

Université de Montréal

Exploration des mécanismes d'agrégation de peptides amyloïdes

par
Geneviève Boucher

Département de Biochimie (Bioinformatique)
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Bioinformatique

Août, 2005

© Geneviève Boucher, 2005.



W

4

U58

2006

v.006

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Exploration des mécanismes d'agrégation de peptides amyloïdes

présenté par:

Geneviève Boucher

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Hervé Philippe,	président-rapporteur
Normand Mousseau,	directeur de recherche
Michel Côté,	membre du jury

Mémoire accepté le: ...07/12/05

À Laurent.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur, Normand Mousseau, de m'avoir offert l'opportunité de faire ma maîtrise sous sa direction et Philippe Derreumaux pour m'avoir guidée dans l'aspect biochimique de mon projet.

Aussi, je tiens à souligner la gentillesse de ceux et celles qui n'ont pas hésité à m'offrir leur aide qui s'est avéré très précieuse : Guang Hong Wei, Mathieu Coinçon, Sébastien Santini et Adrien Melquiond.

Je voudrais aussi remercier mes collègues, mes amis et ma famille qui m'ont encouragée tout au long de ces trois années ; un merci tout spécial à Laurent Nepveu dont le soutien a su entretenir ma persévérance et ma motivation jusqu'à la fin.

Je voudrais aussi dire un immense merci au CRSNG ainsi qu'à la FES pour leur soutien financier.

RÉSUMÉ

Les fibrilles amyloïdes sont associées à plus d'une vingtaine de maladies collectivement nommées amyloïdoses. Ces structures sont morphologiquement similaires, malgré l'absence de propriété commune au niveau de la séquence ou de la structure native des protéines qui les composent. La nature des fibrilles a considérablement nui à leur caractérisation. Toutefois, des études ont révélé que les peptides les composant s'organisent selon un motif de feuillets β en croix. Aussi, un grand nombre d'observations suggère que la toxicité observée dans les amyloïdoses n'est pas liée aux fibrilles, mais aux oligomères solubles formés plus tôt dans la fibrillogénèse. Les oligomères sont donc des cibles thérapeutiques potentielles et la compréhension de leurs mécanismes d'agrégation devient primordiale pour lutter contre les amyloïdoses. Cependant, leur caractérisation expérimentale est complexe d'où l'attrait de compléter les efforts expérimentaux en utilisant des méthodes d'analyse *in silico*. Par contre, les méthodes numériques classiques ne peuvent être utilisées efficacement pour étudier la formation des oligomères, car leur temps d'agrégation est considérable et hors de la portée de ces méthodes. Des méthodes numériques alternatives doivent donc être utilisées.

Dans le cadre de ce mémoire, j'ai étudié de façon détaillée les mécanismes d'agrégation de peptides amyloïdes en utilisant la technique d'activation-relaxation (ART) couplée à un potentiel d'énergie simplifié (OPEP). Cette combinaison a été utilisée avec succès par le passé. J'ai donc utilisé cette méthode pour étudier l'assemblage d'un tétramère du peptide KFFE, petit peptide capable de former des fibrilles *in vitro*, et pour étudier la formation d'un tétramère d'un fragment constitué des résidus 11 à 25 du peptide β -amyloïde, peptide associé à la maladie d'Alzheimer.

Mots-clés : amyloïde, agrégation, oligomères, fibrilles, simulation, technique d'activation-relaxation

ABSTRACT

Insoluble amyloid fibrils are found in several diseases such as Alzheimer's disease. Although the fibrillae observed in these diseases are histologically similar, the normally soluble proteins implied in their formation do not have, *a priori*, any common properties. The insoluble polymeric nature of the fibril has limited the amount of high resolution data available. However, X-ray diffraction of the fiber revealed a cross-beta sheet motif within the fibrils. Mounting evidences suggest that the toxicity observed in these diseases is not related to the fibrillae themselves, but to soluble intermediate oligomers formed earlier in the process of fibrillogenesis. It is therefore of great interest to study and understand the mechanisms of oligomers formation. However, the experimental and detailed characterization of intermediate oligomers is complex. Considering this obstacle, *in silico* methods provide an interesting alternative approach that can complement efficiently experimental efforts. In particular, computer simulations should be able to provide reliable insights on the general properties associated with the aggregation mechanisms. Even for small peptidic chains with an implicit solvent description the aggregation process can take a time beyond the reach of standard simulation techniques such as molecular dynamics (MD), and alternative techniques must be used.

Using the activation-relaxation technique (ART) and an approximate free energy model (OPEP), we study in details the mechanisms of aggregation of some amyloid and amyloid-like peptides. ART-OPEP has been tested extensively on a beta-hairpin as well as a dimer and trimer of $A\beta_{16-22}$, producing realistic folding or aggregation trajectories in agreement with experiments and standard simulations. In this work, we have used ART-OPEP to study the aggregation in tetramer of the small peptide KFFE, the smallest known to form *in vitro* fibrils that are similar to those observed in the various diseases, and of a sub-fragment composed of residues 11 to 25 of the bigger β -amyloid peptide (associated with Alzheimer's disease).

Key words : amyloid, aggregation, oligomer, fibril, simulation, activation-relaxation technique

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 :INTRODUCTION BIOCHIMIQUE	5
1.1 Les protéines	5
1.2 Repliement	9
1.3 Les fibres amyloïdes	12
1.3.1 Structure des fibres amyloïdes	13
1.3.2 Comment se forment les fibrilles?	14
1.4 Qui est responsable de la toxicité observée dans les amyloïdoses? . .	16
1.4.1 Une stratégie pour contrer les amyloïdoses	17
1.5 Conclusion	18
CHAPITRE 2 :ÉTUDE NUMÉRIQUE DES STRUCTURES AMYLOÏDES 20	
2.1 Représentation de la protéine	20
2.2 Approximation de la fonction d'énergie	21
2.3 Exploration de la surface d'énergie	21
2.3.1 Dynamique moléculaire	22

2.3.2	Que peut-on apprendre par cette méthode?	23
2.3.3	Limites de la méthode	26
2.3.4	La technique d'activation-relaxation	27
2.3.5	Limites de la méthode	33
CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE		35
3.1	Peptides à l'étude	35
3.1.1	KFFE	35
3.1.2	$A\beta_{11-25}$	36
3.2	Simulations ART-OPEP	37
3.2.1	ART	37
3.2.2	Potentiel d'énergie OPEP	38
CHAPITRE 4 : EXPLORATION DES MÉCANISMES D'AGRÉGATION DE PEPTIDES KFFE EN TÉTRAMÈRE 40		
4.1	Assemblage de quatre peptides KFFE	41
4.1.1	Structure du monomère	41
4.1.2	Formation du tétramère par simulation ART-OPEP	41
4.2	Assemblage de quatre peptides KPGE par simulation ART-OPEP	46
4.3	Évaluation de la stabilité du modèle de Tjernberg par simulation de dynamique moléculaire	47
4.4	Qu'apprenons-nous de l'étude du tétramère de KFFE?	49
CHAPITRE 5 : EXPLORATION DES MÉCANISMES D'AGRÉGATION DE PEPTIDES $A\beta(11-25)$ EN TÉTRAMÈRE 51		
5.1	Énergie des modèles	52
5.2	Structure du monomère	53
5.3	Assemblage de quatre peptides $A\beta_{11-25}$ à 500 K	54
5.3.1	Assemblage à partir de structures initiales aléatoires	55
5.3.2	Assemblage à partir de structures pré-organisées	58
5.4	Assemblage du tétramère à 1000 K	69

5.4.1	À partir de structures aléatoires	70
5.4.2	À partir de structures pré-organisées	72
5.5	Stabilité des modèles expérimentaux par ART-OPEP	74
5.6	Déstabilisation du tétramère de Sikorski par simulation ART-OPEP	77
5.6.1	Évaluation de la stabilité du modèle expérimental de Sikorski par simulation de dynamique moléculaire	79
5.7	Qu'apprenons-nous de l'étude du tétramère de $A\beta_{11-25}$?	81
CONCLUSION		87
BIBLIOGRAPHIE		90

LISTE DES FIGURES

1.1	Les quatre niveaux d'organisation structurale chez les protéines . . .	6
1.2	Représentation d'une chaîne polypeptidique	7
1.3	Diagramme de Ramachandran	8
1.4	Représentation de la surface d'énergie en entonnoir	10
1.5	Représentation du minimum global d'une surface d'énergie en entonnoir	11
1.6	Modèle suggéré pour la formation des fibrilles amyloïdes	14
1.7	Modèle de nucléation-polymérisation	15
2.1	Les trois premières étapes de la technique d'activation-relaxation . .	28
3.1	Trois principaux modèles représentant l'organisation de $A\beta_{11-25}$ dans les fibrilles	37
4.1	Structures de plus faible énergie obtenues par simulation ART-OPEP	42
4.2	Analyse d'une trajectoire ART-OPEP à partir de quatre brins KFFE arrangés aléatoirement menant à la formation d'un tétramère anti-parallèle hors-registre	43
4.3	Analyse d'une trajectoire ART-OPEP à partir de quatre brins KFFE arrangés aléatoirement menant à la formation d'une structure constituée de deux dimères	44
4.4	Ensemble des mécanismes de formation observés au cours des simulations ART-OPEP	45
4.5	Les simulations à partir du peptide muté KPGE ont conduit à la formation d'assemblages désordonnés	46
4.6	Dynamique moléculaire pour évaluer la stabilité du modèle de Tjernberg	48
5.1	Structures rencontrées dans les simulations du monomère de $A\beta_{11-25}$	54

5.2	Représentation des différents types de structures	56
5.3	Deux structures initiales aléatoires utilisées	56
5.4	Structures de plus basse énergie obtenues à partir de la structure initiale aléatoire A	57
5.5	Structures de plus basse énergie obtenues à partir de la structure initiale aléatoire B	58
5.6	Structures initiales pré-organisées	59
5.7	Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale pré-organisée I	60
5.8	Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale pré-organisée II	62
5.9	Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale pré-organisée III	63
5.10	Graphes d'analyse de la simulation ayant conduit à la structure de plus basse énergie	66
5.11	Structures de plus basse énergie obtenues dans les simulations ART- OPEP à partir de structures initiales pré-organisées composées de deux dimères	68
5.12	Distribution des déplacements effectués lors des événements ART .	70
5.13	Évolution de l'énergie de deux simulations effectuées à partir de la structure aléatoire B à basse (500 K) et à haute (1000 K) température	71
5.14	Clichés des trajectoires ART-OPEP effectuées à 1000 K à partir des structures pré-organisées I, II, III	73
5.15	Changement de registre observé au cours d'une simulation effectuée à partir du tétramère de Sirkoski à 500 K	76
5.16	Alignement du coeur hydrophobe du fragment $A\beta_{11-25}$ dans les modèles	77
5.17	Analyse d'une simulation de déstabilisation	78
5.18	Analyse de la trajectoire de dynamique moléculaire de 20 ns effectuée à partir de la structure modèle de Sikorski à 330 K	79

5.19 Clichés de la trajectoire de dynamique moléculaire de 20 ns effectuée
à partir de la structure modèle de Sikorski à 330 K 81

LISTE DES TABLEAUX

1.1 Classement des acides aminés selon leurs caractéristiques physico-chimiques	5
5.1 Taux d'acceptation selon la température de Metropolis et la structure initiale	69

INTRODUCTION

Depuis un demi-siècle, la place qu'occupe l'informatique dans nos vies n'a cessé de croître. Les nombreux progrès réalisés dans ce domaine, touchant principalement la capacité de stockage de données et la puissance des processeurs, ne sont pas étrangers à ce phénomène. Grâce aux ressources aujourd'hui disponibles, il est possible d'utiliser l'informatique pour étudier des problèmes qui étaient jusqu'alors hors de portée des méthodes numériques. Par exemple, le problème du repliement des protéines en biochimie est difficilement étudiable en laboratoire. Quoique de nombreux progrès aient été accomplis depuis ans, les efforts expérimentaux n'ont pas permis d'élucider complètement les mécanismes par lesquels les protéines adoptent leur forme tri-dimensionnelle. Toutefois, depuis quelques années, les nouvelles ressources informatiques disponibles ont apporté de nouveaux outils et beaucoup de groupes de recherche ont décidé d'aborder numériquement le problème du repliement des protéines pour compléter l'effort expérimental. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont très prometteurs.

Les protéines sont construites à partir de vingt éléments de base, les acides aminés (ou résidus). Chaque acide aminé a des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres. Les protéines sont d'abord fabriquées sous forme de chaînes d'acides aminés et se replient ensuite dans l'espace pour adopter une conformation (structure) bien définie. Leur structure finale, aussi appelée native, est intimement liée à leur fonction.

Les règles précises encadrant le repliement des protéines ne sont pas connues, mais on fait l'hypothèse que les protéines se replient en minimisant leur énergie et que la structure native correspond à la structure de plus faible énergie qu'elles puissent adopter.

Comme la fonction protéique dépend de la structure, une erreur de repliement peut avoir des conséquences désastreuses au niveau de la cellule.

Dans le présent mémoire, nous avons étudié la façon dont certaines protéines mal repliées ou dépliées s'assemblent pour former des structures filamenteuses très

stables appelées fibrilles ou fibres amyloïdes.

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à ces fibres au cours des dernières années. Cet intérêt n'est pas étranger à la découverte d'un lien entre ces structures et une vingtaine de maladies dont font partie les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, le diabète de type II et les encéphalopathies spongiformes telles que la maladie de la vache folle chez le bovin et la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'humain. On désigne l'ensemble de ces maladies par le terme amyloïdose.

Malgré l'importance médicale évidente des fibrilles amyloïdes, les connaissances actuellement disponibles les concernant sont limitées. En effet, ces structures sont insolubles ce qui les rend résistantes aux méthodes biochimiques classiques et ce qui complique leur étude.

Certaines méthodes ont tout de même permis d'établir qu'un motif de feuillets β en croix (" *cross- β sheet* ") est commun à l'organisation de toutes les fibres amyloïdes^[46]. Cependant, le détail de l'arrangement des peptides à l'intérieur du motif n'est pas connu.

On a longtemps cru que les fibrilles étaient les principales et les seules responsables de la toxicité observée dans les pathologies. Cependant, l'absence de relation entre la quantité de fibres retrouvée dans les tissus et la gravité de la maladie chez les patients atteints d'une amyloïdose^[13] ajoutée à un nombre croissant d'observations *in vitro* ont mené à une autre hypothèse. Les oligomères, petites structures intermédiaires instables, formés dans les premières étapes de la formation des fibres, seraient particulièrement toxiques pour les cellules, peut-être même plus que les fibrilles elle-mêmes.

Cette hypothèse a orienté les recherches dans une nouvelle direction en soulignant l'importance de s'intéresser aux premiers instants du mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes (mécanisme aussi appelé fibrillogénèse). En effet si, tel qu'on le croit, les oligomères sont les réels responsables de la toxicité observée, ils deviennent des cibles thérapeutiques importantes pour vaincre les amyloïdoses.

Cependant, la caractérisation expérimentale des oligomères est, elle aussi, difficile en raison de leur courte durée de vie et de leur présence sous un grand nombre

de conformations et de degrés d'agrégation différents.

Compte tenu de ces difficultés, les méthodes d'analyse *in silico* constituent une approche alternative intéressante pour compléter les efforts expérimentaux. Elles peuvent fournir des indices indispensables concernant les propriétés associées aux mécanismes d'assemblage des oligomères (oligomérisation) en plus de permettre une caractérisation atomique de ces derniers.

Toutefois, les méthodes de simulation numérique classiques ne peuvent être utilisées efficacement ici, car le processus d'agrégation dépasse les limites de temps d'étude permises par ces méthodes. En effet, le temps nécessaire à la formation de fibrilles, même formées de peptides très courts, est trop important pour que le phénomène puisse être directement étudié par les méthodes couramment utilisées comme la dynamique moléculaire (DM). Des méthodes numériques alternatives doivent donc être développées et utilisées.

Dans le présent mémoire, nous avons effectué une étude détaillée des mécanismes d'assemblage de peptides amyloïdes en utilisant une méthode alternative développée par Normand Mousseau et ses collaborateurs, appelée la technique d'activation-relaxation (ART). Cette méthode a l'avantage de ne pas être limitée par une échelle de temps. Pour notre étude, ART a été couplée à un potentiel d'énergie simplifié nommé OPEP^[37]. La combinaison ART-OPEP a été utilisée efficacement par le passé par des membres du groupe du Dr. Mousseau pour étudier le repliement et l'agrégation de protéines^[38-40, 42, 43, 54]. Elle s'avère donc un moyen efficace pour étudier la formation des oligomères.

Description des chapitres

Suite à cette brève introduction, nous aborderons plus en détails les notions de protéines et de fibrilles amyloïdes au chapitre 1. Le chapitre 2 exposera les principales méthodes numériques utilisées pour étudier les problèmes de repliement et d'agrégation des protéines. Nous expliquerons dans ce chapitre le détail de la technique d'activation-relaxation qui a été utilisée dans ce mémoire. Nous verrons ensuite, au chapitre 3, les autres aspects de la méthodologie que nous avons choisi

d'utiliser au cours de notre projet. Les chapitres 4 et 5 présenteront les résultats obtenus au cours de l'étude du peptide KFFE et du peptide $A\beta_{11-25}$ respectivement. Nous concluons ensuite ce mémoire en résumant ce que nos travaux ont permis d'apprendre et en exposant les perspectives à long terme du projet.

Il faut mentionner que ce projet a été réalisé en collaboration avec le groupe de Philippe Derreumaux, de l'Institut de Biologie Physico-Chimique de Paris.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION BIOCHIMIQUE

1.1 Les protéines

Chaque organisme vivant contient des milliers de protéines aux fonctions variées. Ces macromolécules sont indispensables au bon fonctionnement des cellules. Que leur rôle soit au niveau du maintien de la structure, du transport, de la défense/protection, du stockage, du contrôle/régulation, du métabolisme ou du mouvement, la fonction de chaque protéine est intimement liée à sa structure d'où tout l'intérêt porté à cette dernière.

Les protéines sont construites à partir d'acides aminés (ou résidus). Elles peuvent être constituées d'une (protéine monomérique) ou de plusieurs (protéine multimérique) chaînes polypeptidiques; une chaîne polypeptidique étant un enchaînement d'acides aminés. Seulement vingt acides aminés, aux propriétés physico-chimiques particulières entrent dans la fabrication des protéines. On peut regrouper les résidus en catégories selon qu'ils sont hydrophobes, polaires ou chargés (voir tableau 1.1)^[52].

TAB. 1.1 – Classement des acides aminés selon leurs caractéristiques physico-chimiques : hydrophobes, polaires ou chargés à pH physiologique.

Hydrophobes	Alanine, valine, leucine, isoleucine, glycine phénylalanine, proline, méthionine, tryptophane
Polaires	Sérine, thréonine, glutamine, cystéine, tyrosine, asparagine
Chargés	Lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, histidine

Tous les acides aminés (exceptée la glycine) ont en commun un groupement carboxyle COOH, un groupement aminé NH₂ et un carbone chiral dénoté C_α. Ils se différencient, les uns par rapport aux autres, par l'identité de la chaîne latérale liée au carbone α (C_α). L'enchaînement des acides aminés d'une chaîne polypeptidique, appelé la séquence, est encodé dans l'ADN. Cet enchaînement contient

toute l'information nécessaire à la chaîne pour se replier et adopter une structure tri-dimensionnelle fonctionnelle. Toutefois, dans les cellules vivantes, il arrive que des protéines spécifiques, appelées chaperonnes, interagissent avec les chaînes polypeptidiques pour les aider à se replier correctement.

On distingue quatre niveaux d'organisation lorsque l'on s'intéresse aux structures protéiques. Ces différents niveaux, plus précisément la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire, sont représentés à la figure 1.1.

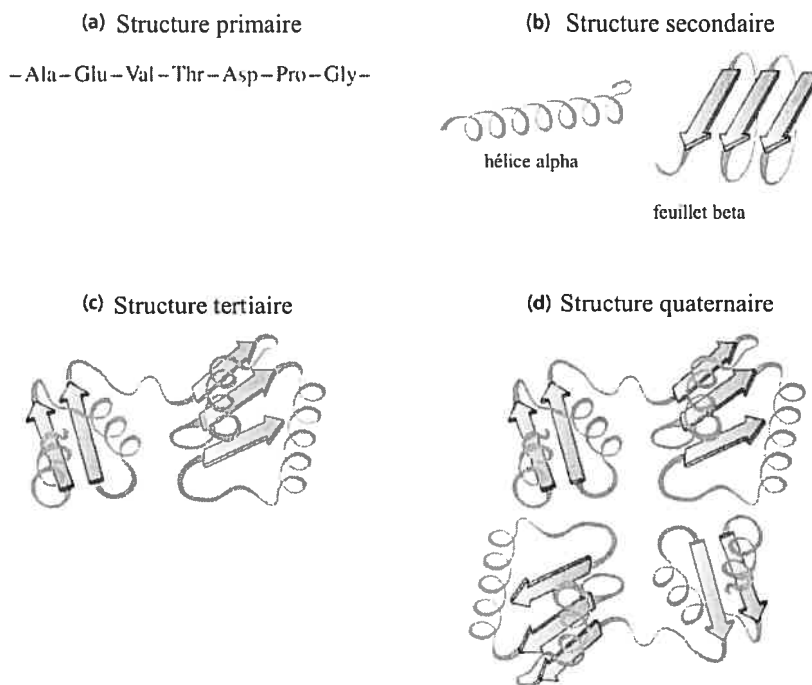


FIG. 1.1 – Les quatre niveaux d'organisation structurale chez les protéines. a) La structure primaire est la séquence en acides aminés. b) La structure secondaire désigne l'ensemble des sous-structures régulières comme l'hélice α et le feuillet β . c) La structure tertiaire correspond à la structure finale adoptée par la chaîne polypeptidique d) La structure quaternaire désigne l'assemblage des chaînes polypeptidiques repliées (sous-unités) dans le cas d'une protéine multimérique. L'image a été modifiée et provient du livre de Horton et al.^[48].

Nous avons déjà traité du premier niveau d'organisation en s'attardant à la

notion de séquence. En effet, la structure primaire est l'enchaînement linéaire des résidus. Les acides aminés se succédant sont joints par un lien covalent appelé liaison peptidique. Cette liaison est en fait une liaison amide entre le groupement aminé d'un résidu et le groupement carboxyle du résidu suivant. Elle possède des propriétés de double liaison ce qui restreint toute rotation autour du lien -NH-CO- . Cela contribue à la création d'une unité peptidique plane constituée de six atomes telle qu'on peut le voir à la figure 1.2. À cause des propriétés particulières de la liaison peptidique, l'angle ω (omega) qui lui est associé a une valeur constante de 180° .

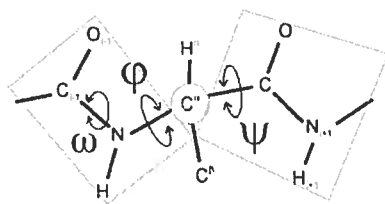


FIG. 1.2 – Représentation d'une chaîne polypeptidique. On peut voir sur la chaîne les différents degrés de liberté (ϕ , ψ , ω) ainsi que les deux plans peptidiques liés à un même C_α . Chaque plan peptidique est composé de six atomes incluant les C_α . L'image a été modifiée et provient de l'article de Ho et al. ^[51].

Toutefois, les rotations autour des liaisons $\text{-C}_\alpha\text{-CO-}$ et $\text{-NH-C}_\alpha\text{-}$ sont possibles. Les angles respectifs liés à ces liaisons, soient l'angle ψ (psi) et l'angle ϕ (phi), n'ont pas de valeurs fixes. On considère que ces angles se rapportent aux rotations que peuvent effectuer les deux plans peptidiques se trouvant de part et d'autre d'un même C_α . Cependant, toutes les combinaisons d'angles (ϕ , ψ) ne sont pas permises. Un grand nombre de combinaisons mène à un encombrement stérique et à des répulsions électrostatiques entre les atomes des deux plans peptidiques ou entre les atomes d'un plan peptidique et ceux de la chaîne latérale liée au C_α . En 1968, Ramachandran ^[60] a effectué une analyse conformationnelle de tripeptides et a rapporté dans un graphe, présentant les valeurs de ϕ en abscisse et les valeurs de ψ en ordonnée, les paires (ϕ , ψ) qui donnaient lieu aux conformations les plus stables. Il a remarqué que ces paires d'angles étaient regroupées dans des zones distinctes du

diagramme que l'on qualifie souvent de régions permises. Les résultats théoriques de son étude ont été maintes fois confirmés par les résultats expérimentaux.

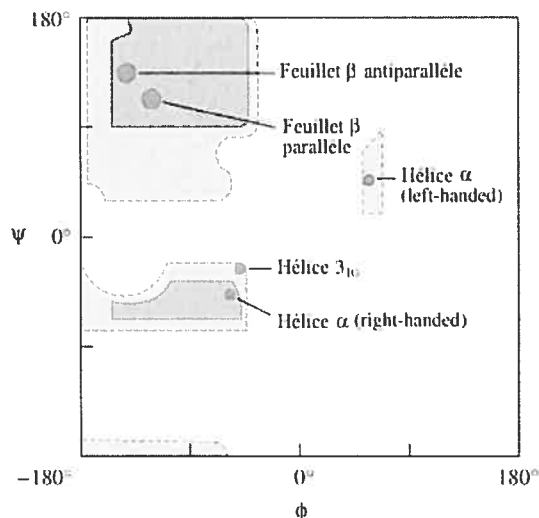


FIG. 1.3 – Diagramme de Ramachandran^[60]. L'axe des x correspond aux valeurs de l'angle ϕ ($C_{n-1}-N-C_{\alpha}-C$) tandis que l'axe des y correspond aux valeurs de l'angle ψ ($N-C_{\alpha}-C-N_{n+1}$). Les différentes zones correspondant aux structures secondaires (hélice et feuillet β) sont indiquées en foncé. L'image a été modifiée et provient du livre de Horton et al.^[48]

Le graphe de Ramachandran, présenté à la figure 1.3, s'applique à tous les acides aminés à l'exception de la glycine (qui est moins contrainte que les autres résidus puisque sa chaîne latérale est un hydrogène) et de la proline (qui est plus contrainte que les autres étant donné sa structure).

Lorsque plusieurs résidus arborent successivement des paires d'angles d'une même région permise, il y a formation de structures régulières dont les plus communes sont l'hélice α et le feuillet β . Ces sous-structures régulières constituent le deuxième niveau d'organisation des structures protéiques soit la structure secondaire. Elles sont majoritairement stabilisées par des liaisons hydrogène (nous aborderons la notion de liaisons hydrogène à la prochaine section).

Quant à la structure tertiaire, elle concerne l'arrangement des divers éléments de structure secondaire en une structure finale (ou native) qui sera adoptée par

une chaîne polypeptidique. Il est important de rappeler qu'une protéine peut être constituée d'une seule ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Lorsque plusieurs chaînes polypeptidiques s'assemblent pour permettre à une protéine d'accomplir sa fonction, on s'y réfère en parlant de sous-unités. L'arrangement des sous-unités entre elles constitue la structure quaternaire.

1.2 Repliement

Des milliards d'années seraient nécessaires à une protéine de cent acides aminés pour essayer aléatoirement toutes les structures qui lui sont accessibles (paradoxe de Levinthal). On peut donc supposer qu'il existe des règles précises ayant pour but de "guider" le processus de repliement puisque, dans la cellule, les protéines adoptent généralement leur structure native (structure tertiaire) en des temps beaucoup plus raisonnables (de l'ordre de la seconde). Cela permet de considérer le problème de repliement comme un problème de minimisation où la protéine se replie afin d'adopter une conformation finale qui lui permettra de minimiser son énergie.

Une relation mathématique existe entre la structure d'une macromolécule et son énergie. La surface d'énergie¹ se définit comme la relation entre la conformation d'une chaîne polypeptidique et son énergie interne. Elle contient aussi de l'information associée aux règles déterminant quelles configurations sont accessibles à partir d'une configuration donnée. De plus, elle est associée à la façon dont la protéine peut se déplacer entre ces configurations^[24]. La surface, qui est continue, se décrit par un ensemble de minima, de maxima et de barrières énergétiques (points de selle) plus ou moins élevées.

Plusieurs forces covalentes et non-covalentes déterminent la structure des protéines. Parmi elles, notons les interactions de Van der Waals entre atomes adjacents, l'effet hydrophobe, les forces électrostatiques et les liaisons hydrogène. Les interactions de Van der Waals sont le résultat de l'attraction du noyau d'un atome par les

¹Pour plus de détails sur la surface d'énergie des protéines voir les articles de Bryngelson et al.^[49] et de Plotkin et al.^[24].

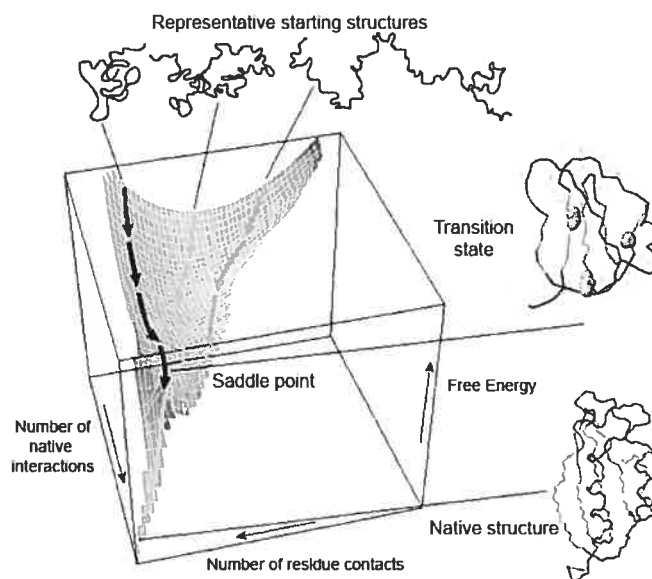


FIG. 1.4 – Représentation de la surface d'énergie en entonnoir^[9]. En partant de plusieurs conformations initiales dénaturées, plusieurs trajectoires convergent vers l'état natif de la protéine.

électrons d'un autre atome de façon non covalente. Ces interactions, plutôt faibles, se produisent à de courtes distances (de 3 à 4 Å). L'effet hydrophobe est associé à la présence de chaînes latérales hydrophobes en solution aqueuse. Ce phénomène mène à une organisation des molécules d'eau du solvant et, par conséquent, à une baisse d'entropie non favorable dans le système. Ceci pousse les chaînes hydrophobes à se regrouper au centre de la structure afin de minimiser leur contact avec le solvant. On dit alors qu'il y a formation d'un "coeur hydrophobe". Quant aux forces électrostatiques, elles proviennent de l'attraction de chaînes latérales de charges opposées. Les ponts salins ainsi formés stabilisent les structures secondaires et tertiaires. Finalement, les liaisons hydrogène se forment lorsqu'une paire d'atomes nucléophiles² partage un hydrogène entre eux. Typiquement, l'oxygène et l'azote de la chaîne principale sont de bons partenaires. Les structures secondaires

²Les atomes doivent se trouver à une distance se situant entre à 2,6 et 3,2 Å et l'angle formé entre eux doit être inférieur à 40°

telles que l'hélice α et le feuillet β , sont majoritairement stabilisées par ce type d'interaction.

Toutes ces forces entrent en jeu dans le processus de repliement des protéines. On considère que la structure native d'une protéine correspond au minimum global de sa surface d'énergie et que le repliement est une exploration des conformations possibles menant à la structure native. En effet, comme les interactions natives (interactions retrouvées dans la structure native) sont plus stables que les interactions non-natives (interactions non retrouvées dans la structure native), la recherche de conformations stables favorisera les interactions natives ce qui mènera au minimum global (ou à la structure native). La surface d'énergie libre associée à un tel mécanisme a la forme d'un entonnoir telle que représentée à la figure 1.4.

La surface d'énergie en entonnoir suggère que plusieurs trajectoires convergent vers le minimum global en visitant un nombre de structures intermédiaires variable. Il n'y a donc pas une trajectoire de repliement obligatoire. Une fois au minimum global, on ne considère pas la structure adoptée comme étant rigide. Les protéines sont des entités dynamiques et non statiques. On sait que la structure native est flexible et qu'elle peut être en équilibre avec d'autres structures d'énergie équivalente. Le fond de l'entonnoir n'est donc pas nécessairement lisse comme on peut le voir à la figure 1.5.

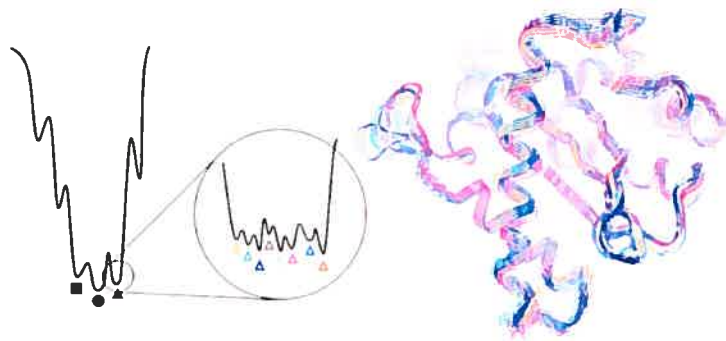


FIG. 1.5 – Représentation du minimum global d'une surface d'énergie en entonnoir. Les protéines sont des entités dynamiques et l'on peut voir que, pour une protéine flexible, la structure native est en équilibre avec des conformations d'énergie équivalente. L'image a été modifiée et provient de l'article de Carlson et al.^[2]

1.3 Les fibres amyloïdes

Tel que dit précédemment, chaque protéine se replie normalement dans une conformation de basse énergie spécifiée par sa séquence en acides aminés. Cependant, il arrive que certaines protéines se replient en une structure non native ou qu'elles n'arrivent tout simplement pas à rester correctement repliées. Comme il existe une relation structure/fonction, un mauvais repliement peut mener à une perte de la fonction protéique ce qui n'est pas souhaitable pour la cellule. En effet, les protéines mal repliées ont tendance à s'agréger et/ou à interagir de façon inappropriée avec les autres constituants de la cellule ce qui entrave les processus cellulaires normaux. Plusieurs cas de mauvais repliement ont d'ailleurs été associés à de graves maladies dont font partie les amyloïdoses. Ce type de pathologies est caractérisé par la formation et le dépôt de fibrilles amyloïdes dans les tissus. Ces dernières dérivent de l'agrégation de protéines se trouvant dans des conformations différentes de leur conformation native.

Les structures amyloïdes ont d'abord été associées à divers peptides impliqués dans une vingtaine de maladies (amyloïdoses). Dans toutes ces maladies, les fibres arborent une morphologie très similaire, malgré le fait que les protéines qui les composent n'aient rien en commun tant au niveau de leur structure native qu'au niveau de leur séquence.

Toutefois, ces dernières années, plusieurs observations ont permis d'établir que les protéines connues pour leur implication dans les diverses maladies n'étaient pas les seules protéines capables de former ce type de structures. En effet, un nombre considérable de recherches ont montré que plusieurs protéines différentes (par exemple l'insuline, la myoglobine^[58] ou le cytochrome C), n'étant pas impliquées dans une maladie, possédaient la capacité de former, *in vitro* et en présence de conditions dénaturantes, des fibres similaires aux fibres pathologiques^[9,50]. Parmi les conditions particulières nécessaires, notons un pH faible, une température élevée, l'absence de ligand, une concentration saline modérée ou la présence de co-solvant.

Cette grande diversité chez les polypeptides capables de former des structures

amyloïdes pousse à croire que la fibrillogenèse pourrait être une propriété générale des chaînes polypeptidiques. Une telle hypothèse permet de suggérer que la formation des fibres est gouvernée par des mécanismes généraux.

1.3.1 Structure des fibres amyloïdes

Malgré leur importance médicale et le fait que leur formation ne soit pas exclusive à un type de peptides, peu d'informations sont disponibles concernant la structure des fibres amyloïdes. En effet, la nature polymérique insoluble de ces assemblages les rend résistants aux méthodes d'élucidation de structure conventionnelles ce qui complique leur étude. Par exemple, ni la cristallographie ni la résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution ne peuvent être utilisées car les fibres ne forment pas de cristaux et ne sont pas solubles.

Néanmoins, la microscopie électronique (EM), la résonance magnétique nucléaire en état solide (ssRMN), la spectroscopie infra-rouge exploitant les transformations de Fourier (FTIR), le dichroïsme circulaire (CD) ainsi que la diffraction de fibres aux rayons X sont quelques exemples de méthodes utilisées pour étudier sommairement les fibrilles. Sans entrer dans les détails expérimentaux, mentionnons que la microscopie électronique permet de détecter visuellement les fibrilles tandis que la RMN en état solide est utilisée pour déterminer la distance entre des carbones marqués se trouvant à moins de 6 Å. Ceci permet de repérer des arrangements de feuillets β parallèles ou antiparallèles. Quant à la spectroscopie infra-rouge, elle permet de détecter la présence de feuillets β pendant que le dichroïsme circulaire détecte les changements dans la structure secondaire et dans l'environnement et l'orientation des chaînes latérales aromatiques. Pour ce qui est de la diffraction de fibres aux rayons X, elle a permis de mettre en évidence un motif de diffraction caractéristique aux fibrilles amyloïdes, nommé motif de feuillets β en croix ("*cross- β sheet motif*"), où les brins des feuillets β sont disposés perpendiculairement à l'axe de la fibre tandis que les liaisons hydrogène intermoléculaires sont arrangées parallèlement à l'axe

L'arrangement des feuillets β à l'intérieur du motif n'est pas connu et il ne se-

rait pas universel. Les feuillets β s'orienteraient parallèlement dans certaines fibres tandis qu'ils seraient plutôt antiparallèles^[59] dans d'autres. Pourtant, peu importe les protéines les constituant et leur arrangement, la morphologie des fibres est très similaire. Elles ont typiquement de 0,1 à 10 micromètres de long et approximativement 10 nanomètres de large.

1.3.2 Comment se forment les fibrilles ?

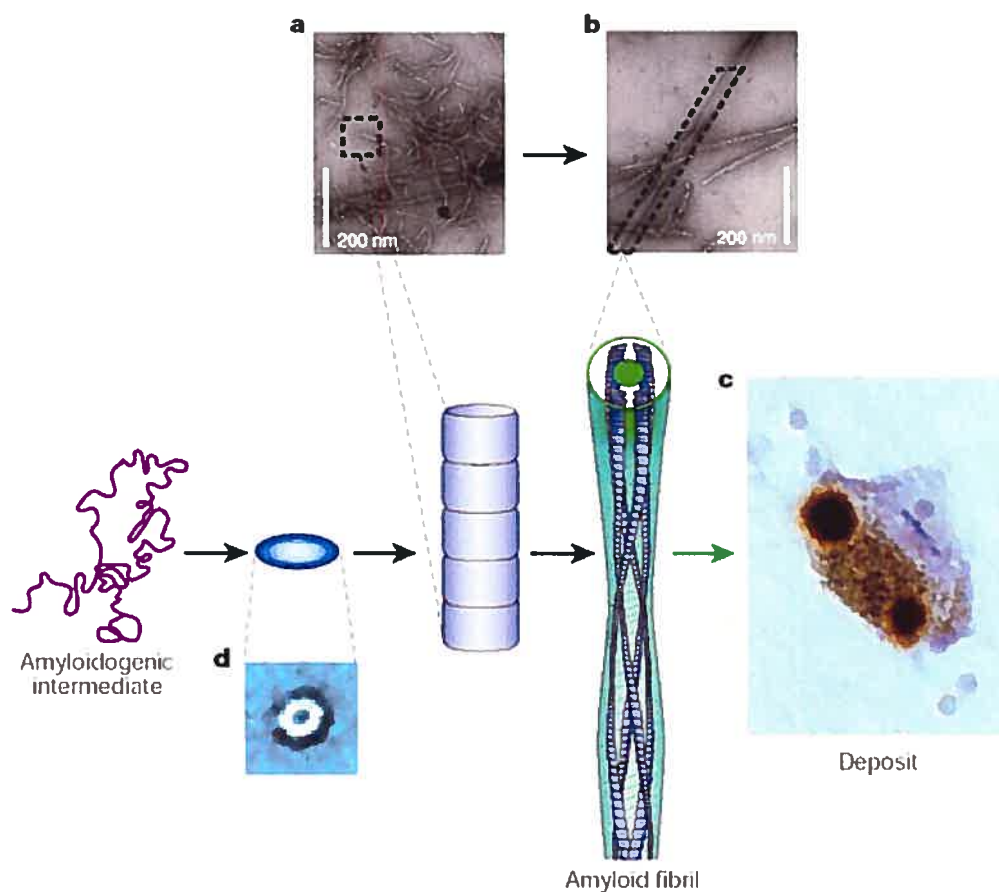


FIG. 1.6 – Modèle suggéré pour la formation des fibrilles amyloïdes par Stefani et al.^[9]. Des protéines mal repliées s'assemblent en oligomères (qui sont parfois amorphes ou micellaires comme en (d)) qui s'assemblent à leur tour pour former des protofilaments (a). Les protofilaments (a) s'organisent en fibrilles matures (b), principal constituant des plaques (c) observables dans les tissus.

La figure 1.6 présente un modèle du mécanisme de fibrillogenèse. La première étape implique l'assemblage de protéines totalement ou partiellement dépliées en oligomères. Les oligomères sont des structures intermédiaires solubles métastables. Ces derniers s'arrangent ensemble pour former des protofibrilles ou protofilaments (photo a sur la figure 1.6) qui s'organisent, à leur tour, pour former les fibrilles (photo b sur la figure 1.6). Ces dernières formeront ensuite des dépôts (photo c sur la figure 1.6) bien visibles dans les tissus affectés par les amyloïdoses. Il arrive que les oligomères n'adoptent pas de structures organisées ; on les retrouve alors dans une conformation de type amorphe ou micellaire³(voir d sur la figure 1.6).

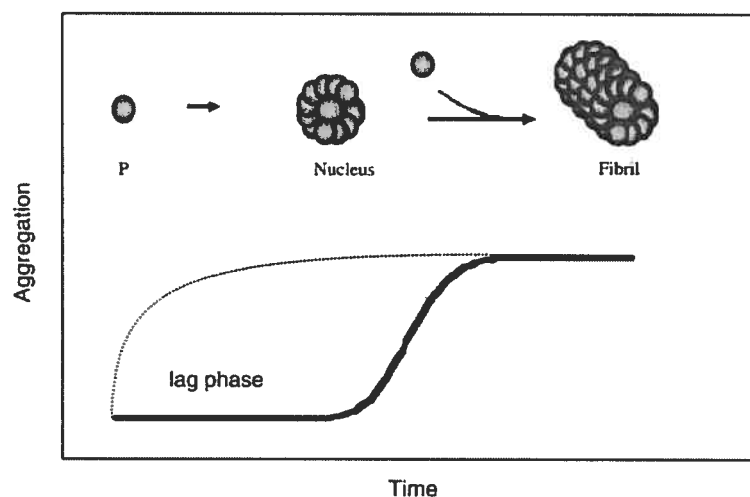


FIG. 1.7 = Modèle de nucléation-polymérisation. L'agrégation des peptides P est précédée d'une phase de latence. L'agrégation s'accélère lorsque le noyau critique est atteint. Le trait plus pâle présente la cinétique d'agrégation observée suite à l'addition de noyaux critiques pré-formés : la phase de latence n'a plus lieu. L'image provient de l'article de Nilsson et al. [33].

La transition d'un état oligomérique à un protofilament se fait selon le modèle de nucléation-polymérisation présenté à la figure 1.3.2. La figure présente la formation

³La micelle se définit comme une structure circulaire formée de différentes molécules qui s'assemblent pour se protéger du solvant environnant. Par exemple, on observe ce phénomène lorsqu'on laisse tomber des gouttes d'huile dans un solvant aqueux. Les molécules hydrophobes, dans l'exemple l'huile, s'organisent de façon à minimiser les contacts avec l'eau ; c'est pourquoi toutes les gouttelettes se regroupent ensemble.

de fibrilles amyloïdes pour une protéine hypothétique P. Le processus d'agrégation débute par une phase de latence où aucune agrégation n'est observée et où les intermédiaires solubles sont en équilibre. Suit une association entre quelques peptides ce qui mène à la formation d'une structure favorable stable que l'on désigne sous le terme de noyau critique. Dès que cette structure est formée, le processus d'agrégation s'accélère. La taille du noyau critique requise pour enclencher l'agrégation rapide des peptides dépend de l'identité de la protéine en cause. Par exemple, des études expérimentales ont montré que $A\beta_{40}$ existe sous la forme de monomères, de dimères, de trimères et de tétramères en équilibre rapide tandis que $A\beta_{42}$ existe sous la forme de pentamères et d'hexamères^[11,12]. Quant au mécanisme d'élongation, les fibrilles croîtraient latéralement et longitudinalement.

On peut donc résumer le mécanisme de formation des fibrilles ainsi :



1.4 Qui est responsable de la toxicité observée dans les amyloïdoses ?

Nous venons de voir que beaucoup de structures intermédiaires différentes entrent en jeu dans le processus de fibrillogénèse allant de la protéine mal repliée au dépôt observable dans les tissus des patients atteints. Compte tenu de la présence de ces structures dans un nombre de pathologies différentes, nous pouvons nous demander laquelle ou lesquelles sont responsables de la cytotoxicité observée.

On a d'abord cru que les fibrilles amyloïdes, formant les dépôts, étaient les principales responsables de la toxicité associée aux différentes pathologies. Cependant, plusieurs études récentes ont suggéré que les principales responsables seraient les oligomères formés préalablement aux fibres. Ces intermédiaires seraient plus, sinon aussi, dommageables que les fibrilles matures.

Plusieurs résultats expérimentaux ont permis d'en arriver à cette hypothèse. D'abord, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, des études ont montré qu'il n'exis-

tait pas de corrélation entre la forme insoluble du peptide impliqué, $A\beta$, et la gravité de la maladie, mais qu'une augmentation significative de la concentration du peptide $A\beta$ soluble était directement liée à la sévérité de la maladie^[13].

Ensuite, plusieurs études effectuées *in vitro* ont démontré que la présence d'oligomères dans des cultures cellulaires était plus toxiques que celle des fibrilles^[1,17,32]. De plus, des études immuno-chimiques ont montré qu'un anticorps polyclonal dirigé contre une construction de la forme soluble de $A\beta$, ne liant pas les fibrilles, enrayait la cytotoxicité associée aux intermédiaires^[7].

Quoique les mécanismes de toxicité associés aux oligomères soient encore à l'étude, on croit que la nocivité de ces intermédiaires précoces résulterait d'une capacité à interagir avec les membranes cellulaires^[9,63] ; soit en y créant des pores de façon non spécifique ou en se liant à certains constituants membranaires de façon spécifique . La déstabilisation résultante affecterait la concentration d'ions calcium dans la cellule entraînant, par la suite, la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose.

1.4.1 Une stratégie pour contrer les amyloïdoses

Compte tenu des effets dévastateurs que provoquent les structures amyloïdes dans les cellules, des stratégies doivent être développées pour lutter contre les amyloïdoses. Comme les intermédiaires pré-fibrillaires semblent être particulièrement nocifs pour les cellules, une des stratégies possibles est d'empêcher leur formation ou, du moins, de limiter leur présence⁴. Plusieurs groupes de recherche tentent de développer de tels inhibiteurs pouvant soit bloquer ou accélérer la fibrillogénèse ; le but ultime étant d'éviter l'existence des oligomères dans les tissus^[6,31,57].

Toutefois, la conception rationnelle de telles molécules nécessite une profonde compréhension des mécanismes précoces d'oligomérisation et de fibrillogénèse. Malheureusement, la caractérisation expérimentale et détaillée de ces intermédiaires instables est loin d'être simple. En effet, ces structures ont une courte durée de vie

⁴Pour connaître d'autres stratégies envisagées, se référer à l'article de Wolfe et al.^[34]

et sont présentes sous un grand nombre de conformations et de degrés d'agrégation différents [12,33,40].

1.5 Conclusion

En résumé, rappelons que les protéines sont des macromolécules qui occupent des fonctions importantes dans les cellules. La fonction de chacune est liée à sa structure qui est elle-même liée à la séquence en acides aminés. La structure native est adoptée suite à un processus de repliement où la protéine minimise son énergie pour adopter la structure la plus stable qui soit. Il arrive que certaines protéines n'arrivent pas à se replier ou à demeurer dans leur forme native. Ce phénomène peut entraîner de graves conséquences pour les cellules comme c'est le cas dans les amyloïdoses.

Le terme amyloïdose désigne un ensemble de maladies (dont font partie la maladie d'Alzheimer et le diabète de type II) caractérisées par la présence de dépôts dans les tissus formés de structures protéiques particulières appelées les fibres amyloïdes. Il a été démontré que plusieurs protéines autres que les protéines associées aux amyloïdoses ont la capacité de former des fibrilles en présence de conditions dénaturantes *in vitro*. Cela permet de suggérer qu'un mécanisme commun est à la base de la formation des fibrilles.

Morphologiquement, les fibrilles sont très similaires peu importe l'identité du peptide qui les compose. Elles arborent toutes un motif de feuillets β en croix où les brins des feuillets β les composant sont disposés parallèlement à l'axe de la fibre tandis que les liaisons hydrogène intermoléculaires sont arrangées parallèlement à l'axe. Les fibrilles se forment selon le modèle de nucléation-polymérisation : le processus débute par une phase de latence où plusieurs oligomères solubles sont en équilibre. Cette phase est suivie par une agrégation rapide des peptides en protofibrilles. Ces derniers s'assemblent ensuite pour former les fibrilles matures. Le passage de la phase de latence à la phase d'agrégation rapide s'effectue lorsqu'une structure stable appelée noyau critique est formée.

On a longtemps cru que les fibrilles matures étaient responsables de la toxicité observée dans les amyloïdoses. Toutefois, de récentes études suggèrent que ce serait plutôt les structures formées préalablement aux fibres qui seraient nocives pour les cellules. Plusieurs stratégies pour contrer ce type de maladies tentent donc d'empêcher l'agrégation des peptides amyloïdes pour limiter la présence des intermédiaires solubles. Toutefois, encore trop peu d'informations sont disponibles concernant les oligomères intermédiaires ; leur étude expérimentale étant complexe.

Dans ce contexte, plusieurs se sont penchés vers les méthodes numériques pour étudier efficacement ces structures et tenter d'en apprendre davantage sur leurs mécanismes d'agrégation.

CHAPITRE 2

ÉTUDE NUMÉRIQUE DES STRUCTURES AMYLOÏDES

L'élucidation des premiers événements associés à la formation des fibrilles semble vitale pour le traitement des pathologies. Cependant, la caractérisation expérimentale de ces mécanismes et de la structure des intermédiaires s'avère problématique. Dans ce contexte, les méthodes numériques offrent des possibilités intéressantes pour étudier la formation des oligomères et des fibrilles.

La façon théorique d'étudier l'auto-assemblage des oligomères est la même que celle utilisée pour élucider les mécanismes de repliement des protéines. Elle consiste en l'exploration de la surface d'énergie du système étudié.

Tel que mentionné au chapitre précédent, la surface d'énergie représente une relation mathématique entre la structure d'une molécule et l'énergie qui y est associée. Ainsi, elle traduit l'effet que peut avoir toutes modifications structurales sur l'énergie de la molécule. On illustre souvent cette relation mathématique par un graphe (voir figure 1.4) où chaque point correspond à une structure et la hauteur de la surface en ce point correspond à son énergie. La surface est composée de minima, de maxima et de points de selle (états de transition). Lorsque l'on s'intéresse au repliement des protéines, on cherche à trouver le minimum global de la surface d'énergie, c'est-à-dire le minimum ayant la valeur d'énergie la plus faible.

Pour explorer la surface d'énergie, trois éléments sont requis : une représentation de la protéine, une approximation de la fonction d'énergie (car la vraie n'est pas connue) et un algorithme permettant de trouver les conformations de faible énergie.

2.1 Représentation de la protéine

Les coordonnées cartésiennes et internes sont les plus utilisées pour représenter les protéines. Les coordonnées cartésiennes se définissent comme la position dans l'espace (selon les axes des x , des y et des z) de chaque atome composant la protéine

tandis que les coordonnées internes correspondent à l'énumération des différents angles de la chaîne peptidique (ψ , ϕ , ω).

2.2 Approximation de la fonction d'énergie

L'approximation de la fonction d'énergie (potentiel d'énergie) est en fait une modélisation mathématique des forces (effet hydrophobe, interactions électrostatiques, interactions de Van der Waals, liaison hydrogène, stéréochimie) qui agissent sur la structure des protéines. Certains potentiels sont dits tout-atome, c'est-à-dire que tous les atomes sont considérés dans les calculs. À des fins de simplification et d'économie de temps, certains potentiels ne représentent pas tous les atomes explicitement, mais remplacent, par exemple, un groupe d'atomes par l'équivalent d'un atome unique. Les chaînes latérales des acides aminés peuvent ainsi être remplacées par des "billes" uniques. De la même façon, certains potentiels incluent tous les atomes des molécules du solvant dans lequel baigne la ou les protéines étudiées. On parle alors de solvant explicite. D'autres incluent plutôt le solvant implicitement, c'est-à-dire que l'effet global du solvant est considéré dans le calcul de l'énergie de la protéine, mais les molécules de solvant ne sont pas représentées dans le système. L'idéal pour approcher la réalité est d'utiliser un potentiel tout-atome en solvant explicite. Cependant, les calculs requis dans ce type de potentiel sont très coûteux en temps et limitent l'étendue des études possibles. Parmi les potentiels d'énergie (ou champs de force) les plus connus, mentionnons les potentiels tout-atome en solvant explicite CHARMM^[29], AMBER^[45], MM4^[23] et GROMOS^[61].

2.3 Exploration de la surface d'énergie

Quant au troisième élément requis, il s'agit d'un algorithme pour échantillonner la surface d'énergie. Bien qu'il existe plusieurs algorithmes pour faire cela, nous n'en détaillerons que deux dans les prochaines sections : la dynamique moléculaire puisque c'est l'algorithme le plus utilisé, et la technique d'activation-relaxation puisque c'est celui que nous avons privilégié pour notre étude.

2.3.1 Dynamique moléculaire

2.3.1.1 Description de la méthode

La dynamique moléculaire est une méthode numérique qui permet de caractériser au niveau atomique des systèmes complexes comme les macromolécules, les gaz ou les liquides. Le principe consiste à générer des trajectoires d'un ensemble fini de particules en intégrant les équations classiques du mouvement (équations de Newton) pour un pas n à un pas $n + 1$ (les équations sont dépendantes du temps) :

$$a_n = F_n/m \quad (2.1)$$

$$V_{n+1} = V_n + a_n \delta t \quad (2.2)$$

$$X_{n+1} = X_n + V_n \delta t + 1/2 a_n \delta t^2 \quad (2.3)$$

où a est l'accélération, F est la force, m est la masse, V est la vitesse, δt est la différence de temps et X est la position des atomes.

Les trajectoires obtenues sont utilisées pour obtenir de l'information à propos des propriétés dynamiques et statiques du système étudié en fonction du temps. Cependant, à cause des ressources informatiques limitées, l'échelle de temps d'étude pour cette méthode ne dépasse pas les micro-secondes.

Pourtant, le temps nécessaire à la formation des fibrilles *in vitro*, même formées de peptides très courts, est souvent de plusieurs centaines d'heures (10 jours dans le cas des fibres observées par Tjernberg^[22] à partir de peptides d'aussi peu que quatre résidus). Cette durée est trop importante pour que le phénomène puisse être directement étudié par une simulation de dynamique moléculaire classique.

2.3.1.2 Dynamique moléculaire discontinuée

Pour contrer la limite de temps intrinsèque à la dynamique moléculaire classique, certains ont recours à la dynamique moléculaire discontinuée (DMD). Sans trop entrer dans les détails, la dynamique moléculaire discontinuée^[14] utilise un potentiel à courte portée où toutes les interactions sont représentées par des puits

carrés, ce qui permet d'intégrer de collision en collision. Cet algorithme utilise aussi une représentation simplifiée des acides aminés. Contrairement à la dynamique moléculaire classique qui se concentre sur les forces physiques agissant sur le système à chaque instant, la dynamique moléculaire discontinuée se concentre uniquement sur les collisions survenant dans le système. Ainsi, chaque paire de particules (les particules sont considérées comme des sphères pleines) interagit selon un potentiel sphérique. Chaque paire se déplace donc avec une vitesse constante jusqu'à ce qu'elle atteigne une distance où le potentiel change, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'une collision se produise. L'algorithme procède en cherchant la prochaine collision. Il ne conserve d'ailleurs que la position et la vitesse des particules associées à une collision. Cette méthode permet d'étudier des phénomènes se produisant dans l'échelle de temps des secondes au prix d'une simplification considérable des interactions et des acides aminés.

2.3.2 Que peut-on apprendre par cette méthode ?

La dynamique moléculaire ne permet pas d'observer la formation des fibrilles, mais elle permet tout de même d'en apprendre davantage sur leurs mécanismes de formation. Plusieurs groupes ont privilégié cette méthode pour effectuer des études de déstabilisation et des études d'agrégation.

Une étude de déstabilisation vise à évaluer la stabilité de structures organisées déjà formées ou repliées. Ainsi, dans le cas des fibrilles, plusieurs structures initiales sont construites en variant le nombre et l'arrangement des peptides entre eux. En choisissant une température de simulation élevée, il est possible de déterminer quels assemblages sont les plus stables. Il est aussi possible de muter la séquence peptidique pour évaluer l'effet qu'a chaque résidu sur la stabilité de la structure.

Par exemple, Ma et Nussinov ^[53] ont étudié la stabilité d'octamères (oligomères formés de huit peptides) de $A\beta_{16-22}$, de séquence KLVFFAE, par des simulations de dynamique moléculaire avec un solvant explicite à une température de 330 K. Ce peptide est un fragment composé des résidus 16 à 22 du plus grand peptide β -amyloïde relié à la maladie d'Alzheimer. Ils ont conclu que le modèle le plus stable

pour l'octamère était celui où les monomères étaient organisés en feuillets parallèles de brins β antiparallèles. Dans la même étude, ils ont évalué quelle était la forme monomérique la plus stable pour les peptides $A\beta_{16-35}$ et $A\beta_{10-35}$. Ils ont observé qu'une structure en épingle β était favorisée pour $A\beta_{16-35}$. Quant au monomère $A\beta_{10-35}$, il était stable sous les formes linéaire et en épingle β . Les auteurs ont indiqué qu'expérimentalement, ce peptide formait deux types de fibrilles selon le pH. Ils ont suggéré que l'une de ces formes est composée de peptides étendus tandis que l'autre est composée de peptides en épingle β .

Aussi, Zanuy et al.^[56] ont étudié la stabilité d'oligomères du peptide NFGAIL par des simulations de dynamique moléculaire utilisant le potentiel CHARMM22 à 350 K. Vingt-deux trajectoires ont été obtenues pour un temps total de 31 ns à partir de différentes possibilités d'arrangement des brins/feuillets dans des oligomères formés de deux à neuf monomères. Leurs résultats ont montré que la conformation la plus stable pour ce peptide est celle où les monomères s'organisent en feuillets parallèles de brins β anti-parallèles. En modifiant la séquence du peptide NFGAIL, c'est-à-dire en mutant la phénylalanine par une alanine, ils ont montré que les oligomères de NAGAIL étaient instables et se désagrégeaient très rapidement en début de simulation contrairement aux oligomères de NFGAIL. Ils ont ainsi conclu que le principal facteur en cause dans l'oligomérisation est l'effet hydrophobe. Leur étude a été appuyée par les résultats de Azriel et al.^[18] qui ont étudié expérimentalement le rôle de chaque acide aminé du peptide NFGAIL en les mutant par le résidu alanine à tour de rôle. Ils ont réussi à identifier quels acides aminés étaient critiques pour la formation de fibrilles de ce peptide. Ils ont conclu que le résidu phénylalanine était très important pour la stabilité de l'agrégat tandis que le résidu polaire asparagine jouait un rôle dans la cinétique de polymérisation. Finalement, ils ont observé que l'effet des résidus apolaires alanine, isoleucine et leucine ne concernait que la cinétique de polymérisation et n'affectait pas l'organisation fibrillaire finale.

L'inconvénient des études de stabilité est qu'elles ne fournissent aucune information sur le processus d'oligomérisation des peptides, seulement sur la stabilité de leur organisation.

Des études d'assemblage ont aussi été effectuées en utilisant la dynamique moléculaire. Toutefois, compte tenu des limites de la méthode, l'ajout de contraintes dans le système (interaction figée entre certains peptides par exemple), l'utilisation de la dynamique moléculaire discontinuée (DMD) et le choix de système simplifié sont caractéristiques de ce type d'étude.

En 2004, Wu et al.^[66] ont étudié l'auto-assemblage de quatre peptides NFGAIL en solvant explicite avec le potentiel tout-atome AMBER. Ils ont noté la formation d'oligomères partiellement organisés et de structures désordonnées en début de simulation. En 2005^[67], ils ont réutilisé la même méthode pour étudier des octamères de NFGAIL et de NAGAIL en simplifiant leur système. Ils ont supposé que l'assemblage d'un dimère était une étape du processus de formation d'agrégats plus larges. Ils ont donc construit des dimères et ont contraint les peptides les composant à interagir ensemble. Le but de cette approche était d'arriver à observer l'agrégation des peptides en un temps acceptable. Leurs résultats ont montré que le résidu phénylalanine jouait un rôle important dans la formation d'oligomères ordonnés. Ils ont à nouveau noté la formation de structures désordonnées stabilisées par des interactions hydrophobes non spécifiques et ont suggéré que la dissociation de ces structures soit l'étape limitante de l'oligomérisation.

Aussi, Klimov et Thirumalai^[10] ont étudié le repliement d'un trimère formé du peptide $A\beta_{16-22}$ par des simulations de dynamique moléculaire d'environ 11 ns à une température de 300 K avec un solvant explicite. $A\beta_{16-22}$ a été largement utilisé en modélisation, car il est relativement court et il contient les résidus aromatiques phénylalanines qui joueraient un rôle important dans la formation des fibrilles de $A\beta$. Les auteurs ont ajouté un biais à leur simulation pour faciliter l'interaction entre les peptides et ils ont observé que l'assemblage d'un trimère $A\beta_{16-22}$ pouvait se produire par différents "chemins" comportant tous obligatoirement la formation d'un intermédiaire en hélice α . Les résultats de leurs simulations ne décrivaient pas avec précision la formation du trimère, mais seulement les premières étapes du processus d'agrégation. Ils ont ensuite muté les résidus du coeur hydrophobe de $A\beta_{16-22}$ par des résidus chargés. Ils ont observé que cela rendait les oligomères

très instables suggérant que le facteur majeur qui régit l'oligomérisation des peptides soit l'effet hydrophobe. Ils ont aussi montré que le remplacement des acides aminés chargés terminaux augmentait les fluctuations dans l'orientation des peptides, suggérant un lien entre ces résidus et la stabilité des oligomères.

Nguyen et al.^[8] ont, pour leur part, observé la formation spontanée de structures amyloïdes par dynamique moléculaire discontinuée en considérant des ensembles de 12 à 96 peptides polyalanines. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée par plusieurs groupes^[8,20,36,47,65]. En utilisant cette méthode, Nguyen et al. ont constaté que la formation d'agrégats amorphes précédait la formation d'une structure critique ordonnée, elle-même préalable à l'agrégation rapide des peptides. Leurs résultats sont donc en accord avec le modèle de nucléation-polymérisation associé à la formation des fibrilles. De plus, ils ont noté que la fibrillogénèse était dépendante de la concentration de peptides et de la température de simulation.

Aussi, Urbanc et al.^[20] ont utilisé la DMD pour étudier l'agrégation de deux alloformes de $A\beta$, $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$. Leurs résultats ont montré que la distribution de la taille des oligomères était différente pour les deux peptides : $A\beta_{40}$ menant à plus de dimères et $A\beta_{42}$, à plus de pentamères. Ils ont aussi identifié des différences structurales entre les formes monomériques et oligomériques des deux peptides.

2.3.3 Limites de la méthode

Quoique la portée de ce que l'on peut apprendre des fibrilles par dynamique moléculaire soit limitée, les différentes études effectuées permettent tout de même d'explorer certains aspects de la fibrillogénèse. Ainsi, les études mentionnées plus haut ont permis de suggérer que les forces hydrophobes et les résidus aromatiques phénylalanines joueraient un rôle important dans la formation des fibrilles, que la structure des différents peptides à l'intérieur des fibres ne serait pas unique et que la formation d'oligomères désordonnés serait courante.

Néanmoins, lorsque l'on étudie la formation des fibrilles, on ne peut pas passer à côté des limites associées à la dynamique moléculaire. Son principal désavantage est qu'elle ne permet pas d'étudier des phénomènes se produisant au-delà de l'ordre

des microsecondes. Or, la formation des fibrilles (tel que mentionné précédemment) s'effectue sur une échelle de temps supérieure aux microsecondes. Aussi, à cause de cette contrainte de temps, les systèmes étudiés ne peuvent être très complexes car le nombre d'atomes impliqués est lié à la durée des simulations. Enfin, un nombre important de paramètres sont à ajuster lorsqu'on utilise cette méthode, ajustement qui demande de l'utilisateur qu'il connaisse bien le système en cause et qu'il suive un bon protocole de simulation.

Et quoique la dynamique moléculaire discontinuée offre des résultats intéressants, elle ne peut être utilisée avec des potentiels tout-atome tels que CHARMM ou AMBER. Elle nécessite aussi que les forces du système étudié soient modélisées d'une façon particulière.

2.3.4 La technique d'activation-relaxation

2.3.4.1 Description de la méthode

À l'origine, la technique d'activation-relaxation a été développée pour étudier les mécanismes de diffusion dans divers matériaux amorphes^[19]. La méthode a ensuite été modifiée pour être appliquée à l'étude d'un plus grand nombre de problèmes dont celui du repliement des protéines^[35,54].

ART est une méthode qui permet l'exploration de surfaces d'énergie continues par une série d'étapes d'activation. Les événements définis par ART sont décrits directement dans la surface d'énergie ce qui permet à la méthode de générer des mouvements de n'importe quelle complexité.

Un événement typique de ART comporte 4 étapes ; les deux premières étapes faisant partie de la phase d'activation et les deux dernières, de la phase de relaxation (le détail de chacune des étapes énumérées ci-bas sera exposé plus loin dans ce chapitre) :

- 1) À partir d'un minimum local d'énergie, une configuration est poussée aléatoirement hors de ce minimum dans une des $3N$ dimensions, où N est le nombre

d'atomes, de la surface d'énergie, ce jusqu'à ce que la dimension choisie corresponde à la direction d'un point de selle de premier ordre.

2) La configuration est ensuite poussée dans la direction du point de selle de premier ordre et ce jusqu'à ce que ce dernier soit atteint.

3) La configuration est poussée légèrement au-delà du point de selle et est relaxée vers un nouveau minimum local par une méthode de minimisation standard.

4) La configuration finale (associée au nouveau minimum local) est rejetée ou acceptée en utilisant le critère de Metropolis.

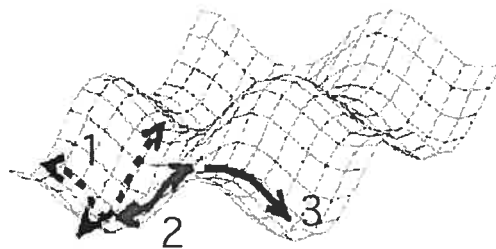


FIG. 2.1 – Les trois premières étapes de la technique d'activation-relaxation. 1) Sortie du minimum local d'énergie dans une direction aléatoire jusqu'à ce que la direction d'un point de selle de premier ordre soit trouvée 2) La configuration est poussée dans la direction du point de selle de premier ordre jusqu'à ce que ce dernier soit atteint 3) La configuration est relaxée vers un nouveau minimum local qui sera accepté ou rejeté selon le critère de Metropolis.

ART explore donc la surface d'énergie par un chemin constitué de minima locaux séparés par des points de selle de premier ordre. Les trajectoires générées sont donc toutes physiquement possibles.

Nous devons ici introduire quelques notions mathématiques avant de poursuivre afin de faciliter la compréhension de la description détaillée de l'algorithme.

Nous avons vu au chapitre 2 que la surface d'énergie associée aux structures protéiques est composée de plusieurs états : minima, maxima et points de selles

(états de transition). Aux points de selle, comme aux minima et maxima, la dérivée première de l'énergie, la force, est nulle.

Une exploration de la surface d'énergie visant à trouver la structure d'énergie minimale cherche à passer par les états où la force est nulle et définit donc une trajectoire minimum-point de selle-minimum.

On peut caractériser la courbure de la surface étudiée en un point donné en calculant les vecteurs propres et les valeurs propres associés à ce point (le vecteur propre relevant de la valeur propre). Ces valeurs, calculées à partir de la matrice hessienne (matrice des dérivées secondes), nous permettent d'identifier la présence d'un minimum, d'un maximum et d'un point de selle.

En terme de valeur propre, un minimum se définit comme un état où la valeur propre est supérieure à 0 dans toutes les directions tandis qu'un point de selle de premier ordre est un état où la valeur propre est inférieure à 0 dans une direction et supérieure à 0 dans toutes les autres directions. Par conséquent, un point de selle d'ordre n est caractérisé par une valeur propre négative dans n directions tandis qu'un maximum présente une valeur propre inférieure à 0 dans toutes les directions.

L'algorithme ART ne considère que les points de selle de premier ordre pour élaborer une trajectoire minimum-point de selle-minimum ; l'énergie associée aux points de selle d'ordres supérieurs étant plus élevée, la visite de ces états est donc beaucoup moins probable.

1) Quitter le minimum local

Il faut noter qu'un minimum local ne contient aucune information quant à la position ou au nombre de points de selle qui l'entourent. C'est pourquoi la configuration quitte le minimum local dans une direction aléatoire. Pour prévenir toute instabilité de la configuration, cette dernière est lentement déplacée dans la direction aléatoire tandis que son énergie totale est minimisée partiellement jusqu'à ce que la direction d'un point de selle de premier ordre soit trouvée, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'une valeur propre négative apparaisse dans la matrice hessienne locale.

2) Convergence vers un point de selle de premier ordre

Une fois hors du minimum local, une valeur propre correspondant à une direction de courbure négative est trouvée dans la matrice hessienne. La configuration est ensuite déplacée le long du vecteur propre associé à cette valeur propre négative qui indique la direction d'un point de selle de premier ordre.

Comme on ne désire connaître que la plus faible valeur propre de la matrice et le vecteur propre qui s'y rapporte, la matrice hessienne entière n'a pas besoin d'être calculée et diagonalisée à chaque étape (une opération qui serait en $O(N^3)$ en temps). La plus faible valeur propre de la matrice est calculée en utilisant l'algorithme de Lanczos (méthode récursive en $O(N)$ en temps)^[26].

La configuration est ensuite déplacée dans la direction associée au vecteur propre (à la courbure négative) et l'énergie totale de cette dernière est minimisée partiellement, toujours pour assurer la stabilité de la configuration, jusqu'à ce que le point de selle soit atteint.

3) Relaxation à un nouveau minimum local

Après avoir convergé au point de selle, la configuration peut être amenée dans l'un ou l'autre des deux minima séparés par ce dernier par une méthode de relaxation. Voilà pourquoi la configuration est poussée légèrement au-delà du point de selle à la troisième étape. Cela permet d'éviter de revenir au minimum local initial. N'importe quelle méthode de minimisation peut être utilisée à cette étape. Nous avons utilisé une méthode de dynamique amortie où l'on effectue des pas de dynamique moléculaire classique jusqu'à ce que les vecteurs de force et de vitesse deviennent antiparallèles. Ainsi, dès que le produit scalaire de ces deux vecteurs devient négatif, on attribue une valeur nulle à la vitesse et on repart une dynamique moléculaire jusqu'à ce que la force atteigne une valeur près de zéro (10^{-4}), indiquant ainsi que l'on a atteint un point critique, dans ce cas-ci un minimum local.

4) Acceptation/refus de la nouvelle configuration

La nouvelle configuration est ensuite acceptée ou rejetée selon le critère de Metropolis, c'est-à-dire avec une probabilité :

$$p = \min(1, e^{(-\Delta E/k_B T)}) \quad (2.4)$$

où ΔE est la différence d'énergie entre la configuration finale et la configuration initiale, k_B est la constante de Boltzmann et T est la température de Metropolis. Si la nouvelle configuration est acceptée, le prochain événement débutera à partir de cette dernière tandis que si elle est refusée, le prochain événement de ART débutera à partir du minimum initial précédent.

La technique d'activation-relaxation est une méthode efficace en temps, indépendante d'une échelle de temps et non biaisée qui génère des trajectoires bien contrôlées tel que démontré par Mousseau et al. ^[54]. De plus, l'échantillonnage effectué est ergodique, c'est-à-dire que toutes les classes d'événements semblent échantillonnées (n'importe quelle région de l'espace est accessible à partir de n'importe quelle autre en un nombre fini d'étapes) et tous les événements générés par la méthode sont réversibles. La technique d'activation-relaxation nécessite l'ajustement d'un très petit nombre de paramètres tels que la température de Metropolis et la valeur seuil de la valeur propre.

Notons que l'ajustement de ces paramètres ne modifie en aucun cas la surface d'énergie, mais affecte plutôt l'efficacité de la méthode.

La température de Metropolis doit être ajustée pour obtenir un échantillonnage satisfaisant de la surface d'énergie. En effet, tel que mentionné précédemment, la conformation finale sera acceptée ou rejetée selon un test Metropolis basé sur la différence d'énergie entre les configurations initiale et finale. Comme les conformations sont relaxées et n'incluent aucune contribution entropique, la température de Metropolis ne correspond pas à la température réelle. Si elle est trop élevée, l'échantillonnage sera équivalent à une exploration aléatoire de la surface d'énergie, c'est-à-dire que pratiquement toutes les configurations seront acceptées et on ne convergera pas vers les états de basse énergie. Par contre, si elle est trop faible, le système sera emprisonné dans un minimum local. Donc, le choix de la température

de Metropolis doit permettre d'obtenir un taux d'acceptation (rapport entre le nombre d'événements acceptés et le nombre total d'événements) raisonnable tout en permettant une convergence vers une configuration avec un minimum d'énergie. Ce choix est déterminé par une série d'essais et d'erreurs. Santini et al.^[39,40] suggère que la température de Metropolis optimale doit engendrer un taux d'acceptation se situant entre 10 et 70 % et indique qu'elle devrait se trouver entre 300 K et 1000 K pour la plupart des protéines décrites par le potentiel d'énergie OPEP (nous reviendrons sur ce potentiel au chapitre suivant).

Le second paramètre à ajuster est la valeur seuil de courbure utilisée pour déterminer si la configuration a quitté le minimum local initial. On trouve donc la valeur de la plus faible valeur propre dans la matrice hessienne (calculée par l'algorithme de Lanczos) et si cette valeur est plus faible que le seuil fixé, la configuration a quitté le bassin et peut converger vers un point de selle de premier ordre. Si la valeur seuil comparée à la valeur propre est négative mais trop près de zéro, la relaxation partielle, effectuée pour assurer la stabilité de la conformation, ramènera la configuration dans la région de courbure positive, c'est-à-dire au minimum. Cependant, si cette valeur est trop négative, la configuration risque d'être poussée dans un nouveau minimum générant ainsi une trajectoire discontinuée. La valeur seuil dépend du système étudié et est obtenue par essai erreur.

2.3.4.2 Que peut-on apprendre par cette méthode ?

Plusieurs membres de notre groupe de recherche ont utilisé cette méthode avec succès par le passé. Ainsi, Santini et al.^[39,40] ont utilisé la technique d'activation-relaxation avec le potentiel d'énergie OPEP, dont nous parlerons au prochain chapitre, pour étudier les mécanismes d'assemblage d'un dimère et d'un trimère de $A\beta_{16-22}$. L'étude de la surface d'énergie libre associée à la formation du dimère a permis de décrire plusieurs voies de repliement menant à une structure de basse énergie dimérique et antiparallèle en accord avec les données expérimentales. Les simulations ont permis de décrire un mouvement de reptation de l'un des brins du feuillet par rapport à l'autre. Finalement, l'étude a montré que plusieurs voies

pouvaient mener à la formation du dimère et que toutes ces voies n'impliquaient pas nécessairement un intermédiaire α -hélical tel qu'envisagé par Klimov et al.^[10]. Quant à l'étude du trimère, elle a permis d'observer la formation d'une structure antiparallèle stable s'approchant de la structure des peptides à l'intérieur des fibrilles. Cette structure est en équilibre avec plusieurs structures β antiparallèles hors-registre et mixtes. Aussi, l'étude a révélé un mécanisme d'assemblage unique en trimère antiparallèle qui consiste en la formation d'un dimère suivie de l'addition d'un monomère. Des mouvements de reptation ont aussi été identifiés dans cette étude.

Wei et al.^[42,43] ont aussi utilisé ART avec le potentiel OPEP pour caractériser les mécanismes d'assemblage de six et huit tétrapeptides KFFE. Les simulations ART-OPEP à partir de six peptides ont conduit à l'obtention de trois structures de faible énergie : un arrangement de deux trimères, un arrangement d'un tétramère et d'un dimère et un barril β . Les deux premiers arrangements se sont révélés consistants avec les résultats expérimentaux associés à la structure des fibrilles. Suite à cette étude, Wei et al. ont proposé que les fibrilles croissaient de façon bidirectionnelle, c'est-à-dire latéralement et longitudinalement. L'étude de l'octamère a, quant à elle, montré que les peptides s'arrangeaient en plusieurs structures organisées de basse énergie. Deux de ces structures présentaient un arrangement de deux tétramères compatible avec les résultats expérimentaux de diffraction de fibres aux rayons X tandis que les autres étaient constitués d'un mélange de dimères et de trimères. L'étude a montré que huit peptides constituaient un nombre inférieur à la taille requise pour le noyau critique pour ce système. Notons que les études concernant le tétrapeptide ont été réalisées simultanément à notre propre étude du tétramère de KFFE.

2.3.5 Limites de la méthode

Malgré la génération de trajectoires physiquement acceptables (trajectoire continue de minima locaux séparés par des états de transition), la méthode ART-OPEP comporte ses limites. Dans sa forme actuelle, ART ne décrit pas les contribu-

tions thermales entropiques. Ainsi, on ne fait qu'explorer la surface d'énergie sans rien connaître des barrières énergétiques franchies. La méthode ne permet donc pas de savoir laquelle des trajectoires générées est la plus probable. Toutefois, cette limite peut s'avérer utile, car elle permet à la méthode de proposer plusieurs mécanismes possibles sans discriminer ceux qui sont théoriquement moins favorisés. Par exemple, l'étude du repliement d'un petit peptide en épingle β a permis de proposer trois mécanismes qui ont aussi été identifiés séparément par dynamique moléculaire.

Un second problème de la méthodologie est lié au potentiel d'énergie OPEP qui représente les chaînes latérales de façon simplifiée (voir le chapitre suivant). Le potentiel d'énergie OPEP ne permet pas de reproduire d'une façon détaillée les interactions entre les chaînes latérales (qui sont représentées par des billes) et les interactions avec le solvant. Le fait de ne pas avoir tous les atomes ne permet pas d'approfondir explicitement le rôle de chaque résidu dans le processus d'agrégation ou de repliement.

Or, dans le cas de la formation des fibrilles amyloïdes constituées du peptide β -amyloïde, plusieurs études ont démontré que les résidus phénylalanines du coeur hydrophobe avaient un important rôle à jouer dans le processus d'assemblage. L'utilisation d'OPEP pourrait nous permettre d'envisager un rôle pour ces acides aminés, mais ne permettrait pas de caractériser directement leur implication. Toutefois, selon Stefani et al.^[9], la nature des acides aminés n'est pas un facteur primordial dans l'auto-assemblage des fibrilles puisque plusieurs protéines ne présentant aucune similarité de séquence ont la capacité de former des fibrilles. Ce serait plutôt une caractéristique de l'arrangement des chaînes principales, indépendant de la séquence, qui favoriserait l'agrégation.

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

Pour notre projet, nous avons utilisé la technique d'activation-relaxation (ART) couplée au potentiel d'énergie simplifié OPEP pour étudier les mécanismes d'agrégation de peptides amyloïdes. Nous avons aussi effectué quelques simulations de dynamique moléculaire avec le programme GROMACS^[4, 16] pour évaluer la stabilité de certaines structures.

Nous ne présenterons dans ce chapitre que les peptides à l'étude et le potentiel avec lequel la méthode ART a été utilisée.

3.1 Peptides à l'étude

Comme nous l'avons mentionné au premier chapitre, il existe un grand nombre de peptides ne présentant aucune similarité de séquence ou de structure native capable de former des fibrilles *in vitro* en présence de conditions dénaturantes. L'hypothèse voulant que la capacité à former des fibres amyloïdes soit une propriété intrinsèque des chaînes polypeptidiques nous permet d'étudier des peptides donnés (souvent plus courts) pour dégager les mécanismes généraux de la fibrillogénèse. Vu les contraintes en temps et en ressources imposées par les méthodes numériques, cela constitue un grand avantage.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi d'étudier deux peptides particuliers : le térapeptide KFFE et un segment du peptide β -amyloïde, le peptide $A\beta_{11-25}$.

3.1.1 KFFE

En 2002, Tjernberg et al.^[22] ont entrepris d'étudier les exigences minimales requises pour observer la formation de fibrilles *in vitro*. Ils ont construit différents peptides de longueurs variées et ont observé que des peptides comprenant aussi

peu que quatre résidus, de séquence KFFE et KVVE, pouvaient former des fibres amyloïdes pratiquement identiques structurellement aux fibrilles pathologiques. Ils ont aussi proposé un modèle structural pour le tétramère de KFFE basé sur des expériences de minimisation d'énergie. Dans ce modèle, les quatre térapeptides s'arrangent en feuillet β antiparallèle.

Nous avons décidé d'étudier ce peptide pour deux raisons. D'abord, les données expérimentales disponibles permettent d'effectuer des comparaisons et de valider nos résultats. Ensuite, le faible nombre de résidus du peptide constitue un avantage du point de vue numérique.

Mentionnons que toutes les images présentant les structures de KFFE ont été obtenues en utilisant les programmes de visualisation MOLMOL^[25] et PYMOL^[62].

3.1.2 $A\beta_{11-25}$

$A\beta_{11-25}$ est un fragment constitué des résidus 11 à 25 du peptide β -amyloïde ($A\beta$). Sa séquence, EVHHQKLVFFAEDVG, contient la région centrale hydrophobe de $A\beta$ que l'on croit importante pour la fibrillogenèse. $A\beta_{11-25}$ forme, *in vitro*, des fibrilles bien organisées qui ont été l'objet de quelques études expérimentales^[27,30,55].

Suite à des études de résonance magnétique en état solide sur des fibres de $A\beta_{11-25}$, Petkova et al.^[55] ont suggéré que les peptides s'assemblaient (dans les fibres) en feuillets β antiparallèles où le coeur hydrophobe (LVFFA) est en conformation étendue. Ils ont aussi suggéré que le registre du réseau de liaisons hydrogène¹ est dépendant du pH. Sikorski et al.^[27] ont aussi proposé une organisation β antiparallèle en se basant sur l'analyse de résultats obtenus par diffraction de fibres aux rayons X.

Il est important de rappeler que le peptide β -amyloïde est le peptide associé à

¹Le registre des liaisons hydrogène est défini comme l'alignement des liens hydrogène entre deux peptides adjacents. Par exemple, un registre $1+k \leftrightarrow 1+k$ indique une interaction intermoléculaire entre le premier résidu d'un peptide et le premier résidu du peptide adjacent si $k = 0$. On dit alors que le réseau de ponts hydrogène est "en-registre" parallèle. Dans le cas de peptides de 15 résidus, un registre $1+k \leftrightarrow 15-k$ se rapporte à une structure antiparallèle "en-registre" où le premier résidu d'un brin interagit avec le dernier résidu du brin adjacent par un lien hydrogène pour $k = 0$.

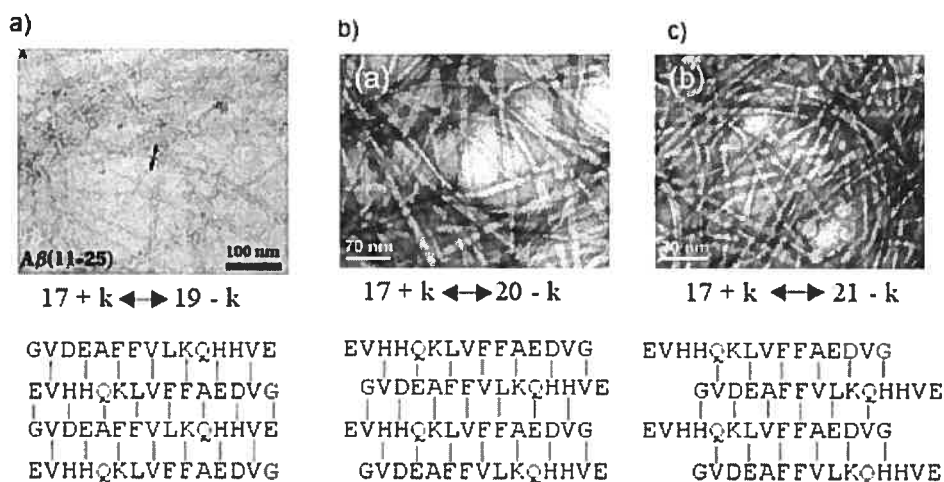


FIG. 3.1 – Trois modèles représentant l'organisation de $A\beta_{11-25}$ dans les fibrilles. a) Modèle proposé par Sikorski et al. suite à des études de diffraction aux rayons X. Une photographie au microscope électronique des fibres obtenues *in vitro* est présentée de même qu'une représentation du modèle antiparallèle suggéré [27]. b) et c) Deux modèles dépendant du pH ont été proposés par Petkova et al. suite à des études de RMN en état solide. Les fibres obtenues à pH 7.4 (b) et pH 2.4 (c) ainsi que les modèles antiparallèles s'y rapportant sont présentés. Quoique les fibres obtenues *in vitro* aient une morphologie similaire, le registre des liaisons hydrogène des structures β les composant est dépendant du pH^[55].

la maladie d'Alzheimer. Nous nous y attarderons un peu plus longuement au début du chapitre 5.

3.2 Simulations ART-OPEP

3.2.1 ART

Compte tenu du succès obtenu par la méthode ART-OPEP [39,40,42,43,54], nous avons privilégié cette méthode pour étudier les peptides présentés aux sections précédentes. Nous avons déjà décrit la technique d'activation-relaxation à la section 2.3.4 du chapitre 2. La méthode ART ne peut cependant pas être utilisée seule, car ce n'est que l'algorithme pour explorer la surface d'énergie. Elle doit être couplée à un potentiel qui, en approximant la fonction d'énergie, permet de définir la surface à explorer.

3.2.2 Potentiel d'énergie OPEP

ART est utilisée conjointement au potentiel d'énergie OPEP ("*Optimized Potential for Efficient peptide-structure Prediction*") qui a été entraîné en utilisant six polypeptides en solution n'incluant pas KFFE et A β ^[37]. Ce potentiel d'énergie traite les effets d'un solvant aqueux implicitement et représente chaque acide aminé par ses atomes N, H, C, O, C α de la chaîne principale et par une bille de géométrie et de rayon de Van der Waals appropriés pour la chaîne latérale. La façon dont ces billes sont générées tient compte de la longueur des liens C α et SC (chaîne latérale), de l'angle entre les atomes C α_{i-1} , C α_i et SC $_i$ et des angles diédraux impropres entre les atomes C α_{i+1} , C α_{i-1} , C α_i et SC $_i$. Les simplifications effectuées dans OPEP permettent d'obtenir une surface d'énergie qui est moins rugueuse et qui peut être explorée plus facilement.

L'énergie totale dans OPEP est exprimée par l'équation :

$$E = w_L E_L + w_{SC,SC} E_{SC,SC} + w_{SC,M} E_{SC,M} + w_{M,M} E_{M,M} + w_H E_{HB1} + w_{HH} E_{HB2} \quad (3.1)$$

où E_L est un terme quadratique se rapportant à la longueur des liens, aux angles entre les chaînes latérales et la chaîne principale et aux angles de torsion des chaînes latérales et des groupes peptidiques; $E_{M,M}$ représente l'énergie associée à l'interaction entre les particules de la chaîne principale; $E_{M,SC}$ représente l'énergie associée à l'interaction entre les particules de la chaîne principale et des chaînes latérales; $E_{SC,SC}$ représente l'énergie associée à l'interaction entre les particules des chaînes latérales; E_{HB} représente l'énergie associée aux liaisons hydrogène. Dans la version du potentiel que nous utilisons, tous les poids w ont été fixés à une valeur de 1 et un terme énergétique, $E\psi$, a été inclus dans la fonction d'énergie pour pénaliser les angles ψ dont la valeur est hors des régions permises du graphe de Ramachandran^[60]. Pour de courts peptides, cette pénalité suffit pour s'assurer d'obtenir une majorité de structures stéréochimiquement correctes. Dans le cas de l'étude du peptide A β_{11-25} , nous avons ajouté un terme énergétique supplémentaire, E_ϕ , lié à l'angle ϕ .

E_ψ et E_ϕ ont ainsi pour rôle de défavoriser les structures dont les angles ψ et ϕ ont des valeurs non permises. Dans le cas de $A\beta_{11-25}$ (peptide de 15 résidus), la restriction d'un seul angle diédral n'était pas suffisante. Nous sommes arrivé à cette constatation après avoir observé plusieurs structures incorrectes. L'ajout d'une pénalité énergétique au niveau de l'angle ϕ a permis de résoudre ce problème.

Le potentiel OPEP comporte trois principales limites. D'abord, comme les chaînes latérales sont représentées par des billes, le potentiel ne permet pas d'explorer toute la complexité des interactions pouvant survenir entre elles. Ensuite, comme le solvant n'est pas traité explicitement, les liaisons hydrogène entre les atomes du solvant et ceux des peptides ne sont pas considérées. Or, ces liens hydrogène affectent l'énergie et l'entropie du système. De plus, le potentiel ne tient pas compte de l'effet du pH du solvant sur la stabilité des chaînes polypeptidiques.

Toutefois, malgré ces limites, plusieurs études ont montré que les mécanismes générés suite à des simulations ART-OPEP étaient cinétiquement possibles. Par exemple, Wei et al.^[41] ont observé, suite à une étude ART-OPEP, que le mécanisme de repliement d'un peptide donné en hélice α passait par un état de transition caractérisé par deux hélices connectées par une boucle. Ce mécanisme a aussi été trouvé par Chowdhury et al.^[64] suite à des études de dynamique moléculaire utilisant un potentiel tout-atome. De la même façon, l'étude du repliement d'une épingle β par ART-OPEP a permis d'identifier deux mécanismes trouvés par les méthodes standards en plus d'un troisième mécanisme impliquant un phénomène de reptation. Ce troisième mécanisme a par la suite été observé en utilisant une autre méthode de simulation en solvant explicite^[21].

CHAPITRE 4

EXPLORATION DES MÉCANISMES D'AGRÉGATION DE PEPTIDES KFFE EN TÉTRAMÈRE

Le peptide KFFE est un peptide synthétique formant des fibres *in vitro* similaires aux fibres retrouvées dans les amyloïdoses.

L'étude de l'assemblage de quatre peptides KFFE visait l'élucidation de mécanismes généraux caractérisant la formation des oligomères instables dans les premières étapes de la fibrillogenèse. Rappelons que l'intérêt d'étudier les oligomères réside dans le fait que ces structures seraient la principale cause de la toxicité observée dans les diverses pathologies. Contrairement à l'étude des hexamères et des octamères^[42,43], l'étude du tétramère a permis de caractériser extensivement les mécanismes d'agrégation et de dissociation des peptides et d'observer l'effet de mutations dans la séquence térapeptidique.

Trois séries de simulations ont été effectuées dans le cadre de notre étude. La première consistait en une trentaine de simulations ART-OPEP à 300 K à partir d'un arrangement aléatoire de quatre térapeptides séparés d'une distance variant de 6 à 10 Å . Cette température est la même que celle choisie par Santini et al. pour l'étude du peptide $A\beta_{16-22}$ ^[40] et s'approche de celle choisie par Wei et al. pour l'étude de l'hexamère de KFFE^[43]. 12 000 événements ont été effectués par simulation¹. Le taux d'acceptation moyen à la température choisie approchait 71 %.

ART-OPEP a aussi été utilisée pour la seconde série de simulations, mais à partir d'une structure initiale où les deux phénylalanines de la séquence peptidique ont été mutées par une proline et une glycine. Enfin, deux simulations de dynamique moléculaire tout-atomes en solvant explicite à 298 et 330 K, pour un total de 50 nanosecondes, ont été effectuées pour évaluer la stabilité d'un feuillet β antiparallèle

¹4 à 5 jours sur un processeur PowerMac G5 1,8Ghz

correspondant au modèle proposé par Tjernberg^[22] pour le tétramère.

Ce travail a été effectué en collaboration avec Adrien Melquiond de l'Institut de Biologie Physico-Chimique de Paris qui a effectué la deuxième série de simulations ainsi que la dynamique moléculaire. Les résultats ont été publiés en 2005 dans la revue " *Journal of Chemical Physics*"^[38].

4.1 Assemblage de quatre peptides KFFE

4.1.1 Structure du monomère

Quatre simulations indépendantes ont été effectuées sur un monomère du peptide KFFE pour s'assurer que la méthode modélisait de façon efficace le peptide. Les résultats obtenus ont montré que 28 % des structures monomériques adoptaient une conformation β et 72 % adoptaient une conformation *random-coil*. Ces résultats correspondent aux données expérimentales retrouvées dans la littérature^[22] pour ce peptide.

4.1.2 Formation du tétramère par simulation ART-OPEP

Parmi la trentaine de simulations que nous avons effectuées, toutes ont mené à des conformations organisées ou semi-organisées. Nous avons relevé quatre états de plus basse énergie (calculée selon la fonction d'énergie du potentiel OPEP) dont l'énergie variait de -35 à -48 *kcal/mol*. Après 12 000 événements, 30 % des simulations ont mené à la formation de tétramères β antiparallèles, 30 % ont conduit à l'assemblage d'un tétramère mixte ou d'un trimère mixte avec un monomère et 10 % des simulations ont permis la formation de deux dimères antiparallèles. La figure 4.1 présente les différentes structures de basse énergie observées avec leur énergie correspondante.

Pour caractériser le processus d'agrégation des térapeptides, nous avons calculé l'énergie totale des conformations, la distance "bout-à-bout" de chaque monomère, l'orientation relative de paires de monomères et le nombre de ponts hydrogène formés, tout cela en fonction du nombre d'événements acceptés. La distance bout-

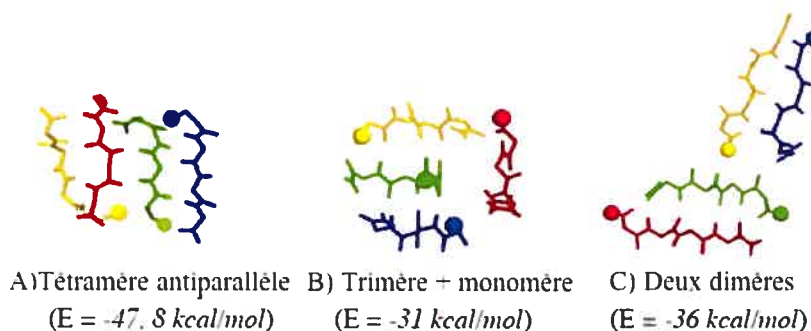


FIG. 4.1 – Structures de plus faible énergie obtenues par simulation ART-OPEP.

à-bout ("*end-to-end distance*") est définie comme la distance entre l'atome d'azote du premier résidu et l'atome de carbone du dernier résidu pour un monomère donné. Une distance d'environ 4 Å est associée à une conformation compacte tandis qu'une distance approximative de 12 Å est associée à une conformation étendue. Pour caractériser l'orientation relative des brins en fonction des événements, nous avons calculé le produit scalaire des vecteurs unitaires de distance bout-à-bout pour chaque paire de monomères : une valeur de 1 indique une orientation parallèle, une valeur de -1 indique une orientation antiparallèle tandis qu'une valeur de 0 indique une orientation perpendiculaire.

La figure 4.2 présente le détail d'une simulation ART-OPEP menant à la formation d'un tétramère antiparallèle.

Nous voyons tout d'abord sur le graphe présentant l'énergie totale en fonction du numéro de l'événement accepté que l'énergie du système diminue tout au long de la simulation et converge vers un plateau à environ -35 kcal/mol. Cela se produit parallèlement à l'augmentation du nombre de ponts hydrogène qui fluctue autour de 12 à la fin de la simulation. L'évolution du processus d'agrégation est mieux illustrée par les graphes représentant l'orientation relative et la distance bout-à-bout des monomères en fonction des événements. Tout d'abord, nous pouvons noter que la stabilisation observée au tout début de la simulation correspond à la formation d'un dimère entre les monomères 2, 3. On voit que, dès le départ, les brins 2 et 3 adoptent une conformation étendue associée au brin β et s'orientent

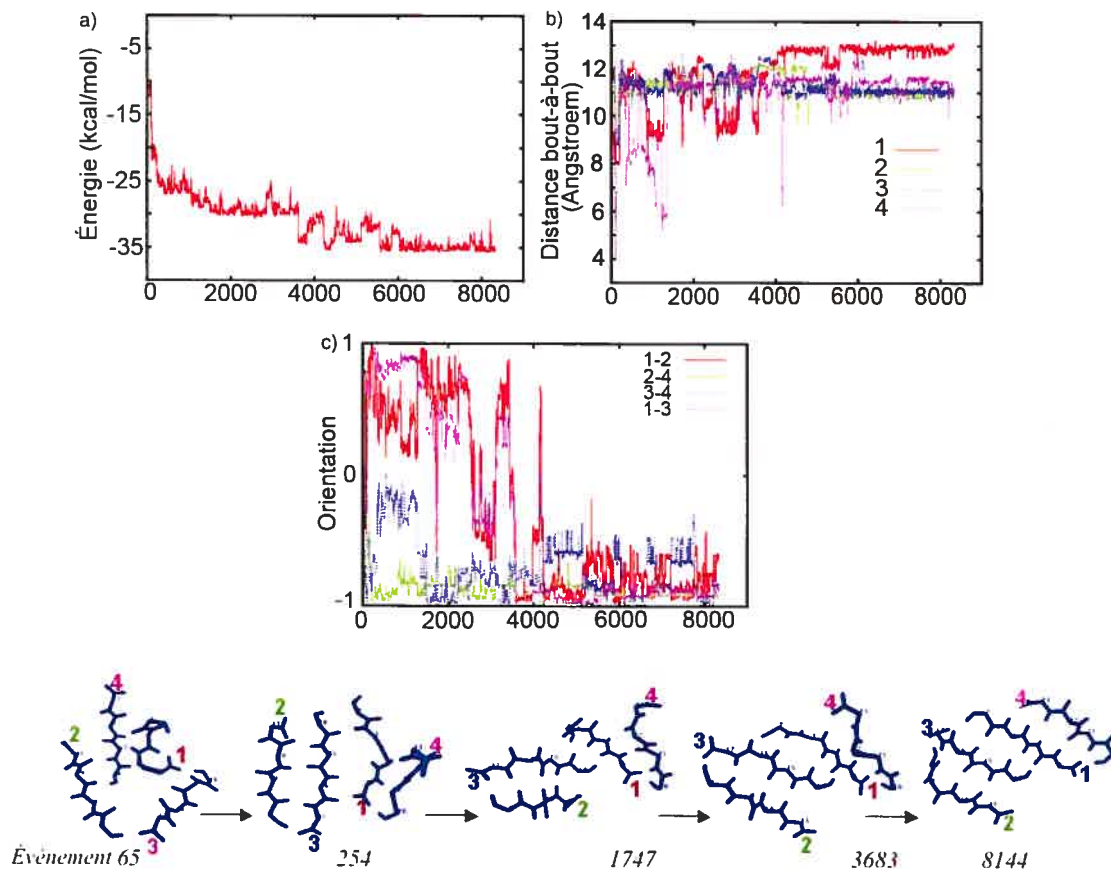


FIG. 4.2 – Analyse d’une trajectoire ART-OPEP à partir de quatre brins KFFE arrangés aléatoirement menant à la formation d’un tétramère antiparallèle hors-registre. Les graphes de l’énergie (a), de la distance bout-à-bout des monomères (b) et de l’orientation des monomères (c) sont présentés en fonction du numéro de l’événement accepté.

de façon antiparallèle. Nous constatons aussi qu’au départ les brins 1 et 3 sont orientés parallèlement, mais que le brin 1 change d’orientation au cours de la simulation. À l’événement 3600, ce brin s’oriente de façon antiparallèle au brin 3 déjà impliqué dans un dimère antiparallèle avec le brin 2. Il y a donc formation d’un trimère antiparallèle ce qui permet une stabilisation additionnelle du système. Vers l’événement 4200, la distance bout-à-bout du brin 4 se stabilise et ce brin s’oriente plus ou moins perpendiculairement au brin 1. Il y a formation d’un tétramère antiparallèle où le brin 4 conserve tout de même une certaine flexibilité à l’extrémité

comme l'indique son orientation par rapport au brin 1.

Les mécanismes menant à la formation d'une structure tétramérique varient d'une simulation à l'autre. Ainsi, les états de plus faibles énergies ont parfois été visités plus rapidement et la formation d'un trimère ne précédait pas systématiquement la formation du tétramère. Dans certaines simulations, l'état oligomérique précédant la forme native tétramérique était la conformation de deux dimères.

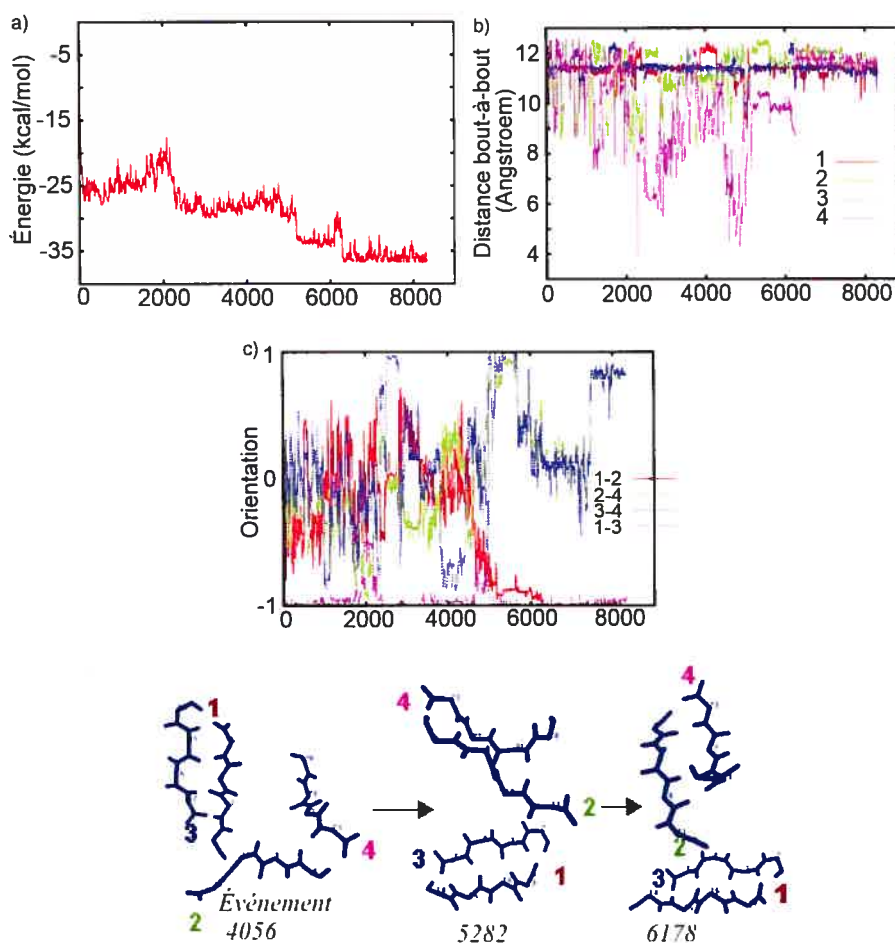


FIG. 4.3 – Analyse d'une trajectoire ART-OPEP à partir de quatre brins KFFE arrangés aléatoirement menant à la formation d'une structure constituée de deux dimères. Les graphes de l'énergie (a), de la distance bout-à-bout des monomères (b) et de l'orientation des monomères (c) sont présentés en fonction du numéro de l'événement accepté.

La figure 4.3 présente l'analyse d'une simulation menant à la formation de deux

dimères. Nous pouvons constater grâce au graphe de la distance bout-à-bout et au graphe de l'orientation relative des brins que, dès le départ, les brins 1 et 3 adoptent une conformation étendue et s'orientent de façon antiparallèle. Il y a donc formation d'un premier dimère. La distance bout-à-bout des brins 2 et 4 varie beaucoup au cours de la simulation tout comme leur orientation relative ainsi que leur orientation par rapport au dimère 1-3 jusqu'à ce que ces brins s'organisent de façon antiparallèle et que leur distance bout-à-bout se stabilise. À partir de ce moment, nous pouvons suivre l'orientation des deux dimères l'un par rapport à l'autre sur le graphe d'orientation relative. Nous constatons que lors de la formation du deuxième dimère, les deux dimères sont parallèles, mais qu'ils changent ensuite d'orientation pour devenir perpendiculaires et pour revenir par la suite parallèles.

L'arrangement en deux dimères est le seul qui présente les propriétés des fibres amyloïdes, c'est-à-dire qui présente des couches empilées de feuillets β antiparallèles comme dans le motif de feuillets β en croix. Nous avons évalué la distance entre les dimères en calculant la distance entre les centres de masse de chaque paire de monomères. Nous avons trouvé une distance d'environ 11 Å ce qui correspond à la distance expérimentale observée dans les fibres. L'énergie totale de l'arrangement en deux dimères est de -36 kcal/mol .

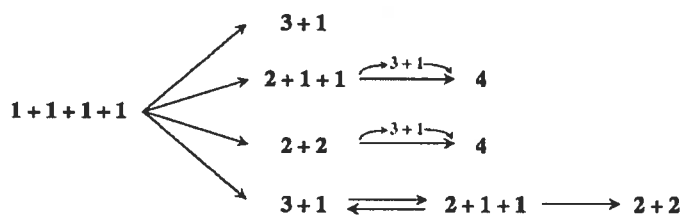


FIG. 4.4 – Ensemble des mécanismes de formation observés au cours des simulations ART-OPEP

Une représentation de l'ensemble des mécanismes d'agrégation observés est présentée à la figure 4.4. Nos analyses ont montré que la formation de structures en conformation β semble s'effectuer par addition séquentielle, c'est-à-dire par l'addition d'une chaîne (4 monomères \rightarrow 1 dimère + 2 monomères \rightarrow 1 trimère + 1 monomère \rightarrow 1 tétramère) ou par l'addition de deux chaînes (4 monomères \rightarrow 2

dimères \rightarrow 1 tétramère).

Parmi toutes les simulations effectuées, 30 % n'ont pas permis de localiser un état stable en moins de 8000 événements acceptés. Ces simulations ont plutôt mené à des structures oligomériques désorganisées. Ce phénomène avait aussi été observé par Santini et al.^[39,40] lors de simulations ART-OPEP sur des dimères et trimères du peptide $A\beta_{16-22}$. Cela suggère que l'étape limitante du processus d'oligomérisation est le réarrangement des structures désorganisées en une structure présentant un alignement natif des brins.

4.2 Assemblage de quatre peptides KPGE par simulation ART-OPEP



FIG. 4.5 – Les simulations à partir du peptide muté KPGE ont conduit à la formation d'assemblages désordonnés.

Mon collègue Adrien Melquiond a remplacé les deux phénylalanines de KFFE par une proline et une glycine pour déterminer l'effet de ces mutations au niveau de la formation des structures β dans les simulations ART-OPEP. À cause de sa structure chimique particulière, la proline ne favorise pas la formation de feuillets β . Nous nous attendions donc à ce que l'incorporation de cet acide aminé défavorise la formation de structures organisées (cet acide aminé étant stéréochimiquement restreint). Les résultats obtenus par mon collègue correspondaient à nos attentes puisqu'aucune structure organisée n'a été observée. La formation de structures désordonnées a plutôt été notée. Ceci indique que la méthode ART-OPEP gère bien l'identité des différents acides aminés.

4.3 Évaluation de la stabilité du modèle de Tjernberg par simulation de dynamique moléculaire

La stabilité du modèle de Tjernberg a été évaluée par deux simulations de dynamique moléculaire : l'une de 20 nanosecondes à une température de 298 K et l'autre, de 30 nanosecondes à une température de 330 K. Les simulations de dynamique moléculaires ont été effectuées par Adrien Melquiond. La figure 4.6 présente un résumé visuel des trajectoires ainsi que la distance des moindres carrés ("*Root Mean-Square Deviations*" ou RMSD) de la chaîne principale du tétramère antiparallèle en fonction du temps de simulation par rapport à la structure initiale. Le RMSD se définit comme :

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (x_{ai} - x_{bi})^2 + \sum_{i=0}^n (y_{ai} - y_{bi})^2 + \sum_{i=0}^n (z_{ai} - z_{bi})^2}{n}} \quad (4.1)$$

où x, y, z sont les coordonnées de chaque atome dont on veut mesurer l'écart de distance et n est le nombre d'atomes. Cette valeur exprime une "différence" structurale entre deux structures.

Nous pouvons constater que les chaînes du tétramère antiparallèle se sont dissociées et réassemblées deux fois au cours des 20 nanosecondes de la première simulation. La deuxième simulation a été effectuée à une température plus proche des conditions expérimentales d'incubation des peptides amyloïdes menant à l'obtention de fibrilles. Nous pouvons voir qu'au cours de cette simulation les quatre brins se sont dissociés (approchant un maximum de 8,2 Å RMSD) et se sont ensuite réassemblés pour reformer la structure initiale de départ (environ 15 ns). Après cela, tel qu'on peut le voir à la figure 4.6, le RMSD associé aux peptides varie entre 1,5 et 4,5 signifiant que les quatre brins explorent des états intermédiaires.

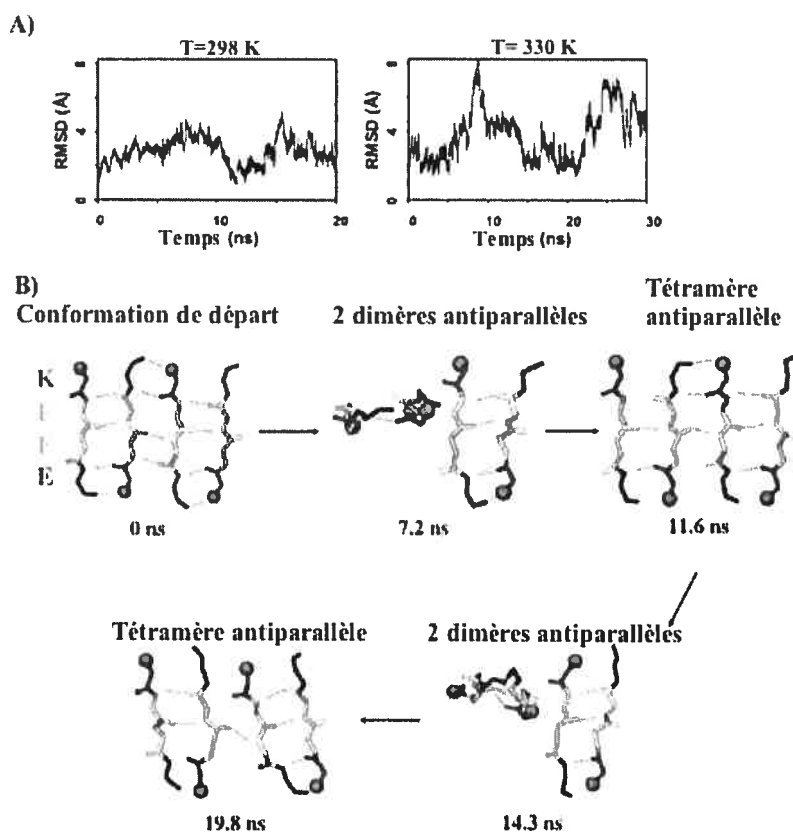


FIG. 4.6 – Dynamique moléculaire pour évaluer la stabilité du modèle de Tjernberg (modifié de Melquiond et al.^[38]). A) RMSD en Å en fonction de l'évolution de la simulation. B) Représentation de quelques structures obtenues au cours de la simulation effectuée à une température de 298K

Pour analyser les trajectoires, nous avons aussi regroupé les conformations observées en utilisant un seuil de 2,5 Å pour le RMSD des carbones α de la chaîne principale ("clustering"). Les analyses de la simulation à 298 K ont montré que la structure tétramérique antiparallèle des peptides (population de 76 %) était en équilibre avec une structure où deux dimères antiparallèles s'organisent de façon perpendiculaire (population de 16 %). La rotation d'un dimère par rapport à l'autre est donc thermiquement accessible à la température de la pièce.

Plus de groupes ont pu être identifiés lors de l'analyse de la simulation réalisée

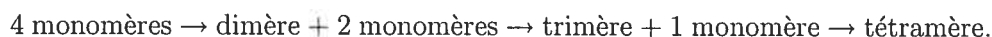
à 330 K. Nous avons ainsi observé des structures composées d'un dimère et de deux monomères (population de 8 %), d'un trimère et d'un monomère (population de 21 %) dont l'orientation des brins variait (parallèle versus antiparallèle). La structure tétramérique antiparallèle initiale et la structure tétramérique mixte ont aussi été rencontrées (population tétramérique de 71 %).

Nous pouvons constater que le changement de conformations se fait assez rapidement et ce, pour les deux températures étudiées. Même si nous n'affirmons pas qu'un équilibre a été atteint durant les simulations, nous pouvons néanmoins voir que le modèle de Tjernberg est en équilibre avec au moins la conformation de deux dimères antiparallèles perpendiculaires et plusieurs autres arrangements moins peuplés à température ambiante.

Il est intéressant de constater que les structures intermédiaires de faible énergie obtenues au cours des simulations ART-OPEP à partir d'un arrangement aléatoire des brins ont aussi été observées au cours des simulations de dynamique moléculaire

4.4 Qu'apprenons-nous de l'étude du tétramère de KFFE ?

Le mécanisme d'oligomérisation est en accord avec les résultats de Jang et al.^[65] qui ont proposé le modèle suivant pour la formation d'un complexe de quatre feuillets β :



Tel que mentionné auparavant, notre groupe^[42,43] s'est intéressé à la formation de l'hexamère et de l'octamère du peptide KFFE. L'étude de l'heptamère a aussi été effectuée par Melquiond et al., mais les résultats n'ont pas été publiés.

L'étude de l'hexamère, de l'heptamère et de l'octamère a montré que lorsque le nombre de peptides est plus élevé, les structures de basse énergie sont majoritairement organisées en deux couches : dimère-tétramère et trimère-trimère pour l'hexamère, trimère-tétramère pour l'heptamère et tétramère-tétramère pour l'octamère. Dans le cas de l'hexamère, une structure de faible énergie ressemblant à

un baril- β a aussi été formée.

Pour chaque trajectoire, plusieurs mécanismes d'agrégation différents ont été observés, mais tous avaient la particularité d'être séquentiels et de pouvoir se décrire comme suit :

$$M_1 + A_{n-1} = A_n \quad (4.2)$$

où M_1 est un monomère et A_n (avec $n > 1$) est un oligomère formé de n peptides organisés.

Nos résultats qui présentaient la première description détaillée de l'assemblage tétramérique de peptides KFFE ont montré qu'une multitude de trajets, visitant plusieurs conformations intermédiaires différentes, menait aux structures plus génériques. Nous avons aussi relevé que l'oligomérisation semblait un processus séquentiel.

De plus, notre étude a montré que la méthode ART-OPEP constituait une alternative pour étudier la formation dynamique des oligomères, ce qui nous a entraîné à la deuxième étape de notre projet soit l'étude du peptide $A\beta_{11-25}$, composé de 15 acides aminés.

CHAPITRE 5

EXPLORATION DES MÉCANISMES D'AGRÉGATION DE PEPTIDES $A\beta(11-25)$ EN TÉTRAMÈRE

$A\beta_{11-25}$ est un peptide constitué des résidus 11 à 25 du peptide β -amyloïde ($A\beta$) associé à la maladie d'Alzheimer, la forme la plus commune de démence sénile. On prévoit d'ailleurs que plus de 750 000 Canadiens seront atteints de cette maladie ou d'affections connexes d'ici 2031^[15]. Cette maladie neurodégénérative se caractérise entre autres par l'apparition de plaques (dites séniles) dans certaines régions du cerveau. Le peptide β -amyloïde est l'un des constituants majoritaires des fibrilles qui composent les plaques séniles chez les patients atteints.

Il existe deux formes prédominantes du peptide $A\beta$: l'une contient 40 acides aminés ($A\beta_{40}$) et l'autre, 42 ($A\beta_{42}$). Le peptide β -amyloïde est produit lors du clivage protéolytique de la protéine APP ("*Amyloid Precursor Protein*"). Cette protéolyse a lieu chez tous les individus, mais il semble qu'elle soit plus importante chez les individus atteints.

Le fragment peptidique $A\beta_{11-25}$ qui forme *in vitro* des fibrilles amyloïdes très semblables aux fibres pathologiques, contient le coeur hydrophobe du peptide β -amyloïde (LVFFA). Cette région de $A\beta$, composée des résidus 17 à 21, jouerait un rôle majeur dans le processus de fibrillogenèse. Ce peptide constitue donc un bon modèle pour étudier le processus d'oligomérisation associé aux premières étapes de la formation des fibrilles.

Récemment, le groupe du Dr. Mousseau s'est intéressé à un fragment plus court de $A\beta$ constitué des résidus 16 à 22, $A\beta_{16-22}$ ^[39,40]. Nous avons donc poursuivi l'étude entamée en étudiant un fragment plus substantiel de $A\beta$ comportant 9 résidus de plus pour un total de quinze résidus.

Tel que mentionné au chapitre 3, des études expérimentales effectuées sur des fibres composées de peptides $A\beta_{11-25}$ ont montré que ces derniers s'assemblaient en feuillets β antiparallèles où le segment hydrophobe est en conformation étendue.

Petkova et al.^[55] ont, en plus, démontré que le registre du réseau de liaisons hydrogène¹ était dépendant du pH.

Au total, trois modèles de feuillet β antiparallèle, au registre différent, ont été proposés pour décrire l'organisation des peptides dans les fibres de $A\beta_{11-25}$: le modèle de Sikorski^[27] de registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ et les modèles de Petkova^[55] à pH physiologique (pH = 7,4) de registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ (Petkova7.4) et à faible pH (pH = 2,4) de registre $17 + k \Leftrightarrow 22 - k$ (Petkova2.4).

5.1 Énergie des modèles

Nous avons d'abord effectué un nombre de simulations ART-OPEP (dont nous parlerons plus en détails à la section 5.5) afin d'évaluer les valeurs d'énergie pour les modèles expérimentaux. Ainsi, nous avons pu comparer l'énergie des structures obtenues dans les différentes simulations effectuées (voir les prochaines sections) avec celle des structures dérivant de données expérimentales.

Les structures de plus basse énergie pour chaque modèle ont montré que le modèle de Petkova à pH 7,4 (Petkova7.4) était le plus stable et que celui de Petkova à pH faible (Petkova2.4) était le moins stable. La moins grande stabilité du modèle de Petkova2.4 peut s'expliquer par le fait qu'il présentait un nombre inférieur de liaisons hydrogène. Expérimentalement, le registre de ce modèle n'a été observé qu'à bas pH. À faible pH, cet arrangement est stabilisé par les liens hydrogène qu'il effectue avec les molécules d'eau protonnées environnantes. Toutefois, comme le solvant est implicite dans le potentiel OPEP et que le pH est neutre, cette stabilisation n'est pas possible. Dans nos simulations, cette structure s'avère donc défavorisée comparativement aux deux autres. L'énergie de Petkova2.4 avoisinait $-184,2 \text{ kcal/mol}$ tandis que celle de Sikorski et Petkova7.4 approchait respectivement $-192,0$ et $-199,0 \text{ kcal/mol}$. Toutefois, nous avons trouvé dans une

¹Dans le cas des modèles présentés dans le texte, Petkova et al.^[55] ont choisi d'identifier le registre en se basant sur le résidu 17 du peptide $A\beta$, la leucine 17. Cet acide aminé est considéré comme le premier du coeur hydrophobe. Ainsi, lorsque l'on parle d'un registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ pour $k = 0$, on a que le résidu LEU17 interagit avec le résidu PHE20 du peptide adjacent.

simulation effectuée à partir de deux dimères pré-formés (voir la section 5.3.2.3), un tétramère du registre de Sikorski qui présentait une énergie de $-197,2 \text{ kcal/mol}$. Cette différence peut être liée à de possibles imperfections dans nos structures modèles qui ont été construites en utilisant le logiciel MOLMOL^[25].

Nous reparlerons de la stabilité des structures modèles plus en détails à la section 5.5.

5.2 Structure du monomère

Avant de passer à l'étude du tétramère de $A\beta_{11-25}$, nous nous sommes attardés au monomère de ce peptide. Nous avons donc effectué quatre simulations ART-OPEP à 500 K^2 , pour un taux d'acceptation de 40 %, de 15 000 événements à partir d'un monomère $A\beta_{11-25}$ étendu et d'un monomère plus compact afin d'évaluer quelle était la conformation la plus favorable.

Nous avons observé que le peptide se trouvait essentiellement en conformation *random-coil* au cours des simulations (62,3 % de tous les événements acceptés), mais qu'il visitait néanmoins des états de plus faible énergie associés à une structure en hélice α (14,2 % des événements acceptés) et à une structure β (23,4 % des événements acceptés). L'hélice α a été définie comme une succession de cinq résidus consécutifs en conformation α et la structure β , comme une structure dont au moins six résidus étaient en conformation β selon le graphe de Ramachandran^[60]. L'énergie associée à ces structures était de $-20,5 \text{ kcal/mol}$ pour l'hélice et de $-19,1 \text{ kcal/mol}$ pour la structure β .

Nous avons ensuite évalué la stabilité des structures de basse énergie trouvées dans la première série de simulations. Au total, quatre simulations de 15 000 événements ont été effectuées à partir de deux structures de départ : une épingle β ressemblant à celle trouvée précédemment³ ($-19,0 \text{ kcal/mol}$) et une hélice α ($-20,5$

²Rappelons que la température dans les simulations ART-OPEP n'est pas une température réelle. En effet, comme nous l'avons expliqué au chapitre 3, elle est liée à l'acceptation ou au rejet des minima locaux trouvés. La température de Metropolis a été choisie suite à une série d'essais et d'erreurs.

³L'épingle utilisée comme structure initiale ici diffèrait de la structure de basse énergie trouvée

$kcal/mol$). La structure la plus stable rencontrée au cours de ces simulations s'est avérée être une épingle β dont l'énergie était de $-22,5 kcal/mol$. Cette structure a été obtenue au cours d'une simulation où la structure initiale était l'hélice α . Cette épingle contenait deux résidus en conformation β et une liaison hydrogène intramoléculaire de plus que l'épingle de $-19.1 kcal/mol$ obtenue auparavant.

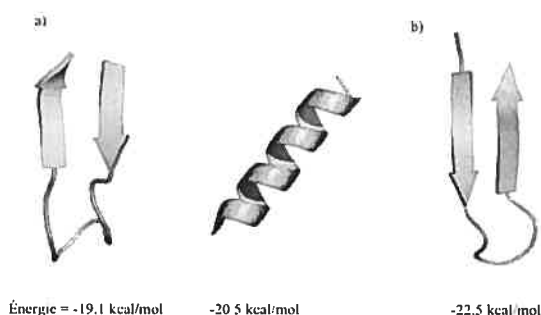


FIG. 5.1 – Structures rencontrées dans les simulations du monomère de $A\beta_{11-25}$. a) Structures de plus basse énergie rencontrées dans les simulations à partir d'une structure initiale étendue. b) Cette épingle β est la structure de plus basse énergie rencontrée.

Nous avons ainsi observé qu'il était possible de retrouver les structures en hélice α et en épingle β peu importe la structure initiale (conformation α ou β). Par contre, ces structures ne constituaient pas les états les plus peuplés, car plus de 60 % des événements acceptés au cours de ces simulations présentaient plutôt une conformation *random-coil*. Cela suggère que ces structures ne sont pas stables.

5.3 Assemblage de quatre peptides $A\beta_{11-25}$ à 500 K

Avant d'entreprendre la présentation de nos résultats pour le tétramère, nous devons clarifier certains termes que nous utiliserons se rapportant à l'organisation des peptides. D'abord, nous avons défini une structure organisée comme une

précédemment. Elle contenait 10 résidus en conformation β et 7 liens hydrogène comparativement à 8 résidus β et 6 liens hydrogène pour la structure de basse énergie. Malgré une liaison hydrogène de plus, la structure initiale présentait une énergie équivalente à celle de basse. Une contribution élevée associée à l'énergie de torsion chez la structure initiale de $-19,0 kcal/mol$ explique cette équivalence.

structure où les quatre peptides interagissent entre eux pour former un feuillet β^4 . Une structure où deux ou trois peptides interagissent pour former un feuillet β est semi-organisée tandis qu'une structure où aucun feuillet β n'est formé est dite désorganisée. Pour les structures organisées et semi-organisées, nous avons établi des distinctions. Les notions de dimère, de trimère et de tétramère s'appliquent respectivement si deux, trois et quatre peptides interagissent et forment une structure β .

Les dimères, trimères, tetramères peuvent ensuite être qualifiés d'étendus ou non. Selon le registre, si tous les acides aminés ayant la possibilité d'être impliqués dans le feuillet le sont, la structure est considérée comme étendue. Par exemple, un tétramère dont le registre des liaisons hydrogène occasionnerait un décalage entre les peptides pourrait tout de même être considéré comme étendu si tous les acides aminés identifiés par le registre interagissent entre eux. Dans le cas contraire, nous parlons de structures dimériques, trimériques ou tetramériques. Les différents types de structures sont illustrés à la figure 5.2.

Nous avons donc effectué trois séries de simulations pour tenter d'en apprendre davantage sur le processus d'oligomérisation du peptide $A\beta_{11-25}$. Une première série a été effectuée à une température de Metropolis de 500 K à partir de différentes structures initiales, aléatoires et pré-organisées, tandis que la deuxième série a été effectuée à 1000 K pour ces mêmes structures initiales. Quant à la troisième, elle visait surtout à évaluer la stabilité des trois modèles expérimentaux.

5.3.1 Assemblage à partir de structures initiales aléatoires

Pour étudier le processus d'assemblage du peptide $A\beta_{11-25}$, nous avons construit deux structures initiales où les brins, plus ou moins étendus, ont été disposés à environ 10 ou 20 Å les uns des autres. Nous qualifions ces structures initiales d'aléatoires puisqu'elles ne contiennent aucune structure pré-organisée. Elles sont

⁴Comme il a été montré que les peptides adoptaient une structure β dans les fibrilles, nous n'avons pas considéré que les peptides s'organisaient ou étaient organisés s'ils formaient des structures α .

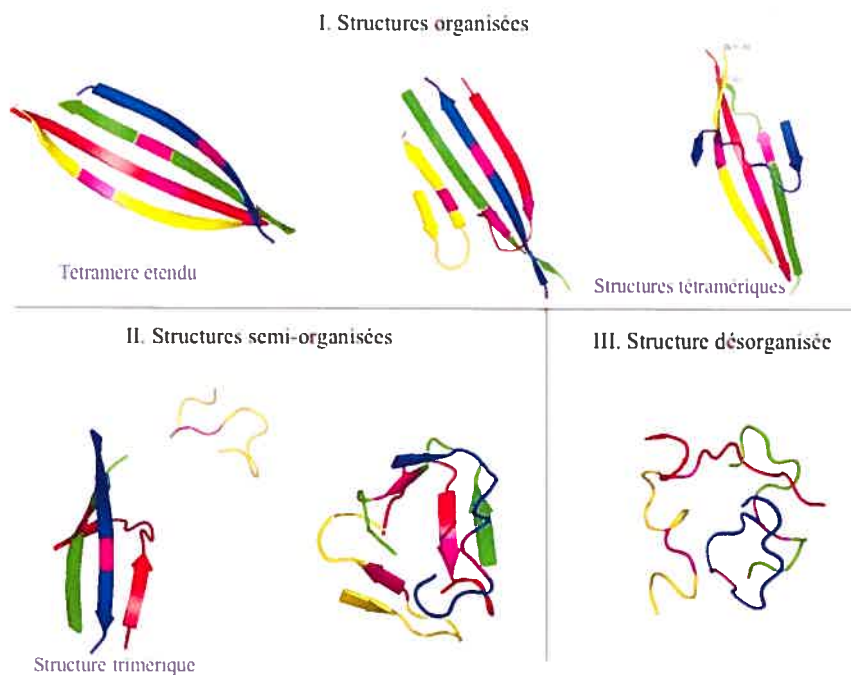


FIG. 5.2 – Représentation des types de structures auxquels nous ferons référence dans ce chapitre. Chaque couleur représente un monomère et le segment rose représente les phénylalanines du segment hydrophobe.

présentées à la figure 5.3. Nous pouvons voir que chez la structure A les brins 1 (rouge), 2 (jaune) et 4 (vert) sont placés parallèlement. Quant à la structure B, les brins 1 et 3 (bleu) sont parallèles tandis que 2 et 4 sont antiparallèles. À noter que sur toutes les représentations des structures, les phénylalanines, constituant le centre du segment hydrophobe, sont colorées en rose.

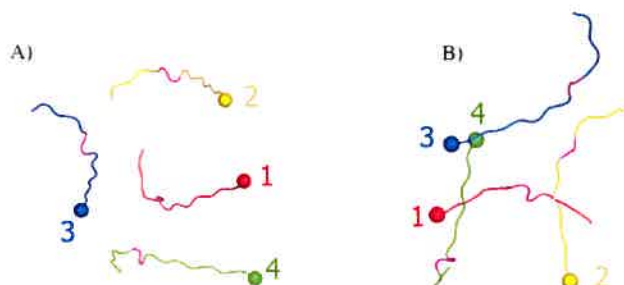


FIG. 5.3 – Deux structures initiales aléatoires utilisées.

Pour chaque structure, cinq simulations, dont le nombre d'événements variait de 10 000 à 25 000⁵, ont été effectuées à une température de Metropolis de 500 K pour un taux d'acceptation d'environ 30 %. La température a été choisie suite à une série d'essais et d'erreurs⁶.

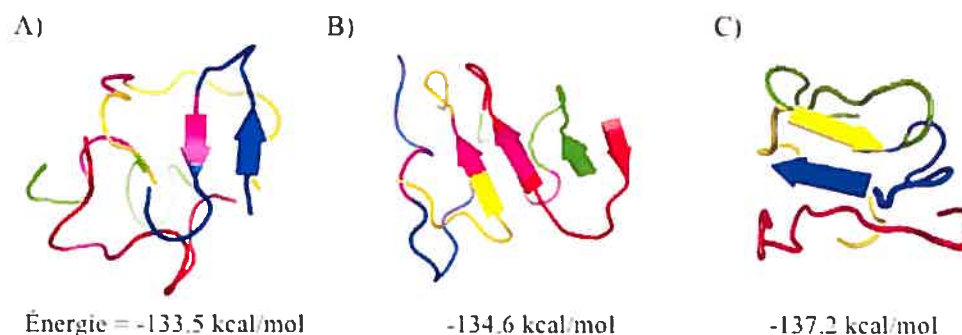


FIG. 5.4 – Structures de plus basse énergie obtenues à partir de la structure initiale aléatoire A.

Aucune des cinq simulations effectuées à partir de la structure A de la figure 5.3 n'a permis d'obtenir de structures semi-organisées ou organisées d'une énergie inférieure à -138 kcal/mol . La figure 5.4 présente les trois structures de plus basse énergie obtenues.

Pour ce qui est des simulations entreprises à partir de la structure B de la figure, elles ont toutes mené à des structures semi-organisées dont les valeurs d'énergie se situaient entre -139 et -149 kcal/mol . Les conformations de plus basse énergie, rencontrées parmi un total d'environ 88 000 structures acceptées, sont présentées à la figure 5.5. La majorité de ces arrangements comportait entre 52 et 58 % de résidus en conformation β , mais aucun n'a adopté la structure étendue pourtant énergétiquement favorisée. Nous avons tout de même constaté que les peptides s'organisaient partiellement en feuillets β antiparallèles (B sur la figure 5.5) et

⁵500 à 800 événements sont effectués par jour sur un processeur Intel Pentium4 3,2 GHz et le taux d'acceptation des événements effectués dépend de la température de Metropolis choisie.

⁶Nous avons essayé une température de 300 K (comme pour l'étude de KFFE), mais trop peu d'événements étaient acceptés à cette température. Nous avons donc testé 500 K et choisi d'effectuer nos simulations à cette température qui menait à un taux d'acceptation plus élevé

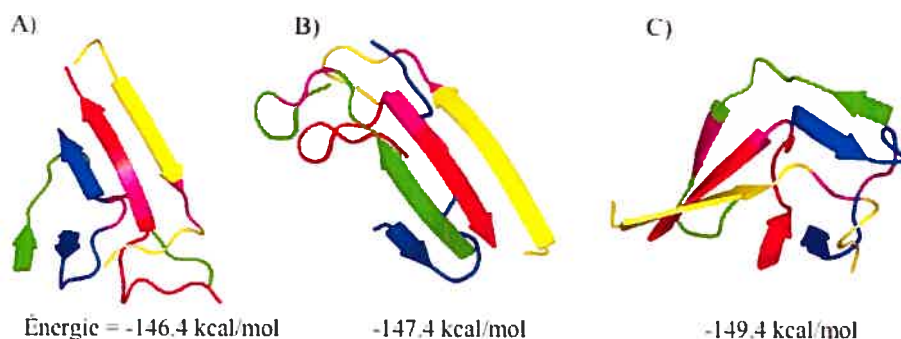


FIG. 5.5 – Structures de plus basse énergie obtenues à partir de la structure initiale aléatoire B.

mixtes (A et C sur la figure 5.5).

5.3.2 Assemblage à partir de structures pré-organisées

Compte tenu des résultats obtenus à partir des structures initiales aléatoires, nous avons regardé si la formation de structures organisées était possible à partir de structures initiales pré-organisées. En effet, nous savons d'après le modèle de nucléation-polymérisation que la formation d'une structure stable (noyau critique) constitue l'étape limitante du processus d'assemblage. Nous avons voulu vérifier si la présence d'une première structure organisée pouvait ainsi accélérer l'agrégation ou mener à la formation de cette structure stable.

Nous avons donc construit cinq structures initiales présentées à la figure 5.6. Ces structures ont toutes été construites à partir d'un dimère composé des brins 3-4 présentant le registre de liaisons hydrogène du modèle de Sikorski soit $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$. Nous avons choisi ce registre, car il conduit à un alignement parfait des extrémités des peptides, c'est-à-dire que tous les acides aminés des peptides ont un partenaire potentiel pour faire des liaisons hydrogène.

La première structure (I) consistait en un dimère antiparallèle pré-formé, flanqué de chaque côté d'un monomère perpendiculaire distant de 10 \AA . La seconde (II) s'apparentait à la première à la différence que l'un des deux brins perpendiculaires ne se trouvait pas à 10 \AA mais à 30 \AA . La troisième structure (III) était com-

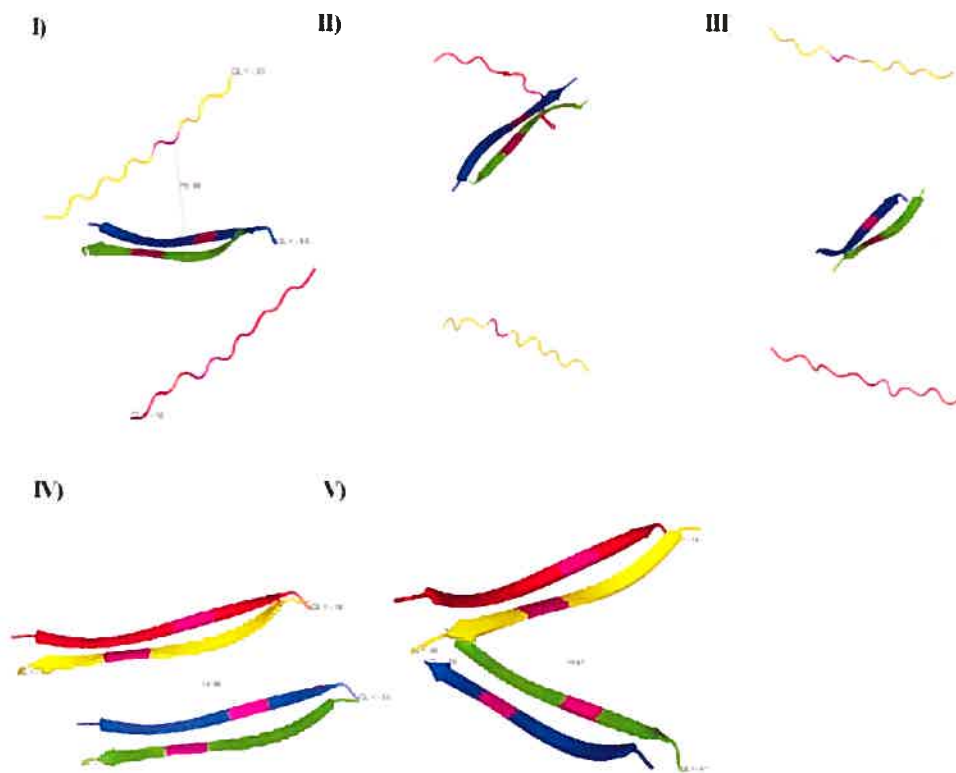


FIG. 5.6 – Structures initiales pré-organisées composées de un ou deux dimères de registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$.

parable aux deux premières, cependant, les deux monomères étaient placés à 30 Å du dimère. Quant à la quatrième et à la cinquième structure (IV et V), elles étaient composées de deux dimères pré-organisés séparés d'environ 15 Å et placés respectivement, parallèlement (IV) et orthogonalement (V).

5.3.2.1 À partir des structures I, II, III

Nous avons effectué une quinzaine de simulations, variant de 10 000 à 25 000 événements à partir des structures initiales I, II et III.

Dans les simulations exécutées à partir de la structure I, nous avons noté qu'après 10 000 événements, les simulations n'avaient pas convergé (c'est-à-dire que l'énergie continuait de diminuer et que les structures continuaient à évoluer)

quoique la majorité ait conduit à la formation de structures trimériques (1/5) et tétramériques (3/5). L'énergie des structures les plus stables observées dans les simulations de 10 000 événements variait de -147,6 à -158,4 *kcal/mol*. Un trimère presque étendu (A sur la figure 5.7) ainsi que deux structures tétramériques, l'une mixte (B sur la figure 5.7) et l'autre antiparallèle (C sur la figure 5.7), constituaient les structures de plus faible énergie observées en moins de 10 000 événements.

Nous avons prolongé deux des trois simulations ayant mené à des structures tétramériques pour vérifier s'il était possible pour ces structures d'atteindre une énergie approchant celle des modèles expérimentaux.

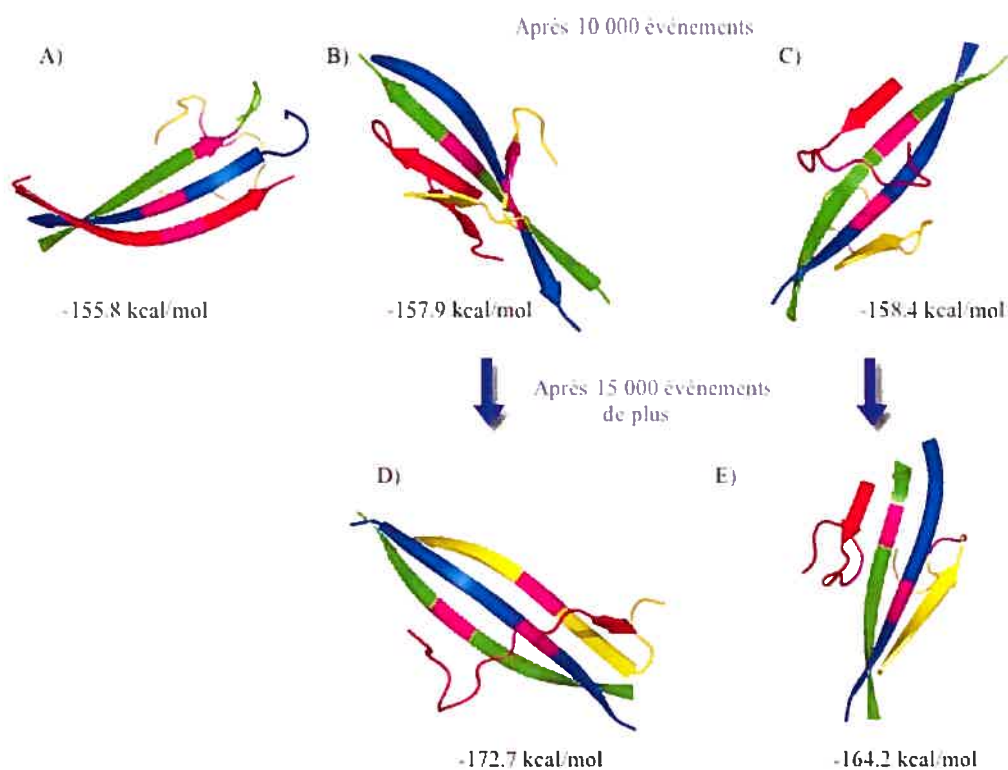


FIG. 5.7 – Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale I. A) Trimère presque entièrement étendu. B) et C) Structures de plus basse énergie obtenue après 10 000 événements. D) La simulation ayant mené à la structure B a été prolongée et un trimère étendu de basse énergie a été formé. E) La simulation de la structure C prolongée a mené à une structure tétramérique antiparallèle.

Les simulations ayant conduit aux structures B et C (sur la figure 5.7) ont donc

été prolongées pour un total de 25 000 événements par simulation. Nous avons noté que les brins avaient tendance à vouloir s'étendre le long du dimère dans les simulations plus longues. Ainsi, nous pouvons voir à la figure 5.7 qu'en continuant la simulation ayant mené à la formation du tétramère mixte (B \rightarrow D sur la figure), le brin extérieur 2 antiparallèle (jaune) s'est placé pour augmenter le nombre de liaisons hydrogène qu'il faisait avec le dimère 3-4 tandis que le brin extérieur 1 parallèle (rouge) s'est repositionné afin d'adopter une orientation antiparallèle au dimère. La structure ainsi formée avait une énergie de $-172,7 \text{ kcal/mol}$.

Le prolongement de la simulation liée à la structure tétramérique antiparallèle (C \rightarrow E sur la figure) a, quant à lui, permis à l'un des brins extérieurs (jaune) de s'étendre pour former deux ponts hydrogène supplémentaires. L'arrangement ainsi formé avait une énergie de $-164,2 \text{ kcal/mol}$.

Donc en partant de la structure I, trois simulations parmi cinq ont conduit à la formation de structures tétramériques. La quatrième a, pour sa part, mené à la formation d'un trimère presque étendu tandis que les monomères n'ont pas interagi avec le dimère pour former une structure β dans la cinquième. De plus, en prolongeant les simulations, nous avons constaté que les brins avaient tendance à essayer de s'étendre le long du dimère afin de diminuer leur énergie, mais qu'ils n'y parvenaient pas totalement. Même après 25 000 événements, les simulations prolongées n'ont pas conduit à la formation de structures aussi stables que les structures modèles. Elles ont tout de même montré que les structures continuaient d'évoluer vers des états plus organisés. Considérant le nombre d'arrangements possibles que peuvent adopter quatre peptides de quinze résidus, 25 000 événements ne semblent pas suffisants pour converger vers les états les plus stables.

Dans les cas où les peptides se trouvaient à 10 et à 30 Å du dimère pré-formé (II), nous avons observé, en moins de 1000 événements, la formation de structures trimériques. Certaines de ces structures ont ensuite mené à la formation de trimères étendus (B de la figure 5.8) et à la formation de structures tétramériques de basse énergie (A de la figure 5.8). Notons que la structure B est stabilisée par les interactions hydrogène intramoléculaires que fait le monomère n'interagissant pas avec

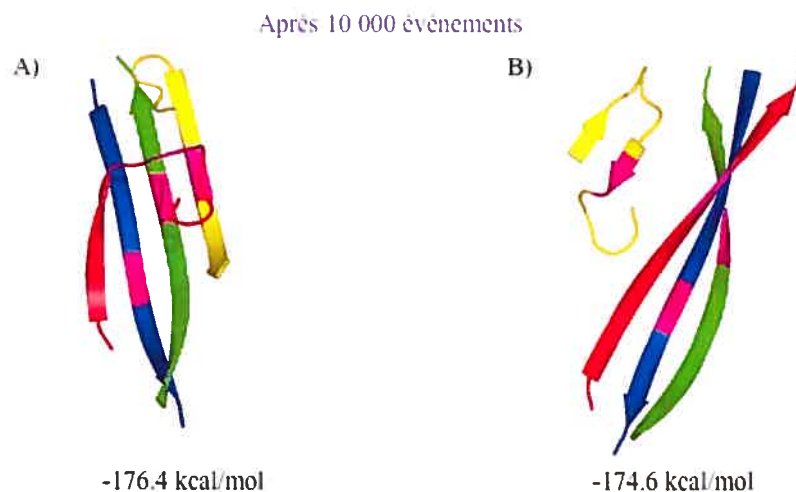


FIG. 5.8 – Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale II en moins de 10 000 événements. A) Structure tétramérique. B) Trimère étendu.

le trimère. L'énergie des structures les plus stables observées dans ces simulations variait de $-145,5$ à $-176,4 \text{ kcal/mol}$.

Ainsi à partir de la structure II, trois simulations sur cinq ont conduit à des structures tétramériques en passant par l'assemblage d'une structure trimérique (formée du monomère distant de 10 \AA et du dimère) suivi de l'ajout du deuxième monomère.

Lorsque les deux monomères se trouvaient à 30 \AA du dimère (structure III), nous avons constaté qu'en 10 000 événements, dans trois des cinq simulations, l'un des deux brins éloignés ne rejoignait pas le dimère. Dans ces cas, un seul brin a pu s'organiser de façon plus ou moins étendue avec le dimère pour former des structures semi-organisées trimériques dont l'énergie variait de $-131,9$ à $-162,5 \text{ kcal/mol}$. Dans le cas de la structure à $-162,5 \text{ kcal/mol}$, un des monomères éloignés formait une épingle β ; dans les autres cas, les monomères étaient en *random-coil*. Comme 10 000 événements semblaient insuffisants pour amener les brins à interagir ensemble, deux des cinq simulations ont été prolongées.

Les structures de plus basse énergie de l'ensemble de ces simulations sont présentées à la figure 5.9. Nous pouvons voir que des structures trimériques an-

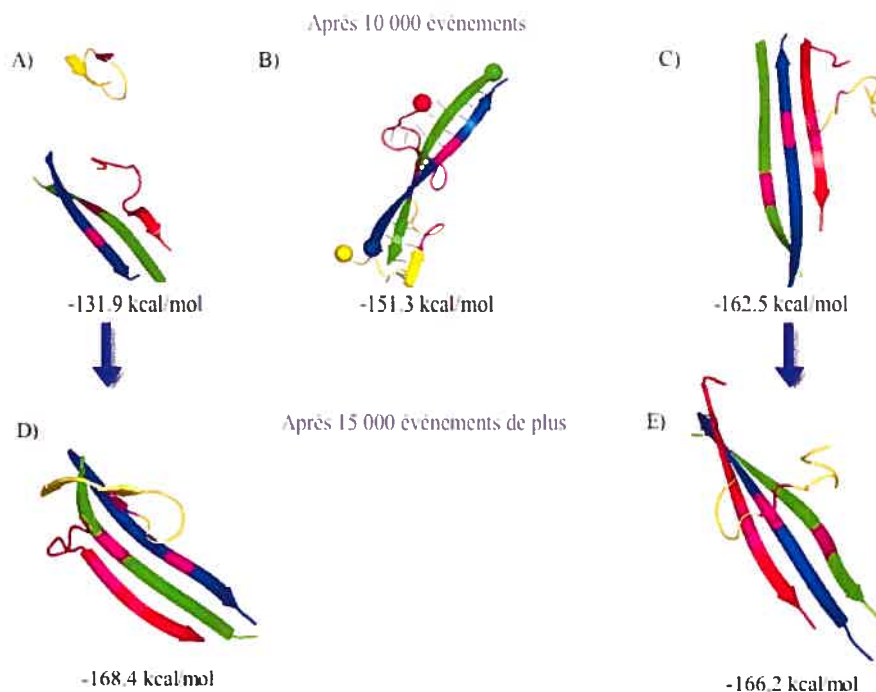


FIG. 5.9 – Structures de plus faible énergie obtenues à partir de la structure initiale III. A) et D) Après 15 000 événements additionnels, le monomère jaune s'est rapproché du trimère et commençait à s'organiser avec la structure trimérique. B) Structure tétramérique rencontrée en moins de 10 000 événements. Malgré le fait que les résidus des brins 1 et 2 ne présentent pas toutes les caractéristiques propres aux structures β telles que calculées par le programme DSSP du logiciel de visualisation PYMOL, ils forment néanmoins des liaisons hydrogène avec la structure existante tel qu'on peut le voir sur la figure. Les liens hydrogène ainsi que les extrémité N-terminale des peptides ont été rajoutées sur la figure. C) et E) Le prolongement de la simulation n'a pas permis au brin jaune de s'organiser avec le trimère.

tiparallèles ont été formées dans les 10 000 premiers événements. La structure C présente même un trimère plus ou moins étendu.

Malgré le prolongement des deux simulations, le deuxième monomère n'a pas réussi à s'organiser avec la structure trimérique (voir A→D et C→E sur la figure). Par contre, nous avons noté que dans la simulation A→D, le deuxième monomère s'est tout de même rapproché de la structure trimérique. Nous avons aussi observé que le monomère 1 (brin rouge de la structure A) s'est étendu le long du dimère. Ces deux phénomènes ont permis de minimiser l'énergie de la structure A à -172,7

kcal/mol. Pour ce qui est de la structure tétramérique B, elle a été formée en moins de 10 000 événements.

Ainsi, de façon générale pour la structure III, il semble que les monomères étaient trop éloignés du dimère pour interagir tous les deux avec lui dans le nombre total d'événements effectués. Mais nous avons tout de même observé la formation de structures trimériques stables dont un trimère presque étendu.

En résumé, nous avons observé dans cette première partie des simulations mettant en jeu des structures pré-organisées que la présence d'un dimère pré-formé facilitait l'assemblage de structures organisées trimériques et tétramériques. Aussi, nous avons remarqué la facilité avec laquelle les structures trimériques étendues ont été formées par rapport aux tétramères ce qui nous pousse à nous questionner sur l'importance de cette structure. Toutefois, même après un nombre important d'événements, les simulations prolongées ont montré que les structures continuaient d'évoluer vers des états plus organisés ce qui indique que plus d'événements acceptés sont nécessaires pour observer la convergence des simulations et établir si la formation du tétramère étendu survient.

5.3.2.2 Exemple d'un mécanisme de formation d'une structure organisée à partir de la structure II

Nous avons ensuite analysé les mécanismes d'assemblage observés dans les différentes simulations à partir des structures I, II et III. Nous avons d'abord noté que le mécanisme d'assemblage des peptides était moins dynamique que ce à quoi nous nous attendions. La figure 5.10 présente l'analyse de l'une des simulations effectuées à partir de la structure initiale II. Cette simulation a conduit à la structure de plus basse énergie parmi toutes les structures stables. Ainsi, nous retrouvons le graphe d'énergie, de la distance bout-à-bout, de l'orientation des brins et de l'évolution du nombre des liens hydrogène comme c'était le cas au chapitre 4 pour l'analyse des trajectoires de KFFE.

Trois nouvelles analyses ont été ajoutées aux précédentes : la proportion de résidus en conformation α , β et *random-coil* ainsi que l'évolution des nouveaux liens

hydrogènes formés et l'évolution des liens hydrogène formés entre les monomères. Tous ces graphes sont fonction du nombre d'événements acceptés. La proportion de résidus dans certaines conformations a été évaluée en se référant aux régions permises du graphe de Ramachandran^[60].

Dans le contexte de l'évolution des nouveaux liens hydrogène, un lien a été défini comme nouveau s'il ne se trouvait pas dans la structure initiale et s'il n'avait pas déjà été formé préalablement dans la simulation. Cette valeur permet d'avoir une idée du dynamisme de la simulation.

Nous voyons, tout d'abord, sur le graphe présentant l'énergie en fonction du numéro de l'événement accepté (A) que l'énergie du système diminue tout au long de la simulation. Cela se produit parallèlement à une augmentation du pourcentage de résidus en conformation β (C) qui fluctue autour de 70 % à la fin de la simulation, et à une augmentation du nombre de ponts hydrogène intermoléculaires (E). L'énergie diminue donc parallèlement à l'organisation des brins en structure β .

Les graphes de l'orientation des brins (G), de la distance bout-à-bout (B) et des liens entre les monomères (D) nous permettent d'avoir une idée plus précise des événements clés survenus durant la simulation. D'abord, l'orientation entre les brins 3 et 4, leur distance bout-à-bout ainsi que le nombre de liens hydrogène qu'ils

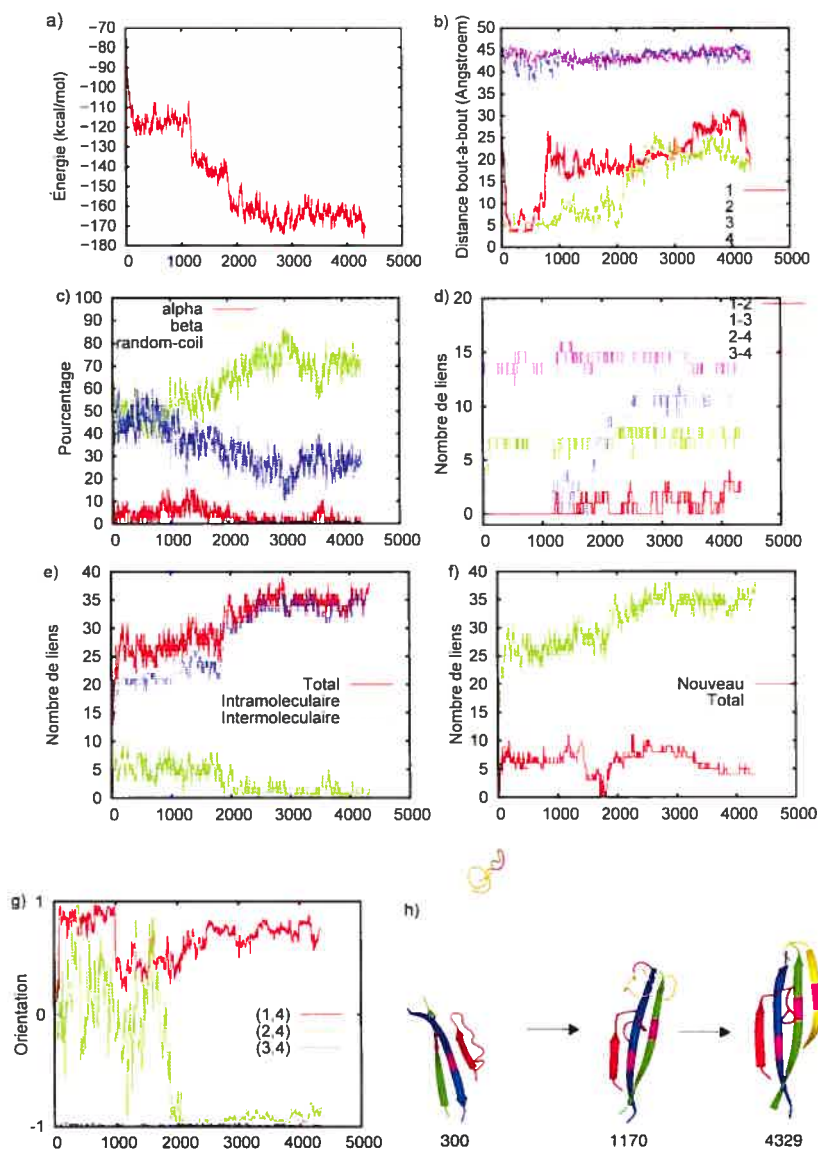


FIG. 5.10 – Graphes d'analyse de la simulation ayant conduit à la structure de plus basse énergie. Les graphes d'énergie (a), de distance bout-à-bout des monomères (b), la conformation des résidus (c), le nombre de liens hydrogène entre les monomères (d), le nombre de liens hydrogènes total, intermoléculaires et intramoléculaires (e), le nombre de nouveaux liens hydrogène (f) et l'orientation des monomères (g) sont présentés en fonction du nombre d'événements acceptés.

effectuent varient peu au cours de la simulation. Cela indique que le dimère 3-4 reste bien formé tout au long de la simulation.

Nous pouvons ensuite voir que le brin 1 rejoint le dimère en moins de 200 événements pour interagir de façon antiparallèle avec lui. En effet, le monomère 1 devient très rapidement parallèle au brin 4 du dimère, donc antiparallèle au brin 3, et établit sept liaisons hydrogène avec le monomère 3 du dimère ce qui correspond à une première minimisation de l'énergie. Au départ, le brin 1 n'est pas étendu tel que le montre sa distance bout-à-bout après l'événement 110. Toutefois, la valeur de sa distance bout-à-bout augmente vers l'événement 700 indiquant que les deux extrémités du peptide sont plus éloignées et que le brin s'est plus étendu.

Le graphe de l'énergie montre qu'une autre stabilisation a eu lieu vers l'événement 2000. Cette stabilisation est liée à l'interaction du brin 2 avec la structure trimérique présente. En effet, nous constatons que la distance bout-à-bout du brin 2 a augmenté et que ce dernier a commencé à établir des liens hydrogène avec le brin 4. Nous pouvons aussi voir que le brin 2 a adopté une orientation antiparallèle au brin 4. À partir de cet événement, le nombre de liens hydrogène intramoléculaires a diminué au profit des liens intermoléculaires et la proportion de résidus en conformation β s'est accrue. L'organisation du dernier monomère avec les autres permet de diminuer l'énergie du système à $-176,4 \text{ kcal/mol}$. Ainsi, les deux peptides en sont venus à interagir avec le dimère pré-formé. Toutefois, la présence de liaisons hydrogène entre ces deux brins ainsi que leur distance bout-à-bout qui n'atteint pas 45 \AA signifient que les monomères ne sont pas totalement étendus au côté du dimère.

Le graphe qui présente l'évolution des nouveaux liens hydrogène en fonction du nombre d'événements acceptés (F) montrent très bien la formation des nouveaux liens associés à l'interaction des brins 1 et 2 avec le dimère 3-4 aux événements 110 et 2000. Il montre aussi qu'en fin de simulations, peu de nouveaux liens étaient formés. Il est donc difficile d'évaluer si un deuxième prolongement de la simulation permettrait de converger vers un état de plus basse énergie comparable à celui des modèles expérimentaux.

5.3.2.3 À partir des structures IV, V

Nous avons ensuite évalué si la présence de deux dimères antiparallèles préformés pouvait mener à la formation d'un tétramère étendu. Nous avons effectué huit simulations de 10 000 événements à partir des structures IV et V à basse température. Sur ces huit, trois ont mené à la formation de tétramères antiparallèles, où le registre des liens hydrogène entre les dimères était $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ (correspondant au modèle de Sikorski), et mixtes. L'énergie des tétramères formés se situait entre -184,9 et -197,2 *kcal/mol* où l'énergie la plus haute était associée au tétramère mixte. Le tétramère antiparallèle était donc le plus stable. Les autres simulations ont conduit à la formation de structures comme celle présentée en A de la figure 5.11, c'est-à-dire à la formation de structures où les dimères n'étaient pas correctement positionnés.

Ainsi, la formation du tétramère étendu a été observée à partir de structures initiales composées de deux dimères. Cependant, comme pour les simulations effectuées en partant des structures I, II et III, peu de dynamisme a été relevé une fois les premières liaisons hydrogène formées.



FIG. 5.11 – Structures de plus basse énergie obtenues dans les simulations ART-OPEP à partir de structures initiales pré-organisées IV et V. A) Les deux dimères n'interagissent pas de manière appropriée à la formation du tétramère étendu. B) Tétramère mixte. C) Tétramère antiparallèle de registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ entre les deux dimères.

5.4 Assemblage du tétramère à 1000 K

Puisqu'un manque de dynamisme a été remarqué dans la plupart voire toutes les simulations et que le nombre d'événements atteint ne semblait pas suffisant pour observer la convergence vers des états totalement organisés, nous avons augmenté la température de Metropolis à 1000 K afin d'augmenter le nombre d'événements acceptés par simulation.

TAB. 5.1 – Taux d'acceptation selon la température de Metropolis et la structure initiale étudiée.

Structures	Taux d'acceptation	
	500 K	1000 K
Aléatoire	28 %	52 %
I	29 %	51 %
II	29 %	50 %
III	30 %	52 %
IV	24 %	42 %
V	24 %	41 %

Nous avons opté pour cette température, car elle nous permettait de presque doubler le nombre d'événements acceptés pour les simulations partant des structures initiales mentionnées précédemment(5.1). Ainsi à 1000 K, environ 50 % de tous les événements effectués étaient acceptés. Rappelons que la température de Metropolis n'est pas une température réelle car les contributions entropiques ne sont pas incluses dans la méthode ART.

Comme le montre le graphe 5.12 qui présente, pour une structure aléatoire, la distribution du déplacement des atomes relié aux événements ART de plusieurs simulations, la température affecte principalement le taux d'acceptation et non la façon qu'a la méthode ART d'explorer la surface d'énergie. Le graphe A de la figure démontre que la méthode échantillonne la surface d'énergie de la même façon peu importe la température. En effet, la distribution des déplacements est similaire, c'est-à-dire que la majorité des déplacements effectués lors d'événements ART ont

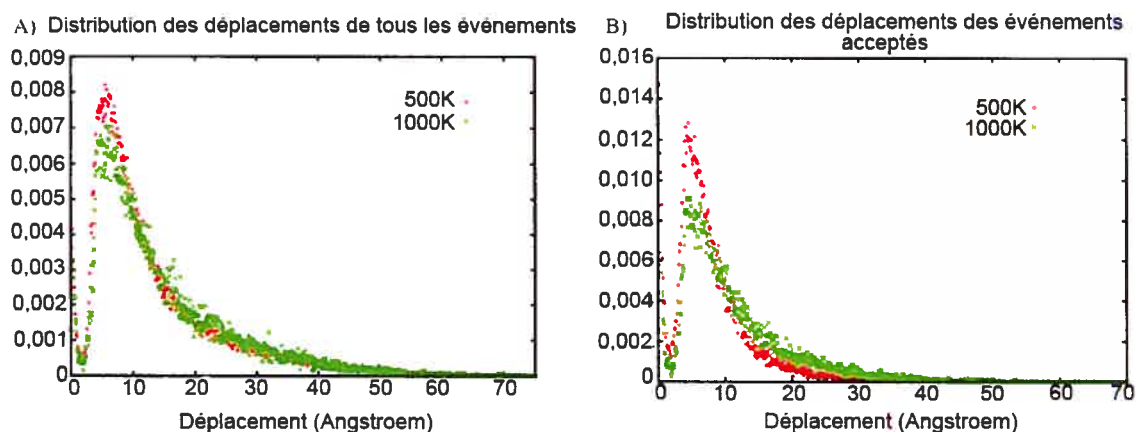


FIG. 5.12 – Distribution des déplacements, en Å effectués lors des événements ART. A) Distribution des déplacements de la totalité des événements effectués à partir de la structure aléatoire B à 500 K et 1000 K. B) Distribution des déplacements effectués lors des événements acceptés effectués à partir de la structure aléatoire B à 500 K et 1000 K.

une valeur d'environ 5,5 Å . Quant au graphe B, il montre que la proportion des événements acceptés associés à un déplacement supérieur à 10 Å est plus faible lorsque la température est de 500 K. À 1000 K, plus d'événements reliés à une grande déformation des peptides sont acceptés. Ainsi, augmenter la température affecte peu la méthode d'échantillonnage de la technique ART elle-même.

5.4.1 À partir de structures aléatoires

Nous avons effectué dix simulations de 10 000 événements à partir des deux structures aléatoires présentées à la section 5.3.1 pour un taux d'acceptation approchant 52 %. Une seule simulation, à partir de la structure initiale aléatoire B (voir la figure 5.3), a conduit à une structure organisée tétramérique dont l'énergie était de $-145,3 \text{ kcal/mol}$. Cette structure comportait vingt-cinq liens hydrogènes intermoléculaires ce qui est inférieur aux structures de basse énergie rencontrées à 500 K et 58 % de résidus β ce qui est équivalent. Les quatre autres simulations ont conduit à la formation de structures compactes d'énergie plus élevée que celle attribuée aux modèles expérimentaux présentés en début de chapitre. La figure 5.13 présente un exemple de l'évolution de l'énergie totale en fonction des événements

acceptés pour deux simulations : l'une effectuée à 1000 K où il y a formation d'une structure compacte et l'autre, à 500 K où il y a formation d'une structure semi-organisée.

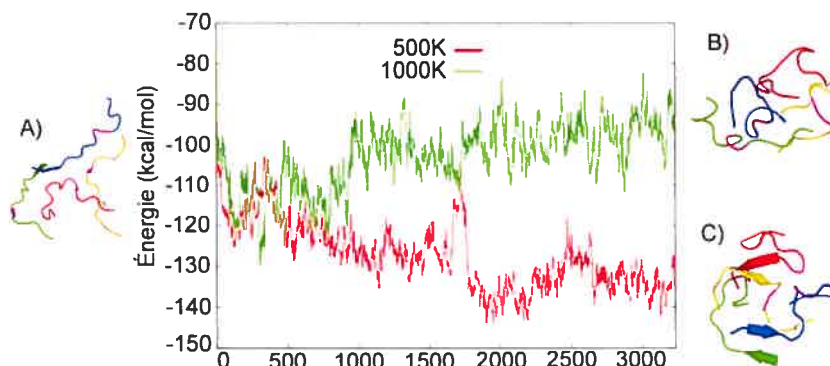


FIG. 5.13 – Évolution de l'énergie de deux simulations effectuées à partir de la structure aléatoire B à basse (500 K) et à haute (1000 K) température pour un taux d'acceptation respectif de 28 et 52 % .

L'évolution de l'énergie totale montre qu'à haute température, il y a une augmentation de l'énergie, ce qui n'était pas le cas à basse température où l'énergie diminue tout au long de la simulation. Un écart de $22,6 \text{ kcal/mol}$ sépare les dernières structures acceptées dans chacune des simulations. À 1000 K, cette augmentation d'énergie correspond à la formation d'une structure désordonnée.

La formation de structures compactes dans quatre simulations sur cinq à haute température (lorsque le taux d'acceptation est plus élevé) laisse envisager que peu de chemins conduisent aux structures organisées au niveau de la surface d'énergie de ce système. Il faut toutefois rappeler que ART ne tient pas compte de la hauteur des barrières d'énergie. Ainsi quoique ces trajectoires soient physiquement possibles, nous n'avons aucun moyen de savoir si elles sont reliées aux mécanismes d'agrégation réels.

5.4.2 À partir de structures pré-organisées

Nous avons ensuite effectué quinze simulations de 10 000 à 25 000 événements à partir des cinq structures pré-organisées dont le taux d'acceptation variait entre 40 et 50 % selon la structure initiale.

Le même type de structures désordonnées a été observé dans six des quinze simulations à partir des structures I, II et III. De plus, dans chaque cas, ce type de structures a été associé à une déstabilisation du dimère pré-formé. Dans les autres simulations, la dernière structure acceptée était soit en train de se désassembler (7/15) et n'a pas été comptabilisée comme désorganisée soit une structure stable (2/15).

La figure 5.14 présente des clichés tirés de certaines simulations effectuées à 1000 K. En A, nous pouvons constater que le dimère pré-formé 3-4 s'est désorganisé et qu'un nouveau dimère 1-3 s'est assemblé. En fin de simulation, le dimère 1-3 semblait en train de se désassembler. Cette simulation effectuée à partir de la structure initiale I fait partie des quatre simulations n'ayant pas été comptabilisées comme menant à une structure compacte. Quant aux clichés de B, aussi tirés d'une simulation à partir de la structure I, ils exposent clairement le phénomène de désorganisation du dimère pré-formé 3-4 menant à la formation d'une structure désorganisée, dans ce cas-ci, de $-88,9 \text{ kcal/mol}$.

Les clichés de C proviennent, pour leur part, de l'une des deux simulations ayant conduit à un trimère étendu stable. Cette simulation a été effectuée à partir de la structure III. Tout comme à 500 K, un premier brin interagissait avec le dimère pour former une structure trimérique. Ce brin s'est partiellement étendu au fil des événements acceptés. Parallèlement, le second monomère s'est rapproché mais n'a pu interagir avec la structure dans le nombre d'événements effectués.

Pour ce qui est des structures initiales IV et V, la formation du tétramère a été observée dans trois simulations parmi huit (et les tétramères formés étaient toujours présents après 10 000 événements). Nous retrouvons ici le même rapport de formation de structures étendues qu'à basse température.

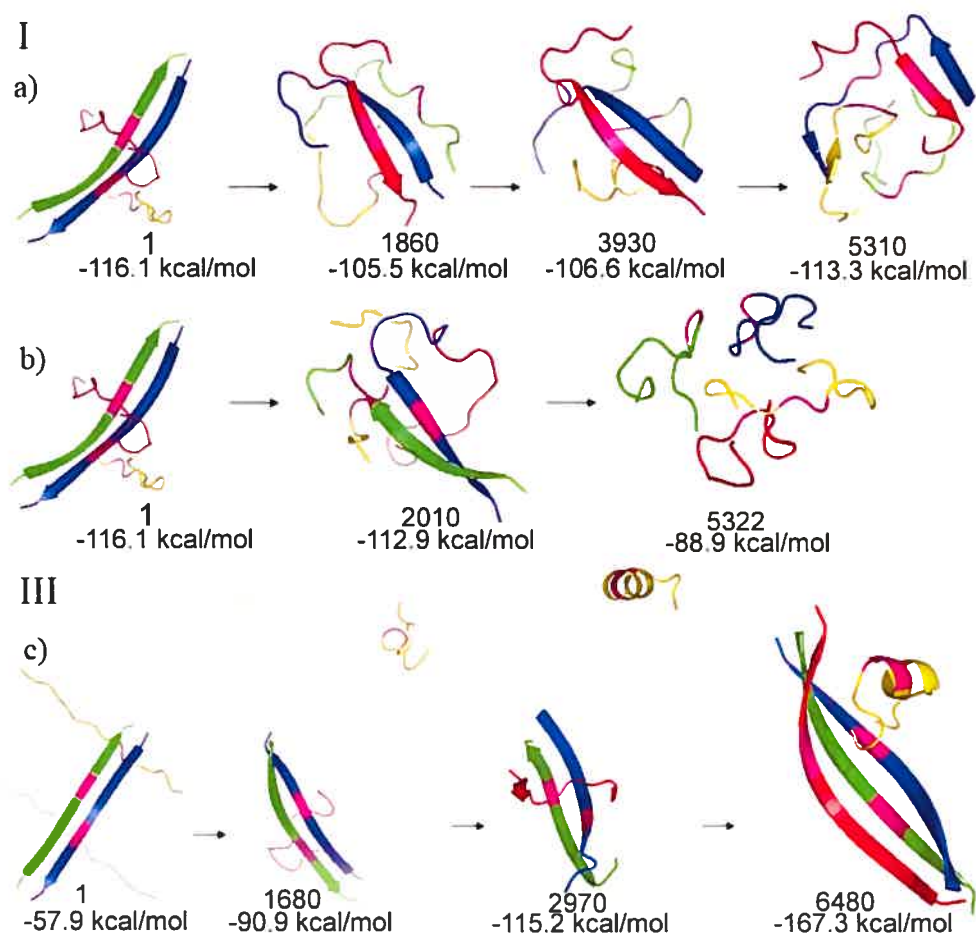


FIG. 5.14 – Clichés des trajectoires ART-OPEP effectuées à 1000 K à partir des structures pré-organisées I, II, III. Les clichés de A) et B) ont été obtenus à partir de la structure initiale I tandis que ceux de C) ont été obtenus à partir de la structure initiale III.

Cependant, les simulations étant plus dynamiques aucune structure n'est restée prise dans un arrangement semblable à la structure A de la figure 5.11 ; les brins arrivaient à se réarranger pour former le tétramère étendu ou ils se désorganisaient partiellement. Les structures qui n'étaient donc pas des tétramères étendus étaient plutôt des tétramères se désorganisant. Les structures de plus basse énergie observées avaient une énergie de $-192,7$ et $-194,3$ kcal/mol. De plus, les simulations à 1000 K se sont révélées plus dynamiques qu'à basse température et un changement

de registre des liens hydrogène a même été observé dans l'une des simulations : les brins extérieurs du tétramère passant d'un registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ à un registre $17 + k \Leftrightarrow 21 - k$. Ce dernier registre est celui conduisant au meilleur alignement du segment hydrophobe. L'ensemble des résultats obtenus à partir des structures initiales double dimère suggère que l'assemblage de deux dimères n'est pas suffisant pour assurer la formation d'un tétramère étendu à 1000 K.

5.5 Stabilité des modèles expérimentaux par ART-OPEP

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, nous avons ensuite évalué la stabilité des structures modèles à haute et à basse température.

Au total, nous avons effectué 6 simulations de 10 000 événements à une température de Metropolis de 1500 K pour un taux d'acceptation moyen de 57 %. Dans ces conditions, le modèle de Petkova à pH 2,4 s'est avéré le moins stable, menant à une conformation déstabilisée compacte en moins de 5000 événements. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette structure contenait moins de liaisons hydrogène que les autres modèles.

Quant aux tétramères antiparallèles de Sikorski et de Petkova à pH 7,4, nous avons observé que le modèle de Sikorski était moins stable que celui de Petkova ; la structure du premier se désorganisant dans les deux simulations effectuées ce qui n'était pas le cas pour celle de Petkova7.4 ; cette dernière était toujours conservée après 10 000 événements.

Nous avons ensuite entrepris des simulations à basse température à partir des modèles de Sikorski, de Petkova2.4 et de Petkova7.4. Deux de quatre simulations effectuées à une température de Metropolis de 500 K pour un taux d'acceptation de 25 %, à partir de la structure de Sikorski, nous ont permis d'observer le début d'un mouvement de reptation de l'un des brins extérieurs par rapport aux brins intérieurs. Le brin extérieur semblait glisser par rapport au brin intérieur pour provoquer un changement de registre permettant à la structure de minimiser momentanément son énergie.

Ce mouvement a aussi été remarqué à une température de 1000 K dans toutes les simulations pour cette structure et dans toutes celles pour la structure de Petkova2.4 (nous avons aussi observé un tel mouvement dans l'une des simulations effectuée à partir de la structure pré-organisée V comme nous l'avons mentionné plus tôt). Notons que le registre adopté dans chaque cas variait. Ainsi, les registres $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ et $17 + k \Leftrightarrow 21 - k$ ont été adoptés respectivement 3/4 et 1/4 fois. La figure 5.15 illustre ce mouvement en présentant des clichés d'un tétramère où un brin passe du registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ au registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$. Les graphes de l'énergie totale, de l'évolution des nouveaux liens hydrogène et du registre entre chaque monomère sont présentés et permettent de suivre l'évolution de la structure. Nous pouvons voir que l'énergie associée à la structure et le nombre de liaisons hydrogène fluctuent respectivement autour de -185 kcal/mol et de 44. En début de simulation, les monomères 3-4 adoptent un registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ qui sera par contre perturbé vers l'événement 600 (voir d sur la figure 5.15). Cette perturbation coïncide avec la formation de nouveaux liens hydrogènes. Ces derniers se brisent avant l'événement 2200 tandis que de nouveaux liens se forment suite autour de l'événement 2800. Ces derniers correspondent aux liens caractéristiques du nouveau registre observé entre les brins 3 et 4. Un minimum énergétique de $-193,3 \text{ kcal/mol}$ est observé à l'événement 4385. Le nombre de nouveaux liens hydrogène diminue à la fin de la simulation, mais le nombre total de liens reste relativement stable indiquant que les nouveaux brins ayant été formés se brisent et se reforment sans que de nouveaux liens ne soient formés. Quoique ce mouvement soit possible et ait été noté plusieurs fois dans nos simulations, le graphe de l'énergie montre qu'il n'est pas la source d'une stabilisation significative pour le tétramère.

Dans le cas des simulations effectuées à partir du modèle de Petkova7.4, aucun mouvement de reptation n'a été observé pour cette structure.

Du point de vue énergétique, les structures de plus basse énergie rencontrées à 500 K pour les modèles de Sikorski et de Petkova7.4 étaient respectivement de $-192,0 \text{ kcal/mol}$ et de $-199,0 \text{ kcal/mol}$ tel que mentionné à la section 5.1. Toutefois, un tétramère du registre de Sikorski de $-197,2 \text{ kcal/mol}$ a été obtenu à partir de

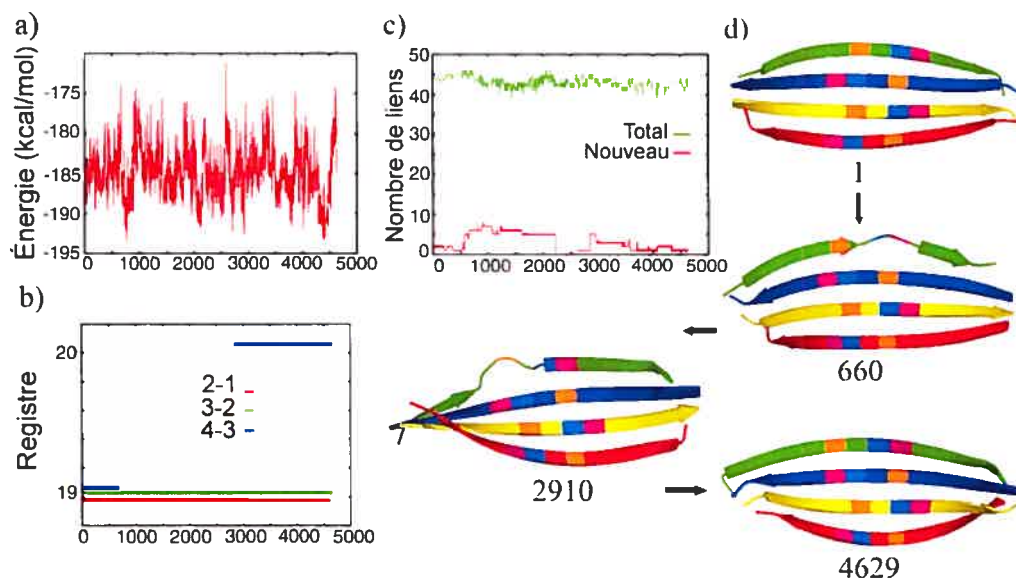


FIG. 5.15 – Changement de registre observé au cours d’une simulation effectuée à partir du tétramère de Sirkoski à 500 K. Les graphes de l’énergie (a), du registre entre les monomères (b) et du nombre de nouveaux liens hydrogène (c) sont présentés en fonction du nombre d’événements acceptés. Des clichés de la trajectoire ART-OPEP obtenue sont présentés en (d). Sur les structures, la leucine est représentée en orange, et les phénylalanines en fushia et bleu.

deux dimères à la section 5.3.2.3. Cette différence est possiblement due à des imperfections dans la structure modèle de Sikorski que nous avons utilisée. Néanmoins, les structures de basse énergie des deux modèles ($-197,2$ et $-199,0$ $kcal/mol$) semblent indiquer que leur stabilité est similaire.

Nous avons ensuite évalué le détail de l’énergie associée aux structures de plus basse énergie des deux modèles les plus stables. Nous avons noté que la principale différence entre les deux structures se situait au niveau de leur énergie hydrophobe. Une différence d’environ 4 $kcal/mol$ favorisait la structure de Petkova7.4 par rapport à celle de Sikorski.

Cet écart pourrait être lié à la différence de registre des tétramères. Il semble que le registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ soit plus favorable que le registre $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$. Cela peut être attribué au fait que le coeur hydrophobe est mieux aligné dans le registre de Petkova7.4 que dans celui de Sikorski. Nos résultats semblent donc

indiquer que les registres $17 + k \Leftrightarrow 19 - k$ et $17 + k \Leftrightarrow 22 - k$ sont moins favorables que le registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$. Ceci pourrait être lié au meilleur alignement du coeur hydrophobe auquel conduit ce dernier.



FIG. 5.16 – Alignement du coeur hydrophobe du fragment $A\beta_{11-25}$ dans les modèles de a) Sikorski et b) Petkova à pH 7,4.

Aucun des auteurs^[27,55] ayant présenté les modèles n'a pu expliquer les raisons menant au registre particulier qu'il a observé expérimentalement. Du point de vue de l'hydrophobicité des chaînes latérales, le registre $17 + k \Leftrightarrow 21 - k$ constituerait le meilleur choix, car il conduit à un alignement parfait du segment hydrophobe. Cependant, ce registre n'a pas été observé dans les conditions expérimentales que les auteurs ont utilisées. Petkova et al.^[55] ont suggéré que le registre ne dépendait pas seulement des forces hydrophobes, mais qu'il était le reflet de l'équilibre entre les forces hydrophobes, les interactions électrostatiques dépendantes du pH et les interactions de Van der Waals.

Nos résultats montrent toutefois qu'en l'absence de l'effet du pH, le registre $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ du modèle Petkova^{7.4} semble le plus stable des trois.

5.6 Déstabilisation du tétramère de Sikorski par simulation ART-OPEP

Nous avons caractérisé en détails le mécanisme de formation des structures compactes. Nous avons noté que, dans la plupart des cas, la déstabilisation est associée à une flexibilité des extrémités des peptides ou/et à un réarrangement des brins extérieurs. Nous présentons ici l'analyse d'une simulation partant d'un tétramère de Sikorski et aboutissant à une structure compacte.

Les graphes de la figure 5.17 présentent l'évolution de l'énergie totale et hydrophobe (D), la distance bout-à-bout (E) et l'évolution du nombre de liens hydrogène total (C) et entre les monomères (A) en fonction des événements acceptés.

Ces graphes montrent que le processus de déstabilisation est caractérisé par une réduction du nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires se produisant d'abord entre les brins 1 et 2. Une diminution de l'énergie hydrophobe et de la distance bout-à-bout des monomères est aussi observée parallèlement à une augmentation de l'énergie totale.

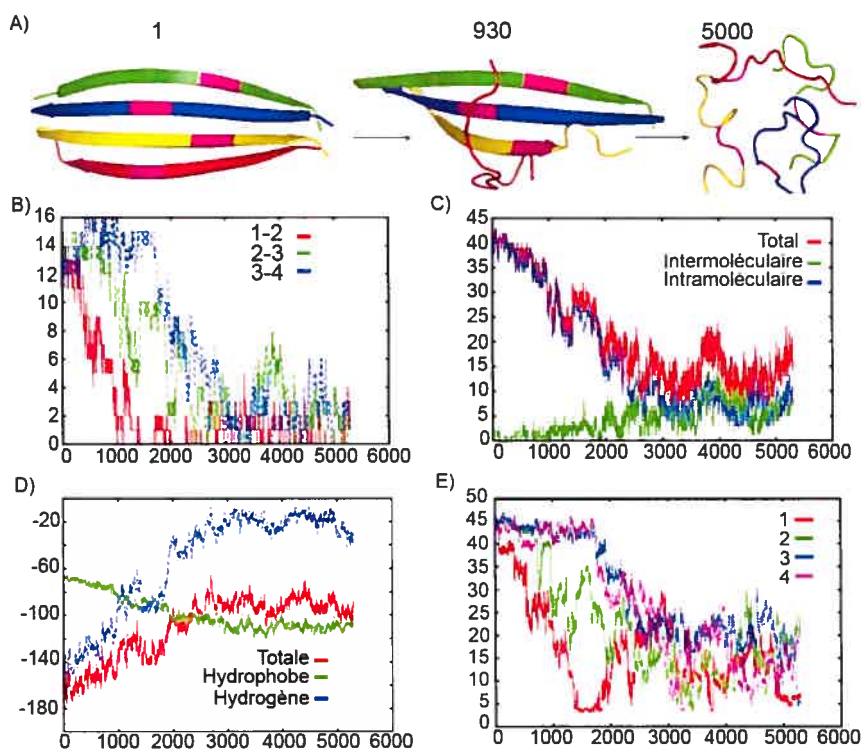


FIG. 5.17 – Analyse d'une simulation de déstabilisation. A) Clichés de la trajectoire de désorganisation du tétramère de Sikorski. Le tétramère étendu est déstabilisé et forme une structure désorganisée (événement 5000) lorsque le taux d'acceptation était de 57 %. Les graphes du nombre de liens hydrogène entre les monomères (B), du nombre de liens hydrogène total, intermoléculaires et intramoléculaires (C), de l'énergie totale, hydrophobe et reliée aux liens hydrogène (D) et de la distance bout-à-bout des monomères (E) sont présentés en fonction des événements acceptés

Dans la majorité des cas où elles ont été observées, ces structures compactes étaient caractérisées par une énergie hydrophobe faible, par un petit nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires et par une distance bout-à-bout inférieure à 25 Å . De plus, la plupart de leurs résidus était en conformation *random-coil*.

Ainsi, lorsque plus d'événements étaient acceptés, les structures organisées dérivait rapidement vers la formation de structures compactes. Avec un plus haut taux d'acceptation, nous acceptons plus souvent des minima locaux dont l'énergie est supérieure à l'énergie du minimum précédent dans la trajectoire. Dans le cas de l'assemblage de structures compactes, cela indique qu'il existe un nombre très important de chemins conduisant à ces structures et que l'on se dirige vers leur formation assez facilement.

5.6.1 Évaluation de la stabilité du modèle expérimental de Sikorski par simulation de dynamique moléculaire

Compte tenu des résultats obtenus par les simulations ART-OPEP, nous avons évalué la stabilité du tétramère de Sikorski par une simulation de dynamique moléculaire à une température de 330 K pendant 20 nanosecondes. Pour effectuer

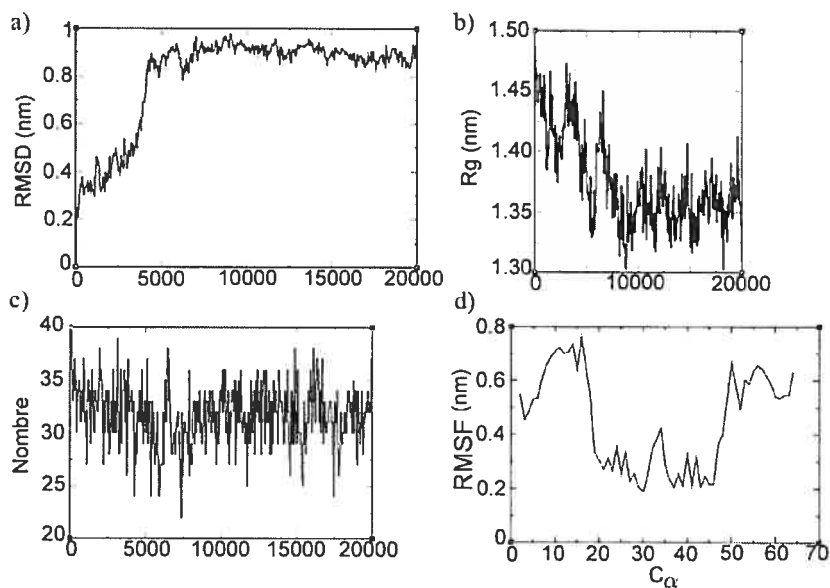


FIG. 5.18 – Analyse de la trajectoire de dynamique moléculaire de 20 ns effectuée à partir de la structure modèle de Sikorski à 330 K. A) Graphe du RMSD en fonction de l'évolution de la simulation. B) Le rayon de gyration en fonction de l'évolution de la simulation. C) Le RMSF (RMS fluctuations) en fonction de l'identité des carbones α . Les premiers C_α des chaînes 1, 2, 3 et 4 sont respectivement numérotés 2, 18, 34 et 48.

la dynamique, nous avons utilisé le programme GROMACS^[4,16] à pH neutre avec le potentiel d'énergie tout-atomes GROMOS96^[61]. Nous avons suivi un protocole où les structures ont d'abord été solvatées dans une boîte octaédrique contenant 12 056 molécules d'eau où huit ions Na^+ ont été ajoutés afin de neutraliser le système. Les simulations ont été effectuées à pression constante (1 atm) et la longueur des liens a été contrainte par l'algorithme SHAKE^[44]. Le pas de dynamique était de 2 femtosecondes et la méthode " *Particle Mesh Ewald*^[28]" a été utilisée.

Nos résultats montre que la structure s'éloigne de la structure initiale au début de la simulation. En effet, durant les premiers 5 ns, le RMSD entre la structure initiale et les structures de la trajectoire de dynamique moléculaire (figure 5.18 a) augmente de façon constante jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur près de 10 Å . La valeur du RMSD fluctue ensuite autour de 10 Å pour les 15 ns suivant. Toutefois, l'évolution de la structure se poursuit après les premiers 5 ns comme en témoigne le graphe du rayon de gyration⁷(b). Ce dernier varie pendant encore 5 ns avant de se stabiliser. Quant au nombre de liaisons hydrogène entre les atomes de la chaîne principale (c), il se maintient autour de 31 tout au long de la simulation. Aussi, comme le montre le graphe du RMSF (d), de petites fluctuations sont associées aux carbones α des brins extérieurs et des extrémités. La structure de Sikorski reste donc stable durant les 20 ns de la simulation, même si les extrémités des peptides ne sont plus conservées dans la structure (figure 5.19). Ceci est semblable aux premières étapes de la déstabilisation observée dans les simulations ART-OPEP. Cependant, cette déformation pourrait aussi être associée à la torsion naturelle à laquelle est soumis la structure sans qu'aucune déstabilisation ne soit en cause (comme semble indiquer l'évolution du RMSD).

⁷Le rayon de gyration est calculé en faisant la moyenne de la distance de chaque atome au centre de masse (où chaque contribution à la moyenne est pondérée selon la masse de l'atome en cause)

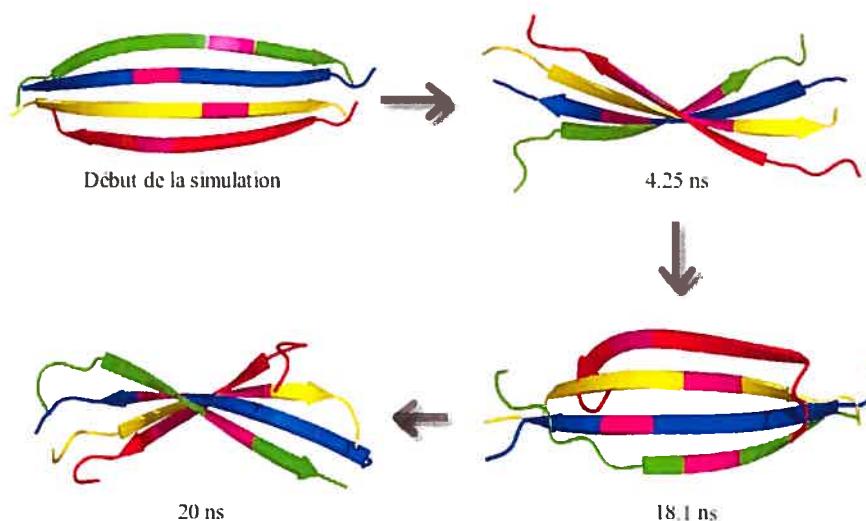


FIG. 5.19 – Clichés de la trajectoire de dynamique moléculaire de 20 ns effectuée à partir de la structure modèle de Sikorski à 330 K

5.7 Qu'apprenons-nous de l'étude du tétramère de A β_{11-25} ?

Tout d'abord, notons que c'est la première fois qu'un tétramère du peptide A β_{11-25} est étudié numériquement. En effet, la soixantaine de résidus du système constitue un défi pour les méthodes numériques (autant pour ART-OPEP que pour GROMACS) compte tenu des ressources disponibles. Tel que nous l'avons mentionné à quelques reprises dans ce chapitre, un grand nombre d'événements a été effectué (menant à des états plus ou moins organisés) sans que nous observions une convergence dans les simulations. Pour un système de soixante résidus comme celui du tétramère, deux mois ont été nécessaires, sur un processeur Intel Pentium4 3,2 GHz, pour atteindre 25 000 événements. Ceci explique pourquoi nous n'avons pas prolongé toutes les simulations. Toutefois, il faut noter que deux mois est aussi la durée ayant été nécessaire pour obtenir les vingt nanosecondes de dynamique moléculaire (avec GROMACS) sur le même type de processeur. Par contre, même sans avoir convergé, les trajectoires ART-OPEP obtenues nous ont permis d'en apprendre davantage sur le tétramère.

Ainsi, notre étude à basse température de Metropolis, a montré qu'il était

plutôt difficile de former des structures organisées en partant de structures initiales aléatoires. En effet, à faible taux d'acceptation, nous avons uniquement relevé la formation de structures semi-organisées présentant une énergie relativement plus élevée (environ 50 *kcal/mol*) que celle des modèles expérimentaux. De plus, les arrangements semi-organisés formés semblaient pris dans une même "région" de la surface d'énergie, c'est-à-dire que l'aspect global de la structure une fois partiellement organisée changeait peu.

La présence d'une première structure organisée dans la structure initiale a clairement facilité la formation de structures tétramériques. Plusieurs groupes de recherches^[10,67] ont étudié l'agrégation des peptides en utilisant des structures pré-organisées fixes et/ou en imposant des contraintes sur l'attraction entre les peptides. Contrairement à ces études, les deux monomères impliqués dans le dimère pré-assemblé de notre structure initiale n'étaient pas contraints d'interagir pendant les simulations. Les trois structures initiales utilisées (I, II, III) nous ont permis d'observer que la formation de structures trimériques (parfois étendues) précédait souvent la formation de structures tétramériques stables. Nous avons noté que les trimères se formaient plus facilement que les tétramères et avons rencontré six trimères étendus parmi les quinze simulations effectuées à partir des structures pré-organisées. Toutefois, il est difficile d'évaluer si l'importance du trimère est biologique ou liée à la technique. Étudier la structure trimérique en utilisant d'autres approches numériques pourrait nous aider à établir cela.

À plus haute température, nous avons remarqué que la majorité des simulations effectuées à partir de structures initiales aléatoires menait à la formation de structures compactes désordonnées caractérisées par une énergie hydrophobe faible, par peu de liaisons hydrogène intermoléculaires et par une énergie totale élevée. De la même façon, une grande partie des simulations effectuées à partir des structures pré-organisées a conduit à ce même type de structures. Dans le cas du dimère pré-formé, l'assemblage en ces structures était relié à une déstabilisation du dimère initial.

Aussi, nos résultats concernant la formation des intermédiaires compacts suggè-

rent que la surface d'énergie du système étudié est complexe et qu'il existe peu de chemins conduisant aux structures stables comparativement au nombre d'arrangements possibles de plus haute énergie. Cette représentation de la surface d'énergie s'accorde avec les résultats expérimentaux de Kim et al.^[30] et avec les résultats numériques de Wu et al.^[66,67] et de Nguyen et al.^[8] qui ont tous relevé l'importance des structures compactes désordonnées dans le processus d'agrégation. Kim et al. ont montré, en effectuant des études de FRET ("*Fluorescence Energy Transfer*") *in vitro* à partir du peptide A β_{11-25} qu'en faible concentration, l'agrégation du peptide n'était pas favorisée et que ce dernier adoptait plutôt une conformation compacte de type micellaire tandis qu'à concentration plus élevée, le processus d'agrégation s'enclenchait. Numériquement, deux autres groupes ont observé l'importance des structures désordonnées dans leurs simulations. Nguyen et al.^[8] ont observé par DMD avec un potentiel d'énergie simplifié que la formation des structures amorphes précédait systématiquement l'agrégation. Les 48 peptides polyalanines de leur simulation passaient ainsi un certain temps en conformation désorganisée jusqu'à ce que ces derniers s'orientent adéquatement pour interagir et former le noyau critique. Wu et al.^[66] avancent pour leur part, en se basant sur des études de dynamique moléculaire du peptide NFGAIL que la dissociation des structures compactes amorphes constituerait l'étape limitante du processus d'initiation de l'agrégation. Ils suggèrent que les interactions hydrophobes jouent un rôle particulier en début de processus en défavorisant la formation d'agrégats organisés.

Nos résultats rejoignent donc ce que d'autres ont observé par différentes méthodes numériques. Nous avons en effet noté dans plusieurs simulations qu'une fois en conformation compacte, les peptides n'avaient pas tendance à s'arranger de manière à former des structures β organisées. Aussi, nous avons constaté, pour le nombre d'événements effectués, que la formation de structures organisées stables à partir de peptides disposés aléatoirement n'était pas favorisée tandis qu'elle était possible lorsque un ou deux dimères étaient présents. Ceci implique que la formation d'une première structure organisée (n'étant pas nécessairement le noyau critique) peut aussi être considérée comme une étape défavorable du début du processus

d'agrégation.

L'étude complète concernant la stabilité des modèles expérimentaux a permis de montrer que le modèle de Petkova7.4 semble le plus stable des trois modèles proposés dans la littérature^[27,55]. Ce modèle est cependant à peine plus stable que celui de Sikorski. La différence dans l'énergie hydrophobe de ces structures ainsi que l'observation d'un mouvement de reptation changeant le registre des liens hydrogène dans les structures de Sikorski et de Petkova2.4 nous laissent supposer que le registre de liaisons hydrogène $17 + k \Leftrightarrow 20 - k$ est le plus stable des trois registres proposés selon le potentiel OPEP.

Des mouvements de reptation avaient aussi été relevés par Wei et al.^[35] et Santini et al.^[39,40] précédemment. Wei et al. ont révélé, suite à des simulations ART-OPEP, que ce mouvement constituait, pour un petit peptide donné, un mécanisme de repliement possible en épingle β . Quant à Santini et al., ils ont observé que les mouvements de reptation étaient fréquents dans l'assemblage du dimère et du trimère du peptide $A\beta_{16-22}$.

En résumé, les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du tétramère de $A\beta_{11-25}$ nous ont permis de suggérer qu'il n'est pas favorable pour les quatre peptides de s'agréger et de réduire leur entropie lorsqu'aucune autre structure organisée n'est présente. Ces derniers, à plus haute température, semblent préférer s'assembler en une structure compacte désordonnée. Quoique ne révélant rien de l'arrangement peptidique dans les fibrilles, ces structures intermédiaires désordonnées ne sont pas dépourvues d'intérêt. En effet, des oligomères de type amorphe, globulaire et annulaire^[3] ont été observés expérimentalement. Ces structures auraient un rôle toxique à jouer dans la mort cellulaire associée aux amyloïdoses. L'une des hypothèses existantes stipule que les intermédiaires annulaires contribueraient à la perméabilisation des membranes cellulaires en agissant comme des pores^[9].

Aussi, les nombreuses possibilités d'arrangement, la complexité de la surface d'énergie et le nombre d'atomes impliqués dans le tétramère de $A\beta_{11-25}$ en ont fait un système complexe à étudier qui a mis en évidence certaines limites de la méthode et des ressources disponibles.

Ainsi comme les températures de Metropolis utilisées dans nos simulations ont été choisies de façon plus ou moins subjective (essai-erreur)⁸, il serait nécessaire d'approfondir l'étude en effectuant des simulations supplémentaires à des températures variées comprises entre 500 K et 1000 K. Cela permettrait de caractériser plus en détails la surface d'énergie associée au système et de confirmer la bonne paramétrisation. Des simulations à 750 K sont d'ailleurs présentement effectuées par un membre de notre groupe afin d'évaluer s'il est plus facile de converger à cette température.

De plus, quoique plusieurs études^[38,39,41,54] aient montré que les mécanismes trouvés par simulation ART-OPEP correspondaient à ceux observés par d'autres méthodes numériques, il serait intéressant d'utiliser la technique d'activation-relaxation avec un potentiel différent pour valider nos résultats et essayer d'en apprendre davantage sur la formation des fibrilles. Par exemple, l'utilisation d'un potentiel où le solvant est traité explicitement permettrait de mieux détailler l'effet du pH sur la formation des fibrilles.

Aussi, comme ART-OPEP a été utilisé par le passé avec de petit système (contenant peu de résidus), il serait nécessaire de valider nos résultats par d'autres méthodes numériques afin d'évaluer l'efficacité de notre méthodologie pour de plus gros systèmes.

Enfin, nous avons mentionné au chapitre 2 que le fait que ART ne tienne pas compte de la hauteur des barrières d'énergie pouvait s'avérer un avantage dans certains cas. En effet, cela permet à la méthode de proposer plusieurs mécanismes possibles. Cependant, il n'est pas possible d'évaluer lequel des mécanismes proposés est le plus probable. Contrairement aux études précédentes où relativement peu d'arrangements était possible, quatre peptides de quinze résidus génèrent un nombre important de possibilités. Ainsi, on peut supposer que plusieurs mécanismes peuvent mener aux structures plus organisées et que, dans ce cas, il serait utile d'identifier les plus plausibles.

⁸La température de 500 K a été choisie suite à une série d'essais et d'erreurs et celle de 1000 K a été choisie pour doubler le taux d'acceptation observé à 500 K

En terminant, suite à notre étude, nous pouvons soulever quelques points qui mériteraient d'être approfondis (en plus de tester différentes températures de Metropolis incluses entre 500 K et 1000 K). Tout d'abord, il serait intéressant d'examiner, malgré le nombre d'atomes plus élevés, les mécanismes de formation de l'hexamère du peptide $A\beta_{11-25}$. La structure trimérique ayant été aisément assemblée dans plusieurs simulations, nous pouvons nous demander quel serait son rôle dans la formation d'un hexamère. De plus, comme la composante hydrophobe semble importante dans la formation des structures compactes, il serait intéressant d'effectuer des mutations dans le segment hydrophobe afin d'évaluer leur effet au niveau des processus d'assemblage.

CONCLUSION

Les fibrilles amyloïdes sont reconnues pour leur implication dans un nombre important de maladies (amyloïdoses) incluant la maladie d'Alzheimer. Ces structures, difficiles à étudier expérimentalement ont longtemps été associées à la toxicité observée dans les amyloïdoses, mais de récentes études ont remis leur implication en doute. L'effet toxique observé serait plutôt ou principalement lié aux oligomères solubles formés dans les premières étapes de la fibrillogénèse. L'objectif de ce mémoire était d'effectuer une étude détaillée des mécanismes d'assemblage de peptides amyloïdes en utilisant la technique d'activation-relaxation, développée par Normand Mousseau, afin d'en apprendre davantage sur les mécanismes de formation des oligomères et des fibrilles.

Pour répondre à notre objectif, nous avons d'abord étudié les mécanismes d'assemblage de quatre térapeptides synthétiques de séquence KFFE. Ce petit peptide est capable de former des fibres *in vitro* similaires aux fibres pathologiques. Comme il a été révélé qu'une large classe de protéines diversifiées avait la capacité de former des fibrilles, il a été suggéré que des mécanismes généraux puissent gouverner la formation de ces dernières. Dans un tel cas, l'étude du tétramère de KFFE est très avantageuse, car elle permet d'en apprendre davantage sur la formation des fibrilles en un temps de simulation raisonnable. Trois séries de simulations ont été effectuées dans cette partie du projet : la première consistait en une trentaine de simulations ART-OPEP à 300 K à partir d'un arrangement initial aléatoire de quatre peptides, la seconde impliquait aussi des simulations ART-OPEP, mais effectuées à partir d'une structure initiale où les phénylalanines de la séquence peptidique ont été mutées par une proline et une glycine tandis que la troisième série de simulations faisait intervenir deux simulations de dynamique moléculaire tout-atome en solvant explicite afin d'évaluer la stabilité d'un feuillet β antiparallèle modèle proposé dans la littérature^[22].

Ensuite, nous avons étudié les mécanismes d'agrégation d'un tétramère du peptide $A\beta_{11-25}$. L'intérêt d'étudier ce peptide, aussi capable de former des fibrilles *in*

vitro, réside dans le fait qu'il est un fragment composé des acides aminés 11 à 25 du plus gros peptide β -amyloïde relié à la maladie d'Alzheimer. Ici aussi, nous avons entrepris trois séries de simulations pour tenter d'en apprendre davantage sur les processus d'oligomérisation et de fibrillogénèse. Une première série a été effectuée à 500 K à partir de différentes structures initiales, aléatoires et pré-organisées, tandis que la deuxième série a été effectuée à 1000 K pour ces mêmes structures initiales. Quant à la troisième, elle visait surtout à évaluer la stabilité de trois modèles expérimentaux proposés dans la littérature^[27,55].

Les résultats que nous avons obtenus, tant pour le peptide KFFE que pour le peptide $A\beta_{11-25}$, étaient les premiers résultats concernant l'assemblage de ces peptides en tétramère. Nos résultats ont montré que la technique d'activation-relaxation est une méthode alternative pour étudier les phénomènes d'agrégation des peptides.

L'étude du peptide de KFFE a démontré que le mécanisme d'oligomérisation est un processus d'addition séquentielle de peptides. Plusieurs mécanismes d'agrégation différents ont été observés dans les différentes simulations, mais tous avaient la particularité de privilégier une addition séquentielle de monomères.

Enfin, l'étude concernant le peptide $A\beta_{11-25}$ a mis en lumière l'importance des oligomères désordonnés. Un certain nombre de résultats expérimentaux suggère que ce type d'oligomères serait particulièrement nocif pour les cellules. L'étude du tétramère de $A\beta_{11-25}$ a aussi exposé certaines des limites de la méthode. En effet, le choix d'une température de Metropolis adéquate s'est révélé difficile tandis que le nombre d'événements quotidiens générés s'est révélé insuffisant pour permettre une exploration efficace de la surface d'énergie en moins de quelques mois.

Comme le but ultime de l'étude concernant les fibrilles amyloïdes, entreprise par le groupe du Dr. Mousseau, vise à approfondir les connaissances liées à ces structures afin de permettre la conception rationnelle d'inhibiteurs capables de lutter contre les différentes maladies liées au fibrilles, la prochaine étape du projet serait d'étudier les mécanismes d'action des inhibiteurs déjà identifiés. IA β 5p^[5,34], liant le peptide β -amyloïde, est l'un de ces composés prometteurs. Il a été démontré

expérimentalement que ce composé ralentissait la formation des fibrilles, mais son processus d'inhibition n'est pas connu et le complexe formé n'est pas résolu. Il serait donc primordial de comprendre comment fonctionne cet inhibiteur et à quel niveau il interagit avec les structures amyloïdes. Cela pourrait être tenté par des simulations ART-OPEP. Une fois les mécanismes d'action dégagés et la structure du complexe élucidée, la recherche, dans des bases de données, de composés aux propriétés similaires pourra être envisagée, permettant ainsi de réellement orienter la conception de médicaments permettant de lutter contre les amyloïdoses. La combinaison des résultats expérimentaux et numériques permet d'espérer un réel développement dans ce domaine.

D'ailleurs, il est fort probable que de plus en plus d'études unissant l'effort expérimental aux méthodes numériques seront effectuées avec succès dans les années à venir. Les innombrables données biologiques maintenant disponibles ont tout avantage à être étudiées numériquement maintenant que les progrès au niveau des ressources informatiques permettent de traiter des problèmes de plus en plus complexes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Kuo YM. Emmerling MR. Vigo-Pelfrey C. Kasunic TC. Kirkpatrick JB. Murdoch GH. Ball MJ. Roher AE. Water-soluble abeta (n-40, n-42) oligomers in normal and alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.*, 271(8) :4077–81, 1996.
- [2] Carlson HA. McCammon AJ. Accommodating protein flexibility in computational drug. *Molecular Pharmacology*, 57 :213–218, 2000.
- [3] Zhu M. Han S. Zhou F. Carter SA. Fink AL. Annular oligomeric amyloid intermediates observed by *in-situ* amf. *J. Biol. Chem.*, page manuscript M400004200, 2004.
- [4] Van der Spoel D. Van Drunen R. Berendsen HJC. Gromacs : A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.*, 91 :43–56, 1995.
- [5] Adessi C. Forssard MJ Boissard C. Fraga S. Bieler S. Ruckle T. Vilbois F. Robinson SM. Mutter M. Banks WA. Soto C. Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of alzheimer's diseases. *J. Biol. Chem.*, 278 :13905–13911, 2003.
- [6] Permanne B. Adessi C. Saborio GP. Fraga S. Forssard MJ. Van Dorpe J. Dewachter I. Banks WA. Van Leuven F. Soto C. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J.*, 16(8) :860–862, 2002.
- [7] Kaye R. Head E. Thompson JL. McIntire TM. Milton SC. Cotman CW. Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300 :486–489, 2003.
- [8] Nguyen HD. Hall CK. Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 101(46) :16180–16185, 2004.

- [9] Stefani M. Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity : new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.*, 81 :678-699, 2003.
- [10] Klimov DK. Thirumalai D. Dissecting the assembly of $\alpha\beta$ 16-22 amyloid peptides into antiparallel β sheets. *Structure*, 1 :295-307, 2003.
- [11] Bitan G. Kirkitadze MD. Lomakin A. Vollers SS. Benedek GB. Teplow DB. Amyloid β -protein ($\alpha\beta$) assembly : $A\beta$ 40 and $\alpha\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 100(1) :330-335, 2003.
- [12] Bitan G. Teplow DB. Rapid photochemical cross-linking- a new tool for studies of metastable, amyloidogenic protein assemblies. *Acc Chem Res.*, 37 :357-364, 2004.
- [13] Kirkitadze MD. Bitan G. Teplow DB. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders : The emerging role of oligomeric assemblies. *J. Neuro. Res.*, 69 :567-577, 2002.
- [14] Rapaport DC. Molecular dynamics study of a polymer chain in solution. *J. Chem. Phys.*, 71 :3299-3303, 1979.
- [15] Groupe de travail de l'Étude canadienne sur la santé et le vieillissement. Méthodes d'étude et prévalence de la démence. *Journal de l'Association médicale canadienne*, 150 :899-913, 1994.
- [16] Lindahl E. Hess B. Van der Spoel D. Gromacs 3.0 : A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, 7 :306-317, 1995.
- [17] Hartley DM. Walsh DM. Ye CP. Diehl T. Vasquez S. Vassilev PM. Teplow DB. Selkoe DJ. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 19(20) :8876-8884, 1999.
- [18] Azriel R. Grazit E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 276 :34156-34161, 2001.

- [19] Mousseau N. Barkema GT. Traveling through potential energy landscapes of disordered materials : The activation-relaxation technique. *Physical Review*, 57 :2419, 1998.
- [20] Urbanc B. Cruz L. Buldyrev SV. Bitan F. Teplow DB. Stanley HE. *In silico* study of amyloid β -protein folding and oligomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 101(50) :17345–17350, 2004.
- [21] Ikeda K. Higo J. Free-energy landscape of a chameleon sequence in explicit water and its inherent a/b bifacial property. *Protein Sci.*, 12 :2542–2548, 2003.
- [22] Tjernberg L. Hosia W. Bark N. Thyberg J. Johansson J. Charge attraction and β propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. *J. Biol. Chem.*, 277(45) :43243–43246, 2002.
- [23] Allinger NL. Chen K. Lii JH. An improved force field (mm4) for saturated hydrocarbons. *J. Comp. Chem.*, 17 :642–668, 1996.
- [24] Plotkin SS. Onuchic JN. Understanding protein folding with energy landscape theory, part i : Basic concepts. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2) :111–167, 2002.
- [25] Koradi R. Billeter M. Wthrich K. Molmol : a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graphics*, 14 :51–55, 1996.
- [26] Lanczos. *Applied Analysis*. Dover, New York, 1988.
- [27] Sikorski P. Atkins EDT. Serpell LC. Structure and texture of fibrous crystals formed by alzheimer's $\alpha\beta$ (11-25) peptide fragment. *Structure*, 11 :915–926, 2003.
- [28] Essman U. Perela L. Berkowitz ML. Darden T. Lee H. Pedersen LG. A smooth particle mesh ewald method. *J. Comp. Phys.*, 103 :8577–8592, 1995.
- [29] Brooks BR. Brucooleri RE. Olafson BD. States DJ. Swaminathan S. Karplus M. Charmm :a program for macromolecular energy minimization and dynamic calculations. *J. Comp. Chem.*, 4 :187–217, 1983.

- [30] Kim J. Lee M. Observation of multi-step conformation switching in β -amyloid peptide aggregation by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316 :393–397, 2004.
- [31] Findeis MA. Peptide inhibitors of β -amyloid aggregation. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2 :417–423, 2002.
- [32] Dahlgren KN. Manelli AM. Stine Jr BW. Baker LK. Krafft GA. LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.*, 57 :198–204, 2004.
- [33] Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 34 :151–160, 2004.
- [34] Wolfe MS. Therapeutic strategies for alzheimer’s disease. *Nature Drug Discovery*, 1 :859–866, 2002.
- [35] Wei G. Derreumaux P. Mousseau N. Sampling the complex energy landscape of a simple beta-hairpin. *J. Chem. Phys.*, 119 :10712–10716, 2003.
- [36] Urbanc B. Cruz L. Ding F. Sammond D. Khare S. Buldyrev SV. Stanley HE. Dokholyan NV. Molecular dynamics simulation of amyloid β dimer formation. *Biophys. J.*, 87 :2310–2321, 2004.
- [37] Derreumaux P. From polypeptide sequences to structures using monte carlo simulations and an optimized potential. *J. Chem. Phys.*, 111 :2301–2310, 1999.
- [38] Melquiond A. Boucher G. Mousseau N. Derreumaux P. Following the aggregation of amyloid-forming peptides by computer simulations. *J Chem. Phys.*, 122(17) :174904, 2005.
- [39] Santini S. Mousseau N. Derreumaux P. In silico assembly of alzheimer’s $a\beta_{16-22}$ peptide into β -sheets. *J. Amer. Chem. Soc.*, 126 :11509–11516, 2004.
- [40] Santini S. Wei GH. Mousseau N. Derreumaux P. Pathway complexity of alzheimer’s β -amyloid $a\beta_{16-22}$. *Structure*, 12(7) :1245–1255, 2004.
- [41] Wei G. Mousseau N. Derreumaux P. Exploring the energy landscape of proteins : a characterization of the activation-relaxation technique. *J. Chem. Phys.*, 117 :11379–11387, 2002.

- [42] Wei G. Mousseau N. Derreumaux P. Exploring the early steps of aggregation of amyloid-forming peptide kffe. *J. Physics Condensed Matter*, 16 :S5047–S5054, 2004.
- [43] Wei G. Mousseau N. Derreumaux P. Sampling the self-assembly pathways of kffe hexamers. *Biophys J BioFAST*, 2004.
- [44] Myamoto S. Kollman PA. Settle : An analytical version of the shake and rattle algorithms for rigid water models. *J. Comp. Chem.*, 12 :952–962, 1992.
- [45] Weiner PK. Kolman PA. Amber : Assisted model building with energy refinement. a general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comp. Chem.*, 2 :287–303, 1981.
- [46] Serpell LC. Blake CF. Fraser PE. Molecular structure of a fibrillar alzheimer's $\alpha\beta$ fragment. *Biochemistry*, 39 :13269–13275, 2000.
- [47] Stanley HE. Dokholyan NV Peng S. Ding F. Urbanc B. Buldyrev SV. Cruz L. Discrete molecular dynamics simulations of peptide aggregation. *Phys. Rev E.*, 69 :041908, 2004.
- [48] Horton. Moran. Ochs. Rawn. Scrimgeour. Perry. *Principle of Biochemistry 3rd Edition*. Prentice-Hall, New Jersey, 2002.
- [49] Bryngelson JD. Onuchic JN. Socci ND. Wolynes PG. Funnels, pathways, and energy landscape of protein folding : a synthesis. *Proteins*, 21(3) :167–195, 1995.
- [50] Zhao H. Tuominen EK. Kinnunen PK. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry*, 43(32) :10302–10307, 2004.
- [51] Ho BK. Thomas A. Brasseur R. Revisiting the ramachandran plot : Hard-sphere repulsion, electrostatics, and h-bonding in the α -helix. *Protein Science*, 12 :2508–2522, 2003.
- [52] Koolman J. R

- [53] Ma B. Nussinov R. Stabilities and conformations of alzheimer's β -amyloid peptide oligomers ($a\beta_{16-22}$, $a\beta_{16-35}$ and $a\beta_{10-35}$) : Sequence effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 99(22) :14126–14131, 2002.
- [54] Mousseau N. Derreumaux P. Barkema GT. Malek R. Sampling activated mechanisms in proteins with the activation-relaxation technique. *J. Molecular Graphics and Modeling*, 19 :78–86, 2001.
- [55] Petkova AT. Buntkowsky G. Dyda F. Leapman RD. Yau W-M. Tycko R. Solid state nmr reveals a ph-dependent antiparallel β -sheet registry in fibrils formed by a β -amyloid peptide. *J. Mol. Biol.*, 335 :247–260, 2004.
- [56] Zanuy D. Ma B. Nussinov R. Short peptide amyloid organization : Stabilities and conformations of the islet amyloid peptide nfgail. *Biophys. J.*, 84 :1884–1894, 2003.
- [57] Kim JR. Murphy RM. Mechanism of accelerated assembly of β -amyloid filaments into fibrils by klvffk₆. *Biophys. J.*, 86 :3194–3203, 2004.
- [58] Fandrich M. Forge V. Buder K. Kittler M. Dobson CM. Diekmann S. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 100(26) :15463–15468, 2003.
- [59] Gordon DJ. Balbach JJ. Tycko R. Meredith SC. Increasing the amphiphilicity of an amyloidogenic peptide changes the β -sheet structure in the fibrils from antiparallel to parallel. *Biophys. J.*, 86 :428–434, 2004.
- [60] Ramachandran GN. Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, 23 :283–438, 1968.
- [61] Scott WRP. Hunenberger PH. Tironi IG. Mark AE. Billeter SR. Fennen J. Torda AE. Huber T. Kruger P. Van Gunsteren WF. The gromos biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem.*, 103 :3596–3607, 1999.
- [62] DeLano WL. The pymol molecular graphics system. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA*. <http://www.pymol.org>, 2002.
- [63] Lacor PN. Buniel MC. Chang L. Fernandez SJ. Gong Y. Viola KL. Lambert MP. Velasco PT. Bigio EH. Finch CE. Krafft GA. Klein WL. Synaptic targe-

- ting by alzheimer's-related amyloid β oligomers. *The Jour. of Neuroscience*, 24(45) :10191–10200, 2004.
- [64] Chowdhury S. Zhang W. Wu C. Xiong G. Duan Y. Breaking non-native hydrophobic clusters is the rate-limiting step in the folding of an alanine-based peptide. *Biopolymers*, 68(1) :63–75, 2003.
- [65] Jang H. Hall CK. Zhou Y. Folding pathways of a tetrameric β -sheet complex : Molecular dynamics simulations on simplified off-lattice protein models. *Biophys. J.*, 86 :31–49, 2004.
- [66] Wu C. Lei H. Duan Y. Formation of partially-ordered oligomers of amyloidogenic hexapeptide (nfgail) in aqueous solution observed in molecular dynamics simulations. *Biophys. J. BioFAST*, 2004.
- [67] Wu C. Lei H. Duan Y. The role of phe in the formation of well-ordered oligomers of amyloidogenic hexapeptide (nfgail) observed in molecular dynamics simulations with explicit solvent. *Biophys. J. BioFAST Jan 14 ; [Epub ahead of print]*, 2005.