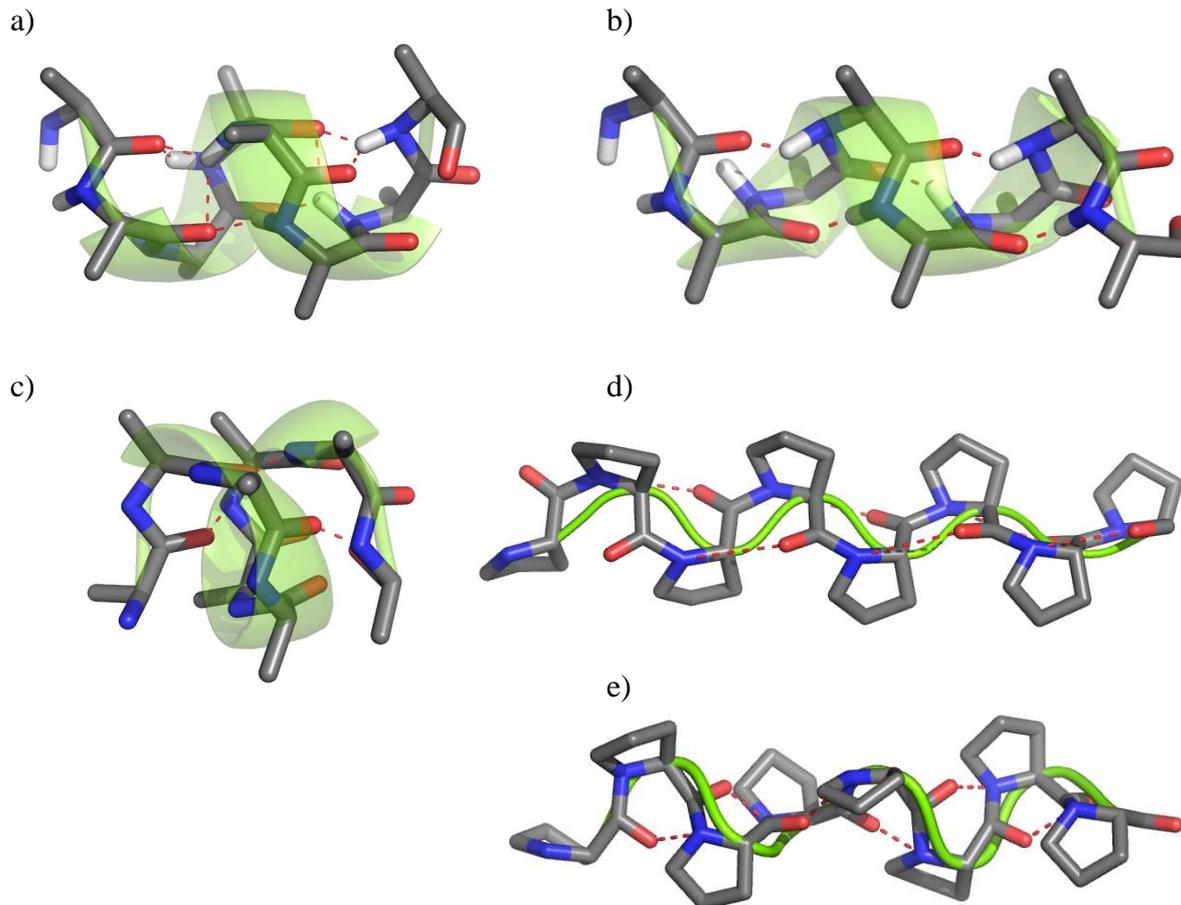
Une succession de prolines peut donner lieu à 2 types de structures secondaires hélicoïdales particulières, la polyproline I et la polyproline II.

La polyproline I (Figure 6d) est une hélice droite de *cis*-proline comprenant 3,3 résidus par tour avec des angles dièdres  $\varphi=-83^\circ$  et  $\psi=+158^\circ$ . Elle est favorisée par les solvants organiques.

La polyproline II (Figure 6e) correspond à une structure composée de 3 résidus par tour avec des angles  $\varphi=-75^\circ$  et  $\psi=+145^\circ$  et des résidus en conformation *trans*. On la retrouve dans les

protéines fibreuses telles que le collagène et c'est une structure souvent mise en évidence dans les expériences de dichroïsme circulaire sur la tropoélastine. Cette conformation est favorisée par les milieux aqueux et ne permet pas de liaisons hydrogène entre les résidus. Cependant l'eau assure un pontage entre ces derniers et stabilise l'ensemble.

Enfin, un polypeptide composée de glycine peut adopter une conformation polyglycine avec des angles  $\varphi = -80^\circ$  et  $\psi = +150^\circ$ .



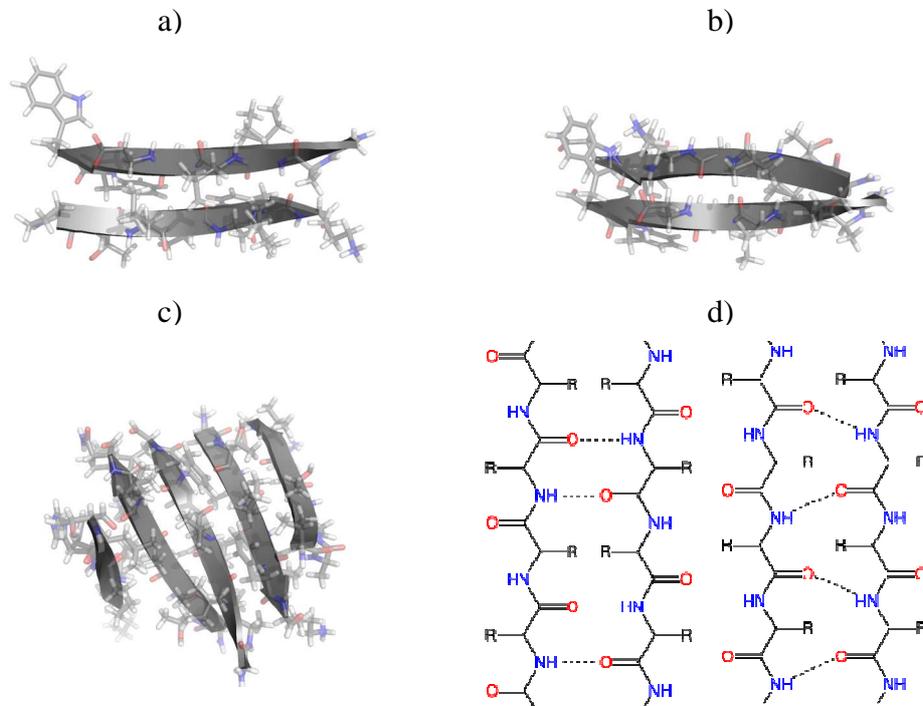
**Figure 6 : a) Hélice  $\alpha$ . b) Hélice  $3_{10}$ . c) Hélice  $\pi$ . d) Polyproline I. e) Polyproline II. Par souci de clarté les hydrogènes ne sont pas représentés.**

***b. Brins :***

Les brins  $\beta$  sont des structures étendues. Un seul brin ne peut pas former de liaison hydrogène intra-chaîne ce qui le rend peu stable. L'association de plusieurs brins va donner un feuillet  $\beta$ . Celui-ci sera parallèle ( $\varphi = -119^\circ$  ;  $\psi = +113^\circ$ ) si les chaînes sont orientées dans le même sens ou antiparallèle ( $\varphi = -139^\circ$  ;  $\psi = +135^\circ$ ) si les chaînes sont dans des sens opposés (Figure 7, A et B). Cette association va permettre la formation des liaisons hydrogène entre

carbonyle peptidique et amine du brin adjacent qui vont rendre la structure stable. L'organisation des liaisons hydrogène sera différente dans chaque cas (Figure 7 D)

Dans les protéines, on parle parfois de feuillets mixtes composés d'une combinaison de brins orientés parallèlement et antiparallèlement (Figure 7 C).



**Figure 7 : a) Brins en feuillet  $\beta$  antiparallèle, b) parallèle, c) mixte. Réseau de liaisons hydrogène dans les feuillets  $\beta$  antiparallèles (d à gauche) et dans les feuillets  $\beta$  parallèle (d à droite).**

### c. Coudes :

Les hélices et les feuillets constituent des éléments de structure secondaire régulière car plusieurs résidus successifs ont la même conformation ; dans le cas contraire, on parle de structure irrégulière. Ces conformations irrégulières permettent un changement de direction de la chaîne polypeptidique et permettent de relier entre-elle les structures régulières. Lorsque ce changement se fait sur quelques résidus, on parlera de coudes ou de *turns*. On distingue les coudes  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\pi$ , qui sont retrouvés respectivement sur 2, 3, 4, 5 et 6 résidus.

Le coude  $\beta$  représente le type majoritaire dans les protéines. Il permet souvent de connecter deux brins  $\beta$  antiparallèles. Ils sont définis selon plusieurs critères. La distance entre les  $C\alpha$  des résidus  $i$  et  $i+3$  doit être inférieure à 7 Å et les deux résidus centraux ( $i+1$  et  $i+2$ ) ne doivent pas avoir des critères de résidus en hélice (Wilmot and Thornton 1990) Selon des critères d'angles  $\varphi$  et  $\psi$  sur les résidus centraux, 9 types des coudes sont définis (Hutchinson

and Thornton 1994) : I, I', II, II', VIa1, VIa2, VIb, VIII et IV (Tableau 1). Les résidus qui n'intègrent pas la classification dans un des huit premiers types de coude sont inclus dans le type IV.

Outre l'introduction d'un changement de direction de la chaîne polypeptidique, les coudes  $\beta$  ont un rôle majeur dans les mécanismes de reconnaissance moléculaire et le repliement des protéines.

Type	$\varphi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\varphi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$
I	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$
I'	$+60^\circ$	$+30^\circ$	$+90^\circ$	$0^\circ$
II	$-60^\circ$	$+120^\circ$	$+80^\circ$	$0^\circ$
II'	$+60^\circ$	$-120^\circ$	$-80^\circ$	$0^\circ$
VIa1	$-60^\circ$	$+120^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$
VIa2	$-120^\circ$	$+120^\circ$	$-60^\circ$	$0^\circ$
VIb	$-135^\circ$	$135^\circ$	$-75^\circ$	$+160^\circ$
VIII	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-120^\circ$	$+120^\circ$
IV	-	-	-	-

**Tableau 1 : Valeurs des angles dièdres des résidus centraux des différents type de coudes  $\beta$ .**

#### **d. Boucle :**

Lorsqu'un résidu n'intègre aucune des structures secondaires énoncées jusqu'ici on parlera alors de boucle, de pelote statistique, ou de random coil.

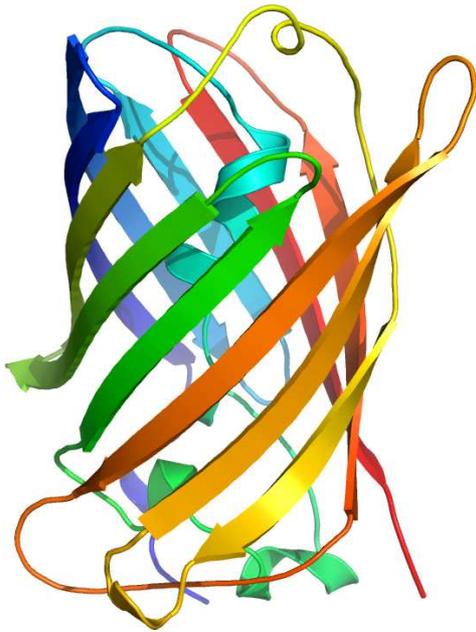
Lors de l'assignement des structures secondaires sur la base des angles dièdres, on autorise une liberté de  $\pm 30^\circ$  autour de la valeur centrale.

### **3. Structure tertiaire :**

La structure tertiaire se réfère à l'organisation tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique qui traduit l'organisation des structures secondaires locales dans l'espace (Figure 8). Il en résulte la formation d'un cœur regroupant les acides aminés hydrophobes les masquant au solvant. Les deux méthodes utilisées pour la détermination des structures tridimensionnelles des protéines sont la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces méthodes permettent l'obtention des

coordonnées x, y, z pour chaque atome, coordonnées déposées au sein de la Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), banque de données structurales.

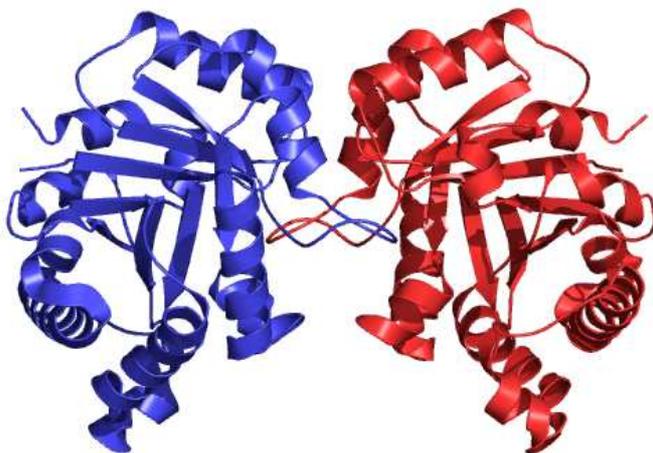
Le maintien de l'ensemble est assuré par des liaisons covalentes (ponts disulfures entre deux cystéines), des interactions électrostatiques (ponts salins et liaisons hydrogène), des interactions de van der Waals et par des interactions avec l'environnement - avec des lipides dans le cas de protéines membranaires par exemple. On parlera de domaine lorsqu'une partie de la chaîne polypeptidique se replie indépendamment du reste de la protéine.



**Figure 8 : Structure tertiaire de la Green Fluorescence Protein résolue à 1,9 Å (GFP : code PDB : 1GFL).**

#### 4. Structure quaternaire :

La structure quaternaire correspond à l'association de plusieurs sous-unités protéiques identiques ou non, résultant parfois de la formation de ponts disulfure et de l'établissement d'interactions faibles décrites précédemment. On parlera alors de multimère.



**Figure 9 : Structure quaternaire dimérique de la triose phosphate isomérase de levure (1WYI).**

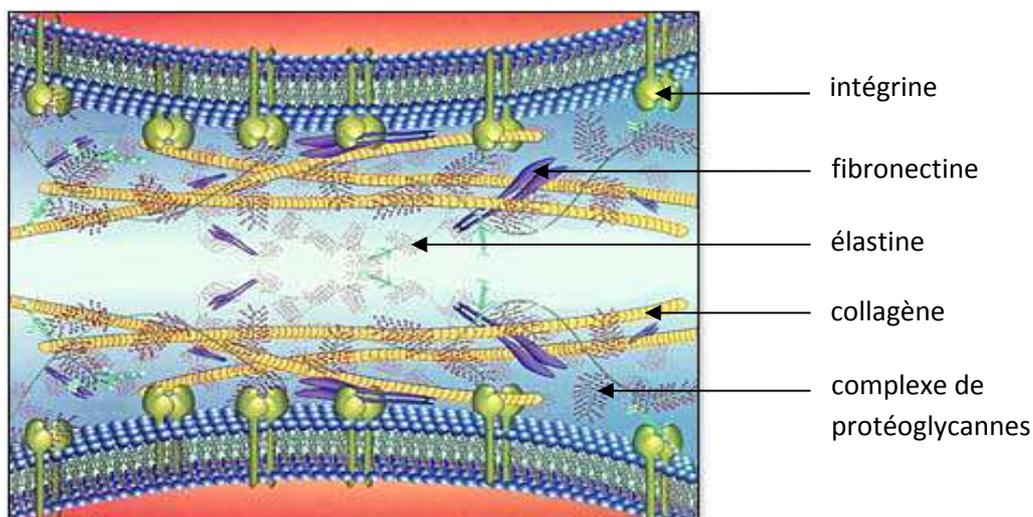
## II. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE :

La matrice extracellulaire (MEC) est composée d'un ensemble de macromolécules qui constitue un réseau tridimensionnel entourant les cellules des êtres vivants. Parmi les molécules représentées au sein de la MEC, on recense :

- des glycoaminoglycannes (GAGs) constitués de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées,
- des protéoglycannes qui sont des GAGs liés de façon covalente à un noyau protéique.
- des protéines de structure comme la fibronectine ou la laminine, comportant des sites de liaisons spécifiques pour d'autres macromolécules et pour les cellules,
- des protéines fibreuses telles que les collagènes ou l'élastine.

Ces composés sont sécrétés localement par les cellules composant chaque tissu et leurs proportions/distributions varient selon le tissu considéré et les conditions physiopathologiques. La MEC n'assure pas seulement le remplissage de l'espace intercellulaire et la cohésion du tissu, mais elle influence le comportement, la forme, l'adhésion, la multiplication ou la migration des cellules.

Les fibres élastiques sont des composants majeurs de la MEC. Ce sont des assemblages macromoléculaires constitués d'"un cœur" d'élastine entouré d'un manteau de microfibrilles riches en fibrilline (Kielty, Sherratt et al. 2002; Kielty, Sherratt et al. 2005; Mithieux and Weiss 2005)



**Figure 10 : Organisation de la matrice extracellulaire.**

## 1. La tropoélastine :

L'élastine est une protéine multimérique hautement polymérisée, insoluble, dont le monomère soluble, la tropoélastine, présente un poids moléculaire d'environ 70 kDa pour 760 résidus (Indik, Yeh et al. 1987; Bashir, Indik et al. 1989). Cette protéine est codée par un gène unique porté par le chromosome 7 (Fazio, Mattei et al. 1991). La tropoélastine est constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de domaines riches en lysine impliqués dans la polymérisation de la molécule (Brown-Augsburger, Tisdale et al. 1995; Tamburro, Bochicchio et al. 2003). Ces domaines sont dénommés exons en référence à l'organisation du gène dite "cassette-like", en se basant sur la numérotation du gène de la tropoélastine bovine (de 1 à 36). La tropoélastine humaine possède 34 exons issus de l'épissage alternatif d'exons entiers de l'ARN messager primaire pouvant donner lieu à différents isoformes de la molécule. Ainsi par exemple, l'isoforme principal ne possède pas l'exon 26A mais ce dernier est présent dans certaines pathologies (Debelle and Tamburro 1999). On trouve plus précisément un peptide signal, des domaines hydrophobes riches en glycines et en prolines, des domaines de pontage de type KA et de type KP, et enfin l'exon 36 présentant la particularité de contenir les deux seules cystéines de la tropoélastine ainsi qu'une charge locale importante due aux résidus RKRK (Figure 11). Les exons 22, 23, 24, 30, 32 et 33 sont les exons identifiés comme étant à l'origine de 11 variants d'épissage (Parks and Deak 1990; Zhang, He et al. 1999). Trois pathologies sont associées à des mutations ou des délétions du gène de la tropoélastine : le *cutis laxa*, la sténose aortique supra-avalvulaire, et le syndrome de William-Beuren.

La tropoélastine présente un haut contenu en acides aminés hydrophobes que sont la valine, l'alanine, la proline, la leucine ou l'isoleucine. Ces cinq résidus représentent 52% de la séquence. On retrouve également de nombreuses glycines (~33% de la molécule). Ces résidus sont souvent présents en répétitions de type GG, PG, GP, XG, VGG, et par extension XGGZG (X, Z=V, L), séquences sur lesquelles nous reviendrons par la suite. La composition même de la protéine rend son étude par les méthodes expérimentales classiques très difficile. L'insolubilité, l'hydrophobie ainsi que la flexibilité de la protéine et l'équilibre entre les conformations qui semblent exister rend la cristallographie impossible. La redondance des résidus G, P, L, A, V produit une dégénérescence du signal de RMN qui rend les spectres quasiment inexploitable. Cependant, l'existence de séquences consensus répétées a permis le développement d'une approche dite réductionniste (thèse de B. Bocchicchio,

2003 ; (Tamburro, Bochicchio et al. 2003)). L'alternance de domaines hydrophobes et de domaines de pontage permet de poser l'hypothèse d'un comportement indépendant de chaque domaine par rapport au reste de la molécule. La tropoélastine est donc étudiée exon par exon voire motif par motif. Les résultats obtenus permettant de remonter au comportement de la molécule entière. (Guantieri, Tamburro et al. 1987; Tamburro, Guantieri et al. 1991; Tamburro, Guantieri et al. 1992; Villani and Tamburro 1995; Broch, Moulabbi et al. 1996; Broch, Moulabbi et al. 1998; Martino, Bavoso et al. 1998; Martino, Coviello et al. 2000; Martino and Tamburro 2001; Kumashiro, Kurano et al. 2003)

### 1. Synthèse et assemblage :

La synthèse de l'élastine, ou élastogénèse, commence *in utero*, se poursuit durant l'enfance et est terminée à l'adolescence. La migration intracellulaire de la tropoélastine est assurée par une protéine chaperonne, l'Elastin Binding Protein (EBP), qui protège la molécule d'une agrégation prématurée et de la dégradation par des sérines-protéases.

L'EBP est un complexe hétérotrimérique (Mecham, Hinek et al. 1989) constitué de trois sous-unités protéiques : une neuraminidase Neu-1 (55 kDa), une protéine protectrice PPCA (61 kDa), et enfin une sous unité de 67 kDa entièrement extracellulaire, qui lie l'élastine (Hinek 1996) ou la laminine (Hinek, Wrenn et al. 1988). Cette protéine de 67 kDa est dérivée d'un épissage alternatif de la  $\beta$ -galactosidase (Privitera, Prody et al. 1998) lui ayant fait perdre une partie de son site actif. Bien qu'ayant perdu toute activité enzymatique, elle reste en revanche sensible aux  $\beta$ -galactosides (Hinek, Wrenn et al. 1988). Il a été proposé que la fixation du lactose ou du galactose, par la sous unité de 67 kDa conduit à des changements conformationnels suffisants pour, à la fois (1) engendrer l'impossibilité de fixation des ligands, et (2) conduire à son détachement de la membrane et du complexe récepteur (Hinek 1996). Aussi, le traitement préalable des cellules par le lactose supprime toute liaison de la tropoélastine, de la laminine et de peptides dérivés au récepteur.

Cette sous unité sert également de protéine chaperonne lors de la sécrétion de l'élastine dans le compartiment extracellulaire : lors de leurs synthèses intracellulaires, la sous-unité réceptrice de l'élastine s'associe rapidement à la chaîne de tropoélastine empêchant la polymérisation intracellulaire de l'élastine (Hinek and Rabinovitch 1994). Cette association perdure jusqu'à la sécrétion du complexe dans le compartiment extracellulaire, au contact des fibres naissantes d'élastine. Au contact du lactose, le complexe se disloque et la sous-unité de

67 kDa s'associe aux deux autres constituants du récepteur de l'élastine. Les microfibrilles synthétisées dans une première étape servent de support sur lequel se déposent les molécules de tropoélastine. Les molécules de tropoélastine s'alignent de façon ordonnée et les résidus lysine se trouvent alors à proximité les uns des autres. Ils subissent une désamination oxydative catalysée par la lysyl oxydase (LOX) qui permet la formation des liaisons covalentes croisées (Reiser, McCormick et al. 1992). C'est cette étape qui rend l'élastine insoluble.

Exon	[	-----	Séquence	-----	]
1	1		G		1
2	2		GVPGAIPGGVPGGVFYFYP		18
3	19		GAGLGALGG		27
4	28		<b>GALGPGGKPLKPV</b>		40
5	41		PGGLAGAGLGA		51
6	52		<b>GLGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAAYKAAKA</b>		82
7	83		GAGLGGVPGVGGVSA		99
8	100		<b>GAVVPQPGAGVKPGKVP</b>		116
9	117		GVGLPGVYPPGGVLPGA		132
10	133		<b>RFPGVGVLPGVPTGAGVKPKAP</b>		154
11	155		GVGGAFAGIP		164
12	165		<b>GVGPFGGPQPGVPLGYPIKAPKLP</b>		188
13	189		<b>GGYGLPYTTGKLPY</b>		202
14	203		GYGPGGVAGAAGKAGYPTGT		222
15	223		<b>GVGPQAAAAAAKAAAKF</b>		240
16	241		GAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIA		270
17	271		<b>GVGTPAAAAAAKAAKAY</b>		290
18	291		GAAAGLVPGGPGFGVGVPGAGVPGVPGAGIPVVPAGIPGAAVP		339
19	340		<b>GVVSPAAAAKAAKAAKY</b>		357
20	358		GARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGFVGVGGIPGVAGVPSVGGVPGVGGVPGVGIS		412
21	413		<b>PEAQAAAAKAAKY</b>		426
22	427		GAAGAGVLGGLVPGPQAAVPGVPGTGGVP		455
23	456		<b>GVGTPAAAAKAAKAAQF</b>		474
24	475		GLVPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVVAPGI		522
25	523		<b>GPGGVAAAAKSAKVAAKAQL</b>		543
26	544		RAAAGLGAGIPGLGVGVVPGVGLGVGAGVPGVGVGAGVPGFGA		585
26A	586		GADEGVRRLSPQLREGDPSSSQHLPSTPSSPR		618
27	619		<b>VPGALAAKAAKY</b>		631
28	632		GAAVPGVLGGLGALGGVGIIPGGVV		655
29	656		<b>GAGPAAAAAAKAAKAAQF</b>		675
30	676		GLVGAAGLGGLGVGGLGVPGVGGV		700
31	701		<b>GIPPAKAAKAAKY</b>		713
32	714		GAAGLGGVGGAGQFPLG		731
33	732		GVAARPGFGLSPIFP		746
36	747		<b>GGACLGKACGRKRK</b>		760

**Figure 11 : Organisation du gène de l'élastine. En bleu sont représentés les domaines KP, en rouge les domaines KA et en noir les domaines hydrophobes, en vert l'exon 36.**

La séquence d'interaction de l'élastine avec l'EBP est connue, et désigne le peptide VGVAPG, présent 2 fois 3 unités dans l'exon 24 de la tropoélastine : séquence (VGVAPG)<sub>3</sub> VGLAPG(VGVAPG)<sub>3</sub>. Le site de liaison de la laminine à son récepteur désigne un peptide proche en séquence de VGVAPG : le peptide LGTIPG.

Contrairement à la plupart des autres protéines, la capacité de déposer de l'élastine est perdue chez l'adulte. Par conséquent, la dégradation de l'élastine observée au cours du vieillissement de l'individu est un phénomène irréversible qui lui fait perdre ses propriétés mécaniques et physiologiques. Il a été montré un lien étroit entre dégradation de l'élastine et des pathologies comme les anévrismes, l'emphysème ou la progression tumorale.

## 2. Assemblage *in vitro* :

La tropoélastine possède la propriété de s'auto-assembler *in vitro* dans des conditions physiologiques, en absence de microfibrilles, au cours d'un processus nommé coacervation. La coacervation est définie comme une transition inverse en température. Ce processus réversible implique les domaines hydrophobes de la tropoélastine et est lié au comportement des molécules d'eau autour des molécules de tropoélastine. A basse température, l'eau forme des clathrates autour des domaines hydrophobes de la protéine. Lors d'une élévation de température, cette organisation est rompue et les domaines hydrophobes se retrouvent alors "libres" leur permettant d'interagir les uns avec les autres ce qui se traduit par une séparation entre une phase concentrée en protéine et une phase aqueuse. Le processus de coacervation a été montré pour de nombreux exons ou constructions polypeptidiques et est dépendant de la concentration en protéine, du pH, de la présence de sels, ou de la pression en CO<sub>2</sub> (Vrhovski, Jensen et al. 1997; Dehghani, Annabi et al. 2008). Il reste cependant difficile de savoir si ce phénomène existe et/ou est nécessaire *in vivo*.

Des assemblages supramoléculaires ont été décrits par microscopie électronique, microscopie de force atomique pour des séquences allant du térapeptide (VPGG) à des polymères répétés (poly-VPGXG, poly-XGGZG), d'hydrolysats d'élastine au monomère entier. Ces observations mettent en évidence trois types d'organisation : des structures fibrillaires de 5 nm d'épaisseur, des globules et des agrégats ayant des propriétés amyloïdes.

### 3. Assemblage *in vivo* :

La partie C-terminale de la tropoélastine, codée par les exons 29 à 36, a un rôle capital dans l'assemblage de l'élastine. L'interaction de ce fragment avec un anticorps conduit à l'arrêt du dépôt d'élastine dans la matrice extracellulaire de cellules bovines sans pour autant inhiber la sécrétion de la protéine dans l'espace intercellulaire (Kozel, Wachi et al. 2003). Il apparaît désormais que la délétion de l'exon 36 (GGACLGKACGRKRRK), la mutation des cystéines ou la délétion des résidus RKRK de la tropoélastine n'empêchent pas l'association initiale de la protéine aux microfibrilles mais limite fortement la formation des liaisons croisées dans la fibre en croissance. Broekelmann et coll. (Broekelmann, Ciliberto et al. 2008) ont mis en évidence que cet exon n'est détecté qu'à de très faible taux dans la fibre mature comparativement au nombre de monomères présent. Ils suggèrent que ce domaine est soit supprimé soit modifié lors de processus post-traductionnels. Ces résultats indiquent que les propriétés d'adhésion aux cellules et à la matrice peuvent être modifiées ou perdues au cours de la maturation de la fibre alors que ce domaine est identifié dans des interactions avec MAGP-1 et les intégrines  $\alpha\beta 3$  (Brown-Augsburger, Broekelmann et al. 1994; Rodgers and Weiss 2004).

L'absence de l'exon 30 abolit totalement l'association initiale de la protéine avec les microfibrilles. Ce domaine est décrit comme ayant la capacité de s'auto-assembler *in vitro*. Il est décrit comme formant des brins  $\beta$  et donne des fibres ayant des caractéristiques amyloïdes (Tamburro, Pepe et al. 2005).

L'ordre des événements conduisant à l'incorporation de tropoélastine dans la fibre en croissance reste à élucider, le point clé étant l'alignement des molécules.

La 1<sup>ère</sup> hypothèse consiste à suggérer que des interactions hydrophobes sont d'abord mises en jeu notamment par l'intermédiaire de l'exon 30. L'exon 36 est ensuite le premier exon à être lié via les résidus lysines ce qui permet alors d'ordonner les molécules de tropoélastine en optimisant l'agencement spatial des lysines restantes pour la lysyl oxydase (Broekelmann, Ciliberto et al. 2008) conduisant à l'incorporation de la tropoélastine et à la croissance de la fibre.

La 2<sup>ème</sup> hypothèse consiste à privilégier la formation des pontages entre les domaines KA en hélice  $\alpha$  ce qui réduit la flexibilité des chaînes polypeptidiques afin de faciliter les interactions entre domaines hydrophobes au cours de l'élastogénèse.

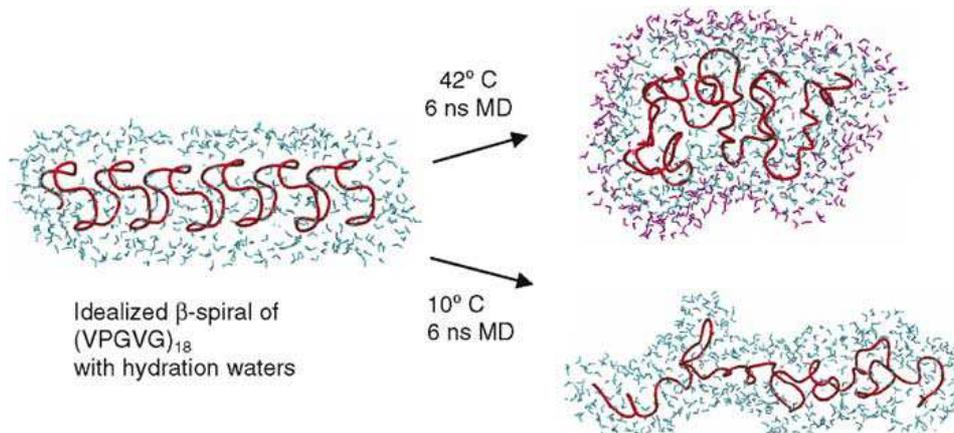
#### 4. Propriétés structurales :

De nombreuses études ont été menées afin d'élucider la structure secondaire et tertiaire de l'élastine, en utilisant comme matériel biologique l'élastine, l' $\alpha$ -élastine (élastine solubilisée par l'acide oxalique), la  $\kappa$ -élastine (élastine dégradée par la potasse éthanolique à 37°C), des peptides synthétiques ou la tropoélastine recombinante. En effet, l'élastine mature est insoluble mais les peptides ou les exons dérivant de l'élastine ainsi que la tropoélastine sont hydrophiles.

Les méthodologies employées incluent le dichroïsme circulaire, les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge, et la microscopie électronique. Il n'est pas possible d'en dégager une structure globale faisant l'unanimité, mais il est possible d'obtenir des informations au niveau local.

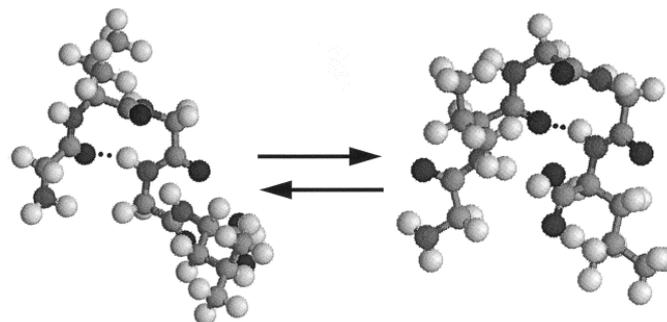
Les spectroscopies de dichroïsme circulaire et Raman indiquent que la tropoélastine est peu structurée (Urry, Starcher et al. 1969; Starcher and Urry 1973; Debelle, Alix et al. 1995; Debelle, Alix et al. 1998; Muiznieks, Jensen et al. 2003) mais on note cependant la présence d'hélice  $\alpha$  (3-10%) et de structures de types  $\beta$  (brins et coudes, 45-60%). La polyproline II est souvent mise en évidence mais ne semble exister que de façon transitoire en fonction de la nature du solvant. Les logiciels de prédiction de structures secondaires ne sont pas particulièrement adaptés aux protéines fibreuses comme l'élastine ; les logiciels dédiés à la prédiction du désordre (PONDR, DisEMBL, GloPlot) peuvent prédire jusqu'à 75% de désordre à partir de la séquence primaire (Muiznieks and Weiss 2007).

Historiquement, un des premiers modèles a été proposé par D. Urry : ce modèle repose sur une structure dite en spirale  $\beta$  (Figure 12) composé d'une répétition successive de coude  $\beta$  de type II sur les séquences VPGVG, VPGG et APGVGV. Le modèle proposé a servi de point de départ à différentes études de dynamique moléculaire (Li and Daggett 2002) mais il apparaît que la spirale  $\beta$  n'est pas stable dans l'eau au cours de cycles d'élongation-relâchement et ne permet pas d'expliquer l'élasticité de la molécule. De plus, ce modèle ne permet pas d'envisager les mécanismes mis en jeu au niveau des exons de pontage.



**Figure 12 : Modèle de spirale  $\beta$  proposé par Urry. Structures finales obtenues à la fin des trajectoires de dynamique moléculaire menées à 2 températures différentes (Tiré de (Li and Daggett 2002)).**

Tamburro & coll. ont ensuite proposé un modèle qui recoupe toutes les informations obtenues grâce aux méthodologies précédemment citées (Tamburro, Bochicchio et al. 2003) et qui localisent les hélices dans les exons riches en alanines de la tropoélastine humaine synthétique (Tamburro, Pepe et al. 2006). Les études menées ont été réalisées dans l'eau et le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), solvant moins polaire que l'eau. Le TFE est connu comme induisant la formation de structures secondaires comme les hélices ou les coudes  $\beta$  en favorisant la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces deux solvants constituent deux cas extrêmes, le comportement de l'élastine est certainement intermédiaire entre le « tout-eau » et le « tout-TFE ».

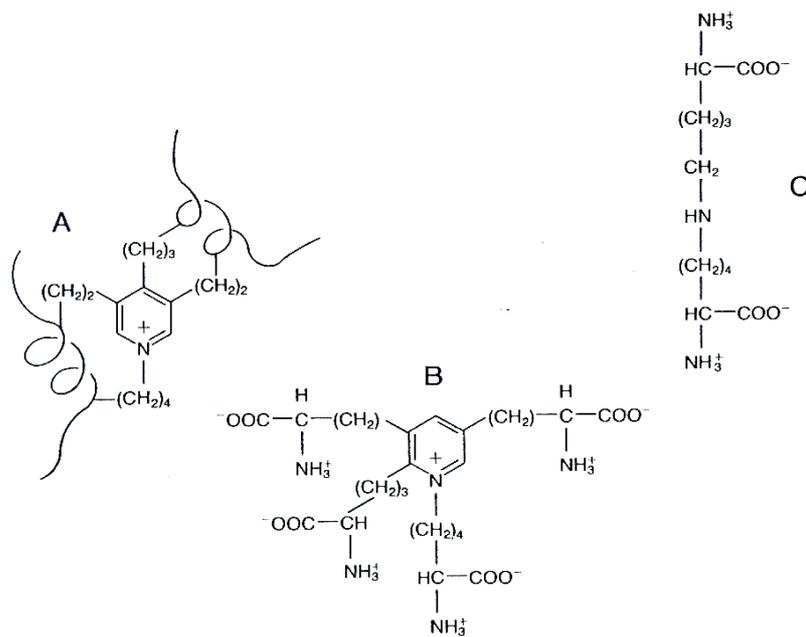


**Figure 13 : Modèle de coude glissant, ici illustré sur le pentapeptide GVGGL. Le coude  $\beta$  est formé par la liaison Gly<sub>4</sub>[NH] - Gly<sub>1</sub>[C=O] (à gauche) ou par la liaison Leu<sub>5</sub>[NH] - Val<sub>2</sub>[C=O] (à droite) ; (Tiré de (Debelle and Tamburro 1999)).**

Ainsi pour les exons hydrophobes pris seuls, il est proposé un équilibre dans l'eau entre structures polyproline II et non-ordonnée ou irrégulières ; le TFE favorise quant à lui un équilibre entre des coudes de type I-II et des conformations peu ordonnées. Ces coudes ne

sont pas figés dans la structure mais dits glissant le long de la séquence (Debelle and Tamburro 1999).

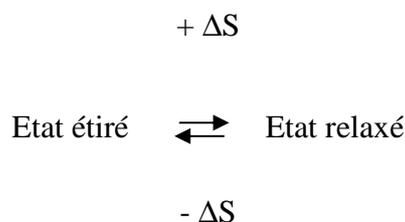
Les exons de pontage riches en alanines et impliqués dans la formation des liaisons croisées ont été étudiés isolément de façon systématique par Tamburro et coll. (Tamburro, Pepe et al. 2006). Ces exons adoptent majoritairement une structure en hélice  $\alpha$  stable indépendamment de la température. Des études de dynamique moléculaire (Floquet N., résultats non publiés) ont montré que les liaisons croisées stabilisent les exons impliqués dans une conformation en hélice  $\alpha$  tout au long de la trajectoire. La plupart de ces exons présentent des lysines par paires sauf les exons 19 et 25 dont la séquence contient 3 lysines. Bien qu'il soit théoriquement possible de former des liaisons entre 4 molécules, les auteurs proposent qu'une liaison se forme entre les exons 10, 19 et 25 *via* une desmosine et deux lysinorleucines mettant en jeu 3 molécules de tropoélastine (Mecham, Broekelmann et al. 1995). La digestion protéolytique de l'élastine bovine confirme ce mode de liaison.



**Figure 14 : structures chimiques des principaux résidus de pontage de la tropoélastine : Desmosine (A), isoDesmosine (B), déhydrolysino-norleucine (C).**

## 5. Elasticité :

Les propriétés élastiques de l'élastine sont principalement d'origine entropique (Hoeve and Flory 1974; Gosline, Lillie et al. 2002). Ce principe permet à un élastomère soumis à une déformation de retourner à son état initial.



L'élasticité s'explique par une grande flexibilité des chaînes de tropoélastine à l'état relaxé qui permet d'accéder à un équilibre entre différentes formes parfois considéré comme peu structurées (coudes  $\beta$ , polyproline II ...), labiles, et à l'origine d'une grande entropie moléculaire. Le rôle des coudes  $\beta$  dans cet équilibre a été commenté, aboutissant au concept de « coudes glissants » (Lelj, Tamburro et al. 1992). Aussi, l'élasticité moléculaire de l'élastine est attribuée principalement aux domaines hydrophobes. Dans l'état étiré, la perte de degrés de liberté conduit à des mouvements non plus chaotiques, mais solitoniques (Villani and Tamburro 1999), quasi-périodiques. Les structures locales diffèrent, deviennent quasi-étendues (brins  $\beta$ ), au contact de l'eau (Debelle and Alix 1999). Les mouvements correspondant ont de faibles amplitudes et contribuent à diminuer l'entropie. Selon le second principe de la thermodynamique :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

où  $\Delta G$  représente l'énergie libre,  $\Delta H$  la variation d'enthalpie,  $\Delta S$  la variation d'entropie, et  $T$  la température. Dans l'état étiré, l'entropie de l'élastine baisse conduisant à une contribution positive pour le  $\Delta G$ , signe d'un équilibre déplacé spontanément dans le sens étiré  $\rightarrow$  relaxé. L'élastine ne présente ses propriétés élastiques qu'en présence d'eau (Debelle and Alix 1999; Debelle and Tamburro 1999; Li and Daggett 2002). Dans l'état étiré, les nombreux groupes hydrophobes constituant les chaînes de tropoélastine se retrouvent malgré eux au contact de l'eau. Cette interaction défavorable, forcée, conduit à une réorganisation des premières couches de solvation au contact direct des chaînes latérales, contribuant à la baisse d'entropie. Spontanément, les groupes non polaires exposés à l'eau vont chercher à se réassocier pour minimiser ces interactions et retourner à l'état relaxé (Li, Alonso et al. 2001).

## 6. Cas particulier des exons 28 et 30 :

Le rôle primordial de l'exon 30 (**GLVGAAGLGGGLGVGGLGVPGVGGLG**) dans la formation des fibres élastiques et sa capacité à s'agréger de façon irréversible ont conduit à s'intéresser particulièrement à ce domaine. Comme dit précédemment, il est impliqué dans l'interaction avec les microfibrilles. *In vitro*, il possède la propriété de s'auto-assembler pour former des structures fibrillaires mais ne coacerve pas. Une séquence consensus de type XGGZG est identifiée comme étant la séquence minimale donnant lieu à l'agrégation. X et Z peuvent être une Valine, une Leucine, une Alanine.

Cette séquence est répétée 3 fois dans l'exon 30 mais est aussi retrouvée 2 fois dans l'exon 28 (**GAAVPGVLGGLGALGGVGIPGGVV**) (Bochicchio, Pepe et al. 2007), et 1 fois dans l'exon 7 (**GAGLGGVPGVGGLGVSA**) (Ostuni, Bochicchio et al. 2007). Les expériences menées sur l'exon 7 montrent que la propension à former des fibres amyloïdes n'est pas seulement dépendante de la présence ou non du motif consensus mais dépend également des séquences présentes en amont et aval. Ainsi, en présence du peptide signal de la tropoélastine conduit à la formation de fibres pour un polypeptide synthétique comprenant les exons 1 à 7 de l'élastine tandis que le même polypeptide délété du peptide signal coacerve. De plus, la propension à donner des fibres amyloïdes ou un élastomère est gouverné par la composition et le rapport glycine/proline (Rauscher, Baud et al. 2006). Les auteurs ont montré que ce critère permet de discriminer des protéines aussi diverses que les soies d'araignée, des protéines amyloïdes, des domaines hydrophobes de l'élastine ou des protéines élastomériques (abductine et résiline).

Le caractère amyloïde des fibres observées reposent sur différent critères :

- contrairement à la coacervation, l'assemblage des fibres se fait de façon irréversible. L'augmentation de la température conduit à la formation d'agrégats et un refroidissement de la solution ne permet pas de resolubiliser la protéine.
- Les mesures en spectroscopie FTIR, DC mettent en évidence la présence de structures secondaires de type feuillet  $\beta$  antiparallèle. Cette condition est nécessaire mais non suffisante à l'obtention de structures amyloïdes.

- Les agrégats formés fixent le rouge Congo et une bi-réfringence rouge/verte est observée en microscopie

Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'une séquence minimale de 25 résidus était nécessaire pour observer le phénomène (Flamia, Salvi et al. 2007).

Des polymères du motif répétés ont été largement étudiés d'un point de vue structural (polyVGGVG - polyVGGLG - polyLGGVG) (Castiglione-Morelli, Scopa et al. 1990; Tamburro, Guantieri et al. 1992; Martino, Coviello et al. 2000) et montrent la présence de coudes  $\beta$  de type II au niveau des résidus XG ou GG. Ces coudes sont très labiles, flexibles et peuvent facilement glisser le long de la chaîne polypeptidique.

### 7. Peptides dérivés de l'élastine et concept de matrikines :

L'élastine n'a pas seulement un rôle architectural au sein de la matrice. Il a en effet été montré que des peptides dérivant de l'élastine sont biologiquement actifs et sont un des éléments principaux de la régulation de l'activité cellulaire. Nous savons que des peptides dérivant de l'élastine sont présents dans la circulation sanguine, aussi bien dans des conditions pathologiques que normales (Wei, Erdei et al. 1993). Ils sont issus de la dégradation par usure mécanique des fibres d'élastine mais aussi par des élastases de type métalloprotéinases matricielle ou serine-protéinase. Les MMPs impliquées dans la dégradation de l'élastine sont les MMP-2, -9, -12, et -14. Il est montré *in vitro* que la MMP-12 possède au moins 86 sites de clivages dans la tropoélastine, et est capable de générer des peptides faisant de 4 à 41 acides aminés à partir des exons 5, 6, 26, 28-31 d'élastine de peau humaine (Taddese, Weiss et al. 2008; Taddese, Weiss et al. 2008). Parmi les peptides identifiés se trouvent le motif GXXPG. Ce motif est notamment connu au sein de l'exon 24 au niveau de la séquence VGVAPG présente 6 fois, hexapeptide largement étudié au sein de notre laboratoire. On le trouve successivement 3 fois, suivi par un hexapeptide VGLAPG puis de nouveau répété 3 fois. Il existe en tout 8 répétitions de type GXXPG au sein de cet exon. Les peptides présentant cette séquence consensus, en particulier VGVAPG, ont une activité biologique (Maquart, Simeon et al. 1999; Brassart, Fuchs et al. 2001; Huet, Brassart et al. 2001) quand ils sont libérés (Lombard, Bouchu et al. 2005; Lombard, Arzel et al. 2006) et sont regroupés sous le terme de matrikines. Les effets biologiques associés sont médiés par l'interaction de ce motif avec le complexe récepteur de l'élastine. La modélisation moléculaire a permis d'identifier sur ce peptide un coude  $\beta$  de type VIII sur la séquence GVAP (Floquet, Hery-

Huynh et al. 2004). D'autres peptides reproduisent les effets du VGVAPG : LGTIPG dérivé de la laminine, PGAIPG dérivé de l'élastine.

La propension des motifs XGGZG à former des agrégats *in vitro* est vérifiée mais le lien avec une situation pathologique ou délétère *in vivo* reste à prouver. La question est de savoir si les phénomènes observés expérimentalement peuvent être reproduits au sein d'un organisme.

Un dépôt amyloïde qualifié "d'élastotique ou élastomérique" a été observé dans des poumons de patients atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aigue (Fan and Nagle 2002). Doostkam et coll (Doostkam, Bohl et al. 2008) ont mis en évidence un dépôt amyloïde dans la paroi artérielle qui se révèle ne pas fixer d'anticorps dirigés contre des protéines impliquées habituellement dans ce genre de pathologies (amyloïde A, protéine  $\beta$ -A4,  $\beta$ -2-microglobuline, ...). Par contre, il est mis en évidence la fixation d'un anticorps dirigé contre l'élastine. Une protéine interagissant avec l'élastine dans les cellules musculaires lisse d'aorte, la lactadhérine, donne par clivage protéolytique un polypeptide de 50 acides aminés, la médine : RLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSEKVTGIITQGARNFGSVQFVA.

Ce polypeptide se dépose dans la media aortique de patients âgés de plus de 50 ans et co-localise avec les fibres élastiques. Par ailleurs, il est montré que tant la médine que la lactadhérine interagissent avec la tropoélastine (Larsson, Peng et al. 2006; Larsson, Soderberg et al. 2007; Peng, Larsson et al. 2007). Ces résultats suggèrent donc que l'élastine puisse être impliquée dans le dépôt amyloïde de la médine.

La séquence XGGZG est identifiée dans les produits de dégradation de l'élastine (**LGGLGA**, **LGGLGVGG**, **LGGVGIPGG**, **LVGAAGLGGLGVGG**, **LGGLGVGGLGVPGVGG** ..., (Taddese, Weiss et al. 2008)). La formation des fibres *in vitro* est dépendante de la concentration en protéines, de la présence de sel mais aussi de la présence de lipides, de l'influence de la température. Le lipide utilisé est le sodium taurocholate, un sel biliaire analogue du cholestérol. Le cholestérol est connu comme favorisant le dépôt en fibres amyloïdes de la protéine A $\beta$  (1-42) impliquée dans la formation de plaque dans la maladie d'Alzheimer (Harris 2002) et favorise la dégradation de la tropoélastine par des élastases (Guantieri, Tamburro et al. 1983). Il est aussi montré que les peptides hydrophobes issus du clivage du précurseur soluble sont un des constituants majeurs de ces mêmes plaques. Enfin, l'agrégation des exons 28 et 30 de l'élastine est abolie *in vitro* en présence d'un inhibiteur de la

protéine amyloïde A $\beta$  (KLVFF, (Tjernberg, Naslund et al. 1996)), lui-même dérivé de cette protéine (Bochicchio, Lorusso et al. 2009).

### III. LES AMYLOÏDES

#### 1. Généralités :

Le terme amyloïde vient du grec "amylon" (=amidon) et fut introduit par R. Virchow en 1854 pour décrire chez l'homme des dépôts pathogènes donnant une coloration bleue-violette en présence d'une solution d'iode et d'acide sulfurique (Virchow, R. (1854) Zur Zellulose-Frage. Zeitschr. f. physiol.Anat. 6, 416 – 426) Cette notion fait référence à la réaction amidon-iode qui donne cette coloration en milieu acide. La nature protéique des dépôts fut mise en évidence par Friedreich & Kekulé en 1859 (Friedreich, N. and Kekulé, A. (1859) Zur Amyloidfrage. Virchows Arch. 16, 50 – 65). Par définition, "amyloïde" fait référence à un dépôt protéique extracellulaire organisé en fibres linéaires. Ces fibres sont composées de fins filaments (protofilaments), fixent le rouge Congo<sup>1</sup> (Klunk, Jacob et al. 1999) ou le fluorochrome Thioflavine T (LeVine 1999). Le rouge Congo est un colorant donnant une biréfringence verte caractéristique sous lumière polarisée. Dans le cas de dépôt dans la cellule même, le terme approprié est "inclusion intracellulaire". Cependant par extension, on parle généralement d'amyloïde pour tout dépôt protéique.

Une quarantaine de maladies - Alzheimer, Huntington, Parkinson, diabète de type II ... (Tableau 2) - liées à un dépôt protéique insoluble sont décrites. Ces pathologies sont associées à la conversion d'une protéine ou d'un fragment peptidique d'un état soluble en agrégat fibrillaire organisé et insoluble. Ces dépôts se révèlent très stables, résistants aux protéases et sont retrouvés dans tous les tissus et organes. La partie protéique constitue le cœur du dépôt mais on y retrouve associés des ions métalliques, des glycosaminoglycanes, et d'autres protéines. Les protéines associées à des dépôts intra ou extracellulaires sont d'une grande hétérogénéité tant en terme de séquence, d'homologie structurale, de contenu en structure secondaire ou en longueur de chaîne (Tableau 2). On notera que l'on trouve aussi bien des petits peptides (A $\beta$ ), des multimères (TTR) que des protéines non structurées, des monomères repliés, des protéines monomériques ( $\beta$ 2-Microglobuline). Mais, des travaux de mutagenèse ont montré l'importance de résidus-clé dans l'agrégation (amyloid-prone region), conduisant à l'élaboration de méthodes de prédiction des régions favorables à la formation de fibres (Lopez de la Paz and Serrano 2004; Pawar, Dubay et al. 2005; Tartaglia, Pawar et al. 2008).

---

<sup>1</sup> La spécificité de fixation du rouge Congo tend à être remise en question (Bousset, 2004; Khurana, 2001).

Precursor polypeptide	Amyloid classification	Associated syndrome/disease	Number of residues	Native structure of protein or peptide
A $\beta$ peptide	A $\beta$	Alzheimer's disease	40 or 42	Natively unfolded
Atrial natriuretic factor	AANF	cardiac arrhythmias	28	Natively unfolded
Apolipoprotein AI	AApoAI	atherosclerosis	80-93	Natively unfolded
Serum amyloid A	protein AA	rheumatoid arthritis	76-104	All- $\alpha$
Cystatin C	ACys	cerebral amyloid angiopathy (Icelandic type)	120	$\alpha$ + $\beta$
Gelsolin	AGel	familial Finnish amyloidosis	71	Natively unfolded
Immunoglobulin light chain	AL systemic	AL amyloidosis	~90	All- $\beta$
Islet amyloid polypeptide	AIAPP	diabetes mellitus, type II	37	Natively unfolded
Lysozyme	ALys	hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis	130	$\alpha$ + $\beta$
Medin	AMed	aortic medial amyloid	50	Unknown
$\beta$ 2-Microglobulin	A $\beta$ 2M	dialysis related amyloidosis	99	All- $\beta$
Prion protein	APrP	spongiform encephalopathies	253	Natively unfolded (1-120) & $\alpha$ - helical (121-230)
Prolactin	APro	prolactinomas	199	All- $\alpha$
Transthyretin	ATTR	familial amyloid polyneuropathy	127	All- $\beta$

**Tableau 2 : Exemple de polypeptides et pathologies associés à des dépôts amyloïdes, tiré de (Fandrich 2007) et adapté de (Chiti and Dobson 2006).**

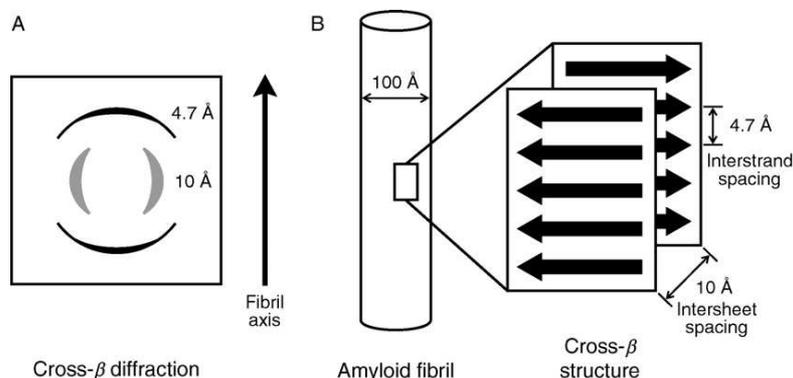
L'accumulation de protéines résulte d'un changement conformationnel voire d'une dénaturation partielle dont les raisons restent encore peu claires. Il apparaît cependant que les critères suivant influencent l'assemblage de protéine ou de peptide amyloïdogénique :

- séquence, composition en acides aminés, longueur du peptide et concentration.
- point isoélectrique, solubilité, charge, hydrophobicité.
- environnement : pH, température, solvant, interaction avec des membranes lipidiques, modification post-traductionnelle.

Il a été montré qu'un environnement riche en matériel fibrillaire pouvait être un facteur de risque supplémentaire dans les pathologies à amyloïdes (Lundmark, Westermark et al. 2005).

## 2. Propriétés structurales :

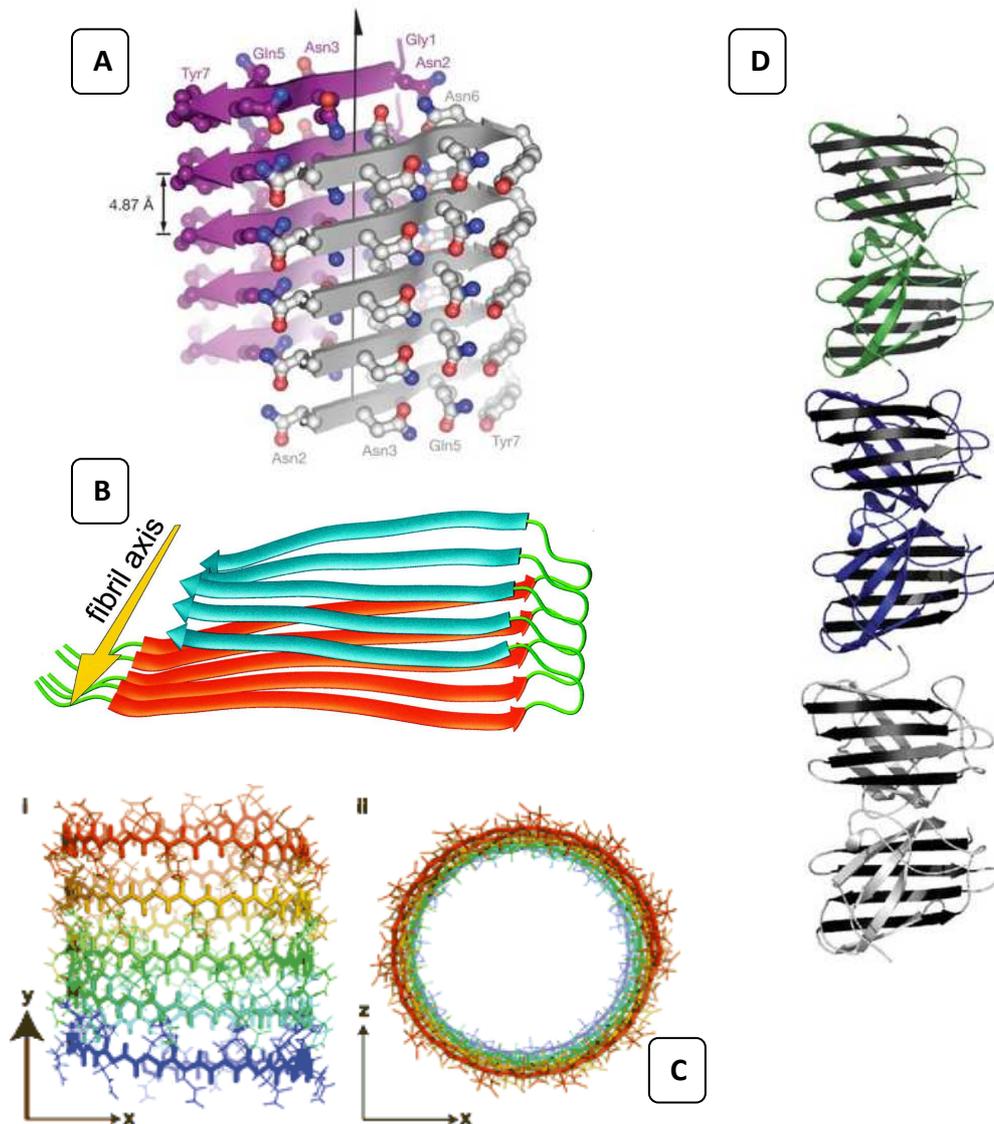
En 1959, Cohen & Calkins (Cohen and Calkins 1959) mettent en évidence que les protéines amyloïdes ont des caractéristiques structurales communes, indépendamment de leur origine. En 1968, Geddes & coll. (Geddes, Parker et al. 1968) montrent que l'élément de base de l'amyloïde est un peptide structuré en brin  $\beta$  organisé en feuillet et introduisent la structure dite en croix  $\beta$  typique des fibres amyloïdes.



**Figure 15 : (A) Représentation d'un cliché de diffraction typique d'une structure en croix  $\beta$ . (B) Modèle traduisant le cliché de diffraction observé, tiré de (Nelson and Eisenberg 2006).**

Initialement, les seules informations disponibles provenaient de la microscopie électronique à transmission, de la microscopie à force atomique et des clichés de diffraction aux rayons X sur des fibres. La structure tridimensionnelle décrivant un assemblage amyloïde est donc longtemps restée une inconnue de par sa taille limitant l'emploi de la RMN liquide, et par l'impossibilité d'obtenir des cristaux. Les progrès en RMN du solide et l'obtention de cristaux

de peptides de protéine ayant des propriétés de fibre amyloïde ont levé cette inconnue (Jaroniec, MacPhee et al. 2002; Petkova, Ishii et al. 2002; Makin, Atkins et al. 2005; Nelson, Sawaya et al. 2005; Ritter, Maddelein et al. 2005).



**Figure 16 : (A) Structure cristallographique du peptide GNNQQNY provenant de la protéine prion de levure Sup-35 (tiré de Nelson, 2005) (B) Modèle RMN de l'état solide du peptide A $\beta$ 1-40 (Tiré de Petkova, 2002) (C) Deux vue du modèle en hélice  $\beta$  proposé par Perutz (2002), tiré de (Harrison, Sharpe et al. 2007) (D) Modèle d'un filament de superoxyde dismutase mutante humaine 10ZU (Tiré de Nelson & Eisenberg, 2006).**

Le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge ont appuyé la nature en brins  $\beta$  des agrégats. Les clichés de diffraction aux rayons X révèlent deux pics, l'un à environ 4.7 Å qui traduit l'espacement entre deux brins  $\beta$  dans un feuillet, l'autre à environ 10 Å qui correspond à la distance inter-feuillets (Figure 15).

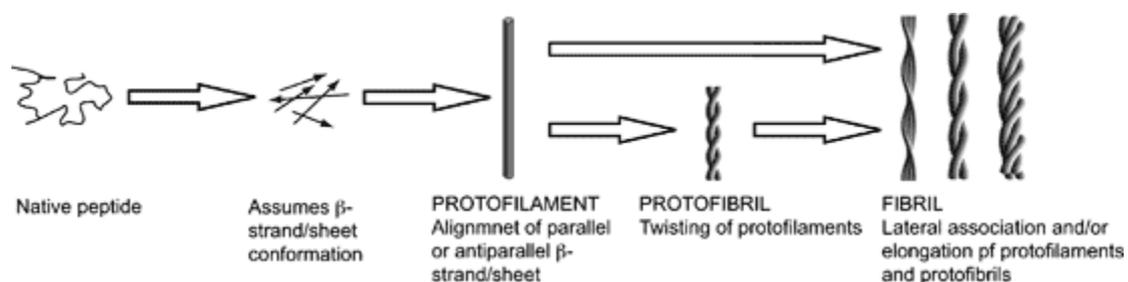
Les différentes structures obtenues mettent en évidence la structure en croix  $\beta$  caractéristique du cliché de diffraction obtenu, la présence d'interactions entre résidus hydrophobes ou entre résidus polaires. On note par contre une grande hétérogénéité dans la longueur des brins  $\beta$  et leur arrangement en feuillet antiparallèle ou parallèle.

### 3. Formation des fibres amyloïdes :

A l'échelle macroscopique, chaque fibre est constituée de plusieurs filaments, eux-mêmes composés de 2 à 6 protofilaments, et son diamètre est de l'ordre de 100 Å pour une longueur qui peut atteindre 20–25 nm.

La formation des fibres amyloïdes se fait via différents intermédiaires (Figure 17) :

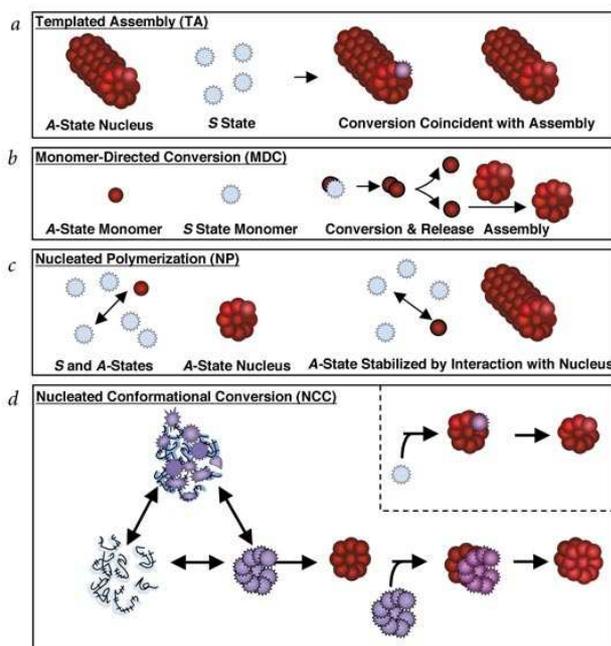
- le monomère est l'unité de base, peptide ou protéine,
- les oligomères sont des agrégats globulaires qui s'apparentent à des structures micellaires. La taille des oligomères formés est là aussi très variable pour un même monomère considéré. Ainsi le peptide A $\beta$  peut former selon les conditions des globules de 5 à 15 nm (Lambert, Barlow et al. 1998; Huang, Yang et al. 2000). Cependant, considérer l'oligomère comme un intermédiaire dans la voie menant à la formation de fibres ne fait pas l'unanimité (Baskakov, Legname et al. 2002; Yong, Lomakin et al. 2002; Wacker, Zareie et al. 2004),
- les protofilaments sont les agrégats linéaires présentant une structuration en feuillets  $\beta$ , ici aussi pouvant être d'une grande variabilité en terme de diamètre et de taille,
- les fibres sont composées typiquement de 2 à 6 filaments enroulés les uns autour des autres de façon hélicoïdale. La fibre mature est le produit final insoluble de l'amyloïdogenèse.



**Figure 17 : Etapes et intermédiaires conduisant à la formation de fibres amyloïdes, tiré de (Harrison, Sharpe et al. 2007).**

L'amyloïdogenèse nécessite l'agrégation de petits peptides ou de protéines natives en des assemblages structurés qui formeront au final des protofilaments et des fibres ; des modifications conformationnelles qui créent ou exposent des régions capables d'initier ou promouvoir l'agrégation. La nature et les causes de ces changements restent peu connues. De plus, la détection et l'étude des propriétés de ces intermédiaires restent très difficile en raison de leur existence transitoire et l'insolubilité des assemblages formés.

Une transition de structure  $\alpha$  vers une structure  $\beta$  est souvent associée à un caractère amyloïdogène. Cependant, la prédiction des structures secondaires ne s'applique pas toujours : la  $\beta$ 2-microglobuline est un contre-exemple de protéine structurée en feuillets  $\beta$ , en contradiction avec cette hypothèse. Kallberg et coll. ont par ailleurs montré que les protéines impliquées dans les pathologies à amyloïdes présentaient des régions ayant une contradiction entre des structures secondaires prédites en feuillets  $\beta$  et des structures observées expérimentalement en hélice  $\alpha$  (Kallberg, Gustafsson et al. 2001). Enfin, la formation de fibres amyloïdes est aussi associée à un état de dénaturation ou de repliement partiel différent de l'état natif.



**Figure 18 : Modèle de conversion des monomères et assemblage des fibres amyloïdes, tiré de (Kelly 2000).**

Trois modèles sont décrits pour expliquer les mécanismes conduisant aux modifications conformationnelles des protéines formant des fibres (Figure 18). Le 1<sup>er</sup> modèle nécessite la formation d'un "noyau" qui pourrait être un monomère ou un oligomère (*Nucleated Polymerisation*). Une fois formé, ce noyau croît par addition de monomère "amyloïde

compétent" à chaque extrémité et la fibre croît rapidement. Le second modèle se base sur la conversion d'un monomère "incompétent" par un monomère "compétent" (*Monomer-Directed Conversion*). L'étape limitante de ce modèle est la conversion du premier monomère incompetent. Dans le troisième modèle, un monomère en solution et dans une conformation désordonnée se fixe à une fibre préexistante qui induit sa conversion progressive en une structure compétente permettant l'élongation de la fibre (*Templated Assembly*). Dans ce modèle, l'étape limitante est la conversion du monomère.

D'un point de vue cinétique, trois phases peuvent être décrites. La première phase correspond au phénomène de nucléation. Au cours de cette phase dite aussi de latence (lag-phase) peu de changements sont observables, de petits oligomères sont formés sans mise en évidence des feuilletts  $\beta$  caractéristiques. Cette étape aboutit à la formation d'un noyau stable. Ce phénomène est très aléatoire : la même expérience répétée en parallèle, sur la même solution, montre des temps de latence différents (Hortschansky, Schroeckh et al. 2005). Dans ce modèle, la formation du noyau est l'étape thermodynamiquement défavorable. La phase de latence peut être supprimée par l'addition initiale de fibres déjà formées (technique de d'ensemencement : seeding). Ces dernières servent alors de noyau et les protéines peuvent s'y fixer directement. La seconde phase correspond à la croissance de la fibre. Les mono ou oligomères se fixent sur les noyaux préformés et allongent progressivement la fibre à chaque extrémité. La troisième phase est atteinte lorsqu'il n'y a plus de monomère en solution, les fibres ne peuvent plus s'allonger et un équilibre est atteint.

Il apparaît désormais que la propension à donner des fibres amyloïdes soit une propriété générique de toutes les protéines à partir du moment où elles sont placées dans des conditions appropriées.

#### 4. Toxicité des amyloïdes :

La présence de dépôt fibrillaires, stables et organisés dans les tissus de patients atteints de pathologies liées à des dépôts protéiques ont logiquement conduit à les considérer comme la cause de nombreux désordres. Mais il semble de plus en plus clair que la toxicité des amyloïdes est aussi liée aux oligomères qui apparaissent au cours de la fibrillogénèse. Les causes du désordre peuvent être multiples :

Tout d'abord, une protéine qui s'agrège n'est plus disponible dans la cellule pour remplir sa fonction. De plus, les modifications conformationnelles sous-jacentes à ce phénomène ont tendance à exposer des résidus qui sont habituellement enfouis dans la molécule ou dispersés dans le cas de peptides ou protéines non repliés. Cette exposition indésirable permet des interactions inappropriées avec des composants cellulaires, d'autres protéines, des membranes ou des métabolites ; ceci conduit à une dérégulation de la machinerie cellulaire (équilibre ionique, séquestration de protéines essentielles ...) conduisant à la mort cellulaire. L'accumulation de protéines tend aussi à augmenter le volume de l'organe atteint et à rompre l'intégrité du tissu dans lequel se fait le processus amyloïdogénique.

---

---

# MATERIELS ET METHODES

---

## I. MODELISATION MOLECULAIRE :

La modélisation moléculaire regroupe les méthodes servant à décrire et à prédire le comportement de molécules et de plus larges systèmes moléculaires en évaluant leur énergie. Celle-ci regroupe les méthodes de mécanique quantique, de mécanique moléculaire, et simulations de dynamique moléculaire. Toutes sont inévitablement associées aux méthodes de graphisme moléculaire permettant de visualiser et manipuler les molécules dans l'espace à trois dimensions (x, y, z). L'énergie d'une molécule dépend des positions dans l'espace de ses N particules, autrement dit de 3N degrés de liberté (3N - 6 lorsque l'on considère le système en coordonnées internes); aussi, plus l'énergie d'une configuration est basse et plus cette configuration a de chance d'exister et d'être stable lorsque la molécule est considérée comme isolée.

Un système moléculaire peut être totalement caractérisé en résolvant l'équation de Schrödinger:

$$H \Psi = E \Psi$$

$\Psi$  désigne la fonction d'onde, H l'opérateur Hamiltonien qui s'applique à  $\Psi$ , et E l'énergie du système. Cette équation ne peut être résolue analytiquement que pour un nombre très limité de particules, comme dans le cas de l'atome d'hydrogène ou de l'hélium par exemple. Lorsque le système moléculaire devient plus complexe, la solution analytique ne peut se faire et nécessite un ensemble d'approximations plus ou moins importante. Ainsi, l'électron présentant une masse 1836 fois inférieure à celle du proton, on peut considérer que les électrons s'adaptent instantanément aux changements de positions des noyaux. C'est l'approximation de Born-Oppenheimer qui permet de séparer les mouvements électroniques et nucléaires. L'énergie totale du système est alors égale à la somme de l'énergie nucléaire (répulsion des particules chargées positivement des noyaux) et de l'énergie électronique.

Quand les noyaux sont considérés fixes, les calculs sont concentrés sur les électrons qui se repoussent entre eux et se déplacent dans le champ électrostatique créé par les noyaux. C'est le principe de base utilisé dans les méthodes de chimie quantique, également désignées par le terme *ab-initio* et qui permettent de calculer la configuration la plus favorable pour une molécule, uniquement à partir de sa formule chimique. Le problème réside dans le fait que ces méthodes qui tiennent compte de la structure des orbitales électroniques ne sont applicables, pour le moment, qu'à des molécules ne présentant que quelques dizaines d'atomes non lourds.

En effet, elles nécessitent un nombre d'opérations énorme et donc des moyens de calcul très importants. Etant donné le nombre d'électrons contenus dans une molécule, l'utilisation d'autres méthodes (méthodes semi-empiriques) réduisant le nombre de particules à traiter, n'est toujours pas suffisant pour être raisonnablement envisageable pour des systèmes biologiques, ne serait-ce que pour une petite protéine, même si actuellement par exemple, des protéines hémiques sont traitées par ces méthodes. Les méthodes QM/MM (Quantum Mechanics / Molecular Mechanics) permettent de faire le relais entre les différents niveaux d'approximation.

D'autres types d'approximations ont été nécessaires à l'élaboration et au développement de méthodes destinées à l'étude de systèmes de plus grosses tailles comme les protéines ou les peptides, pouvant atteindre jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'atomes. Il s'agit des méthodes empiriques de mécanique moléculaire. Ces méthodes sont basées sur les principes de la mécanique classique, et non plus quantique, et se réfèrent aux positions des noyaux atomiques et non plus à celles des électrons des molécules.

Puisqu'elles ne tiennent pas compte de la structure électronique de l'atome, les méthodes de mécanique moléculaire ne permettent pas la création de liaisons covalentes comme c'est le cas dans les méthodes de chimie quantique.

La mécanique moléculaire est basée sur une description mécanistique de ce qu'est une molécule : les atomes sont assimilés à des points massiques ( $m$ ) chargés ( $q$ ) reliés entre eux par des liaisons (ressorts). Une telle description réductionniste, rendue possible par l'approximation de Born-Oppenheimer décrite plus haut, aboutit pour certains systèmes, à des résultats aussi convainquant que ceux obtenus avec une description quantique du problème.

## 1. Mécanique moléculaire :

### ***a. Fonction énergie potentielle empirique et champ de forces :***

Les méthodes de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire sont basées sur l'utilisation d'une fonction énergie potentielle empirique, qui regroupe les termes d'énergie nécessaires à décrire l'ensemble des interactions intra- et inter-moléculaires entre particules liées, et non liées, à l'intérieur d'un système moléculaire. Cette fonction dépend de l'ensemble des coordonnées (cartésiennes ou internes) de la (ou des) molécule(s). Dans ce travail, nous avons principalement utilisé le programme NAMD et le champ de forces CHARMM associé

(Phillips, Braun et al. 2005). Ce dernier utilise une description classique de la fonction d'énergie potentielle :

$$U_{total} = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{coulomb}$$

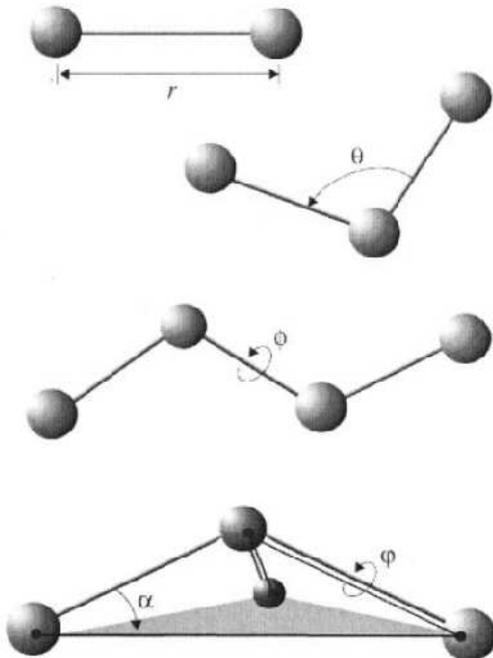
Les 2 premiers termes quadratiques décrivent les interactions associées à l'élongation des liaisons covalentes et la variation des angles formés par deux liaisons covalentes :

$$U_{bond} = \sum_{bonds\ i} k_i^{bond} (r_i - r_{0i})^2$$

$$U_{angles} = \sum_{angles\ i} k_i^{angle} (\theta_i - \theta_{0i})^2$$

Le 3<sup>ème</sup> terme regroupe les variations des torsions autour d'une simple liaison covalente et d'angles impropres :

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedral\ i} \begin{cases} k_i^{dih} (\phi_i - \gamma_i)^2, & n = 0, \\ k_i^{dih} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)], & n_i \neq 0, \end{cases}$$



**Figure 19 : Coordonnées internes pour les interactions liantes :  $r$  liaisons de valences,  $\theta$  angles de valences,  $\Phi$  angles dièdres valenciels,  $\phi$  angles impropres gouvernés par l'angle  $\alpha$  hors du plan.**

Les deux derniers termes décrivent les interactions non liantes entre paires d'atomes, respectivement sur le terme stérique et le terme électrostatique :

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>1} 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>1} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}$$

Les 3 premiers termes souvent désignés par le terme "interactions liantes" font référence à des atomes séparés par au plus 3 liaisons covalentes et regroupent les termes associés aux liaisons de valence  $r$ , aux angles de valences  $\theta$ , aux angles impropres  $\varphi$ , et aux angles dièdres valenciels  $\Phi$ . Les 2 termes suivants ou "interactions non-liantes" font référence à des paires d'atomes  $i, j$ , de charges respectives  $q_i$  et  $q_j$  et séparés d'une distance  $r_{ij}$  au-delà de 3 liaisons covalentes :

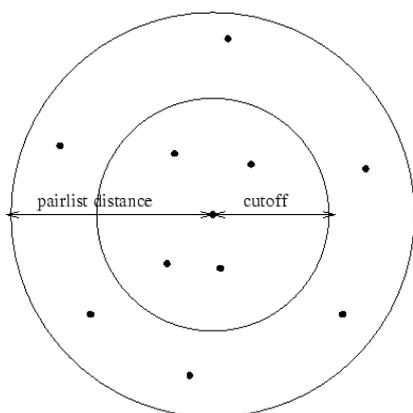
- un potentiel de Lennard-Jones traduisant les interactions de van der Waals comporte un terme internucléaire répulsif à courte distance (en  $r^{-12}$ ) empêchant les recouvrements stériques, et un terme attractif (en  $r^{-6}$ ) à plus longue portée servant à mimer les fluctuations des nuages électroniques;  $\varepsilon_{ij}$  représente la profondeur du puits de potentiel associé et la valeur de  $\sigma_{ij}$  (diamètre de Lennard-Jones) et dépend des caractéristiques des atomes  $i$  et  $j$ ,
- un potentiel coulombien associé aux interactions électrostatiques;  $\varepsilon$  représente la constante diélectrique du milieu, faisant écran aux charges  $q_i$  et  $q_j$  respectives des atomes  $i$  et  $j$ ,
- la constante diélectrique peut varier allant de 1 pour le vide à 80 pour l'eau; on peut également utiliser une valeur de  $\varepsilon(r)$  fonction de la distance  $r_{ij}$  entre chaque paire d'atomes. Le fait d'introduire une constante diélectrique donnée consiste à mimer le solvant de manière implicite. Dans les simulations lorsque le solvant est traité de manière explicite,  $\varepsilon$  doit être égale à 1.

Pour chaque particule, les paramètres  $k_i^{\text{bond}}$ ,  $r_{0i}$ , ... sont paramétrés dans le champ de forces pour qu'ils reproduisent fidèlement la structure, la dynamique et les propriétés thermodynamiques de petites molécules modèles très bien caractérisées expérimentalement. Dans le cas des protéines, par exemple, des acides aminés isolés ou bloqués, voire des dipeptides serviront à paramétrer le champ de forces.

### **b. Rayons de coupure ou cut-off :**

La plus grande part des ressources informatiques, lors des simulations, est dédiée au calcul des énergies non-liantes. Le nombre des interactions internes est petit comparé aux interactions non-liantes ( $\propto N^2$ ). En principe, toutes les interactions non-liantes entre les paires d'atomes sont calculées. Mais ces interactions sont négligeables passé une certaine distance. Nous avons donc recours à l'utilisation d'une distance de coupure (*cut-off*) pour ces interactions. Passée cette distance, les interactions non-liantes ne sont plus calculées. Lors de l'emploi d'une distance de coupure avec des conditions périodiques, il faut s'assurer d'utiliser une dimension de cellule et une distance de coupure de sorte qu'un atome n'interagisse pas avec son image et ne pas utiliser une distance de coupure plus grande que la moitié de la dimension de la cellule de base. En général, une distance de coupure de  $2\sigma$  est acceptable; En pratique, une distance de 10 à 12 Å est utilisée. L'utilisation d'une distance de coupure n'accélère pas beaucoup les calculs s'il faut calculer les distances entre chaque atome à chaque calcul d'énergie.

Un gain en temps de calcul est possible par l'utilisation d'une liste de voisins non-liés. Les voisins sont les atomes qui se retrouvent en dedans de la distance de coupure. Ces voisins ne changent pas significativement avant 10 ou 20 itérations. La distance de coupure pour la liste des voisins est légèrement supérieure à la distance de coupure pour les calculs d'énergie.



**Figure 20 : Différence entre le cutoff et la distance prenant en compte les voisins de l'atome considéré. Les paires listées sont autorisées à se déplacer au-delà du cutoff sans influencer sur la conservation de l'énergie.**

Nous avons donc recours à l'utilisation de 2 distances de coupure : une pour les interactions de van der Waals, l'autre pour les interactions électrostatiques.

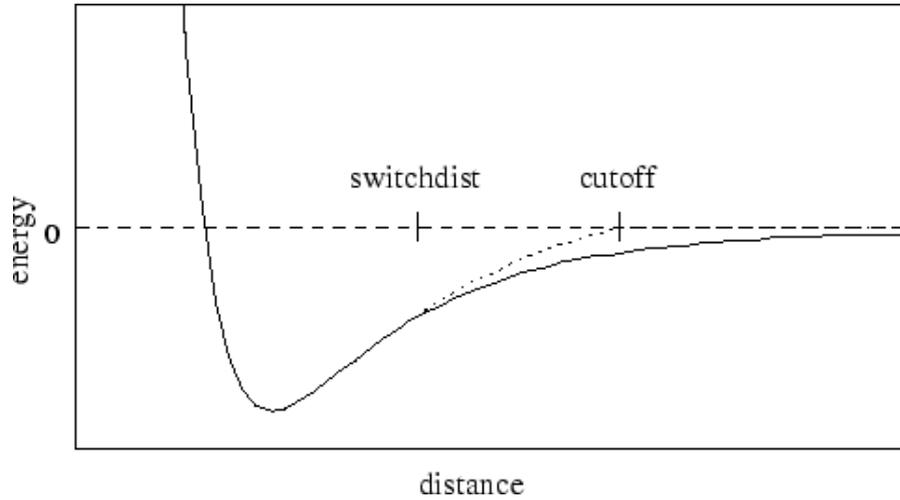
### **c. Les fonctions Shift et Switch :**

Pour le calcul des interactions de van der Waals, NAMD permet l'utilisation de la fonction *switch* définie comme suit, avec l'effet suivant sur la fonction énergie potentielle :

$$SW(R, R_{on}, R_{off}) = 0 \text{ pour } R > R_{off}$$

$$SW(R, R_{on}, R_{off}) = \frac{(R^2 - R_{off}^2)^2 \times (R^2 - R_{off}^2 - 3(R^2 - R_{on}^2))}{(R_{off}^2 - R_{on}^2)^3} \text{ pour } R_{off} > R > R_{on}$$

$$SW(R, R_{on}, R_{off}) = 1 \text{ pour } R < R_{on}$$

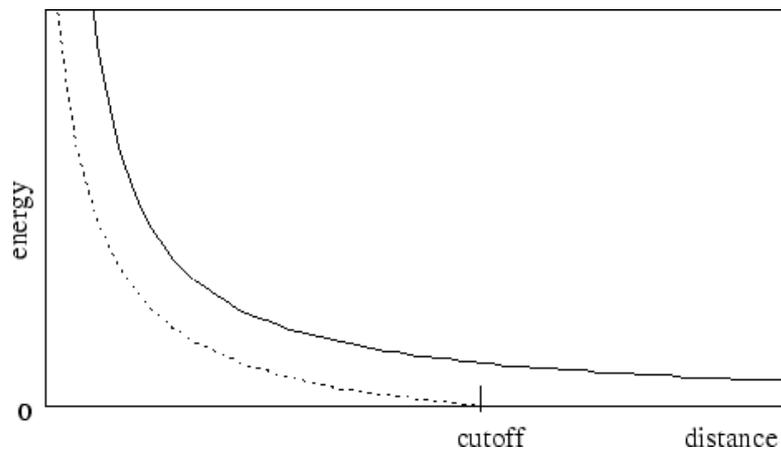


**Figure 21 : Potentiel de van der Waals avec ou sans la fonction *switch*.**

Cette méthode amène progressivement le potentiel à 0 entre les distances  $R_{on}$  définie par la variable *switchdist* et  $R_{off}$  définie par la variable *cutoff*. Ceci évite par ailleurs de tronquer brutalement la courbe d'énergie potentielle.

La fonction *shift* modifie toute la valeur de courbe d'énergie potentielle.

$$SH(R, R_{on}, R_{off}) = Q_i Q_j \frac{C}{\epsilon_0 R} \left(1 - \frac{R^2}{R_{off}^2}\right)^2$$



**Figure 22 : Effet de la fonction *shift* sur un potentiel électrostatique.**

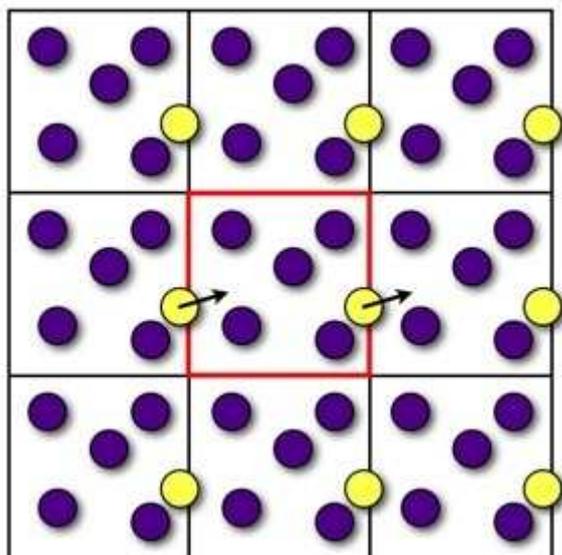
En ce qui concerne les interactions électrostatiques, nous avons utilisé la sommation d'Ewald (Ewald 1921). Le calcul se fait en deux parties : pour les courtes distances, il s'effectue de façon conventionnelle avec le *cut-off* alors que pour les longues distances il y a une sommation dans l'espace de Fourier, en utilisant une grille. Cette méthode permet de calculer les interactions électrostatiques d'un atome de charge  $q_i$  avec tous les autres atomes du système, ainsi qu'avec toutes ses images périodiques. Il n'y a donc plus de troncature des interactions électrostatiques ce qui permet d'avoir une meilleure modélisation de ce type d'interaction. "Particle Mesh Ewald" est une méthode efficace de calcul de la sommation d'Ewald (Darden, York et al. 1993; Essmann, Perea et al. 1995).

#### **d. Traitement de l'eau :**

Le modèle d'eau utilisé est le modèle TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar et al. 1983). Ce modèle rigide prend en compte les interactions coulombiennes et les expressions de Lennard-Jones, l'angle entre les atomes d'hydrogène est maintenu constant. Il comporte 3 sites d'interactions électrostatiques : charge négative de l'oxygène, charges partielles positives sur des hydrogènes. L'interaction de van der Waals entre deux molécules d'eau sera calculée d'après la fonction de Lennard-Jones avec seulement un simple point d'interaction par molécule centré sur l'atome d'oxygène.

Pour éviter non seulement que la densité du solvant au voisinage du soluté ne varie, mais aussi que la zone de solvant ne soit au contact direct du vide (effets de bord), des conditions périodiques aux limites sont imposées. Le système soluté-solvant constitue la boîte centrale qui est répliquée sous forme d'images dans toutes les directions de l'espace pour un total de  $[(3 \times 9) - 1] = 26$  images.

La fonction d'énergie potentielle n'est calculée que pour le système central et ses interactions éventuelles avec les atomes des boîtes images. Les éventuels mouvements de chacun des atomes sont ensuite répercutés dans toutes les images. Ainsi, si une molécule de solvant sort du système principal, par le jeu des conditions périodiques aux limites, l'image de cette même molécule est réintroduite dans la boîte primaire ce qui permet d'avoir toujours une densité constante du solvant.



**Figure 23 : Principe des conditions périodiques aux limites.**

***e. Méthodes de minimisation d'énergie :***

L'énergie potentielle d'un système à  $N$  atomes est une fonction de ses  $3N$  coordonnées cartésiennes décrivant une hypersurface d'énergie potentielle dans l'espace à  $3N$  dimensions. Il est impossible de représenter géométriquement cette surface dans sa globalité, sauf pour des cas très simples où l'énergie ne dépend que de deux coordonnées, auquel cas une représentation tridimensionnelle est possible. En modélisation moléculaire, on recherche à localiser les points de cette surface correspondant aux minima d'énergie identifiés par l'utilisation d'algorithmes de minimisation. Le point ayant une énergie maximale entre deux minima est d'intérêt: c'est un point de selle, ayant une conformation appelée structure de transition. Les minima et points de selle possèdent une dérivée première de la fonction d'énergie par rapport aux coordonnées qui est nulle. Le grand nombre de minima d'énergies d'un système moléculaire conduit souvent à un échec dans la localisation du point correspondant au minimum global d'énergie, et les techniques de minimisation décrites ci-dessous n'aboutissent souvent qu'à l'identification de minima locaux.

La méthode du gradient conjugué (GC) est la méthode implémentée dans NAMD. C'est une méthode qui possède de meilleures propriétés de convergence; elle tient son nom du fait qu'elle considère les étapes précédentes de minimisation pour s'orienter dans la meilleure direction.

Les autres méthodes largement répandues sont mais non implémentées dans NAMD :

- la méthode de la plus grande pente (“Steepest Descent” : SD) est une méthode non convergente qui aboutit à de faibles déplacements des atomes du système et sert principalement à éliminer les mauvais contacts (contacts stériques) lors de la construction de modèles moléculaires,

- les méthodes Newton Raphson (NRAP) et Adopted Basis Newton Raphson (ABNR) sont des méthodes convergentes basées sur le calcul de la dérivée seconde.

Aucune de ces méthodes ne garantit l’obtention du minimum global d’énergie, aussi il est souvent utilisés dans une séquence définie : d’abord SD puis GC ou ABNR pour converger en local.

## 2. Méthodes de Dynamique Moléculaire (DM) :

### a. Principe :

La description d’une molécule comme un ensemble de points massiques permet de lui appliquer les lois de la mécanique classique. La dynamique moléculaire permet d’engendrer des configurations successives au cours du temps d’un système moléculaire grâce à l’intégration des équations de Newton. Le résultat est une « trajectoire » qui décrit les positions et vitesses de tous les atomes de la molécule au cours du temps. La seconde loi de Newton s’écrit :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\delta^2 \vec{r}_i}{\delta t^2}$$

où  $\vec{F}_i$  est la force s’appliquant sur la particule  $i$ ,  $m_i$  est la masse de l’atome  $i$ ,  $\vec{a}_i$  son accélération,  $\vec{r}_i$  sa position.

NAMD utilise l’algorithme Verlet-vitesse (Allen and Tildesley 1987) pour l’intégration des équations de Newton. L’algorithme de Verlet classique utilise les positions et accélérations au temps  $t$ , et les positions de l’étape précédente,  $r(t - \delta t)$ , pour calculer les nouvelles positions à l’étape  $t + \delta t$ , en s’appuyant sur un développement limité :

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \dots$$

$$r(t - \delta t) = r(t) - \delta t v(t) - \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) - \dots$$

ce qui donne en combinant les deux équations précédentes :

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \delta t^2 a(t)$$

Il est alors possible d'obtenir les vitesses à partir des positions :

$$v(t) = \frac{[r(t + \delta t) - r(t - \delta t)]}{2\delta t}$$

L'algorithme de Verlet-vitesses calcule les positions à  $t+\delta t$ , en calculant tout d'abord les vitesses à  $\frac{\delta t}{2}$  :

$$v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = v(t) + a(t) \frac{\delta t}{2}$$

Les positions des atomes sont alors déduites à  $t+\delta t$  :

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

Les forces  $f(t+\delta t)$  et accélération  $a(t+\delta t)$  peuvent être calculées à partir des nouvelles valeurs de positions  $r(t)$ . Enfin, les vitesses au temps  $t+\delta t$  sont déduites :

$$v(t + \delta t) = v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) + a(t + \delta t) \frac{\delta t}{2}$$

Les vitesses initiales sont distribuées de façon aléatoire selon une distribution de Maxwell. Une simulation de dynamique moléculaire résout ces équations pour l'ensemble des atomes du système étudié, et ce itérativement, jusqu'à l'arrêt du calcul. Pour pouvoir appliquer ce type d'équations, il est nécessaire de choisir un pas d'intégration fini  $\Delta t$  (pour  $\delta t$ ) très inférieur à la période des mouvements les plus rapides à l'échelle atomique (vibration d'élongation d'une liaison X – H), c'est-à-dire de l'ordre de la femtoseconde (1 ou 2 fs). L'augmentation du pas d'intégration réduit la durée nécessaire pour les calculs mais néglige les phénomènes dont l'échelle de temps est inférieure à cette valeur, mais surtout risque de rendre le système instable. La procédure *SHAKE* (Ryckaert, Ciccotti et al. 1977) permet, en contraignant les longueurs de certaines liaisons, comme les liaisons impliquant un hydrogène, d'augmenter le

pas d'intégration de 2 fs. Enfin, un gain en temps de calcul peut être obtenu en utilisant un pas d'intégration différent pour les interactions à courte portée et les interactions à longue portée : *multiple timestep* (Street, Tildesley et al. 1978). En combinaison de la fonction *shake*, cette fonction permet d'utiliser un pas de 2 fs pour les interactions de courte portée et 4 fs pour les interactions de longue portée.

Pour un système considéré comme isolé, nous avons :  $E_T = E_C + E_P$  avec  $E_T$  l'énergie totale du système,  $E_C$  et  $E_P$  respectivement les énergies cinétique et potentielle.  $E_P$  est définie par la forme du champ de forces décrit précédemment. On relie  $E_C$  à la vitesse par la relation  $E_C = \frac{1}{2}mv^2$  ce qui fait ainsi le lien avec les positions  $r$  et l'accélération  $a$ .

De plus,  $E_C$  est relié à la température par la relation :  $E_C = \frac{3}{2}NkT$

avec  $N$  nombre d'atomes,  $k$  constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue en Kelvin. Cette relation explique que si la température augmente, la vitesse augmente et donc le mouvement.

L'équation de Langevin est utilisée dans NAMD pour générer une distribution de Boltzmann pour l'ensemble canonique (NVT, particules, volume et température constants), et ainsi contrôler la température.

$$M\dot{v} = F(r) - \gamma v + \sqrt{\frac{2\gamma k_B T}{M}} R(t)$$

où  $M$  est la masse,  $v$  est la vitesse,  $F$  la force,  $r$  la position,  $\gamma$  le coefficient de friction,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $R(t)$  la force sur l'atome  $i$  causée par des fluctuations aléatoires résultant des interactions avec le solvant, force aléatoire, non-corrélée avec la vitesse ou la position de l'atome  $i$ , changeante, dans le temps, et obéit à une distribution gaussienne centrée sur zéro.

Les deux derniers termes représentent un couplage à un réservoir thermique. Les paramètres de simulation concernant le contrôle de la température sont le coefficient de friction  $\gamma$  et la température désirée  $T$ .

Dans l'ensemble isobare-isotherme (NPT), le contrôle de la pression se fait également en utilisant l'équation de Langevin, par un couplage avec un piston agissant sur le système simulé. Les paramètres du contrôle de la pression sont :

- la pression désirée (les unités sont en bar avec NAMD, soit 1 atm=1.01325 bar),
- la température du piston  $T$  et sa période d'oscillation  $\tau$  (fs): ces valeurs sont reliées à la masse du piston  $W = 3N\tau^2k_B T$ .
- la friction exercée sur le piston est donnée via une échelle de temps de friction. Ce terme doit être égal ou plus petit que  $\tau$ .

### **b. Protocole de simulation :**

Toutes les simulations ont été réalisées dans l'ensemble isotherme-isobare (NPT : 298K, 1 atmosphère). La première étape consiste à obtenir les coordonnées de tous les atomes du système. L'ensemble des systèmes étudiés (peptides linéaires) sont construits en conformation étendue ( $\phi=180^\circ$ ;  $\psi=180^\circ$ ) en bloquant les extrémités N-terminale (acétylation,  $\text{COCH}_3$ ) et C-terminale (amination,  $\text{NH}_2$ ). Cette précaution permet d'éviter des effets d'attraction artificiels entre les extrémités chargées qui peuvent survenir pour des peptides de petite taille (5 à 15 résidus dans notre cas).

Le peptide est immergé dans une boîte d'eau, modèle TIP3P étendue d'au moins 13 Å (égal au *cutoff*) dans les trois directions de l'espace par rapport aux dimensions minimales du peptide. Toute molécule d'eau à moins de 2.8 Å du peptide est éliminée.

Le système est ensuite soumis à 5000 pas de minimisation en gradient conjugué puis 100000 pas d'équilibrage en réinitialisant les vitesses à 298K, avec un coefficient de friction de  $5 \text{ ps}^{-1}$ . Dans un 2<sup>ème</sup> temps, le système est de nouveau minimisé pendant 5000 pas et équilibré pendant 200000 pas à 298K. Le système est enfin équilibré pendant 250000 pas à 298K en diminuant la constante de friction à  $1 \text{ ps}^{-1}$ . La production proprement dite consiste à laisser le système évoluer à 298K, 1 atmosphère sur une durée totale de 50 ns. Les coordonnées, les vitesses et les énergies sont sauvegardées toutes les 5 ps. A la fin des 50 ns de simulation, la production nous donne 10000 structures.

### **3. Analyse des trajectoires :**

Les trajectoires sont visualisées sous VMD (Humphrey, Dalke et al. 1996). Ce logiciel inclut des utilitaires d'analyse.

**a. Rayon de giration :**

Le rayon de giration permet d'évaluer la compacité d'un peptide. Si le rayon de giration est élevé, le peptide est considéré comme étendu ; si le rayon de giration est petit, le peptide est replié. Cette variable peut-être intéressante pour mettre en évidence des équilibres entre conformations étendues et repliées.

$$R_{gyr} = \frac{(\sum_{i=1}^n w(i)(r(i) - \bar{r})^2)}{\sum_{i=1}^n w(i)}$$

avec  $r(i)$  la position de l'atome  $i$  et  $\bar{r}$  le centre géométrique

**b. RMSD :**

Le RMSD (*Root Mean Square Deviation*), écart quadratique moyen, traduit l'écart moyen sur la position des atomes entre deux structures superposées. En pratique, l'écart est calculé sur la position des  $C_{\alpha}$  ou sur les atomes de la chaîne principale. Le RMSD est évalué tout au long de la simulation par rapport à la structure initiale ou par comparaison entre toutes les structures générées au cours de la trajectoire.

$$RMSD(i, j) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \|\vec{r}_{i,n} - \vec{r}_{j,n}\|^2}$$

avec  $N$  nombre d'atomes du système et  $\vec{r}_{i,n}$  position de l'atome  $n$  dans la conformation  $i$ .

**c. Structures secondaires :**

Le suivi des structures secondaires est effectué sous VMD par l'intermédiaire du logiciel STRIDE (Frishman and Argos 1995). Cet algorithme se base à la fois sur l'existence de liaisons hydrogène et sur les valeurs des angles dièdres de la chaîne principale. Il permet l'attribution des coudes (T), des structures étendues type brin (E), de pont isolé (B), des hélices  $\alpha$  (H), des hélices  $3_{10}$  et des hélices  $\pi$ . Tout ce qui n'est pas attribué dans une des catégories précédentes est considéré comme boucle (coil) (Tableau 1).

Nous avons aussi utilisé l'algorithme PROMOTIF (Hutchinson and Thornton 1996) basé sur DSSP (Kabsch and Sander 1983). DSSP repose uniquement sur l'arrangement des liaisons hydrogène pour l'attribution des structures secondaires. Nous avons utilisé PROMOTIF car il permet l'attribution du type de coude  $\beta$  à partir des valeurs des angles dièdres des résidus  $i+1$

et  $i+2$  pour des coudes dont la distance entre le résidu  $i$  et le résidu  $i+3$  est inférieure à 7 Å. Cette méthode autorise une variation des angles  $\varphi$  et  $\psi$  de  $\pm 30^\circ$  par rapport aux valeurs canoniques.

L'évaluation de la polyproline II a été effectuée par extraction des angles  $\varphi$  et  $\psi$  sous VMD et filtrage sous R.

T	E	B	H	G	I	C
Turn	Extended Conformation	Isolated Bridge	$\alpha$ helix	$3_{10}$ helix	$Pi$ helix	Coil

**Tableau 3 : code couleur correspondant aux structures secondaires sous VMD.**

## **II. METHODES EXPERIMENTALES :**

### 1. Synthèse chimique :

Les peptides sont synthétisés en phase solide (SPPS) sur un synthétiseur APPLIED BIOSYSTEM 431A. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une matrice solide et insoluble (résine) sur laquelle la chaîne peptidique est liée de façon covalente par son acide aminé C-terminal. La synthèse est réalisée de l'acide aminé C-terminal vers le résidu N-terminal (sens inverse de lecture). Le principal avantage de cette approche réside dans le fait que le produit reste accroché à la matrice à chaque étape de la synthèse. Cela permet au cours de la purification, avec les solvants appropriés, de se débarrasser des excès de réactifs et des sous-produits de la réaction. De plus, les réactions se font dans une chambre unique réduisant les pertes de produits au cours des transferts des intermédiaires.

La fonction amine des acides aminés utilisés est protégée par un groupement Fmoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) pour permettre l'activation du groupement carboxylique par le DCC/HOBt (DiCyclohexylCarbodiimide/HydroxyBenzotriazole). Le cycle de synthèse en phase solide se déroule selon le schéma suivant :

- fixation covalente du résidu Fmoc-AA<sub>n</sub> à la résine,
- déprotection du groupement Fmoc en NH<sub>2</sub> du résidu AA<sub>n</sub>,

- liaison du résidu AA<sub>n-1</sub>, protégé en NH<sub>2</sub> et activé en COOH, au résidu AA<sub>n</sub>,
- répétition cyclique des deux étapes précédentes jusqu'à la fin de la synthèse,
- déprotection du résidu N-terminal.

Les réactions de déprotection du groupement Fmoc et d'élongation de la chaîne peptidique ont lieu dans une chambre de réaction tandis que l'activation du COOH se fait dans une chambre d'activation séparée.

Le détachement du peptide de la résine est effectué avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). En fonction des acides aminés composant le peptide il faut éventuellement procéder à l'élimination des groupements protecteurs fixés à l'extrémité des chaînes latérales.

La résine est ensuite filtrée sur un support poreux, lavée au TFA et au DCM (DiChloroMéthane). Le peptide est enfin précipité dans l'éther éthylique, centrifugé, resolubilisé dans l'eau et lyophilisé.

Un échantillon du peptide synthétisé est envoyé au centre de spectrométrie de masse du Centre National de la Recherche de Naples afin d'identifier la composition de l'échantillon et sa pureté. Si le poids moléculaire de produit synthétisé correspond au poids moléculaire attendu, la solution peut être purifiée.

## 2. Chromatographie Liquide Haute Performance :

Les peptides synthétisés sont purifiés par HPLC. Cette technique de séparation repose sur l'affinité des molécules pour les phases stationnaire et mobile. La phase stationnaire est constituée d'octadécylsilane (C18) greffé à un support en silice dont les particules font 10 µm et sont espacées de 300 Å; la phase mobile est constituée d'un mélange de solvant dont le rapport est variable au cours de la purification. Ainsi, pour la purification de peptide, la phase mobile est un mélange H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) et CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA).

## 3. Dichroïsme circulaire :

### a. Principe :

La lumière est une onde électromagnétique, associée à un photon d'énergie  $h\nu$ , constituée d'un vecteur champ électrique  $\vec{E}$  et d'un vecteur champ magnétique  $\vec{B}$  qui oscillent tous deux perpendiculairement à la direction de propagation (Figure 24). Pour la lumière

naturelle, le vecteur champ électrique peut prendre toutes les directions perpendiculaires à la direction de propagation, la lumière est non polarisée (Figure 25A).

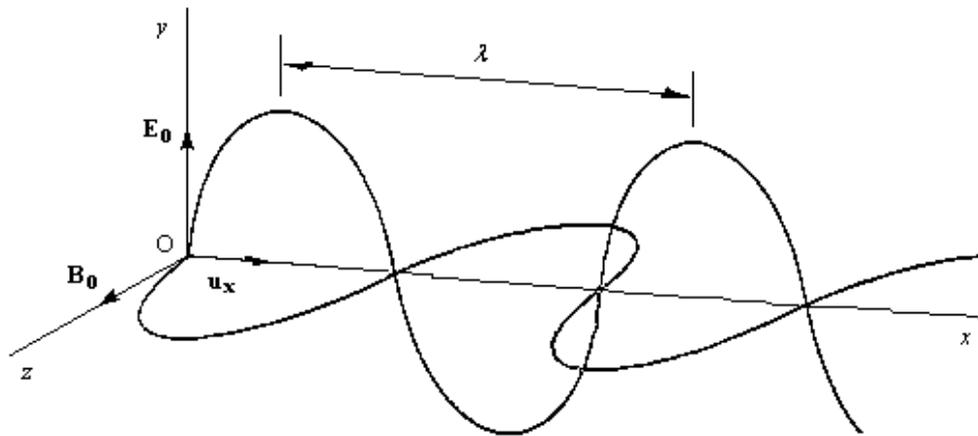


Figure 24 : Onde plane monochromatique sinusoïdale.

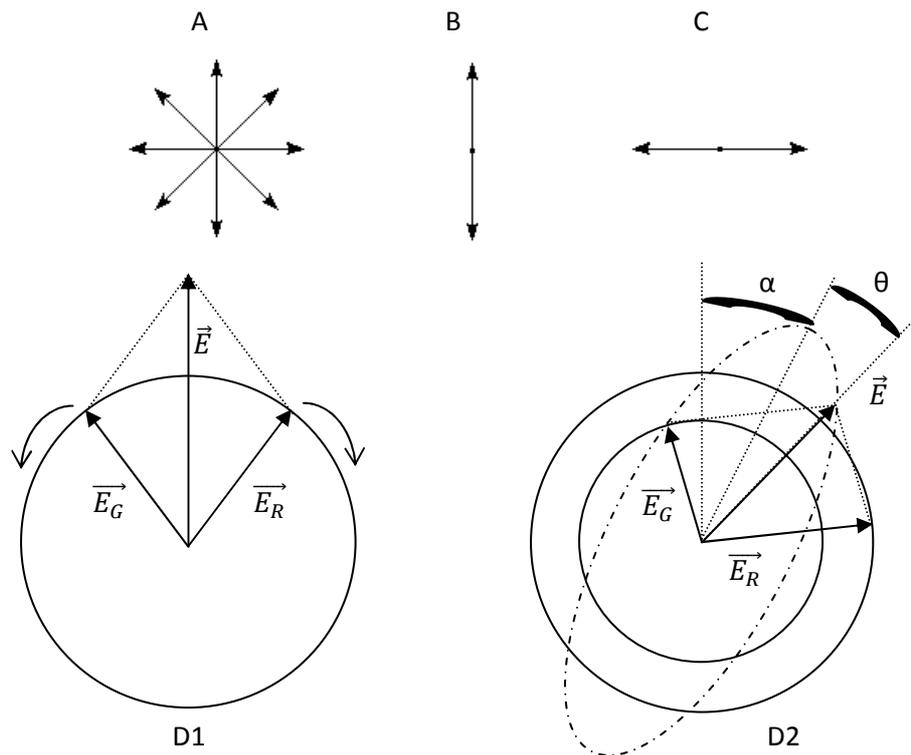
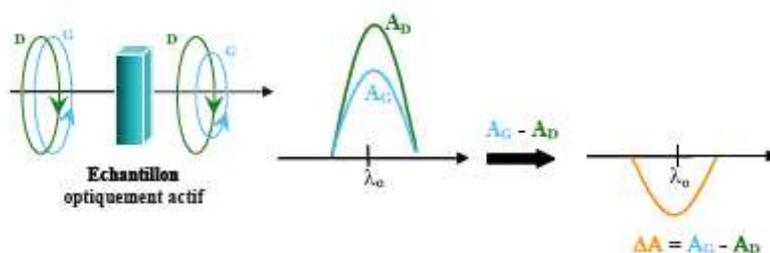


Figure 25 : (A) Direction de propagation de la lumière naturelle (B) de la lumière polarisée verticalement (C) de la lumière polarisée horizontalement. (D1) Champ électrique résultant des deux vecteurs équidistants  $E_D$  et  $E_G$  (D2) Activité optique  $\alpha$  et ellipticité  $\theta$  de la lumière polarisée dans un plan, émergent d'un milieu optiquement actif.

Lorsque la lumière est polarisée linéairement, le vecteur  $\vec{E}$  oscille dans plan unique (Figure 25B, C, D1). Les deux composantes  $E_x$  et  $E_y$  oscillent en phase. Un déphasage entre les deux composantes va induire un vecteur  $\vec{E}$  décrivant une ellipse (Figure 25D2).

On parlera alors d'onde polarisée elliptiquement. L'ellipticité  $\theta$  définit l'angle entre les deux demi-axe de l'ellipse formée. Une ellipticité nulle traduit une lumière polarisée linéairement. Pour un angle  $\theta$  valant  $45^\circ$ , le vecteur  $\vec{E}$  décrit un cercle, la lumière est alors polarisée circulairement. Selon le sens du parcours du cercle, la polarisation est droite ou gauche.

L'interaction de la lumière polarisée circulairement avec des molécules chirales donne lieu à au phénomène d'activité optique. Elle se manifeste par une modification de l'amplitude des composantes polarisées droite ou gauche ( $E_D$  et  $E_G$ ), et par un effet sur leur phase. Elle traduit une interaction des molécules avec la composante magnétique de l'onde lumineuse. Cette interaction est beaucoup plus faible que celle de la composante électrique mais elle est très sensible à la polarisation circulaire, alors que l'interaction électrique ne l'est pas. Seules les molécules chirales sont optiquement actives. En pratique, toutes les molécules biologiques sont chirales, c'est le cas des acides aminés par exemple qui possèdent un carbone asymétrique et un seul énantiomère. Le dichroïsme circulaire (Figure 26) est la différence  $\Delta A$  d'absorbance d'un échantillon chiral pour de la lumière polarisée circulairement successivement à gauche et à droite :  $\Delta A = A_g - A_d$



**Figure 26 : Principe optique du dichroïsme circulaire, différence d'absorbance  $\Delta A$  entre les lumières polarisées circulairement à gauche  $A_G$  et à droite  $A_D$ .**

Connaissant  $l$  le trajet optique en cm et  $C$  la concentration molaire en  $\text{mol.L}^{-1}$  en chromophore, on obtient le pouvoir dichroïque molaire :

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d = \frac{\Delta A}{l \cdot C}$$

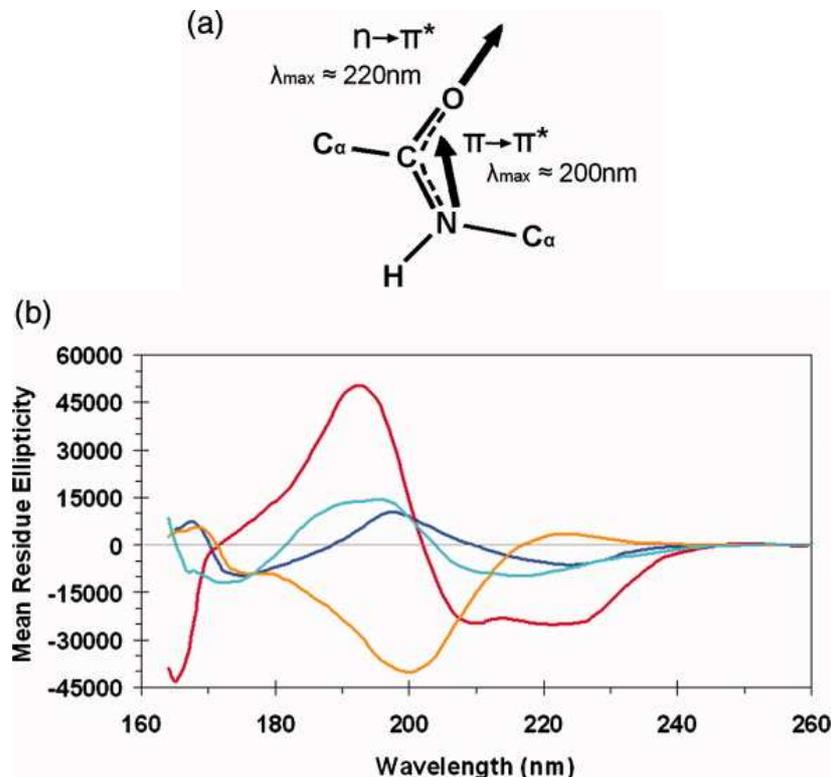
avec  $\varepsilon_g$  et  $\varepsilon_d$  les coefficients d'extinction molaire pour la lumière polarisée à gauche et à droite.

$\Delta\varepsilon$  est déterminé expérimentalement par mesure de  $[\theta]$ , ellipticité molaire exprimée en  $\text{degré}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  :

$$[\theta] = 3300 \cdot \Delta\varepsilon = \frac{100 \cdot \theta}{Cl}$$

**b. Application aux protéines :**

La spectroscopie de dichroïsme circulaire est un instrument permettant d'identifier la conformation d'un peptide ou d'une protéine et de suivre/identifier des équilibres conformationnels en fonction des conditions expérimentales telles que la température, le type de solvant, la présence de sels ou la concentration en peptide ou protéine. Le spectre DC d'une protéine est une somme de contributions des spectres liés aux éléments de structures secondaires qui la composent. Les différences entre des spectres enregistrés dans diverses conditions (températures différentes par exemple) doit permettre de mettre en avant les modifications conformationnelles mises en jeu.



**Figure 27 : (a) Orientation des transitions  $n \rightarrow \pi^*$  et  $\pi \rightarrow \pi^*$  dans la liaison peptidique (b) Spectres caractéristiques de protéines en hélice (rouge, myoglobine) en feuillet  $\beta$  (bleu, concavaline A ; cyan, beta-lactoglobuline), polyproline II (orange, collagène). Tiré de (Whitmore and Wallace 2008).**

Dans le cas des peptides et des protéines, le chromophore est la fonction amide de la liaison peptidique, responsable de l'absorption du signal de dichroïsme circulaire dans la région de l'UV lointain. Deux transitions électroniques sont à l'origine du signal : la transition  $n-\pi^*$  autour de 230 nm (impliquant les électrons non-liants de l'oxygène du carbonyle) et la transition  $\pi-\pi^*$  aux environs de 200 nm (impliquant les électrons  $\pi$  du carbonyle) (Figure 27A). L'intensité et l'énergie associées à ces transitions dépendent des valeurs des angles  $\varphi$  et  $\psi$  et donc des structures secondaires (Figure 27B).

L'hélice  $\alpha$  est caractérisée par un spectre de dichroïsme circulaire avec deux contributions négatives d'intensités proches à 210 et 220 nm, ainsi qu'une intense bande positive en dessous de 200 nm. L'allure du spectre associé à cette structure est très peu sensible aux conditions expérimentales, comme le solvant par exemple, de par la grande régularité de cette structure.

Les brins et feuilletts  $\beta$  donnent un spectre avec une bande négative vers 215 nm et une bande positive vers 195 nm. Les brins et les feuilletts donnent un spectre qui est beaucoup plus sensible à l'environnement et la nature des résidus qui les composent. De plus, les brins et feuilletts peuvent adopter une orientation parallèle ou antiparallèle et présenter des déformations par rapport à un brin ou un feuillet "idéal" qui modifient l'allure du spectre.

Les boucles présentent une forte bande négative dominante à 200 nm, ainsi qu'une petite contribution positive ou négative aux alentours de 220 nm.

Les coudes  $\beta$  sont plus difficiles à mettre en évidence par dichroïsme circulaire. Les valeurs des angles dièdres proches de l'hélice  $\alpha$  (coude de type I) ou du feuillet  $\beta$  (coude de type II) donnent des signaux confondus dans ceux provenant des hélices et des feuilletts dont les contributions sont plus fortes. Ainsi, les coudes sont difficilement détectables dans les protéines, par contre ils sont bien décrits dans la littérature pour de petits peptides : le coude de type I a une allure de spectre d'hélice  $\alpha$ , le coude de type II est caractérisé par une bande positive vers 200 nm, le coude  $\beta$  de type VIII présente un spectre proche d'une structure désordonnée avec une bande négative à 200 nm et un épaulement à 220 nm.

Une étude en température est requise pour mettre en évidence la présence de polyproline II. Le spectre associé à cette structure secondaire s'apparente au spectre d'une protéine ne possédant pas de structure secondaire. Le une bande négative dominante vers 195 nm et une bande positive aux alentours de 217 nm. Lorsque la température diminue, les deux bandes de

la PPII augmentent en intensité indiquant une structure plus stable soumise à moins d'agitation thermique. Cet effet de température n'est pas reproduit pour une protéine désordonnée.

D'un point de vue pratique, les spectres sont enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-600 à différentes températures, à la concentration de 0.1 mg/mL, dans une cellule de 0.1 cm. La température est maintenue par couplage à un bain HAAKE. Les spectres sont enregistrés dans l'intervalle 190-250 nm tous les 0.1 nm.

#### 4. Turbidimétrie :

La turbidimétrie est couramment employée dans les expériences de coacervation de la tropoélastine et ses dérivés peptidiques. Cette méthode exploite l'absorption et la réflexion d'un rayon lumineux de longueur d'onde connue. La turbidimétrie est enregistrée à 440 nm en fonction de la température sur un spectrophotomètre Cary UV50 équipé d'un système Peltier de contrôle de la température. Les mesures sont effectuées dans une cuve en quartz contenant 1.5 mL de peptide en solution dans l'eau ou tampon Tris 50 mM, NaCl 1.5 M et CaCl<sub>2</sub> 1 M à pH 7. La température de la solution est augmentée de 1°C/min et l'absorbance est mesurée à 440 nm.

---

# RESULTATS

---

## I. Etudes des peptides (XGGZG)<sub>1</sub>:

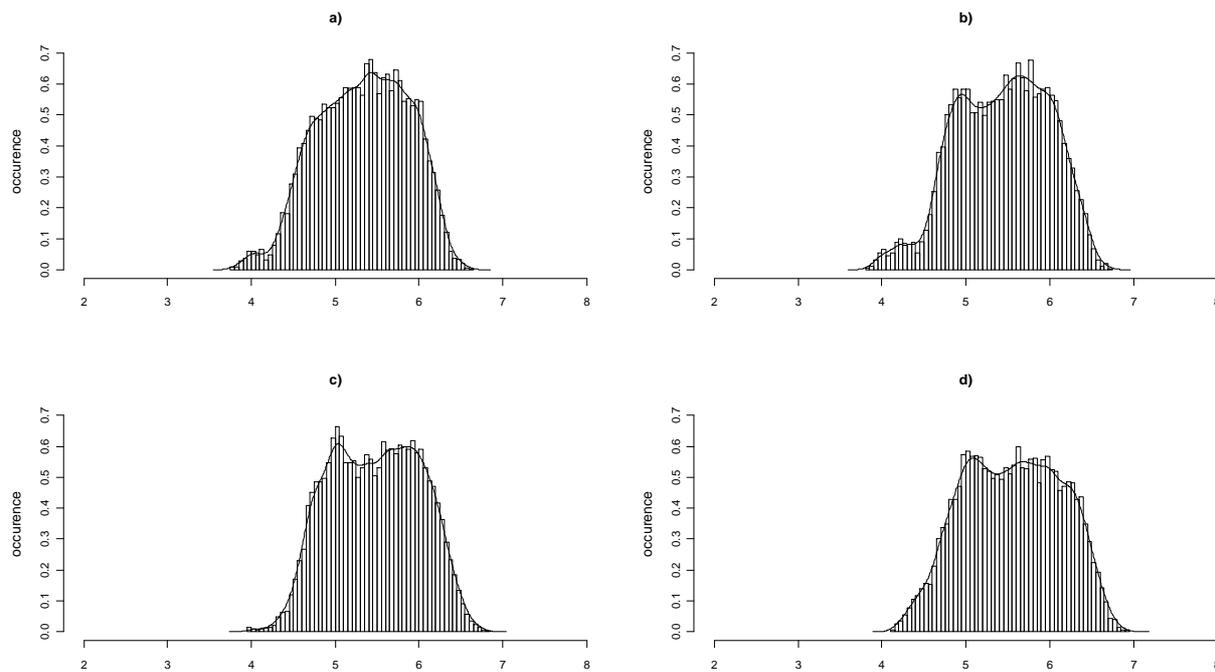
Dans cette partie nous allons tout d'abord nous intéresser aux comportements dynamiques des pentapeptides pour nous intéresser aux influences des chaînes latérales dans les différentes permutations étudiées.

L'ensemble des quatre peptides XGGZG avec toutes les permutations valine et leucine possibles a été simulé à 298 Kelvin en solvant explicite sous NAMD en utilisant le champ de forces CHARMM. Ces pentapeptides sont les suivants : VGGVG, VGGLG, LGGVG et enfin LGGLG, ce dernier peptide présentant les chaînes latérales les plus importantes. Les extrémités sont protégées par un groupement acétyle et amide en N et C terminal, respectivement. Bien qu'il ait été démontré expérimentalement qu'une longueur de séquence minimale d'environ 20 résidus soit nécessaire à la formation d'assemblages supramoléculaires, il nous paraît nécessaire de débiter l'étude par le motif XGGZG puisque ce dernier constitue le bloc minimal des différents peptides elastin-like qui seront étudiés dans ce travail.

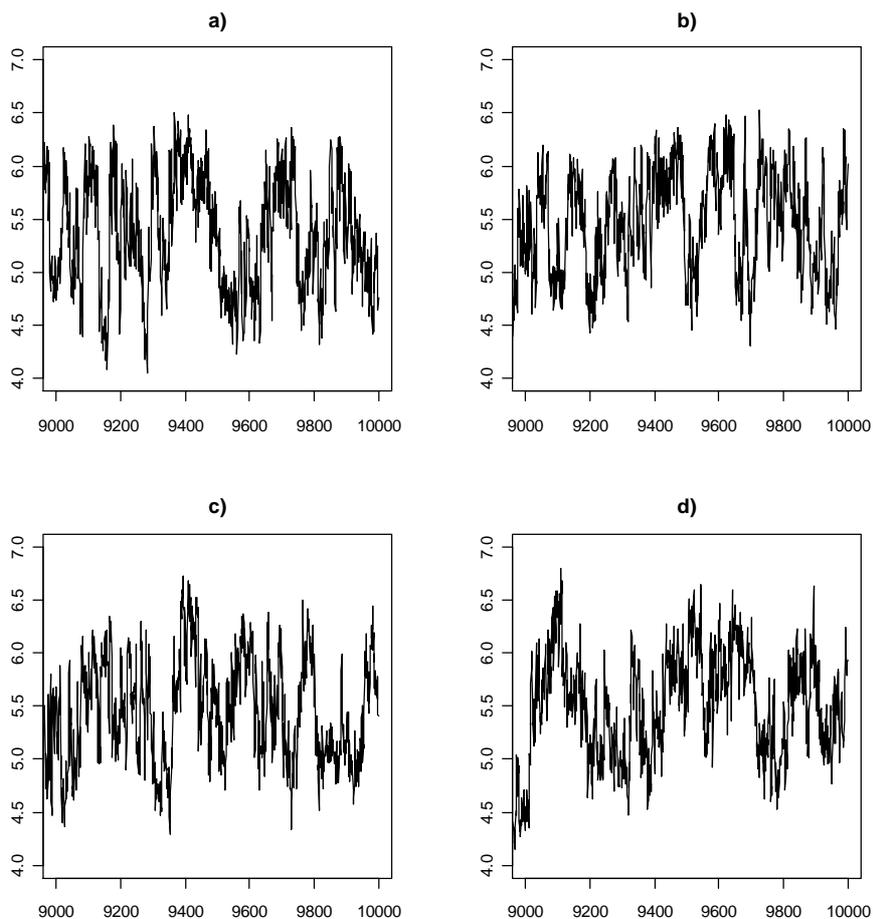
sequence	radius of gyration (mean, min, max, sd)	end-to-end distance (mean, min, max, sd)
VGGVG	5,333 (3,775   6,616   0,538)	11,100 (3,328   17,120   2,708)
VGGLG	5,438 (3,826   6,727   0,554)	11,010 (3,432   17,120   2,799)
LGGVG	5,474 (3,967   6,815   0,536)	11,600 (3,406   17,120   2,421)
LGGLG	5,554 (4,135   6,931   0,579)	11,230 (3,350   17,120   2,635)

**Tableau 4 : Statistiques des rayons de giration et distances mesurées bout à bout (bab), valeurs moyenne, minimale, maximale, et déviation standard.**

Pour chaque simulation, la distribution des distances entre les C $\alpha$  des résidus 1 et 5 (non montrée) ne semble pas faire apparaître de différences entre les peptides avec un maximum de population entre 10 et 15 Å. Au regard de la distribution des rayons de giration (Figure 28), il semble que pour les peptides VGGLG, LGGVG et LGGLG il y ait deux populations dont les rayons de giration sont centrés autour de 5 Å et 6 Å. La valeur moyenne de ce facteur augmente avec l'augmentation du contenu en leucine (Tableau 4). Ce constat n'est pas surprenant compte tenu de la différence de taille entre les chaînes latérales de la valine et de leucine (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> et C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, respectivement). Le peptide VGGVG a une distribution qui est plus équilibrée.

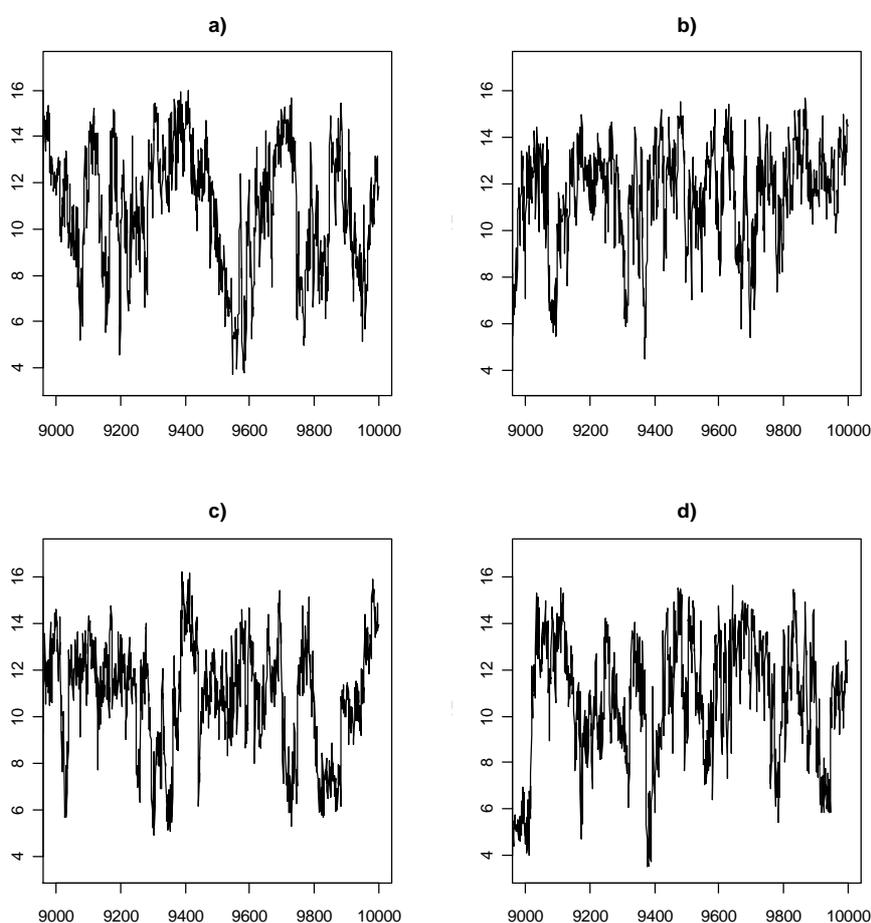


**Figure 28 : Histogrammes des rayons de giration pour les peptides a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.**



**Figure 29 : Rayon de giration au cours des 5 dernières nanosecondes de la trajectoire. a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.**

Si on s'intéresse à une courte portion de trajectoire (5 ns), nous pouvons constater que le rayon de giration fluctue énormément autour de la valeur moyenne. L'analyse de ce dernier sur la trajectoire entière ne permet pas de faire apparaître un état stable (étendu, replié ou intermédiaire) sur une échelle de temps suffisamment longue. Cependant, il semble qu'il soit possible de mettre en évidence un équilibre avec des échanges très rapide entre des structures plus ou moins repliées et étendues sans pour autant avoir une prédominance de l'une ou l'autre. L'analyse de la distance (Figure 30) entre les deux  $C\alpha$  en position 1 et 5 sur la même échelle de temps (5 ns) permet de traduire le même comportement oscillant entre des structures compactes ( $<10 \text{ \AA}$ ) et plutôt étendues ( $>10 \text{ \AA}$ ).



**Figure 30 : Distance bout à bout mesurée au cours des 5 dernières ns de trajectoire. a) VGGVG, b) VGGLG, c) LGGVG, d) LGGLG.**

Sur des peptides de cette taille et ayant trois glycines, il est difficile de tirer des conclusions permettant de caractériser précisément le comportement des peptides. Il est aussi peu probable de voir apparaître des structures secondaires telles que les hélices ou les brins clairement formées. Mais comme il a déjà été montré au laboratoire, de courts peptides

peuvent former des coudes qui leurs confèrent, par ailleurs, parfois une activité biologique. Au delà de ces considérations, les peptides que nous étudions adoptent environ 25 % (somme des coudes observés sur l'ensemble des 10000 structures finales) de structures en coude avec des Ca des résidus i et i+3 distants de moins de 7 Å au cours de la trajectoire (Tableau 5) Tableau 5 : Attribution des coudes β pour chacun des peptides XGGZG.. Le détail de l'attribution des coudes montrent que le type IV (ne répondant pas à des critères d'attribution particuliers) est largement majoritaire. Seul le peptide LGGVG montre un plus faible nombre de coude, nombre qui est de plus déplacé sur le coude LGGV.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	
VGGV	4	3	44	2	949	18	1020
GGVG	5	0	0	24	1374	17	1420
VGGL	0	1	48	24	1055	28	1156
GGLG	14	0	0	27	1442	5	1488
LGGV	2	1	9	3	901	39	955
GGVG	0	0	0	13	494	9	516
LGGL	5	7	7	27	1150	29	1225
GGLG	18	0	0	29	1164	26	1237

Tableau 5 : Attribution des coudes β pour chacun des peptides XGGZG.

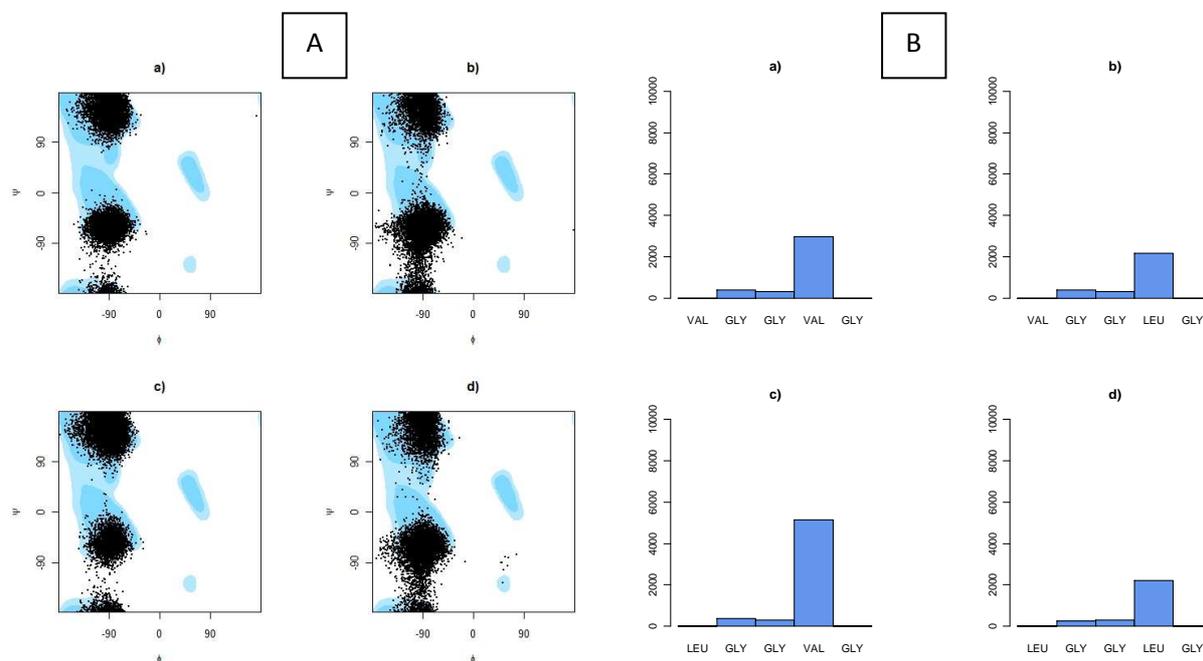
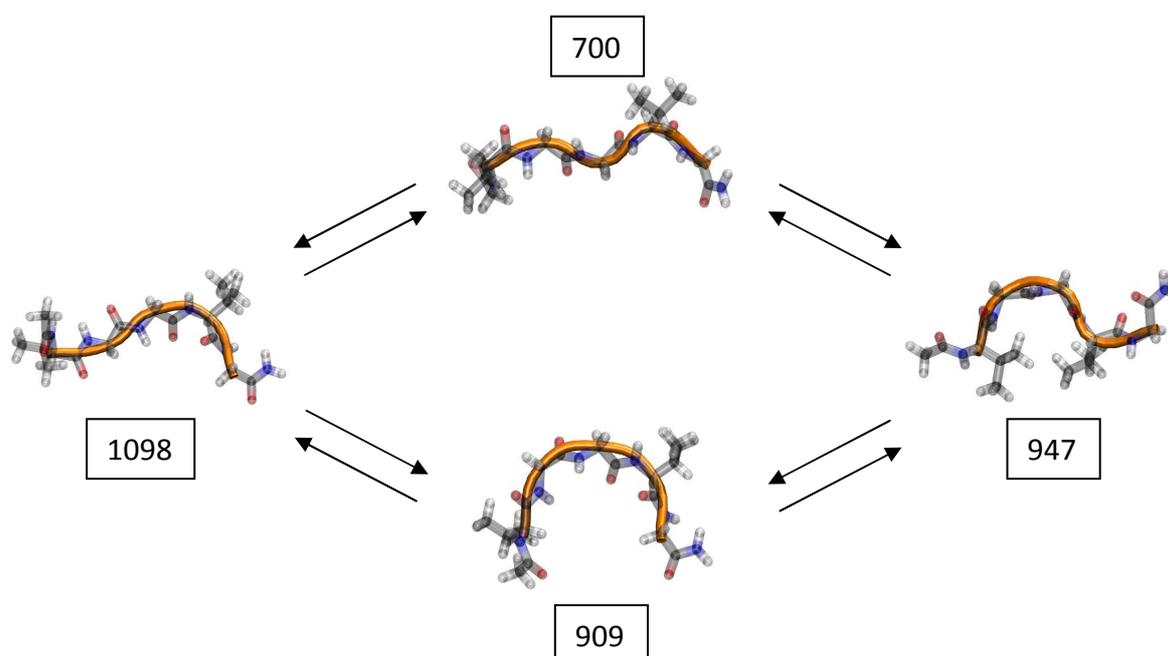


Figure 31 : Diagrammes de Ramachandran du résidu en position 4 (A) et structuration en polyproline II (B), pour les peptides VGGVG (a), VGGLG (b), LGGVG (c), LGGLG (d).

Le détail de l'analyse de la polyproline II (Figure 31) met en évidence une propension plus favorable de la valine à explorer des angles  $\phi$  et  $\psi$  dans la région  $-75^\circ ; +145^\circ$  lorsque ce résidu est en position 4 par rapport à la leucine. Il n'est pas possible de mesurer cette structure secondaire dans le cas des résidus en position 1 et 5 par absence de l'angle  $\phi$  ou  $\psi$ .

Le regroupement en famille de conformation nous permet de rassembler les conformations proches les unes des autres en structures représentatives. Cette opération est réalisée avec l'outil `g_cluster` disponible dans le package GROMACS. Le seuil de coupure retenu pour la séparation des différentes structures est de  $0.8 \text{ \AA}$ , et permet de générer environ 50 clusters pour chaque séquence. Les dix premiers clusters sont suffisants pour décrire 70 % des structures tandis que les vingt premiers décrivent 90 % des structures.



**Figure 32 : Equilibre de conformations pour le peptide VGGVG illustrant le phénomène de coude glissant. La population de chaque conformation est indiquée.**

Les cinq premiers clusters de chaque peptide illustrent le comportement en coude glissant de l'élastine où existent en équilibre des structures étendues (1), très repliées (2), et des structures intermédiaires (3) (Figure 33). Ainsi, par exemple pour le peptide VGGVG (Figure 32), l'équilibre peut être décrit de la façon suivante (la population de chaque structure représentative est indiquée) : la difficulté à établir des conformations stables au cours de la trajectoire vient d'une part du contenu en glycine mais aussi de l'exposition directe au solvant des résidus hydrophobes. A la différence de ce qui peut se produire dans un exon ou dans la

---

molécule de tropoélastine entière, les domaines hydrophobes ne peuvent pas se regrouper et minimiser les interactions avec le proche environnement que constitue l'eau.

Les simulations sur l'ensemble de ces peptides, réalisés en début de thèse sur le ordinateur ROMEO1 de notre université, montrent un comportement classique des peptides élastiques retrouvés dans l'élastine et qui ont déjà fait l'objet de nombreuses études dans notre groupe. Il apparaît, que nonobstant l'encombrement de la chaîne latérale grandissant, les pentapeptides étudiés montrent un équilibre entre de nombreuses conformations. La théorie des coudes glissants, initialement proposé par le Pr A. Tamburro, se trouve ici de nouveau vérifiée. Pour passer d'une structure étendue ou quasi étendue à repliée, le peptide doit passer par des intermédiaires de polyproline II et présenter des coudes qui vont se déplacer selon la chaîne (ici les peptides étant courts, il ne peut y avoir que des coudes sur les 4 premiers résidus ou sur les 4 derniers).

Dans le paragraphe suivant, nous allons nous intéresser aux mêmes motifs peptidiques et aux mêmes combinaisons en augmentant la taille du peptide. Il est évident qu'un décapeptide ne devrait pas permettre l'obtention de deux brins  $\beta$  qui pourraient s'associer en feuillet, mais nous souhaitons regarder le comportement conformationnel de chacun de ces peptides avec un regard plus particulier sur la jonction entre deux motifs successifs.

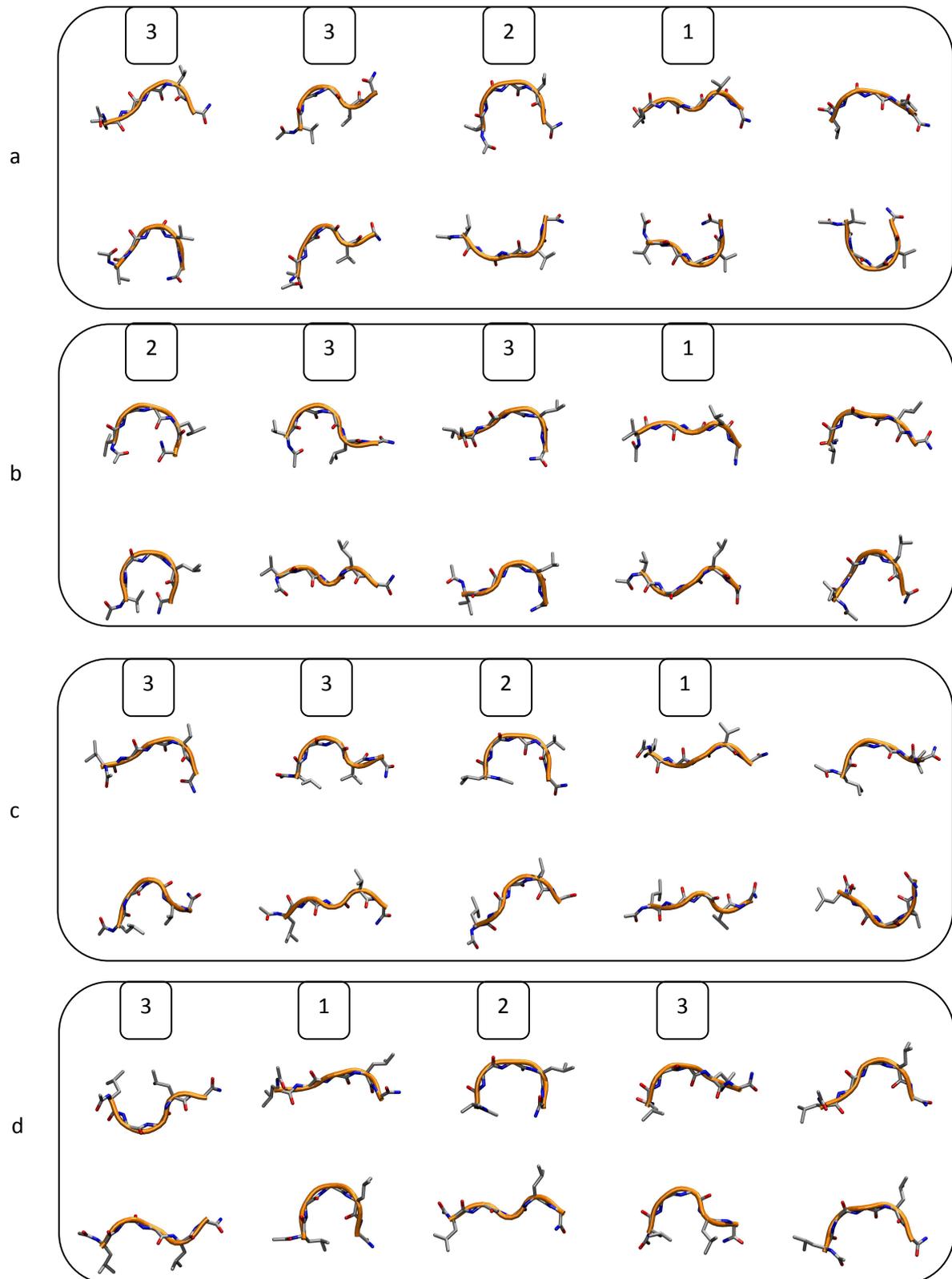


Figure 33 : Structures représentatives des 10 premiers clusters pour chaque peptides a) (VGGVG), b) (VGGLG), c) (LGGVG), d) (LGGLG).

## II. Etude des peptides (XGGZG)<sub>2</sub>:

Les quatre combinaisons ont été étudiées dans les mêmes conditions que précédemment. Comme pour les peptides simples (5 résidus,  $n=1$ ), les décapeptides présentent une grande variation du rayon de giration (Figure 34) ne montrant pas de stabilité à établir une structure compacte sur un temps long. Nous pouvons constater une fluctuation permanente entre des valeurs allant de 6 à 10 Å.

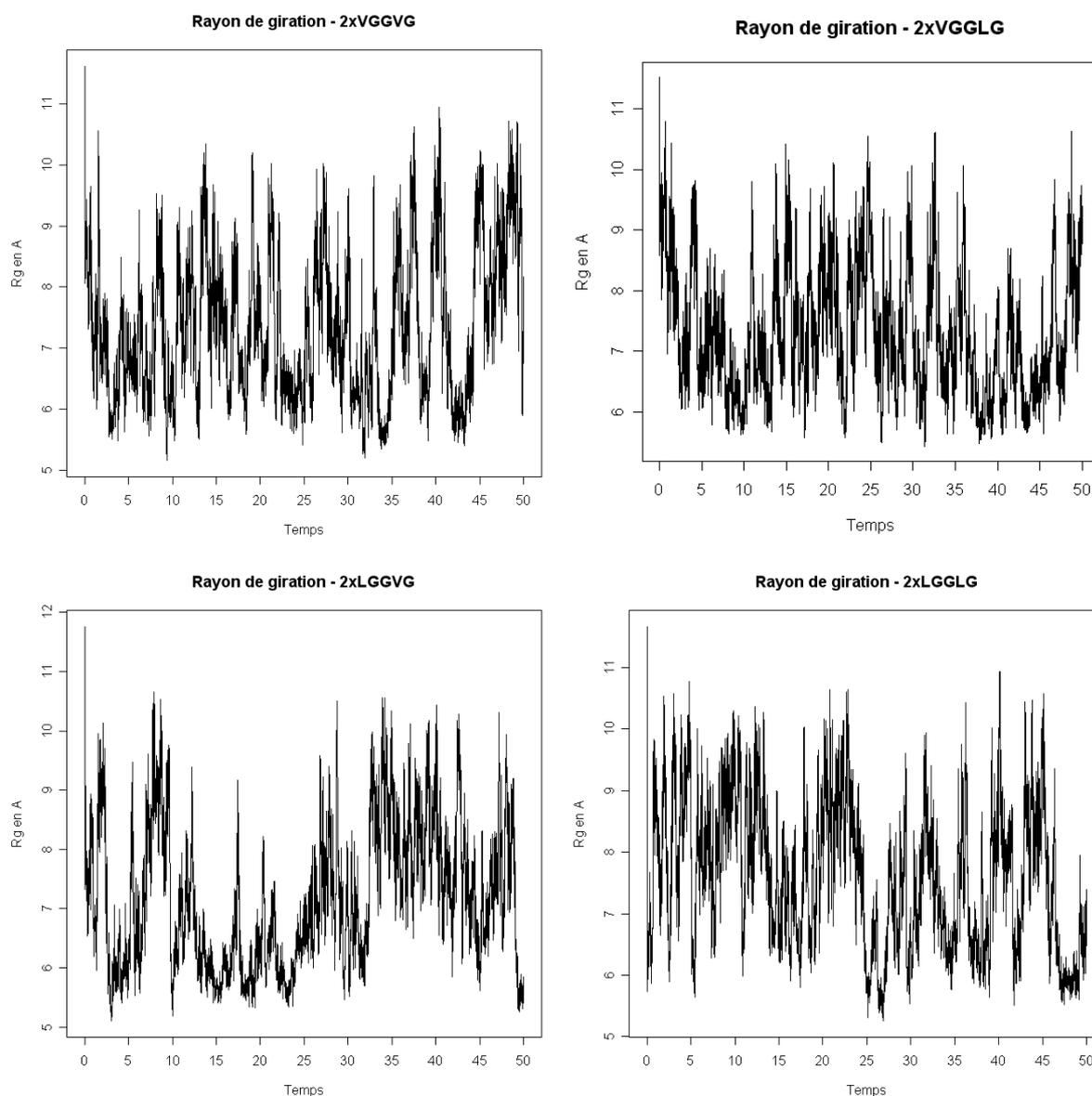


Figure 34 : Rayon de giration mesuré pour chacun des peptides XGGZG.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1VGGV4	13	0	86	6	887	34	1026
2GGVG5	8	0	0	87	2122	1	2218
3GVGV6	153	0	293	0	2730	278	3454
4VGVG7	4	0	0	5	1101	22	1132
5GVGG8	41	0	88	0	842	53	1024
6VGGV9	1	7	3	1	978	23	1013
7GGVG10	6	0	0	30	1528	15	1579

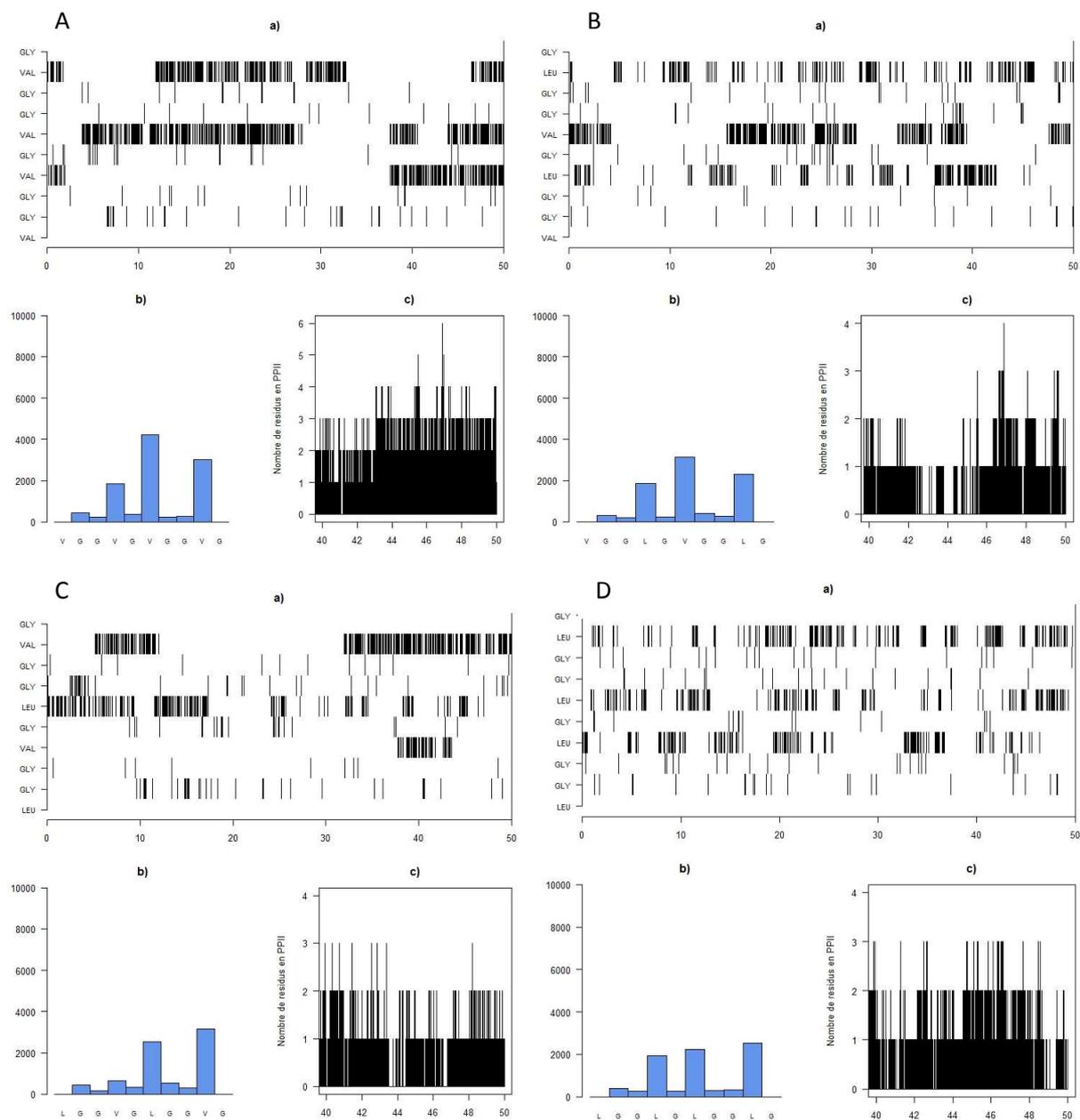
	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1VGGL4	2	24	3	19	1015	40	1103
2GGLG5	16	0	0	28	1545	24	1613
3GLGV6	47	0	271	0	2280	111	2709
4LVGV7	3	0	0	49	2708	18	2778
5GVGG8	94	0	29	0	1139	58	1320
6VGGL9	3	9	2	16	1124	37	1191
7GGLG10	11	0	0	25	952	5	993

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1LGGV4	4	1	16	0	752	8	781
2GGVG5	21	0	0	83	2938	0	3042
3GVGL6	72	0	2	0	2459	376	2909
4VGLG7	0	0	0	19	1165	21	1205
5GLGG8	136	0	130	0	1260	132	1658
6LGGV9	0	4	61	19	976	17	1077
7GGVG10	5	0	0	17	1312	12	1346

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1LGGL4	0	33	25	5	707	15	785
2GGLG5	32	0	0	27	1775	1	1835
3GLGL6	97	0	9	0	1320	162	1588
4LGLG7	2	0	0	22	1251	29	1304
5GLGG8	170	0	246	0	1836	83	2335
6LGGL9	2	0	14	7	758	40	821
7GGLG10	10	0	0	33	1113	7	1163

**Tableau 6 : Attribution des coudes  $\beta$  pour chacune des répétitions (XGGZG)<sub>2</sub>.**

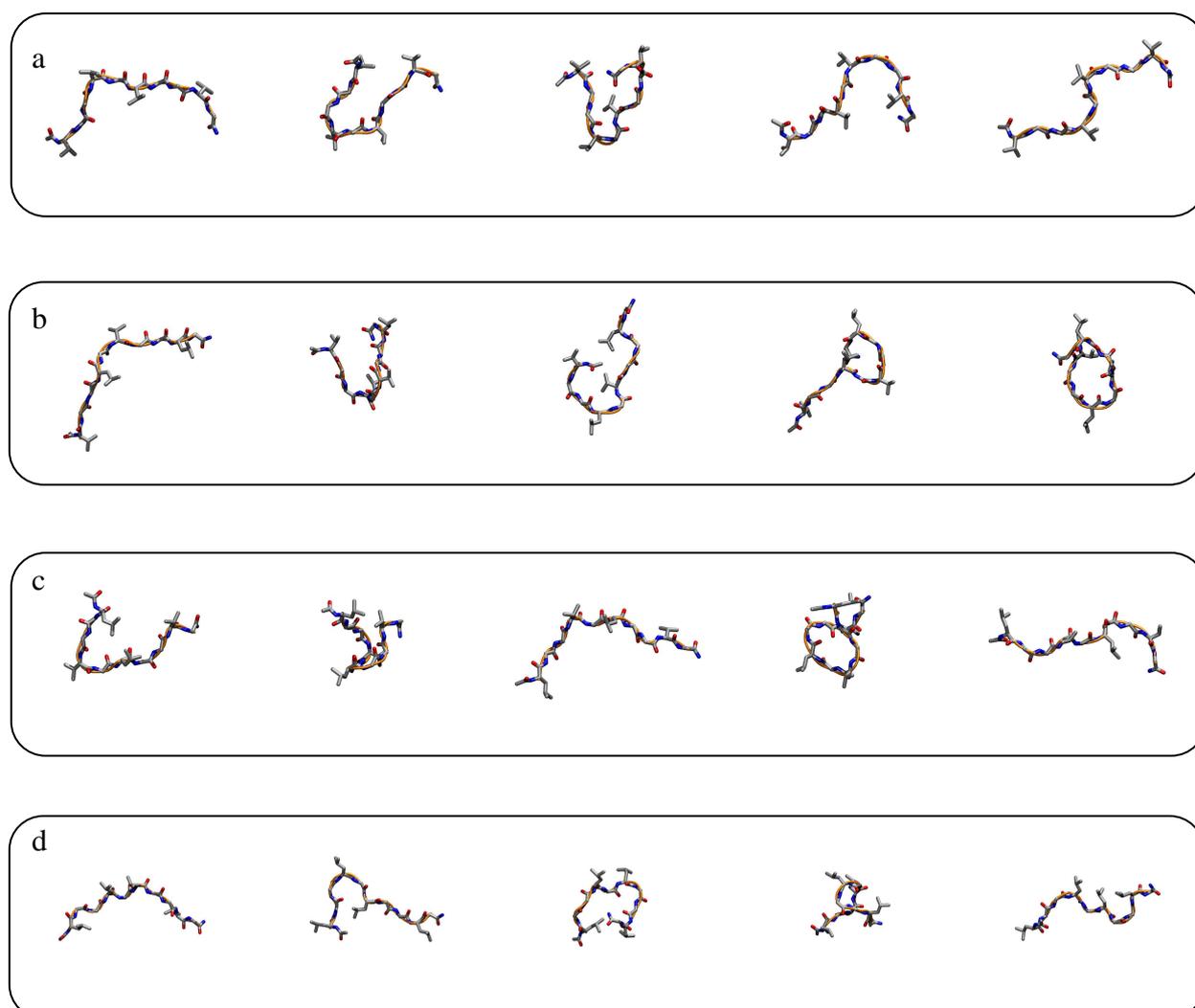
Nous pouvons remarquer que pour les 3 premiers peptides, les deux coudes qui sont majoritaires sont chevauchants, ce qui n'est pas le cas pour le peptide (LGGLG)<sub>2</sub>. Ceci traduit un équilibre de coudes glissants sur les 5 résidus consécutifs (Tableau 6). Les coudes sont très largement du type IV quelque soit le peptide considéré avec entre 20 et 30 % de cette conformation sur le térapeptide impliqué. Les coudes identifiés dans les 4 séquences se situent sur les résidus GX et XG indépendamment de la nature du résidu X (Val ou Leu).



**Figure 35 : a) Résidus en polyproline II au cours des trajectoires. b) nombre d'observation pour chaque résidu. c) nombre total de résidus simultanément en PPII. A) (VGGVG)<sub>2</sub>, B) (VGGLG)<sub>2</sub>, C) (LGGVG)<sub>2</sub>, D) (LGGLG)<sub>2</sub>.**

La quantification des résidus en PPII (Figure 35) au cours des trajectoires indique clairement une plus grande propension de la valine à explorer cette zone du diagramme de Ramachandran comparativement à la leucine.

D'une part, pris individuellement le résidu valine en position 6 dans les peptides  $(VGGVG)_2$ ,  $(VGGLG)_2$  est celui qui est le plus retrouvé en PPII alors que la leucine est quantifiée aux environs de 20% en PPII. De plus, sur les 10 dernières nanosecondes de trajectoire le VGGVG peut compter jusqu'à 6 résidus simultanément en PPII (sur les 8 que nous prenons en considération) tandis que les autres séquences en compte successivement 4 puis 3.



**Figure 36 : Structures représentatives des 5 premières famille de conformation pour a)  $(VGGVG)_2$ , b)  $(VGGLG)_2$ , c)  $(LGGVG)_2$ , d)  $(LGGLG)_2$ .**

Si on s'intéresse plus particulièrement à la répartition des différentes familles de conformations au cours de la dynamique (Figure 36), nous pouvons constater que les structures représentatives des 5 premiers clusters de chaque répétition sont principalement des structures étendues qui ne présentent pas de structures secondaires autres que les coudes  $\beta$  que nous avons déjà traités.

Sur ces différentes simulations, il apparaît que la encore il y a un équilibre entre les différents états possibles des peptides élastiques. Cependant, lorsque la chaîne latérale augmente, la conformation se retrouve guidée par l'orientation des chaînes latérales des leucines. Quand il est possible, celles-ci tentent de se regrouper par 2 pour limiter les interactions avec le solvant (Figure 36d par exemple). Les résidus qui sont à la frontière de la répétition comme par exemple la valine 6 décrite ci-dessus, ont une propension importante à se retrouver en conformation PPII et permettre ainsi d'avoir des amas de résidus autour de cette position dans cette conformation.

Dans le paragraphe suivant, nous allons aborder les motifs pentapeptidiques répétés 3 fois. Il est évident que dès lors avec des peptides de 15 amino-acides, la longueur doit permettre un repliement suffisant pour former deux brins betas connectés par un coude. Cette répétition de trois motifs est aussi intéressante car elle représente la longueur maximale (même si celle-ci n'est pas constituée d'homo-répétition) dans la séquence d'élastine.

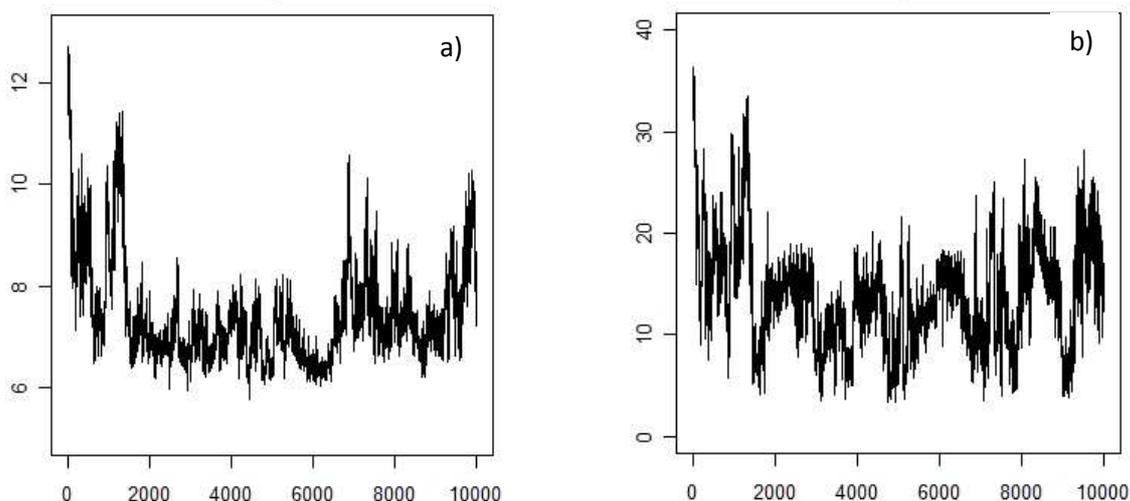
### III. Etude des peptides (XGGZG)<sub>3</sub> :

De nouveau nous étudions les motifs répétés 3 fois avec les mêmes conditions de simulations. Cependant, nos simulations sont plus longues, réalisées sur ROMEO2, supercalculateur parallélisé BULL de 106 processeurs. Sur le premier motif, nous avons par ailleurs regardé l'influence de la température.

Nous avons souhaité augmenter la taille des peptides jusqu'à 15 amino-acides pour voir s'il était possible, par simulations de dynamique moléculaire d'observer, à partir d'une structure tout étendue, un repliement qui permettrait d'observer une formation de brins  $\beta$  qui amènerait à un « petit » feuillet  $\beta$ . Nous sommes bien conscients que les méthodes utilisées ne sont pas optimisées pour expliquer le repliement à partir de la séquence pour de grands peptides et des protéines. Cependant, dans le cas étudié, nous espérons obtenir des informations de structures à partir d'une conformation tout étendue dans une boîte de solvant. De plus, nous savions par expérimental grâce aux travaux du groupe du professeur Tamburro, que chacun des poly(XGGZG) obtenus par synthèse chimique et caractérisés expérimentalement aboutissaient à la formation de fibres amyloïdes parfaites.

#### 1. Dynamique moléculaire du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à 298 K :

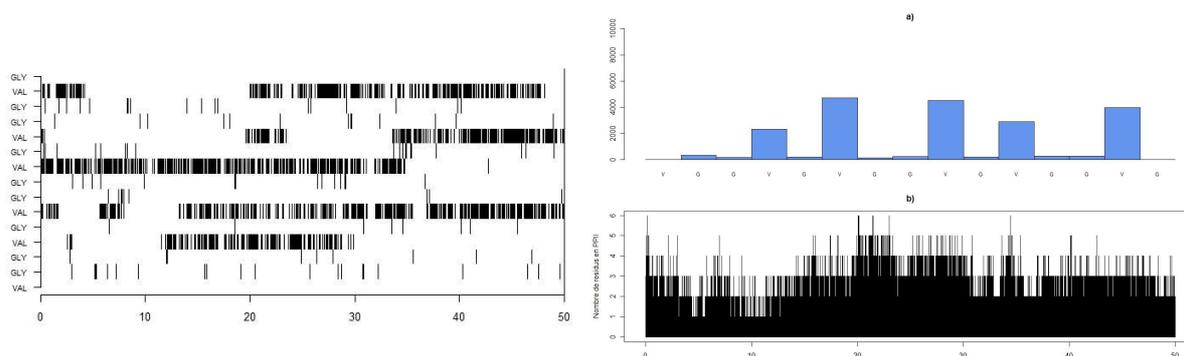
La distance mesurée bout à bout et le rayon de giration sont reportés dans la Figure 37.



**Figure 37 : a) Rayon de giration et b) distance mesurée bout a bout au cours de la simulation du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à 298 K.**

Le peptide (VGGVG)<sub>3</sub> adopte une structure compacte dans les 10 premières nanosecondes de simulation associée un rayon de giration entre 6 et 8 Å et à une distance bout à bout oscillant entre 5 et 20 Å. Le peptide tend à explorer de nouveau des structures un peu plus étendues vers la fin de la simulation (au delà de 35 nanosecondes), la distance bout à bout dépassant régulièrement 20 Å.

Dans la Figure 38, sont reportés les résidus explorant une conformation en PPII ainsi que la quantification résidu par résidu, sans tenir compte des résidus aux extrémités. Nous pouvons constater que chacun des 5 résidus valine peut présenter des angles dans cette région du diagramme de Ramachandran ( $\phi=-75^\circ$ ;  $\psi=+145^\circ$ ) avec une variation autorisée de  $\pm 30^\circ$  en accord avec la méthode définie par Hutchinson et Thornton (Hutchinson and Thornton 1996). Les résidus en position 6, 9 et 14 ont une plus grande propension à adopter cette conformation au cours de notre trajectoire à 298 K. Les résidus glycine, malgré leur nombre (8) ont une très faible propension à former de la PPII. Nous pouvons de plus observer de 0 à 6 résidus simultanément en PPII.



**Figure 38 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, a) quantification et b) résidus simultanément dans cette conformation.**

Les résultats de la détermination des coudes  $\beta$  sont reportés dans le Tableau 7. Le coude le plus représenté est localisé sur les résidus <sup>5</sup>GVGG<sup>8</sup> (~25%). Nous pouvons remarquer que l'ensemble des coudes présents au cours de la trajectoire sont très largement du type IV. Néanmoins, certains ont une tendance à être de type I (<sup>10</sup>GVGG<sup>13</sup>), de type II (<sup>5</sup>GVGG<sup>8</sup> et <sup>8</sup>GVG<sup>11</sup>), II' (<sup>7</sup>GGVG<sup>10</sup>). Enfin, des coudes de type VIII sont identifiés sur les résidus <sup>3</sup>GVG<sup>6</sup> et <sup>10</sup>GVGG<sup>13</sup>. Cependant, les proportions dans lesquelles ces coudes sont observés restent faibles par rapport à l'attribution en coude de type IV. Cela nous permet de ne dégager qu'une tendance qui est à rapprocher aux résultats expérimentaux obtenus sur le polypeptide poly(VGGVG). Il a ainsi été montré que ce peptide présentait majoritairement

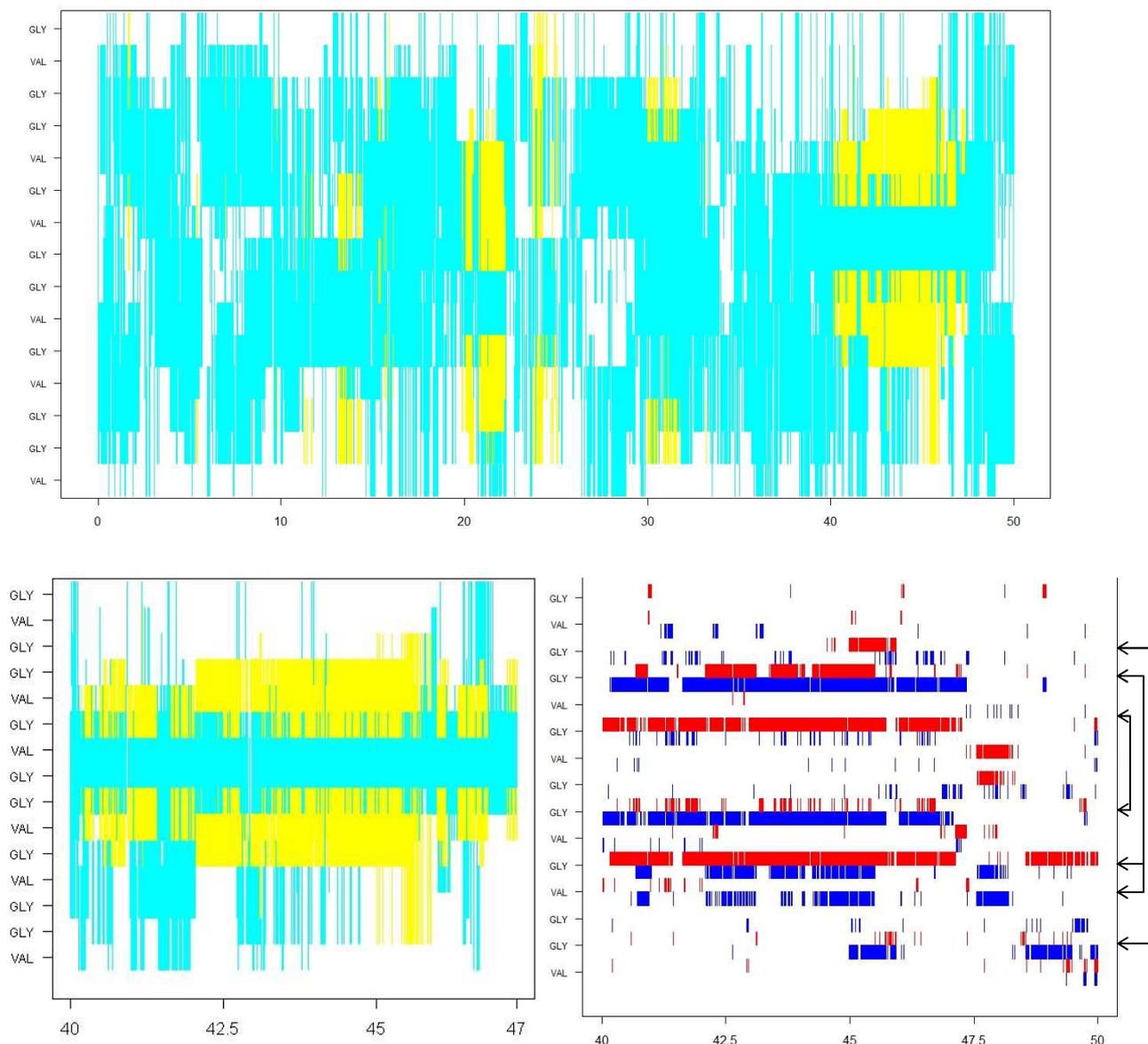
des coudes (de type II) sur les résidus VG ou GG. Il est de plus montré que des séquences du type XGG avec X=Val, Ala, Leu, adoptent principalement un coude sur XG qui est aussi de type II.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1VGGV5	4	2	4	0	865	42	917
2GGVG5	8	0	0	30	1360	0	1398
3GVGV6	76	0	1	0	1648	169	1894
4VGVG7	4	0	0	60	743	86	893
5GVGG8	59	0	310	0	2076	37	2482
6VGGV9	0	0	8	5	1196	8	1217
7GGVG10	24	0	0	306	1653	7	1990
8GVGV11	17	0	424	0	1608	72	2121
9VGVG12	1	0	0	1	1968	0	1970
10GVGG13	177	0	21	0	1648	163	2009
11VGGV14	2	10	2	4	683	76	777
12GGVG15	3	0	0	7	394	14	418

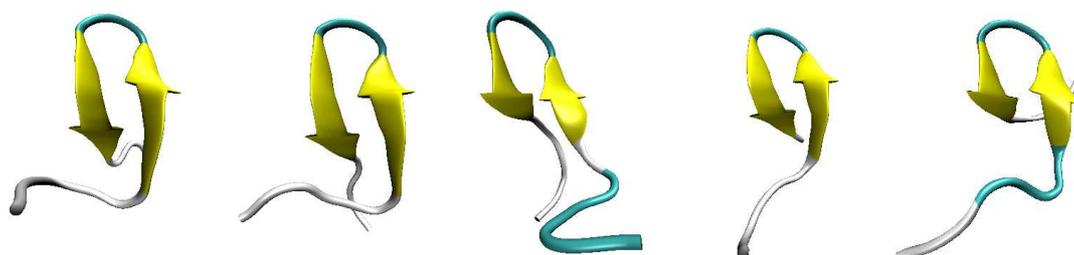
**Tableau 7 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**

Notre séquence peut adopter 12 coudes de 3 motifs possibles : 3/12 soit 25% sur XGGX, 4/12 soit 33,3% sur XVGX, et 5/12 soit 41,7% sur XGVX. Rapporté au nombre de coudes totaux comptabilisés, nous pouvons nous apercevoir que le coude VG est très largement majoritaire (47%) suivi par le coude sur GV (36,9%) et le coude sur GG (16,1%).

Nous voyons apparaître à plusieurs reprises au cours de la dynamique de courts brins antiparallèles ( $\varphi=139^\circ$ ,  $\psi=+135^\circ$ ) (Figure 39). Certes, la dynamique ne porte que sur une seule chaîne et ne laisse en rien présager de ce qui peut se passer à forte concentration avec une multitude de chaînes polypeptidiques en présence, mais nous mettons en évidence la capacité du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à former ces structures secondaires, qui sont une condition nécessaire mais non suffisante à la formation d'assemblages supramoléculaires. Il est à noter que la formation des brins sur les résidus implique principalement les résidus G<sup>5</sup>, V<sup>6</sup>, G<sup>7</sup> d'une part, et G<sup>10</sup>, V<sup>11</sup>, G<sup>12</sup> d'autre part. De plus, il semble exister une corrélation entre la formation des brins antiparallèles et l'établissement d'un coude  $\beta$  très stable sur les résidus <sup>7</sup>GGVG<sup>10</sup>, associé à une liaison hydrogène établie entre G<sup>7</sup> et G<sup>10</sup>. Les brins sont stabilisés par l'établissement transitoire de liaisons hydrogènes entre les résidus G<sup>2</sup> et G<sup>13</sup>, V<sup>4</sup> et G<sup>5</sup> avec le résidu G<sup>13</sup>. Les structures représentatives des brins formés sur la fin de la dynamique sont illustrées dans la Figure 40.



**Figure 39 : Structures secondaires observées, détail entre 40 et 47 ns, analyse des liaisons hydrogène.**

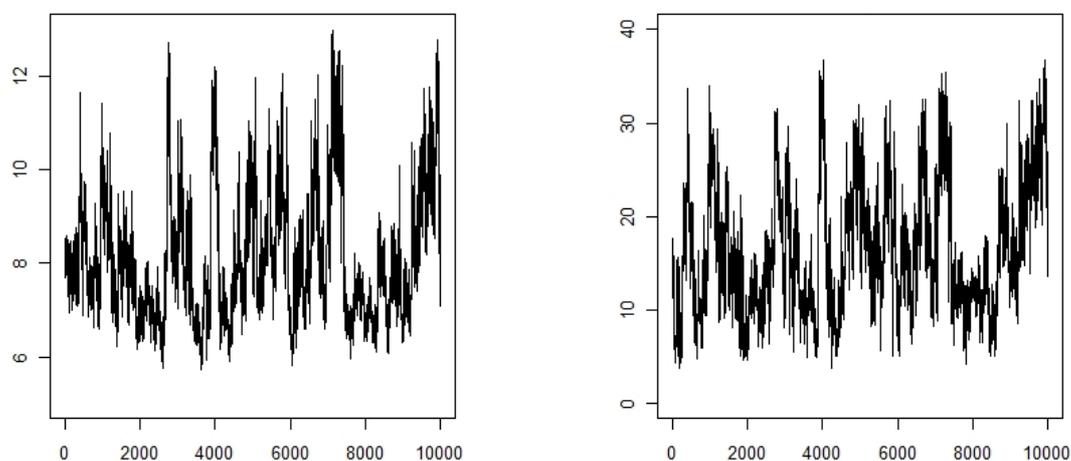


**Figure 40 : Structures représentatives des conformations observées au cours de la dynamique du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à 298K.**

## 2. Dynamique moléculaire du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à 333 K :

Le rayon de giration et la distance mesurée bout à bout reportés dans la Figure 41 et montre une plus grande variation sur l'ensemble de la dynamique à 333 K qu'à 298 K. Autrement dit, le peptide oscille plus entre les structures étendues et repliées à 330 K, conséquence d'une agitation thermique plus importante lorsque la température augmente.

Le détail des coudes le long de la séquence du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> est reporté dans la Tableau 8. Les résultats montrent une augmentation du nombre global de coude observé à 330 K. Ces résultats sont compatibles avec des observations expérimentales faites sur le peptide VGVAPG.



**Figure 41 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout au cours de la simulation du peptide (VGGVG)<sub>3</sub> à 333 K.**

A cette température, les proportions en coudes des différents motifs s'établissent respectivement à 44,2% sur GV 42,1% sur VG et 13,7% sur GG.

La quantification des résidus en polyproline II, reportée dans la Figure 42, montre une diminution de la propension des acides aminés à adopter cette structure secondaire à plus haute température. Les structures secondaires analysées dans la Figure 43 indiquent une diminution de la formation de brins au cours de la trajectoire à 333 K. Cependant nous pouvons constater que l'apparition de feuillets vers 40 ns est comparable aux événements observés dans la dynamique à 298 K : le coude sur les résidus <sup>8</sup>GV<sup>9</sup>.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1VGGV5	0	8	3	3	760	26	800
2GGVG5	6	0	0	28	1859	8	1901
3GVGV6	95	0	484	0	1991	217	2787
4VGVG7	5	0	0	50	1670	13	1738
5VGGG8	125	0	283	0	1425	101	1934
6VGGV9	3	1	14	2	1595	21	1636
7GGVG10	44	0	0	72	2624	15	2755
8VGVG11	68	0	349	0	2567	265	3249
9VGVG12	12	0	0	28	2197	21	2258
10VGGG13	97	0	33	0	1345	91	1566
11VGGV14	5	0	9	5	626	30	675
12GGVG15	17	0	0	40	1297	3	1357

Tableau 8 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.

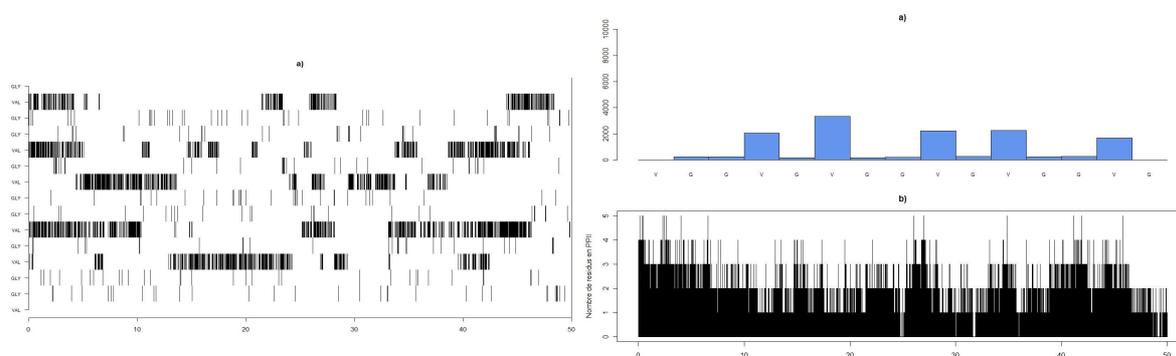


Figure 42 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.

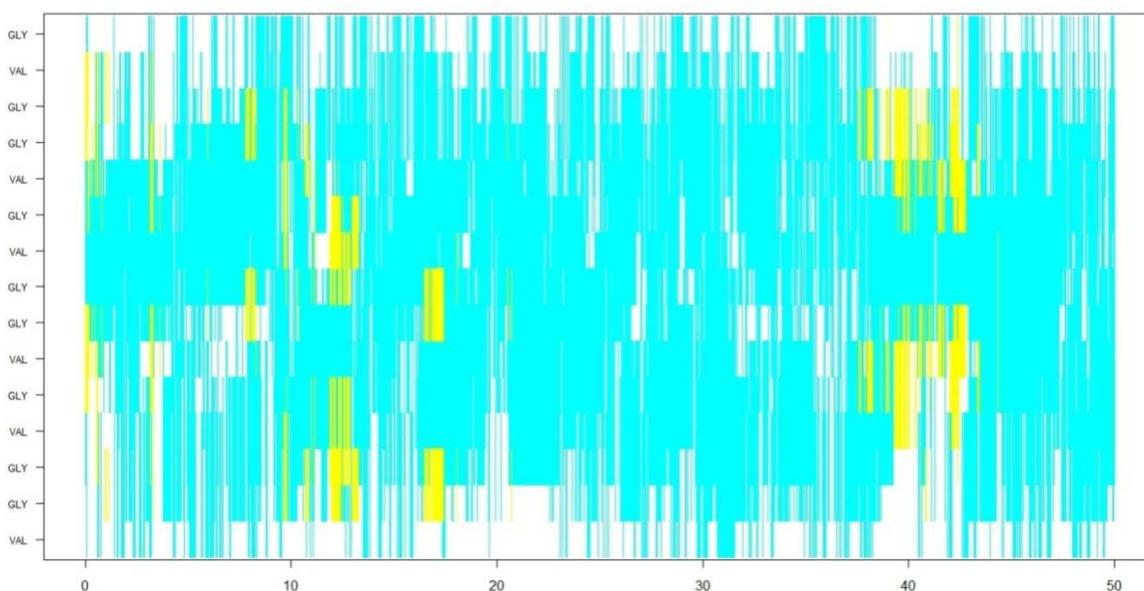
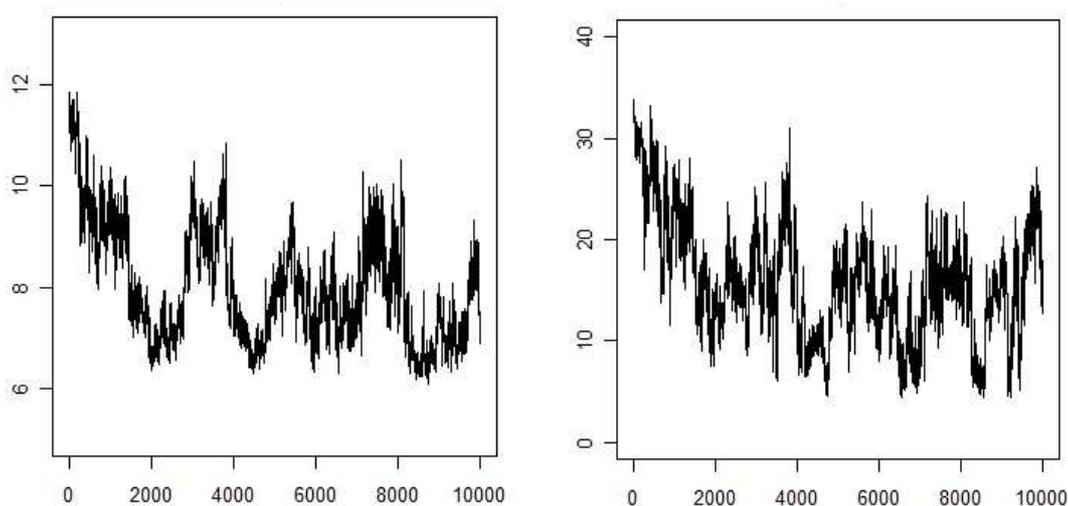


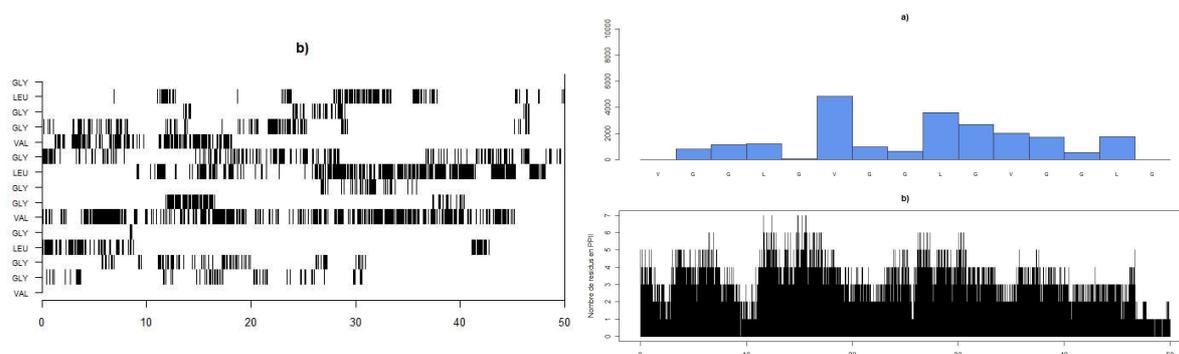
Figure 43 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.

### 3. Simulation du peptide (VGGLG)<sub>3</sub> à 298 K :

Comme pour la précédente répétition, le peptide adopte une structure compacte dans les 10 premières nanosecondes de simulation (Figure 44), puis se déplie de nouveau dans les 10 nanosecondes suivantes. Le phénomène se reproduit par la suite jusqu'à la fin de la trajectoire.



**Figure 44 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout au cours de la simulation du peptide (VGGLG)<sub>3</sub> à 298 K.**



**Figure 45 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.**

Le détail des résidus adoptant une structuration en polyproline II reporté dans la Figure 45, nous montre que pour cette séquence, le segment LGVG présente pour chaque acide aminé 20% du temps dans cette conformation. Le résidu V<sup>6</sup> adopte par ailleurs plus de 40% de polyproline II. Nous pouvons aussi voir qu'au cours de la dynamique jusqu'à 7

résidus sont simultanément en polyproline II ce qui montre l'importance de cette structuration dans des répétitions de type "elastin-like".

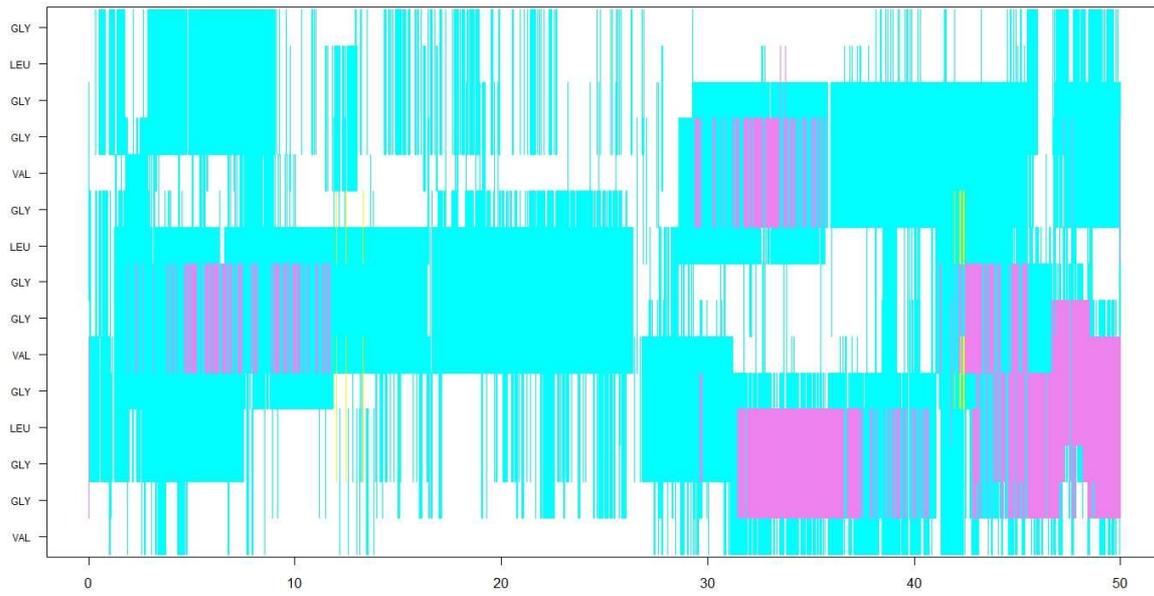
	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1VGGL4	0	0	42	0	139	2	183
2GGLG5	0	0	0	139	151	0	290
3GLGV6	709	0	547	0	564	0	1820
4LGVG7	0	0	0	0	19	22	41
5GVGG8	0	0	646	0	574	0	1220
6VGGL9	1650	1487	804	0	639	0	4580
7GGLG10	0	0	0	0	160	230	390
8GLGV11	145	0	0	0	268	10	423
9LGVG12	245	0	0	0	255	32	532
10GVGG13	286	0	0	0	72	3	361
11VGGL14	0	0	64	0	65	1	130
12GGLG15	693	0	0	197	571	28	1489

**Tableau 9 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**

L'analyse et la quantification des coudes sont illustrées dans le Tableau 9. Il apparaît clairement que le coude sur  ${}^6\text{VGGL}^9$  est largement majoritaire. De façon surprenante par rapport aux simulations précédentes, les coudes majoritaires ne sont pas de type IV. Les coudes sont de type I ( ${}^3\text{GLGV}^6$ ,  ${}^6\text{VGGL}^9$ ,  ${}^{12}\text{GGLG}^{15}$ ), de type I' ( ${}^6\text{VGGL}^9$ ), de type II ( ${}^3\text{GLGV}^6$ ,  ${}^5\text{GVGG}^8$ ,  ${}^6\text{VGGL}^9$ ), et de type VIII mais dans de faibles proportions. Ces résultats sont compatibles avec les connaissances expérimentales indiquant des coudes sur GG et XG (Tamburro, Guantieri et al. 1992).

L'analyse des structures secondaires (Figure 46) montrent que l'incorporation de la leucine dans la séquence polypeptidique tend à favoriser l'apparition d'hélices.

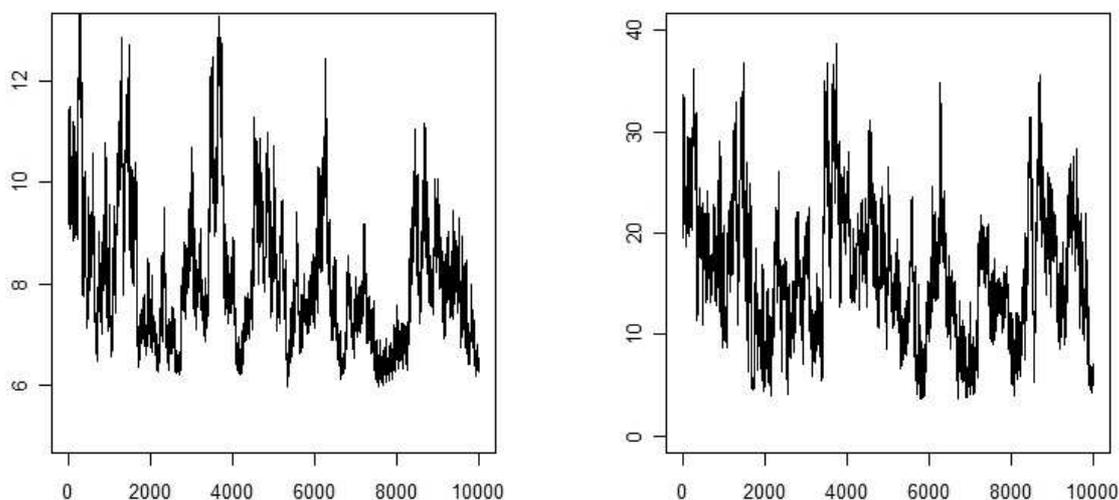
Ces résultats suggèrent pour l'instant que la propension de la leucine à former des hélices l'emporte sur la propension de la valine à former des brins, liée à l'encombrement de la chaîne et à son aptitude dans le cas présent à présenter des rotamères qui influent sur la structure du peptide.



**Figure 46 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.**

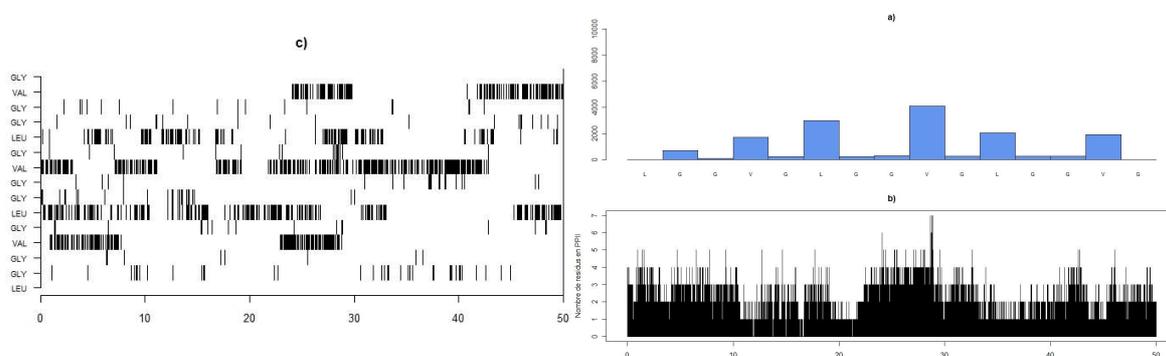
#### 4. Simulation du peptide (LGGVG)<sub>3</sub> à 298 K:

Par rapport à la séquence précédente, celle-ci ne consiste qu'en une inversion leucine/valine.



**Figure 47 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.**

Cette répétition présente une plus grande variation dans le rayon de giration et la distance bout à bout (Figure 47). L'enchaînement des acides aminés ne semble pas plus favorable à la formation de structure compacte par rapport aux (VGGLG)<sub>3</sub>.



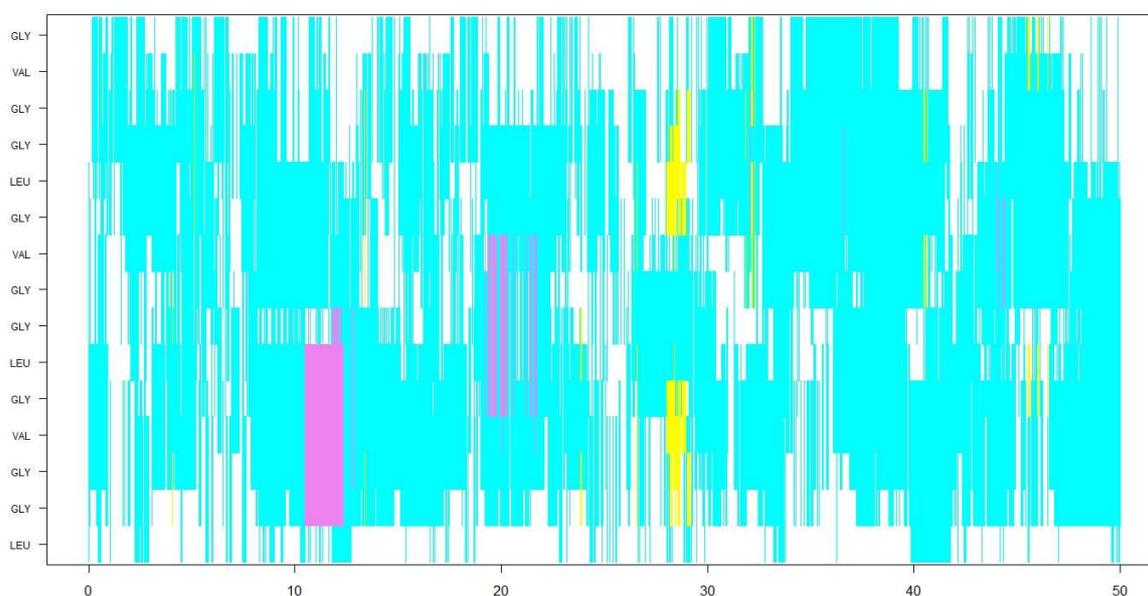
**Figure 48 : Résidus adoptant une structure en polyproline II, quantification et résidus simultanément dans cette conformation.**

Les résidus non-glycine sont les résidus qui adoptent le plus de la polyproline II (Figure 48). Cependant, par rapport à la permutation précédente, il n'apparaît pas de formation sur des résidus continus, comme cela était le cas. Cependant, nous pouvons dénombrer jusqu'à 7 résidus simultanément en PPII.

Le coude majoritaire est présent sur le térapeptide  ${}^3\text{GVGL}^6$  et tous les coudes répertoriés sont de type IV dans de larges proportions (Tableau 10) tandis que des résultats de RMN montrent que le peptide  $(\text{LGGVG})_6$  possède une grande hétérogénéité de structures (PII et coude de type I et II) (Kumashiro, Kurano et al. 2003; Ohgo, Niemczura et al. 2006; Kumashiro, Ohgo et al. 2008).

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1LGGV4	18	2	19	1	479	2	521
2GGVG5	3	0	0	9	1322	8	1342
3GVGL6	123	0	90	0	2065	103	2381
4VGLG7	23	0	0	6	778	39	846
5GLGG8	34	0	206	0	582	20	842
6LGGV9	0	5	9	15	955	11	995
7GGVG10	19	0	0	2	455	6	482
8GVGL11	1	0	259	0	505	21	786
9VGLG12	2	0	0	12	1293	0	1307
10GLGG13	33	0	75	0	709	53	870
11LGGV14	0	1	0	1	349	8	359
12GGVG15	4	0	0	21	943	15	983

**Tableau 10 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**



**Figure 49 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.**

Le détail des structures secondaires reporté dans la Figure 49 nous montre que ce le peptide  $(\text{LGGVG})_3$  présente de faibles proportions d'hélice (entre 10 et 15 ns) et de feuillets (avant 30 ns, et ponctuellement par la suite), et donc une perte de stabilité des feuillets lorsque ces derniers apparaissent.



Le détail des structures secondaires (Figure 52), autre que le coude, montrent clairement l'existence d'une hélice très stable au cours de la dynamique sur les résidus  $^{11}\text{LGGL}^{14}$ ,  $^{10}\text{GLGG}^{13}$ , voire sur le quintuplet  $^{10}\text{GLGGL}^{14}$ . De plus, des hélices sont observées sur  $^2\text{GGL}^4$  et  $^5\text{GLGG}^8$ .

	I	II	II'	IV	VIII	Total
1LGGL4	1509	0	709	733	4	2955
2GGLG5	2064	0	58	1808	0	3930
3GLGL6	0	0	0	24	0	24
4LGLG7	0	0	95	232	0	327
5GLGG8	1494	289	0	315	0	2098
6LGGL9	1424	0	0	608	0	2032
7GGLG10	0	0	0	181	306	487
8GLGL11	0	363	0	190	0	553
9LGLG12	261	0	0	269	0	530
10GLGG13	819	0	0	158	0	977
11LGGL14	1160	0	0	149	0	1309
12GGLG15	576	0	0	431	18	1025

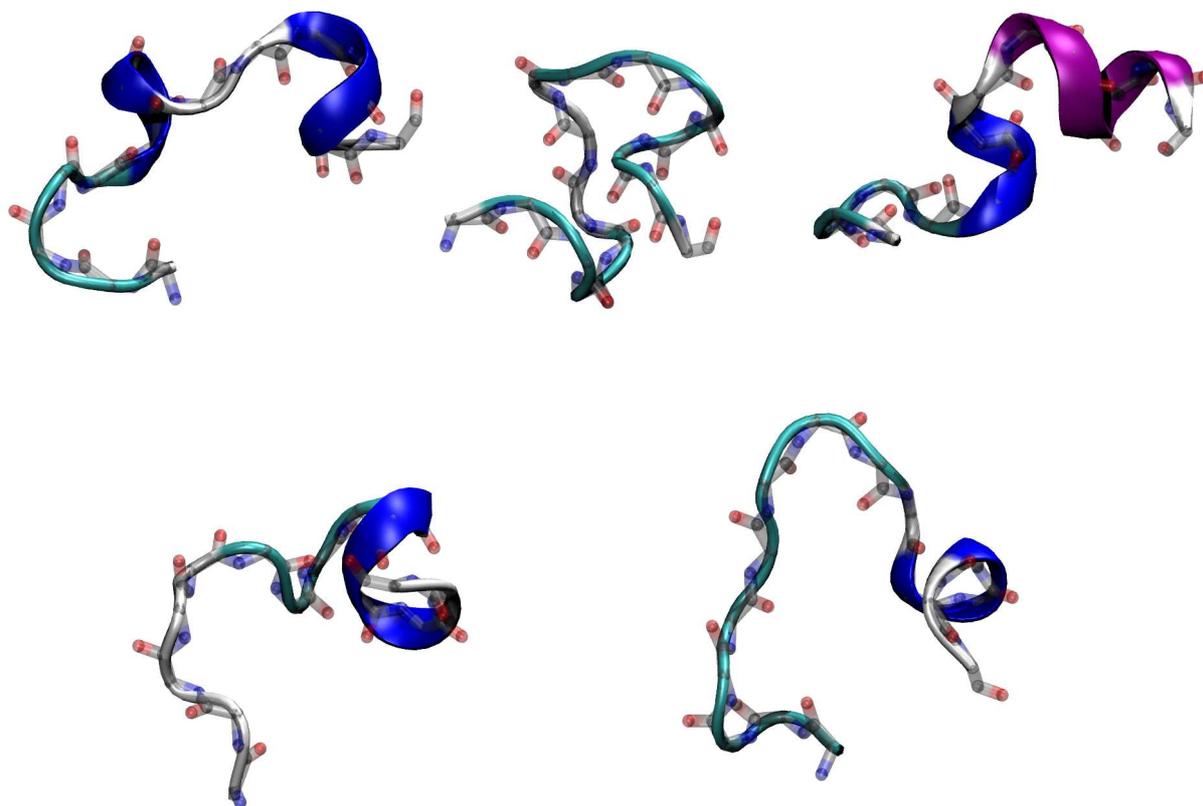
**Tableau 11 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**

La stabilité structurale mise en évidence au court de cette trajectoire se traduit par une diminution très nette du nombre de clusters obtenus lors du regroupement en famille de conformation (Figure 53). Ainsi en conservant un cut-off de 3.2 Å comme pour les autres



**Figure 52 : Structures secondaires observées au cours de la trajectoire.**

trajectoires, nous obtenons 17 familles de conformation. Les 3 premiers clusters représentent respectivement 38 %, 33 % et 13 % du nombre total de structures. Nous pouvons constater la présence d'une hélice soit de type  $\alpha$  (violet) soit de type  $3_{10}$  (bleu).



**Figure 53 : Structures représentatives des cinq premiers clusters du peptide (LGGLG)<sub>3</sub>.**

Dans ces différents paragraphes, nous avons étudiés les différentes combinaisons des différents motifs peptidiques répétées 3 fois. S'il est évident que le comportement structural n'est pas très différent d'un comportement de peptides élastiques, avec passage continu entre les formes dépliées, présentant de la polyprolineII ou différents types de coudes qui souvent s'avèrent être glissants, nous pouvons voir apparaître dans ces simulations des éléments de structures secondaires de type brins  $\beta$  et hélice  $\alpha$ . Au cours des trajectoires, les portions en brin beta peuvent s'associer pour former, grâce à la présence d'un coude entre les 2 brins un feuillet  $\beta$ . Nous pouvons constater aussi que ces feuillets pourraient avoir eu aussi un comportement de "feuillet glissant". Les brins les constituants peuvent varier sur un ou deux

---

amino-acides et amener le coude de connexion à glisser lui-même, entraînant une reptation du feuillet  $\beta$ . Les liaisons hydrogènes se rompent localement et se reconstituent sur l'acide aminé suivant lorsque les caractéristiques géométriques sont suffisantes. La nature des séquences étudiées et leur longueur ne permettent pas de voir des brins parallèles. Les dynamiques ne sont réalisées que sur une seule chaîne et ne laissent en rien présager de ce qui se passerait à une forte concentration. Tous les cas d'association entre les chaînes peptidiques doivent exister mais avec des temps de résilience très différents. Cependant, il est évident qu'avec une multitude de chaînes polypeptidiques il serait possible de former ces structures secondaires, qui sont une condition nécessaire mais non suffisante à la formation d'assemblages supramoléculaires

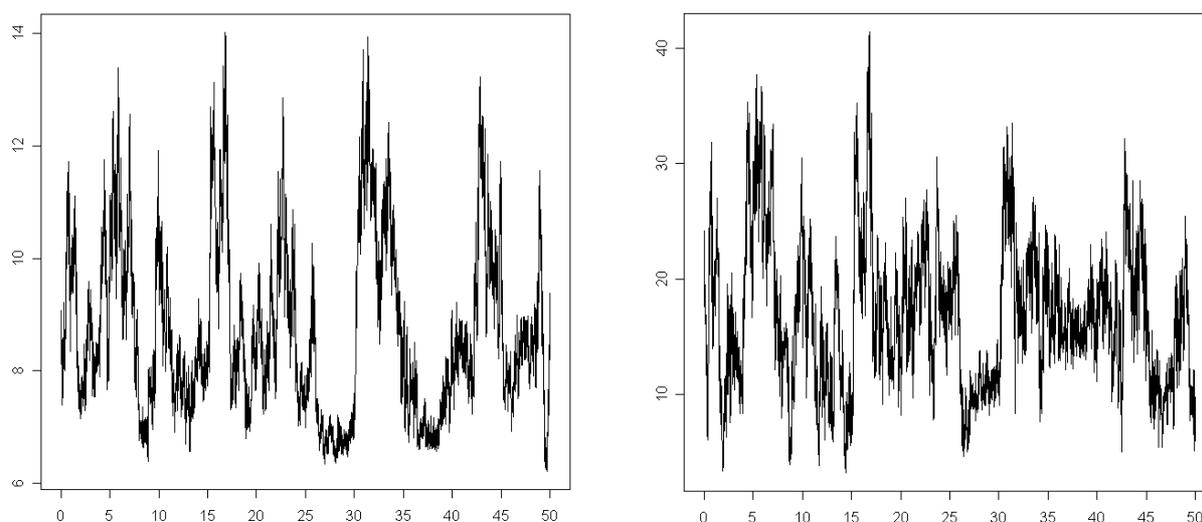
Lorsque la chaîne latérale augmente dans le cas de la leucine, des conformations de type hélice apparaissent dans les simulations. Il est évident que l'on est très loin des conditions d'interconversion qui sont connues dans le cadre de peptides amyloïdes connus, mais on voit qu'il est possible cependant d'avoir les deux types de structures secondaires localement.

## IV. Etudes des exons 28 et 30 de la tropoélastine :

Récemment, Tamburro et collaborateurs ont montré que les exons 28 GAAVPGVLGGLGALGGVGPVV et 30 GLVGAAGLGGLGVGGLGVPVGGGLG formaient des fibres amyloïdes. Au sein de ces exons, nous retrouvons les peptides précédemment étudiés. Dans le même temps, ces auteurs ont étudié la longueur minimale nécessaire pour obtenir de telles fibres et qui correspond aux 17 premiers résidus de l'exon 30. Nous allons regarder différentes simulations sur ces deux exons.

### 1. Simulation de 50 ns du peptide 30\_17 contenant les 17 premiers acides aminés de l'exon 30 à 298 K :

Comme pour les répétitions XGGZG3, l'exon 30\_17 présente à la fois des structures compactes avec un rayon de giration à environ 7 Å et des structures étendues avec un Rg à près de 14 Å (Figure 54).



**Figure 54 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.**

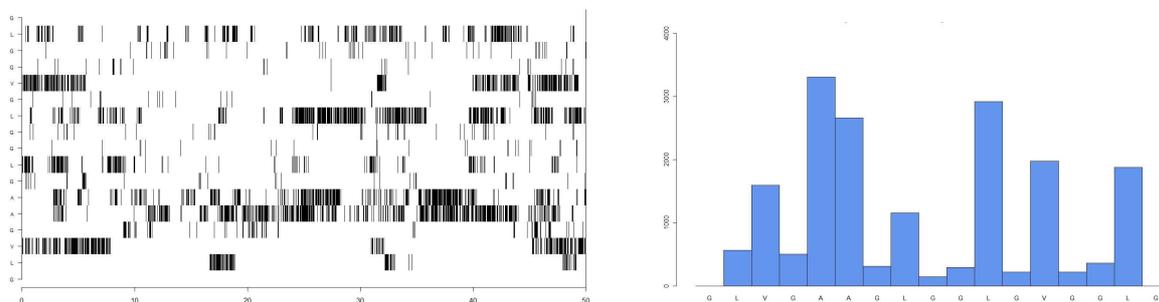
Les résultats de dichroïsme circulaire publiés par Pepe et collaborateurs indiquent que ce segment de l'exon est tout d'abord désordonné ou en PPII, et présente des coudes de type I ou des brins  $\beta$  dans sa structure lors d'une augmentation de la température, sans qu'il soit possible d'identifier la position et les résidus concernés.

L'analyse de la trajectoire montre que de nombreux coudes sont formés sur la séquence, et principalement sur les 4 premiers résidus (Tableau 12). Nous observons des

coudes de type I, II et VIII dans de faibles pourcentages comparativement aux coudes non attribués. Ainsi, alors que dans le polypeptide (LGGLG)<sub>3</sub> de nombreux coudes de type I' sont identifiés, il n'est pas possible de faire le même type d'observation au cours de cette simulation.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1GLVG4	341	0	0	0	6410	133	6884
2LVGA5	7	0	45	0	973	245	1270
3VGAA6	0	0	0	26	802	0	828
4GAAG7	113	0	0	0	1743	26	1882
5AAGL8	32	0	112	0	1192	218	1554
6AGLG9	5	0	0	31	1567	5	1608
7GLGG10	150	0	66	0	1777	74	2067
8LGGL11	3	6	1	3	1513	29	1555
9GGLG12	9	0	0	93	1016	6	1124
10GLGV13	80	0	282	0	2025	232	2619
11LVVG14	4	0	0	19	3595	7	3625
12GVGG15	325	0	45	0	2163	124	2657
13VGGL16	0	0	1	3	717	46	767
14GGLG17	2	0	0	21	879	4	906

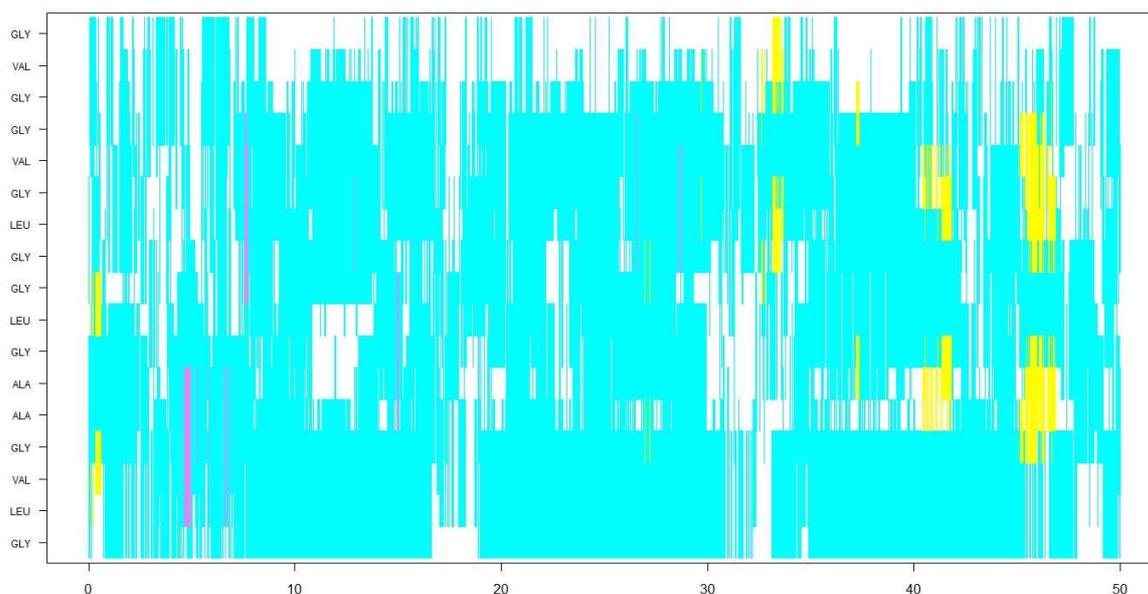
**Tableau 12 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**



**Figure 55 : Résidus en polyproline II et proportion correspondante.**

Par ailleurs, le détail des résidus en PPII est reporté dans la Figure 55 montre une quantification comparable aux résultats sur les séquences précédentes.

Les leucines et les valines, notamment celles présentes dans le motif XGGZG peuvent explorer la zone de la carte de Ramachandran correspondante. De plus, nous pouvons remarquer que les deux alanines en position 5 et 6 sont souvent observées dans cette conformation au cours de la trajectoire.



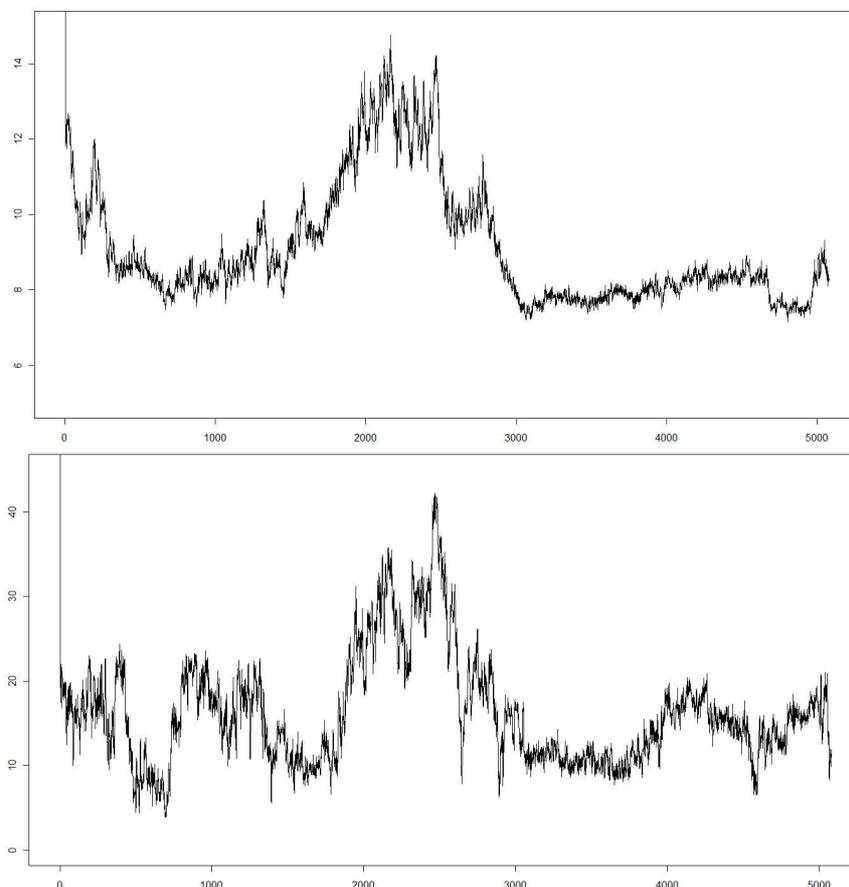
**Figure 56 : Analyses des structures secondaires observées au cours de la trajectoire.**

Les structures secondaires adoptées par l'exon 30\_17 sont reportées dans la Figure 56. Des hélices sont observées de façon très transitoire sur  $^2\text{LVGAA}^6$ ,  $^9\text{GGLGVG}^{14}$  et  $^5\text{AAGLG}^9$ . De la même façon des brins sont mis en évidence sur de courtes portions de la séquence : VG et LG, GGL, GLG et GLG, AA et GV, AG et LG, AAG et LGV, GAA et GVG, GAAG et LGVG, GAAG et GLGVG, LGVGG. Cependant, cette simulation réalisée en solvation explicite ne correspondant qu'à une seule molécule et ne permet pas de conclure à la possibilité d'agrégation. Les parties de trajectoires qui présentent des structures secondaires de type brins  $\beta$  sont cependant dans les zones de nos peptides modèles.

## 2. Simulation de 25 ns de l'exon 30 à 298 K :

Au cours de la trajectoire l'exon 30 adopte une structure très compacte après 15 ns, structure qui persiste jusqu'à la fin de la dynamique (25ns). L'exon 30 est long de 25 résidus et il apparaît que cette longueur de séquence permet une stabilité que nous n'avons pas observée jusqu'ici pour des séquences plus courtes (Figure 57). De plus, une proline est présente dans la séquence, ce qui tend à réduire la flexibilité de la chaîne.

L'analyse des coudes fait ressortir 4 coudes principaux au cours de la dynamique :  ${}^4\text{GAAG}^7$ ,  ${}^5\text{AGGL}^8$  et  ${}^6\text{AGLG}^9$ , ces coudes sont adjacents et donc compatibles avec le concept de coude glissant. Enfin le coude  ${}^{19}\text{PGVG}^{22}$  est le coude majoritaire et est présent de façon stable à partir de 12 ns de simulation (Tableau 13).



**Figure 57 : Rayon de giration et distance mesurée bout à bout.**

La PPII (Figure 58) est observée sur les résidus non-glycine mais à la différence du peptide 30\_17, les deux alanines dans la partie N-terminale sont très peu observées dans cette conformation tandis que chaque résidu du doublet VP est identifié dans cette conformation plus de 60 % de la trajectoire. Ces observations laissent à supposer que localement les résidus  ${}^{18}\text{VP}^{19}$  sont régulièrement en PPII immédiatement suivi d'un coude sur les résidus  $i+1$  et  $i+2$ ,  $\text{G}^{20}$  et  $\text{G}^{21}$  respectivement.

Quelques structures secondaires apparaissent au cours de la trajectoire, notamment une hélice sur LVGAA, et des brins sur les résidus  ${}^3\text{VG}^4$  et  ${}^{13}\text{VG}^{14}$ ,  ${}^7\text{GLG}^9$ ,  ${}^7\text{GLGGLG}^{12}$  (Figure 59).

Le regroupement en famille de conformation nous propose pour les 5 premiers clusters des structures compactes, présentant même pour la 3<sup>ème</sup> famille, un feuillet court dans la partie C-terminale dont les résidus sont <sup>18</sup>VP<sup>19</sup> et <sup>23</sup>LG<sup>24</sup> (Figure 61).

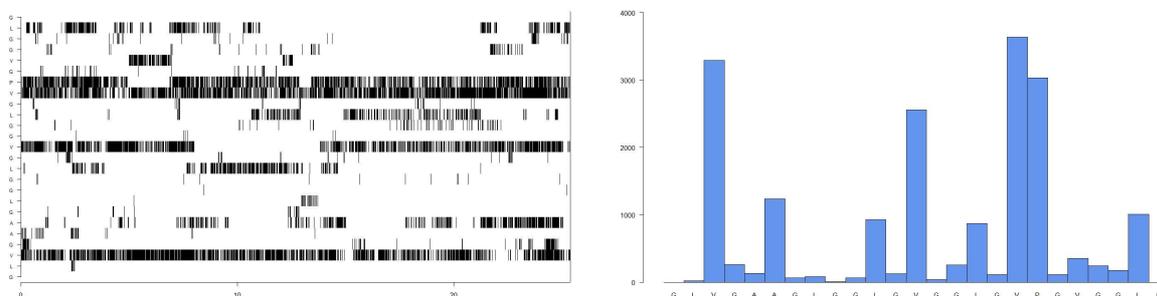
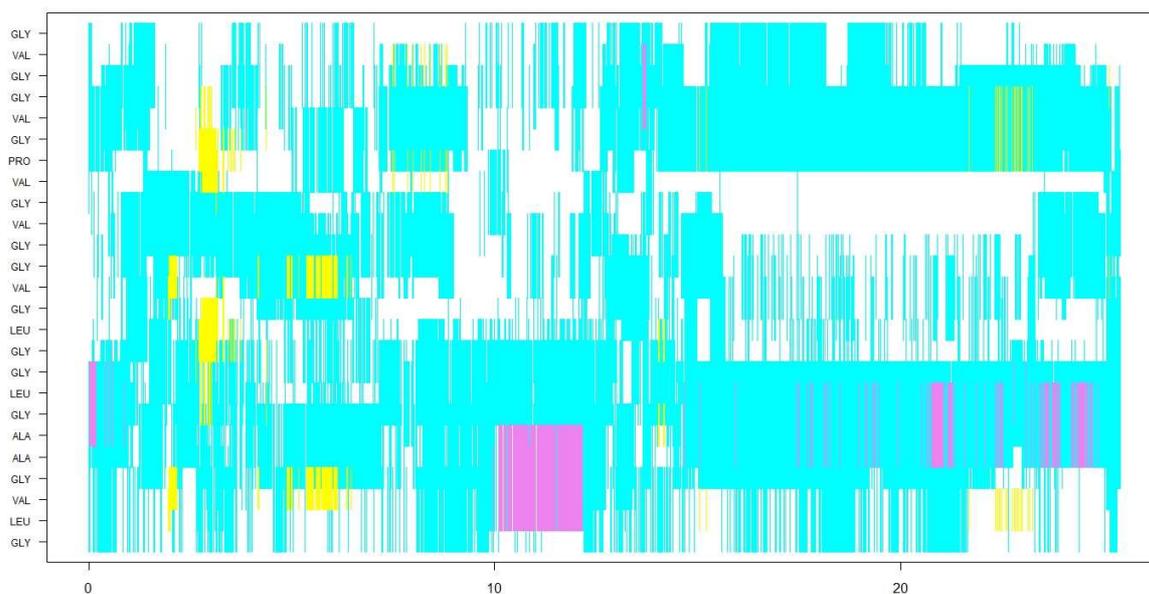


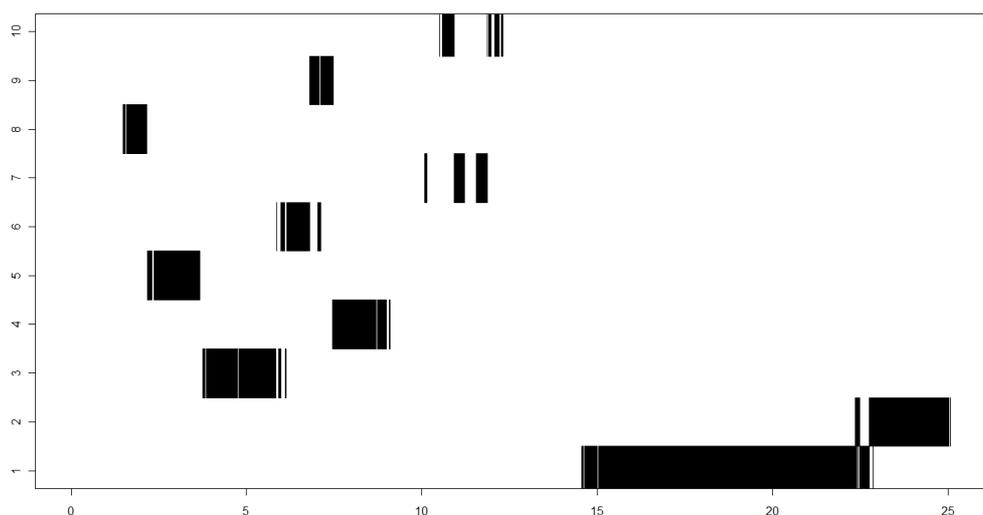
Figure 58 : Résidus en polyproline II et proportion correspondante.

	I	II	II'	IV	VIII	Total
1GLVG4	4	0	0	783	254	1041
2LVGA5	0	32	0	149	0	181
3VGAA6	2	0	7	320	0	329
4GAAG7	266	0	0	1941	193	2400
5AAGL8	195	181	0	1855	27	2258
6AGLG9	22	0	4	2110	0	2136
7GLGG10	76	3	0	1305	44	1428
8LGGL11	2	0	0	367	12	381
9GGLG12	0	0	1	169	1	171
10GLGV13	6	0	0	351	23	380
11LGVG14	0	0	3	256	7	266
12GVGG15	12	137	0	448	4	601
13VGGL16	0	0	0	1122	2	1124
14GGLG17	4	0	15	1018	6	1043
15GLGV18	40	20	0	348	17	425
16LGVP19	0	0	0	75	1	76
17GVPG20	0	0	0	2	0	2
18VPGV21	1	2	0	173	40	216
19PGVG22	7	0	13	2558	0	2578
20GVGG23	61	2	0	830	250	1143
21VGGL24	11	4	0	302	12	329
22GGLG25	35	0	14	1103	0	1152

Tableau 13 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.

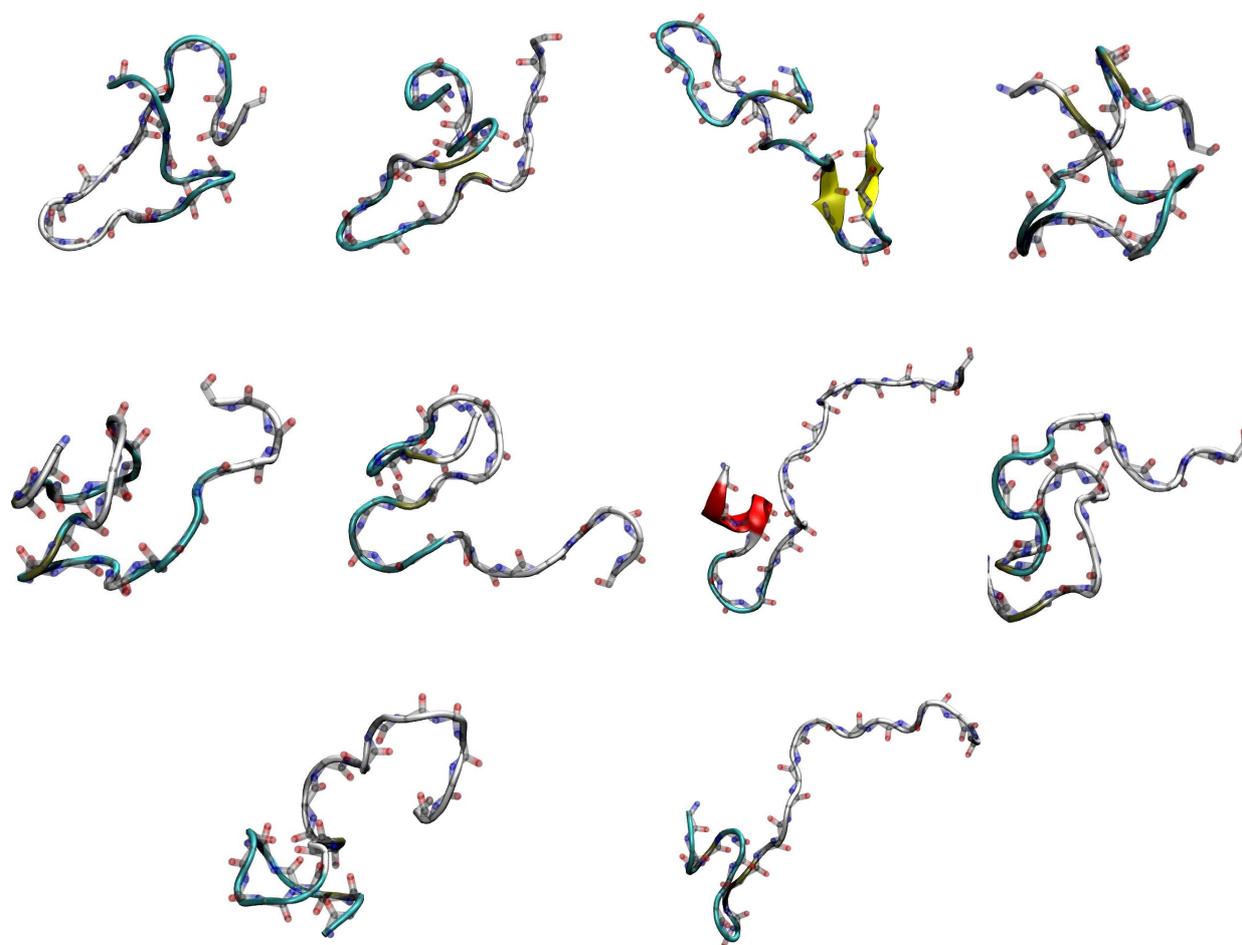


**Figure 59 : Analyse des structures secondaires de l'exon 30 lors d'une simulation à 298 K.**



**Figure 60 : Familles de conformation occupées lors de la dynamique.**

Les clusters occupés au cours de la trajectoire sont représentés dans la Figure 60. Nous pouvons voir que sur la fin de la trajectoire, seuls les clusters 1 et 2 sont occupés. Cette observation est compatible avec les résultats que nous obtenons : l'exon se révèle très stable après 15 ns de simulation, cela se traduit par des structures locales très peuplées (PPII et coude  $\beta$  sur VPGVG particulièrement). De plus, le regroupement en famille de conformation nous donne un cluster très important (1587) et les quatre suivants diminuent rapidement (462, 396, 301, 288).



**Figure 61 : Structures représentatives des 10 premières familles de conformation.**

Nous pouvons aussi remarquer que par rapport au peptide codé par les 17 premiers résidus de l'exon 30, la présence d'hélice sur les résidus <sup>10</sup>GLGGL<sup>14</sup> est complètement abolie.

### 3. Simulation de 25 ns de l'exon 28 à 298 K :

L'exon 28 adopte une structure très compacte au bout de 10 ns de simulation et la structure formée reste extrêmement stable jusqu'à la fin de la simulation (Figure 62). Les fluctuations du rayon de giration et de la distance bout à bout restent très faibles durant les 15 dernières nanosecondes de simulation. Seuls des coudes  $\beta$  et de la PPII sont observés au cours de la trajectoire.

Le détail de l'attribution des coudes  $\beta$  est reporté dans la Tableau 14. Nous pouvons constater la présence pratiquement tout au long de la simulation d'une suite de coude de type II sur <sup>4</sup>VPGV<sup>7</sup>, de type IV sur <sup>5</sup>PGVL<sup>8</sup> et <sup>6</sup>GVLG<sup>9</sup>. Nous remarquons la présence d'un coude

de type I sur  ${}^9\text{GGLG}^{12}$ , de type II sur  ${}^{11}\text{LGAL}^{14}$ , de type IV et I sur  ${}^{12}\text{GALG}^{15}$ . Deux coudes adjacents sur les résidus  ${}^{14}\text{LGGV}^{17}$  (type I') et  ${}^{16}\text{GVGI}^{19}$  (type II et type IV). Enfin un coude de type IV est observé sur  ${}^{20}\text{PGGV}^{23}$ .

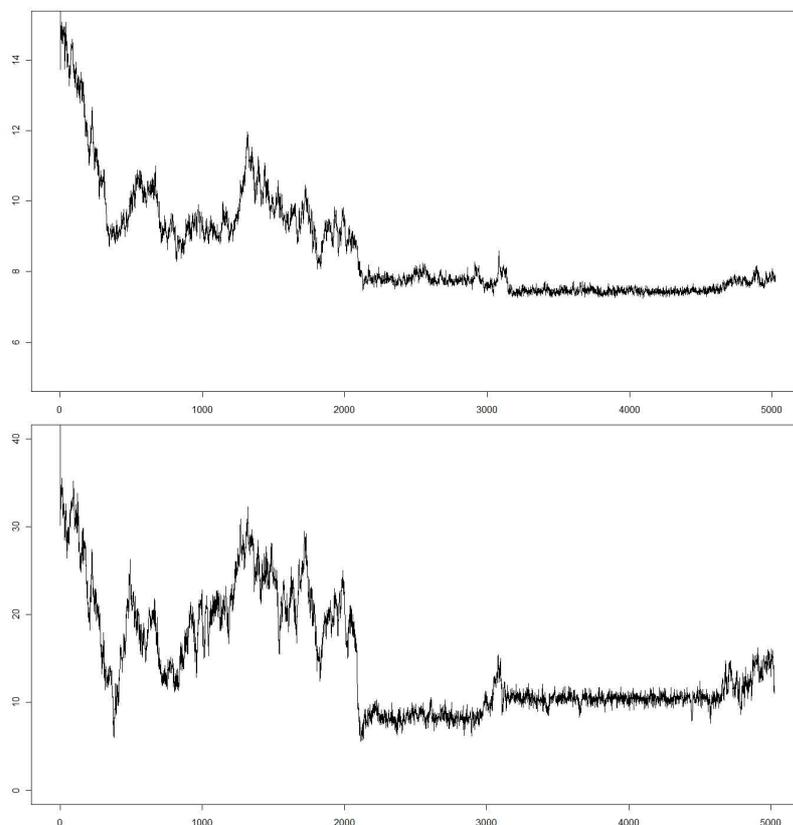


Figure 62 : rayon de giration et distance mesurée bout à bout.

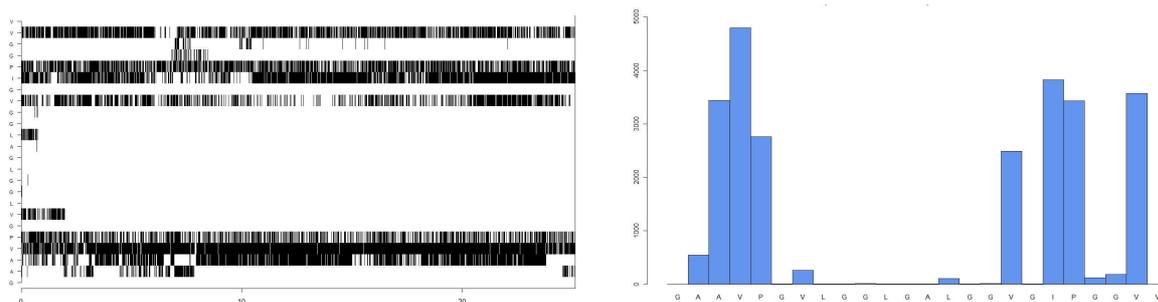


Figure 63 : résidus en polyproline II et proportion correspondante.

Le résultat d'un regroupement en famille de conformation est illustré dans la Figure 65. La première conformation, très compacte, est celle qui apparait vers 8 ns en équilibre avec les conformations 3 et 8 puis existe jusqu'à la fin de la dynamique. Les résidus <sup>3</sup>AVP<sup>5</sup> ont une forte propension à rester en PPII tout au long des 25 ns de simulation (Figure 63). Nous pouvons faire la même constatation pour les résidus V<sup>17</sup>, I<sup>19</sup>, P<sup>20</sup>, V<sup>23</sup>. La présence de proline dans la séquence va de paire dans cette séquence avec une réduction de la variation des angles dièdres des résidus proches.

	I	I'	II	II'	IV	VIII	Total
1GAAV4	0	0	0	0	74	33	107
2AAVP5	0	0	0	0	3	2	5
3AVPG6	0	0	0	0	2	0	2
4VPGV7	0	0	3010	0	1608	0	4618
5PGVL8	0	0	0	0	4540	0	4540
6GVLG9	366	0	0	0	3471	0	3837
7VLGG10	0	0	0	0	1	8	9
8LGGL11	0	0	0	318	113	0	431
9GGLG12	3084	0	0	693	727	0	4504
10GLGA13	0	0	0	0	0	0	0
11LGAL14	0	0	0	1258	566	0	1824
12GALG15	1776	0	0	0	2136	55	3967
13ALGG16	0	0	0	0	382	0	382
14LGGV17	0	3749	0	0	863	0	4612
15GGVG18	0	0	0	0	0	0	0
16GVGI19	0	0	2078	0	1971	0	4049
17VGIP20	0	0	0	0	41	0	41
18GIPG21	0	0	0	0	2	0	2
19IPGG22	0	0	281	0	40	2	323
20PGGV23	1	296	0	0	1995	4	2296
21GGVV24	0	0	0	0	60	5	65

**Tableau 14 : Attribution des coudes  $\beta$  au cours de la trajectoire.**

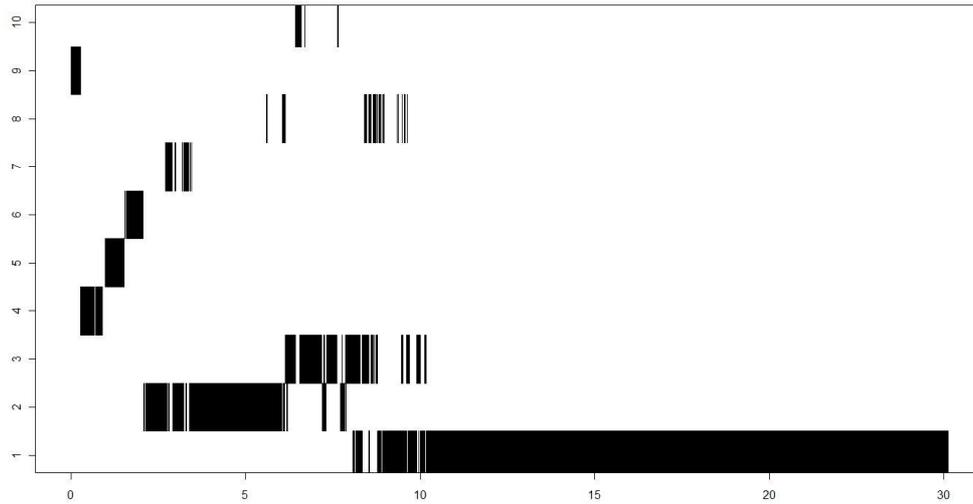


Figure 64 : famille de conformations occupées lors de la dynamique.

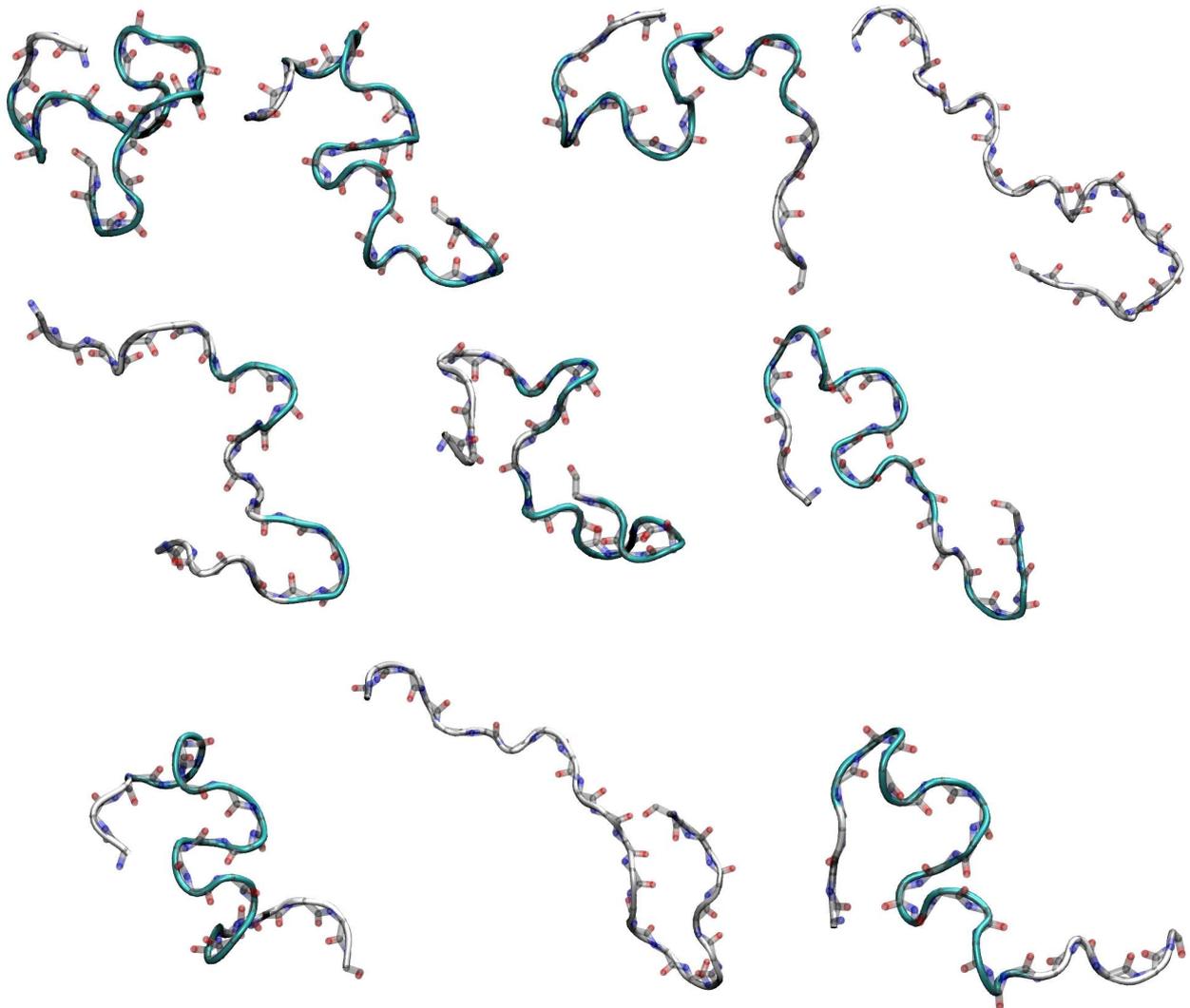
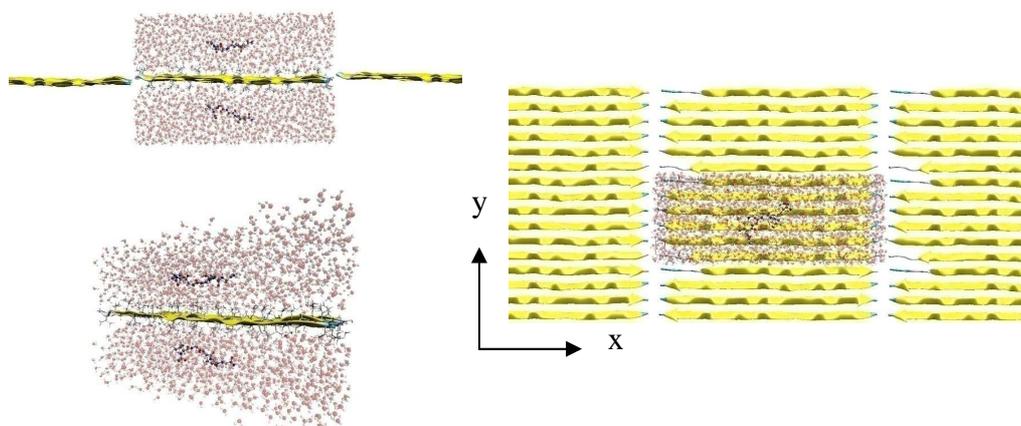


Figure 65 : structure représentatives des 10 premières familles de conformation.

Ces différentes simulations prouvent que les exons décrits ci-dessus, comparés aux différents peptides étudiés précédemment, peuvent localement présenter des caractéristiques qui pourraient induire des interactions de type comparables à celles observées pour des amyloïdes. Cependant, dans le cas des exons il n'apparaît pas de brins  $\beta$  qui s'associent en feuillet. Pour observer des formations de structures secondaires amenant à la description de fibres amyloïdes, il serait certainement nécessaire d'étudier le comportement de plusieurs exons entre eux pour étudier si les mouvements de reptation que nous observons peuvent suffire à la formation d'éléments constitutifs nécessaires à l'agrégation.

## **V. Simulations de deux peptides VGGVG sur un feuillet $\beta$ virtuellement infini de poly(VGGVG) :**

L'agrégation de peptide ou protéine nécessite la formation d'un agrégat stable permettant la croissance d'une fibre amyloïde. L'objectif ici n'est pas de simuler ce phénomène mais d'évaluer quel peut-être le comportement d'un peptide modèle de l'atropoélastine dans un environnement connu pour être favorable à la croissance d'amyloïde.

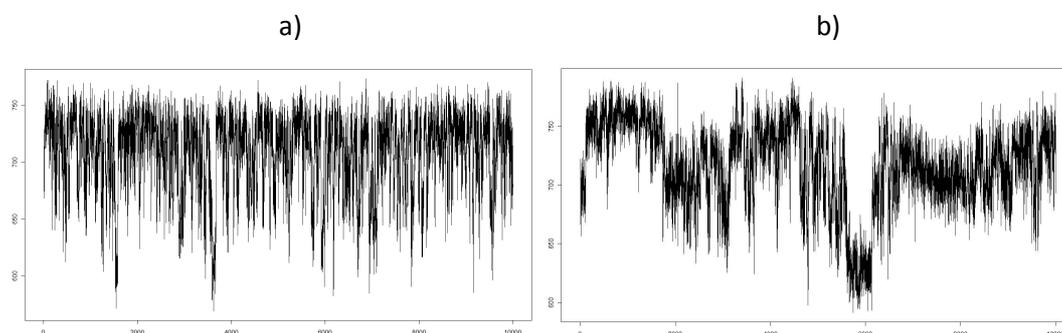


**Figure 66 : Système de départ pour une simulation des deux peptides VGGVG au voisinage d'un plancher  $\beta$  virtuellement infini.**

Deux peptides VGGVG ont été disposés de part et d'autre du plancher. Ce plancher est virtuellement infini car nous appliquons, à travers les conditions périodiques utilisées lors de la simulation, une liaison peptidique entre les images par le biais d'un patch disponible dans les définitions de topologie de CHARMM (patch LINK).

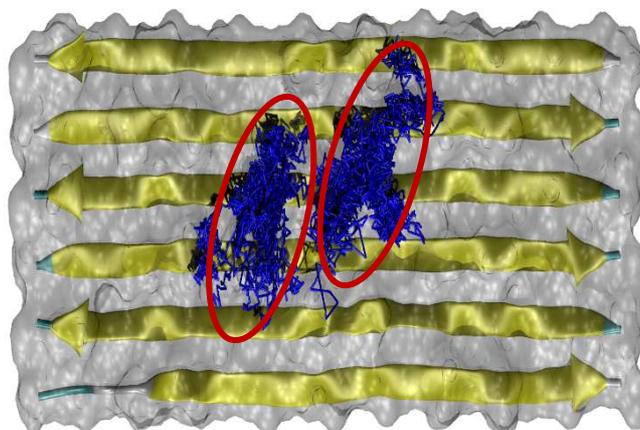
La création du plancher débute par l'obtention de deux brins de  $(VGGVG)_4$  répondant aux critères d'angles d'un feuillet  $\beta$  antiparallèles. Le choix du nombre de résidus est fait de telle sorte à respecter l'alternance CO-NH de la liaison peptidique. Ces brins ont ensuite été placés dans le plan xy et répliqué selon y pour former un feuillet de six brins. Les résidus terminaux sont à distance d'une liaison peptidique du résidu adjacent dans la cellule voisine. Le patch est appliqué à travers les conditions périodiques selon x. Nous avons tout d'abord vérifié que le plancher ne se refermait pas sur lui-même au cours d'une première simulation puis des contraintes sont appliquées sur le plancher afin de ne pas observer une trop grande

déformation du plan selon Z. Les deux peptides sont disposés au début de la simulation à 10 Å du plancher (Figure 66).



**Figure 67 : Surface accessible au solvant calculée pour le peptide VGGVG seul (a) et le peptide simulé en présence du feuillet  $\beta$  (b).**

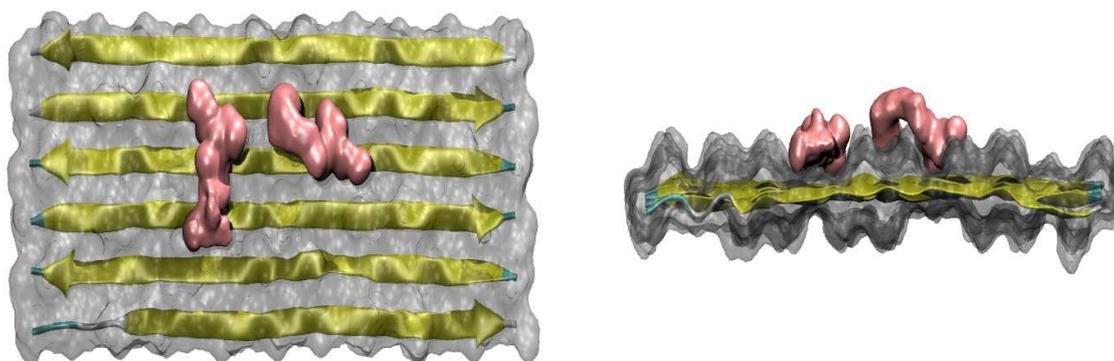
Dès les premières picosecondes de simulation, les peptides viennent au contact du feuillet. La première constatation est que la valeur de la surface accessible au solvant du peptide diminue par rapport à la simulation effectuée sur le peptide VGGVG seul, traité précédemment (Figure 67). En venant au contact du plancher une partie de la chaîne peptidique se retrouve masquée aux molécules d'eau environnantes.



**Figure 68 : Trajectoire suivi par le centre de masse du peptide au cours des 50 ns de dynamique.**

L'occupation des peptides sur le plancher au cours de la trajectoire a été calculée en prenant une résolution de 0,5 Å (Figure 68). La position moyenne est représentée. Nous pouvons constater que deux positions moyennes résultent de cette analyse : l'orientation du peptide peut-être parallèle à l'orientation des brins ou être perpendiculaire à l'orientation des

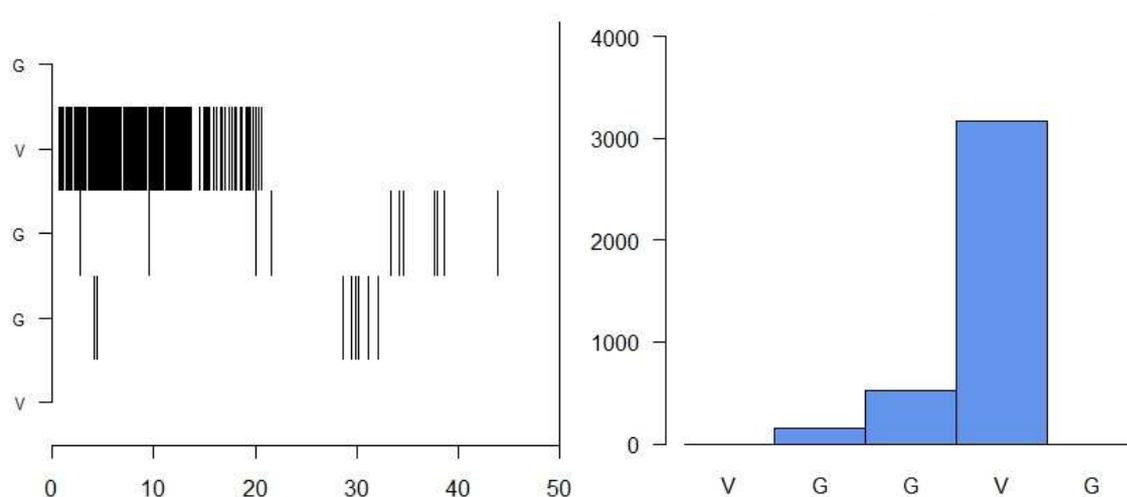
brins. Le suivi de la position du centre de masse du peptide traduit par ailleurs le fait que deux positions sont principalement occupées.



**Figure 69 : Position moyenne occupée par le peptide 1 au cours de la trajectoire (vue à 90° selon y).**

Au cours de la dynamique, entre 15 et 25 % des structures présentent un coude (majoritairement de type IV, données non-montrées) ce qui reste comparables aux autres simulations sur les peptides XGGZG.

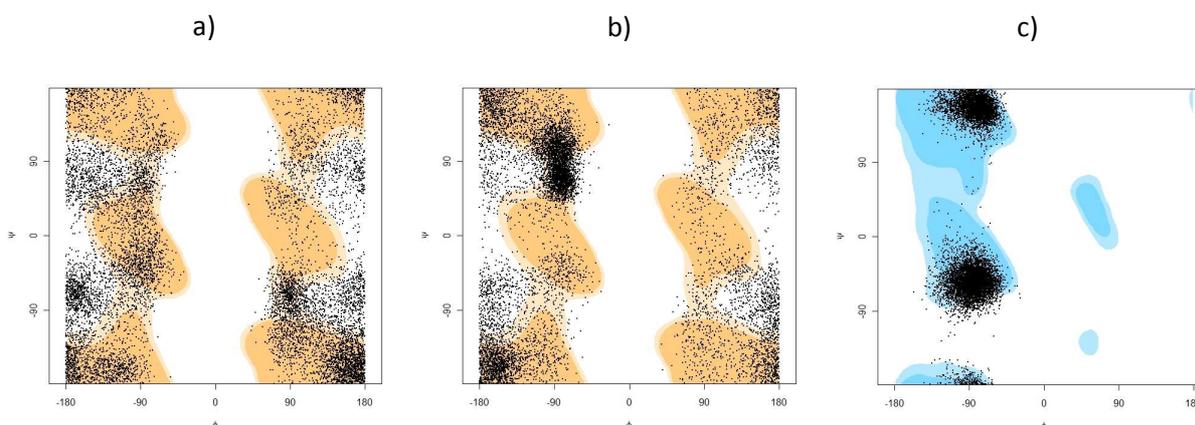
Le peptide ne forme pas de liaison hydrogène avec le plan ce qui indique que les interactions mise en jeu sont d'ordre hydrophobe. De plus, les deux positions mises en évidence occupent les cavités générées dans la structure par l'intervalle GG et l'alternance de valine d'un côté et de l'autre du feuillet.



**Figure 70 : Résidus du peptide 1 en PPII au cours de la trajectoire.**

Comme pour le peptide VGGVG simulé seul, la valine 4 explore la carte de Ramachandran dans la région  $-75^\circ ; +145^\circ$  (Figure 71) dans des proportions significatives (30 % du temps de la simulation) (Figure 70).

Le regroupement en famille de conformation en conservant un cut-off de  $0,8 \text{ \AA}$  comme pour les simulations des peptides XGGZG, montre une augmentation du peuplement des deux premiers clusters et particulièrement du premier cluster qui passe de 1098 structures le constituant (peptide seul) à 2909 dans le cas du peptide simulé en présence du feuillet  $\beta$  infini.



**Figure 71 : Carte de Ramachandran des résidus a) G<sup>2</sup>, b) G<sup>3</sup>, c) V<sup>4</sup>.**

De ces simulations, on retire les informations suivantes : il apparaît que sur le plancher virtuel simulant une plaque d'agrégation, un peptide de même nature peut interagir principalement selon deux positions préférentielles. Ces peptides échantillonnent l'espace globalement de façon très restreintes ce qui peut s'expliquer peut-être par à la fois la taille de la cellule initiale qu'il faudrait certainement étendre (augmenter la longueur d'un brin de plusieurs monomères et mettre 7 ou 9 brins en antiparallèle dans la cellule) et/ou la taille du peptide qui dans le cas présent se comporte comme un peptide élastique, c'est-à-dire avec des conformations peu éloignées de celles trouvées pour le monomère étudié au début de ce chapitre de résultats. Les interactions mises en jeu sont principalement de type hydrophobe et aucune liaison hydrogène n'est établie entre le peptide et le plancher. Cela provient peut-être du fait que nous avons du contraindre le plancher au travers des carbones  $\alpha$  mais en tout état de cause, le plancher ne pouvait se trouver complètement "retourné" ou "éclaté" pour permettre l'établissement de ces liaisons hydrogènes entre le NH ou CO du peptide et ceux de la chaîne principale des résidus du plancher.

Il est aussi important de noter que la surface accessible au solvant du plancher idéal est très caractéristique du peptide modèle étudié. En effet, nous avons construit les autres planchers correspondants aux motifs XGGZG et fait des premiers tests avec les peptides associés. Il apparaît que le « paysage » de la surface accessible au solvant est totalement différent d'un cas sur l'autre, et que les peptides venant au contact de la surface sont engagés dans des interactions qui semblent équivalentes même si la présence d'une chaîne latérale plus importante comme la leucine peut guider le peptide différemment. Cependant, ayant eu beaucoup de problèmes de stabilité du plancher ces différents cas, et n'ayant pas eu le temps d'effectuer des simulations importantes, nous n'avons pas poursuivi ces simulations. Il serait important dans le futur de les reprendre et de vérifier le comportement de chacun d'entre eux, de regarder ce qui se passerait si l'on augmentait les peptides passant des monomères aux dimères puis trimères, de regarder les effets de solvation et certainement de reprendre ces études en focalisant particulièrement sur les caractéristiques hydrophobes.

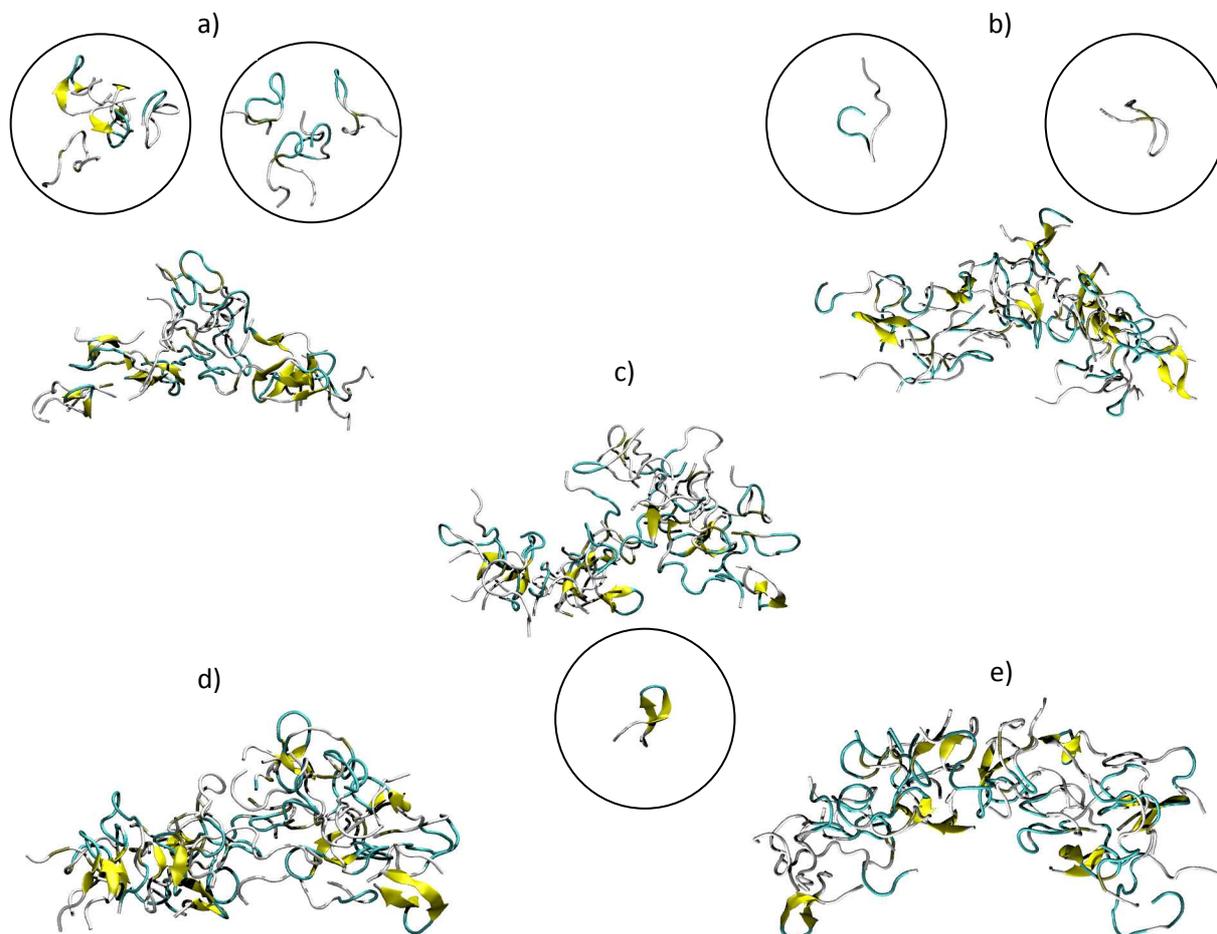
## **VI. Simulation de 27 chaînes de (VGGVG)<sub>3</sub> à 298 K en absence et présence de cholestérol :**

Comme nous avons pu le voir au travers de toutes les simulations précédentes, un des facteurs qui semblent être limitant dans la compréhension des mécanismes d'association et d'agrégation des peptides provient de l'étude du peptide « isolé », c'est-à-dire sans tenir compte de l'influence des autres peptides et par conséquent de la concentration. De façon à tenter d'apporter des premiers éléments de réponses nous avons abordé des simulations avec plusieurs chaînes peptidiques. De plus, de part la connaissance des études expérimentales menées par le Professeur Tamburro, nous avons considéré aussi comme solvant le taurocholate de sodium qui favorise la formation de structures amyloïdogéniques.

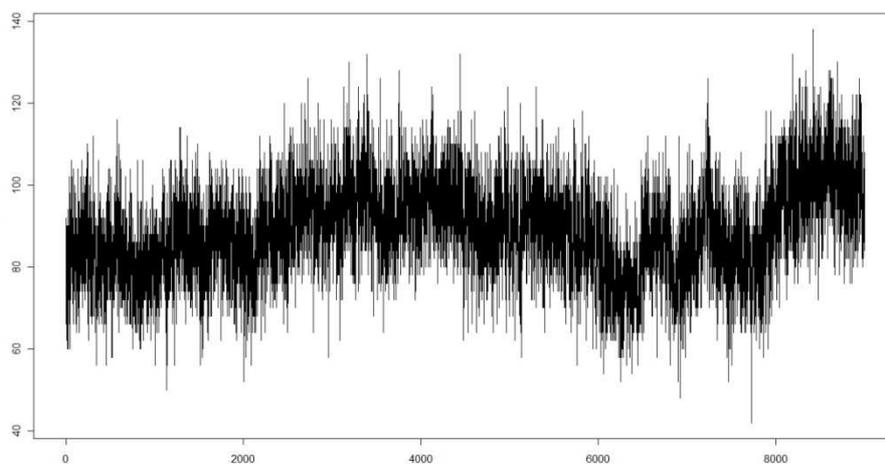
Cette première simulation a été menée en disposant 27 chaînes polypeptidiques dans une boîte de 71 Å de côté, complétées par une solvatation de molécules d'eau explicites. Deux simulations ont été menées afin de déterminer le rôle éventuel que joue le cholestérol dans l'assemblage des chaînes de (VGGVG)<sub>3</sub>. En effet, il est montré *in vitro* qu'en présence d'un analogue soluble du cholestérol (le taurocholate de sodium, sel biliaire) l'agrégation des peptides amyloïdogénique est grandement favorisée. Les 27 chaînes (405 résidus) sont disposées initialement de façon aléatoire dans la boîte, de même que 50 molécules de cholestérol dans la simulation correspondante afin de mimer les effets des lipides observés expérimentalement. Les analyses portent sur les 40 ns de simulation.

Nous pouvons voir qu'au cours de la trajectoire, les chaînes peptidiques se regroupent rapidement pour former un agrégat amorphe. Le nombre de chaînes isolées ou de petits agrégats (Figure 72a, b et c) diminue progressivement pour ne plus former qu'un oligomère (Figure 72d et e). Ce processus peut se traduire de plusieurs façons. Tout d'abord nous voyons une augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre les différents peptides (Figure 73). Parallèlement, la surface accessible au solvant voit sa valeur chuter de façon importante de 28000 à 18000 Å<sup>2</sup>. Le regroupement des peptides tend à enfouir certains résidus et ainsi à les masquer aux molécules d'eau. La surface accessible aux molécules diminue donc. Dans le même temps, nous constatons une augmentation du nombre de contacts entre les peptides (Figure 80). Les variations très importantes observées (flèches Figure 80) sont liées aux conditions périodiques. En effet, pour éviter les effets de bords, nous utilisons au cours de la

simulation une fonction qui réintroduit toute molécule d'eau sortant par une face de la boîte par la face opposée. Cette fonction s'applique également aux peptides et occasionne une brusque variation dans certaines observables. Malgré tout, les profils que nous obtenons ne semblent pas laisser de doutes quant aux conclusions que nous tirons.



**Figure 72 : Intermédiaires observés au cours de la dynamique sans cholestérol.**



**Figure 73 : Evolution du nombre de liaisons hydrogène peptide-peptide au cours de la trajectoire sans cholestérol.**

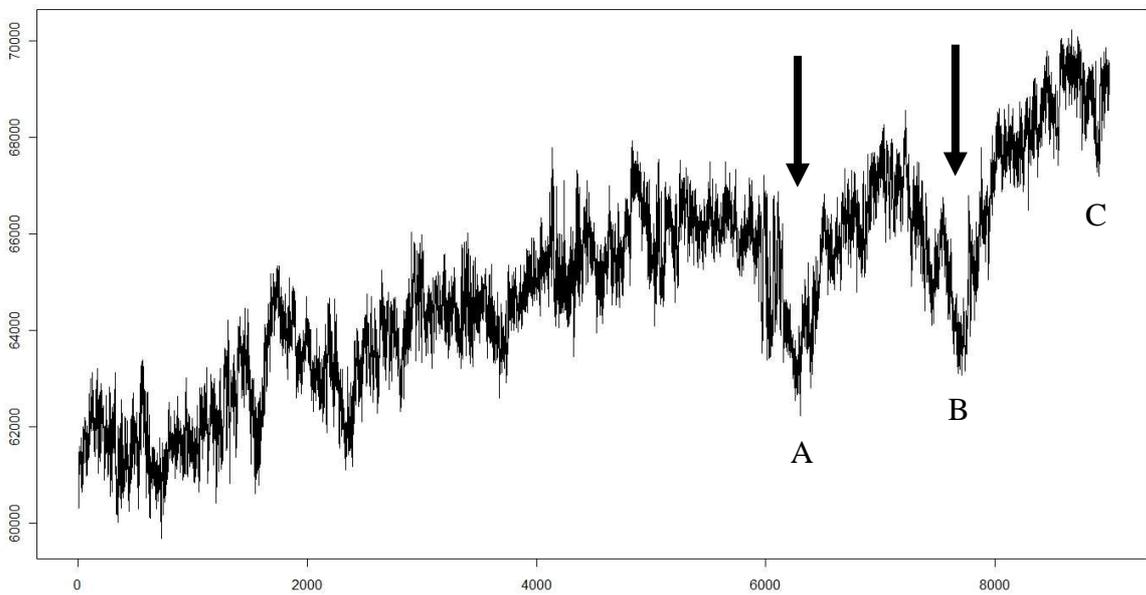
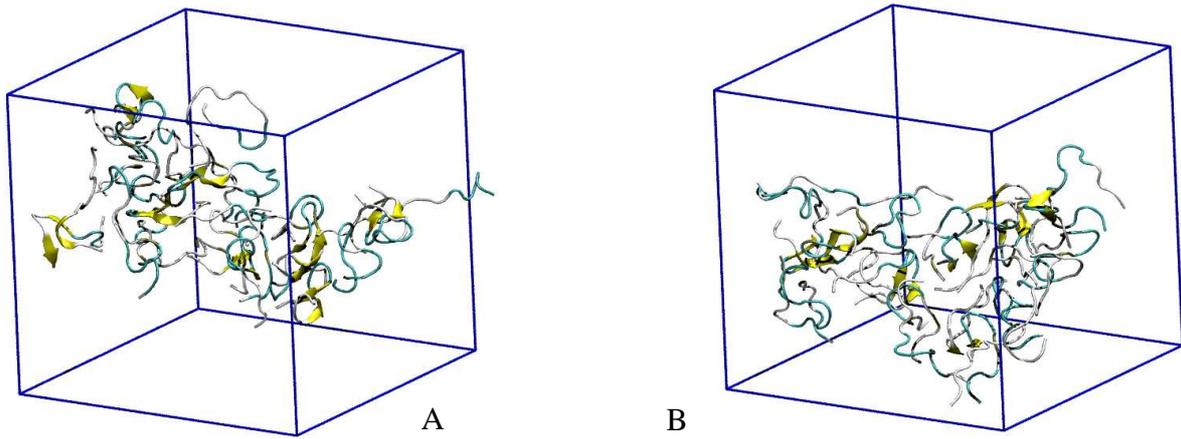
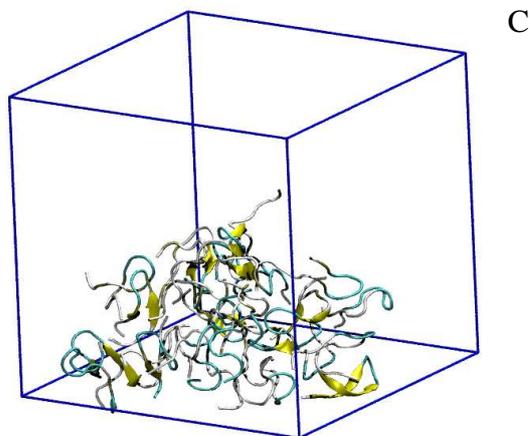
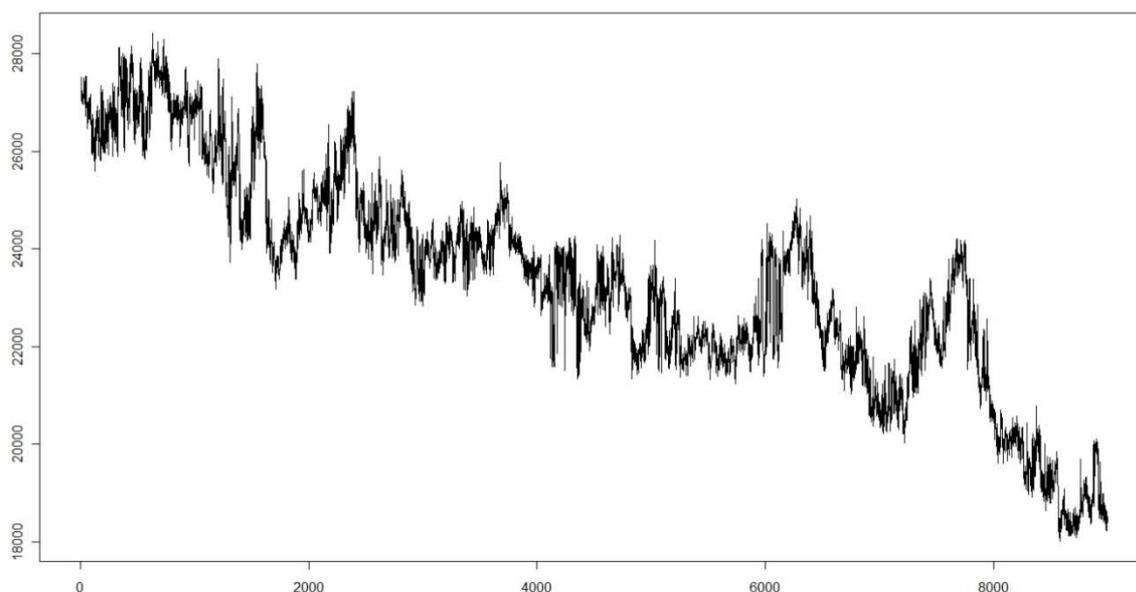
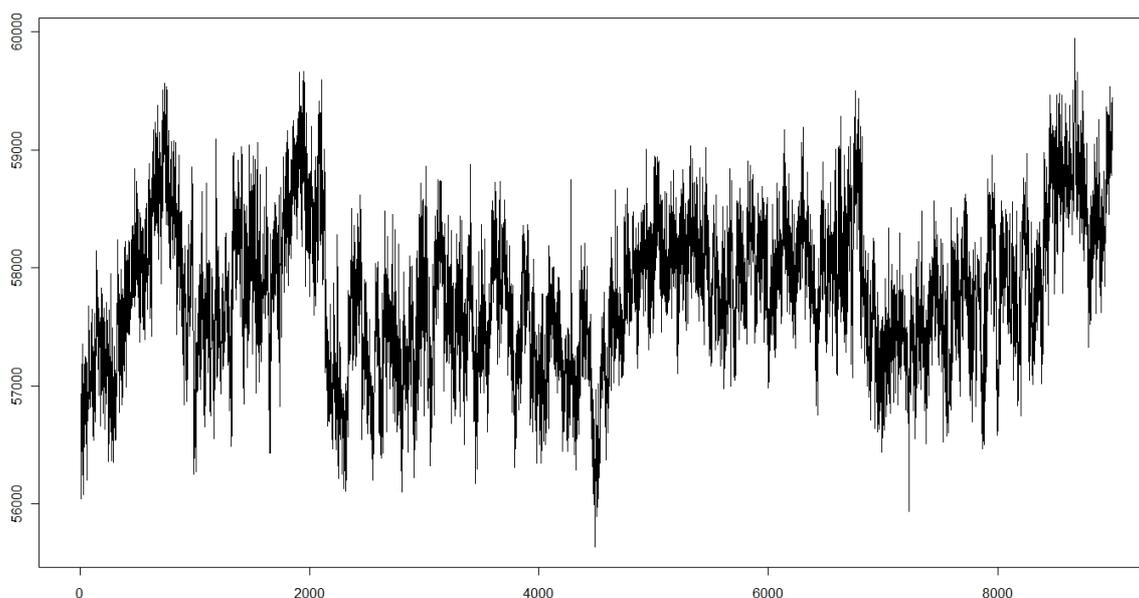


Figure 74 : Nombre de contacts peptide-peptide au cours de la dynamique sans cholestérol et images de la trajectoire au point A, B et C.



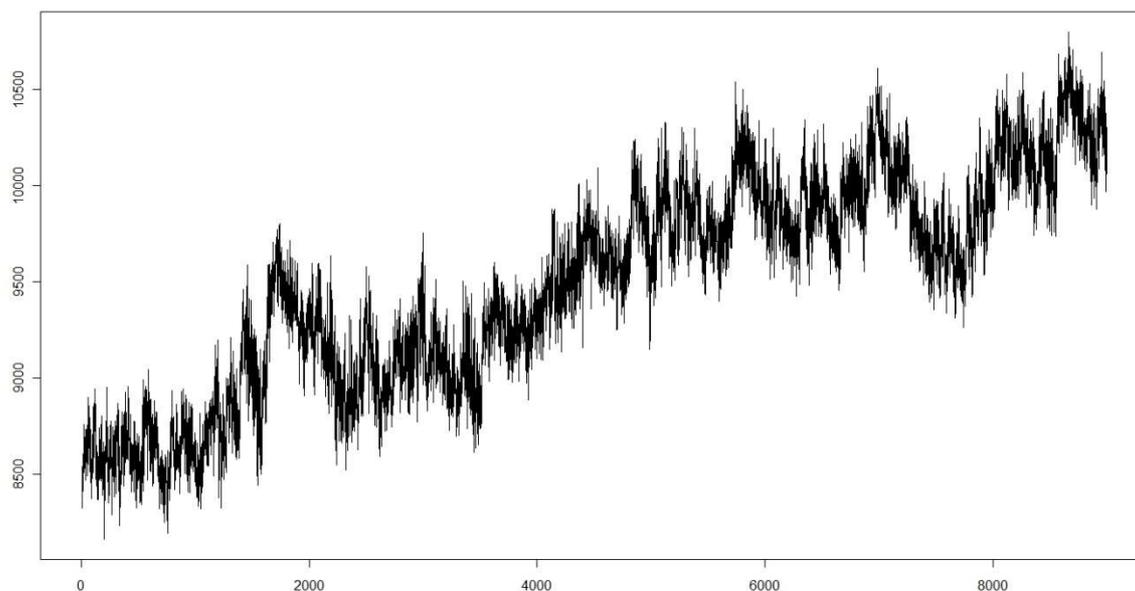


**Figure 75 : Surface accessible au solvant au cours de la trajectoire sans cholestérol.**

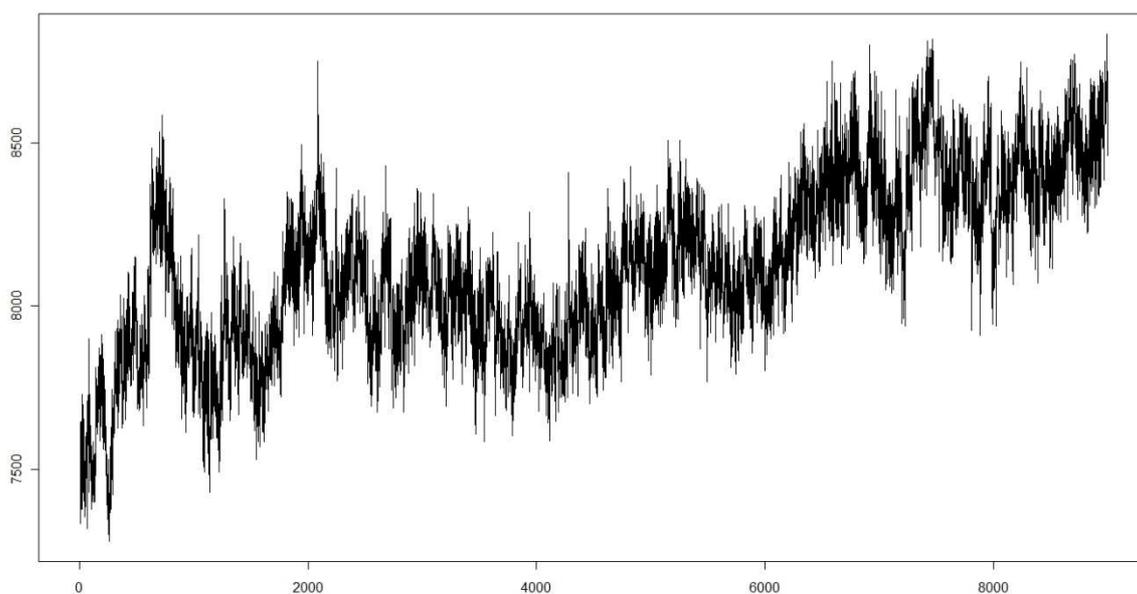


**Figure 76 : Nombre de contacts peptide-peptide au cours de la dynamique avec cholestérol.**

L'analyse de la trajectoire en présence de cholestérol ne donne pas un profil aussi régulier pour les différentes variables que nous regardons. Le nombre de contacts entre peptides est très fluctuant (Figure 76) par contre le nombre de contacts entre les chaînes latérales des résidus semble augmenter tout au long de la trajectoire argumentant en faveur d'un regroupement des chaînes latérales des valines aussi bien en présence qu'en absence de cholestérol (Figure 77 et Figure 78). Tout comme dans la première simulation, les peptides tendent à se regrouper et à former un amas mélangeant peptides et cholestérol.

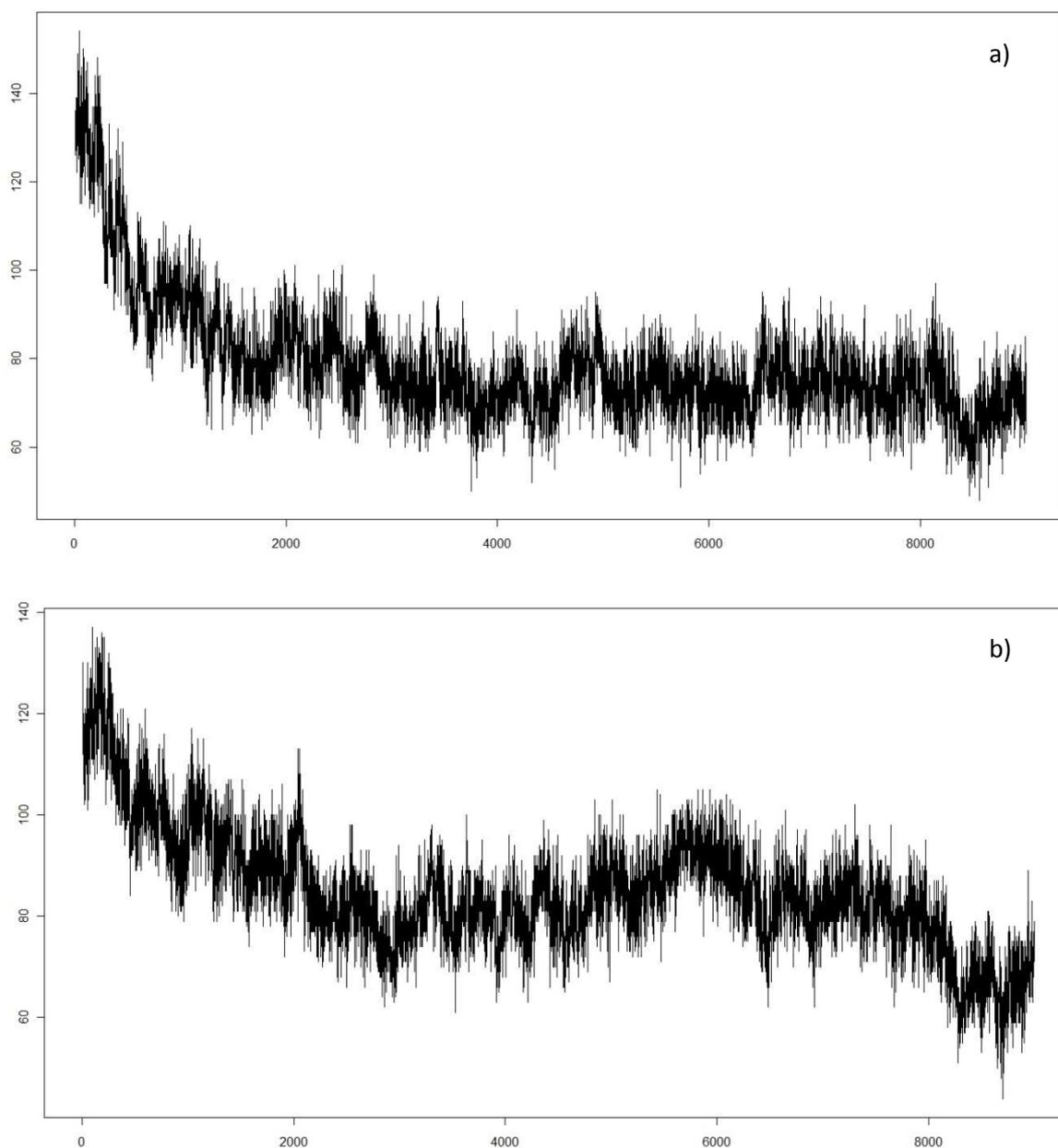


**Figure 77 : Nombre de contact peptide-peptide mettant en jeu les chaines latérales des résidus valine en absence de cholestérol.**



**Figure 78 : Nombre de contact peptide-peptide mettant en jeu les chaines latérales des résidus valine en présence de cholestérol.**

Lorsqu'on s'intéresse au contenu en structures  $\beta$  au cours des trajectoires de dynamique moléculaire, nous remarquons que le nombre d'acides aminés dans cette conformation tend à diminuer progressivement jusqu'à atteindre un équilibre. Dans le cas de la simulation en présence de lipide, la diminution de structures  $\beta$  semble être ralentie mais atteint au final un niveau comparable à la simulation sans cholestérol (Figure 79).



**Figure 79 : contenu en conformation  $\beta$  au cours des trajectoires a) sans et b) avec cholestérol.**

La taille des systèmes étudiés (plus de 30000 atomes) dans cette partie nécessite sans aucun doute un allongement du temps de simulation mais aussi des ressources en moyens de calcul importantes. Mais il reste inenvisageable d'obtenir au final une fibre parfaite constituée de chaînes parfaitement ordonnées en feuillets  $\beta$  parallèles ou antiparallèles.

## VII. Simulation de 2 peptides VGGLG contraints et comportement de l'eau au cours de la dynamique :

Comme on a pu le voir sur ce travail, le comportement dynamique des peptides d'élastine reposant sur des séquences de type XGGZG est très compliqué. Toutes les simulations réalisées l'ont été en prenant pour solvant explicite un modèle d'eau de TIP3P. Nous avons pu voir que cette solvataion semble jouer un rôle considérable dans le comportement dynamique

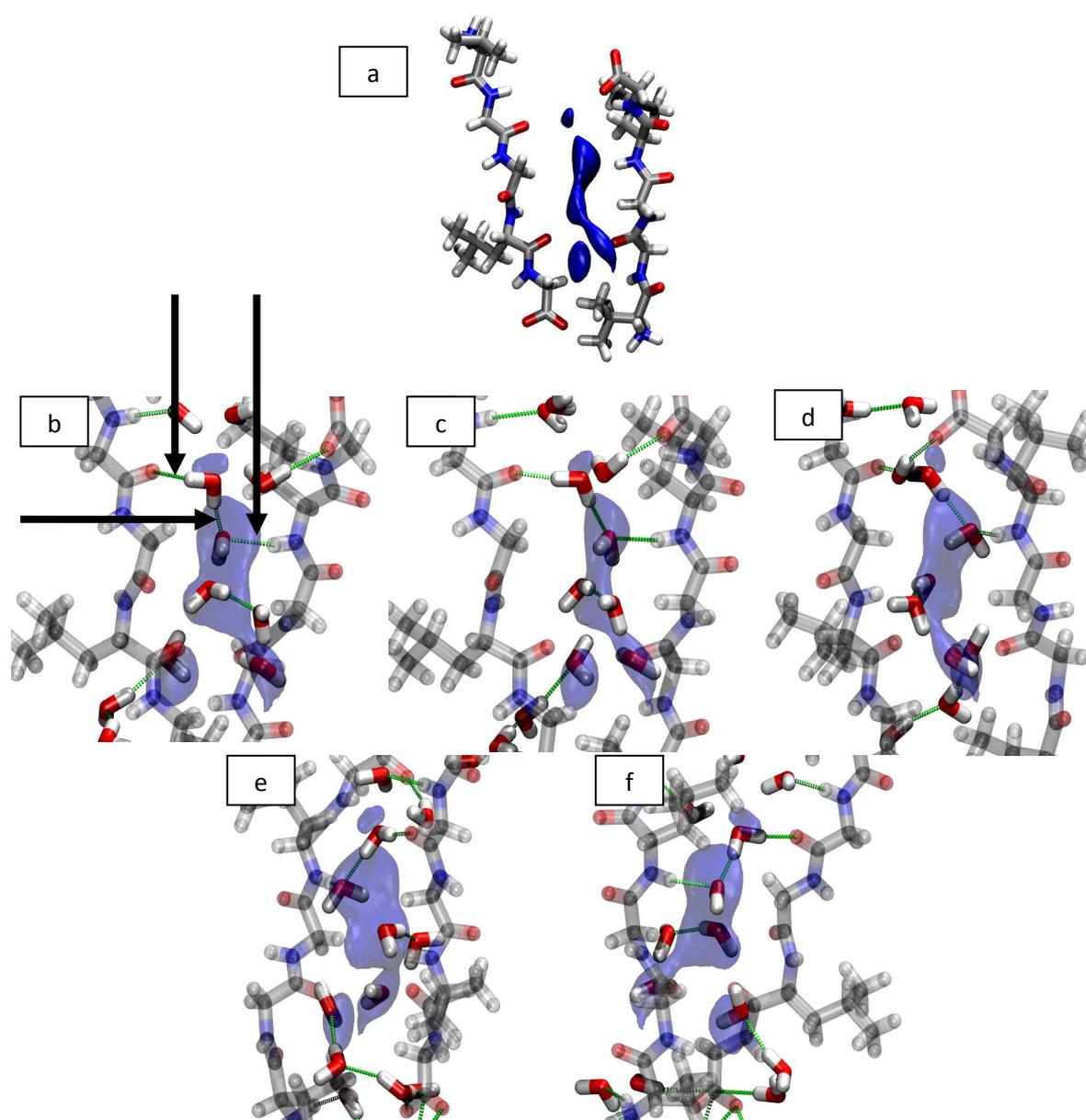


Figure 80 : a) Densité d'occupation de l'espace inter-peptidique par les molécules d'eau au cours de la trajectoire, b) c) d) vues comportant les molécules d'eau et liaisons hydrogène e) f) vue à 180 °.

des peptides et que de plus dans le cas par exemple des solvations des planchers idéaux cela devenait certainement fondamental, les interactions mises en jeu relevant presque exclusivement de contributions hydrophobes. Dans cette partie du travail nous tentons d'apporter une validation sur un modèle proposé par Tamburro et collaborateurs. A partir de ce modèle comportant les coordonnées des 10 résidus constituant deux peptides VGGLG et dix molécules d'eau, nous avons effectué une simulation en appliquant des contraintes sur les carbones  $\alpha$  tout en laissant les autres atomes évoluer librement. Le système est solvaté dans une boîte de 43x56x56 Å portant le nombre final d'atomes à 8926, dont 2936 molécules d'eau. La simulation est longue de 50 ns.

L'occupation moyenne de l'espace inter-peptide calculé à 0.1 Å est illustrée en Figure 80.

Peptide 1			Peptide 2		
donneur	accepteur	occupation	donneur	accepteur	occupation
VAL1-Main	water-O	41,37%	VAL1-Main	water-O	1,91%
GLY2-Main	water-O	30,17%	GLY2-Main	water-O	5,08%
GLY3-Main	water-O	1,66%	GLY3-Main	water-O	0,05%
LEU4-Main	water-O	60,60%	LEU4-Main	water-O	16,28%
GLY5-Main	water-O	2,91%	GLY5-Main	water-O	3,61%
water-O	VAL1-Main	8,32%	water-O	VAL1-Main	0,79%
water-O	GLY2-Main	70,90%	water-O	GLY2-Main	49,39%
water-O	GLY3-Main	0,08%	water-O	GLY3-Main	0,83%
water-O	LEU4-Main	17,48%	water-O	LEU4-Main	74,47%
water-O	GLY5-Main	0,09%	water-O	GLY5-Main	0,28%

Figure 81 : Liaisons hydrogène formées entre les peptides et les molécules d'eau à moins de 4 Å des deux peptides.

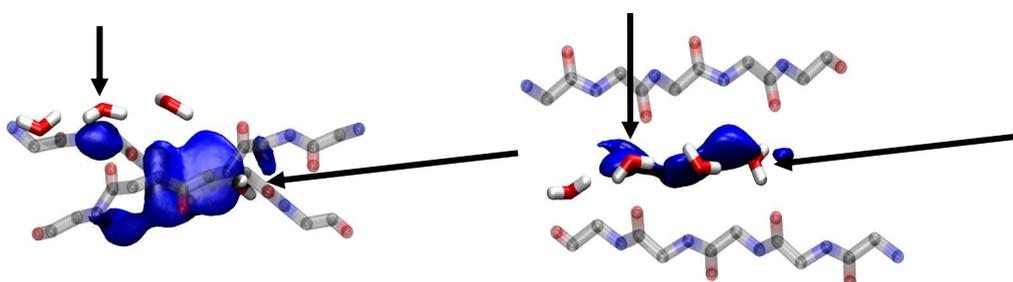
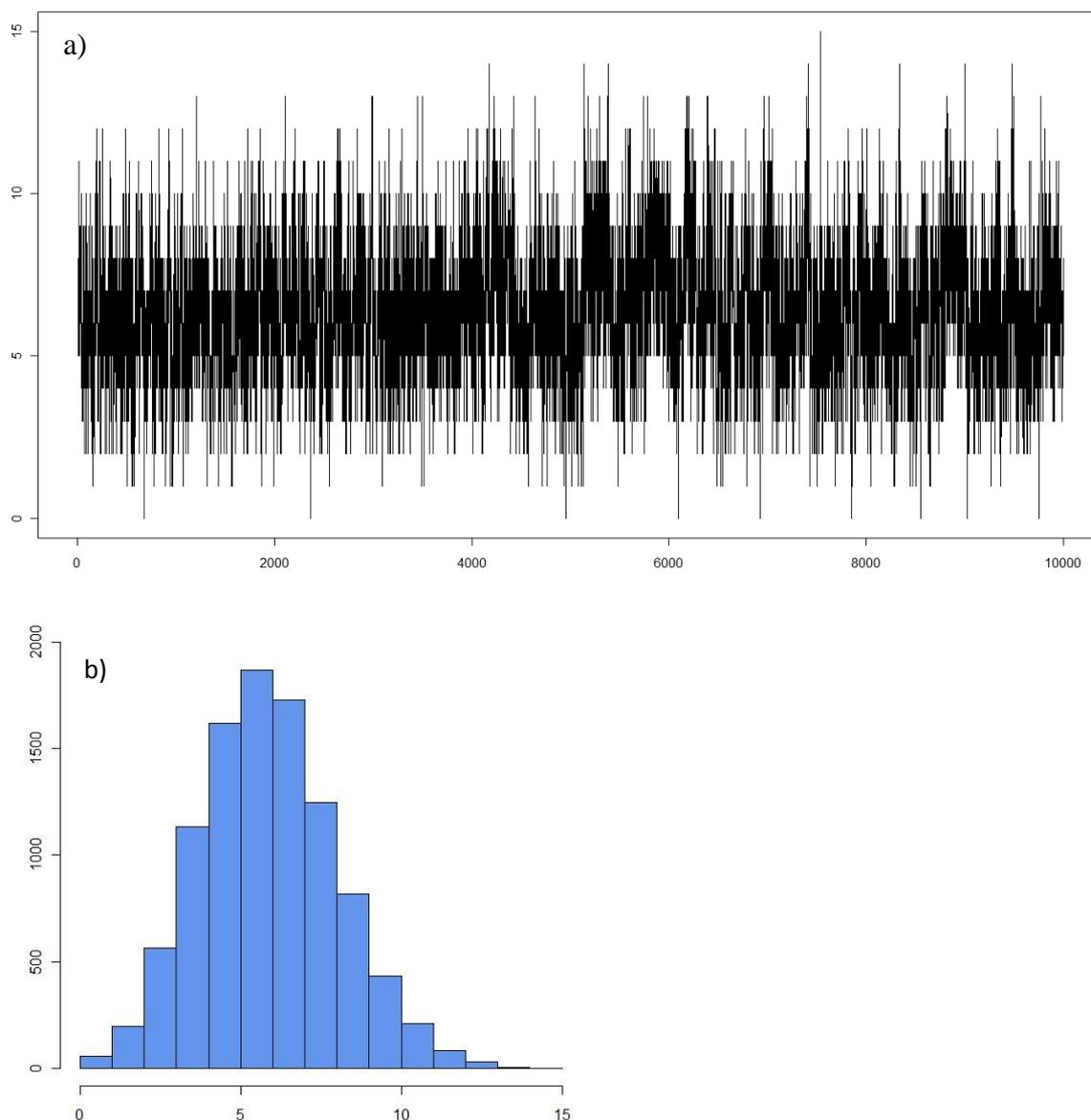


Figure 82 : Densité d'occupation calculée à partir de la trajectoire et superposition au modèle initiale proposé par Tamburro et collaborateurs.

Nous pouvons constater la formation d'un pontage entre les deux peptides par des molécules d'eau illustrées dans la figure. Ces molécules n'occupent pas parfaitement la densité mais sont assez représentatives.



**Figure 83 : a) Nombre de liaison H formées entre l'eau et les peptides au cours de la trajectoire dans l'espace inter-peptidique b) distribution correspondante.**

Les résidus impliqués dans les interactions avec l'eau sont reportés dans la Figure 81. Les liaisons hydrogène ont été calculées pour tout accepteur et donneur (eau et peptide) distant de moins de 3.51 Å et un angle de 30°, seules les molécules d'eau à moins de 4 Å des deux peptides sont concernées. Pour les deux peptides, les résidus en position 3 et 5 ne participent pratiquement pas à l'établissement de liaisons hydrogènes. Mise à part la valine 1 du peptide

2, les autres résidus sont très impliqués dans la formation de ces liaisons dans l'espace inter-peptidique. De plus, nous pouvons constater que la moyenne du nombre de liaison est à 5 (Figure 83). Par rapport au modèle initiale, les molécules sont positionnées au dessus de la densité d'occupation déterminée (Figure 82). Deux d'entre elles (flèches) sont très proches de la densité et les deux autres en sont éloignées. Cependant, la densité calculée est suffisante à l'occupation par 3 ou 4 molécules d'eau comme dans le modèle initial.

Nous voyons donc que lorsque deux peptides sont en face l'un de l'autre, sans établir de liaisons hydrogène comme on les retrouve dans une association de type feuillet, il peut y avoir l'établissement d'une sorte de canal d'eau qui maintient les deux peptides. Ces peptides se trouvent en contact au travers du réseau de liaisons hydrogène qui existent en utilisant les molécules d'eau comme pontage. Il apparaît au travers de cette simulation que l'eau suit un réseau bien défini et que le temps de résilience des molécules d'eau permet de trouver des positions spécifiques depuis lesquels un réseau stable de liaisons hydrogène s'établit. Ces données semblent être compatibles avec l'autofluorescence observée par l'équipe du Professeur Tamburro.

---

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

L'élastine présente une multitude de fonctionnalité. Cette protéine est tout d'abord une protéine structurelle qui assure l'intégrité du tissu. Mais c'est aussi une protéine source de peptides impliqués dans la signalisation cellulaire et un ensemble de processus biologique. L'organisation modulaire ainsi que ses propriétés physico-chimiques particulière de l'élastine, grande résistance mais aussi élasticité, en ont fait un candidat de choix dans l'élaboration de matériau et biomatériau. Une grande attention a donc été portée à des blocs répétitifs identifiés dans la tropoélastine (VPGVG, VPG et XGGZG plus récemment).

Le bloc XGGZG - X, Z=Valine ou Leucine se caractérise pas sa capacité à donner des fibres de type amyloïde dans des conditions appropriées. Ce processus s'oppose à la coacervation par son caractère irréversible. Les motifs XGGZG de la tropoélastine humaine sont situés dans l'exon 7 (une répétition VGGLG), dans l'exon 28 (répétitions LGGLG et LGGVG) et l'exon 30 (répétitions LGGLG, VGGLG et de nouveau VGGLG). Par extension nous nous sommes intéressés au motif VGGVG que nous qualifions d'"élastin-like". Expérimentalement de nombreuses données illustrent le caractère amyloïde des assemblages supramoléculaires que donnent aussi bien les exons 7, 28, 30, que les répétitions (XGGZG)<sub>n</sub>. Ces fibres fixent le rouge Congo et sont observés sous forme de globules, de protofibrilles, de fibres par diverses méthodes de microscopies.

L'élastine étant globalement une protéine peu structurée, et particulièrement dans les exons sur lesquels notre attention s'est portée, la modélisation moléculaire se révèle être un outil de choix ayant fait ses preuves lorsque l'on aborde le problème "élastine".

Aussi, la première étape de ce travail a porté sur l'étude des répétitions XGGZG simples en étudiant toutes les permutations possibles de valine et leucine. Toutes les simulations ont été menées à 298 K car la plupart des données disponibles sur ces peptides sont obtenues à température ambiante. Nous montrons dans un premier temps que les peptides VGGVG, VGGLG, LGGVG et LGGLG existent dans un équilibre très dynamique au cours des trajectoires qui ont été conduites. Ces équilibres incluent des structures étendues et des structures repliées présentant les extrémités N et C-terminales très proches. Nous pouvons observer des structures intermédiaires dont certaines ont des coudes qui sont communément qualifiés de coudes glissants.

Ce type de comportement a déjà été très bien décrit pour des peptides typiques de la tropoélastine comme par exemple le peptide VGVAPG. La principale différence par rapport

aux peptides que nous étudions est l'absence de la proline dans la séquence. Ce résidu a tendance à "rigidifier" le squelette peptidique et à permettre la formation d'un coude de type VIII sur les résidus GVAP. Cette conformation confère au peptide VGVAPG une activité biologique *via* son complexe récepteur l'Elastin Binding Protein, EBP. De nombreuses études de docking et dynamique moléculaire de complexe VGVAPG et EBP corroborent les données structurales de ce peptide.

Dans notre cas, aucun type de coude particulier autre que le type IV n'a pu être mis en évidence de par la présence de nombreuses glycines. Cependant, cette structure en coude coexiste avec des structures locales sur les résidus non-glycine en polyproline II qui est une structure qui est très régulièrement mise en évidence dans le monomère d'élastine ou les exons et peptides qui en sont dérivés.

La suite de ce travail a concerné l'étude des répétitions XGGZG répétées deux fois. Comme pour les monomères du motif consensus, nous voyons un équilibre de conformations faisant apparaître de nombreux coudes et une forte propension à former de la polyproline II. A ce stade, nos résultats ne permettent pas d'expliquer les mécanismes mis en jeu dans la formation de fibres de type amyloïde par la séquence consensus XGGZG retrouvée dans l'exon 7, 28 et 30. Sachant qu'expérimentalement une séquence minimale est requise pour voir apparaître des fibres de type amyloïde, nous avons donc décidé d'étendre à des peptides plus long, soit jusqu'à 15 résidus. Loin de l'idée de faire du folding des exons de l'élastine, qui de tout façon sont peu ordonnés, l'objectif était de montrer l'apparition de structures secondaires autres que celles habituellement observées. Nous montrons que le peptide (VGGVG)<sub>3</sub> adopte une conformation en feuillets  $\beta$  antiparallèles qui sont observables de façon transitoire, de même que l'établissement de liaisons hydrogène entre les brins adjacents. Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales sur le poly(VGGVG). L'augmentation de la température semble, dans nos simulations, réduire la stabilité des feuillets  $\beta$  antiparallèles lorsque ceux-ci sont observés. Dans le cas des peptides (VGGLG)<sub>3</sub> et (LGGVG)<sub>3</sub> nous voyons apparaître des hélices à divers endroits de la séquence. Cette observation est confirmée pour le polypeptide (LGGLG)<sub>3</sub> qui donne principalement des hélices du type  $\alpha$  et/ou  $3_{10}$ . Ces résultats laissent à supposer que la valine est plus favorable que la leucine dans la formation de structure  $\beta$  dans le cas d'une chaîne isolée. Dans les protéines ou les polypeptides formant des amyloïdes, il est souvent mis en évidence une transition de structures de type hélice  $\alpha$  vers des conformations de type feuillet. Dans les

peptides que nous avons étudiés, nous voyons apparaître des hélices  $\alpha$  en combinaison avec des coudes et de la polyproline II qui est une forme d'hélice. Il paraît donc tout à fait possible de spéculer que les poly(XGGZG) ou les exons 28 et 30 subissent une transition de cet ordre.

Plusieurs simulations ont ensuite été menées sur les exons 28, 30 et 30\_17. Pour ce dernier peptide, les simulations conduisent à des feuillets qui se matérialisent dans les séquences que nous avons étudiées. Ces observations sont comparables au cours de la dynamique de l'exon 30 mais ne donnent pas de structures secondaires d'autres natures que les coudes ou la polyproline II dans le cas de l'exon 28. Le rôle de l'exon 30, et de toute la partie C-terminale de la tropoélastine codée par les exons 29 à 36, dans l'assemblage normal de la molécule à des fibres élastiques en croissance est largement décrit. Il convient cependant de s'interroger sur l'ambivalence de cet exon : pris dans la molécule de tropoélastine entière, il interagit avec les microfibrilles tandis que dans certaines conditions il est capable de donner des fibres amyloïdes dont les effets sur les cellules peuvent-être délétères.

La continuité de ce travail a donné lieu à une approche originale. Nous avons créé un plancher idéal de feuillets  $\beta$  virtuellement infini à travers les conditions périodiques. La simulation de peptides dans cet environnement s'est justifiée par le fait qu'expérimentalement la présence d'une structure  $\beta$  est un facteur favorisant l'agrégation. Nous pouvons constater que les peptides viennent très rapidement au contact du plancher et adoptent deux orientations principales, perpendiculaire et parallèle à la direction du plancher. Ces interactions sont principalement de nature stérique et hydrophobe. Le plancher agit alors comme une matrice sur laquelle une croissance fibrillaire est envisageable.

La dernière partie de ce travail a concerné l'étude du comportement de l'eau entre deux peptides dont le modèle a été proposé par Tamburro et coll. afin d'expliquer la fluorescence intrinsèque de fibres amyloïdes. Nous montrons que des positions préférentielles de l'eau sont identifiées et qu'elles ne sont pas en accord complet avec les modèles proposés. Cependant, la position des molécules d'eau pourraient être en accord avec nos observations si ces dernières se situaient dans le plan constitué par les deux peptides.

Nous avons évoqué au cours de ce travail le point de vue biologique. Le matériel qui nous intéresse est un des constituants majeurs de la MEC au contact direct des cellules (musculaires lisses notamment). Dans des conditions physiopathologiques comme l'emphysème ou l'athérosclérose, les fibres élastiques et son monomère, la tropoélastine, sont

soumises à l'action de diverses enzymes de dégradation dont les élastases qui augmentent en grande quantité dans les phénomènes d'inflammation. Il est désormais montré que ces enzymes ont le potentiel de libérer dans le proche environnement cellulaire des peptides contenant le motif XGGZG pris dans des polypeptides plus ou moins long.

De plus, un faisceau convergent d'indices semblent indiquer que la tropoélastine est un candidat potentiel à la formation de fibres amyloïdes *in vivo*. Des dépôts qualifiés d'élastotiques ont été décrits chez l'homme, mais à l'heure actuelle la provenance des protéines impliquées dans ces processus n'est encore clairement identifiée. Il est montré que les protéines impliquées dans les amyloïdoses de la paroi artérielles peuvent être la lactadhérine (une protéine interagissant avec l'élastine, possède un peptide clivé, la médine, qui a la capacité de former des fibres amyloïde dans la paroi aortique) ou l'élastine qui a aussi été identifiée dans des dépôts amyloïdes de la paroi artérielle.

La présence de dépôt conduit à l'affaiblissement de la paroi pour conduire finalement à sa rupture. De plus la présence même de formes agrégées peut avoir des effets sur la survie des cellules environnante. C'est dans le but d'évaluer l'impact d'agrégats formés à partir de l'exon 30 de la tropoélastine que nous avons envisagé des tests biologiques sur des cellules musculaires lisses vasculaires. Nous voulions évaluer l'effet sur la survie ou la prolifération de ces cellules. Malheureusement, l'utilisation d'un matériel agrégé s'est révélée compliquée sur des cellules. Les tests envisagés nécessitent l'emploi d'une grande quantité de peptide, à l'échelle de la dizaine du milligramme pure, quantité qui n'est facile à obtenir. De plus, l'expérimentateur chimiste utilise parfois des solvants organiques tels que le trifluoroéthanol, (TFE), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ou encore l'acétonitrile. Ces solvants ne sont pas compatibles en culture cellulaire ce qui rend l'étude de l'effet des peptides sur des cellules compliquée.

Outre les expérimentations biologiques, les perspectives de ce travail sont multiples. Il semble nécessaire d'envisager l'emploi de méthodes permettant de s'affranchir des échelles de temps requis pour la survenue d'évènements conduisant à la formation d'assemblages mettant en jeu un grand nombre de chaînes. Cette perspective doit cependant être tempérée. La tropoélastine, reste une protéine nativement peu structurée mais qui exhibe des conformations locales en équilibre dynamique, n'est pas forcément un bon candidat à

l'emploi de méthodologies développées pour des protéines qui adoptent une structuration "classique".

Sur les bases du travail effectué, des simulations utilisant les techniques de gros-grains (coarse-grained) ont été initiées. Les premiers résultats, bien qu'ils ne corroborent pas totalement les résultats obtenus, sont encourageants. Ces techniques couplées à des méthodes d'échantillonnage différents comme les échanges de répliques (Replica-Exchange) doivent nous permettre de simulations beaucoup plus longues, soit d'envisager l'étude de différentes concentrations chacun des peptides étudiés. Il apparaît aussi que des simulations en température pourraient s'avérer très intéressantes pour tenter d'étudier les phénomènes de coacervation ou d'agrégation et ainsi approfondir nos connaissances sur ces deux processus.

En tant que telles, les simulations obtenues dans ce travail et celles décrites ci-dessus pourraient être une source de données fondamentales pour le comportement des molécules d'eau et l'effet de solvation de ces peptides. Il serait impératif de reprendre l'ensemble des simulations et de ne s'intéresser qu'aux effets de solvation, aux positions moyennes des molécules d'eau, à leurs dynamiques et à leurs arrangements structuraux. Sur certaines des simulations et pour des conformations de type coude, nous avons constaté une organisation des molécules d'eau sous forme de clathrates autour des chaînes latérales de valine. Les structures semblent "s'effondrer" lorsque la conformation du peptide change.

Parmi d'autres simulations à envisager, la piste des planchers idéaux semble aussi très prometteuse. Augmenter la taille de la cellule initiale, augmenter les nombres de brins, jouer sur la taille du ou des peptides relâchés, modifier les conditions de température, de solvation (comme l'ajout de taurocholate de sodium ou cholestérol), regarder le paysage et les paramètres physico-chimiques et les forces hydrophobes des planchers, ajouter plusieurs planchers, relâcher toutes contraintes sont autant de simulations qui peuvent être effectuées.

Les peptides poly(XGGZG) constituent de bons candidats à l'élaboration de biomatériaux, il est sans doute encore primordial d'affiner nos connaissances sur les éléments qui gouvernent l'agrégation mais aussi la coacervation ou l'assemblage normal de la tropoélastine dans les fibres élastiques. L'obtention de matériau à base de peptides dérivés de l'élastine peut s'envisager de deux façon : une agrégation directe contrôlé ou l'ajout d'une lysine en position N et C-terminale suivi d'une réaction de liaison au glutaraldéhyde. Cette réaction conduit alors à l'obtention d'un matériau qui possède des caractéristiques

macroscopiques comparables aux fibres amyloïdes. Les champs d'applications de tels matériaux restent cependant à approfondir et à investiguer.

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Allen, M. P. and D. J. Tildesley (1987). "Computer Simulation of Liquids." Oxford University Press, New York.
- Bashir, M. M., Z. Indik, et al. (1989). "Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region." J Biol Chem **264**(15): 8887-91.
- Baskakov, I. V., G. Legname, et al. (2002). "Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid." J Biol Chem **277**(24): 21140-8.
- Bochicchio, B., M. Lorusso, et al. (2009). "On enhancers and inhibitors of elastin-derived amyloidogenesis." Nanomed **4**(1): 31-46.
- Bochicchio, B., A. Pepe, et al. (2007). "Investigating the amyloidogenic nanostructured sequences of elastin: sequence encoded by exon 28 of human tropoelastin gene." Biomacromolecules **8**(11): 3478-86.
- Brassart, B., P. Fuchs, et al. (2001). "Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts." J Biol Chem **276**(7): 5222-7.
- Broch, H., M. Moulabbi, et al. (1996). "Conformational and electrostatic properties of V-G-G-V-G, a typical sequence of the glycine-rich regions of elastin. An ab initio quantum molecular study." Int J Pept Protein Res **47**(5): 394-404.
- Broch, H., M. Moulabbi, et al. (1998). "Quantum molecular modeling of the elastic tetrapeptide Val-Pro-Gly-Gly." J Biomol Struct Dyn **15**(6): 1073-91.
- Broekelmann, T. J., C. H. Ciliberto, et al. (2008). "Modification and functional inactivation of the tropoelastin carboxy-terminal domain in cross-linked elastin." Matrix Biol **27**(7): 631-9.
- Brown-Augsburger, P., T. Broekelmann, et al. (1994). "Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase." J Biol Chem **269**(45): 28443-9.
- Brown-Augsburger, P., C. Tisdale, et al. (1995). "Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly." J Biol Chem **270**(30): 17778-83.
- Castiglione-Morelli, A., A. Scopa, et al. (1990). "Spectroscopic studies on elastin-like synthetic polypeptides." Int J Biol Macromol **12**(6): 363-8.
- Chiti, F. and C. M. Dobson (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease." Annu Rev Biochem **75**: 333-66.
- Cohen, A. S. and E. Calkins (1959). "Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins." Nature **183**(4669): 1202-3.
- Darden, T. A., D. M. York, et al. (1993). "Particle mesh Ewald: an N log(N) method for Ewald sums in large systems." J Chem Phys: 10089-10092.
- Debelle, L. and A. J. Alix (1999). "The structures of elastins and their function." Biochimie **81**(10): 981-94.
- Debelle, L., A. J. Alix, et al. (1995). "Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies." J Biol Chem **270**(44): 26099-103.
- Debelle, L., A. J. Alix, et al. (1998). "The secondary structure and architecture of human elastin." Eur J Biochem **258**(2): 533-9.
- Debelle, L. and A. M. Tamburro (1999). "Elastin: molecular description and function." Int J Biochem Cell Biol **31**(2): 261-72.
- Dehghani, F., N. Annabi, et al. (2008). "Effect of dense gas CO<sub>2</sub> on the coacervation of elastin." Biomacromolecules **9**(4): 1100-5.
- Del Mercato, L. L., P. P. Pompa, et al. (2007). "Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(46): 18019-24.

- Doostkam, S., J. R. Bohl, et al. (2008). "Amyloid deposits in senile vertebral arteries, immunohistological and ultrastructural findings." *Pak J Biol Sci* **11**(14): 1852-5.
- Essmann, U., L. Perea, et al. (1995). "A smooth particle mesh ewald method." *J Chem Phys*: 8577-8593.
- Ewald, P. (1921). "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale." *Ann Phys* **64**: 253-287.
- Fan, K. and W. A. Nagle (2002). "Amyloid associated with elastin-staining laminar aggregates in the lungs of patients diagnosed with acute respiratory distress syndrome." *BMC Pulm Med* **2**: 5.
- Fandrich, M. (2007). "On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates." *Cell Mol Life Sci* **64**(16): 2066-78.
- Fazio, M. J., M. G. Mattei, et al. (1991). "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7." *Am J Hum Genet* **48**(4): 696-703.
- Flamia, R., A. M. Salvi, et al. (2007). "Transformation of amyloid-like fibers, formed from an elastin-based biopolymer, into a hydrogel: an X-ray photoelectron spectroscopy and atomic force microscopy study." *Biomacromolecules* **8**(1): 128-38.
- Floquet, N., S. Hery-Huynh, et al. (2004). "Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide." *Biopolymers* **76**(3): 266-80.
- Frishman, D. and P. Argos (1995). "Knowledge-based protein secondary structure assignment." *Proteins* **23**(4): 566-79.
- Geddes, A. J., K. D. Parker, et al. (1968). "'Cross-beta' conformation in proteins." *J Mol Biol* **32**(2): 343-58.
- Gosline, J., M. Lillie, et al. (2002). "Elastic proteins: biological roles and mechanical properties." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**(1418): 121-32.
- Guantieri, V., A. M. Tamburro, et al. (1987). "Conformational studies on polypeptide models of collagen. Poly(Gly-Pro-Val), poly(Gly-Pro-Met), poly(Gly-Val-Pro) and poly(Gly-Met-Pro)." *Int J Pept Protein Res* **29**(2): 216-30.
- Guantieri, V., A. M. Tamburro, et al. (1983). "Interactions of human and bovine elastins with lipids: their proteolysis by elastase." *Connect Tissue Res* **12**(1): 79-83.
- Harris, J. R. (2002). "In vitro fibrillogenesis of the amyloid beta 1-42 peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition." *Micron* **33**(7-8): 609-26.
- Harrison, R. S., P. C. Sharpe, et al. (2007). "Amyloid peptides and proteins in review." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **159**: 1-77.
- Hinek, A. (1996). "Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor." *Biol Chem* **377**(7-8): 471-80.
- Hinek, A. and M. Rabinovitch (1994). "67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin." *J Cell Biol* **126**(2): 563-74.
- Hinek, A., D. S. Wrenn, et al. (1988). "The elastin receptor: a galactoside-binding protein." *Science* **239**(4847): 1539-41.
- Hoeve, C. A. and P. J. Flory (1974). "The elastic properties of elastin." *Biopolymers* **13**(4): 677-86.
- Hortschansky, P., V. Schroeckh, et al. (2005). "The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation." *Protein Sci* **14**(7): 1753-9.
- Huang, T. H., D. S. Yang, et al. (2000). "Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer beta-amyloid peptide." *J Mol Biol* **297**(1): 73-87.
- Huet, E., B. Brassart, et al. (2001). "[Effect of elastin peptides on the production of matrix metalloproteinase 2 by human skin fibroblasts in culture]." *J Soc Biol* **195**(2): 165-72.

- Humphrey, W., A. Dalke, et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph **14**(1): 33-8, 27-8.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1994). "A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins." Protein Sci **3**(12): 2207-16.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1996). "PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins." Protein Sci **5**(2): 212-20.
- Indik, Z., H. Yeh, et al. (1987). "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5680-4.
- Jaroniec, C. P., C. E. MacPhee, et al. (2002). "Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16748-53.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, et al. (1983). "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water." J Chem Phys **79**: 926-935.
- Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-637.
- Kallberg, Y., M. Gustafsson, et al. (2001). "Prediction of amyloid fibril-forming proteins." J Biol Chem **276**(16): 12945-50.
- Kelly, J. W. (2000). "Mechanisms of amyloidogenesis." Nat Struct Biol **7**(10): 824-6.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, et al. (2005). "Fibrillin microfibrils." Adv Protein Chem **70**: 405-36.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, et al. (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2817-28.
- Klunk, W. E., R. F. Jacob, et al. (1999). "Quantifying amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) aggregation using the Congo red-A $\beta$  (CR-A $\beta$ ) spectrophotometric assay." Anal Biochem **266**(1): 66-76.
- Kozel, B. A., H. Wachi, et al. (2003). "Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo." J Biol Chem **278**(20): 18491-8.
- Kumashiro, K. K., T. L. Kurano, et al. (2003). "<sup>13</sup>C CPMAS NMR studies of the elastin-like polypeptide (LGGVG)<sub>n</sub>." Biopolymers **70**(2): 221-6.
- Kumashiro, K. K., K. Ohgo, et al. (2008). "Structural insights into the elastin mimetic (LGGVG)<sub>6</sub> using solid-state <sup>13</sup>C NMR experiments and statistical analysis of the PDB." Biopolymers **89**(8): 668-79.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-53.
- Larsson, A., S. Peng, et al. (2006). "Lactadherin binds to elastin--a starting point for medin amyloid formation?" Amyloid **13**(2): 78-85.
- Larsson, A., L. Soderberg, et al. (2007). "Unwinding fibril formation of medin, the peptide of the most common form of human amyloid." Biochem Biophys Res Commun **361**(4): 822-8.
- Lelj, F., A. M. Tamburro, et al. (1992). "Molecular dynamics study of the conformational behavior of a representative elastin building block: Boc-Gly-Val-Gly-Gly-Leu-OMe." Biopolymers **32**(2): 161-72.
- LeVine, H., 3rd (1999). "Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T." Methods Enzymol **309**: 274-84.
- Li, B., D. O. Alonso, et al. (2001). "Hydrophobic hydration is an important source of elasticity in elastin-based biopolymers." J Am Chem Soc **123**(48): 11991-8.
- Li, B. and V. Daggett (2002). "Molecular basis for the extensibility of elastin." J Muscle Res Cell Motil **23**(5-6): 561-73.

- Lombard, C., L. Arzel, et al. (2006). "Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24." *Biochimie* **88**(12): 1915-21.
- Lombard, C., D. Bouchu, et al. (2005). "Proteinase 3 hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24." *Amino Acids* **28**(4): 403-8.
- Lopez de la Paz, M. and L. Serrano (2004). "Sequence determinants of amyloid fibril formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 87-92.
- Lundmark, K., G. T. Westermark, et al. (2005). "Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6098-102.
- Makin, O. S., E. Atkins, et al. (2005). "Molecular basis for amyloid fibril formation and stability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 315-20.
- Maquart, F. X., A. Simeon, et al. (1999). "[Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]." *J Soc Biol* **193**(4-5): 423-8.
- Martino, M., A. Bavoso, et al. (1998). "Structure and dynamics of elastin building blocks. Boc-LG-OEt, Boc-VGG-OH." *J Biomol Struct Dyn* **15**(5): 861-75.
- Martino, M., A. Coviello, et al. (2000). "Synthesis and structural characterization of poly(LGGVG), an elastin-like polypeptide." *Int J Biol Macromol* **27**(1): 59-64.
- Martino, M. and A. M. Tamburro (2001). "Chemical synthesis of cross-linked poly(KGGVG), an elastin-like biopolymer." *Biopolymers* **59**(1): 29-37.
- Mecham, R. P., T. Broekelmann, et al. (1995). "Elastic fibre assembly: macromolecular interactions." *Ciba Found Symp* **192**: 172-81; discussion 181-4.
- Mecham, R. P., A. Hinek, et al. (1989). "Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein." *Biochemistry* **28**(9): 3716-22.
- Mithieux, S. M. and A. S. Weiss (2005). "Elastin." *Adv Protein Chem* **70**: 437-61.
- Muiznieks, L. D., S. A. Jensen, et al. (2003). "Structural changes and facilitated association of tropoelastin." *Arch Biochem Biophys* **410**(2): 317-23.
- Muiznieks, L. D. and A. S. Weiss (2007). "Flexibility in the solution structure of human tropoelastin." *Biochemistry* **46**(27): 8196-205.
- Nelson, R. and D. Eisenberg (2006). "Structural models of amyloid-like fibrils." *Adv Protein Chem* **73**: 235-82.
- Nelson, R., M. R. Sawaya, et al. (2005). "Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils." *Nature* **435**(7043): 773-8.
- Ohgo, K., W. P. Niemczura, et al. (2006). "Heterogeneity in the conformation of valine in the elastin mimetic (LGGVG)<sub>6</sub> as shown by solid-state <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy." *Biomacromolecules* **7**(12): 3306-10.
- Ostuni, A., B. Boichichio, et al. (2007). "Molecular and supramolecular structural studies on human tropoelastin sequences." *Biophys J* **93**(10): 3640-51.
- Parks, W. C. and S. B. Deak (1990). "Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**(5): 399-406.
- Pawar, A. P., K. F. Dubay, et al. (2005). "Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases." *J Mol Biol* **350**(2): 379-92.
- Peng, S., A. Larsson, et al. (2007). "Role of aggregated medin in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm and dissection." *Lab Invest* **87**(12): 1195-205.
- Petkova, A. T., Y. Ishii, et al. (2002). "A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16742-7.
- Phillips, J. C., R. Braun, et al. (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD." *J Comput Chem* **26**(16): 1781-802.

- Privitera, S., C. A. Prody, et al. (1998). "The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein." *J Biol Chem* **273**(11): 6319-26.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, et al. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." *J Mol Biol* **7**: 95-9.
- Rauscher, S., S. Baud, et al. (2006). "Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils." *Structure* **14**(11): 1667-76.
- Reiser, K., R. J. McCormick, et al. (1992). "Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin." *FASEB J* **6**(7): 2439-49.
- Ritter, C., M. L. Maddelein, et al. (2005). "Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion." *Nature* **435**(7043): 844-8.
- Rodgers, U. R. and A. S. Weiss (2004). "Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin." *Biochimie* **86**(3): 173-8.
- Ryckaert, J. P., G. Ciccotti, et al. (1977). "Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes." *J Comp Phys* **23**: 327-341.
- Starcher, B. C. and D. W. Urry (1973). "Elastin coacervate as a matrix for calcification." *Biochem Biophys Res Commun* **53**(1): 210-6.
- Street, W. B., D. J. Tildesley, et al. (1978). "Multiples time-step methods in molecular dynamics." *Mol Phys* **35**: 639-468.
- Taddese, S., A. S. Weiss, et al. (2008). "In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24." *Matrix Biol.*
- Taddese, S., A. S. Weiss, et al. (2008). "Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin." *Matrix Biol* **27**(5): 420-8.
- Tamburro, A. M., B. Boichichio, et al. (2003). "Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies." *Biochemistry* **42**(45): 13347-62.
- Tamburro, A. M., V. Guantieri, et al. (1992). "Synthesis and structural studies of a pentapeptide sequence of elastin. Poly (Val-Gly-Gly-Leu-Gly)." *J Biomol Struct Dyn* **10**(3): 441-54.
- Tamburro, A. M., V. Guantieri, et al. (1991). "Polypeptide models of elastin: CD and NMR studies on synthetic poly(X-Gly-Gly)." *Chirality* **3**(4): 318-23.
- Tamburro, A. M., A. Pepe, et al. (2006). "Localizing alpha-helices in human tropoelastin: assembly of the elastin "puzzle"." *Biochemistry* **45**(31): 9518-30.
- Tamburro, A. M., A. Pepe, et al. (2005). "Supramolecular amyloid-like assembly of the polypeptide sequence coded by exon 30 of human tropoelastin." *J Biol Chem* **280**(4): 2682-90.
- Tartaglia, G. G., A. P. Pawar, et al. (2008). "Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins." *J Mol Biol* **380**(2): 425-36.
- Tjernberg, L. O., J. Naslund, et al. (1996). "Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand." *J Biol Chem* **271**(15): 8545-8.
- Urry, D. W., B. Starcher, et al. (1969). "Coacervation of solubilized elastin effects a notable conformational change." *Nature* **222**(5195): 795-6.
- Villani, V. and A. M. Tamburro (1995). "Conformational modeling of elastin tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Gly-Gly-NMe by molecular dynamics simulations with improvements to the thermalization procedure." *J Biomol Struct Dyn* **12**(6): 1173-202.
- Villani, V. and A. M. Tamburro (1999). "Conformational chaos of an elastin-related peptide in aqueous solution." *Ann N Y Acad Sci* **879**: 284-7.

- 
- Vrhovski, B., S. Jensen, et al. (1997). "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin." *Eur J Biochem* **250**(1): 92-8.
- Wacker, J. L., M. H. Zareie, et al. (2004). "Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1215-22.
- Wei, S. M., J. Erdei, et al. (1993). "Elastin peptide concentration in human serum: variation with antibodies and elastin peptides used for the enzyme-linked immunosorbent assay." *J Immunol Methods* **164**(2): 175-87.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2008). "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." *Biopolymers* **89**(5): 392-400.
- Wilmot, C. M. and J. M. Thornton (1990). "Beta-turns and their distortions: a proposed new nomenclature." *Protein Eng* **3**(6): 479-93.
- Yong, W., A. Lomakin, et al. (2002). "Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid beta -protein fibril assembly by using small angle neutron scattering." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 150-4.
- Zhang, M. C., L. He, et al. (1999). "Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN)." *J Biol Chem* **274**(2): 981-6.

## RESUME

Ce travail de thèse porte sur l'étude de peptides dérivés de la tropoélastine par simulations de dynamique moléculaire en solvant explicite. Ces peptides sont issus des exons 7, 28 et 30 et possèdent une séquence consensus XGGZG (X, Z = Valine, Leucine) identifiée expérimentalement comme responsable de la formation d'assemblages supramoléculaire ayant des propriétés amyloïdes. Nous montrons tout d'abord que le motif minimal XGGZG et (XGGZG)<sub>2</sub> adoptent un grand nombre de coudes quelque soit la permutation entre valine et leucine et que localement les résidus non-glycine présentent une conformation de type polyproline II dans des proportions significatives. L'étude des répétitions (XGGZG)<sub>3</sub> fait apparaître des structures allant du feuillet  $\beta$  antiparallèle pour (VGGVG)<sub>3</sub> à de l'hélice  $\alpha$  et  $3_{10}$  pour (LGGLG)<sub>3</sub>. Les répétitions (VGGLG)<sub>3</sub> et (LGGVG)<sub>3</sub> donnent pour leur part à la fois des structures comportant de faibles proportions d'hélices ou de feuillets. Des résultats équivalents sont obtenus sur les exons 28 et 30 entiers, ainsi que sur le peptide comprenant les 17 premier résidus de l'exon 30. La création d'un plancher poly(VGGVG) de brins  $\beta$  virtuellement infini nous permet de montrer qu'en sa présence, des peptides VGGVG peuvent s'organiser parallèlement ou perpendiculairement à ce dernier. Enfin, des simulations préliminaires distinctes ont été menées afin d'évaluer le rôle du cholestérol dans les phénomènes d'agrégation ou dynamiques des peptides dérivés de la tropoélastine. Des études de l'effet biologique des ces peptides ont été débutées et sont une perspectives intéressantes de ce travail.

### MOTS-CLES :

Elastine - Peptides d'élastine - répétitions XGGZG - Exon 28 - Exon 30 - Agrégation - Amyloïde - Plancher  $\beta$  - NAMD - Dynamique Moléculaire -Synthèse Chimique - Dichroïsme Circulaire - Turbidimétrie - Microscopies