

Thèse de Doctorat de l'Université d'Évry-Val-d'Essonne

Discipline : Bioinformatique

Présentée par **Joseph ANDRÉ**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université d'Évry-Val-d'Essonne

## **MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE COMPLEXES TUBULINE/LIGAND**

Directeur de Thèse : **Philippe MANIVET**

Soutenue le Mercredi 11 janvier 2012

Devant le jury composé de

**Catherine ETCHEBEST  
David PERAHIA  
André SOBEL  
Patrick A. CURMI  
Philippe MANIVET**

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



# Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire Structure et Activités des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP) en partenariat avec la société BioQuanta. Je souhaite remercier ici toutes les personnes qui m'ont accompagné, soutenu et encouragé au cours de ces quatre années de collaboration scientifique.

J'adresse tout d'abord mes remerciements au Professeur Philippe MANIVET pour son encadrement et sa confiance durant cette thèse.

J'adresse mes remerciements et ma gratitude au directeur du SABNP, Docteur Patrick CURMI, pour son accueil dans son laboratoire. Ses encouragements, son soutien ainsi que ses conseils m'ont été d'une aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier Professeur Catherine ETCHEBEST du laboratoire Dynamique des Systèmes et Interactions des Macromolécules Biologiques (DSIMB), le Docteur David PERAHIA du laboratoire Bioinformatique, Modélisation et Dynamique Moléculaire (BiMoDyM) et le Docteur André SOBEL d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le Professeur Flavio TOMA, les Docteurs Élisabeth ADJADJ et Marie-Jeanne CLÉMENT ainsi que Vandana JOSHI pour les discussions et les échanges scientifiques et personnels enrichissants. Leur aide et leur soutien ont été essentiels à la réalisation de ces travaux de thèse et la rédaction du manuscrit.

Mes remerciements vont également à Lydia LEBOUIL, secrétaire du laboratoire pour son assistance dans les tâches administratives depuis mon arrivée au laboratoire et dont le caractère n'a d'égal que sa compétence et son dévouement. J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des membres du SABNP pour leurs encouragements et leur intérêt sincère dans mes travaux lors des réunions de laboratoire.

La réalisation de ces travaux de thèse, la rédaction de l'article qui en a découlé et celle de ce manuscrit n'aurait pas pu être menés à bien sans l'assistance de mes anciens

collègues et amis de la société BioQuanta. J'adresse donc mes remerciements et ma reconnaissance aux Docteurs Aixiao LI, Cyril BAUVAIS, Guillaume BOLLLOT, Joseph REBHEMED, Claude HERCEND et Christophe ROCHE ainsi à Lucie HUYNH, Alexandre JACOB, Nicolas DELACOTTE, Karim BEKRI, Pierrick CRAVEUR. Vos conseils, votre solidarité et votre soutien, m'ont été indispensables durant ces quatre années et plus particulièrement dans cette période difficile de fin de thèse. Ces moments partagés et nos échanges qu'ils soient scientifiques ou personnels resteront les meilleurs souvenirs de cette aventure.

Pour finir avec une note plus personnelle, à mes amis : Matthieu, Bruno et Virginie, Jean-Philippe, Paul et Léa, Alex, Mayu, Rémi, Marlène, un grand merci pour vos encouragements et pour m'avoir changé les idées durant les repas de la « Confrérie du Loc-Lac » et les soirées « Puzzle Versus ».

Je remercie chaleureusement mes parents et beaux-parents ainsi que mes frères qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Tam qui m'a soutenu au quotidien. Ton écoute, tes encouragements m'ont réconforté et motivé tout au long de cette aventure : Děkuji.

# Résumé

Les microtubules sont des polymères cylindriques de tubuline- $\alpha\beta$ , membres du cytosquelette eucaryote. Ils possèdent une dynamique intrinsèque nécessaire à de nombreuses fonctions cellulaires telle que la mitose. L'hydrolyse du nucléotide GTP dans les polymères de tubuline- $\alpha\beta$  ainsi que les interactions entre la tubuline et les protéines partenaires ou les molécules à visées pharmacologiques, jouent un rôle critique sur la dynamique des microtubules. Durant cette thèse, des approches de modélisation moléculaire ont été utilisées pour mieux appréhender les interactions tubuline-ligand à l'échelle atomique et contribuer au développement de nouvelles molécules actives.

Des simulations de dynamiques moléculaires ont été réalisées pour étudier l'effet de différents nucléotides dans la tubuline- $\beta$  sur la structure et la dynamique du protofilament de tubuline. Nous proposons un rôle du résidu  $\alpha$ E254 dans la coordination du magnésium catalytique. Nous observons également des changements conformationnels aux interfaces latérales et un réarrangement de structure aux interfaces longitudinales qui peuvent affecter la stabilisation du microtubule. Des travaux menés au laboratoire ont montré que la colchicine et le carbendazime se fixent dans des poches voisines dans la sous-unité tubuline- $\beta$  et inhibent la prolifération cellulaire. Nous avons proposé un site de fixation du carbendazime dans les complexes tubuline-colchicine à l'aide de l'amarrage moléculaire et de simulations de dynamiques moléculaires. Ces expériences ont mené au design de molécules hybrides composées des noyaux colchicine et carbendazime reliés par un *linker*. Une de ces molécules hybrides a été synthétisée et testée avec succès sur des lignées de cellules HeLa. Enfin, nous avons construit des peptides cycliques dérivées d'I19L, un peptide anti-microtubule identifié au laboratoire. Des simulations de dynamique moléculaire et des calculs d'énergie libre de liaisons ont permis d'évaluer ces peptides. Enfin, des mutations ont été proposées afin d'optimiser l'interaction entre le meilleur peptide et la tubuline.

Mots-clés : tubuline- $\alpha\beta$  ; dynamique moléculaire ; nucléotide ; colchicine ; peptide antimitotique

# Abstract

Microtubules are cylindrical polymers of  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers, members of the eukaryotic cytoskeleton. They possess an intrinsic dynamics which is necessary to any cellular functions such as the mitosis. It has long been recognized that GTP hydrolysis in  $\alpha\beta$ -tubulin polymers plays a critical role in this dynamics as well as the interactions between tubulin and the protein partners or the drugs. In this thesis, molecular modeling approaches are applied to three theoretical studies to gain insight at the atomic scale about tubulin-ligand interactions and to contribute to the development of new active compounds.

Molecular dynamics simulations were used to study the effect of the different nucleotide states at  $\beta$ -tubulin on the protofilament structure and dynamics. We propose a role for residue  $\alpha$ E254 in catalytic magnesium coordination. We also observe conformational changes and structure rearrangement at lateral and longitudinal interfaces that can affect the microtubule stabilization. Previous work carried out in the laboratory showed that colchicine and carbendazime bind neighboring pockets in the  $\beta$ -tubulin subunit and inhibit cell proliferation. We proposed a binding site of carbendazime on the tubulin-colchicine complex, using docking and molecular dynamics simulation, which lead to the design of hybrid molecules composed of both colchicines and carbendazime moieties attached with a linker. One of these hybrid molecules has been synthesized and successfully tested on HeLa cells. Finally, we designed four cyclic peptides based on I19L, an anti-microtubule peptide identified at the laboratory. Molecular dynamic simulations and binding free energy calculations were used to evaluate these peptides. Mutations were then proposed on the best peptide to increase its interactions with tubulin.

Keywords :  $\alpha\beta$ -tubulin; molecular dynamics; nucleotide; colchicine; anti-mitotic peptide

# Table des matières

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures.....	II
Liste des annexes.....	V
Abréviations .....	VI
Préambule .....	1
<b>Chapitre I. Structure et fonction du microtubule .....</b>	<b>3</b>
<hr/>	
1. Le microtubule .....	4
1.1. Structure .....	4
1.2. Assemblage et Dynamique des Microtubules.....	6
1.2.a. Nucléation .....	7
1.2.b. Élongation .....	9
1.2.c. Dépolymérisation .....	9
1.2.d. Aspects thermodynamiques de l'instabilité dynamique .....	10
1.2.d.1. Modèle de la coiffe de nucléotide guanoside .....	10
1.2.d.2. Modèle de la coiffe conformationnelle .....	11
1.3. Fonction et activité .....	11
1.3.a. Transport intracellulaire .....	12
1.3.b. Motilité .....	12
1.3.c. Division cellulaire.....	12
2. $\alpha\beta$ -tubuline.....	13
2.1. Isotype et expression .....	13
2.2. Structure .....	13
2.2.a. Structures expérimentales .....	13
2.2.b. Structure secondaire et tertiaire.....	14

2.2.c. Activité catalytique de la tubuline .....	15
2.2.c.1. Le modèle allostérique .....	17
2.2.c.2. Le modèle <i>lattice</i> .....	17
<b>2.3. Poisons du fuseau mitotique .....</b>	<b>18</b>
2.3.a. Les taxanes .....	19
2.3.b. Les colchicinoïdes .....	19
2.3.c. Les vinca-alcaloïdes .....	20
<b>3. Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de la tubuline .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>23</b>

## **Chapitre II. Techniques de Modélisation Moléculaire..... 25**

---

<b>1. Historique et Généralités .....</b>	<b>26</b>
<b>2. La mécanique moléculaire .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Le champ de force .....</b>	<b>27</b>
2.1.a. Le terme d'élongation « stretch » .....	27
2.1.b. Le terme de courbure «bend».....	28
2.1.c. Le terme de torsion.....	29
2.1.d. Termes d'interaction entre atomes non-liés.....	31
2.1.d.1. Les interactions de van der Waals .....	32
2.1.d.2. Les interactions électrostatiques .....	33
2.1.e. Les algorithmes de minimisation de l'énergie .....	33
2.1.e.1. L'algorithme de «la plus grande pente» .....	34
2.1.e.1. L'algorithme du gradient conjugué .....	35
2.1.f. Les contraintes .....	36
2.1.g. Les restrictions .....	36
<b>3. La dynamique moléculaire .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Les algorithmes d'intégration du temps .....</b>	<b>38</b>
3.1.a. L'algorithme de Position Verlet .....	38
3.1.b. L'algorithme de Velocity Verlet.....	38



3.1.c.	Intégration du temps par l'algorithme du « saute-mouton » .....	39
3.2.	Les ensembles thermodynamiques .....	40
3.3.	Les conditions périodiques aux limites.....	40
3.4.	Calcul des énergies d'interactions non-liantes.....	42
3.4.a.	La méthode de la valeur seuil.....	42
3.4.a.1.	La méthode « <i>potential shift</i> ».....	43
3.4.a.2.	La méthode « <i>potential switch</i> ».....	43
3.4.b.	La méthode de la sommation d'Ewald.....	43
3.4.c.	La méthode <i>Particle Mesh Ewald</i> .....	46
4.	Le calcul de l'énergie libre d'interaction .....	47
4.1.	La méthode MM/PBSA.....	48
4.1.a.	Calcul de l'énergie libre du soluté .....	48
4.1.b.	Calcul de l'énergie libre de solvatation.....	50
4.1.b.1.	Méthode MM/PBSA.....	50
4.1.b.2.	Méthode MM/GBSA.....	51
4.1.c.	Avantages et inconvénients .....	52
5.	La modélisation par homologie .....	52
5.1.a.	Principe .....	52
5.1.b.	Avantages et inconvénients .....	53
6.	L'amarrage moléculaire .....	53
6.1.	Méthode de génération de poses.....	54
6.2.	La fonction de score.....	55
7.	La Mécanique Quantique .....	56
7.1.	Introduction .....	56
7.2.	Méthodes de la Fonction d'Onde.....	57
7.3.	Ensemble des Bases .....	58
8.	Les analyses courantes en modélisation moléculaire .....	59

8.1.	Root mean square deviation (RMSD).....	59
8.2.	Root mean square fluctuation (RMSF).....	60
8.3.	Les liaisons hydrogène .....	60
9.	Conclusion .....	61
<b>Chapitre III. Résultats.....</b>		<b>63</b>
<hr/>		
1.	Étude de l'hydrolyse du GTP dans le contexte de la tubuline .....	64
1.1.	Introduction.....	64
1.2.	Méthodologie.....	65
1.2.a.	Présentation des systèmes modélisés.....	65
1.2.b.	Modélisation par homologie .....	66
1.2.c.	Construction des hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$ .....	67
1.2.d.	Préparation des systèmes pour la dynamique moléculaire .....	68
1.2.e.	Minimisation et Dynamique Moléculaire .....	69
1.3.	Résultats et discussion .....	70
1.3.a.	Description de l'environnement du nucléotide dans le site E .....	71
1.3.a.1.	Le site E dans le système tubuline-GTP.....	71
1.3.a.2.	Le site E dans les systèmes à la suite de l'hydrolyse du GTP.....	74
1.3.b.	Changement de structure aux interfaces latérales .....	76
1.3.b.1.	Différence de conformation de la boucle M dépendant du nucléotide .....	77
1.3.b.2.	Différence de conformation de la boucle N dépendant du nucléotide.....	80
1.3.c.	Les effets de l'hydrolyse aux interfaces longitudinales .....	81
1.3.d.	Le rôle de la fluctuation des structures secondaires dans la stabilisation du microtubule.....	83
1.4.	Conclusion .....	84
2.	Construction de molécules hybrides déstabilisatrices du microtubule .....	99
2.1.	Introduction.....	99
2.2.	Méthodologie.....	103
2.2.a.	Amarrage moléculaire .....	103

2.2.b.	Présentation des systèmes modélisés.....	104
2.2.c.	Préparation des paramètres du champ de force.....	104
2.2.d.	Dynamiques moléculaires .....	106
2.3.	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>107</b>
2.3.a.	Rôle de la colchicine dans la déstabilisation du MT .....	107
2.3.b.	Proposition et validation du site de fixation du carbendazime.....	110
2.3.c.	Rôle du carbendazime dans la déstabilisation du MT.....	114
2.3.d.	Développement de nouvelles molécules hybrides .....	118
2.3.e.	Estimation de l'énergie d'interaction des hybrides.....	121
2.3.f.	Synthèse d'une molécule hybride .....	124
2.4.	<b>Conclusion .....</b>	<b>125</b>
3.	<b>Optimisation de peptides dérivés de la stathmine .....</b>	<b>128</b>
3.1.	<b>Introduction .....</b>	<b>128</b>
3.2.	<b>Méthodologie .....</b>	<b>132</b>
3.2.a.	Construction des systèmes .....	132
3.2.b.	Minimisation et Dynamiques Moléculaires .....	133
3.2.c.	Analyse de l'énergie d'interaction .....	134
3.2.d.	Computational Alanine Scanning.....	135
3.3.	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>135</b>
3.3.a.	Analyse de la dynamique moléculaire.....	135
3.3.b.	Mesure de l'énergie d'interaction.....	136
3.3.c.	Interactions tubuline-peptide.....	141
3.3.c.1.	I19L .....	141
3.3.c.2.	I19L_K4C_E16C.....	143
3.3.c.3.	I19L_K4C_E16C_A10R.....	145
3.3.c.4.	G20G .....	147
3.3.c.5.	G20G_K4C_E16C .....	149
3.4.	<b>Computational Alanine Scanning.....</b>	<b>151</b>

3.5. Proposition de nouveaux peptides mutants .....	153
3.5.a. Mutations I1T ou I1D.....	153
3.5.b. Mutation V3N.....	154
3.6. Conclusion.....	155
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>157</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>165</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>175</b>

---

## Liste des tableaux

Tableau 1	Occupation des liaisons hydrogènes entre la sous-unité tubuline- $\beta$ et le GTP.....	71
Tableau 2	Occupation des liaisons hydrogènes entre la sous-unité tubuline- $\beta$ et le GDP dans le système tubuline-Pi.....	74
Tableau 3	Occupation des liaisons hydrogènes entre la sous-unité tubuline- $\beta$ et le GDP dans le système tubuline-GDP·Mg <sup>2+</sup> .....	75
Tableau 4	Occupation des liaisons hydrogènes entre la sous-unité tubuline- $\beta$ et le GDP dans le système tubuline-GDP.....	76
Tableau 5	Paramètres de la boîte pour l'arrimage du carbendazime.....	103
Tableau 6	Paramètres de l'algorithme génétique pour l'amarrage moléculaire du carbendazime. ....	104
Tableau 7	Détails des énergies d'interactions non-liantes entre les différents ligands et la tubuline. ...	123
Tableau 8	Énergie libre d'interaction tubuline-peptide en kcal.mol <sup>-1</sup> . ....	138

# Liste des figures

Figure 1	Image par microscope à fluorescence du réseau de microtubules .....	4
Figure 2	Organisation du microtubule.....	5
Figure 3	Variabilité de l'organisation des structures des microtubules .....	6
Figure 4	Instabilité dynamique du microtubule.....	7
Figure 5	Organisation des centrosomes. ....	8
Figure 6	Modèle de nucléation du microtubule.....	9
Figure 7	Modèle d'élongation du microtubule en feuillet. ....	9
Figure 8	Diagramme 2D de la structure secondaire et tertiaire d'une sous-unité de tubuline.....	15
Figure 9	Structure de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . ....	15
Figure 10	Localisation des sites N et E dans un protofilament. ....	16
Figure 11	Conformations de la tubuline- $\alpha\beta$ et les modèles du rôle du GTP. ....	18
Figure 12	Structure et fixation du Taxol sur l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . ....	19
Figure 13	Structure et fixation de la colchicine sur l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$ . ....	20
Figure 14	Structure et fixation de la vinblastine à l'interface entre une sous-unité tubuline- $\beta$ et une sous-unité tubuline- $\alpha$ . ....	21
Figure 15	Distance entre deux atomes de carbone liés par une liaison covalente simple .....	27
Figure 16	Angle $\theta$ entre trois atomes i, j et k .....	29
Figure 17	Angle de torsion entre quatre atomes de carbones .....	29
Figure 18	Courbe de l'énergie potentielle de torsion .....	30
Figure 19	Couplage entre l'étirement des liaisons et l'écartement de l'angle.....	31
Figure 20	Potentiel de Lennard-Jones 6-12 représentant la courbe de l'énergie de van der Waals .....	32
Figure 21	Algorithme de la plus profonde descente .....	35
Figure 22	Comparaison de l'algorithme de la plus profonde descente et du gradient conjugué.....	36
Figure 23	Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques aux limites.....	41
Figure 24	Systèmes géométriques respectant les conditions périodiques aux limites. ....	42
Figure 25	Représentation des méthodes de troncature de l'énergie de van Der Waals. ....	43
Figure 26	Neutralisation des charges dans la méthode d'Ewald .....	44
Figure 27	Sommation dans l'espace réciproque après neutralisation .....	46
Figure 28	Schématisation des différentes étapes du calcul de PME.....	47
Figure 29	Cycle thermodynamique de formation et de solvation d'un complexe.....	49
Figure 30	Contraintes géométriques d'une liaison hydrogène implémentée dans VMD. ....	61

Figure 31	Représentation des systèmes d'hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$ .....	65
Figure 32	Évolution du RMSD des $C\alpha$ des complexes tubuline-GTP, -Pi et -GDP.....	70
Figure 33	Représentation du site E dans les complexes tubuline-GTP, -Pi et -GDP .....	72
Figure 34	Localisation des boucles M et N dans le contexte du microtubule. ....	78
Figure 35	Structure de la boucle M de la sous-unité tubuline- $\beta$ .....	79
Figure 36	Structure de la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha 2$ .....	80
Figure 37	L'hydrolyse du GTP modifie les contacts aux interfaces longitudinales.....	82
Figure 38	RMSF calculé sur les $C\alpha$ de la sous-unité tubuline- $\beta$ .....	83
Figure 39	Structure de la colchicine .....	99
Figure 40	Site de fixation de la colchicine. ....	100
Figure 41	Dégradation du bénomyl dans l'eau. ....	101
Figure 43	Comparaison de l'énergie relative du carbendazime pour différentes valeurs de l'angle dièdre N-C-N-C et C-N-C-O.....	106
Figure 44	RMSD des $C\alpha$ de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ en présence de colchicine.....	108
Figure 45	Comparaison de la fluctuation des $C\alpha$ de la tubuline et du complexe tubuline-colchicine.	108
Figure 46	Localisation des zones de fluctuations réduites sur l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$ en présence de colchicine. ....	109
Figure 47	Interaction en la tubuline et la colchicine à l'issue de la dynamique moléculaire. ....	110
Figure 48	Des dérivés du benzimidazole associés à des mutations de la sous-unité tubuline- $\beta$ .....	111
Figure 49	Cluster des poses du carbendazime dans le complexe tubuline-colchicine.....	112
Figure 50	Interaction entre le carbendazime après amarrage sur la sous-unité tubuline- $\beta$ .....	113
Figure 52	Fluctuation des $C\alpha$ de la tubuline en présence de carbendazime.....	115
Figure 54	Fluctuation des $C\alpha$ de la tubuline en présence de carbendazime.....	117
Figure 55	Position du carbendazime dans la structure stabilisée du complexe tubuline-colchicine- carbendazime.....	118
Figure 56	Concept de molécule hybride colchicine-carbendazime. ....	119
Figure 57	Structure planaire de la molécule hybride CLC. ....	120
Figure 58	Structure planaire de la molécule hybride C2C.....	120
Figure 60	RMSD des $C\alpha$ de la tubuline dans les complexes tubulines-molécules hybrides .....	122
Figure 61	Interaction des molécules hybrides avec la tubuline. ....	124
Figure 62	Structure plane de la molécule 255q synthétisée Structure plane de la molécule 255q synthétisée.....	125
Figure 63	Structure du complexe tubuline/RB3-SLD. ....	129

Figure 64	Alignement des séquences du domaine N-terminal des protéines de la famille de la stathmine. ....	129
Figure 65	Structure RMN de la chaîne principale de I19L en interaction avec la tubuline .....	130
Figure 66	Interaction électrostatiques et ioniques entre les chaînes latérales du peptide I19L .....	130
Figure 67	Interaction entre le peptide I19L et la sous-unité tubuline- $\alpha$ .....	131
Figure 68	Représentation bidimensionnelle des peptides cycliques et des peptides mutés.....	133
Figure 69	RMSD calculé sur les C $\alpha$ des complexes tubuline-peptide .....	136
Figure 70	Évolution de nombre de résidus impliqués dans des structures secondaires.....	137
Figure 71	Structure des peptides cycliques.....	137
Figure 72	Entropie des peptides libres et en complexes avec la tubuline calculée avec la méthode <i>quasiharmonic entropy</i> .....	140
Figure 73	Liaisons hydrogènes entre I19L et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . ....	141
Figure 74	Liaisons hydrogènes intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L. ....	142
Figure 75	Liaisons hydrogènes entre I19L_K4C_E16C et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . ....	143
Figure 76	Liaisons hydrogènes intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L_K4C_E16C. .	144
Figure 77	Liaisons hydrogènes entre I19L_K4C_E16C_A10R et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . ....	145
Figure 78	Liaisons hydrogènes intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L_K4C_E16C_A10R .....	146
Figure 79	Liaisons hydrogènes entre G20G et la sous-unité tubuline- $\alpha$ .....	147
Figure 80	Liaisons hydrogènes intra-peptide impliquant les chaînes latérales de G20G.....	148
Figure 81	Liaisons hydrogènes entre G20G_K4C_E16C et la sous-unité tubuline- $\alpha$ .....	149
Figure 82	Liaisons hydrogènes intra-peptide impliquant les chaînes latérales de G20G_K4C_E16C	150
Figure 83	Énergie libre de liaison relative entre le complexe tubuline-I19L et les complexes tubuline-I19L mutés. ....	151
Figure 84	Environnement hydrophobe du résidu F15 du peptide I19L. ....	152
Figure 85	Interaction potentielle après les mutations I1T ou I1D. ....	154
Figure 86	Interactions potentielles après les mutations V3N.....	155



## Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des structures 3D de l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$ .....	176
Annexe 2 : Alignement de séquence de la tubuline- $\alpha$ et de la tubuline- $\beta$ .....	177
Annexe 3 : Structures secondaires des sous-unités tubuline- $\alpha$ et de la tubuline- $\beta$ .....	178
Annexe 4 : Séquences de la tubuline- $\alpha$ et de la tubuline- $\beta$ porcines.....	179
Annexe 5 : Liste des mutations de la sous-unité tubuline- $\beta$ associées au bendazimidazole.....	180
Annexe 6 : Synthèse des molécules CLC et 255q.....	181

# Abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AMBER : Assisted Model Building with Energy Refinement

CG : Conjugate gradient. Algorithme du gradient conjugué

CHARMM : Chemistry at HARvard Molecular Mechanics

CPL : Condition périodiques aux limites

GAFF : General Amber Force Field

GBSA : Generalized Born Surface Area

GDP : Guanosine diphosphate

GMPCPP : guanylyl-(alpha, beta)-methylene-diphosphonate

GMPPNP : guanylyl Imidodiphosphate

GROMACS : GROningen MAchine for Chemical Simulations

GTP : Guanosine triphosphate

MAP : Microtubule associated Protein

MM : Molecular Mechanics. Mécanique Moléculaire

MMFF : Merck Molecular Force Field

MT : Microtubule

MTOC : Centre organisationnel du Microtubule ou *Microtubule Organization Center*

NOE : Nuclear Overhauser effect

NPT : Number, Pressure, Temperature. Ensemble isobare isotherme

NVE : Number, Volume, Energy. Ensemble microcanonique

NVT : Number, Volume, Temperature. Ensemble canonique

PBSA : Poisson-Boltzmann Surface Area

PME : Particle Mesh Ewald

RMN . Résonnance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root Mean Square Deviation

RMSF : Root Mean Square Fluctuation

SD : Steepest Descent. Algorithme de la plus grande pente.

SLD : Stathmin Like Domain

T2R : Complexe formés de deux tubulines et du domaine Stathmine de la protéine RB3 (RB3-SLD)

$\gamma$ TuRC : Complexe de tubuline- $\gamma$  en anneau ou  *$\gamma$ -tubulin ring complex*

# Préambule

---

Les microtubules sont des polymères cylindriques de tubuline- $\alpha\beta$ , membres du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils assurent des fonctions architecturales et servent de guide à un ensemble de moteurs moléculaires assurant le transport asymétrique des organelles. Au-delà de ces fonctions, les microtubules ont une dynamique de polymérisation et de dépolymérisation nécessaire à de nombreuses fonctions dans la cellule et notamment la division cellulaire. Cette dynamique dépend de leurs caractères structuraux et de leurs interactions avec des partenaires, à savoir des nucléotides, des protéines de séquestration ou de petites molécules à visée pharmacologiques.

De nombreuses études expérimentales ont été menées pour comprendre les mécanismes de la stabilisation/déstabilisation des microtubules et de leurs interactions dans les complexes tubuline-ligand. Les chercheurs font cependant face à de nombreuses difficultés liées à la taille de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ , sa tendance à l'agrégation et son caractère vital pour la cellule. Dans ce contexte, la modélisation moléculaire est une approche particulièrement appropriée puisqu'elle offre la possibilité d'étudier *in silico* des systèmes hors des contraintes expérimentales à l'échelle atomique.

Ainsi la dynamique moléculaire nous a permis d'étudier les interactions entre la tubuline et différents types de nucléotides. Par ailleurs, en s'appuyant sur des données expérimentales, nous avons également développé des molécules inhibitrices de la polymérisation et exploré leurs effets sur la tubuline. Enfin, nous avons construit et mesuré l'interaction de peptides cycliques avec la tubuline à l'aide d'une approche de dynamique moléculaire couplée à un calcul de l'énergie libre de liaison.

Au travers de cette thèse, différents complexes tubuline-ligand ont été étudiés pour comprendre leurs effets sur la tubuline et le microtubule. Les informations obtenues contribuent à la connaissance des mécanismes d'assemblage et de stabilisation du microtubule. Enfin, ces résultats s'insèrent dans la perspective de développer de nouveaux traitements contre le cancer ou de certaines maladies neuro-dégénératives liées à l'altération du fonctionnement des microtubules.

# Chapitre I.

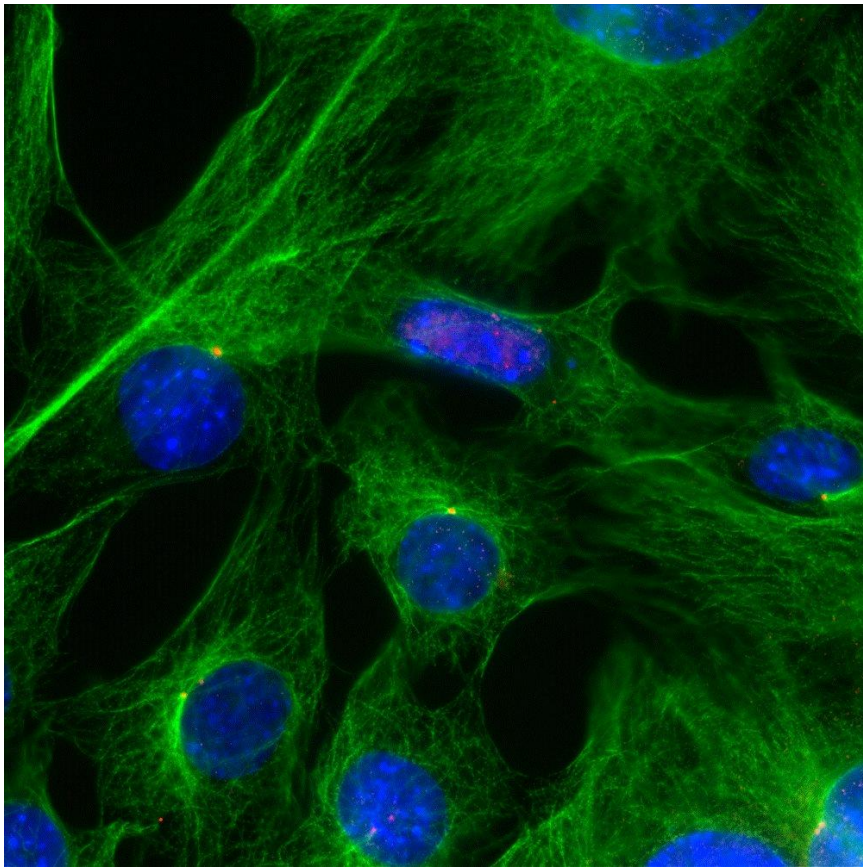
# Structure et fonction

# du microtubule

---

# 1. Le microtubule

Les microtubules (MT) sont des constituants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils participent à l'organisation de l'espace intracellulaire ainsi qu'au maintien de l'intégrité de la cellule. Ces polymères de tubuline- $\alpha\beta$  sont essentiels à la vie de la cellule et sont impliqués dans de nombreuses fonctions au niveau cellulaire comme la détermination de la forme de la cellule, le transport des organelles ou la ségrégation des chromosomes indispensable à la division cellulaire (Figure 1). Ces fonctions sont rendues possibles grâce à la structure ainsi qu'à la dynamique intrinsèque des MT.



**Figure 1 :** Image par microscope à fluorescence du réseau de microtubules. Dans ces fibroblastes normaux de souris, le réseau de microtubules est marqué en vert par un anticorps anti tubuline- $\alpha$ , le noyau en bleu et le MTOC en rouge.

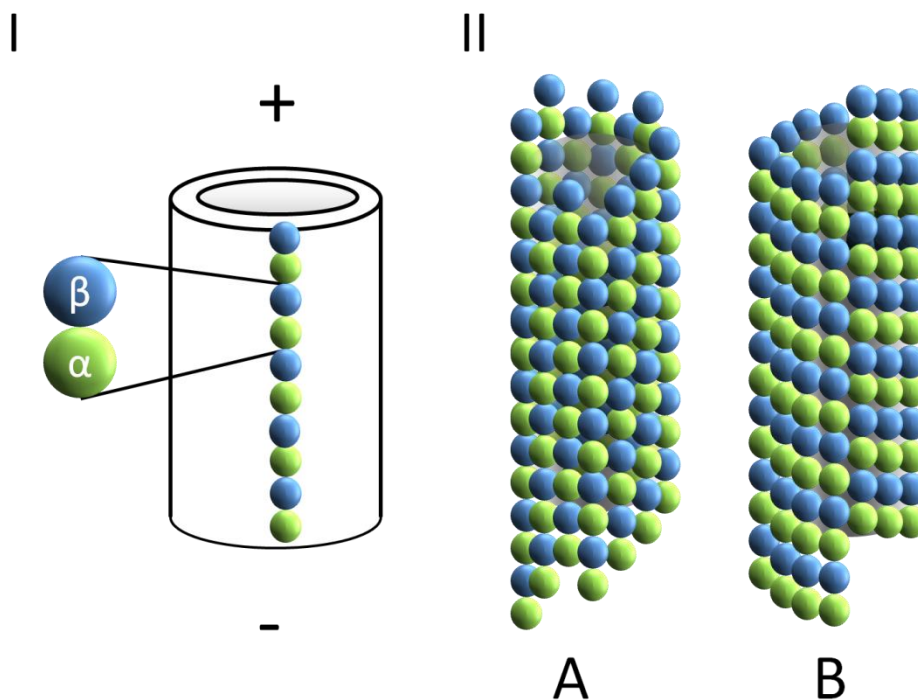
## 1.1. Structure

Les microtubules sont des filaments cylindriques creux de 25 nm de diamètre constitués d'hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$ . Les hétérodimères s'empilent selon une organisation en « tête-à-queue » pour former des protofilaments (Figure 2). *In vivo*, les MT contiennent 13 protofilaments alors

qu'*in vitro* ils peuvent être constitués de 9 à 16 protofilaments, ce qui indique qu'il existe une certaine flexibilité par des interactions latérales entre protofilaments [1].

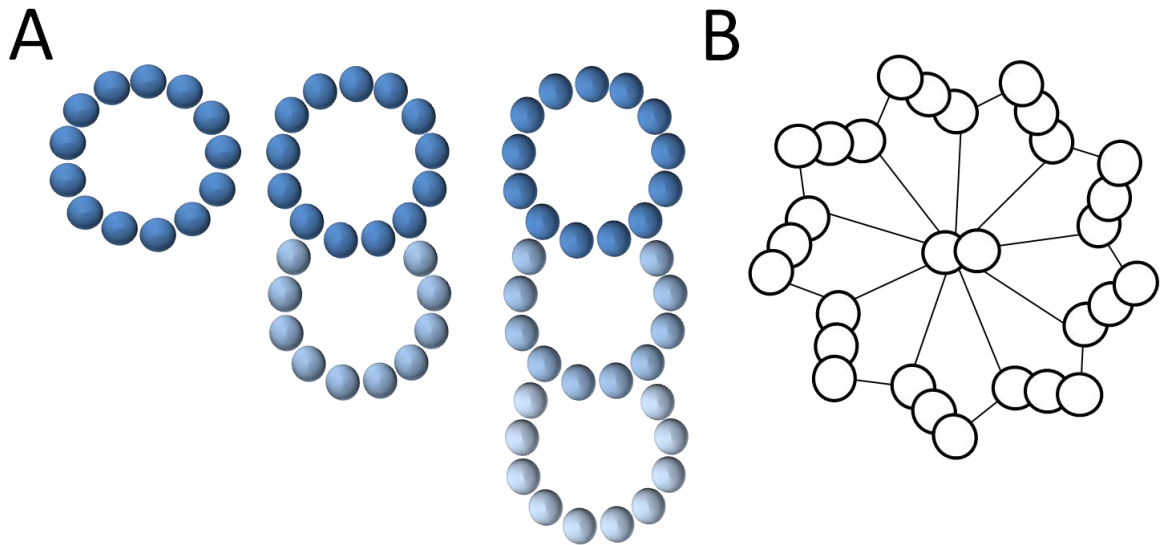
Les protofilaments adjacents s'associent avec un décalage vertical d'environ 9 nm de telle sorte que les sous-unités de tubuline voisines décrivent une structure en hélice gauche de  $12^\circ$  d'élévation autour du microtubule. Trois hélices parallèles sont ainsi nécessaires pour recouvrir entièrement le MT (hélice à trois départs).

Il existe deux modèles pour l'assemblage des protofilaments dans le microtubule. Dans le modèle A (Figure 2 A), les interactions latérales entre deux protofilaments proviennent de l'interaction entre un monomère de tubuline- $\alpha$  et un monomère de tubuline- $\beta$ . En revanche, dans le modèle B (Figure 2B), les liaisons latérales se font entre monomères de même type [2, 3]. Les deux assemblages sont possibles *in vitro* et *in vivo* avec néanmoins une préférence dans les cellules pour le modèle B.



**Figure 2 :** Organisation du microtubule. Sous-unité verte : tubuline- $\alpha$  ; sous-unité bleue : tubuline- $\beta$ . (I) Arrangement d'hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  dans le protofilament. (II) Organisation du microtubule en hélice à 3 départs dans les réseaux A et B.

Selon la fonction cellulaire dans laquelle il est engagé, le réseau de microtubules peut s'arranger en simplet, en doublet et triplet (Figure 3 A). Dès les années 1960, la microscopie électronique a permis par exemple de montrer l'existence d'une organisation particulière des microtubules dans les cils et les flagelles : on y observe un doublet central de microtubule entouré par 9 triplets (Figure 3 B).

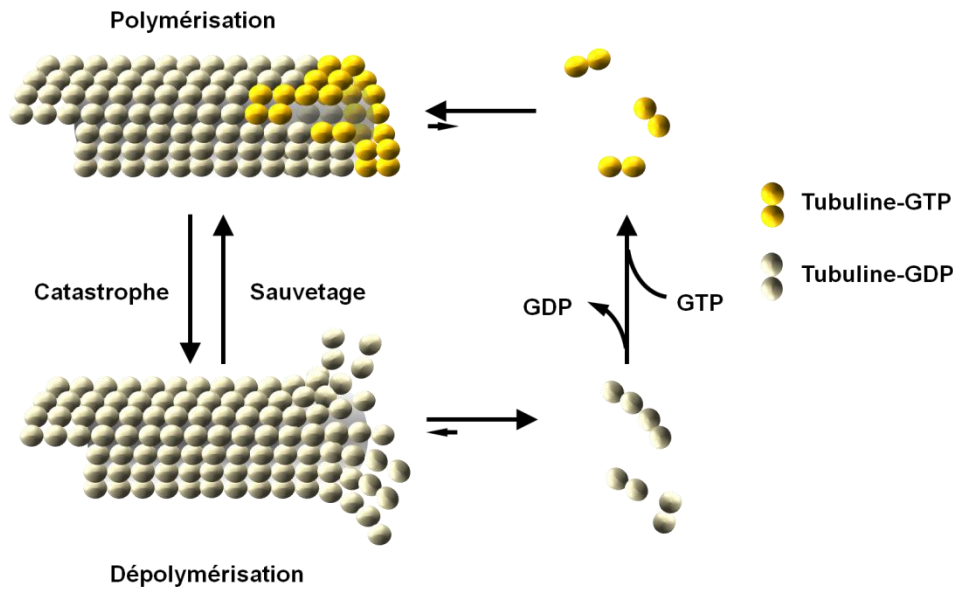


**Figure 3 :** Variabilité de l'organisation des structures des microtubules. (A). Représentation des structures de microtubules en singlet, doublet et triplet. Chaque sphère représente une sous-unité tubuline et correspond à un protofilament vue de dessus. (B). Organisation des microtubules, représentés par des cercles noirs, dans une section de cils ou de flagelles.

## 1.2. *Assemblage et Dynamique des Microtubules*

L'assemblage d'hétérodimères de tubuline en « tête-à-queue » confère une polarité aux microtubules (Figure 2 A). Les microtubules possèdent une dynamique intrinsèque où des phases de croissance lente alternent avec des phases de dépolymérisation rapide. Une des extrémités du microtubule est appelée : extrémité moins (-) car elle possède une dynamique lente en comparaison à l'extrémité plus (+). L'extrémité (-) expose des sous-unités de type tubuline- $\alpha$  tandis que l'extrémité (+) expose des sous-unités de type tubuline- $\beta$  [4, 5].





**Figure 4 :** Instabilité dynamique du microtubule. Adapté de Inoue et Salmon [6].

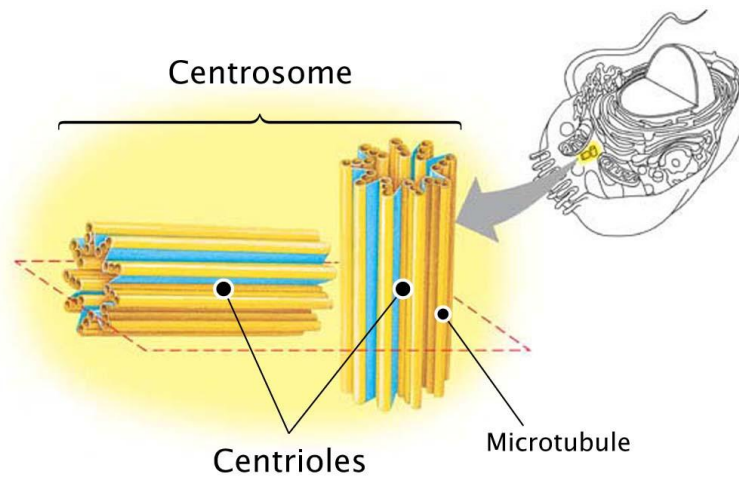
La dynamique du microtubule peut être divisée en trois phases : i) nucléation ii) élongation et iii) dépolymérisation. La transition d'une phase d'élongation lente à une phase de dépolymérisation rapide est appelée catastrophe tandis que le passage d'une phase de dépolymérisation à une phase d'élongation est appelé sauvetage. Au cours de sa vie, le microtubule présente alternativement des phases d'élongation et de dépolymérisation. On parle alors de l'instabilité dynamique du microtubule (Figure 4) décrite par quatre paramètres : vitesse de polymérisation, vitesse de dépolymérisation, fréquence de catastrophes et fréquence de sauvetages. Ces paramètres dépendent de façon variable de la concentration de tubuline [7]. En effet, en dessous d'une certaine concentration appelée « concentration critique » qui varie en fonction des conditions physico-chimiques, la polymérisation ne peut avoir lieu.

À l'état d'équilibre, on peut aussi observer un phénomène dit de *tread milling* c'est-à-dire l'incorporation continue d'hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  à l'extrémité (+) du MT s'opérant à la même vitesse que la dépolymérisation à l'extrémité (-) [7].

### 1.2.a. Nucléation

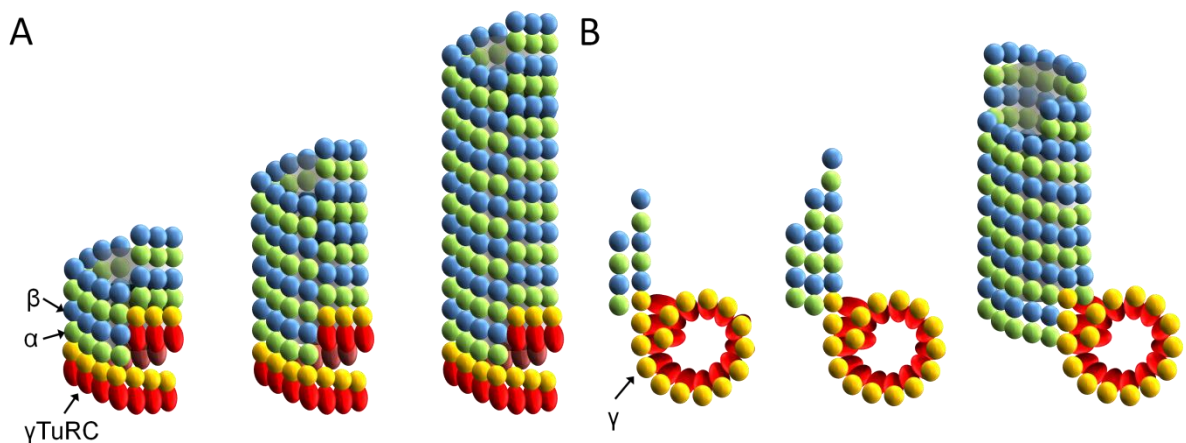
L'assemblage du microtubule dans la cellule se fait à partir du centrosome considéré comme le principal centre organisationnel des microtubules (MicroTubule Organisation Center : MTOC). Après nucléation au niveau du centrosome, les microtubules croissent et rayonnent vers la membrane cellulaire par ajout d'hétérodimères. Les MT sont liés au MTOC par la sous-unité tubuline- $\alpha$  au niveau de leur extrémité (-). Le centrosome (Figure 5) est composé d'une paire de centrioles entourés d'une

matrice centrosomale constituée d'un grand nombre de protéines différentes. Chaque centriole est formé de 9 paires de MT.



**Figure 5 :** Organisation des centrosomes.

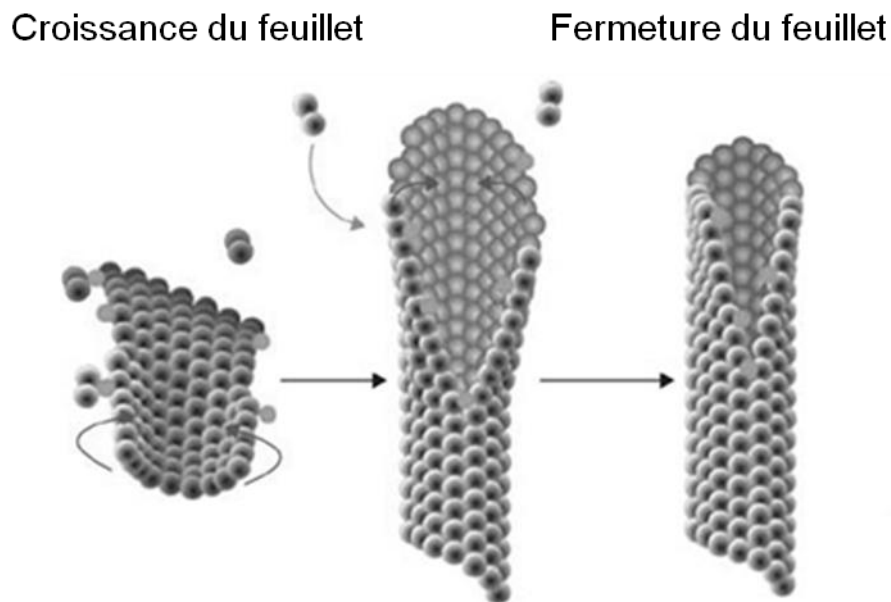
On trouve en périphérie des centrioles des isotypes particuliers de la tubuline- $\gamma$  qui coexistent à l'état monomérique et d'anneaux appelés  $\gamma$ TuRC (pour  $\gamma$ -Tubulin Ring Complex). Étant donné la polarité du MT, il semblerait que l'interaction avec le MTOC se fasse principalement entre la sous-unité tubuline- $\alpha$  et le complexe  $\gamma$ TuRC. Deux modèles permettent d'expliquer comment le MTOC peut servir de matrice pour la nucléation des MT (Figure 6). Dans le premier modèle proposé par Moritz et coll. [8], le complexe  $\gamma$ TuRC constituerait un tour d'hélice sur lequel viendraient ensuite s'ajouter les hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  (Figure 6 A). Dans le second modèle, le complexe  $\gamma$ TuRC mimerait les interactions latérales entre les protofilaments et favoriserait celles-ci (Figure 6 B).



**Figure 6 :** Modèle de nucléation du microtubule. La tubuline- $\gamma$  est représentée en sphères jaunes, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la tubuline en sphères vertes et bleues respectivement et le MTOC en ellipses rouges. (A). Modèle d'élongation où la tubuline- $\gamma$  forme un tour d'hélice du MT. (B). Modèle de nucléation où le MTOC sert de matrice aux interactions entre protofilaments dans le MT.

### 1.2.b. Élongation

Durant l'élongation, la population de microtubules est hétérogène : certaines des extrémités sont franches, d'autres présentent une ou deux protrusions courbes de longueur très variables, et on trouve parfois des organisations en feuillet [9, 10]. Chrétien et coll. [10] ont suggéré que les microtubules s'allongent par addition longitudinale de tubuline à des protofilaments organisés en feuillets courbes, qui se referment ensuite en un cylindre droit (Figure 7). Lorsque le cylindre du microtubule se referme, les feuillets deviendraient plus courts et apparaîtraient comme de simples protrusions, puis sous forme d'extrémités franches lorsque le cylindre est presque complètement refermé [10].



**Figure 7 :** Modèle d'élongation du microtubule en feuillet. L'ajout d'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  courbe le feuillet qui se referme pour former le microtubule. Adapté de Vitre et coll. [11].

### 1.2.c. Dépolymérisation

A la suite de l'hydrolyse du nucléotide, les contacts latéraux entre les protofilaments sont altérés ce qui peut entraîner la dissociation des complexes tubuline-GDP [12]. Lors de la dépolymérisation, les microtubules peuvent présenter des extrémités frangées qui s'ouvrent vers l'extérieur du filament [9]. La longueur des protofilaments courbés dépend de la concentration des ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  [12]. Les

structures produites peuvent alors se retrouver sous forme d'oligomères ou de dimères libres ou encore s'organiser en anneaux de tubuline- $\alpha\beta$  simples ou doubles [13]. La dépolymérisation peut aussi être induite par certaines protéines partenaires du microtubule appelées MAPs (Microtubule Associated Protein).

### 1.2.d. Aspects thermodynamiques de l'instabilité dynamique

Chaque sous-unité de la tubuline- $\alpha\beta$  fixe un nucléotide GTP (Guanosine triphosphate). Le nucléotide situé dans la sous-unité tubuline- $\alpha$  (site N) est enfoui à l'interface intra-dimère et n'est pas hydrolysable au contraire du nucléotide situé dans la sous-unité tubuline- $\beta$  (site E). Le phosphate inorganique produit par l'hydrolyse peut diffuser dans le solvant. En revanche, le nucléotide GDP (guanosine diphosphate) résultant de l'hydrolyse ne peut être échangé qu'à l'issue de la dépolymérisation des MT. De ce fait, la plupart des sous-unités tubuline- $\beta$  dans le microtubule contiennent du GDP dans leur site E.

L'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire pour la polymérisation de la tubuline. En effet, la polymérisation de la tubuline en présence d'analogues du GTP faiblement hydrolysables tel que le guanylyl-(alpha, beta)-methylene-diphosphonate (GMPCPP), voire non hydrolysables tel que le GMPPNP (guanylyl Imidodiphosphate) produit des MT stables [14, 15]. Par ailleurs, les MT GMPCPP sont plus rigides que les MT GDP. Ils ont une dépolymérisation plus lente et ne présentent pas de phénomènes d'instabilité dynamique. En conclusion, l'hydrolyse du GTP se fait rapidement dans le microtubule et est nécessaire pour l'instabilité dynamique du microtubule. Par ailleurs, la présence du nucléotide GDP dans le site E de l'hétérodimère de tubuline rend le microtubule plus sensible à la déstabilisation.

Le microtubule doit être stabilisé pour permettre la polymérisation. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la stabilisation du microtubule.

#### 1.2.d.1. Modèle de la coiffe de nucléotide guanoside

Si l'incorporation de tubuline-GTP dans le microtubule est plus rapide que l'hydrolyse du nucléotide [16], il y aura une accumulation de tubuline-GTP à l'extrémité du MT. La polymérisation des microtubules pourrait conduire à la présence d'une coiffe de complexes tubuline-GTP. Cela est compatible avec l'observation que l'affinité de la tubuline- $\alpha\beta$  est plus importante pour la tubuline-GTP

que pour la tubuline-GDP. Dans ces conditions, une seule couche de tubuline-GTP coiffant le microtubule serait suffisante pour le stabiliser. [17]

Il a été initialement proposé que les complexes tubuline-GDP-Pi participent à la coiffe [18]. Cependant, une étude récente suggère que les phosphates inorganiques des complexes tubuline-GDP·Pi de l'extrémité (+) des microtubules sont échangés avec le solvant et ne s'accumulent ni ne stabilisent les extrémités [19]. De plus il a été montré que le Pi ne stabilise pas le microtubule [20, 21].

#### 1.2.d.2. Modèle de la coiffe conformationnelle

Le feuillet courbe observé aux extrémités des microtubules en cours de polymérisation (décrit au Chapitre I.1.2.b), pourrait constituer une coiffe structurale qui serait mécaniquement plus stable que le cylindre du microtubule. Les protofilaments sont des structures intrinsèquement courbes et énergétiquement relaxées. Lorsqu'ils interagissent latéralement pour former un feuillet, un changement de courbure s'opère qui génère une contrainte mécanique. Plus le feuillet se referme en tube, plus cette énergie élastique s'accumule sous forme de stress dans la paroi du microtubule. Avant sa fermeture totale, le feuillet passerait par un état métastable et ne pourrait totalement se refermer en microtubule que si la coiffe n'est pas déstabilisée [22]. Ainsi, le feuillet est une structure plus stable que le cylindre formant le microtubule [10].

Ce modèle est compatible avec celui d'une coiffe de nucléotide guanoside. Selon cette hypothèse, le protofilament présente à son extrémité en élongation une courte coiffe droite de tubuline-GTP ou GDP·Pi. Cette coiffe réduirait la courbure du protofilament, faciliterait la formation des contacts latéraux, et permettrait la formation du microtubule. L'ensemble des contacts latéraux avec les tubulines voisines empêcherait la courbure induite par l'hydrolyse du GTP en GDP, générant ainsi une contrainte. L'énergie stockée sous forme de tension mécanique dans la paroi du microtubule serait libérée lors des catastrophes.

### ***1.3. Fonction et activité***

Le microtubule participe à un grand nombre de fonctions cellulaires. Les trois tâches prédominantes réalisées par les microtubules impliquent toutes leur mouvement : transport intracellulaire, motilité et division cellulaire [23].

### 1.3.a. Transport intracellulaire

Le rôle des microtubules dans le transport intracellulaire est très important notamment dans les cellules nerveuses. Les ribosomes présents dans le corps de la cellule peuvent se trouver à plusieurs centimètres de la synapse où la synthèse des protéines peut-être nécessaire. Il en va de même pour les mitochondries et les vésicules. Les microtubules constituent un réseau sur lequel, les protéines telles que la kinésine ou la dynéine se déplacent. Le transport actif de ces organelles est bien plus rapide que la diffusion. En effet, les protéines motrices peuvent se déplacer à une vitesse de 3 fm/s soit 25 mm/jour. La kinésine réalise le transport antérograde, du MTOC vers l'extrémité (+) du microtubule tandis que la dynéine effectue le transport rétrograde, vers l'extrémité (-).

### 1.3.b. Motilité

Comme cela a été indiqué précédemment (Chapitre I.1.1), les microtubules sont présents dans les cils et les flagelles, appareils cellulaires communs pour la nage et le déplacement des cellules. L'organisation des microtubules ainsi que leurs interactions avec les protéines motrices sont à l'origine du mouvement des cils et des flagelles, essentiels pour le déplacement des spermatozoïdes par exemple.

### 1.3.c. Division cellulaire

La ségrégation des chromosomes constitue le rôle le plus important des microtubules dans la cellule et est largement dépendante de la dynamique des microtubules et notamment du *treadmilling*. Durant la prophase, les microtubules sont responsables de l'alignement puis de la séparation de centrosomes. Lors de la prométaphase, les MT commencent à interagir avec les chromosomes au niveau des kinétochores. En métaphase, deux centrosomes sont de part et d'autre de la cellule alors que les chromosomes ont été dupliqués. L'alignement des paires de chromosomes est vérifié à la suite de quoi elles sont séparées par les MT lors de l'anaphase.

De par leurs fonctions cellulaires, les MT sont à la fois impliqués dans certaines maladies telles que certaines maladies neurodégénératives (Maladie d'Alzheimer, Maladie de Parkinson, paraplégie spastique et certaines formes de schizophrénie) et la cible de certaines molécules tel que le Taxol ainsi que les vinca-alcaloïdes dans le traitement contre le cancer.

## 2. $\alpha\beta$ -tubuline

### 2.1. *Isotype et expression*

Les séquences protéiques des sous-unités tubuline- $\alpha$  et  $-\beta$  ont été déterminées en 1981 [24, 25]. L'existence d'isotypes de la tubuline, codés par différents gènes, a été confirmée par ces mêmes travaux. La plupart des organismes comptent plusieurs isotypes de la tubuline. Chez l'être humain, on compte ainsi 7 isotypes pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et 8 pour la sous-unité tubuline- $\beta$  (revue dans [26]).

Le niveau d'expression des isotypes de la tubuline varie selon les tissus. Ainsi, l'isotype tubuline- $\beta$ I est l'isotype le plus répandu chez les mammifères et notamment chez l'homme tandis que l'isotype  $\beta$ III est présent essentiellement dans les neurones. L'expression des isotypes de la tubuline peut également être modifiée par des traitements médicamenteux. C'est le cas notamment de l'isotype tubuline- $\beta$ III qui peut-être surexprimé dans les cellules du cancer de la prostate traitées au Taxol, ce qui leur confère une résistance (revue dans [27]). Cet isotype a d'ailleurs été proposé comme biomarqueur du développement des cancers du sein ou des cancers du poumon à cellules non petites [28, 29].

Les différences entre les isotypes sont essentiellement portées par l'extrémité C-Terminale de chaque sous-unité de la tubuline. Par ailleurs, l'extrémité C-Terminale, riche en acides aminés glutamates et glycines, est la cible d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles telles que les polyglutamylations et les polyglycylations. Ces modifications post-traductionnelles participent à la régulation de l'activité de la tubuline dans la cellule.

### 2.2. *Structure*

#### 2.2.a. Structures expérimentales

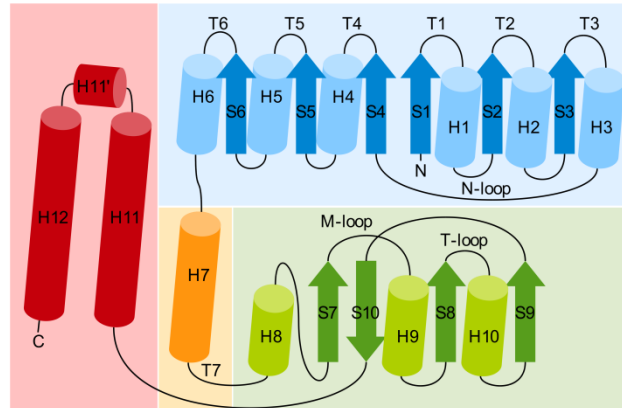
La structure de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  a été résolue pour la première fois par diffraction aux électrons en 1998 [30] à une résolution de 3,7 Å (PDB : 1TUB) puis raffinée à 3,5 Å (PDB : 1JFF) en 2001 [31]. Ces structures ont été obtenues en présence de Taxol et de zinc. Les ions zinc favorisent l'assemblage d'hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  en feuillet bidimensionnels dans lesquels les protofilaments sont arrangés de manière antiparallèle. Les interactions latérales ainsi que la conformation de l'hétérodimère sont donc différentes de celles existant dans le microtubule. Ces deux structures ont permis une meilleure compréhension de l'interaction tubuline-Taxol mais aussi une description des structures secondaires et tertiaires de la tubuline. En 2000, la première structure du complexe T2R est obtenue par diffraction aux rayons X à 3.95 Å (PDB ID : 1FFX) [32]. En 2004, la

même équipe a résolu la structure du complexe T2R-colchicine (PDB ID : 1SA0) à 3,58 Å [33]. La protéine RB3 est une protéine de la famille de la stathmine qui séquestre deux hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  favorisant ainsi la dépolymérisation. Plus récemment, trois nouvelles structures de complexes de type T2R où la tubuline a été remplacée par une tubuline clivée par la subtilisine (sTubuline) ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Dans ces complexes, le nucléotide était soit le GTP (PDB ID : 3RYF), ou GDP (PDB ID : 3RYI) ou encore le nucléotide faiblement hydrolysable GMPCPP (PDB ID : 3RYH) [34]. A partir de ces structures, Nawrotek et coll. [34] ont proposé un rôle du nucléotide dans l'assemblage de la tubuline.

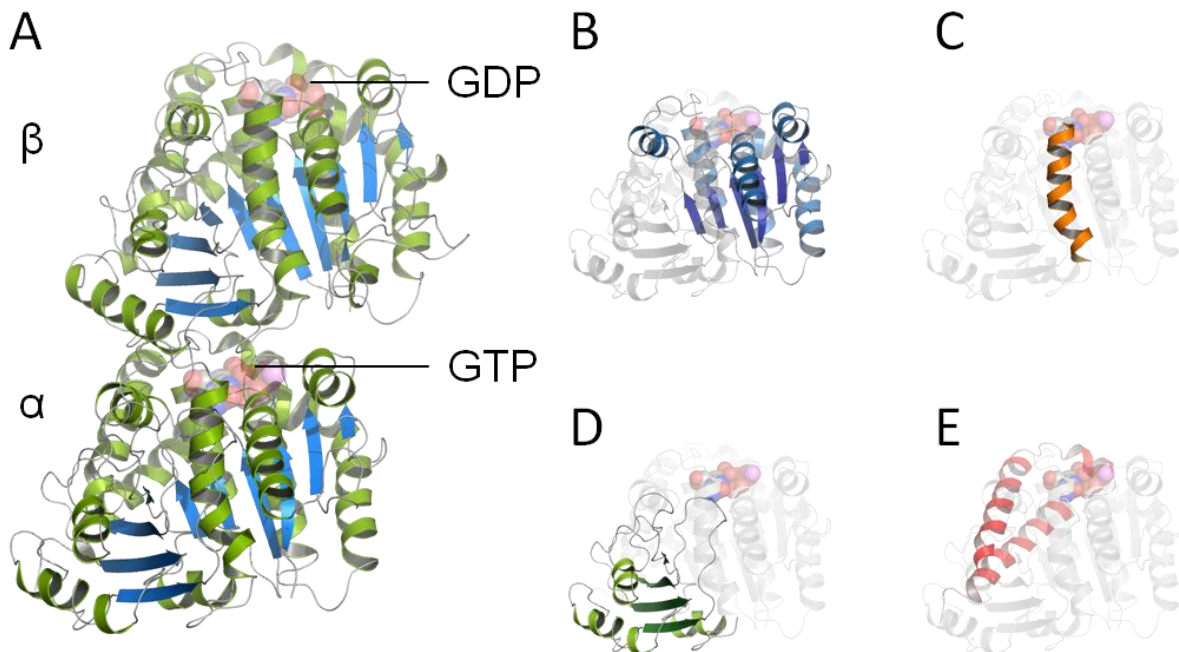
### 2.2.b. Structure secondaire et tertiaire

Malgré une identité de séquences relativement faible (40%) (voir Annexe 2), les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la tubuline partagent le même repliement organisé en trois domaines (Figure 8) : i) un domaine N-terminal composé d'un feuillet  $\beta$  parallèle de six brins flanqués (S1-S6) par 6 hélices  $\alpha$  (H1-H6) formant un repliement de type Rossmann et portant le site de fixation du nucléotide (Figure 9 B), ii) un domaine intermédiaire relié au domaine N-terminal par l'hélice H7 (Figure 9 C), constitué d'un feuillet  $\beta$  mixte de 4 brins (S7-S10) et de 4 hélices  $\alpha$  (H8-H10) (Figure 9 D), iii) et enfin d'un domaine C-terminal en structure hélice-boucle-hélice (H11-H12) (Figure 9 E). Une description des structures secondaires associées à la séquence de la tubuline- $\alpha\beta$  est disponible en Annexe 3. De plus, le domaine N-terminal possède une longue boucle flexible et non repliée : la boucle N ou *N-loop*. D'autre part, le domaine intermédiaire porte une boucle participant aux contacts avec le protofilament adjacent dans le microtubule : la boucle M ou *M-loop* ainsi qu'une boucle entre les structures S8 et H10 : la boucle T ou *T-loop*. Cette dernière est plus courte dans la sous-unité tubuline- $\beta$  et forme ainsi le site de fixation des taxanes. A noter également dans le domaine intermédiaire, la boucle T7 (entre les structures H7 et S7) qui participe aux interactions avec le nucléotide.





**Figure 8 :** Diagramme 2D de la structure secondaire et tertiaire d'une sous-unité de tubuline. Les hélices  $\alpha$  sont représentées par des cylindres, les brins  $\beta$  par des flèches et les boucles par des traits noirs. Le domaine N-terminal apparaît en bleu, l'hélice inter-domaine H7 en orange, le domaine intermédiaire en vert et enfin le domaine C-terminal en rouge.

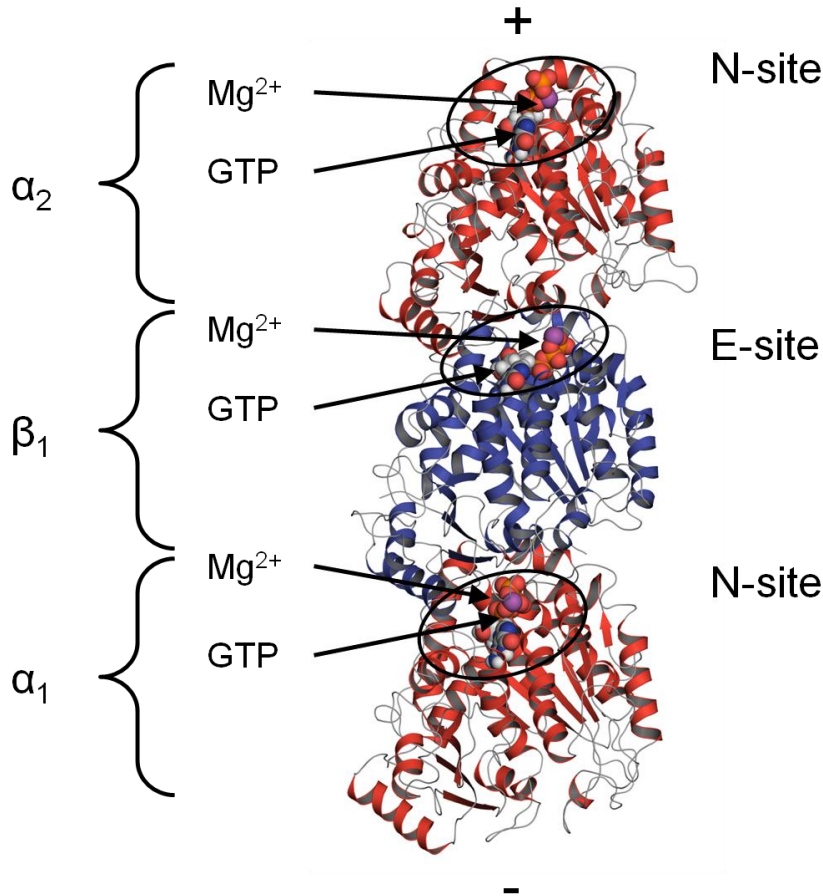


**Figure 9 :** Structure de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . (A) Structures secondaires de la tubuline- $\alpha\beta$  représentées en ruban, vue de l'intérieur du microtubule. Les brins  $\beta$  apparaissent en bleu et les hélices  $\alpha$  en vert. Les nucléotides GTP et GDP sont représentés en sphères. Organisation du domaine N-terminal (B), de l'hélice H7 (C), du domaine intermédiaire (D) et du domaine C-terminale (E) dans la sous-unité tubuline- $\alpha$ .

### 2.2.c. Activité catalytique de la tubuline

Chaque sous-unité de la tubuline- $\alpha\beta$  peut accueillir un nucléotide ainsi qu'un cation divalent, de préférence le GTP et le  $Mg^{2+}$  (Figure 10) [35, 36]. Dans la sous-unité tubuline- $\alpha$ , le nucléotide est

enfoui à l'interface intra-dimère et ne peut-être hydrolysé ni échangé ; on parle de site N [37]. Au contraire, le nucléotide GTP dans la sous-unité tubuline- $\beta$  peut être hydrolysé en GDP et  $P_i$  puis échangé avec du GTP en solution. A la suite de l'hydrolyse, le  $P_i$  et le  $Mg^{2+}$  sont expulsés vers le solvant [36, 38, 39].



**Figure 10 :** Localisation des sites N et E dans un protofilament. Les sous-unités tubuline- $\alpha$  et  $-\beta$  sont représentées en rubans rouges et bleus respectivement. Les nucléotides et le magnésium sont représentés en sphères. La polarité du microtubule est indiquée par les signes (+) et (-). Les sous-unités  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  représentent l'hétérodimère biologique.

L'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  possède une activité GTPase de base quasiment nulle [40, 41]. En effet, l'hydrolyse du GTP portée par la sous-unité tubuline- $\beta$  ne peut avoir lieu que lorsque le site-E est coiffé par un autre hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  ; elle est sa propre protéine activatrice de GTPase (GTPase activating protein) [42]. L'hydrolyse se fait donc uniquement après contact tubuline-tubuline dans le microtubule ou dans les oligomères de tubuline [39]. En revanche, l'incorporation dans un oligomère ou dans le microtubule n'entraîne pas automatiquement l'hydrolyse. Des complexes tubuline-GTP ont été observés dans le microtubule par immunofluorescence grâce à des anticorps spécifiques

de la conformation avant hydrolyse [43]. De plus, l'addition d'hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  n'est pas exclusive aux complexes tubuline-GTP. En effet, les complexes tubuline-GDP peuvent également s'assembler dans le microtubule.

Il est reconnu que l'hydrolyse du GTP fragilise la stabilité du microtubule. Néanmoins, les mécanismes de l'hydrolyse du GTP restent mal compris, de même que l'effet du nucléotide sur la stabilité du MT. Deux modèles ont été proposés pour comprendre l'effet du GTP sur l'assemblage et de l'hydrolyse sur la dépolymérisation.

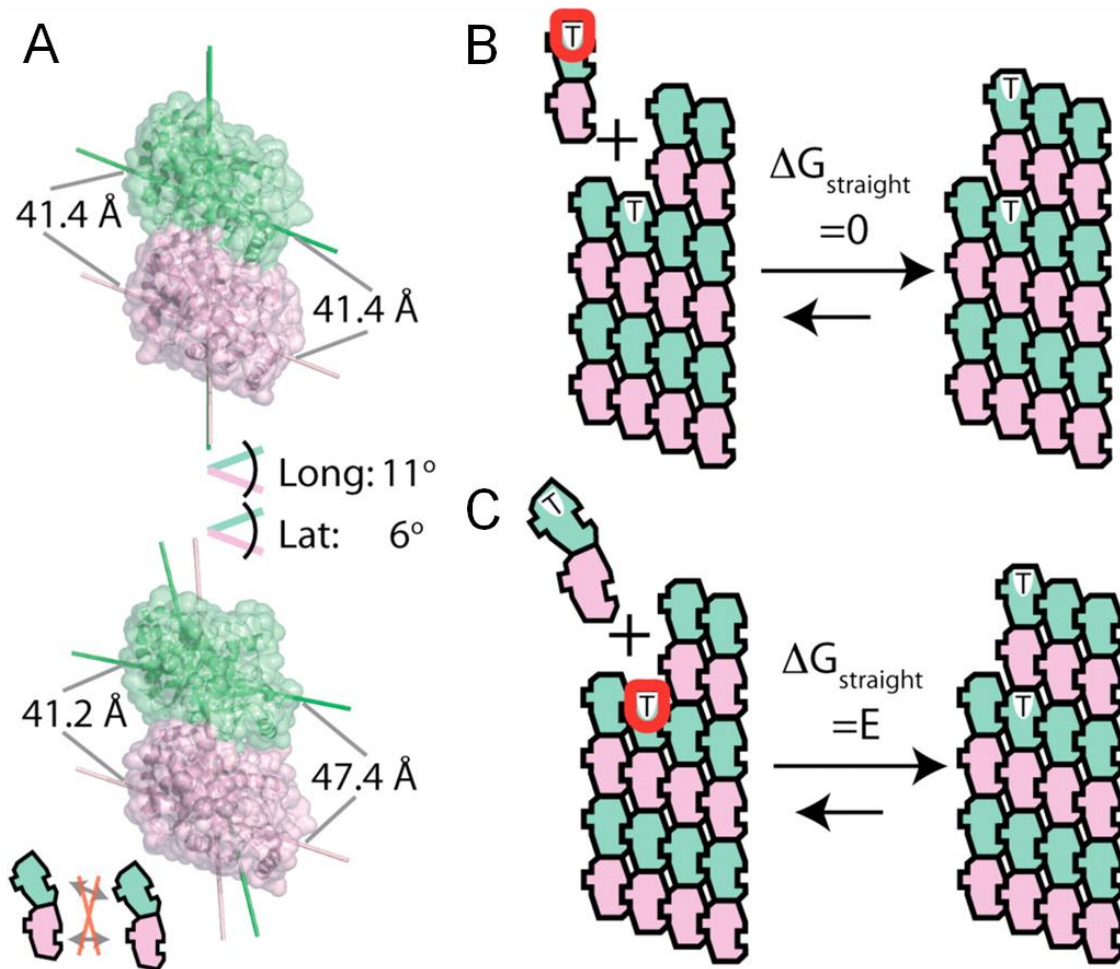
#### 2.2.c.1. Le modèle allostérique

Le premier modèle, appelé modèle allostérique, part du principe que le complexe tubuline-GTP est sensiblement plus droit que le complexe tubuline-GDP (**Figure 11 A**) [44]. L'incorporation dans le microtubule serait facilitée par une absence de réarrangements structuraux et un coup énergétique nul (**Figure 11 C**).

#### 2.2.c.2. Le modèle *lattice*

Au contraire, le modèle *lattice* décrit par Buey et coll. [45] considère que les complexes tubuline-GTP et -GDP sont courbés en solution (**Figure 11 A**) et que le changement de conformation est la conséquence de l'intégration dans le microtubule plutôt que la cause. L'assemblage de la tubuline-GTP dans le microtubule nécessite d'importants réarrangements structuraux, avec un coup énergétique non-nul (**Figure 11 C**). Toutefois, les interactions dans le lacis sont plus fortes dans la conformation droite de la tubuline. Dans ce modèle, le rôle du nucléotide est de favoriser les contacts avec les protofilaments adjacents.

Le modèle *lattice* semble être le plus favorable. Des expériences basées sur la structure de la tubuline- $\gamma$  en présence de GTP $\gamma$ S et de GDP montrent qu'il n'y a pas de réarrangements structuraux associés au nucléotide dans la tubuline non-polymérisés [46]. Plus récemment, des simulations de dynamique moléculaire sur des protofilaments de tubuline- $\alpha\beta$  (hexamère) en présence de GTP et de GDP dans le site E ont montré que les deux complexes, tubuline-GTP et -GDP, ont des structures courbes en dehors du microtubule [47].



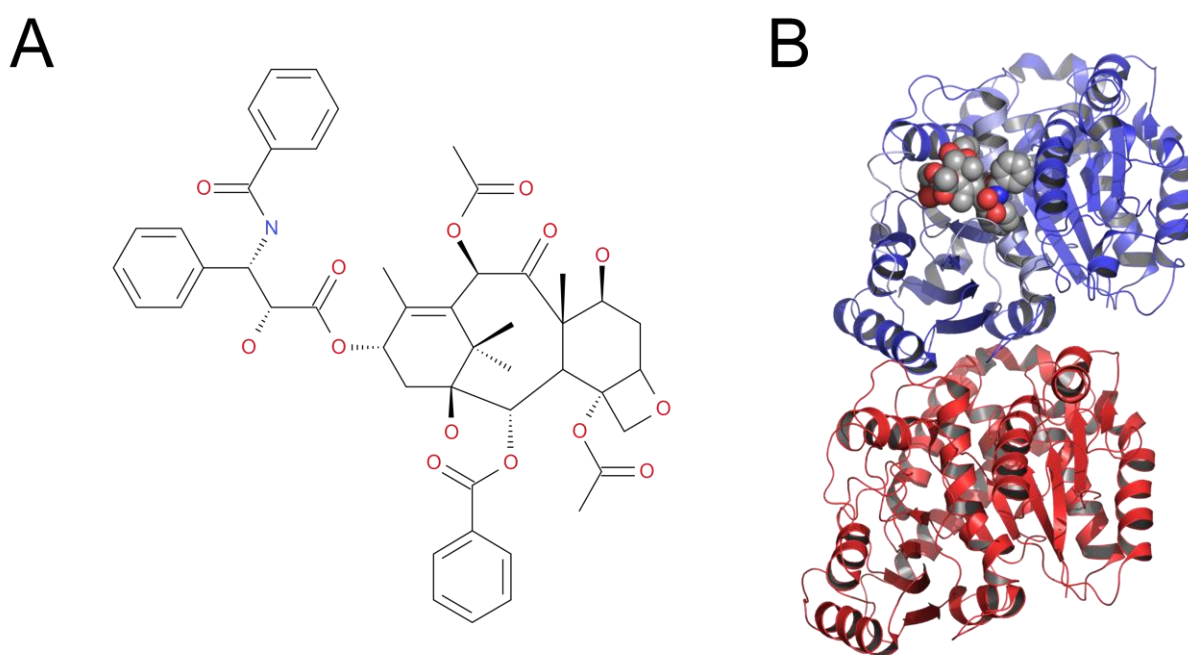
**Figure 11** : Conformations de la tubuline- $\alpha\beta$  et les modèles du rôle du GTP. (A) Les interfaces latérales et longitudinales sont parallèles dans la conformation droite de la tubuline (PDB : 1JFF, en haut) mais pas dans la conformation courbée (PDB : 1SA0, en bas). (B) Modèle allostérique : La tubuline-GTP est dans une conformation droite lorsqu'elle s'insère dans le MT, ce qui ne requiert pas d'énergie. (C) Modèle *lattice* : la conformation de la tubuline est courbe, même en présence de GTP dans le site E et son incorporation dans le MT requiert de l'énergie. Repris de Buey et coll. [45].

### 2.3. Poisons du fuseau mitotique

De nombreuses molécules naturelles peuvent interagir avec la tubuline et altérer la dynamique du microtubule. On peut classer ces molécules selon leur site de fixation sur l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ .

### 2.3.a. Les taxanes

Le paclitaxel (Taxol) est une molécule naturelle extraite de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*). Elle se fixe sur la sous-unité tubuline- $\beta$ , flanquée entre la boucle T, la boucle M et l'hélice H7 (Figure 12). Le Taxol permet la polymérisation des MT en dessous de la concentration critique, bloque leur dépolymérisation et favorise leur assemblage en fagot. Il est commercialisé dans le traitement du cancer depuis 1992.



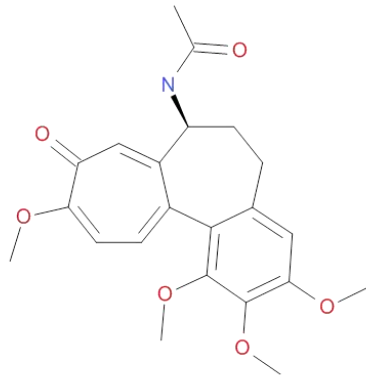
**Figure 12 :** Structure et fixation du Taxol sur l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . (A) Structure plane du Taxol. (B) Site de fixation du Taxol sur la tubuline- $\alpha\beta$  (PDB : 1JFF). Les structures secondaires sont représentées en rubans rouges pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et bleus pour la sous-unité tubuline- $\beta$ . Le Taxol est représenté en sphères. La vue correspond à la face interne du microtubule.

### 2.3.b. Les colchicinoïdes

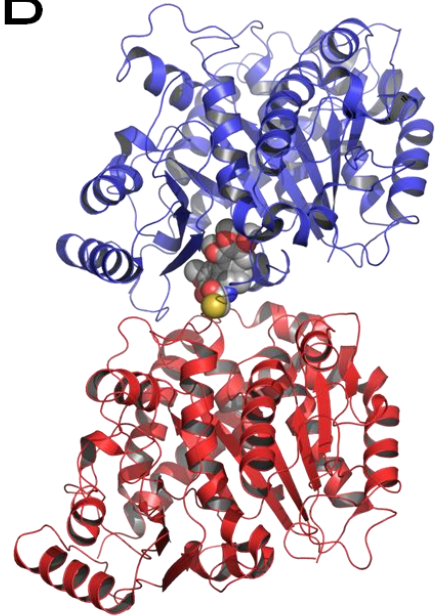
La colchicine est une molécule issue de la colchique (*Colchicum autumnale*). Il s'agit d'un alcaloïde constitué de trois cycles qui se fixe sur le domaine intermédiaire de la sous-unité tubuline- $\beta$ , au niveau de l'interface intra-dimère [33] (Figure 13). A faible dose le complexe tubuline-colchicine s'associe aux extrémités des MT et bloque leur dynamique. A plus forte concentration, on assiste à une dépolymérisation des microtubules et une altération du fuseau mitotique. Ainsi, la cellule est bloquée entre la prophase et la métaphase.

La colchicine possède des propriétés anti-inflammatoires, antimitotiques et antifibrotiques et est utilisée dans le traitement de maladies autoinflammatoires ainsi que de la goutte. De nombreuses molécules dérivées de la colchicine ou partageant certains groupements chimiques peuvent se fixer dans le site de la colchicine [48].

A



B

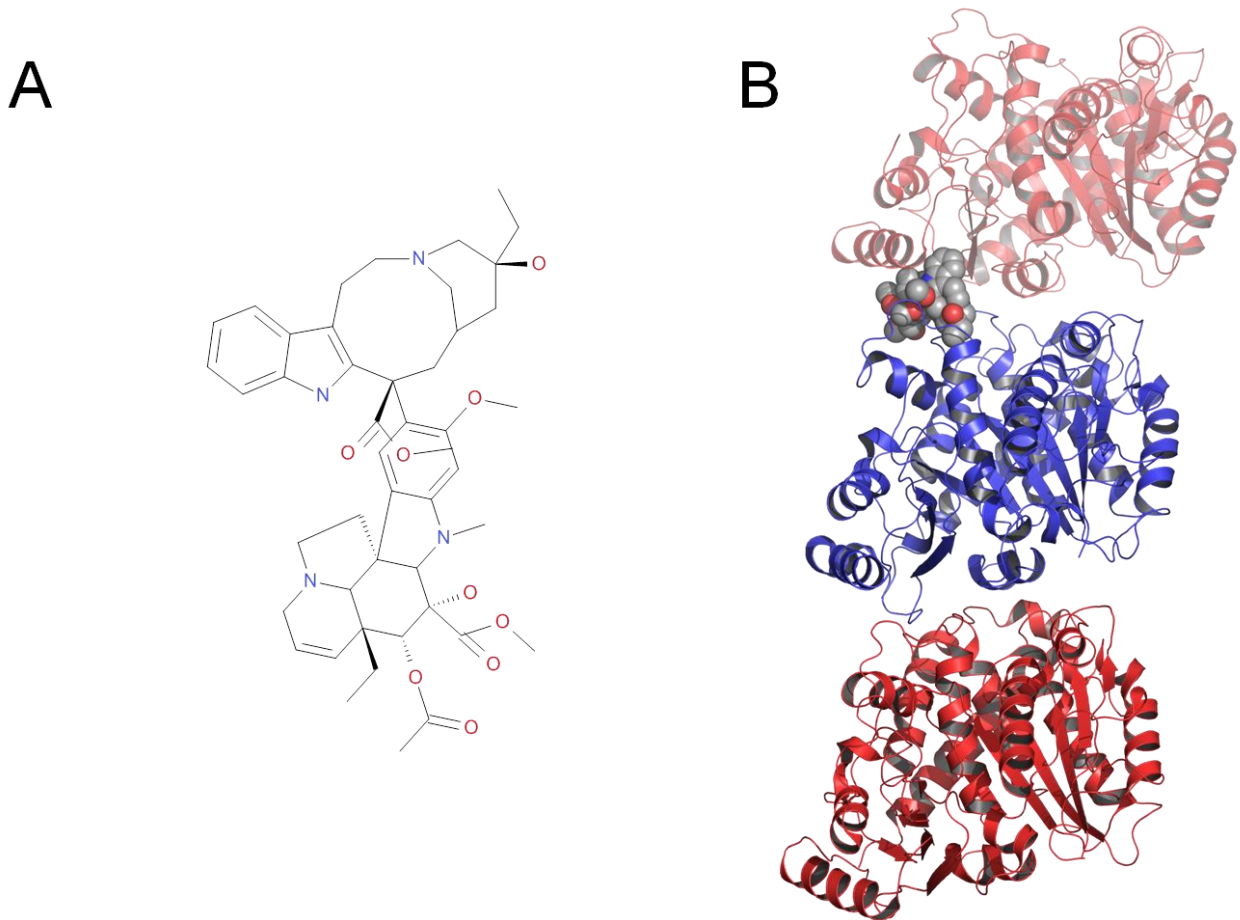


**Figure 13 :** Structure et fixation de la colchicine sur l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$ . (A) Structure de la colchicine. (B) Site de fixation de la DAMA colchicine sur la tubuline- $\alpha\beta$  (PDB : 1SA0). Les structures secondaires sont représentées en rubans rouges pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et bleus pour la sous-unité tubuline- $\beta$ . La DAMA-colchicine est représentée en sphères à l'interface intra-dimère. La vue correspond à la face interne du microtubule.

### 2.3.c. Les vinca-alcaloïdes

Les vinca-alcaloïdes issues des pervenches (*Catharanthus roseus*) se fixent à l'interface entre sous-unité tubuline- $\alpha$  d'un hétérodimère et la sous-unité tubuline- $\beta$  de l'hétérodimère sous-jacent (Figure 14). L'effet de la vinblastine sur le microtubule dépend de sa concentration : en dessous de 1  $\mu\text{M}$  la vinblastine inhibe la dynamique du MT. Entre 1 et 10  $\mu\text{M}$ , la vinblastine inhibe la polymérisation du MT. Au-delà de 10  $\mu\text{M}$ , elle favorise la polymérisation de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . En revanche, au lieu de s'assembler en MT, la tubuline va s'arranger en spirale. L'ajout de polyanions réduit l'activité de la vinblastine mais la suppression de l'extrémité C-terminale de la sous-unité tubuline- $\beta$  restaure l'assemblage normal de la tubuline. Il n'y a pas d'effet de l'extrémité C-terminale de la sous-unité

tubuline- $\alpha$ . La vinblastine est utilisée dans le traitement du cancer du poumon, du sein ou encore des lymphomes.



**Figure 14 :** Structure et fixation de la vinblastine à l'interface entre une sous-unité tubuline- $\beta$  et une sous-unité tubuline- $\alpha$ . (A) Structure de la vinblastine. (B) Site de fixation de la vinblastine sur la tubuline- $\alpha\beta$  (PDB : 1Z2B). Les structures secondaires sont représentées en rubans rouges pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et bleus pour la sous-unité tubuline- $\beta$ . La sous-unité tubuline- $\alpha$  coiffante est en transparence. La vinblastine est représentée en sphères. La vue correspond à la face interne du microtubule.

De nombreux dérivés de ces molécules naturelles ont été développés pour augmenter leur activité. Cependant, les cellules traitées peuvent développer des mécanismes de résistance que ce soit par l'apparition de mutations ou bien par la production d'isotypes de la tubuline pour lesquels l'affinité des drogues est réduite ou encore qui restaurent le phénotype naturel. L'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  reste ainsi la cible de nombreuses recherches et développements pour proposer de nouveaux traitements plus efficaces, mieux adaptés et donc moins toxiques pour les patients.

### 3. Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de la tubuline

La modélisation moléculaire consiste en un ensemble d'approches et de méthodes informatiques qui représentent les phénomènes physiques, chimiques et biologiques par des équations mathématiques. La modélisation moléculaire permet de simuler des systèmes isolés, à l'échelle microscopique afin de calculer des observables macroscopiques.

Dans le cas de la tubuline et des microtubules, plusieurs études de dynamique moléculaire ont déjà été entreprises pour étudier l'effet du nucléotide sur la dynamique de la tubuline. Keskin et coll. ont simulé un hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en présence de GDP et de taxol à l'aide d'une méthode gros grains [49]. Ils observent que la fluctuation est la plus importante au niveau des interfaces longitudinales tandis que le Taxol la réduit au niveau de la boucle M, renforçant les interactions avec les protofilaments adjacents. Plus tard, des simulations de dynamiques moléculaires couplées à des analyses de spectrométrie de masse ont montré que l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  était courbé quelque soit le nucléotide présent dans le site E, suggérant que ce sont les interactions dans le microtubule qui redressent la tubuline. [50]. Une autre étude a proposé que le  $\text{P}\gamma$  joue un rôle dans le redressement de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  [51]. En 2011, une étude sur un protofilament composé de trois hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  a confirmé la courbure de la tubuline- $\alpha\beta$  quelque soit le nucléotide présent dans le site [47]. Ces expériences comparent le nucléotide GTP et GDP dans le site E. En revanche, l'état intermédiaire GDP-Pi n'a jamais été étudié alors qu'il permettrait d'obtenir des informations sur les mécanismes de la catalyse du nucléotide.

D'autres expériences de dynamique moléculaire (voir Chapitre II.3) se sont concentrées sur l'étude de l'interaction tubuline-ligand. En 2004, Mitra et Sept ont réalisé une dynamique moléculaire de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  ainsi que des amarrages moléculaires (voir Chapitre II.6) pour prédire le site de fixation d'une série de depsipeptides (peptide dans lequel une ou plusieurs des liaisons amides sont remplacées par des liaisons ester) dont la dolastatine ou la phomopsine [52]. La même approche a été utilisée pour identifier le site de fixation de l'oryzaline un pesticide de la famille des dinitroanilines [53]. Mitra et Sept ont par la suite simulé deux protofilaments adjacents, chacun composé d'un hétérotrimère de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  en présence de Taxol. Ils ont proposé que le Taxol modifie la structure de la boucle M pour renforcer les interactions entre protofilaments et augmente la fluctuation au niveau du site de fixation du nucléotide, ce qui favorise la stabilisation longitudinale [54]. Plus récemment, la dynamique moléculaire couplée à une mesure de l'énergie libre de liaison a été utilisée pour étudier



l'interaction entre la tubuline et des dérivés arylthioindoles [55]. Enfin, une étude s'appuyant sur les mêmes méthodes a permis de développer des peptides antimitotiques ciblant la tubuline [56].

## 4. Conclusion

Les microtubules sont des constituants majeurs du cytosquelette dont l'activité est indissociable de la dynamique de polymérisation et dépolymérisation de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Les microtubules contribuent fortement à l'organisation intracellulaire telle que la ségrégation des chromosomes ; la tubuline est d'ailleurs une cible pour les thérapies anticancéreuses ainsi qu'un marqueur potentiel de certaines tumeurs. Le microtubule et la tubuline ont été largement étudiés tant au niveau de leurs propriétés physico-chimiques qu'au niveau de leur structure macromoléculaire ou atomique. Néanmoins, un certain nombre de questions ne sont pas encore totalement élucidées telles que les mécanismes de l'hydrolyse du nucléotide ou encore les effets des molécules thérapeutiques et des protéines partenaires sur leur dynamique. La taille de ces complexes protéiques ainsi que les limitations méthodes de cristallographies aux rayons X ou de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont en partie responsables de ces points d'ombre. La modélisation moléculaire permet de contourner certaines de ces limitations et d'obtenir des informations pour interpréter certains observables macroscopiques.



# Chapitre II.

# Techniques de

# Modélisation

# Moléculaire

---

# 1. Historique et Généralités

La modélisation moléculaire est indissociable de la résolution de la structure des molécules et plus particulièrement des biomolécules. Les méthodes de résolution de structures moléculaires par diffraction aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire remontent à la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle [57]. Ainsi c'est en 1953 que James Watson et Francis Crick présente la structure tridimensionnelle (3D) d'une double hélice d'ADN [58]. Suite au travaux de Pauling sur l'hélice  $\alpha$  en 1951[59], il faut attendre 1958 pour que la première structure tridimensionnelle d'une protéine complète : la myoglobine soit résolue [60]. Depuis, plus de 75000 structures 3D ont été enregistrées dans la Protein Data Bank (PDB) [61] dont la majeure partie a été obtenue par diffraction aux rayons X (plus de 65000). L'intérêt pour la structure 3D des protéines est apparu lorsque la relation structure-fonction a été établie avec en perspectives la compréhension des phénomènes cellulaires et le développement de molécules potentiellement thérapeutiques, précurseurs de médicaments. Plus récemment, la croissance quasi-exponentielle du nombre de structures 3D s'explique également par les initiatives de génomique structurale, apparues au tournant du 20<sup>ème</sup> et du 21<sup>ème</sup> siècle suite aux développements des techniques. Ces approches haut-débit de résolution des structures des protéines (*a contrario* des approches standards focalisées) cherchent à déterminer la structure pour prédire la fonction de toutes les protéines d'une grande variété de génomes. La génomique structurale cherche également à réduire les coûts de production des protéines, accélérer et faciliter la détermination du repliement des protéines. Pour ce faire, des méthodes informatiques, fondées sur des données génomiques vont être utilisées telles que la modélisation moléculaire.

L'histoire de la modélisation moléculaire quant à elle prend origine à la moitié du 19<sup>ème</sup> siècle où les premières structures moléculaires bidimensionnelles sont mises sur le papier par Johan Josef Loschmidt. Quelques années plus tard, dans les années 1860, Louis Pasteur introduit la 3D grâce à ses travaux sur les molécules chirales. La modélisation moléculaire devient fortement attachée aux champs de forces dont le concept apparait au début du 20<sup>ème</sup> siècle et dont découlera le développement de la mécanique moléculaire (MM) ou méthode de champs de forces empirique dans les années 1970 par Allinger [62]. A partir des années 1950, les premières méthodes informatiques de mécanique moléculaire sont développées tels que l'algorithme de Metropolis et les bases de la méthode de Monte-Carlo. Depuis, la modélisation moléculaire suit un développement continu des méthodes, bénéficiant d'Internet, de la vulgarisation de l'informatique et de l'explosion de la puissance de calcul. Aujourd'hui, la modélisation moléculaire est encore accélérée grâce aux processeurs graphiques et permet d'élucider la fonction des protéines et les mécanismes des molécules actives.

## 2. La mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire représente les atomes comme des sphères dures incompressibles, portant des charges partielles fixes et leurs liaisons comme des ressorts. Les paramètres du champ de force sont issus de données expérimentales telles que l'étude par spectrométrie infrarouge de la vibration des liaisons ou encore la mesure de la longueur des liaisons par cristallographie aux rayons X. Des méthodes *ab initio* telles que la mécanique quantique peuvent également apporter des informations sur les angles de torsions ou sur la fréquence de vibration des liaisons par exemple. La mécanique moléculaire s'appuie sur le champ de force, à savoir sur une somme de termes énergétiques harmoniques représentant les interactions liantes et non-liantes qui ont lieu à l'intérieur d'une molécule ou entre plusieurs molécules.

### 2.1. *Le champ de force*

Le champ de force permet de décomposer l'énergie totale ou énergie potentielle d'un système moléculaire en une somme de termes correspondant aux énergies liantes et non-liantes (Équation 1). Lors des simulations de dynamique moléculaire j'ai utilisé le champ de force de Charmm (CHARMM27) [63-65] et le champ de force général d'Amber (GAFF) [66-68]. Je présenterai leurs différences au cours de la description des termes de l'équation générique d'un champ de force.

$$E_{totale} = E_{liante} + E_{non-liante} \quad ( 1 )$$

Où

$$E_{liante} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion} \quad ( 2 )$$

Et

$$E_{non-liante} = E_{vdW} + E_{elec} \quad ( 3 )$$

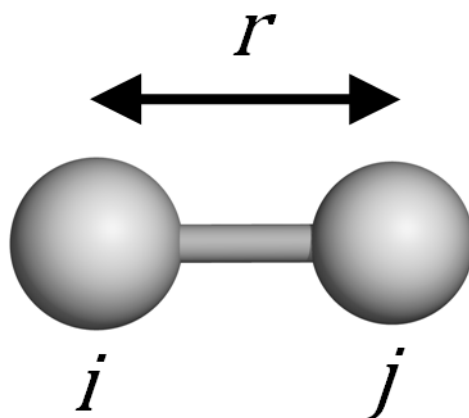
Le terme d'énergie liante (équation 1) prend en compte les interactions séparées par au plus trois liaisons. On parle d'interactions 1-4. Au-delà, les interactions entre les atomes sont calculées avec le terme d'énergie non-liante. Nous allons voir plus en détail les différents termes des équations 2 et 3.

#### 2.1.a. Le terme d'élongation « stretch »

La distance d'une liaison covalente entre deux atomes (Figure 15) est modélisée par un oscillateur harmonique simple (équation 4).

$$E_{ij}^{liaison}(r_{ij}) = k_{ij}^r (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad ( 4 )$$

Avec  $i$  et  $j$  deux atomes séparés par une distance  $r$ ,  $r^0$  la distance à l'équilibre et  $k^r$  la constante de force déterminée de manière empirique. Ces deux derniers paramètres dépendent du type des atomes  $i$  et  $j$ .



**Figure 15 :** Distance entre deux atomes de carbone liés par une liaison covalente simple

### 2.1.b. Le terme de courbure «bend»

L'angle formé par trois atomes liés par des liaisons covalentes (Figure 16) est également modélisé par un oscillateur harmonique qui dépend du type de chacun des trois atomes (équation 5).

$$E_{ijk}^{angle}(\theta_{ijk}) = k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad ( 5 )$$

Avec  $i$ ,  $j$  et  $k$  les trois atomes séparés par un angle  $\theta$ ,  $\theta^0$  l'angle à l'équilibre et  $k^\theta$  la constante de force.

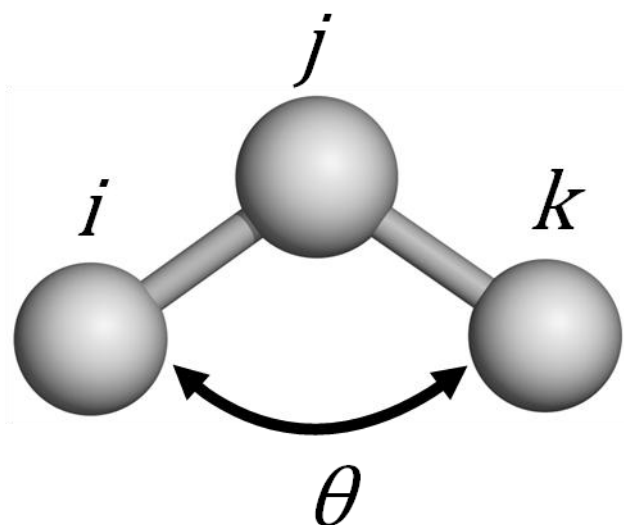


Figure 16 : Angle  $\theta$  entre trois atomes  $i$ ,  $j$  et  $k$

### 2.1.c. Le terme de torsion

L'énergie de torsion entre quatre atomes (Figure 17) séparés par trois liaisons dépend de quatre paramètres : la multiplicité  $\varphi$  ou le nombre de minima d'énergie, la phase  $\gamma$  ou l'angle auquel l'énergie est la plus basse, la barrière énergétique  $Vn$  ou l'écart entre le maximum et le minimum énergétique et enfin l'angle dièdre (Figure 18).

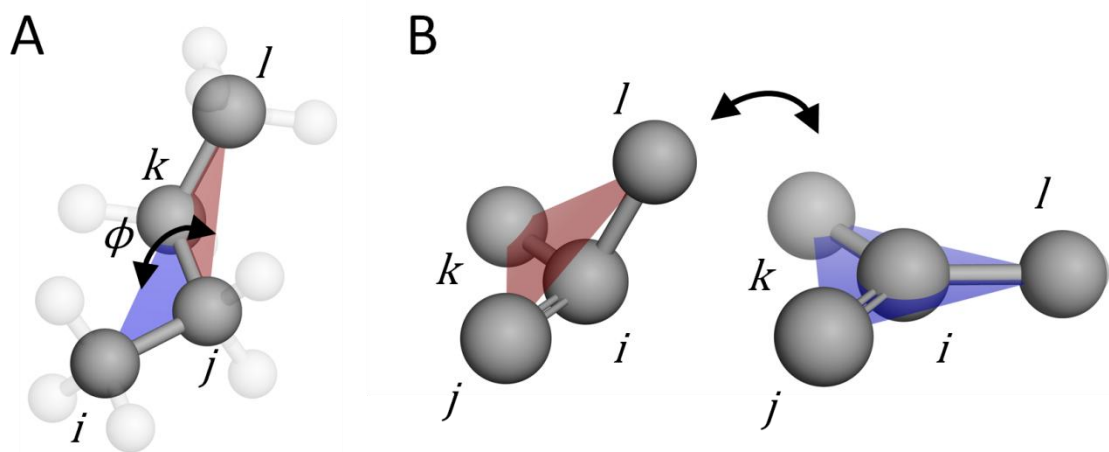
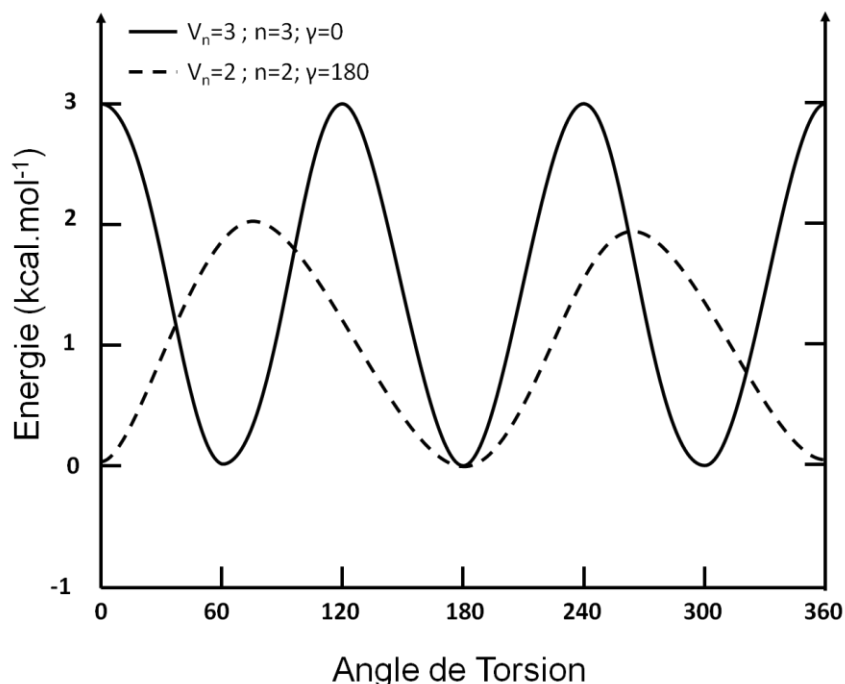


Figure 17 : Angle de torsion entre quatre atomes de carbones. (A) Angle dièdre. (B) Angle impropre



**Figure 18 :** Courbe de l'énergie potentielle de torsion pour différente valeur d'amplitude  $V_n$ , phase  $\gamma$  et de multiplicité  $n$ .

L'énergie de torsion pour les angles dièdres est calculée avec l'équation 6.

$$E_{ijkl}^{dièdre}(\phi_{ijkl}) = \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n_{ijkl}\phi_{ijkl} - \gamma_{ijkl}^0)), n_{ijkl} = 1, 2, 3, 4, 6 \quad (6)$$

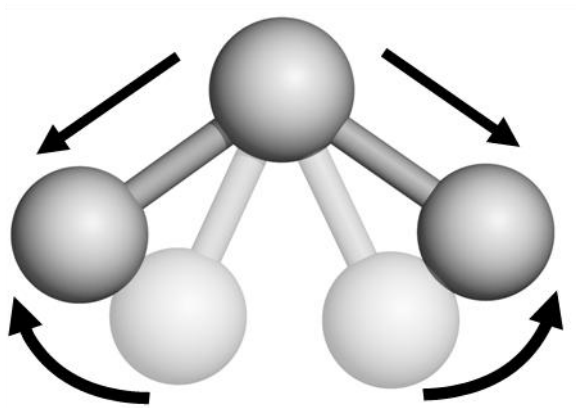
Le terme de torsion peut aussi inclure une équation pour le calcul des angles impropres afin de s'assurer entre autre de la planéité des cycles aromatiques.

D'autres termes dépendants de deux coordonnées internes (liaison, angle, angle dièdre) ou plus peuvent venir compléter le champ de force. On parle alors de termes croisés. On peut retrouver des termes croisés de types *stretch-stretch*, *stretch-bend* (Figure 19) ou encore *bend-bend-torsion* dans les champs de force plus évolués. Ainsi, les champs de force peuvent être classés selon leur niveau de précision :

- Classe I – champs de force décrit uniquement par des termes harmoniques sans termes croisés. (AMBER [69], CHARMM [64])
- Classe II – champs de force décrit par des termes anharmoniques et par des termes croisés (par exemple, l'augmentation de la longueur de la liaison C-H d'un acétaldéhyde en fonction de la rotation selon l'axe C-C) (Merck Molecular Force Field (MMFF) [70], MM2 [71], MM3 [72])



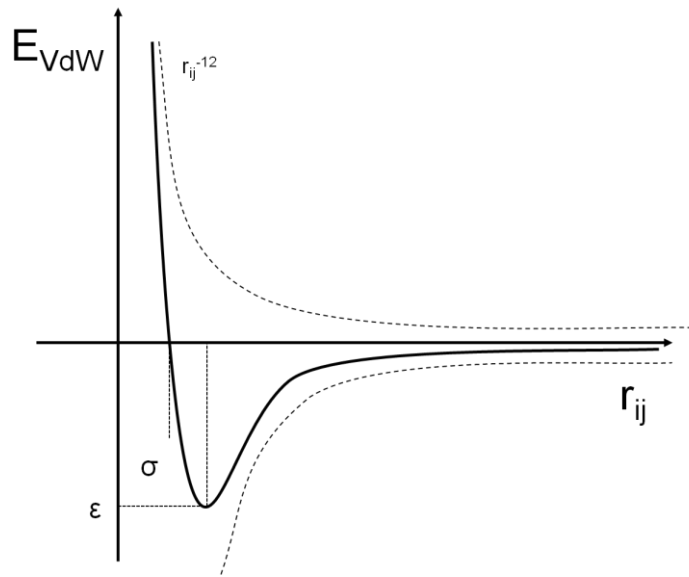
- Classe III – champ de force de classe II prenant également en compte les modifications chimiques telles que l'électronégativité ou des termes conjugués ou encore la polarisation (AMOEBE [73], SIBFA [74]).



**Figure 19 :** Couplage entre l'étirement des liaisons et l'écartement de l'angle.

#### 2.1.d. Termes d'interaction entre atomes non-liés

L'énergie d'interaction non-liante est calculée pour toutes les paires d'atomes séparées par plus de trois liaisons. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'énergie d'interaction non-liante entre les atomes d'un même angle dièdre est généralement comprise implicitement dans le terme d'interaction entre atomes liés. Le terme d'énergie non-liante se compose d'une part des énergies dites de van der Waals ayant la forme d'un potentiel de Lennard-Jones et d'autres par des énergies électrostatiques. Les énergies de van der Waals et électrostatiques sont particulièrement importantes pour le maintien de la structure des biomolécules.



**Figure 20 :** Potentiel de Lennard-Jones 6-12 représentant la courbe de l'énergie de van der Waals

2.1.d.1. Les interactions de van der Waals

Les interactions de van der Waals représentent les interactions électriques de faibles intensités notamment les interactions dipôle-dipôle et dipôle induits. Elles ont été mises en évidence par les travaux du chercheur éponyme sur l'argon en phase gazeuse. La force de van der Waals dépend de la distance entre les atomes. Elle est décrite par un potentiel de Lennard-Jones 6-12 (équation 7).

$$E_{ij}^{vdW} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad ( 7 )$$

Avec  $r_{ij}$  la distance entre les atomes  $i$  et  $j$ ,  $\epsilon$  le paramètre de Lennard-Jones et  $\sigma$  le rayon de Lennard-Jones. A la distance  $r_{ij}=\sigma$ , l'énergie de van der Waals est nulle tandis que  $\epsilon$  représente la profondeur du puits (Figure 20).

Elle a une composante répulsive ( $r^{12}$ ) qui prédomine en amont de la distance à l'équilibre et une composante attractive ( $r^6$ ) prédominante au-delà. L'énergie de van der Waals tend vers zéro quand la distance interatomique tend vers l'infini mais elle est rapidement négligeable, même à courte distance (supérieure à 1 nm).

Les champs de force d'Amber et de CHARMM utilisent une fonction du potentiel de Lennard-Jones légèrement différente (équation 8).

$$E_{ij}^{vdW} = \epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad ( 8 )$$

$\varepsilon$  représente toujours la profondeur du puits et cette valeur est obtenue pour une distance  $r_{ij}=\sigma$ . Cela permet de rendre le calcul plus efficace.

#### 2.1.d.2. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques s'appuient sur les distributions électroniques. En mécanique quantique, il est possible de déterminer cette distribution mais ces méthodes se limitent à de petits systèmes de l'ordre de la centaine d'atomes. En mécanique moléculaire, les charges sont attribuées à chaque atome sous forme de charges partielles de sorte à ce qu'elles représentent correctement le potentiel électrostatique de la molécule. L'énergie électrostatique est calculée selon le terme de Coulomb décrit dans l'équation 9.

$$E_{ij}^{elec}(r_{ij}) = \omega_{ij} \left( \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_{el} r_{ij}} \right) \quad (9)$$

Où  $\varepsilon_{el}$  est la constante diélectrique, généralement égale à 1 ;  $q$  la charge atomique, et  $\omega$  est un facteur pour atténuer les interactions entre des atomes séparés par trois liaisons maximum.

#### 2.1.e. Les algorithmes de minimisation de l'énergie

La probabilité d'existence d'un conformère d'une molécule dépend de son énergie de sorte que plus l'énergie d'un conformère est basse, plus sa probabilité d'existence est grande. Il est possible d'utiliser des méthodes de minimisation pour identifier la structure la plus stable d'une molécule. Cependant, l'énergie potentielle d'une molécule dépend de paramètres énergétiques qui dérivent de ses coordonnées internes soit  $3N-6$  paramètres avec  $N$  le nombre d'atomes. L'ensemble des conformations d'une molécule peut-être imaginé comme un espace à  $3N-6$  dimensions que l'on appelle plus communément : surface d'énergie potentielle. Étant donné la complexité de cette surface elle ne peut être visualisée ni même calculée entièrement pour des molécules contenant plusieurs milliers d'atomes comme les protéines.

Il existe des méthodes de minimisation de l'énergie. En revanche, elles ne permettent pas de calculer la structure la plus stable. Généralement, ces algorithmes identifient uniquement les conformations d'énergie inférieure les plus proches de la conformation initiale. On ne peut trouver que des minima énergétiques locaux. On peut classer ces méthodes en deux catégories selon qu'elles utilisent la dérivée de la surface d'énergie potentielle ou non. Nous allons voir dans le paragraphe suivant deux méthodes courantes qui utilisent la dérivée première.

2.1.e.1. L'algorithme de «la plus grande pente»

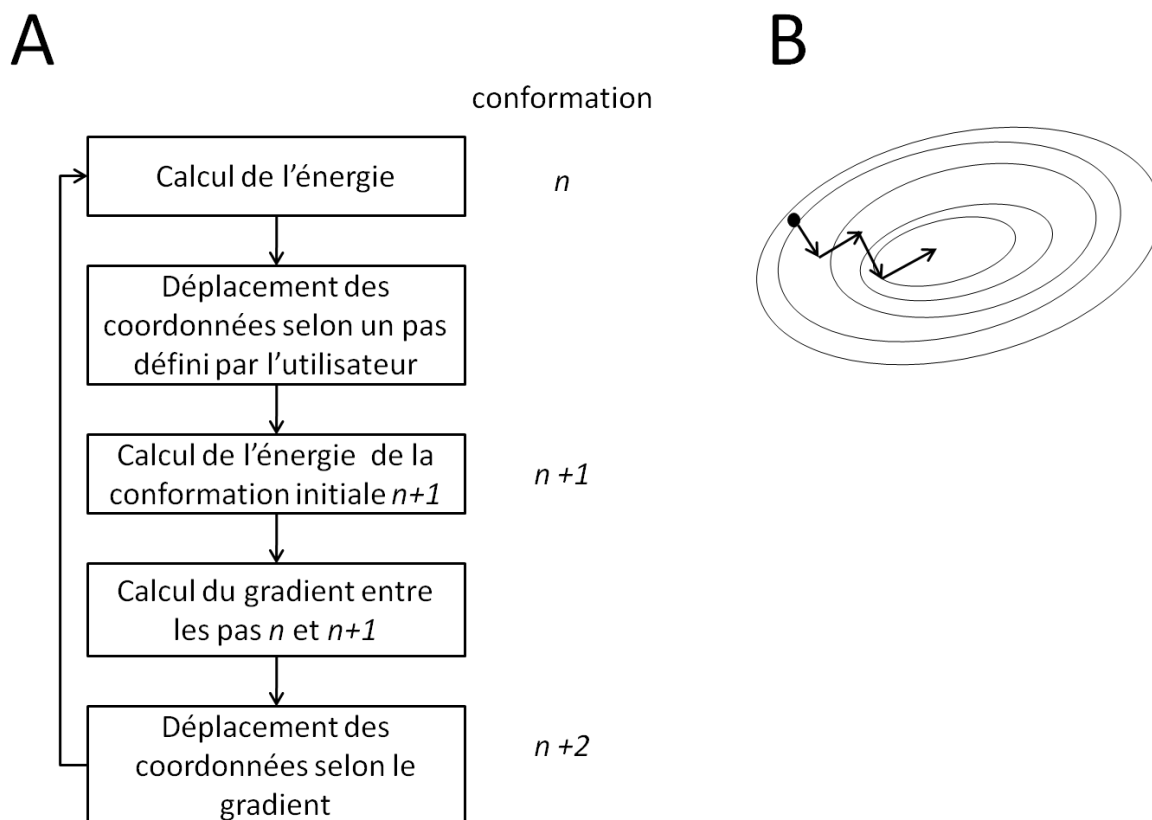
La méthode de la plus grande pente ou *steepest descent* (SD) utilise la dérivée première de la fonction d'énergie.

La direction du gradient (Figure 21 A) est calculée grâce à l'équation suivante :

$$\vec{s}_k = \frac{\vec{g}_k}{|\vec{g}_k|} \quad ( 10 )$$

Où  $\vec{s}_k$  est le vecteur de direction et  $\vec{g}_k$  le gradient au point  $k$ . Cette méthode, requiert un incrément appliqué aux coordonnées à chaque cycle (Figure 21 A) ainsi qu'une condition d'arrêt définie par l'utilisateur. La méthode SD est très performante pour minimiser l'énergie de structures éloignées du minimum local ou dans un puits de potentiel étroit. En revanche, elle devient lente à l'approche du minimum local. Cette limitation est due au fait que les directions et les gradients de deux pas successifs sont orthogonaux. La recherche se fait donc toujours dans la même direction.

La méthode SD est généralement suivie par une étape de minimisation utilisant une méthode plus performante à l'approche du minimum local telle que la méthode du gradient conjugué.



**Figure 21 :** Algorithme de la plus profonde descente. (A) Description des différentes étapes de l'algorithme. (B) schématisation d'une minimisation dans un espace 3D avec la méthode de la plus profonde descente.

#### 2.1.e.1. L'algorithme du gradient conjugué

La méthode du gradient conjugué ou *conjugate-gradient* (CG) utilise également la dérivée première de l'énergie. L'algorithme est le même que celui de la méthode SD à la différence près que le gradient est calculé entre les énergies de deux conformations successives, sans faire intervenir de déplacement de coordonnées (Figure 22). Cette approche permet de calculer une direction qui est le conjugué, du point de vue vectoriel, des gradients des deux étapes précédentes. La direction est déterminée avec la formule suivante :

$$\vec{s}_k = -\vec{g}_k + \gamma_k \vec{g}_{k-1} \quad (11)$$

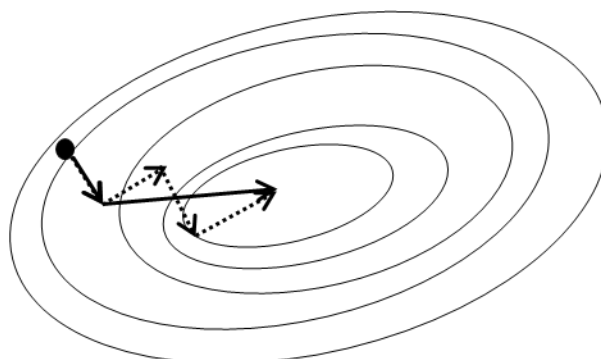
Où  $\gamma_k$  est définie par la formule de Fletcher-Reeves :

$$\vec{s}_k = -\vec{g}_k + \gamma_k \vec{g}_{k-1} \quad (12)$$

Il existe une autre définition pour  $\gamma_k$ , proposée par Polak-Ribière et plus adaptée à la modélisation moléculaire :

$$\gamma_k = \frac{(\vec{g}_k - \vec{g}_{k-1}) \cdot \vec{g}_k}{\vec{g}_{k-1} \cdot \vec{g}_{k-1}} \quad (13)$$

L'algorithme requiert un stockage en mémoire plus important et le temps de calcul par cycle est plus lent que pour la méthode de SD. Cependant, ces limitations sont compensées par l'efficacité de la méthode.



**Figure 22 :** Comparaison de l'algorithme de la plus profonde descente (pointillés) et du gradient conjugué (trait plein).

### 2.1.f. Les contraintes

Dans les protocoles de modélisation moléculaire, il est parfois nécessaire de fixer les positions de certains atomes par des restrictions ou de limiter leur déplacement par des contraintes. Il existe des algorithmes pour contraindre la position de certains atomes tels que les hydrogènes non polaires. C'est le cas des algorithmes SHAKE [75], LINCS [76] ou encore SETTLE [77]. L'utilisation de ces algorithmes pour contraindre les liaisons C-H permet d'utiliser un pas d'intégration plus grand lors de la dynamique moléculaire et ainsi réduire le temps de calcul pour la même durée de simulation.

Je n'ai pas utilisé ces algorithmes dans mes simulations, en revanche, j'ai utilisé des contraintes harmoniques pour figer la position de certains atomes, notamment lors de l'étape de minimisation. Dans ces cas, la nouvelle position des atomes contraints est directement obtenue à partir des coordonnées internes présentes dans la description de la molécule dans le champ de force.

### 2.1.g. Les restrictions

Dans le cas des restrictions, Les atomes concernés sont autorisés à se déplacer, contrairement aux contraintes. En revanche, le déplacement des atomes sera pénalisé par une force harmonique dépendant de la distance entre la position de l'atome et sa position initiale qui est ajoutée à l'équation du champ de force pour le calcul de l'énergie potentielle.

### 3. La dynamique moléculaire

Les méthodes de minimisation permettent de calculer les conformations des molécules de plus basses énergies, généralement considérées comme ayant la conformation la plus stable. Cependant, les phénomènes chimiques et biologiques de même que les propriétés physiques des molécules sont des phénomènes dynamiques qui évoluent au cours du temps. La minimisation ne peut pas appréhender ces phénomènes et se restreint à un espace très réduit de la surface d'énergie potentielle. En intégrant les équations de la mécanique classique en fonction du temps, il est possible d'évoluer sur la surface d'énergie potentielle et de découvrir de nouvelles conformations. En 1964, Rahman simule à l'aide d'un potentiel de Lennard-Jones de l'argon en phase liquide [78] et 10 ans plus tard de l'eau [79]. En 1977, McCammon et coll. réalisent la première dynamique moléculaire de l'inhibiteur de la trypsine du pancréas de bœuf (BPTI) : une protéine de 54 acides aminés [80].

L'intégration des équations de mécanique moléculaire selon le temps s'appuie sur la seconde loi de Newton (équation 14) qui associe la force  $\vec{F}_i$ , à laquelle un objet est soumis, à sa masse  $m_i$  et à son accélération  $\vec{a}_i$ .

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i \quad ( 14 )$$

En calculant la dérivée seconde de la fonction d'énergie potentielle, on obtient ainsi la position d'un objet à partir de la force qu'il subit à un temps  $t$  (équation 15)

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i = m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} = m_i \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \quad ( 15 )$$

Avec  $\vec{v}_i$ , la vitesse,  $t$  le temps et  $\vec{r}_i$  la position.

D'après le champ de force, on sait que la force appliquée à une molécule est fonction de la position de ses atomes. On a donc :

$$-\frac{dE_{pot}(\vec{r})}{d\vec{r}} = \vec{F} = m \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \quad ( 16 )$$

Pour obtenir la position en fonction du temps, il faut donc intégrer la force (équation 17).

$$\int \int \vec{F} dt^2 = \int \int m d^2 \vec{r} \quad ( 17 )$$

L'intégration est difficile d'autant qu'il n'existe pas de méthodes analytiques pour la calculer. Des algorithmes d'intégration ont donc été développés.

### 3.1. Les algorithmes d'intégration du temps

Les algorithmes d'intégration décomposent le temps en intervalles  $\Delta t$  très courts. La vitesse et la position sont alors calculées aux temps  $t + \Delta t$  à l'aide des valeurs à l'instant  $t$  et aux instants précédents.

#### 3.1.a. L'algorithme de Position Verlet

Cette méthode développée par consiste à calculer la vitesse et la position à un instant  $t + \Delta t$  à partir des valeurs aux temps  $t$  et  $t - \Delta t$  [81]. La nouvelle position de chaque atome est calculée à l'aide du développement de Taylor suivant :

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \frac{\vec{F}(t)}{m} dt^2 \quad ( 18 )$$

Elle dépend bien de la position aux instants  $t$  et  $t + \Delta t$  ainsi que de la force  $\vec{F}(t)$  qui s'applique sur l'atome à l'instant  $t$ . La vitesse est calculée avec un autre développement de Taylor :

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{2dt} \quad ( 19 )$$

Cet algorithme s'appelle *Position Verlet* parce qu'on calcule la vitesse à l'instant  $t$  et la position à l'instant  $t + \Delta t$ . Pour initialiser l'algorithme, on calcule la force à  $t=0$  et on attribue les positions de chaque atome à l'état initial à  $t=0$  et  $t=-\Delta t$ .

#### 3.1.b. L'algorithme de Velocity Verlet

L'algorithme *velocity verlet* calcule la position et la vitesse au même instant  $t + \Delta t$  [82]. Tout d'abord on définit un développement de Taylor pour la position à l'instant  $t + \Delta t$ .

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)dt + \frac{\vec{F}(t)}{2m} d^2t \quad ( 20 )$$

D'après l'équation 20, on a :

$$\vec{r}(t) = \vec{r}(t + \Delta t) - \vec{v}(t + \Delta t)dt - \frac{\vec{F}(t + \Delta t)}{2m} d^2t \quad ( 21 )$$

Pour obtenir l'équation de  $\vec{v}(t + \Delta t)$  (équation 22) on additionne  $\vec{r}(t + \Delta t) + \vec{r}(t)$ .



$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{F}(t) + \vec{F}(t + \Delta t)}{2m} dt \quad ( 22 )$$

Les algorithmes *position Verlet* et *velocity Verlet* produisent les mêmes trajectoires. Cependant, dans l'algorithme *velocity Verlet*, la position, la force et la vitesse de chaque atome sont définis au temps  $t_0$ . Quoique plus simple, cet algorithme est plus coûteux en mémoire puisqu'il nécessite le stockage des vitesses aux temps  $t$  et  $t+\Delta t$

### 3.1.c. Intégration du temps par l'algorithme du « saute-mouton »

L'algorithme du saute-mouton (*leapfrog*) tire son nom de sa méthode qui calcule la vitesse et la position à des temps alternés [83]. On pose :

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)}{dt} \quad ( 23 )$$

Et

$$\vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{dt} \quad ( 24 )$$

On obtient donc

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) dt \quad ( 25 )$$

Et

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) dt \quad ( 26 )$$

Dans l'équation 19, on remplace  $\vec{r}(t + \Delta t)$  et  $\vec{r}(t - \Delta t)$  par les équations 25 et 26. On a donc :

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}(t)}{m} dt \quad ( 27 )$$

La vitesse de chaque atome est donc calculée aux demi-intervalles  $t + \frac{\Delta t}{2}$  d'après la force à l'instant  $t$  et la vitesse au demi-intervalle précédent  $t - \frac{\Delta t}{2}$ . Le résultat de l'équation 27 est utilisé pour calculer la position à l'intervalle suivant (équation 28).

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad ( 28 )$$

Pour débiter l'algorithme, on donne la position de chaque atome au temps  $t=0$ , la force est calculée à partir des positions initiales et la vitesse est donnée à l'instant demi entier précédent :  $-\Delta t/2$ .

### 3.2. *Les ensembles thermodynamiques*

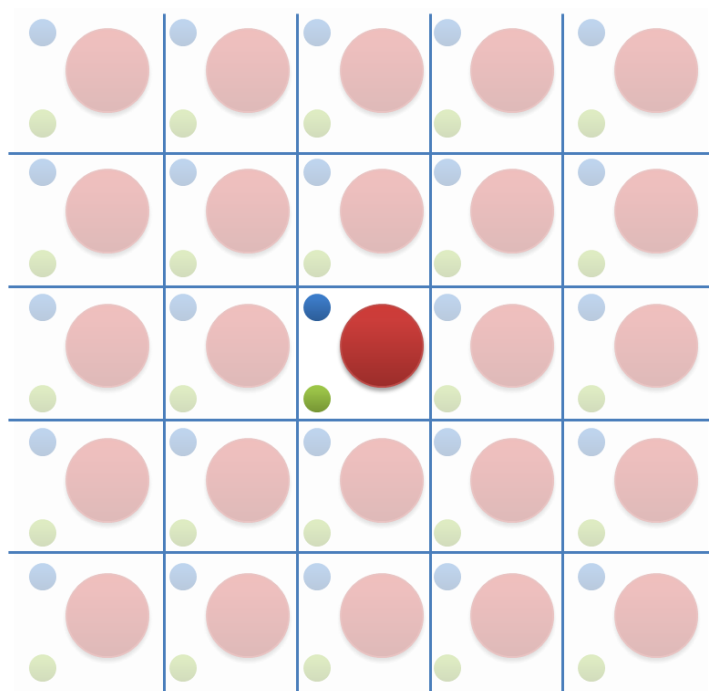
La modélisation moléculaire permet d'imposer des observables macroscopiques telles que la pression, l'enthalpie ou encore l'énergie libre à partir de simulations à l'échelle microscopique. Pour cela, les simulations de dynamique moléculaire simples maintiennent des conditions où le nombre d'atomes  $N$ , le volume  $V$  et l'énergie  $E$  sont constants. C'est l'ensemble NVE ou ensemble microcanonique. Pour étudier des phénomènes biologiques, il peut être nécessaire de réaliser des simulations où la température est constante et l'énergie variable (ensemble NVT ou ensemble canonique) voire un ensemble isobare/isotherme (ensemble NPT). Ces deux ensembles sont les plus utilisés pour modéliser des systèmes biologiques tels que les protéines globulaires, l'ADN ou encore des complexes biologiques.

### 3.3. *Les conditions périodiques aux limites*

Les simulations de dynamique moléculaire peuvent se faire dans le vide, en solvant implicite ou en solvant explicite. Dans le cas d'un système en solvation explicite, il est nécessaire de définir des limites au système. Dans le cas contraire, on observerait un éloignement des molécules du système et notamment les molécules d'eau du solvant qui finiraient par s'évaporer. Cependant, contraindre le système à une boîte dont les parois sont réfléchissantes produit des artefacts qui affectent les mesures effectuées.

Les conditions périodiques aux limites (CPL) ou *periodic boundary conditions* (PBC) permettent de subvenir à ces contraintes de simulations à l'aide d'une représentation du système virtuellement infinie. Le système est placé dans une boîte qui constitue l'unité asymétrique permettant de reconstruire un empilement tridimensionnel, périodique et infini.

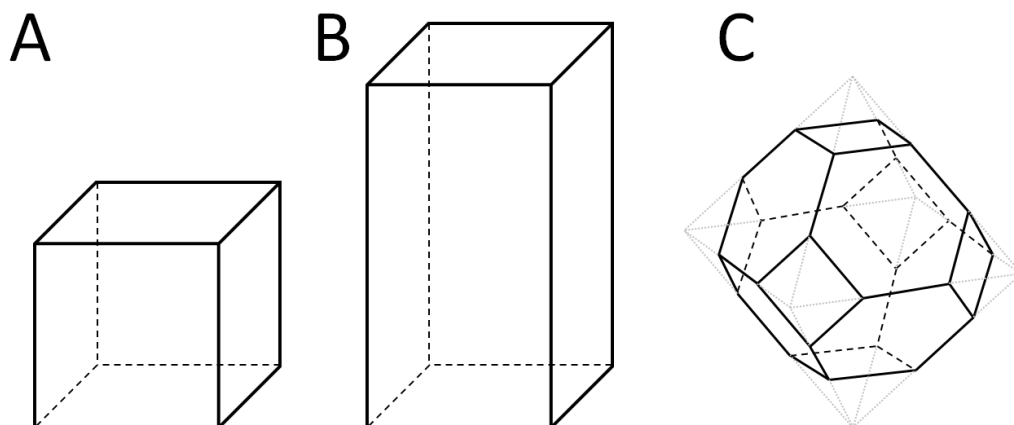
Ainsi, lorsqu'un atome ou une molécule traverse une des faces de la boîte, il réapparaît sur la face opposée (Figure 23). Un atome ou une particule  $i$  interagit avec l'image la plus proche d'une particule  $j$ . En revanche, un atome ou une particule ne doit pas interagir avec elle-même. Cela implique que la valeur seuil (page 42) soit inférieure à la moitié de la taille de la boîte d'eau.



**Figure 23 :** Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques aux limites.

Le système doit aussi répondre à certaines contraintes de forme, de taille et de composition pour pouvoir utiliser les CPL. Les seules formes compatibles avec les CPL sont les prismes rectangulaires et notamment le cube ainsi que l'octaèdre tronqué : une double pyramide à base carrée dont les coins ont été coupés, le prisme hexagonal ainsi que le dodécaèdre rhombique.

Si les deux premières formes géométriques (Figure 24 *A* et *B*) sont les plus intuitives, elles présentent l'inconvénient d'être peu optimisées pour la plupart des molécules et donc d'être coûteuses en temps de calcul. En effet, de nombreuses molécules de solvant se trouvent dans les angles des pavés, éloignées de la biomolécule. L'octaèdre tronqué résout ce problème avec un volume moindre. Dans toutes les simulations décrites dans ce manuscrit, le prisme rectangulaire a été utilisé car il s'accommode bien avec la forme du dimère de tubuline- $\alpha\beta$ .



**Figure 24 :** Exemple de représentation des systèmes géométriques respectant les CPL. (A) cubique. (B) orthorhombique. (C) octaèdre tronqué.

### 3.4. Calcul des énergies d'interactions non-liantes

#### 3.4.a. La méthode de la valeur seuil

Les interactions de van der Waals s'appliquent entre chaque paire d'atomes et sont donc extrêmement coûteuses numériquement. Cependant, ces interactions sont dominées par le terme en «  $r^6$  » et donc convergent rapidement. Cette fonction s'accommode bien avec la méthode de la valeur seuil ou *cutoff*. Elle consiste à utiliser une troncature au-delà de laquelle les énergies d'interactions non-polaires ne sont plus calculées (Figure 25).

Le calcul de l'énergie de van der Waals pour un atome donné nécessite la recherche préalable de ses atomes voisins. Les déplacements des atomes dans une simulation de dynamique moléculaire sont relativement lents. La liste des voisins peut-être mise à jour à des intervalles de temps plus grands que les pas de dynamique moléculaire ou de minimisation, ce qui permet d'accélérer le calcul de l'énergie potentielle. Dans mes simulations, l'actualisation de la liste a été faite tous les 20 pas de simulation soit toutes les 20 fs.

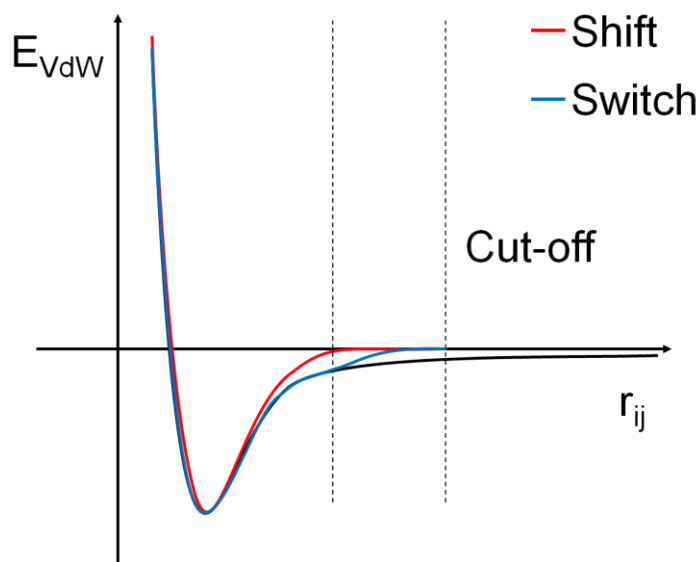
La méthode de la valeur seuil comporte néanmoins un inconvénient principal ; elle crée une discontinuité dans le potentiel énergétique générant de grandes forces à proximité du *cutoff*. Cette discontinuité signifie également que l'énergie n'est pas conservée au cours de la simulation. Cependant deux méthodes permettent de compenser cet artefact.

3.4.a.1. La méthode « *potential shift* »

D'autres méthodes ont été développées pour adoucir le phénomène de troncature dans le calcul des énergies d'interactions non-liantes. La fonction de déplacement du potentiel ou *potential shift* décale la courbe d'énergie de sorte à ce qu'elle croise l'axe des abscisses, représentant l'énergie, à une valeur de troncature.

3.4.a.2. La méthode « *potential switch* »

La fonction permutation du potentiel ou *potential switch* nécessite une valeur de troncature à laquelle l'énergie de van der Waals sera nulle et une autre valeur, inférieure à la première, entre lesquelles la courbe d'énergie sera atténuée. C'est la méthode la plus adaptée pour gérer les interactions de van der Waals.



**Figure 25 :** Représentation des méthodes de troncature de l'énergie de van Der Waals. L'énergie de van der Waals est représentée en noir. L'énergie est décrite comme une fonction de la distance entre deux atomes  $r_{ij}$ . L'énergie de van der Waals à laquelle est appliquée une troncature est en rouge lorsqu'un shift est appliqué et en bleu lorsqu'un switch est appliqué. Les pointillés indiquent les distances des cutoffs.

### 3.4.b. La méthode de la sommation d'Ewald

La méthode d'Ewald a été développée en 1921 par le chercheur éponyme pour l'étude des cristaux ioniques. Son application en modélisation moléculaire date quant à elle de 1971 avec les simulations de systèmes ioniques.

Il est nécessaire d'utiliser les conditions périodiques aux limites pour profiter de la méthode de la sommation d'Ewald. En effet, celle-ci permet de calculer le potentiel électrostatique perçu par une

molécule dans un cristal infini. Cependant, cela implique de calculer les interactions d'une particule avec les autres particules de la boîte principale, des boîtes voisines et des autres boîtes du cristal infini. D'après l'équation 9 pour calculer l'énergie électrostatique des  $N$  atomes d'un système, on a :

$$E_{ij}^{elec}(\mathbf{r}_{ij}) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \omega_{ij} \left( \frac{q_i q_j}{\epsilon_{el} r_{ij}} \right) \text{ avec } i \neq j \quad ( 29 )$$

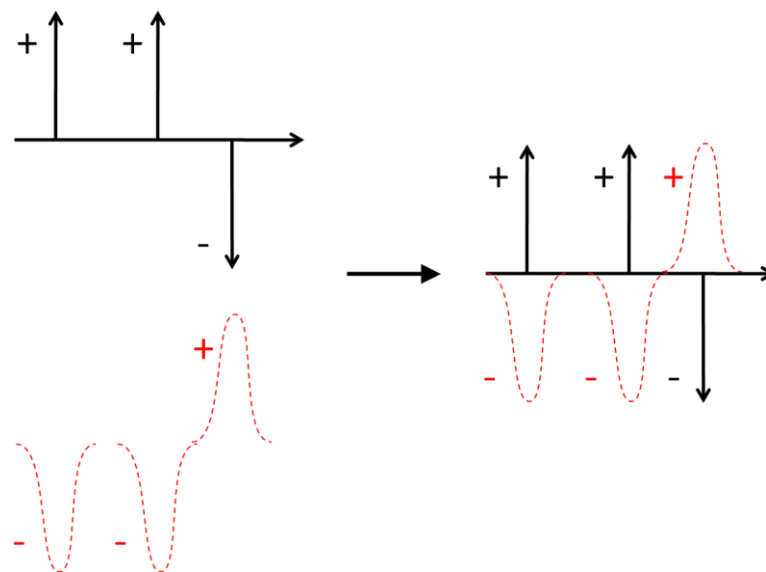
Si on prend en compte la contribution électrostatique des boîtes images  $n$  sur la boîte principale :

$$E_{ij}^{elec}(\mathbf{r}_{ij}) = \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \omega_{ij} \left( \frac{q_i q_j}{\epsilon_{el} |\mathbf{r}_{ij+n}|} \right) \text{ avec } i \neq j \quad ( 30 )$$

Cette formule converge difficilement du fait du terme  $1/r$ . Elle est donc très difficile à calculer. Ewald a noté qu'il était possible de convertir l'équation en une somme de deux termes qui convergent rapidement, l'un dans l'espace direct ou espace réel et l'autre dans l'espace imaginaire (équation 31).

$$\frac{1}{r} = \frac{f(\mathbf{r})}{r} + \frac{1-f(\mathbf{r})}{r} \quad ( 31 )$$

La méthode d'Ewald suppose que chaque charge est neutralisée par des charges de signe opposé. Chaque charge ponctuelle est donc neutralisée par une distribution gaussienne de charge de signe opposé définie par l'équation 32 (Figure 26).



**Figure 26 :** Neutralisation des charges par des gaussiennes de signe opposé dans la méthode d'Ewald. Les charges sont indiquées par les flèches noires et leur signe. Les distributions gaussiennes pour neutraliser les charges sont représentées en pointillés rouges.

$$\rho_i(\mathbf{r}) = \frac{q_i \alpha^3}{\sqrt[3]{\pi}} \exp(-\alpha^2 r^2) \quad ( 32 )$$

Avec  $\alpha$  la largeur de la gaussienne.

On obtient une fonction qui décroît de manière exponentielle. Les interactions sont partiellement écrantées ce qui permet une convergence plus rapide à courte distance. La somme dans l'espace direct est calculée sur ces charges avec l'équation 33 :

$$E_{dir}^{elec} = \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha|r_{ij} + \mathbf{n}|)}{|r_{ij} + \mathbf{n}|} \quad ( 33 )$$

Où *erfc* est une fonction d'erreur complémentaire qui s'exprime avec l'équation suivante :

$$\text{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{x}} \int_x^\infty \exp(-t^2) dt \quad ( 34 )$$

Pour calculer rapidement les énergies électrostatiques à courte distance ( $< 1$  nm) on a écranté les charges par des distributions gaussiennes de charge de signe opposé. A longue distance les interactions électrostatiques sont plus faibles mais il faut quand même les calculer. Pour cela, on neutralise les distributions gaussiennes et on calcule la seconde somme dans l'espace réciproque.

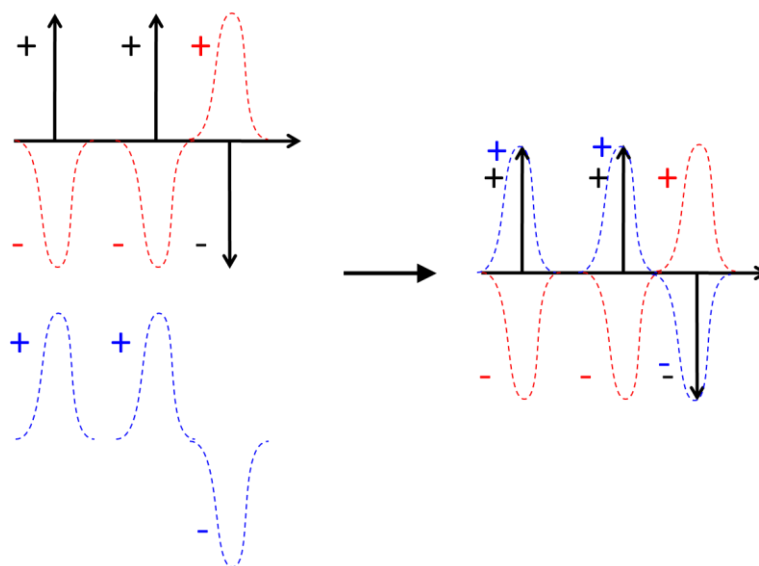
Une distribution de charge est ajoutée pour annuler la précédente de sorte à ce que le potentiel global soit identique à l'original. Cette distribution est sommée dans l'espace réciproque (équation 35) ce qui accélère la convergence (Figure 27).

$$E_{rec}^{elec} = \frac{1}{2} \sum_{k \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k}{4\alpha^2}\right) \cos(kr_{ij}) \quad ( 35 )$$

Avec  $k$  le vecteur réciproque.

Finalement on retranche un terme correctif pour supprimer les interactions entre une distribution gaussienne de charge et la charge qu'elle écrante. Ce terme correctif appelé « *self* » est calculé grâce à l'équation 36.

$$v = -\frac{\alpha}{\sqrt{x}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} \quad ( 36 )$$



**Figure 27 :** Deuxième étape de la sommation d’Ewald : sommation dans l’espace réciproque après neutralisation des distributions gaussiennes de charges opposées (rouge). La distribution de charges représentée en bleu est ajoutée pour calculer les interactions à longue distance.

Seule la méthode PME apparue dans les années 1990 sera présentée dans ce manuscrit [84, 85].

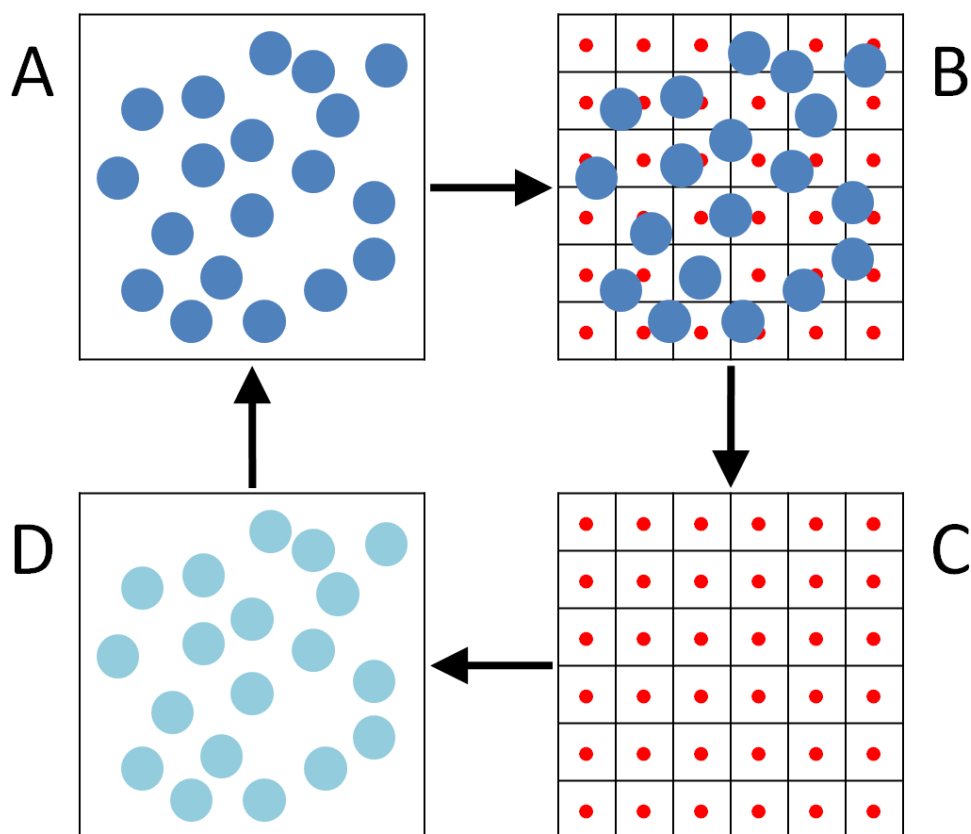
### 3.4.c. La méthode *Particle Mesh Ewald*

La méthode Particle Mesh Ewald (PME) est une variante de la méthode de la sommation d’Ewald. Elles offrent toutes les deux la possibilité de calculer l’intégralité du potentiel électrostatique, au contraire des *cutoffs* tout en étant relativement peu coûteuse en temps de calcul.

La complexité de l’algorithme de la méthode d’Ewald est  $\sigma(N^2)$ , de la méthode PME :  $\sigma(N \log N)$  contre  $\sigma(N)$  pour la méthode des valeurs seuils.

Il s’agit d’une variante de la méthode de la somme d’Ewald vue ci-dessus dont le calcul est plus rapide. Dans la méthode de la sommation d’Ewald, le calcul se fait sur toutes les charges partielles. En revanche dans la méthode PME, le système est découpé selon un maillage régulier où chaque nœud correspond à une charge partielle. Le calcul dans l’espace réciproque peut se faire à l’aide d’une transformée de Fourier, ce qui augmente considérablement la vitesse de calcul. Ce gain de vitesse est dû au passage d’une fonction exponentielle décroissante à une fonction Lorentzienne grâce à la transformée de Fourier. La complexité de l’algorithme est en  $\sigma(N \log N)$ . L’algorithme est schématisé sur la Figure 28.





**Figure 28 :** Schématisation des différentes étapes du calcul de PME. (A) Les particules chargées sont représentées par des sphères bleues. (B) Le système est découpé selon un maillage régulier dans lequel les charges partielles sont interpolées. (C) Les forces sont calculées sur les points de la grille à l'aide d'une transformée de Fourier. (D) Les forces sont interpolées vers les particules et les coordonnées des particules mises à jour. Retour au point (A).

La méthode PME permet d'obtenir des résultats plus proches des valeurs expérimentales comme cela a été montré sur la simulation de la BPTI [84]. Par rapport à la méthode des valeurs seuils, elle permet de prendre en compte l'effet de l'énergie électrostatique à longue distance tout en étant informatiquement peu coûteuse.

## 4. Le calcul de l'énergie libre d'interaction

Parmi les analyses effectuées, nous avons été amenés à mesurer l'énergie d'interaction entre des biomolécules et leurs ligands, qu'ils soient naturels ou synthétiques. A ce titre, nous avons utilisés deux méthodes différentes.

## 4.1. La méthode MM/PBSA

Cette méthode a été mise au point par l'équipe de David Case et Peter Kollman [86]. Elle s'appuie sur la représentation de l'interaction entre un récepteur :  $Rec$  et son ligand :  $Lig$  par la relation suivante :



L'énergie moyenne de chacun des systèmes dans l'équation 37 peut-être obtenue par des simulations de dynamique moléculaire. Il est alors possible de calculer l'énergie libre d'interaction :

$$\Delta G_{liaison} = G_{cpx} - G_{rec} - G_{lig} \quad ( 38 )$$

Où

$$G_{système} = G_{système}^{soluté} + G_{système}^{solvant} \quad ( 39 )$$

La valeur de l'énergie d'interaction dans le solvant  $\Delta G_{liaison}^{solv}$  d'après la relation présentée dans la Figure 29 peut être obtenue grâce à l'équation 40.

$$\Delta G_{liaison}^{solv} = \Delta G_{liaison}^{vide} + \Delta G_{Cpx}^{solv} - (\Delta G_{Rec}^{solv} - \Delta G_{Lig}^{solv}) \quad ( 40 )$$

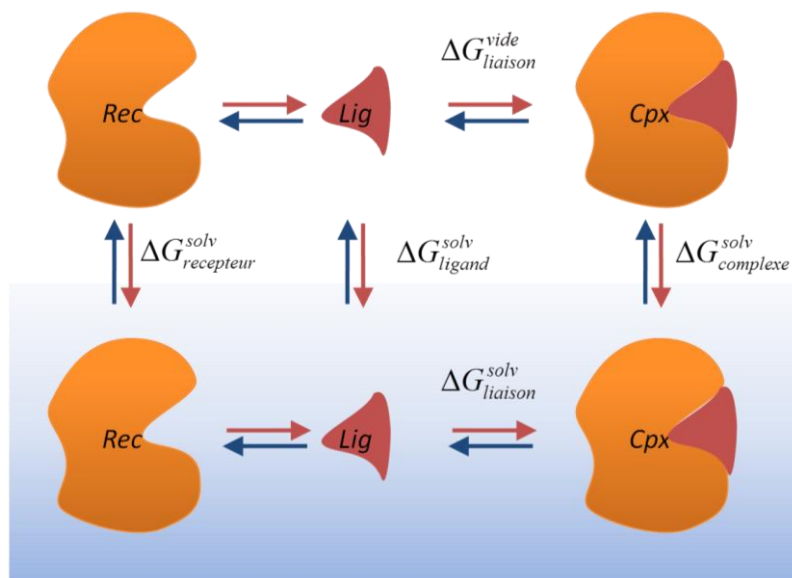
### 4.1.a. Calcul de l'énergie libre du soluté

Maintenant qu'on a défini le principe général nous allons décrire comment est calculée l'énergie libre du soluté (récepteur, ligand ou complexe).

$$\Delta G_{liaison}^{solv} = \Delta G_{liaison}^{vide} + \Delta G_{Cpx}^{solv} - (\Delta G_{Rec}^{solv} - \Delta G_{Lig}^{solv}) \quad ( 41 )$$

Dans l'équation 41 , l'énergie libre du soluté  $G_{soluté}$  est calculée en soustrayant le produit de la température  $T$  en Kelvin et l'entropie  $S_{soluté}$  à l'enthalpie du soluté  $H_{soluté}$ . Or, l'enthalpie varie en fonction de l'énergie interne  $E_{soluté}$ , de la pression  $P$  et du volume  $V_{soluté}$  (équation 42).

$$H_{soluté} = E_{soluté} + PV_{soluté} \quad ( 42 )$$



**Figure 29 :** Cycle thermodynamique de formation et de solvation d'un complexe récepteur/ligand. Les flèches rouges indiquent la solvation et la formation du complexe tandis que les flèches bleues indiquent la désolvation et la dissociation du complexe.

Si on néglige la variation du volume l'énergie libre on a alors :

$$\Delta G_{\text{soluté}} = \Delta E_{\text{soluté}} - T\Delta S_{\text{soluté}} \quad (43)$$

Dans la méthode MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) ainsi que la méthode dérivée MM/GBSA (*Molecular Mechanics/Generalized-Born Surface Area*), l'énergie interne  $\Delta E$  est calculée par mécanique moléculaire comme la somme des énergies liantes (2.1.a à 2.1.c) et non-liantes (2.1.d) (équation 1).

L'entropie  $S$  est définie comme la somme de trois termes :

$$S = S_{\text{trans}} + S_{\text{rot}} + S_{\text{vib}} \quad (44)$$

Les termes entropiques de rotation  $S_{\text{rot}}$  et de translation  $S_{\text{trans}}$  sont calculés à l'aide des équations de la thermodynamique statistique et de leurs fonctions de partitions :

$$S_{\text{trans}} = k \cdot \ln(Q_{\text{trans}}) - \left( \frac{\delta \ln(Q_{\text{trans}})}{\delta k_B T} \right)$$

Avec  $Q_{\text{trans}}$  fonction de partition moléculaire de translation (45)

$$Q_{\text{trans}} = \frac{V}{h^3 \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi m}}}$$

Avec  $V$  le volume,  $h$  et  $k_B$  les constantes de Planck et Boltzmann respectivement,  $T$  la température et  $m$  la masse.

$$S_{rots} = k \cdot \ln(Q_{rot}) - \left( \frac{\delta \ln(Q_{rot})}{\delta k_B T} \right)$$

Avec  $Q_{rot}$  fonction de partition moléculaire de rotation ( 46 )

$$Q_{rot} = \left( \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma} \right) \left( \frac{1}{h \cdot c \cdot k_B \cdot T} \right) \left( \frac{1}{\sqrt{B_A B_B B_C}} \right)$$

Avec  $c$  la vitesse de la lumière,  $\sigma$  le nombre de symétries associé au système et  $B_A$ ,  $B_B$  et  $B_C$  les trois constantes rotationnelles.

Enfin, le terme entropique de vibration  $S_{vib}$  peut-être calculé par différentes méthodes dont la plus courante est celle des modes normaux. Dans un premier temps, chaque structure issue de la dynamique moléculaire est minimisée. Les critères d'arrêt de la minimisation sont très rigoureux et le gradient du potentiel énergétique converge lentement. Ensuite, on diagonalise la matrice Hessienne de la dérivée seconde du potentiel énergétique. On peut alors calculer le terme entropique de vibration (équation 47)

$$S_{vib} = \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{h\nu_i}{k_B T \left( e^{\frac{h\nu_i}{k_B T}} - 1 \right)} - \ln \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i}{k_B T}} \right) \right) \quad ( 47 )$$

Une autre approche a été développée par Karplus et Kuschick [87]. Elle s'appuie sur la matrice de variance/covariance calculée à l'issue d'une simulation de dynamique moléculaire (ou Monte Carlo). Du fait du champ de force, l'échantillon est anharmonique mais on suppose qu'il est issu d'un échantillon harmonique d'où son nom : quasiharmonic entropy ou QH entropy. La complexité calcul dépend du nombre de variables qui lui-même est dérivé du nombre d'atomes. La méthode s'applique donc difficilement aux systèmes de grande taille

## 4.1.b. Calcul de l'énergie libre de solvation

### 4.1.b.1. Méthode MM/PBSA

Jusqu'à présent on s'était intéressé au terme correspondant au soluté dans l'équation 39. On va maintenant développer le calcul de l'énergie libre de solvation. L'énergie libre de solvation peut-être

décomposée en un terme regroupant l'énergie non-électrostatique d'une part et d'autre part l'énergie électrostatique (équation 48)

$$\mathbf{G}^{solv} = \mathbf{G}_{non-elec}^{solv} + \mathbf{G}_{elec}^{solv} \quad ( 48 )$$

Le premier terme  $\mathbf{G}_{non-elec}^{solv}$  est représenté par la surface accessible au solvant (*Solvent Accessible Surface Area* ou SASA) et pondéré par un coefficient  $\gamma$ .

La méthode MM/PBSA utilise l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée pour calculer la contribution énergétique électrostatique du solvant. La fonction de Poisson-Boltzmann est décrite dans l'équation suivante :

$$\vec{\nabla} \cdot [\epsilon(\vec{r})\vec{\nabla}\psi(\vec{r})] = -4\pi\rho^f(\vec{r}) - 4\pi \sum_i c_i^\infty z_i q \lambda(\vec{r}) e^{\frac{-z_i q \psi(\vec{r})}{kT}} \quad ( 49 )$$

Avec  $\epsilon(\vec{r})$  la constante diélectrique position-dépendante,  $\vec{\nabla}\psi(\vec{r})$  le gradient du potentiel électrostatique,  $\rho^f(\vec{r})$  la densité de charge du soluté,  $c_i^\infty$  la concentration de l'ion  $i$  à une position infinie du soluté,  $z_i$  la valence de l'ion,  $q$  sa charge,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $\lambda(\vec{r})$  un facteur d'accessibilité de l'ion dans le solvant à la position  $r$ .

L'énergie électrostatique est calculée dans le vide et le solvant implicite avec l'équation 50.

$$\Delta\mathbf{G}_{elec}^{solv} = \sum_i^N q_i [\Phi(r_i) - \Phi_{vide}(r_i)] \quad ( 50 )$$

#### 4.1.b.2. Méthode MM/GBSA

La méthode MM/GBSA est une méthode alternative pour calculer les énergies d'interactions entre un ligand et un récepteur. Le principe est le même que pour la méthode MM/PBSA sauf pour le calcul de la composante électrostatique de l'énergie libre de solvation (équation 48). Dans ce cas, l'énergie électrostatique associée à la solvation est calculée par la méthode de Born généralisée.

$$\Delta\mathbf{G}_{elec}^{solv} = \frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{f_{GB}} (r_{ij} \alpha_i \alpha_j) \left[ 1 - \frac{e^{-K \cdot f_{GB}}}{\epsilon_W} \right] \quad ( 51 )$$

Avec  $r_{ij}$  la distance entre deux atomes  $i$  et  $j$ ,  $\alpha_i$  et  $\alpha_j$  leurs rayons atomiques effectifs de Born.

$$f_{GB} = \sqrt{r_{ij} + \alpha_i \alpha_j \exp\left(\frac{-2r_{ij}}{\alpha_i \alpha_j}\right)} \quad ( 52 )$$

### 4.1.c. Avantages et inconvénients

Les méthodes MM/PBSA et MM/GBSA sont très proches. Elles présentent l'avantage d'être utilisables pour les complexes protéine-ligand mais également les complexes protéine-protéine. Contrairement à la méthode LIE [88], décrite ci-dessous, elle ne requiert pas de jeu de données d'apprentissage.

De surcroît, la méthode MM-GBSA permet de décomposer l'énergie libre d'interaction par atomes et donc identifier les résidus responsables de l'interaction. En revanche elle est relativement lente en comparaison des méthodes utilisant une conformation unique.

## 5. La modélisation par homologie

Comme on l'a vu au début de ce chapitre, l'étude par modélisation moléculaire des protéines est indissociable de l'étude expérimentale de leurs structures tridimensionnelles. En ce qui concerne les protéines, leurs structures sont répertoriées dans des bases de données publiques telles que la PDB. Cependant, il arrive souvent que ces structures soient incomplètes, du fait de la faible résolution de la diffraction aux rayons X par exemple, que leurs séquences correspondent à des isoformes ou à des organismes différents de ceux auxquels on s'intéresse. La modélisation par homologie permet de faire face à ces problèmes en construisant la structure 3D d'une protéine à partir de la séquence et la structure 3D d'une protéine homologue en général de la même famille.

### 5.1.a. Principe

La modélisation par homologie se fonde sur un postulat : des protéines qui ont des séquences proches ont une structure proche. Elle nécessite deux types d'informations différentes : des informations de séquences pour la protéine « requête » et la protéine de référence (*template*) d'une part et d'autre part la structure 3D de la protéine patron. D'autres informations telles que les structures secondaires, des contraintes géométriques ou des sites de modifications post-traductionnelles peuvent être également utilisées pour améliorer la prédiction des structures. Le logiciel Modeller [89] qui permet de réaliser des modèles par homologie a été utilisé dans mes travaux de thèse en utilisant le protocole détaillé ci-dessous.

Dans un premier temps, les séquences des deux protéines sont alignées afin d'identifier les régions de forte homologie. Ensuite, la structure de la chaîne principale de la protéine patron est conservée mais les chaînes latérales sont modifiées selon les acide-aminés correspondants dans l'alignement de séquence. Enfin, la structure est optimisée pour réduire des contacts interatomiques.

Dans l'éventualité où plusieurs structures de protéines sont disponibles, un premier alignement multiple des séquences des protéines de référence est réalisé. Cet alignement prend en compte la structure des protéines dans le calcul du score. Cela présente l'avantage de ne pas trop pénaliser un alignement de séquences divergentes mais de structures similaires.

Cette méthode de prédiction des structures des protéines est très efficace dans les structures secondaires en hélices ou en brin  $\beta$ , notamment dans le cas où les séquences sont bien conservées. En revanche, la construction des boucles et des régions non structurées peuvent nécessiter des protocoles plus élaborés.

### 5.1.b. Avantages et inconvénients

La modélisation par homologie est une méthode permettant d'obtenir de nombreux modèles de structures 3D de protéines. Contrairement aux approches de repliement par modélisation moléculaire (MD ou MC) qui sont coûteuses en temps de calculs et limitées à de petits peptides, la modélisation par homologie est rapide et peut proposer des structures de protéines de plusieurs centaines d'acides aminés. En revanche, la modélisation par homologie est dépendante de structures de protéines patrons proches de la protéine « requête ». Dans le cas contraire, il est possible de se tourner vers des méthodes qui s'appuient sur les statistiques de repliement de courtes séquences protéiques, telle que Rosetta [90].

## 6. L'amarrage moléculaire

L'amarrage moléculaire est une méthode rapide qui permet de générer un ensemble d'orientations possible d'une molécule par rapport à une autre pour former un complexe stable [91]. L'amarrage moléculaire permet une exploration systématique de l'espace conformationnel d'un ligand dans une cavité et est généralement utilisé pour prédire la conformation et l'orientation de molécules potentiellement actives dans leurs récepteurs afin d'en prédire l'affinité et l'activité.

Un protocole d'amarrage moléculaire consiste en deux étapes :

1. Les algorithmes d'amarrage positionnent la molécule dans le site actif
2. Les fonctions de scores évaluent l'interaction récepteur-ligand et prédisent l'activité du ligand

L'amarrage moléculaire joue un rôle important dans le *drug design* assisté par ordinateur. Il peut être utilisé pour cribler de grandes bibliothèques de composés, classer les résultats avec la fonction de score et proposer des mécanismes d'interactions avec la cible [92].

Les logiciels d'amarrage consistent en deux parties : l'algorithme de génération des poses d'une part et une fonction de score. Nous allons décrire par la suite, l'implémentation de ces deux parties dans le logiciel AutoDock [93].

Le logiciel AutoDock a été utilisé avec succès pour prédire la conformation de complexes enzyme-inhibiteurs [94], peptide-anticorps [95] et mêmes des complexes protéine-protéine [96]. AutoDock pré-calculé l'énergie d'interaction récepteur-ligand aux intersections d'une grille tridimensionnelle. L'énergie est calculée à chaque point de la grille selon le type atomique, la charge et la position dans la grille. L'idée est de stocker l'information de la contribution énergétique du récepteur dans les points de la grille de sorte à ce qu'elle soit lue et non calculé durant les simulations et le calcul de la fonction de score. Cette approche présente l'inconvénient que le récepteur ne peut bouger, auquel cas, il faudrait recalculer les grilles.

## ***6.1. Méthode de génération de poses***

Différentes méthodes de génération des poses sont proposées dans AutoDock :

*Monte Carlo Simulated Annealing* : A chaque étape, la position et l'orientation du ligand est modifiée et l'énergie est calculée. Si l'énergie diminue ou bien s'il répond à des critères qui dépendent de la température, le couple position-orientation est accepté, sinon il est rejeté [97]. Au fur et à mesure que la recherche continue, la température diminue et éventuellement, l'état final du ligand est obtenu dans la liste des conformations. Cette méthode est efficace dans le cas où les ligands ont huit liaisons tournantes au maximum.

L'algorithme génétique : Les degrés de liberté décrivant la translation, l'orientation et la conformation du ligand par rapport à la protéine sont considérés comme les variables d'états du ligand. Chaque variable d'état du ligand est représentée par un gène et l'état du ligand correspond donc à son génome tandis que les coordonnées des atomes du ligand correspondent à son phénotype. Des croisements sont réalisés entre paires de poses dans lesquels les nouvelles poses héritent des gènes de chaque parent. De plus des mutations peuvent avoir lieu. La sélection des meilleurs descendants de la génération courante est calculée d'après la fonction d'énergie. L'algorithme est itéré jusqu'à ce qu'un critère de terminaison est satisfait.



L'algorithme génétique de Lamarck : Il s'agit d'une version améliorée de l'algorithme génétique qui implémente une fonction de recherche locale [98]. Cette méthode fait référence au généticien Jean-Baptiste Lamarck qui supposait que les caractères phénotypiques acquis durant la vie d'un individu devenaient des traits héréditaires. La différence entre l'algorithme génétique et l'algorithme génétique de Lamarck consiste dans le fait que chaque conformation est soumise à une minimisation d'énergie avant d'être évaluée avec la fonction de score. La population suivante est fondée sur certains membres de la population parente dont l'énergie a été minimisée. Cet algorithme est plus rapide que le recuit simulé et l'algorithme génétique standard et permet l'amarrage de ligands ayant un plus grand nombre de degrés de liberté.

## 6.2. La fonction de score

La fonction de score utilisée par AutoDock pour calculer l'énergie libre de liaison inclut 5 termes :

$$\begin{aligned}
 \Delta G = \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(\theta) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\
 + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\
 + \Delta G_{tor} N_{tor} \\
 + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}
 \end{aligned} \quad ( 53 )$$

Où chaque terme  $\Delta G$  à droite de l'égalité est un coefficient déterminé de manière empirique en utilisant une régression linéaire un jeu de complexes protéine-ligand dont les constantes de liaisons sont connues. Les sommes sont réalisées sur les paires d'atomes du ligand  $i$  et de la protéine  $j$ . La contribution dans le vide est incluse dans les termes d'énergie électrostatique, de van der Waals et la liaison hydrogène. Dans ce dernier terme,  $E(t)$  est une pondération dépendant de l'angle  $t$  entre l'atome donneur et l'atome accepteur de proton. Le quatrième terme est ajouté à la composante *in vacuo*. Il représente l'entropie du ligand due à la restriction de la conformation et dépend du nombre de torsions

dans le ligand. Enfin, la désolvatation qui a lieu lors de la fixation du ligand sur le récepteur est définie par le dernier terme.

Le score étant une approximation de l'énergie libre, plus la valeur du score est petite, plus la stabilité du complexe est grande.

## 7. La Mécanique Quantique

Tandis que les méthodes de mécanique moléculaire (MM) se reposent sur les lois de la mécanique classique pour prédire les structures et les propriétés des molécules, les méthodes de mécanique quantique (QM) utilisent les lois de la mécanique quantique. Dans les calculs de mécanique quantique, les électrons sont explicitement pris en compte, permettant d'avoir accès à des informations et des propriétés qui dépendent de la distribution électronique notamment les réactions chimiques faisant intervenir des ruptures de liaisons. La mécanique quantique a été utilisée dans ces travaux de thèse afin de construire les paramètres de champ de force d'une molécule organique : le carbendazime.

### 7.1. Introduction

Les études computationnelles basées sur la chimie théorique permettent d'observer et d'analyser des mécanismes et des propriétés chimiques non observables en chimie de synthèse. Les méthodes de chimie quantique permettent de modéliser les noyaux et les électrons d'un système relativement réduit (~100-150 atomes) aboutissant à la quantification de différentes énergies ou encore à la description de propriétés électroniques moléculaires. Les systèmes chimiques considérés tels que les molécules, les ions, etc... sont toujours définis par des noyaux et des électrons permettant d'obtenir l'énergie potentielle du système étudié. Les méthodes de mécanique quantique utilisent une variété de transformations mathématiques propres à chaque méthode pour résoudre l'équation de Schrödinger (équation 54). En effet, cette équation présentée sous sa forme indépendante du temps ne possède pas de solution exacte sans approximation.

$$H\psi = E\psi \quad ( 54 )$$

Où  $H$  est l'opérateur Hamiltonien,  $\psi$  la fonction d'onde multiélectronique et  $E$  l'état énergétique associé à cette fonction d'onde.

## 7.2. Méthodes de la Fonction d'Onde

Dans le cas de l'approximation de Born-Oppenheimer satisfaisant l'équation 54, les électrons autour d'un noyau fixe sont définis de manière collective par une fonction d'onde dite multiélectronique  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$ . La fonction d'onde décrit la probabilité de trouver simultanément l'électron 1 à la position  $r_1$  et l'électron 2 à la position  $r_2$ , etc... La conséquence est que la probabilité de trouver l'électron 1 à un endroit donné dépend donc de la position de l'électron 2 ce qui induit que les électrons sont corrélés.

Une seconde approximation dite orbitalaire a été introduite, consistant à supposer que les électrons sont pratiquement indépendants les uns des autres, ce qui permet de simplifier l'écriture de la fonction d'onde  $\Psi$  présentée dans l'équation 55.

$$\psi(r_1, r_2, \dots) = \psi_1(r_1)\psi_2(r_2) \dots \quad ( 55 )$$

Néanmoins, cette approximation n'est pas correcte car il existe des interactions entre le noyau chargé positivement et les électrons ainsi qu'entre les électrons eux-mêmes. Pour s'approcher des valeurs établies expérimentalement, on utilise les règles de Slater qui permettent de moyennner la charge effective pour chaque électron. Chacune des fonctions d'onde  $\Psi_1, \Psi_2, \dots$  décrit un seul électron et est dite fonction d'onde monoélectronique. Ces dernières décrivant les états stationnaires des électrons sont appelées orbitales atomiques pour un atome et orbitales moléculaires pour plusieurs.

La théorie de Hartree-Fock basée sur le calcul des orbitales moléculaires consiste à prédire des propriétés chimiques spécifiques aux systèmes étudiés sans se baser sur des données expérimentales [99]. L'application de l'opérateur Hamiltonien  $H$  sur la fonction d'onde  $\Psi$  décrite sous la forme d'un déterminant de Slater  $\varphi$  permet d'aboutir à l'énergie totale  $E_{tot}$  du système, décomposée de la manière suivante :

$$E_{tot} = E_{cin} + E_{pot}^{Ne} + E_{pot}^{ee} + E_{pot}^{NN} \quad ( 56 )$$

Où les termes  $E_{cin}$ ,  $E_{pot}^{Ne}$ ,  $E_{pot}^{ee}$ ,  $E_{pot}^{NN}$  représentent respectivement l'énergie cinétique, les énergies d'échange définies par les interactions d'attraction Noyau-électron et de répulsion électronique de Pauli électron-électron et enfin l'énergie Coulombienne d'interaction Noyau-Noyau.

Au delà de l'approximation d'Hartree-Fock, plusieurs méthodes Post Hartree-Fock plus coûteuses en effort computationnel ont été développées pour décrire de manière correcte les structures électroniques moléculaires. Parmi toutes ces méthodes, MP a été utilisée pour les énergies mais également dans certains cas pour des optimisations sur les systèmes étudiés dans cette thèse.

La théorie de Møller-Plesset non variationnelle basée sur Hartree-Fock permet de calculer de manière plus exacte la corrélation électronique [100]. Cette méthode de perturbation a été utilisée à travers cette thèse au second ordre MP2 essentiellement pour les énergies totales et les énergies d'interaction. La théorie de Møller-Plesset MP se différencie de la méthode Hartree-Fock en ajoutant à l'opérateur Hamiltonien non perturbé  $H_0$  une perturbation  $V_1$  totalisant l'opérateur Hamiltonien représenté dans l'équation suivante :

$$H = H_0 + V_1 \quad ( 57 )$$

La méthode perturbative MP2 permet de résoudre l'équation de Schrödinger (1) en corrigeant l'énergie de l'état fondamental jusqu'au second ordre :

$$E(MP2) = E_0 + E_0^{(1)} + E_0^{(2)} \quad ( 58 )$$

Où représente l'énergie Hartree-Fock et l'énergie de corrélation électronique.

### 7.3. Ensemble des Bases

A travers toutes les méthodes de mécanique quantique utilisées dans cette thèse, l'ensemble de fonctions de bases déterminant toutes les orbitales moléculaires d'un système par l'intermédiaire des fonctions d'onde de Slater permet la résolution des équations de Roothaan (équation 59) [101] s'approchant des équations de Schrödinger.

$$FC = SC \quad ( 59 )$$

Où  $F$  représente la matrice de Fock,  $C$  la matrice coefficient et  $S$  la matrice des recouvrements relative aux fonctions de bases.

A travers ce travail, différents types de bases ont été utilisés pour les optimisations et les calculs d'énergies. La base 6-31G\* correspond à une combinaison linéaire de 6 Gaussiennes pour les orbitales de cœur et de 4 Gaussiennes dont 3 possèdent le même coefficient pour les orbitales de valence. De plus, concernant les bases double et triple- $\zeta$  ont été ajoutées des fonctions de diffusion [102] (\* ou \*\*) diminuant les exposants des Gaussiennes pour une meilleure traduction des recouvrements orbitales à longues distances et des polarisations (+ ou ++) [103].

## 8. Les analyses courantes en modélisation moléculaire

Plusieurs analyses sont fréquemment utilisées dans différents buts que ce soit pour estimer la stabilité du système ou en d'autres termes s'il est équilibré, pour mesurer l'amplitude des mouvements des structures ou encore pour évaluer les interactions comme cela est présenté dans le Chapitre II.4.

### 8.1. *Root mean square deviation (RMSD)*

Le RMSD ou écart quadratique moyen permet d'estimer la similarité de deux structures. Le RMSD entre deux structures  $v$  et  $w$  de  $n$  atomes chacune (ou  $n$  points) est calculé avec la formule suivante :

$$RMSD_{v,w} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} \|v_i - w_i\|^2} \quad ( 60 )$$

Le RMSD est utilisé pour comparer des structures de protéines. Il est généralement appliqué sur les atomes de la chaîne principale des protéines ou simplement sur les  $C\alpha$ . En dynamique moléculaire, on l'utilise également pour observer la déviation du système par rapport à la structure initiale. On considère que le système est équilibré lorsque le RMSD atteint un plateau. Les autres analyses sont généralement effectuées sur la partie stabilisée de la trajectoire.

## 8.2. Root mean square fluctuation (RMSF)

En dynamique moléculaire, le RMSD est une moyenne calculée sur l'ensemble des coordonnées atomiques du système à chaque pas de la trajectoire. Le RMSF ou fluctuation correspond une moyenne calculée sur l'ensemble des pas de la trajectoire pour chaque atome.

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=0}^{t=T} (x_i^t - \tilde{x}_i)^2} \quad (61)$$

Avec  $RMSF_i$  la fluctuation de l'atome  $i$  calculée sur une trajectoire de  $T$  pas comme le carré de la distance entre la position de l'atome à temps  $t$ :  $x_i^t$  et la position moyenne de l'atome :  $\tilde{x}_i$ . Cette analyse donne des informations sur les régions stables dans la structure des protéines. La valeur du RMSF peut-être comparée à la valeur du  $B$  factor des structures cristallines. La relation entre ces deux valeurs est la suivante :

$$B \text{ factor} = \frac{8\pi^2}{3} RMSF^2 \quad (62)$$

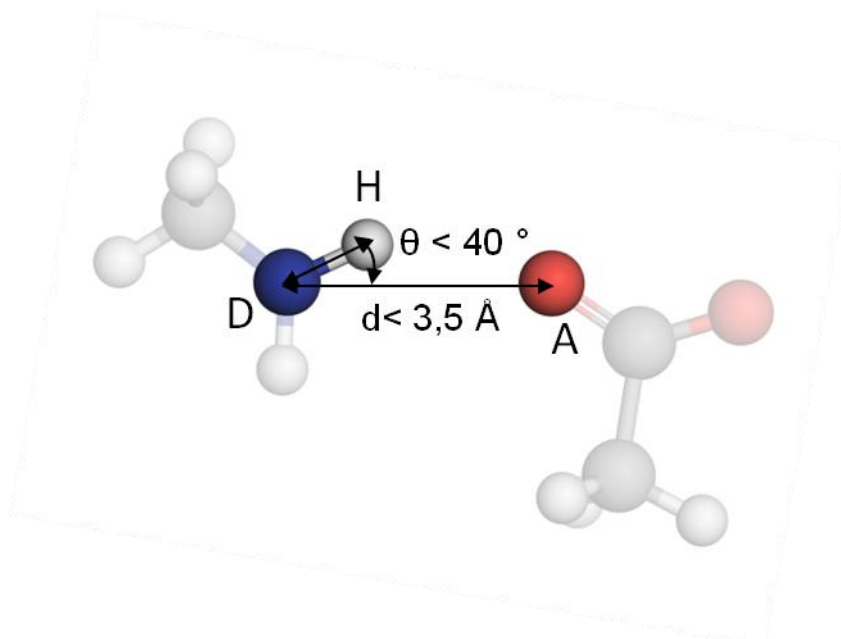
Ainsi, le RMSF peut être utilisé pour comparer la trajectoire de dynamique moléculaire aux données expérimentales.

## 8.3. Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène participent grandement au maintien de la structure des protéines et notamment de leurs structures secondaires. L'énergie nécessaire pour rompre une liaison hydrogène varie entre 5 et 30 kJ/mole ce qui en fait une liaison plus forte que les interactions de van der Waals mais plus faibles que les liaisons ioniques ou covalentes.

Les liaisons hydrogène mettent en jeu d'une part un atome électronégatif tel que l'oxygène, l'azote ou encore le fluor et d'autre part un atome d'hydrogène lié de manière covalente à un autre atome électronégatif. La formation d'une liaison hydrogène dépend également de la position relative ainsi que du type d'atome du donneur (D) et de l'accepteur (A) (**Figure 30**).

- L'angle  $\theta$  entre les vecteur DH et DA doit être inférieur à  $40^\circ$
- La distance  $d$  entre D et A doit être inférieure à 3,5 Å



**Figure 30** : Contraintes géométriques d'une liaison hydrogène implémentée dans VMD.

En dynamique moléculaire, plusieurs observations peuvent être faites sur les liaisons hydrogène. Tout d'abord, le nombre moyen de liaisons hydrogène peut être utilisé pour comparer les interactions entre deux groupes d'atomes ou encore faire une approximation sur la composante enthalpique de l'énergie d'interaction (à raison de 5 à 30 kJ/mole par liaison hydrogène). Une autre analyse faite sur les liaisons hydrogène est l'occupation ou la présence. Cette mesure rapporte un pourcentage de présence de la liaison hydrogène d'intérêt sur un intervalle de temps. Cela peut apporter des informations sur les régions les plus stables dans une molécule.

## 9. Conclusion

La dynamique moléculaire est une méthode permettant d'effectuer des simulations à l'échelle de l'atome mais particulièrement coûteuses en temps de calcul notamment lorsqu'elles s'intéressent à des complexes de haut poids moléculaire telles les protéines membranaires ou dans le cas de cette étude de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Insérés dans leurs membranes ou dans leur boîte d'eau, ces systèmes peuvent rapidement atteindre une centaine de milliers d'atomes, ce qui nécessite une puissance de calcul très importante.

La dynamique moléculaire présente un second inconvénient qui provient du champ de force. Comme on a pu le voir dans les parties précédentes (2.1), le champ de force comprend une somme de termes énergétiques qui représente des phénomènes physico-chimiques mesurables expérimentalement. Parfois, ces équations ne représentent explicitement ou ne représentent qu'une partie seulement des

propriétés des molécules. C'est le cas notamment avec la description des charges atomiques fixes ou encore l'incorporation du terme de liaison hydrogène de manière implicite dans le terme électrostatique [104]. Les champs de force dit polarisable, dans lesquels les charges atomiques varient au cours du temps sont en développement mais leur complexité ne leur autorise pas encore une large utilisation dans le domaine.

Au-delà de l'impossibilité de rompre ou de créer une liaison en dynamique moléculaire classique, on fait face également à une limitation au niveau de l'échantillonnage de l'espace conformationnel. Du fait qu'ils soient harmoniques, les champs de force classique ou de type 1 ont ainsi une tendance à restreindre les molécules dans un puits énergétique. Il est difficile de passer les barrières énergétiques qui séparent les conformations stables des biomolécules. Augmenter la longueur des trajectoires permet de pallier en partie à cette limitation. Avant la récente explosion des durées de simulations, des méthodes avaient été mises au point afin de répondre aussi à la question de l'échantillonnage. Nous n'allons pas entrer en détail sur ces méthodes mais, à titre d'information on peut citer la méthode Replica Exchange Molecular Dynamics [105] (REMD), qui tente de profiter des calculateurs multiprocesseurs pour effectuer plusieurs simulations en même temps et appliquer à chacune d'elles une augmentation soudaine de la température pour franchir les barrières énergétiques. La métadynamique [106] est une autre méthode dérivée de la dynamique moléculaire classique à laquelle on ajoute un potentiel énergétique à chaque pas pour réduire la profondeur du puits d'énergie et ainsi mieux échantillonner l'espace conformationnel.

Les limitations peuvent paraître nombreuses mais les avantages de la dynamique moléculaire sont de taille ; il convient à l'utilisateur de connaître ces limitations et d'en mesurer leurs effets sur les résultats obtenus et dans la mesure du possible les comparer avec des résultats expérimentaux.



# Chapitre III.

# Résultats

---

# 1. Étude de l'hydrolyse du GTP dans le contexte de la tubuline

## 1.1. Introduction

Comme indiqué précédemment (Chapitre I.2), la tubuline existe sous forme GDP ou GTP mais, de façon majoritaire, seul l'hétérodimère tubuline-GTP peut s'incorporer dans le MT. De son côté, l'hydrolyse du nucléotide n'est significative que lorsque la tubuline est sous forme polymérique (oligomère ou microtubule) [39]. Par ailleurs, la dynamique des microtubules est dépendante de l'hydrolyse du GTP. En effet, les MT formés en présence d'analogues non-hydrolysables du GTP restent stables. On connaît également le rôle de l'anneau de tubuline-GTP empêchant la dépolymérisation du microtubule [17]. Toutefois, Dimitrov, et coll. [43] ont démontré la présence de complexes tubuline-GTP non hydrolysés dans le microtubule tandis que Valiron, et coll. [107] ont montré que le complexe tubuline-GDP pouvait également être incorporé dans le microtubule. Par ailleurs, de nombreuses discussions ont montré l'absence d'effet du phosphate inorganique ( $P_i$ ) sur la stabilisation et l'instabilité dynamique du microtubule [19-21, 108].

Le mécanisme réactionnel d'hydrolyse du GTP n'est pas connu. Cependant, les résidus  $\alpha$ E254 et  $\beta$ T143 ont été identifiés comme essentiels dans cette hydrolyse par des études de mutagenèse dirigée [109-111]. De plus, à l'heure actuelle, peu d'informations structurales sont disponibles. Les structures cristallographiques publiques représentent uniquement le nucléotide hydrolysé dans le site E, en présence de protéines partenaires (complexes T2S) ou en feuillet zinc [30, 31, 33]. De nouvelles perspectives s'ouvrent avec la récente publication des structures des complexes sT2R en présence de GTP, GDP et GMPCPP dans le site E [34]. Néanmoins, ces complexes du fait de la contrainte imposée par le partenaire ne sont pas entièrement représentatifs des interactions entre la tubuline et le nucléotide qui ont lieu dans le microtubule.

La détermination de la première structure tridimensionnelle de l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  a permis l'étude par modélisation moléculaire des différences entre les complexes tubuline-GTP et -GDP [30, 49]. Dans cette première étude utilisant des méthodes dites « gros grains », les auteurs proposent que le groupement  $\gamma$  stabilise le microtubule en augmentant la fluctuation des boucles participant aux contacts avec les protofilaments adjacents. Par la suite d'autres études ont recherché les différences structurales entre les complexes tubuline-GTP et -GDP dans des hétérodimères et des oligomères [50, 51]. Dans ces travaux, les auteurs montrent que l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  est courbé

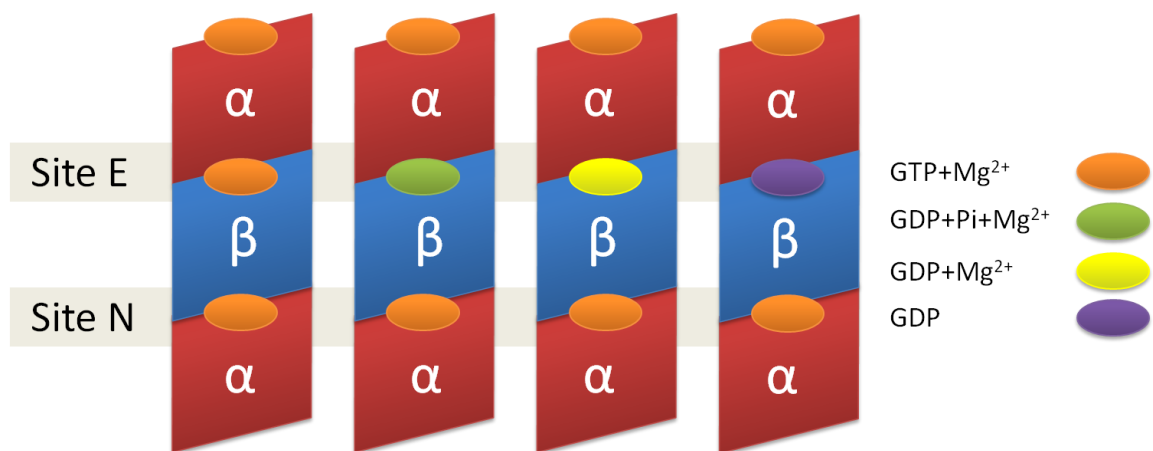
quelque soit le nucléotide dans le site E, en accord avec le modèle *lattice*. Plus récemment, ces résultats ont été confirmés et étendus aux protofilaments avec l'étude d'un hexamère de tubuline [47]. Il apparaît ainsi que l'impact des différents états du nucléotide au site E sur la structure secondaire de la tubuline et les contacts tubuline-tubuline n'ont pas été étudiés dans le contexte du protofilament des microtubules.

Pour la première fois à ma connaissance, j'ai étudié par dynamique moléculaire l'influence des nucléotides GTP, GDP et du complexe GDP/Pi dans le site E de la tubuline au sein d'un système représentatif d'un protofilament : l'hétérotrimère tubuline- $\alpha\beta\alpha$ . Les résultats m'ont permis d'identifier des changements de structure aux niveaux des interfaces latérales à la suite de l'hydrolyse. Les observations montrent également que l'état intermédiaire tubuline-GDP/Pi est instable. Enfin, la comparaison des contacts au niveau des interfaces longitudinales indique qu'à l'issue de l'hydrolyse les interactions intra-dimères dans la tubuline-GDP sont renforcées à la défaveur des interactions inter-dimère et potentiellement de la stabilisation du microtubule.

## 1.2. Méthodologie

### 1.2.a. Présentation des systèmes modélisés

J'ai étudié par modélisation moléculaire les effets du GTP, du GDP-Pi et du GDP situés au niveau du site E de la tubuline- $\beta$  sur la structure et la dynamique d'un protofilament (Figure 31). L'objectif est aussi d'aller vers une proposition de mécanisme de l'hydrolyse du GTP par la tubuline et de comprendre les conséquences sur la stabilisation du MT par le GTP. Pour cela, j'ai comparé quatre systèmes d'hétérotrimères tubuline- $\alpha\beta\alpha$  avec ces différents nucléotides dans le site E.



**Figure 31 :** Représentation des systèmes d'hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  montrant les différents états du nucléotide dans le site E.

Dans ce chapitre, le complexe tubuline-GTP représente un hétérotrimère de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  portant un nucléotide GTP ainsi qu'un cation divalent  $Mg^{2+}$  dans les deux sites N et le site E. Le complexe tubuline-GDP représente un hétérotrimère de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  portant un nucléotide GTP ainsi qu'un cation divalent  $Mg^{2+}$  dans les deux sites N et un nucléotide GDP dans le site E. Le complexe tubuline-GDP· $Mg^{2+}$  est composé de la même manière que le complexe tubuline-GDP avec en plus un ion  $Mg^{2+}$  dans le site E. Enfin, le complexe tubuline-Pi représente un hétérotrimère de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  portant un nucléotide GTP ainsi qu'un cation divalent  $Mg^{2+}$  dans les deux sites N, d'une part et d'autre part dans le site E, les produits de l'hydrolyse du GTP : le nucléotide GDP et un groupement phosphate inorganique Pi ainsi qu'un cation  $Mg^{2+}$ .

Lors de la réalisation des simulations, les structures cristallographiques disponibles ne représentaient que l'état hydrolysé. Durant la rédaction du manuscrit, des structures de complexe sT2R possédant les nucléotides GTP et GMPCPP dans le site E dans un état non-hydrolysé (PDB IDs : 3RYF, 3RYH et 3RYC) ont été publiées. Malgré la bonne résolution de ces structures (entre 2,1 et 2,8 Å), elles ne sont pas complètes du fait de la flexibilité de certaines régions telles que la boucle-N ou encore l'extrémité C-Terminale. Dans les systèmes modélisés, la boucle N a été reconstruite en utilisant des méthodes de modélisation par homologie. Il est à noter que chaque sous-unité de tubuline possède plus de 440 acides aminés soit plus de 6000 atomes en incluant les atomes d'hydrogènes. C'est un système de taille importante du point de vue de la modélisation moléculaire.

J'ai pris le parti dans ces simulations de ne pas prendre en compte l'extrémité C-terminale non structurée et d'étudier ainsi les résidus 1 à 439 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  et les résidus 1 à 427 pour la sous-unité tubuline- $\beta$  pour réduire la taille du système.

### 1.2.b. Modélisation par homologie

- Choix des structures de références

Il existe deux types de structures cristallographiques de la tubuline dans la base de données PDB : i) les structures des protofilaments de tubuline- $\alpha\beta$  en feuillets zinc antiparallèles et ii) les complexes de type T2R (voir Annexe 1).

La structure du complexe tubuline-Taxol (PDB ID : 1JFF) a été résolue par cristallographie électronique (PDB ID : 1TVK) à 3,5 Å. La structure de complexe tubuline-epothilone possède une meilleure résolution (2,89 Å) mais elle est presque identique à celle du complexe tubuline-Taxol (RMSD calculé sur les C $\alpha$  : 0,652 Å ; RMSD calculé sur tous les atomes : 1,058 Å). Dans ces deux structures, les

résidus 35 à 60 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  sont absents. Tandis que dans la structure du complexe T2R-colchicine résolue par diffraction des rayons X (PDB ID : 1SA0) il ne manque que les résidus 38 à 46 malgré la résolution plus faible. J'ai sélectionné les structures 1JFF et 1SA0 comme structures de références.

- Alignement des structures de références

Ensuite, à l'aide du logiciel Modeller [89], j'ai réalisé l'alignement des sous-unités tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  respectivement de chacune des deux structures. Dans le cas de la structure 1SA0, j'ai utilisé les chaînes A. et B. La séquence de la sous-unité tubuline- $\alpha$  est la même pour les deux structures (Uniprot ID : Q2HJ86, Annexe 4) correspondant à l'isotype A1. La sous-unité tubuline- $\beta$  de la structure 1JFF est d'origine porcine (Uniprot ID : P02554) tandis que celle dans la structure 1SA0 est une protéine bovine (Uniprot ID : Q6B856, Annexe 4) mais leur séquence sont identiques à 98,5 % (439 résidus identiques et 4 résidus similaires sur 445).

- Alignement de la séquence de la protéine requête avec les séquences des protéines de références

Pour chaque sous-unité, j'ai utilisé la séquence de la protéine porcine présente dans le fichier PDB 1JFF. L'alignement multiple est réalisé avec Modeller également.

- Génération et évaluation des modèles

La forte identité de séquences facilite la génération des modèles et permet l'utilisation des paramètres par défaut. En revanche, l'utilisation de la structure 1SA0 s'est limitée aux résidus 30 à 65 pour la construction de la boucle N. L'évaluation des modèles se fait à l'aide de la fonction de score DOPE incluse dans Modeller ainsi qu'avec Procheck [112] pour vérifier la justesse des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  à l'aide du diagramme de Ramachandran.

### 1.2.c. Construction des hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$

Les hétérotrimères ont été construits avec PyMOL en superposant les modèles de chaque sous-unité sur les sous-unités correspondantes dans la structure du protofilament décrit par les opérations de symétrie de la structure 3D 1JFF.

Les coordonnées du complexe GTP-Mg<sup>2+</sup> dans le site N sont ensuite directement transposées de la structure cristallographique vers la structure du modèle par homologie. Pour obtenir les coordonnées du complexe GTP-Mg<sup>2+</sup> dans le site E, la même manœuvre est réalisée après avoir aligné les coordonnées des carbones  $\alpha$  de la sous-unité tubuline- $\alpha$  de 1JFF avec ceux de la sous-unité tubuline- $\beta$  du modèle. Le même processus a été appliqué avec la sous-unité tubuline- $\beta$  de la structure cristallographique 1SA0 pour obtenir les coordonnées du complexe GDP-Mg<sup>2+</sup> dans le site E.

Enfin, le complexe GDP-Pi-Mg<sup>2+</sup> est construit en rompant la liaison entre le deuxième et le troisième phosphate puis en ajoutant un groupement hydroxyle à ce dernier. Cette opération a été effectuée avec PyMOL.

#### 1.2.d. Préparation des systèmes pour la dynamique moléculaire

Chaque système a été préparé pour correspondre au champ de force Amber ff03. En effet, la nomenclature des types atomiques ainsi que les noms de résidus sont spécifiques à chaque champ de force et est généralement différent de celle de la PDB. Par exemple, contrairement au format PDB, les champs de force distinguent les différents états de protonation de l'histidine :

- chargée négativement
- neutre, proton porté par l'atome N $\delta$
- neutre, proton porté par l'atome N $\epsilon$
- chargée positivement

Ensuite, les hydrogènes manquants ont été ajoutés à l'aide du logiciel *reduce* présent dans la suite AmberTools 1.5 [66]. Ce logiciel optimise le réseau de liaisons hydrogène en tournant la chaîne latérale des résidus asparagine, glutamine et histidine ou encore en changeant l'état de protonation des histidines.

Les paramètres des nucléotides GTP et GDP ont été obtenus à partir de la base de données des paramètres du champ de force Amber [113]. Le résidu phosphate inorganique n'est pas présent dans le champ de force Amber FF03, ni dans le champ de force généraliste GAFF (Generalized Amber Force-Field) ou dans la base de données de paramètres citée ci-dessus. En revanche, tous les paramètres de distance P-O et d'angle O-P-O sont connus. La topologie du Pi a été générée à l'aide des outils AnteChamber [66] et à partir des paramètres du champ de force généraliste GAFF.

Chaque hétérotrimère tubuline- $\alpha\beta\alpha$  a été placé dans une boîte d'eau orthorhombique avec pour critère qu'une couche d'eau de 12 Å au moins entoure le complexe. J'ai utilisé le modèle d'eau TIP3P dans toutes les simulations [114]. Par ailleurs, La charge totale du complexe a été neutralisée en ajoutant des ions Na<sup>+</sup> dans le solvant. Le potentiel électrostatique est calculé à différents points d'une grille

recouvrant le volume du système sur lesquels les ions sont placés. Ainsi, 57 ions  $\text{Na}^+$  ont été ajoutés dans le système tubuline-GTP et 58 dans les systèmes tubuline-Pi et -GDP. La solvation ainsi que la neutralisation des charges ont été réalisées à l'aide du logiciel tLeap de la suite AmberTools 1.5 [66].

### 1.2.e. Minimisation et Dynamique Moléculaire

Par la suite, les fichiers de topologies et de paramètres ont été convertis du format Amber au format GROMACS à l'aide de l'outil acpype [115]. Un protocole de minimisation a été appliqué à chaque système pour supprimer les contacts atomiques défavorables et optimiser les interactions entre les résidus. La minimisation a été effectuée avec GROMACS selon le protocole suivant :

- 100 pas en utilisant l'algorithme de la pente la plus profonde
  - Critère de convergence :  $1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Contraintes sur le complexe
- 5000 pas en utilisant l'algorithme du gradient conjugué
  - Critère de convergence :  $0,01 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Contraintes sur le complexe
- 100 pas en utilisant l'algorithme de la pente la plus profonde
  - Critère de convergence :  $1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Aucune contrainte
- 5000 pas en utilisant l'algorithme du gradient conjugué
  - Critère de convergence :  $0,01 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Aucune contrainte

Le calcul des énergies de van der Waals a été tronqué au-delà de  $10 \text{ \AA}$  et permuté entre  $8 \text{ \AA}$  et  $10 \text{ \AA}$  à l'aide de la méthode de *potential switch*. Les énergies électrostatiques ont été calculées à l'aide de la méthode PME pour laquelle la frontière entre espace réel et espace réciproque a été placée à  $12 \text{ \AA}$ . Les calculs ont été réalisés dans les conditions périodiques aux limites. Les mêmes paramètres ont été utilisés lors de la dynamique moléculaire.

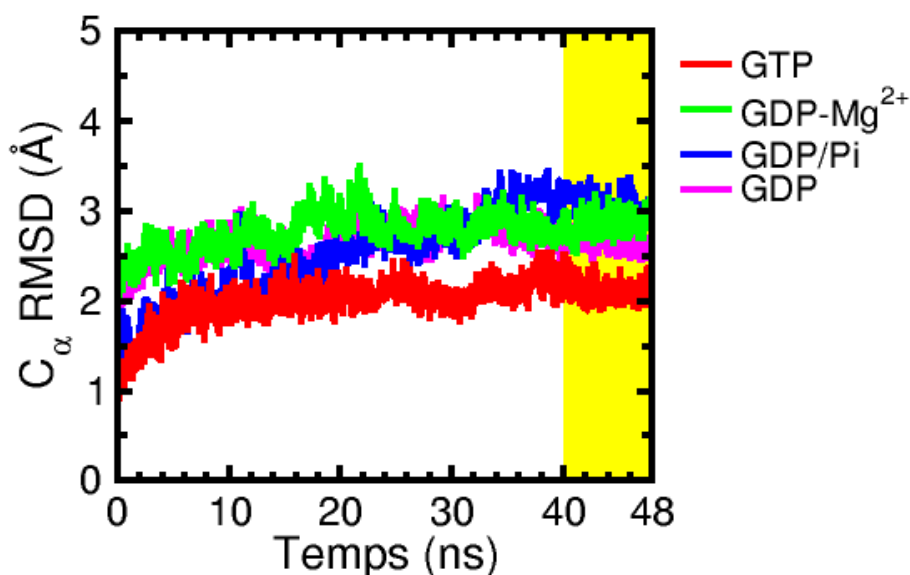
A l'issue de la minimisation, j'ai réalisé deux étapes d'équilibration : La première étape a été effectuée avec des restrictions sur les coordonnées du complexe. L'algorithme du saute-mouton avec un pas d'intégration de  $1 \text{ fs}$  pendant  $100 \text{ ps}$  ( $100000$  pas) dans des conditions NVT afin d'équilibrer la pression et la température. La température moyenne a été maintenue à  $310 \text{ K}$  à l'aide du thermostat de Berendsen [116]. Dans la deuxième étape, les restrictions ont été supprimées et l'équilibration a été

effectuée dans les conditions NPT. La température moyenne a été maintenue à 310 K à l'aide du thermostat de Berendsen et la pression moyenne à 1 atm à l'aide du barostat de Berendsen [116]. L'équilibration a été conduite pendant 5 ns à l'aide de l'algorithme du saute-mouton avec un pas d'intégration de 1 fs.

Enfin, l'étape de production a été menée pendant 48 ns dans les conditions NPT (algorithme du saute-mouton ; pas d'intégration de 1 fs). La température moyenne a été maintenue à 310 K à l'aide du thermostat « *Velocity Rescale* » [117] et la pression moyenne à 1 atm à l'aide du barostat de Berendsen. Les coordonnées du système ont été enregistrées tous les 1000 pas (chaque 1 ps). Les structures moyennes décrites dans ce chapitre correspondent à la structure représentative issue d'une analyse en cluster.

### 1.3. Résultats et discussion

Dans un premier temps, j'ai calculé pour chaque complexe la déviation (RMSD) des  $C_{\alpha}$  par rapport à la structure initiale de la production (Figure 32). Le RMSD des  $C_{\alpha}$  des complexes tubuline-GTP et -GDP atteint rapidement un plateau tandis qu'il ne se stabilise qu'après 40 ns de production pour le complexe tubuline-Pi. Ce retard par rapport aux autres systèmes suggère que le système tubuline-Pi représente un état intermédiaire, énergétiquement moins stable.



**Figure 32 :** Évolution du RMSD des  $C_{\alpha}$  des complexes tubuline-GTP, -Pi et -GDP calculé par rapport à la structure initiale.

Les analyses décrites par la suite ont été réalisées sur les dernières 8 ns durant lesquelles la structure des systèmes est stable.



### 1.3.a. Description de l'environnement du nucléotide dans le site E

Dans un premier temps, je me suis intéressé à la structure du nucléotide dans le site E ainsi qu'aux interactions tubuline-nucléotide.

#### 1.3.a.1. Le site E dans le système tubuline-GTP

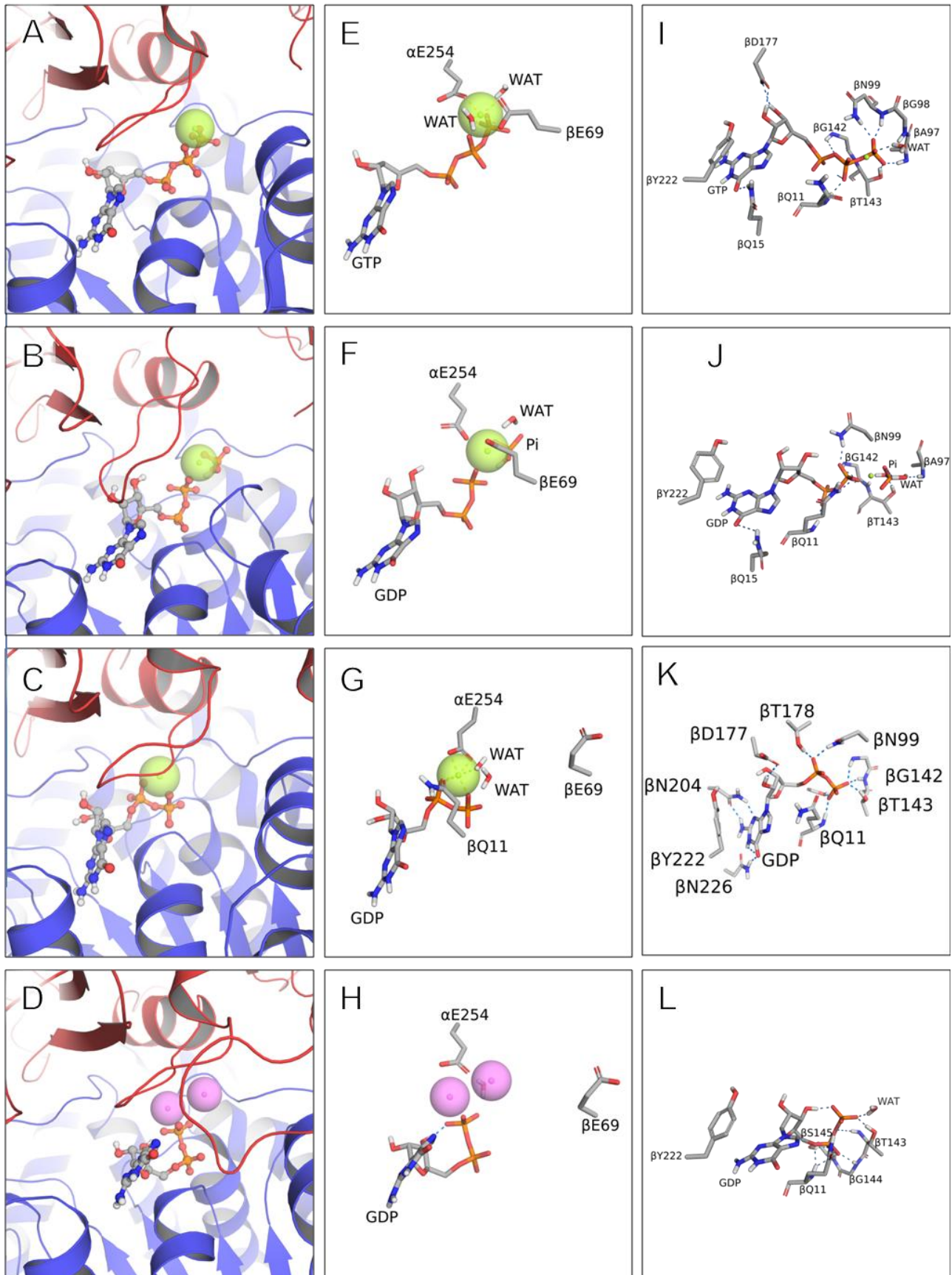
La base du nucléotide est stabilisée par des liaisons hydrogène avec les résidus  $\beta$ Q15 et  $\beta$ N226 des hélices- $\alpha$  H1 et H7 respectivement (Figure 33 A et I). Le ribose engage ses deux groupements hydroxyles dans des liaisons hydrogène avec le résidu  $\beta$ N177 de la boucle T5 d'une part et son groupement cétone avec le résidu  $\beta$ C12 de la boucle T1 d'autre part. Enfin, les boucles T3 et T4 forment un réseau de liaisons hydrogène dense avec les phosphates (**Tableau 1**)

**Tableau 1:** Occupation des liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\beta$  et le GTP. Un pourcentage supérieur à 100 % indique que les deux résidus partagent plus d'une liaison hydrogène.

Résidu	Chaîne	Fonction	Structure	Occupation (%)	Partenaire GTP
N177	Latérale	Accepteur	T5	263	ribose
N226	Latérale	Accepteur	H7	110	guanine
N99	Latérale	Donneur	T3	75	phosphate
N99	Principale	Donneur	T3	66	phosphate
Q15	Latérale	Donneur	H1	53	guanine
S138	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	49	phosphate
N226	Principale	Donneur	H7	48	guanine
G142	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	39	phosphate
C12	Principale	Donneur	T1	39	ribose
Q11	Principale	Donneur	T1	30	phosphate
G98	Principale	Donneur	T3	24	phosphate
T143	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	20	phosphate
A97	Latérale	Donneur	T3	15	phosphate
T143	Latérale	Accepteur	T4 (P-loop)	15	phosphate

Les phosphates P $\beta$  et P $\gamma$  participent également à la coordination du Mg<sup>2+</sup>. Dans le complexe tubuline-GTP, la coordination du Mg<sup>2+</sup> est tétraédrique (Figure 33 E) et engage les atomes d'oxygène suivants :

- O1 du phosphate P $\beta$
- O1 du phosphate P $\gamma$
- O $\epsilon$ 1 du résidu Glu69 de la sous-unité tubuline- $\beta$ 1
- O $\epsilon$ 2 du résidu Glu69 de la sous-unité tubuline- $\beta$ 1
- O $\epsilon$ 1 du résidu Glu254 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ 2
- O d'une molécule d'eau.



**Figure 33 :** Représentation du site E dans les complexes tubuline-GTP, -Pi et -GDP. (A-D) Structure du nucléotide dans le site E. Les sous-unités tubuline- $\alpha$  et  $\beta$  sont représentées en ruban rouge et bleu respectivement. Le nucléotide est représenté en « ball and sticks » et les ions en sphère. (E-H) Description des

interactions avec les ions  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$ . (*I-L*) Interactions entre le nucléotide et la tubuline. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés bleus.

A partir de l'observation de la structure 3D de tubuline- $\alpha$ , Löwe et coll. [31] ont proposé un mode de coordination du  $Mg^{2+}$  impliquant les résidus  $\beta D67$  et  $\beta E69$  (respectivement  $\alpha D69$  et  $\alpha E71$  dans la sous-unité tubuline- $\alpha$ ). Dans la structure 1JFF, le  $Mg^{2+}$  est éloigné de plus de 3 Å du groupement carboxylique de la chaîne latérale du résidu  $\alpha D69$ . Or, d'après des statistiques effectuées sur la PDB, la distance moyenne  $Mg^{2+}$ -Glutamate ou  $Mg^{2+}$ -Aspartate est de  $2,34 \pm 0,24$  Å. Dans le système tubuline-GTP, cet espace est comblé par une molécule d'eau ainsi que la chaîne latérale du résidu  $\beta E69$ , empêchant ainsi l'interaction  $\beta D67$ - $Mg^{2+}$ . Plus récemment, Nawrotek et coll. [34] ont résolu la structure de tubuline- $\alpha\beta$  en présence de GTP dans le site E. Dans cette structure, le  $Mg^{2+}$  est coordonné par quatre molécules d'eau en plus des phosphates  $P\beta$  et  $P\gamma$ . La coordination du  $Mg^{2+}$  que nous avons obtenue dans le système tubuline-GTP n'est donc pas en accord avec la structure cristallographique. Néanmoins, cette structure représente deux hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  séquestrés par le domaine SLD de la protéine RB3, membre de la famille de la stathmine. Cette protéine partenaire modifie la courbure du tétramère et donc les interfaces intra- et inter-dimère. Cette conformation ne correspond pas à celle présente dans le microtubule contrairement au trimère tubuline- $\alpha\beta\alpha$  utilisé ici.

Tout au long de la trajectoire stabilisée, une molécule d'eau est observée à proximité du groupement  $P\gamma$ . La distance moyenne entre l'hydrogène de cette molécule d'eau et l'oxygène du groupement phosphate est de  $2,40 \pm 0,49$  Å et l'angle entre ces deux atomes et le phosphate  $P\gamma$  est tétraédrique ( $110,5 \pm 23,3$  °). Dans cette orientation, cette molécule d'eau établit une liaison hydrogène avec une présence de 41,4 %. De façon intéressante, il apparaît que cette configuration spatiale est favorable pour l'hydrolyse du nucléotide [118]. A partir de ces résultats, je propose que cette molécule d'eau soit nécessaire pour l'hydrolyse du nucléotide.

Par la suite, des calculs de mécanique quantique sur une sélection de groupements chimiques constituant l'environnement du  $P\gamma$  et du  $Mg^{2+}$  pourraient apporter des indications sur le mécanisme électronique du transfert de proton entraînant l'hydrolyse du GTP. Une approche couplée mécanique quantique/mécanique moléculaire bien que plus coûteuse, apporterait des informations sur la réorganisation du site E au cours de l'hydrolyse.

## 1.3.a.2. Le site E dans les systèmes à la suite de l'hydrolyse du GTP

A la suite de l'hydrolyse du GTP, la coordination du  $Mg^{2+}$  ainsi que le réseau de liaisons hydrogène sont modifiés. En effet, on observe que la coordination tétraédrique du  $Mg^{2+}$  devient pentaédrique. Elle implique ces 5 atomes d'oxygènes :

- O1 du phosphate  $P\beta$
- O1 du phosphate Pi
- O2 du phosphate Pi
- O $\epsilon$ 1 du résidu Glu69 de la sous-unité tubuline- $\beta$ 1
- O $\epsilon$ 1 du résidu Glu254 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ 2

Le résidu  $\beta$ E69 n'engage qu'un seul des deux oxygènes de sa chaîne latérale au contraire du Pi qui engage deux oxygènes. Hormis la coordination impliquant la molécule d'eau qui disparaît, les autres coordinations ne sont pas modifiées (**Tableau 2**).

**Tableau 2 :** Occupation des liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\beta$  et le GDP dans le système tubuline-Pi. Un pourcentage supérieur à 100% indique que les deux résidus partagent plus d'une liaison hydrogène.

Résidu	Chaîne	Fonction	Structure	Occupation (%)	Partenaire GTP
N99	Latérale	Donneur	T3	82	phosphate
G142	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	81	phosphate
Pi	Latérale	Donneur	Pi	81	phosphate
N226	Latérale	Accepteur	H7	75	guanine
S145	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	69	phosphate
Q11	Latérale	Donneur	H1	35	phosphate
N226	Latérale	Donneur	H7	18	guanine
T143	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	17	phosphate
Q11	Principale	Donneur	H1	16	phosphate
S145	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	15	phosphate

La rupture de la liaison  $P\beta$ - $P\gamma$  entraîne l'éloignement de la boucle T3 de sa position initiale. Ainsi, le groupement hydroxyle du Pi interagit avec le  $P\beta$  au travers d'une liaison hydrogène. L'interaction entre le nucléotide et la boucle T5 est également perdue à la suite de l'hydrolyse.

Dans le complexe tubuline-GDP· $Mg^{2+}$ , l'ion catalytique est coordonné avec les atomes  $P\alpha$  et  $P\beta$  du nucléotide, la chaîne latérale du résidu  $\beta$ 11, les deux oxygènes du groupement carboxylique du résidu  $\alpha$ E254 ainsi qu'une molécule d'eau. Le nucléotide conserve sa structure tout au long de la trajectoire et

est engagé dans une série de liaisons hydrogène avec la sous-unité tubuline- $\beta$  (Tableau 3). L'atome P $\beta$  est stabilisé par la boucle P tandis que l'atome P $\alpha$  interagit avec les boucles T3 et T5. La chaîne latérale du résidu  $\beta$ D177 de la boucle T5 engage une liaison hydrogène avec le ribose. Enfin, la base est stabilisée d'un part par des liaisons hydrogène avec les résidus  $\beta$ N204 et  $\beta$ N226 et d'autre part par un stacking avec le résidu  $\beta$ Y222 de l'hélice H6.

**Tableau 3 :** Occupation des liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\beta$  et le GDP dans le système tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup>. Un pourcentage supérieur à 100% indique que les deux résidus partagent plus d'une liaison hydrogène.

Résidu	Chaîne	Fonction	Structure	Occupation (%)	Partenaire GTP
N226	Latérale	Accepteur	H7	111	guanine
D177	Latérale	Accepteur	T5	70	guanine
N204	Latérale	Accepteur	T6	52	guanine
T205	Latérale	Donneur	T6	45	guanine
T178	Latérale	Donneur	T5	45	phosphate
S138	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	30	phosphate
Q11	Principale	Donneur	H1	29	phosphate
N99	Latérale	Donneur	T3	19	phosphate
T143	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	14	guanine
G142	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	9	phosphate

Enfin, dans le système tubuline-GDP, le Pi ainsi que le Mg<sup>2+</sup> ne sont pas présents dans le site E. On observe que le nucléotide GDP adopte une conformation dans laquelle, la queue phosphate est repliée vers le ribose. Dans cette conformation, un groupement hydroxyle du ribose est engagé dans une liaison hydrogène avec le P $\beta$ . Cette conformation n'a jamais été observée dans les structures cristallographiques ni documentée dans la littérature sur les études de la tubuline par modélisation moléculaire (**Tableau 4**).

**Tableau 4 :** Occupation des liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\beta$  et le GDP dans le système

Résidu	Chaîne	Fonction	Structure	Occupation (%)	Partenaire GTP
T143	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	91	phosphate
G142	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	80	phosphate
G144	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	60	phosphate
N226	Latérale	Accepteur	H7	58	guanine
T143	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	52	phosphate
N99	Latérale	Donneur	T3	48	phosphate
GDP	Latérale	Donneur	GDP (ribose)	44	phosphate
S145	Principale	Donneur	T4 (P-loop)	41	phosphate
S145	Latérale	Donneur	T4 (P-loop)	40	phosphate
Q11	Latérale	Donneur	H1	20	phosphate

tubuline-GDP.

Comme on peut le voir dans les tableaux ci-dessus, à la suite de l'hydrolyse, les interactions entre le nucléotide et la tubuline- $\beta$  se font principalement au niveau de la queue phosphate. On perd les interactions avec le ribose et celles impliquant la guanine sont réduites. En outre, la sortie du  $P_i$  du site E entraîne une réorientation des chaînes latérales des résidus  $\beta$ Q15 et  $\beta$ E69 qui pointent tous deux en dehors du site de fixation du nucléotide (Figure 33 *G* et *H*). De plus, le résidu  $\beta$ E69 interagit avec le résidu  $\alpha$ M1 et  $\alpha$ N50 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  coiffante.

Enfin, on observe le transfert de deux ions  $Na^+$  du solvant dans le site E (Figure 33 *D* et *H*). Le déplacement de ces deux ions se fait après le changement de conformation du GDP. On peut expliquer cette observation d'un point de vue électrostatique. Dans les systèmes tubuline-GTP et  $-P_i$ , les charges négatives de la queue phosphate sont en partie neutralisées par la charge positive du  $Mg^{2+}$ . Les deux ions  $Na^+$  jouent certainement un rôle de neutralisateur de charge dans cette poche contenant de nombreuses charges négatives (phosphates et groupement carboxyliques).

D'un point de vue de la méthodologie, c'est l'algorithme de PME qui calcule l'énergie électrostatique. L'algorithme peut accentuer le déplacement des ions pour favoriser la neutralisation des charges.

Dans certaines structures cristallographiques du complexe T2R (PDB IDs : 1SA0, 3HKD, 3HKC, 3HKE, 3N2G, 3N2K), le site-E de la chaîne B, située à l'interface inter-dimère contient un cation  $Mg^{2+}$ . Il est positionné entre le  $P_\alpha$  et le  $P_\beta$  du GDP. Les auteurs n'expliquent pas la présence du cation dans ces structures. La position des ions  $Na^+$  dans la dynamique du système tubuline-GDP est proche de celle du  $Mg^{2+}$  dans le complexe tubuline-GDP· $Mg^{2+}$  et dans ces structures 3D du complexe T2S citées ci-dessus.

### 1.3.b. Changement de structure aux interfaces latérales

A la suite de l'observation des structures moyennes de chaque système, j'ai identifié des régions présentant de grandes variations structurales au niveau des interfaces latérales : la boucle M de la sous-unité tubuline- $\beta$ 1 et la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha$ 2 (Figure 34).

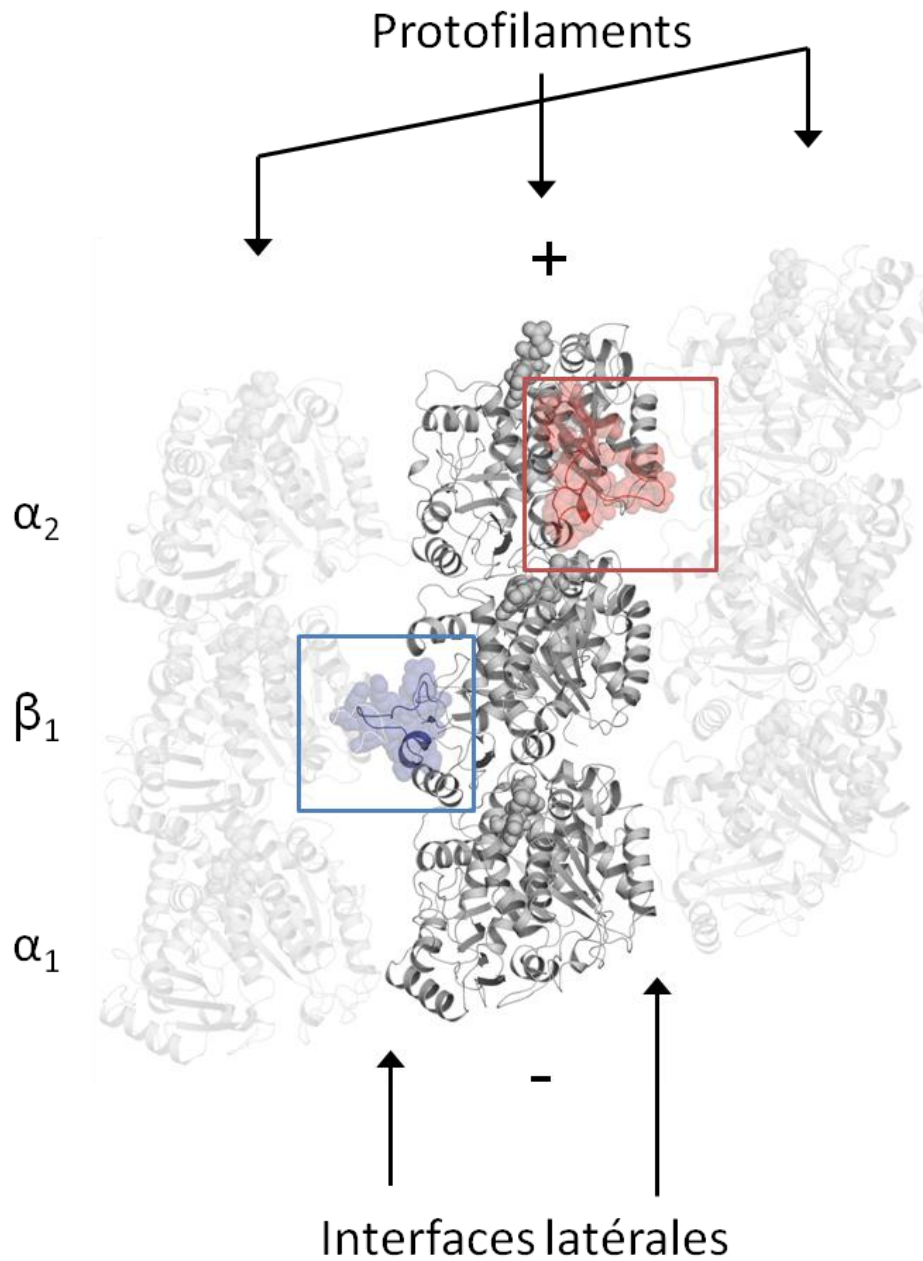
## 1.3.b.1. Différence de conformation de la boucle M dépendant du nucléotide

Dans le système tubuline-GDP, les résidus 271 à 279 de la sous-unité tubuline- $\beta$  sont repliées en hélice  $\alpha$  ou bien en hélice 3-10 au cours de la trajectoire stabilisée (Figure 35 *A* et *B*). Dans cette conformation, le groupement amine principal du résidu  $\beta$ S278 peut établir une liaison hydrogène avec le groupement carboxyle principal du résidu  $\beta$ T214 de l'hélice H6. D'autre part le groupement hydroxyle de  $\beta$ S278 peut être engagé dans une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu  $\beta$ K216. Enfin, on observe des liaisons hydrogène entre le groupement carboxylique du résidu  $\beta$ E288 situé sur l'hélice H9 et les deux groupements amines primaires du résidu  $\beta$ R282 ainsi qu'avec le groupement hydroxyle du résidu  $\beta$ T285. L'hélice formée entre les résidus 271 et 279 ainsi que les interactions avec les hélices  $\alpha$  H6 H9 rapprochent la boucle M du cœur de la sous-unité tubuline- $\beta$  (Figure 35 *B*).

Le complexe tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup> représentant également un état final arbore une conformation de la boucle M de la sous-unité tubuline- $\beta$  (Figure 35 *G* et *H*) similaire à celle du complexe tubuline-GDP (Figure 35 *A* et *B*) dans le sens où elles sont toutes les deux rapprochées du cœur de la tubuline. Toutefois, la structure en hélice  $\alpha$  n'est pas observée. D'autre part, le résidu  $\beta$ R282 n'est pas engagé dans les liaisons ioniques avec le résidu  $\beta$ E288. Au contraire, il est exposé au solvant. Toutefois, la structure de la boucle M ne devrait pas lui permettre d'interagir avec le protofilament voisin dans le contexte du microtubule.

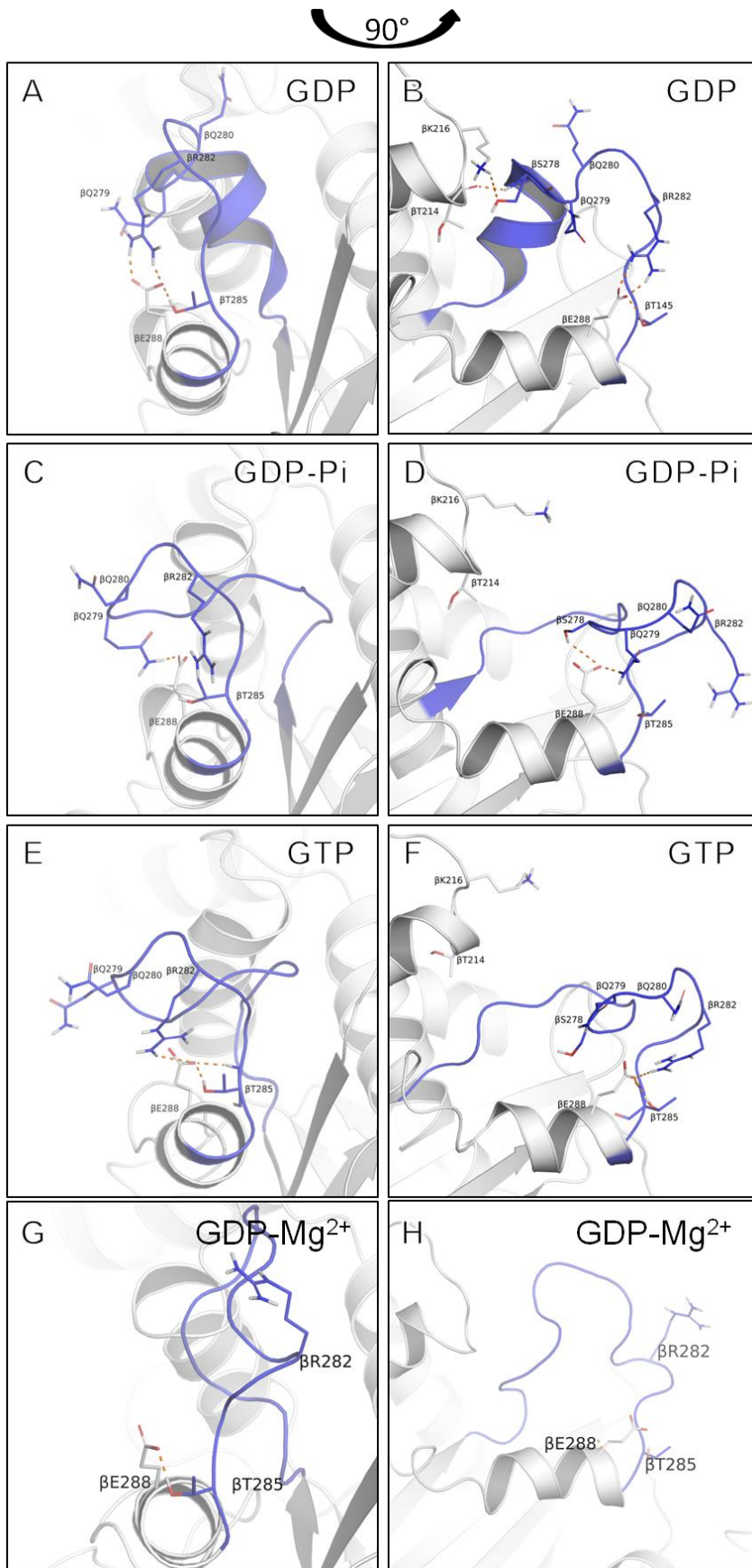
Dans le système tubuline-Pi, on n'observe donc pas d'hélice entre les résidus 271 et 279 (Figure 35 *C* et *D*). Dans cette configuration, l'interaction entre la boucle M et l'hélice H6 est impossible. Ainsi, les résidus  $\beta$ S278 et  $\beta$ Q279 engagent respectivement leur groupement hydroxyle et amine primaire dans des liaisons hydrogène avec le résidu  $\beta$ E288. Ce dernier ne peut plus interagir avec le résidu  $\beta$ R282.

De la même manière que dans le système tubuline-Pi, l'interaction entre la boucle M et l'hélice H6 est impossible dans le système tubuline-GTP (Figure 35 *E* et *F*). Par ailleurs, le résidu  $\beta$ R282 n'engage qu'un seul de ses deux groupements amines primaires dans une liaison hydrogène avec le résidu  $\beta$ E288. Le second groupement amine primaire et l'amine secondaire Ne sont exposés au solvant. Il en est de même pour les résidus  $\beta$ Q279 et  $\beta$ Q280. Ces résidus pourront potentiellement interagir avec le protofilament adjacent dans le microtubule pour favoriser les contacts latéraux (Figure 35 *F*).



**Figure 34 :** Localisation des boucles M et N dans le contexte du microtubule (vue longitudinale). La chaîne principale des sous-unités tubuline- $\alpha$  et  $-\beta$  est représentée en ruban. Le système étudié est représenté en gris foncé au centre, flanqué par deux autres hétérotrimères tubuline- $\alpha\beta\alpha$  en gris clair. La boucle M de la sous-unité tubuline- $\beta_1$  est représentée en sphères bleues et encadrée en bleu tandis que la boucle N est représentée en sphères rouges et encadrée en rouge.



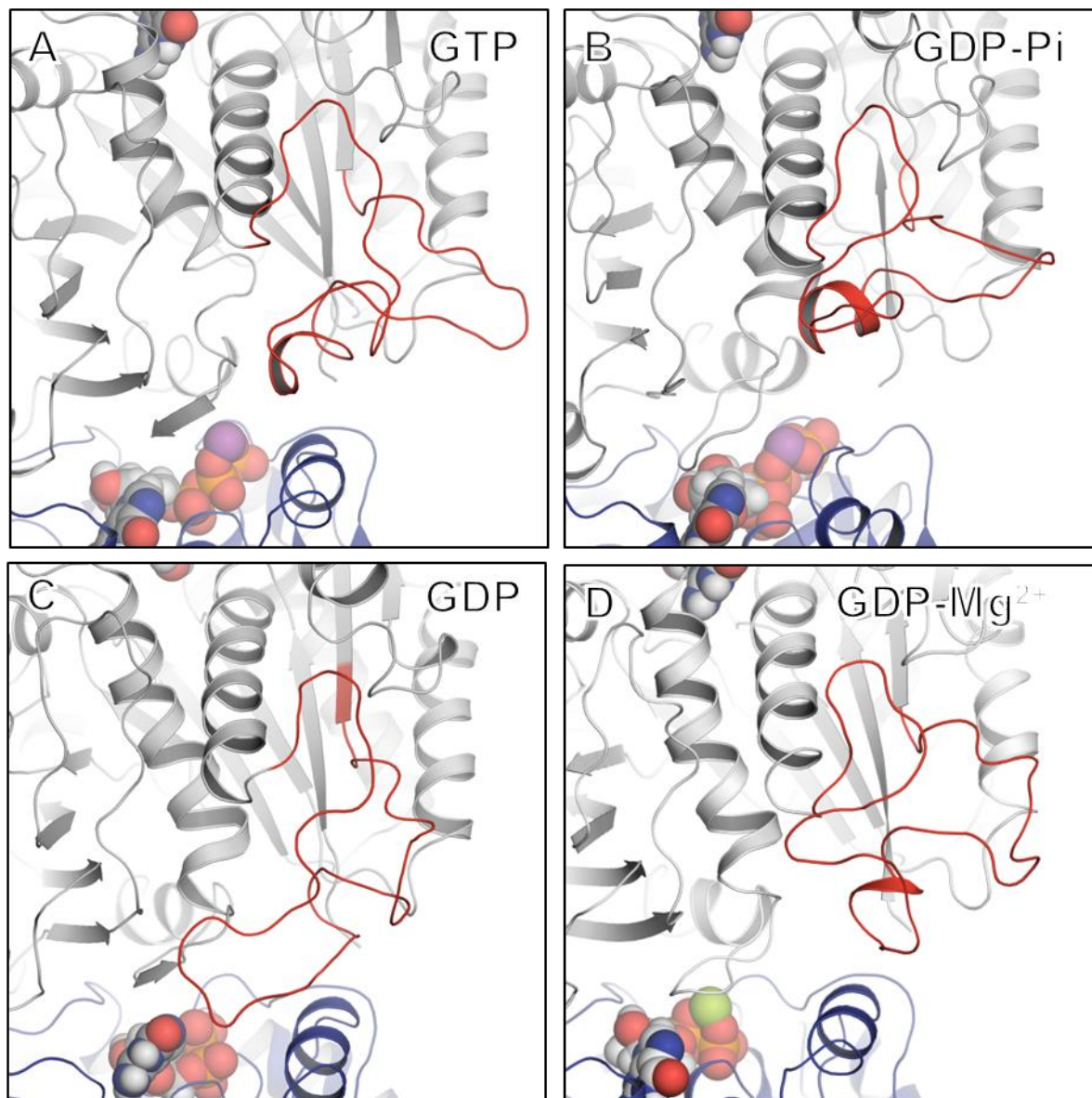


**Figure 35 :** Structure de la boucle M de la sous-unité tubuline- $\beta$ . La chaîne principale de la sous-unité tubuline- $\beta$  est représentée en ruban. La boucle M est identifiée en bleu. Les résidus d'intérêt sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés oranges. Pour des raisons de clarté, les hydrogènes non-polaires ont été enlevés. Vue latérale (A, C, E, G) et longitudinale (B, D, F, H) de la boucle M dans les systèmes tubuline-GDP, -Pi, -GTP et GDP-Mg<sup>2+</sup> respectivement.

1.3.b.2. Différence de conformation de la boucle N dépendant du nucléotide

J'ai également observé des structures différentes de la boucle N dans la sous-unité tubuline- $\alpha 2$  coiffante (Figure 34).

Dans le système tubuline-GTP, la boucle N pointe vers le solvant en direction d'un protofilament adjacent. De plus, les résidus 41 à 50 sont structurés en hélice  $\alpha$  tout au long de la trajectoire stabilisée (Figure 36 A).



**Figure 36 :** Vue longitudinale de la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha 2$ . Les chaînes principales sont représentées en rubans gris pour la sous-unité tubuline- $\alpha 2$  et bleu pour la sous-unité tubuline- $\beta 1$ . La boucle N apparaît en rouge. (A-D). Structure de la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha 2$  dans les systèmes tubuline-GTP, -Pi, -GDP et GDP·Mg<sup>2+</sup> respectivement. Les quatre figures représentent la structure de la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha 2$  à partir d'un même point de vue.

Après l'hydrolyse, on observe que la boucle N s'éloigne du site de fixation du nucléotide en direction de l'extrémité + du protofilament. Elle se referme également sur le cœur de la tubuline (Figure 36 B).

Dans le complexe tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup>, La boucle est à la fois plus proche de la sous-unité tubuline-β et du cœur de la tubuline (Figure 36 D). La structure en hélice est conservée entre les résidus 41 à 50. Enfin, dans le système tubuline-GDP, les résidus 41 à 50 ne sont plus structurés en hélice α. La boucle N se déplie et vient couvrir le site de fixation du nucléotide sous-jacent. La boucle est complètement refermée sur la sous-unité tubuline-α ce qui réduit fortement les contacts latéraux potentiels (Figure 36 C). Dans cette conformation, le résidu βE69 peut engager une liaison hydrogène avec le résidu αN49 (Figure 33 A).

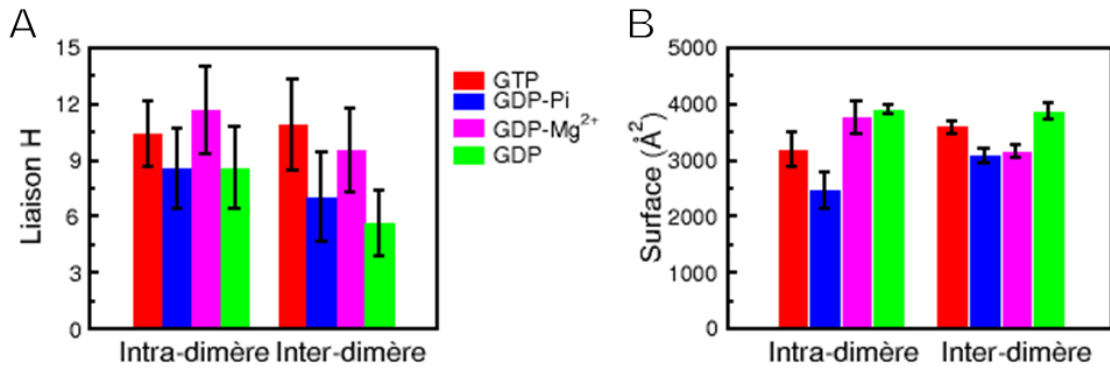
De manière intéressante, ces modifications structurales ont lieu sur la sous-unité tubuline-α coiffante. D'après ces observations, on peut conclure que l'hydrolyse ainsi que la sortie du Pi et du magnésium affectent à la fois l'interface latérale en réduisant les contacts avec les potentiels protofilaments, ainsi que l'interface inter-dimère au travers de la boucle N.

Par ailleurs, il est supposé que l'énergie conformationnelle libérée lors de l'hydrolyse se propage dans l'hétérodimère tubuline-αβ au travers de l'hélice transversale H7, entraînant également un déplacement du domaine intermédiaire [119]. D'après mes observations, on peut imaginer une propagation de l'énergie conformationnelle libérée lors de l'hydrolyse au-delà du dimère vers l'extrémité (+) du microtubule.

### 1.3.c. Les effets de l'hydrolyse aux interfaces longitudinales

Dans le paragraphe précédent, j'ai discuté les raisons et les effets du changement de structure de à l'interface inter-dimère entre GTP et GDP. J'ai notamment évoqué le fait qu'à la suite de l'hydrolyse (système tubuline-Pi), la boucle N se déplaçait dans la direction de l'extrémité + du protofilament. Par la suite, je me suis intéressé aux contacts qui s'opéraient au niveau des interfaces longitudinales.

J'ai étudié deux aspects des interactions entre les sous-unités au cours de la trajectoire stabilisée : d'une part le nombre moyen de liaisons hydrogène et d'autre part la moyenne de la surface de contact (Figure 37).



**Figure 37 :** L'hydrolyse du GTP modifie les contacts aux interfaces longitudinales. (A). Nombre moyen de liaisons hydrogène au niveau des interfaces intra- et inter-dimère. (B). surface de contact moyenne aux interfaces intra- et inter-dimère. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Dans le complexe tubuline-GTP, le nombre de liaisons H à l'interface inter-dimère est plus important qu'à l'intra-dimère. Dans les complexes tubuline-Pi, -GDP·Mg<sup>2+</sup> et les liaisons hydrogène sont moins importantes à l'interface inter-dimère qu'à l'interface intra-dimère (Figure 37 A). De manière surprenante, selon que le nombre de liaisons H au deux interfaces est plus élevé pour le complexe tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup> que pour le complexe tubuline-GDP.

Les résultats sont différents au niveau de la surface de contact (Figure 37 B). Dans le système tubuline-Pi, la surface de contact à l'interface intra-dimère est fortement réduite par rapport aux systèmes tubuline-GTP, -GDP·Mg<sup>2+</sup> et -GDP. La surface de contact à l'interface intra-dimère est plus grande pour les systèmes tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup> et -GDP d'environ 600 Å<sup>2</sup> par rapport au système tubuline-GTP.

Ces résultats nous indiquent que les sous-unités tubuline se réarrangent au cours de l'hydrolyse du nucléotide. Par ailleurs, un réarrangement des sous-unités de tubuline dans le système tubuline-GDP augmente les interactions au niveau de l'interface intra-dimère au détriment de l'interface inter-dimère. Ainsi, l'hydrolyse du GTP ainsi que la sortie du Pi et du Mg<sup>2+</sup> du site bouleverse les contacts longitudinaux (liaisons hydrogène et surface de contacts) et réduit les interactions latérales (structure de la boucle M et de la boucle N)

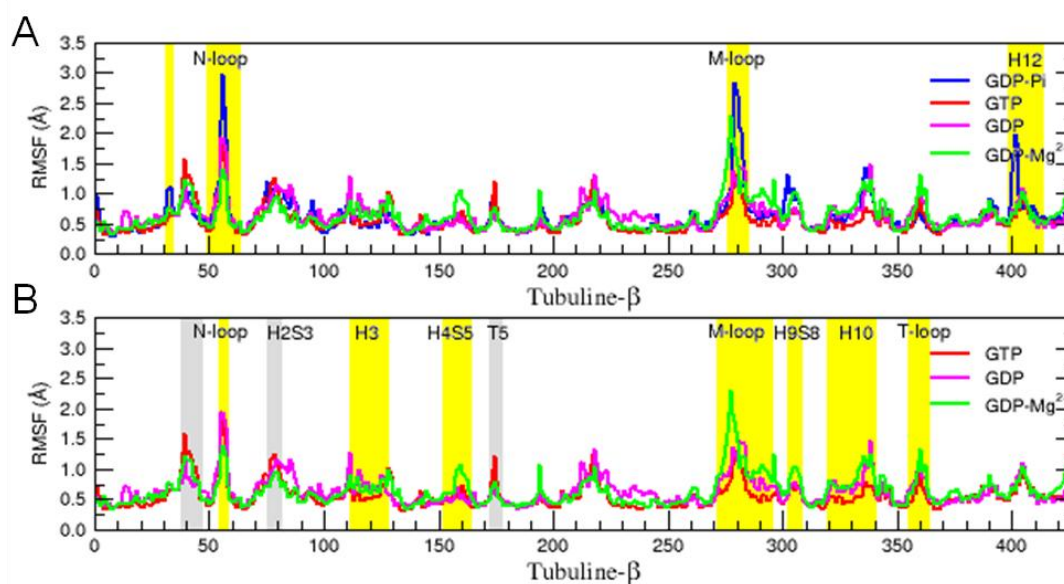
Enfin, dans le microtubule, la dépolymérisation se fait par oligomères qui prennent une structure courbée. Je propose que le réarrangement structural au niveau de l'interface longitudinale, conséquence de l'hydrolyse, soit un précurseur de la dépolymérisation ainsi que de la formation des oligomères courbes.

### 1.3.d. Le rôle de la fluctuation des structures secondaires dans la stabilisation du microtubule

Après avoir observé les changements de structure au niveau des interfaces latérales et longitudinales, je me suis penché sur la question de la flexibilité de ces régions et de son effet sur la stabilisation du microtubule (Figure 38). La comparaison des courbes de fluctuation de la sous-unité tubuline- $\beta$  du système tubuline-Pi avec les systèmes tubuline-GTP et -GDP et -GDP·Mg<sup>2+</sup> montre des pics marqués (Figure 38A) dans les régions suivantes :

- Boucle N
- Boucle M
- Boucle H9S8
- Hélice H12 (partie N-terminale de l'hélice)

Ces boucles sont situées au niveau des interfaces latérales et sont engagées dans les contacts avec les protofilaments adjacents dans le microtubule. L'hélice H12 participe quant à elle à l'interface inter-dimère.



**Figure 38** : RMSF calculé sur les C $\alpha$  de la sous-unité tubuline- $\beta$ . (A) Comparaison du RMSF des trois systèmes tubuline-GTP, -Pi et -GDP·Mg<sup>2+</sup> et GDP. Les régions les plus flexibles ont été surlignées en jaunes dans le système tubuline-Pi. (B) Comparaison du RMSF des deux systèmes tubuline-GTP et GDP. Les régions les plus flexibles ont été surlignées en gris dans le système tubuline-GTP et en jaune pour la tubuline-GDP·Mg<sup>2+</sup>.

Les structures les plus flexibles dans les complexes tubuline-GDP et -GDP·Mg<sup>2+</sup> sont situées au niveau des hélices H3 et H10 et au niveau des boucles H4S5, H9S8, N, M et T.

L'hélice H3 participe aux interfaces latérales et se situe dans l'environnement proche du site de fixation du nucléotide mais du côté de la chaîne phosphate. L'absence de  $P\gamma$  est associée à une augmentation de la fluctuation de cette hélice. L'hélice H10 participe aux interactions longitudinales à l'interface intra-dimère. Par ailleurs, les boucles H4S5, H9S8, N et M participent aux interactions latérales.

Keskin et coll. [49] ont proposé que la fluctuation des structures aux interfaces latérales participe à la stabilisation du microtubule. Nos observations vont à l'encontre de cette proposition. En effet, après l'hydrolyse, la tubuline est dans un état intermédiaire instable qui présente une augmentation de la fluctuation des boucles situées aux niveaux des interfaces latérales et à l'interface inter-dimère. Par ailleurs, il est connu que le  $Pi$  ne stabilise pas le microtubule [21]. Même si on ne peut pas affirmer que l'augmentation de la fluctuation dans les interfaces latérales entraîne la dépolymérisation, on peut conclure qu'elle ne favorise pas la stabilisation.

## **1.4. Conclusion**

Les fonctions cellulaires auxquelles participent les microtubules sont indissociables de leur dynamique de polymérisation et de dépolymérisation de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Cette dynamique est elle-même étroitement liée à l'hydrolyse du nucléotide GTP au niveau de la sous-unité tubuline  $\beta$ . La résolution de la structure cristallographique de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en feuillets zinc antiparallèles [31, 120] ainsi que dans les complexes T2R [32, 33] a permis d'élucider les interactions entre le nucléotide hydrolysé : GDP et la tubuline. Toutefois, la description de ces interactions était limitée par la résolution des structures cristallographiques. La récente détermination à haute résolution des structures des complexes sT2R-GTP et sT2R-GMPCPP [34] a apporté de nouvelles informations structurales concernant le nucléotide, dans le contexte de deux hétérodimères altérés par la présence d'une protéine partenaire.

La question des mécanismes de l'hydrolyse du GTP ainsi que de son effet sur la tubuline et le microtubule est restée partiellement sans réponse. La dynamique moléculaire a été utilisée pour étudier les changements de fluctuation ou de structure dont l'interprétation permettait d'expliquer le phénomène d'instabilité du microtubule. La dynamique moléculaire a ainsi apporté des arguments au modèle *lattice* en montrant que les protofilaments en solution sont courbés, quelque soit l'état du nucléotide dans le site E [47]. Par ailleurs, il a été proposé que les interfaces latérales jouent un rôle dans la stabilisation du microtubule [50, 51]. Toutefois, on peut se poser la question de la validité du modèle hétérodimérique pour l'étude de phénomène qui a lieu dans un protofilament ou dans le microtubule.

J'ai réalisé pour la première fois ici une étude comparative des différents états du nucléotide dans le site E dans le contexte d'un trimère, ce qui n'a jusqu'à présent jamais été réalisé.

L'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  est un complexe protéique de grande taille dont l'étude par des méthodes informatiques peut-être coûteuse en temps de calcul. Dans l'idéal, une représentation d'un fragment de microtubule, par exemple trois protofilaments parallèles permettrait d'analyser les interactions aux interfaces latérales. De la même manière, un protofilament étant constitué de deux hétérodimères ou plus assurerait une étude précise des contacts longitudinaux. A l'heure actuelle, les plus gros systèmes d'étude de la tubuline concernent des hexamères organisés en un protofilament [47] (trois hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$ ) ou deux protofilaments [54] (deux hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$ ) représentant plus de 200000 atomes une fois solvato.

Les complexes hétérotrimériques tubuline- $\alpha\beta\alpha$  présentés ici ont l'avantage de décrire correctement les interactions longitudinales intra- et inter-dimère et donc le site E où a lieu l'hydrolyse du nucléotide. Toutefois pour des raisons de faisabilité des calculs, un compromis a été fait sur les interfaces latérales en ne représentant qu'un seul protofilament.

La première problématique traitée dans cette étude concerne les interactions tubuline-nucléotide. Les simulations et la comparaison des complexes tubuline-GTP, -GDP-Pi, GDP·Mg<sup>2+</sup> et -GDP ont permis d'identifier des résidus, précédemment suspectés comme importants voire essentiels à l'hydrolyse du nucléotide. Les calculs montrent ainsi l'importance du résidu  $\alpha$ E254 dans la coordination du magnésium catalytique et donc potentiellement son rôle dans l'hydrolyse. De la même manière, le résidu  $\beta$ T143 essentiel à l'hydrolyse du GTP, participe à la stabilisation des groupements phosphates. D'autre part, lors de la simulation du complexe tubuline-GDP, deux ions Na<sup>+</sup> viennent se placer dans le site E pour contrer les charges négatives dans cette poche. Il est connu que le magnésium peut-être échangé dans les sites N et E [36]. Toutefois, les structures cristallographiques ne sont pas univoques quant à la présence ou l'absence d'un ion Mg<sup>2+</sup> dans la poche catalytique. Ce déplacement d'ions soulève la question du rôle du magnésium dans la dynamique du microtubule. Enfin, j'ai observé une molécule d'eau dont la position relative au nucléotide triphosphate serait favorable à l'échange de proton.

Des études de mutagenèse *in silico* pourraient apporter des informations supplémentaires sur ces résidus et leur rôle dans l'interaction avec le nucléotide et le magnésium. Par ailleurs, une puissance de calcul élevée permettrait de réaliser des études de mécanique quantique couplée à de la mécanique moléculaire pour relier les différents états décrits dans ces travaux et étudier les mécanismes réactionnels, les ruptures de liaisons et les échanges de protons qui ont lieu lors de l'hydrolyse du nucléotide.

La seconde problématique concerne l'effet des nucléotides sur la structure de la tubuline et du protofilament. Ces aspects de la dynamique de la tubuline ont déjà été traités dans le contexte d'un hétérodimère, cependant l'hydrolyse ne peut avoir lieu que dans un assemblage polymérique de tubuline. La modélisation d'un hétérotrimère de tubuline a mené à l'observation de changements de structure dans la sous-unité tubuline- $\beta$  ainsi que dans la sous-unité tubuline- $\alpha$  sus-jacente. Ces modifications structurales peuvent potentiellement altérer les interactions latérales dans le contexte du microtubule. Par ailleurs, l'amplitude de la fluctuation de ces régions est modifiée de sorte qu'elles soient plus dynamiques après l'hydrolyse. Ces modifications sont dues entre autre, à l'hydrolyse et la perte du Pi dans le site ainsi qu'à la réorganisation des interactions tubuline-nucléotide, par exemple au niveau de l'hélice H3. Enfin, le renforcement des contacts intra-dimère à l'issue de l'hydrolyse et de la perte du Pi suggère une stabilisation à l'intérieur de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en défaveur des interactions inter-dimère et donc du protofilament.

Ces analyses viennent compléter et conforter des études expérimentales et de modélisation moléculaires réalisées précédemment [54, 121]. Ils permettent également de mieux comprendre l'effet du GTP dans la stabilisation du microtubule.

Ces travaux font l'objet d'un article, inclus ci-dessous acutellement soumis au journal *Journal of Computer-Aided Molecular Design*.



## The Guanosine Nucleotide States Allosterically Affect the Lateral and Longitudinal Interfaces in Tubulin Protofilament

Joseph R. André,<sup>†,‡</sup> Marie-Jeanne Clément,<sup>†</sup> Elisabeth Adjadj,<sup>†</sup> Flavio Toma,<sup>†</sup> Patrick A. Curmi,<sup>†</sup> Philippe Manivet<sup>†,§</sup>

<sup>†</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR829; Université Evry-Val d'Essonne; Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, Evry 91025, France.

<sup>‡</sup> BioQuanta Corporation, Aurora, Colorado, USA

<sup>§</sup> Hôpital Lariboisière, Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Clinical Structural Biology unit, Paris 10, France

**ABSTRACT** The dynamics of microtubules (MT) is necessary for many microtubule-dependant cellular functions such as the mitosis. It has been recognized for a long time that GTP hydrolysis in  $\alpha\beta$ -tubulin polymers plays a critical role in this dynamics. However, the effects of the changes in the nature of the guanosine nucleotide at the E-site in  $\beta$ -tubulin on microtubules structures and stability are still not well understood. In the present work, we performed all-atom molecular dynamics simulations of a  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin heterotrimer in three different nucleotide states at the E-site: GTP, GDP-Pi and GDP. We propose a role for  $\alpha$ -tubulin residue glutamate 254 in catalytic magnesium coordination. In addition, we identified a water molecule required for nucleotide hydrolysis. We describe nucleotide-dependent conformational changes at  $\alpha$ -tubulin N-loop and  $\beta$ -tubulin M-loop as well as their potential consequences on the interactions between protofilament. Our results suggest that GTP hydrolysis reduces inter-dimer contacts in favor of intra-dimer interface. Finally, we confront these observations with the role of Taxol in microtubule stability and the recent tubulin-sT2R crystal structures.

## INTRODUCTION

Microtubules (MT) are elements of eukaryotic cytoskeleton involved in many cellular functions such as intracellular transport, motility and cell division (1,2). Their cylindrical structure results from lateral interactions of protofilaments, i.e., linear polymers of  $\alpha\beta$ -tubulin assembled in a head-to-tail fashion, which confers a structural polarity to microtubule (see Fig. 1 A) (3). Microtubules possess an intrinsic dynamics where slow growing phases alternate with rapid depolymerization phases. The transition between these phases is called catastrophe (growth to shortening) and rescue (shortening to polymerization). This phenomenon known as dynamic instability, requires GTP nucleotide hydrolysis and is necessary for the correct microtubule functions in cell (4). One extremity of the microtubules is called the “minus-end” because it possesses a slow dynamics compared to the other one called “plus-end”. The minus end exposes  $\alpha$ -tubulin while the plus end exhibits  $\beta$ -tubulin subunits to the solvent (5).

$\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits share only 40 % of sequence identity but have an overall similar 3D structure (6). The first atomic structure of tubulin was obtained by electron crystallography of zinc-induced anti-parallel tubulin sheets at 3.7 Å (7). It was then refined at 3.5 Å (8). Another structure of  $\alpha\beta$ -tubulin was obtained by X-ray crystallography in more physiological conditions but tubulin was there in complex with RB3, a tubulin sequestering protein from the stathmin family(9). These structures showed that each tubulin subunit is composed of three structural domains (see Fig. 1 B): i) The N-

terminal domain (or nucleotide-binding domain) a Rossman fold composed of six parallel  $\beta$ -strands (S1-S6) flanked by six  $\alpha$ -helices (H1-H6); ii) The intermediate domain linked to the N-terminal domain by the H7  $\alpha$ -helix and composed of four  $\beta$ -strands (S7-S10) and four  $\alpha$ -helices (H7-H10); iii) and finally, the C-terminal domain (or helical domain) is composed of  $\alpha$ -helices (H11, H11' and H12) that are involved in the interaction of MT with Microtubule Associated Proteins (10). Guanosine phosphate nucleotide (GTP) and  $Mg^{2+}$  bind to the N-terminal domain. The nucleotide binding site on  $\alpha$ -tubulin subunit (called N-site) is buried at the intra-dimer interface (Fig. 1 A) and is always associated with GTP which can be neither exchanged nor hydrolyzed (11). On the contrary, GTP bound to  $\beta$ -tubulin subunit E-site (Fig. 1 A) can be hydrolyzed into guanosine diphosphate (GDP) and inorganic phosphate (Pi) or exchanged with guanosine nucleotides from the solution (GTP or GDP) (12). Pi is released from the E-site after nucleotide hydrolysis whereas  $Mg^{2+}$  can be exchanged within the microtubule (13-15).

The role of the nucleotide in microtubule dynamics has been widely discussed. It has been shown that a single layer of GTP-tubulin is necessary and sufficient to stabilize microtubules (16). The GTP-cap compensates the conformational energy released by nucleotide hydrolysis in the microtubule lattice (17). Two models of microtubule polymerization and depolymerization promoted by GTP and GDP have been proposed respectively. The first model known as “allosteric model” is based on the X-ray structure of  $\alpha\beta$ -tubulin in zinc-induced sheet. It supposes that GTP-tubulin in solution is in a conformation straighter than GDP-tubulin thus more convenient for polymerization

(18,19). On the other hand, the “lattice model” supposes that both GTP- and GDP-tubulin complexes have curved conformations in solution and that  $\alpha\beta$ -tubulin is straightened by lateral contacts within the microtubule. GDP hydrolysis would lead to a reduction of these lateral contacts and destabilizes the microtubule (20,21). Recently, high-resolution crystal structures of subtilisin-cleaved tubulin in complex with RB3 (sT<sub>2</sub>R) have been solved with GDP, GTP and slowly-hydrolysable GTP analog: guanylyl-( $\alpha,\beta$ )-methylene-diphosphonate at the E-site (22). These structures bring new information regarding the conformation of the nucleotides and their binding sites. In agreement with the lattice model of polymerization, the authors proposed that GTP induces a loop movement at the nucleotide-binding site favors tubulin recruitment to the microtubule-growing end and eases the transition of the tubulin from curved-to-straight structure.

Molecular modeling approaches have also been used to study the effects of the nucleotide on tubulin and microtubules. Molecular dynamics simulations of  $\alpha\beta$ -tubulin suggested that the P $\gamma$  nucleotide moiety is involved in the straightening of the tubulin dimer (23) and that both tubulin flexibility and microtubule stabilization are affected by the nucleotide (24,25). Molecular dynamics simulations on tubulin hexamer were used to study the effects of Taxol, a natural microtubule-stabilizing agent. It was suggested that Taxol increases  $\beta$ -tubulin flexibility at regions that surrounds the bound nucleotide and allows the microtubule to counteract the conformational changes induced by nucleotide hydrolysis (26). More recently, molecular dynamics simulations performed on a linear  $\alpha\beta$ -tubulin hexamers brought new arguments to the “lattice model”. Both GTP- and GDP-tubulin protofilaments were described in a curved conformation (27).

To the best of our knowledge, the conformational differences between GTP-, GDP- and GDP-Pi-tubulin complexes have not been completely addressed yet, even though they can bring insight in the regulation of the microtubule stability. In this work, we used all-atom molecular dynamics simulations to study a  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin heterotrimer, which can correctly represent the environment required for the GTP hydrolysis and also bring information on interactions at both intra- and inter-dimer interfaces within the protofilament. We compared three different  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin heterotrimer systems, corresponding to the different nucleotides species observed at the E-site, and found that their secondary structure fluctuations and loop conformations differ. Our results suggest that GTP hydrolysis could lead to local and allosterically changes in the tubulin structure. We also bring new insights in microtubule stabilization by GTP and compare it to the mechanism of Taxol stabilization. Finally, we propose initial, intermediate, and final state conformations of the

nucleotide at E-site that could enlighten the mechanism of nucleotide hydrolysis.

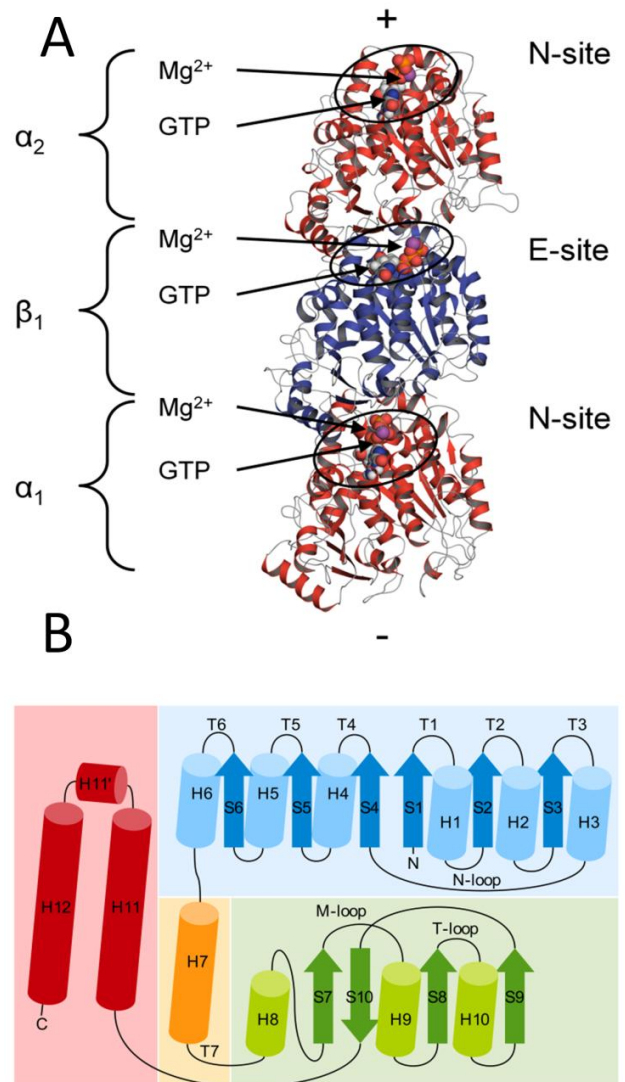


FIGURE 1: (A) Ribbon diagram of the  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin trimer. Protein structures are in red for  $\alpha$ -tubulin and blue for  $\beta$ -tubulin. GTP-Mg<sup>2+</sup> complexes are represented in sphere. Positive (+) and negative (-) signs indicate protofilament polarity. N- and E-site are circled in black. (B) Secondary structure diagram of a tubulin monomer. The N-terminal domain is in blue, inter-domain helix H7 in yellow, the intermediate domain in green and the C-terminal domain in red. Secondary structure elements are numbered according to Nogales et al.(7)

## METHODS

### Preparation of the simulated systems

Initial coordinates of the  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer were downloaded from the Protein Data Bank (PDB code 1JFF). The asymmetric unit contains GTP molecule and a Mg<sup>2+</sup> ion at the N-site and GDP at the E-site; Taxol as well as zinc ion are also present in  $\alpha$ -tubulin. In the electron crystallographic structure of bovine tubulin

(PDB ID: 1JFF), residue 1 is absent in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. Moreover,  $\alpha$ -tubulin subunit H1-S2 loop (residues 35-60) of this structure is not resolved. The Modeller software (version 9v8) was used to perform homology modeling of  $\alpha$ -tubulin subunit H1-S2 loop based on the X-ray structure of the tubulin-RB3 complex (PDB ID 1SA0) ( $\alpha$ -tubulin subunit residues 38-46 are missing in this structure) (28). Homology models were generated and assessed with DOPE score. The Ramachandran plot of the best model was then calculated by ProCheck (Fig. S1 and S2) to discriminate unfavorable amino-acids backbone conformations (29). The protofilament-like  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin trimer was assembled according to the symmetry operations in 1JFF crystal (Fig. 1 A). Three different complexes were built:  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin with GTP/Mg<sup>2+</sup> complex on each nucleotide-binding site (GTP-tubulin);  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin with GTP/Mg<sup>2+</sup> on N-site and GDP-Pi/Mg<sup>2+</sup> on E-site (Pi-tubulin);  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin with GTP/Mg<sup>2+</sup> on N-site and GDP/Mg<sup>2+</sup> on E-site (GDP-tubulin). To acquire a nonhydrolyzed state on the E-site, C $\alpha$  atoms of  $\alpha$ -tubulin were aligned and fitted to C $\alpha$  atoms of  $\beta$ -tubulin using PyMOL (30). Coordinates of the GTP nucleotide and magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>) were transposed from  $\alpha$ -tubulin to  $\beta$ -tubulin. In the GDP-tubulin complex, the Mg<sup>2+</sup> ion at E-site was placed between P $\alpha$  and P $\beta$  atoms according to 1SA0 crystal structure. To build the Pi-tubulin intermediate state, the phosphate bond between the second and the third phosphate atoms was broken and a hydroxyl group was added to the P $\gamma$  atom.

### Molecular dynamics simulations

Each system was prepared using tleap from the AmberTools package and the Amber ff03 force field (31-33). Protonation state of histidine residues was predicted using reduce tool from AmberTools package. Protein complexes were surrounded with at least 12 Å TIP3P water model in an orthorhombic box (34), with a total of ~ 114,000 atoms. Overall charges were neutralized by addition of Na<sup>+</sup> ions (57 in GTP-tubulin; 58 in Pi-tubulin and 56 in GDP-tubulin). Nucleotide parameters were obtained from Amber parameter database (35). Topology and coordinate files were converted to GROMACS format using acpype (36). Molecular dynamics simulations were carried out with GROMACS 4.5.4 (37). Long-range electrostatic interactions beyond 12 Å were computed using Particle Mesh Ewald (PME) (38). Van der Waals interactions were switched from 8 Å and cutoff beyond 10 Å. Minimization was performed with constraints on

protein and ligand for 100 steps of Steepest-Descent with 1 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup> convergence criterion and followed by 5,000 steps of Conjugated-Gradient with 0.01 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup> convergence criterion. The same procedures were then applied without constraint.

Each system was equilibrated during 100 ps (1 fs integration time-step) with positional restraint on complex (10 kJ) in NVT (where number of particles, volume, and temperature are constant) and periodic boundary conditions. Temperature was maintained constant at 310 K using Berendsen thermostat (39). Positional restraints were removed and system was equilibrated during 5 ns (1 fs integration time-step) in NPT (number of particles, pressure and temperature are constant) conditions using Berendsen barostat at 1 atm and Berendsen thermostat at 310 K (39).

Finally, simulations were run in NPT conditions using Berendsen barostat at 1 atm and Velocity-Rescale thermostat at 310 K. Trajectories were recorded every 1 ps during 48 ns (40).

### Analysis

Trajectory analyses were performed on the last 8 ns after reaching stability of the root mean-square deviation (RMSD) computed on C $\alpha$  atoms (Fig. S3). Molecular representations were generated with PyMOL (30). Depicted structures correspond to the representative frame of the cluster computed over the last 8 ns of each trajectory. Root Mean Square Fluctuation (RMSF) was computed using g\_rmsf tool from GROMACS suite after RMSD fitting on  $\beta$ -tubulin C $\alpha$  atoms. Average H-bonds number between subunits and percentage of presence was calculated using VMD H-bond plug-in with the following criteria: donor-acceptor distance inferior to 3.5 Å; donor-hydrogen-acceptor angle superior to 150° (41). Connolly surface area (SASA) was computed (1.4 Å probe radius) for each subunit and  $\alpha\beta$ - as well as  $\beta\alpha$ -tubulin heterodimers using VMD. Intra- and inter-dimer contact areas (IntraCA and InterCA respectively) were calculated using Eq. 1 and 2.

$$\text{IntraCA} = \text{SASA}_{\alpha} + \text{SASA}_{\beta} - \text{SASA}_{\alpha\beta} \quad (1)$$

$$\text{InterCA} = \text{SASA}_{\beta} + \text{SASA}_{\alpha} - \text{SASA}_{\beta\alpha} \quad (2)$$

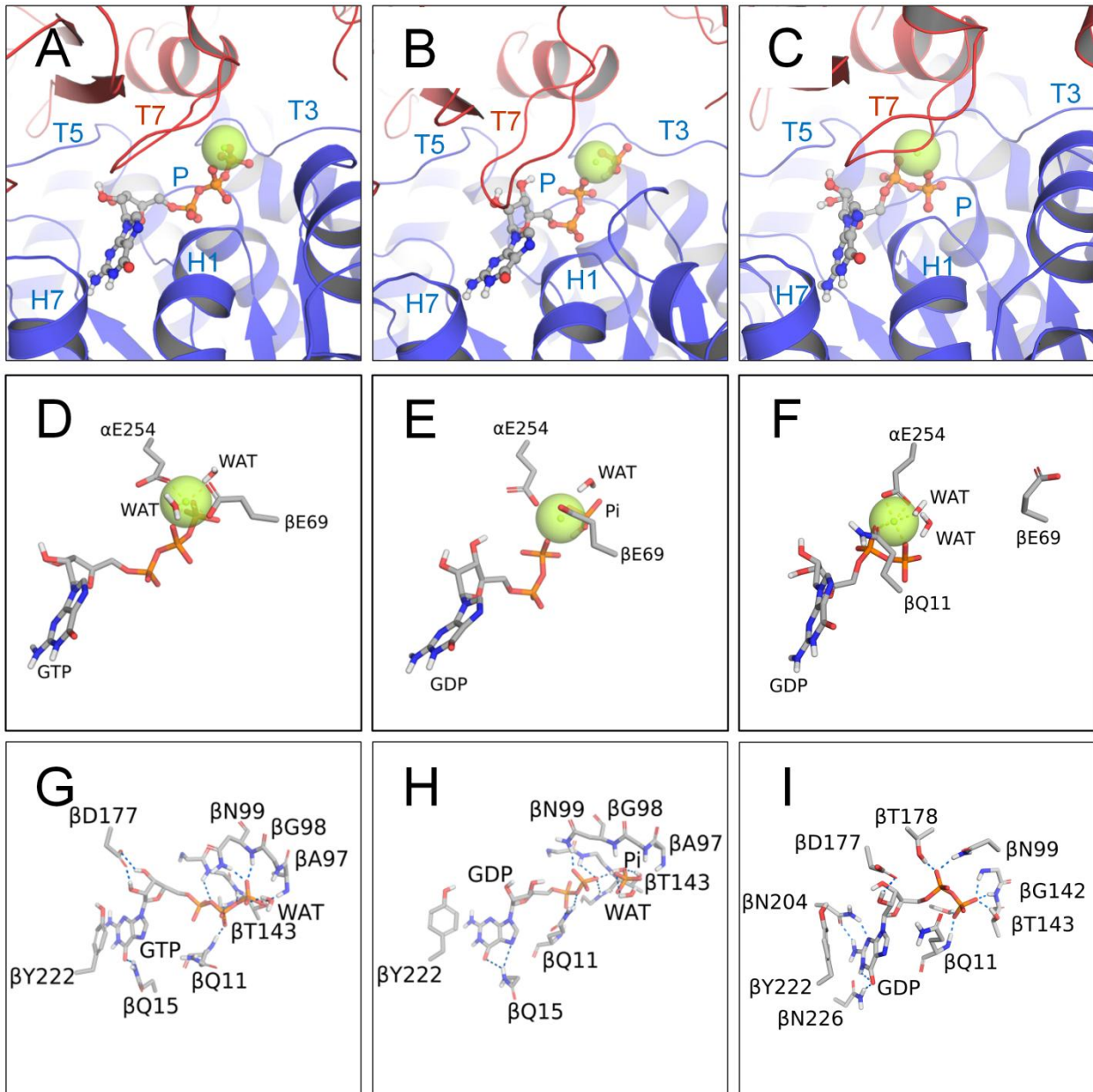


FIGURE 2: Representation of the nucleotide environment at the  $\beta$ -tubulin E-site. (A-C) Blue and red ribbons depict  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 2-tubulin subunit respectively. GTP, GDP and Pi are shown in ball and sticks. Green and purple spheres illustrate  $Mg^{2+}$  and  $Na^{+}$  ions respectively. (D-F) Molecules involved in  $Mg^{2+}$  coordination (G-I) and residues interacting with the nucleotide are shown in stick. H-bonds are depicted with blue dashes. For the sake of clarity, nonpolar hydrogen atoms have been hidden.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The release of $P_{\gamma}$ alters the nucleotide structure and impacts tubulin interdimer interaction.

**GTP-tubulin:** We found in the present simulation of the GTP-tubulin complex (Fig. 2 D) that the  $Mg^{2+}$  ion is coordinated with oxygen atoms from the  $P_{\beta}$  and the  $P_{\gamma}$  phosphate tail, a water molecule and the side chains of the residues  $\alpha$ E254 (Glutamate 254 of the capping  $\alpha$ -tubulin) and  $\beta$ E69 (Glutamate 69 of  $\beta$ -tubulin), the latter engaging the two oxygen atoms of the carboxylic group in a bidentate fashion. Löwe et al. in the structural description of the zinc-induced tubulin sheets

proposed that  $Mg^{2+}$  is coordinated by conserved  $\alpha$ D69 and  $\alpha$ E71 residues (D67 and E69 in  $\beta$ -tubulin respectively) (8). However, in their observations the  $\alpha$ D69 carboxylic group is more than 3 Å away from the  $Mg^{2+}$  cation. This distance disagrees with statistics that we performed here using the PDB database which showed that the average distance observed between  $Mg^{2+}$  and aspartate or glutamate side chain is within the  $2.23 \pm 0.24$  Å range (42-44). On the other hand, in the present simulation of the GTP-tubulin system, the volume between  $\alpha$ D69 (and  $\beta$ D67) and  $Mg^{2+}$  is filled with water molecules, which hinder the suggested amino-acid/cation interaction. In the more recent high-

resolution sT<sub>2</sub>R crystal, the structures also display water molecules interposing between  $\beta$ D67 and Mg<sup>2+</sup> cation. However, the coordination of the magnesium in the GTP-tubulin-sT<sub>2</sub>R complex involves  $\beta$  and  $\gamma$  phosphate atoms of the nucleotide, four water molecules. Our observations disagree with the crystal structures since  $\alpha$ E254 and  $\beta$ E69 participates to the magnesium coordination. Nevertheless, these crystal structures also include a protein partner that tends to curve the  $\alpha\beta$ -tubulin tetramer thus altering the longitudinal interfaces. By comparison of N- and E-site Lowe et al. proposed that E254 in  $\alpha$ -tubulin, substituted in K in  $\beta$ -tubulin as a key residue in GTP-hydrolysis (Fig. 1 A) (45). In addition to the role in GTP hydrolysis our observations support a role of  $\alpha$ E254 in magnesium coordination.

The guanosine group in GTP-tubulin interacts with the  $\beta$ Q11 backbone and the  $\beta$ Q15 side chain through H-bonds (Table 1). The phosphate tail is stabilized by a conserved  $\beta$ -tubulin signature motif GGGTGS on the T4 loop (Fig. 2 G) as well as T3 loop residues  $\beta$ A97,  $\beta$ G98 and  $\beta$ N9, which are involved in H-bonds with P $\gamma$  (Table 1). Finally, both hydroxyl groups of the ribose interact with the carboxylic group of residue  $\beta$ D177 (T5 loop) during the last 8 ns (Table 1) (Fig. 2 G). The importance of the  $\beta$ -tubulin T143 amino acid (T4 loop) for nucleotide hydrolysis has been highlighted by directed mutagenesis studies on the  $\beta$ -tubulin signature motif (46,47). Nawrotek et al. observed a nucleotide dependant conformational change at T3 and T5 loops in sT<sub>2</sub>R structure (22). They proposed that a T5 loop flip exposes an acidic amino acid at the plus end that could help the recruitment of a novel  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer. In our simulations, we did not observe such flip of the T5 loop (Fig. 2 A-C).

Finally, a water molecule has been identified near P $\gamma$  and  $\beta$ E69 (Fig. 2 D). The average distance between the hydrogen atom of the water molecule and the oxygen atom of the phosphate group is  $2.40 \pm 0.49$  Å and the average angle between the hydrogen atom of the water molecule, oxygen atom of the phosphate group and the phosphorus atom is almost tetrahedral ( $110.5 \pm 23.3^\circ$ ). The position of the water is favorable to GTP hydrolysis as described by Friedman and Devary (48).

**GDP-Pi-tubulin:** After GTP hydrolysis, five oxygen atoms from the following partners then coordinate the magnesium ion: Pi, P $\beta$ ,  $\beta$ E69 and  $\alpha$ E254 (Fig. 2 E). GDP is partially stabilized by H-bonds with  $\beta$ T143 main chain as well as side chain of  $\beta$ N99 (Table 1) (Fig. 2 E). The H-bonds network is also modified (Fig. 2 E and H): the interaction of  $\beta$ Q11 side chain with P $\alpha$  atom is increased (Table 1) while the carboxylic group of  $\beta$ E69 now coordinates magnesium in a monodentate fashion (Fig. 2 E). It has been demonstrated that GDP-Pi-tubulin complex destabilizes the microtubule and therefore that GDP-Pi-tubulin is not an analog of GTP-tubulin (49). The present observations confirm that the interactions between Pi and tubulin are different from

that observed between P $\gamma$  and tubulin in the GTP-tubulin-complex.

TABLE 1: H-bonds occupancies between tubulin and nucleotide. Values superior to 100 % indicates that a residue is involved in more than two H-bonds with a nucleotide.

Residue	Chain	Occupancy %			Region	
		GTP	GDP-Pi	GDP-Mg <sup>2+</sup>		
$\alpha$	N249 Backbone		0.75		T7 loop	
	N249 Side chain		1.25			
	A252 Backbone		7.23			
	L253 Backbone		1.50			
	L253 Side chain	0.25				
	K352 Side chain			5.24		S9
Q11	Backbone	29.93	16.21	28.93	H1	
	Side chain	1.25	40.15	2.00		
	C12 Backbone	39.15				
	C12 Side chain	1.50	1.25	0.25		
	Q15 Side chain	53.37	7.73	1.00		
	A97 Backbone	15.46				
G98	Backbone	23.94			T3 loop	
	N99 Backbone	66.33	5.99			
	N99 Side chain	75.06	81.55	19.20		
	S138 Side chain	48.63	6.23	30.92		
	G141 Backbone	6.49	6.23	0.25		
	G142 Backbone	39.40	81.30	8.73		
$\beta$	T143 Backbone	14.96	16.96	5.49	T4 loop	
	T143 Side chain	19.95		13.22		
	G144 Backbone	8.48	2.24			
	S145 Backbone		14.71			
	S145 Side chain		69.08			
	D177 Side chain	262.59	9.98	70.33		
T178	Side chain		0.25	45.14	T5 loop	
	E181 Side chain			0.25		
	N204 Side chain		0.50	52.61		H6
	Y222 Side chain	0.75	2.00	1.00		H6-H7 loop
	N226 Side chain	158.11	93.51	111.97		H7
	Pi		81.05			Pi
GDP			21.95	GDP		

**GDP-tubulin:** The Mg<sup>2+</sup> ion in the GDP-tubulin complex is coordinated with GDP P $\alpha$  and P $\beta$  atoms, carboxyl group of  $\beta$ Q11 side chain, both oxygen of  $\alpha$ E254 side chain carboxylic group and a water molecule (Fig. 2 C and F). The GDP nucleotide conserves its conformation all along the simulation and is engaged in several H-bonds with  $\beta$ -tubulin subunit (Table 1). P $\beta$  atom is stabilized by side chains of  $\beta$ S138 and  $\beta$ T143 (T4 loop) as well as  $\beta$ Q11 main chain (H1 helix) (Fig. 2 I). P $\alpha$  atom interacts with T3 loop residue  $\beta$ N99 and T5 loop residue  $\beta$ T178. The latter loop is also involved in the interaction with the ribose through  $\beta$ I177 side chain. Finally, guanine base is stabilized by both H6 and H7 *via*  $\beta$ N204 and  $\beta$ N226 respectively (Table 1) and H6-H7 loop residue  $\beta$ Y222 is in a position favorable to the stacking with the guanine base.

On the contrary,  $\beta$ Q15 flips outside the binding site and no longer interacts with the guanosine base. Residue  $\beta$ E69, involved in magnesium coordination as well as in GTP hydrolysis, turns away from the binding site too; making possible contacts with the N-loop of the capping  $\alpha$ -tubulin (Fig. 2 F). Finally, it is known that tubulin exchange divalent cation at both N- and E-site, even after nucleotide hydrolysis despite a lower binding affinity of GDP to magnesium (14). We thus performed molecular dynamics simulation of  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin heterotrimer with GDP and without magnesium at the E-site following the protocol described in this study. We observe that two  $\text{Na}^+$  ions transferred from the solvent to the E-site and replaced  $\text{Pi}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  atoms. The nucleotide conformation in this simulation and in the GDP-tubulin complex differs slightly but conserves its interactions with H1, T3 and P-loop (Fig. S4).

### Effect of the nucleotide state at E-site on lateral interface structures of tubulin

We observed conformational changes at  $\beta$ -tubulin M-loop and  $\alpha$ 2-tubulin N-loop (Fig. 3). Indeed, the folding of the M-loop (Fig. 4 A-C) varies in presence (GTP- or Pi-tubulin) or in absence of  $\text{P}\gamma$  (GDP-tubulin). In GTP-tubulin, the  $\beta$ R282 residue is involved in H-bond interaction with  $\beta$ E288 contrary to Pi- and GDP-tubulin complexes. Moreover, because of the conformation of M-loop,  $\beta$ R282 residue in GDP-tubulin is set back. In fact, the GDP-tubulin M-loop is closer to the tubulin core compared to the other systems (Fig. 4 A-C). Mitra and Sept studied the effect of Taxol, a microtubule-stabilizing agent, on a reduced MT model (two adjacent protofilaments of a  $\alpha\beta\alpha$ -tubulin heterotrimer) (26). They proposed a possible mechanism for Taxol activity mediated by  $\beta$ R282 and M-loop: In presence of Taxol, M-loop fluctuation is reduced, its structure is bent toward the adjacent protofilament and residue  $\beta$ R282 breaks its polar interaction with  $\beta$ D288, in favor of E53 in the neighboring  $\beta$ -tubulin. Giannakakou et al. isolated epothilone-resistant cell lines that bear an acquired  $\beta$ R282Q mutation located near the Taxol binding site (50). This mutation impairs Taxol-tubulin interaction, thus position 282 in  $\beta$ -tubulin was considered as harboring a key residue for the molecular recognition of taxanes and epothilone. The similarities between our observations and the effects of Taxol suggest a common mechanism of microtubule stabilization in which nucleotide hydrolysis changes M-loop conformation and potentially alters contacts between adjacent protofilaments.

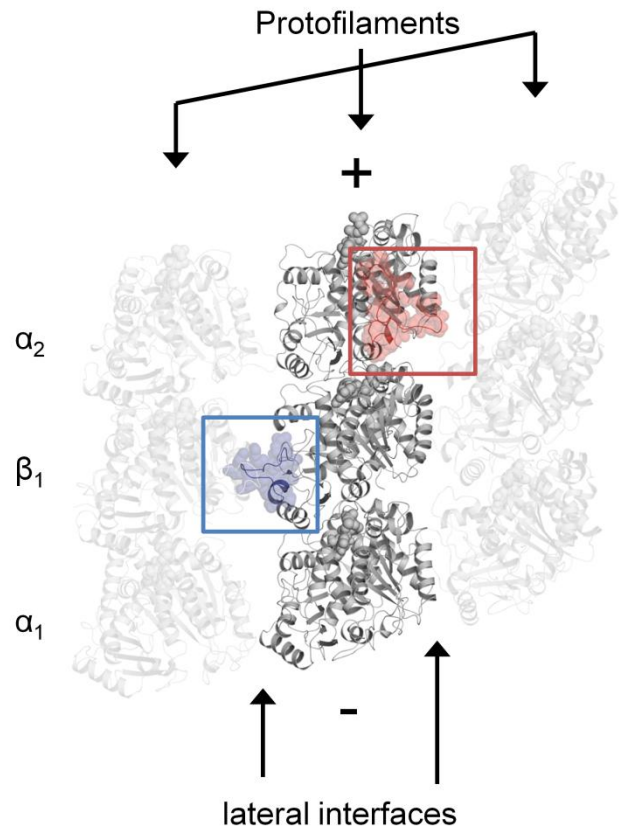


FIGURE 3: Localization of the  $\beta$ -tubulin M-loop and  $\alpha$ -tubulin N-loop. Tubulin secondary structure is represented in ribbon. The protein system used in molecular dynamics is emphasized in darker grey. The  $\alpha$ 2-tubulin N-loop in red and  $\beta$ 1-tubulin M-loop in blue are represented as transparent spheres.

On the other hand, the nucleotide hydrolysis and subsequent  $\text{Pi}$  release alter structures close to the E-site, for example the N-loop structure of the capping  $\alpha$ -tubulin (Fig. 4 D-F). Before hydrolysis (Fig. 4 D), the  $\alpha$ -tubulin N-loop is oriented toward the solvent (and thus the potential adjacent protofilament) and reveals a  $\alpha$ -helix between residue 41-50. After hydrolysis (Fig. 4 E), the  $\alpha$ -helix is conserved but the N-loop is shifted upward in the protofilaments and gets closer to the tubulin core, reducing then the lateral contacts. Finally, after  $\text{Pi}$  release (Fig. 4 F), N-loop collapses onto the tubulin core. This conformation greatly reduces potential lateral contacts. Morrissette et al. proposed a similar effects induced by dinitroaniline (51). The structure modifications of M- and N-loops indicate an allosteric effect of nucleotide hydrolysis that alters lateral interfaces. Moreover, GTP hydrolysis affects the capping  $\alpha$ -tubulin subunit, suggesting a potential propagation along the protofilament.

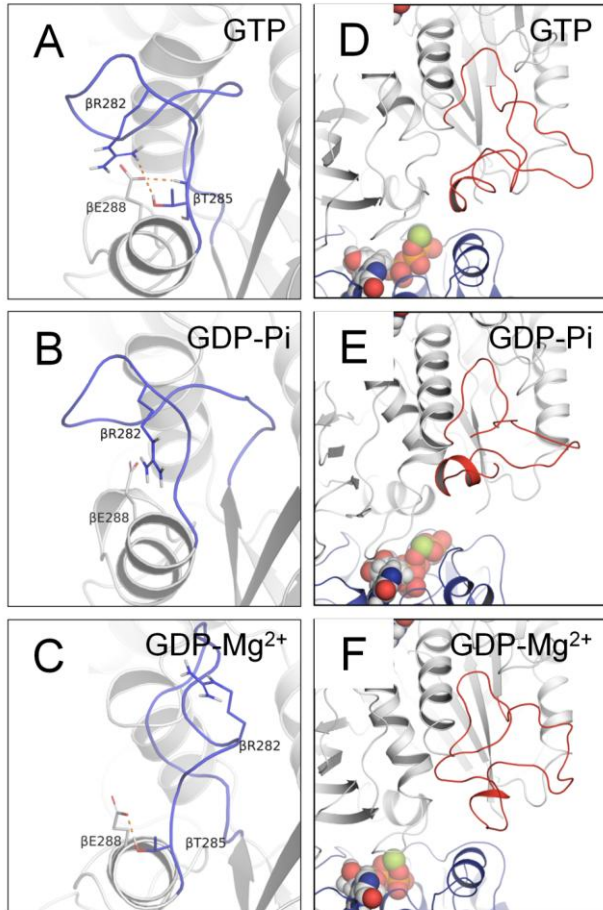


FIGURE 4: Pi release allosterically affects lateral interfaces structures. Secondary structures are represented ribbon. (A-C) M-loop is in blue. Residues of interest are shown in sticks and H-bonds in orange dashes (D-F), N-loop in red and  $\beta$ -tubulin subunit in blue. GTP, GDP, Pi and  $Mg^{2+}$  are shown as spheres.

#### Effect of the nucleotide state at E-site on the lateral interface fluctuation of $\beta$ -tubulin

Based on the RMSF plot (Fig. 5 A), it is clear that  $\beta$ -tubulin subunit exhibits peaks of fluctuation in the Pi-tubulin complex. These peaks correspond to N-, M- and H9-S8 loops that participate to lateral contacts as well as the N-terminal region of H12 helix that is involved in interdimer interface.

We also observe differences between  $\beta$ -tubulin subunit fluctuations of GTP- and GDP-tubulin systems (Fig. 5 B). Indeed,  $\beta$ -tubulin fluctuation is more important for GDP-tubulin at  $\alpha$ -helices H3 and H10 as well as H4-S5, H9-S8 and M- and T-loop. H3, H4-S5, H9-S8 and M-loop participate to lateral contacts whereas H10 is involved in intra-dimer interfaces. In GTP-tubulin system,  $\beta$ -tubulin fluctuation is more important at N-loop (residues 39-48), T5 loop and H2 helix (residues 74-80) that interact with the ribose of the GTP. In fact, fluctuation at lateral interfaces increases after GTP hydrolysis.

Keskin et al. studied the  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer with GTP or GDP at E-site using molecular dynamics (25). They found that structures involved in contacts with adjacent protofilaments and more particularly H3 and H10 helices, H2-S3, N- and M-loops in  $\beta$ -tubulin subunit, exhibit higher fluctuation in the presence of GTP. Our observations disagree with their conclusion. The presence of a capping  $\alpha$ -tubulin subunit appears to affect the dynamics of  $\beta$ -tubulin.

We propose that low amplitude fluctuations at lateral interfaces expose residues to the adjacent protofilament, increase potential contacts and therefore promote MT stabilization.

#### Effect of the nucleotide state at E-site on the longitudinal interfaces

The average number of H-bond interactions decreases between GTP- and Pi-tubulin (respectively from  $10.42 \pm 1.76$  to  $8.59 \pm 2.17$  at intradimer interface and from  $10.89 \pm 2.44$  to  $7.04 \pm 2.38$  at interdimer interface) (Fig. 6 A). Interdimer H-bonds number also decreases in GDP-tubulin compared to GTP-tubulin but is slightly higher than Pi-tubulin ( $8.61 \pm 2.22$ ). In contrast, GDP-tubulin intradimer interface has less H-bonds than Pi-tubulin ( $5.64 \pm 1.74$  vs.  $7.04 \pm 2.37$ ).

The contact area between varies with the guanosine nucleotide state (Fig. 6 B). At both inter- and intradimer interface, surface contact area is reduced in Pi-tubulin compared to GTP-tubulin ( $2468 \text{ \AA}^2$  and  $3198 \text{ \AA}^2$  respectively). The surface contact area increases again at GDP nucleotide state ( $3910 \text{ \AA}^2$  and  $3198 \text{ \AA}^2$  respectively). Together, the H-bonds and surface data indicate that Pi-tubulin is an unstable intermediate. The data also show that hydrolysis and Pi release lead to an increase of overall interactions in the GDP state at intradimer interface and that the destabilization of protofilament would occur mainly at interdimer interface.

#### Origin of the difference between the present MD and previous tubulin crystal structures

The tubulin-nucleotides interactions as well as the conformational changes that we describe tend to disagree with the observation made of the crystal structure of GTP- and GDP-sT2R. However, GDP-sT2R structure does not contain a  $Mg^{2+}$  ion at E-site, on the contrary to other T2R crystal structures. In addition, the partner RB3 bends the tetramer, which affects both intra- and inter-dimer interfaces. On the contrary, our simulations model free protofilaments with straight initial conformation; the longitudinal interfaces are more densely packed and closer to the conformation within the microtubule compared to the T2R complexes. Finally, microtubule destabilization is related to the nucleotide hydrolysis and is associated to conformational changes of the  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer. Indeed, as proposed in the lattice model, significant conformational changes are expected to induce a depolymerization phase. In this matter, our results greatly support this hypothesis.

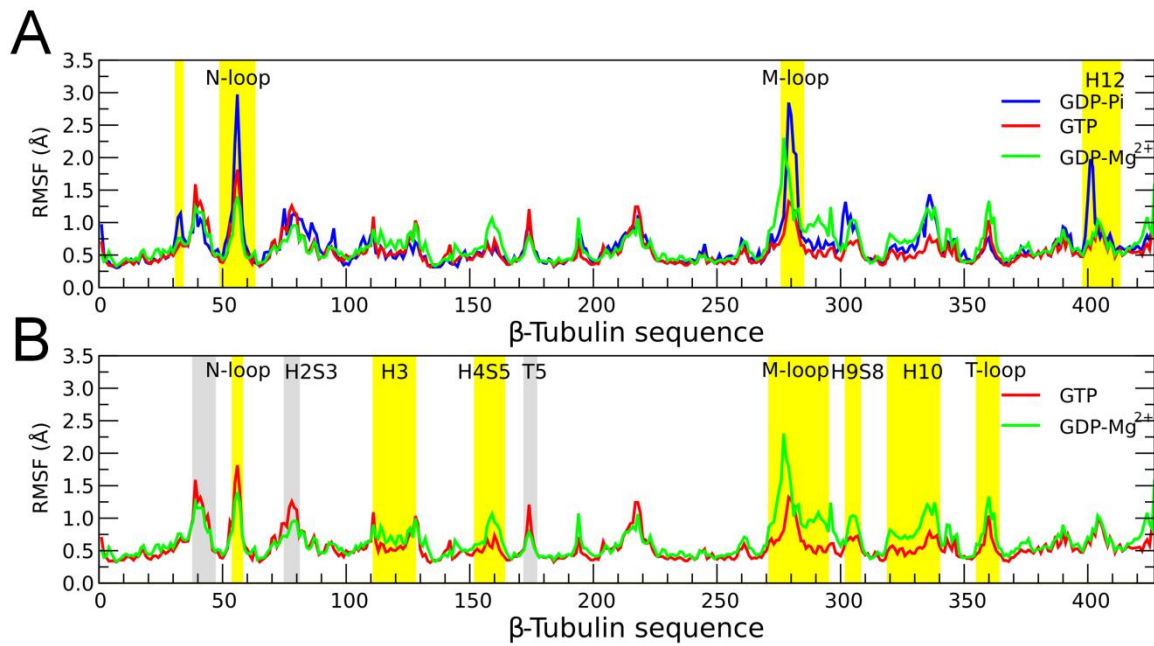


FIGURE 5: Comparison of root mean-square fluctuation of  $\beta$ -tubulin  $C\alpha$  atoms. (A) Pi-tubulin exhibits highly fluctuating regions, highlighted in yellow, compared to GDP- and GTP-tubulin. (B) Yellow and grey indicate regions that have fluctuations more important in GDP- and GTP-tubulin respectively.

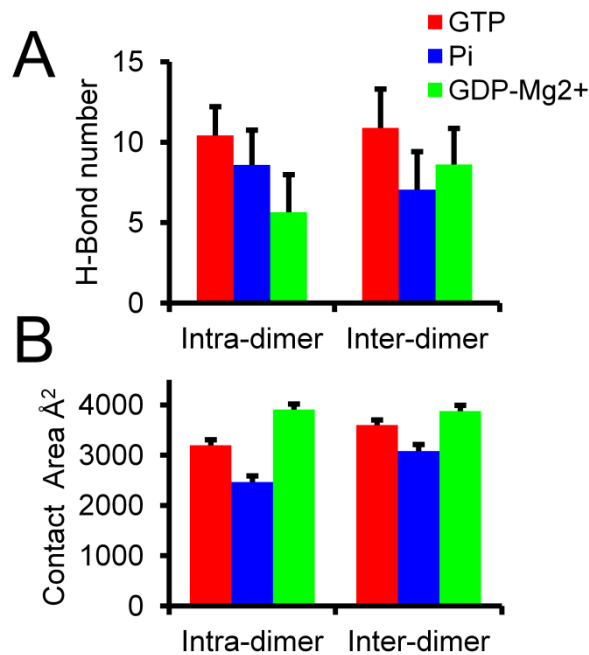


FIGURE 6: GTP-hydrolysis decreases interdimer contacts. (A) Intra- and Interdimer number of H-Bonds for GTP- (red), Pi- (blue), and GDP-tubulin (green). Error bars represent SD. (B) Intra- and interdimer contact areas for GTP- (red), Pi- (blue), and GDP-tubulin (green). Error bars represent SD.

## CONCLUSION

In this work, we performed molecular dynamics simulations of a  $\alpha\beta$ -tubulin heterotrimer in three different nucleotide states at the E-site. At a protein

level, the interactions between tubulin monomers appear weakened at interdimer interface after GTP hydrolysis. However, we found that at the intradimer interface, H-bonds number and surface contact is higher in GDP-tubulin compared to GTP-tubulin. This suggests that after hydrolysis and Pi release, the conformation of  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer changes into a more favorable one at the expense of protofilament and subsequent microtubule stabilization.

We observed that the M-loop of  $\beta$ -tubulin subunit and the N-loop of  $\alpha$ -tubulin change their conformation depending on the nucleotide state at E-site. Both loops appear closer to the tubulin core after GTP hydrolysis. Moreover, the orientation of  $\beta$ R282 in the  $\beta$ -tubulin M-loop after hydrolysis enhances intra-loop interactions and thus reduces interaction with adjacent protofilament as described by Mitra and Sept. We propose that GTP and Taxol share some features that are necessary to increase MT stability. Structural variations of the capping  $\alpha$ -tubulin N-loop suggest a possible transfer of the hydrolysis energy along the protofilament and toward the MT plus end (26). Our results also suggest allosteric structural modifications that could affect the lateral contacts within the microtubule in agreement with the lattice model (21).

Finally, an atomistic point of view of the nucleotide-binding site in the different systems highlights several residues involved in the coordination of the  $Mg^{2+}$  ion and in the nucleotide stabilization. We discovered the presence of a water molecule and show that it has a critical location, which appears necessary for the nucleotide hydrolysis. In addition, we precise the role of the  $\alpha$ E254 residue in the coordination of  $Mg^{2+}$  in



agreement with previous studies highlighting its importance in microtubule dynamics and cell viability (52,53).

Our work exposes detailed and global views of GTP hydrolysis mechanism in  $\alpha\beta$ -tubulin and its potential repercussion on the microtubule dynamic.

## REFERENCES

- Desai, A. and T. J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 13:83-117.
- Nogales, E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry* 69:277-302.
- Amos, L. and A. Klug. 1974. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* 14:523-549.
- Walker, R. A., E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson, and E. D. Salmon. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of cell biology* 107:1437-1448.
- Allen, C. and G. G. Borisy. 1974. Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *J Mol Biol* 90:381-402.
- Burns, R. G. 1991. Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskeleton* 20:181-189.
- Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199-203.
- Lowe, J., H. Li, K. H. Downing, and E. Nogales. 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313:1045-1057.
- Ravelli, R. B., B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, and M. Knossow. 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428:198-202.
- Serrano, L., J. de la Torre, R. B. Maccioni, and J. Avila. 1984. Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:5989-5993.
- Spiegelman, B. M., S. M. Penningroth, and M. W. Kirschner. 1977. Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells. *Cell* 12:587-600.
- David-Pfeuty, T., H. P. Erickson, and D. Pantaloni. 1977. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5372-5376.
- Carrier, M. F., D. Didry, and D. Pantaloni. 1997. Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophysical journal* 73:418-427.
- Correia, J. J., A. H. Beth, and R. C. Williams. 1988. Tubulin exchanges divalent cations at both guanine nucleotide-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 263:10681-10681.
- Grover, S. and E. Hamel. 1994. The magnesium-GTP interaction in microtubule assembly. *European journal of biochemistry / FEBS* 222:163-172.
- Caplow, M. and J. Shanks. 1996. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Molecular biology of the cell* 7:663-675.
- Caplow, M. and R. L. Ruhlen. 1994. The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *The Journal of cell biology* 127:779-788.
- Nogales, E. and H. W. Wang. 2006. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Current opinion in structural biology* 16:221-229.
- Wang, H. W. and E. Nogales. 2005. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* 435:911-915.
- Buey, R. M., J. F. Diaz, and J. M. Andreu. 2006. The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry* 45:5933-5938.
- Rice, L. M., E. A. Montabana, and D. A. Agard. 2008. The lattice as allosteric effector: Structural studies of  $\alpha\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:5378-5383.
- Nawrotek, A., M. Knossow, and B. Gigant. 2011. The Determinants That Govern Microtubule Assembly from the Atomic Structure of GTP-Tubulin. *J Mol Biol* 412:35-42.
- Gebremichael, Y., J. W. Chu, and G. A. Voth. 2008. Intrinsic bending and structural rearrangement of tubulin dimer: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Biophysical journal* 95:2487-2499.
- Bennett, M. J., J. K. Chik, G. W. Slysz, T. Luchko, J. Tuszynski, D. L. Sackett, and D. C. Schriemer. 2009. Structural mass spectrometry of the alpha beta-tubulin dimer supports a revised model of microtubule assembly. *Biochemistry* 48:4858-4870.
- Keskin, O., S. R. Durell, I. Bahar, and R. L. Jernigan. 2002. Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. *Biophysical journal* 83:663-680.
- Mitra, A. and D. Sept. 2008. Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophysical journal* 95:3252-3258.
- Grafmüller, A. and G. A. Voth. 2011. Intrinsic Bending of Microtubule Protofilaments. *Structure* 19:409-417.
- Fiser, A. and A. Sali. 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374:461-491.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26:283-291.

30. Schrödinger, L. L. C. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. DeLano Scientific LLC.
31. Cornell, W. D., P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman. 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society* 117:5179-5197.
32. Duan, Y., C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, and P. Kollman. 2003. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* 24:1999-2012.
33. Case, D. A., T. A. Darden, T. E. Cheatham Iii, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvai, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, M. J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P. A. Kollman. 2010. AMBER 11: University of California, San Francisco.
34. Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 79:926-926.
35. Meagher, K. L., L. T. Redman, and H. A. Carlson. 2003. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of computational chemistry* 24:1016-1025.
36. Sousa Da Silva, A. W., W. F. Wrانken, and E. D. Laue. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. To be submitted.
37. Van Der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. Berendsen. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26:1701-1718.
38. Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald: An N<sup>2</sup>-log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* 98:10089.
39. Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 81:3684-3684.
40. Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126:014101.
41. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33-38, 27-38.
42. Golovin, A., D. Dimitropoulos, T. Oldfield, A. Rachedi, and K. Henrick. 2005. MSDsite: a database search and retrieval system for the analysis and viewing of bound ligands and active sites. *Proteins* 58:190-199.
43. Golovin, A. and K. Henrick. 2008. MSDmotif: exploring protein sites and motifs. *BMC bioinformatics* 9:312.
44. Golovin, A. and K. Henrick. 2009. Chemical substructure search in SQL. *Journal of chemical information and modeling* 49:22-27.
45. Löwe, J., H. Li, K. H. Downing, and E. Nogales. 2001. Refined structure of [alpha][beta]-tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 313:1045-1057.
46. Dougherty, C. A., C. R. Sage, A. Davis, and K. W. Farrell. 2001. Mutation in the beta-tubulin signature motif suppresses microtubule GTPase activity and dynamics, and slows mitosis. *Biochemistry* 40:15725-15732.
47. Nogales, E., K. H. Downing, L. A. Amos, and J. Lowe. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5:451-458.
48. Friedman, Z. Y. and Y. Devary. 2005. Dissection of the GTPase mechanism of Ras protein by MD analysis of Ras mutants. *Proteins* 59:528-533.
49. Caplow, M. and J. Shanks. 1998. Microtubule dynamic instability does not result from stabilization of microtubules by tubulin-GDP-Pi subunits. *Biochemistry* 37:12994-13002.
50. Giannakakou, P., R. Gussio, E. Nogales, K. H. Downing, D. Zaharevitz, B. Bollbuck, G. Poy, D. Sackett, K. C. Nicolaou, and T. Fojo. 2000. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:2904-2909.
51. Morrisette, N. S., A. Mitra, D. Sept, and L. D. Sibley. 2004. Dinitroanilines bind alpha-tubulin to disrupt microtubules. *Molecular biology of the cell* 15:1960-1968.
52. Dai, K., A. Mukherjee, Y. Xu, and J. Lutkenhaus. 1994. Mutations in ftsZ that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. *Journal of bacteriology* 176:130-136.
53. Richards, K. L., K. R. Anders, E. Nogales, K. Schwartz, K. H. Downing, and D. Botstein. 2000. Structure-function relationships in yeast tubulins. *Molecular Biology of the Cell* 11:1887-1903.

SUPPLEMENTARY DATA

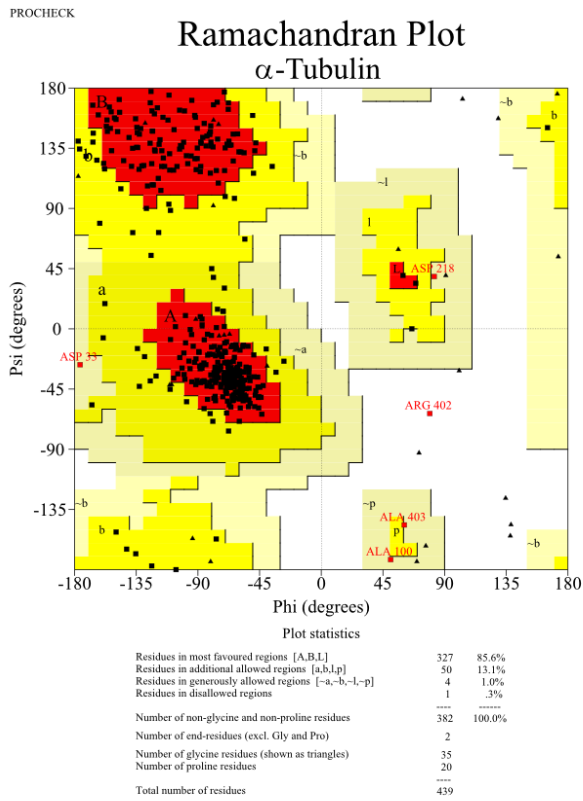


FIGURE S1: RAMACHANDRAN PLOT OF THE BEST HOMOLGY MODEL OF  $\alpha$ -TUBULIN

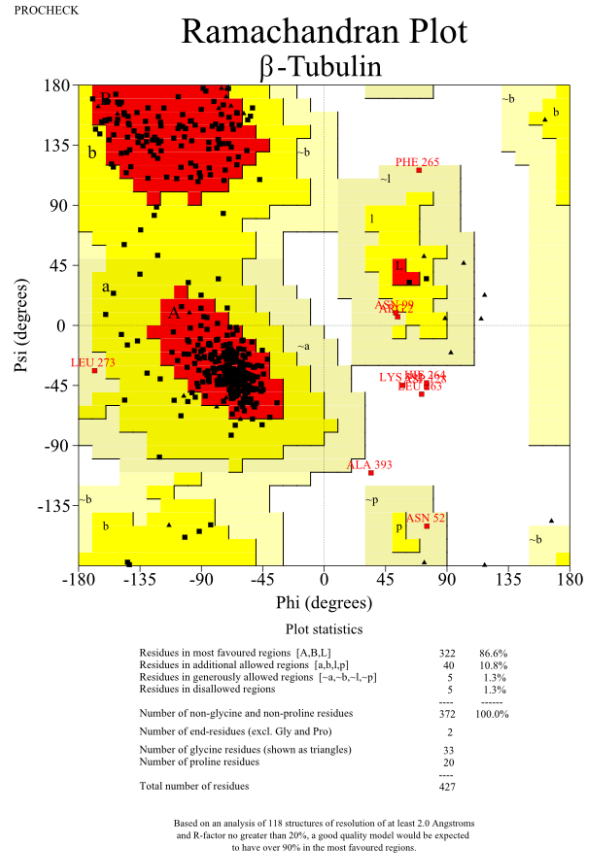


FIGURE S2: RAMACHANDRAN PLOT OF THE BEST HOMOLGY MODEL OF  $\beta$ -TUBULIN

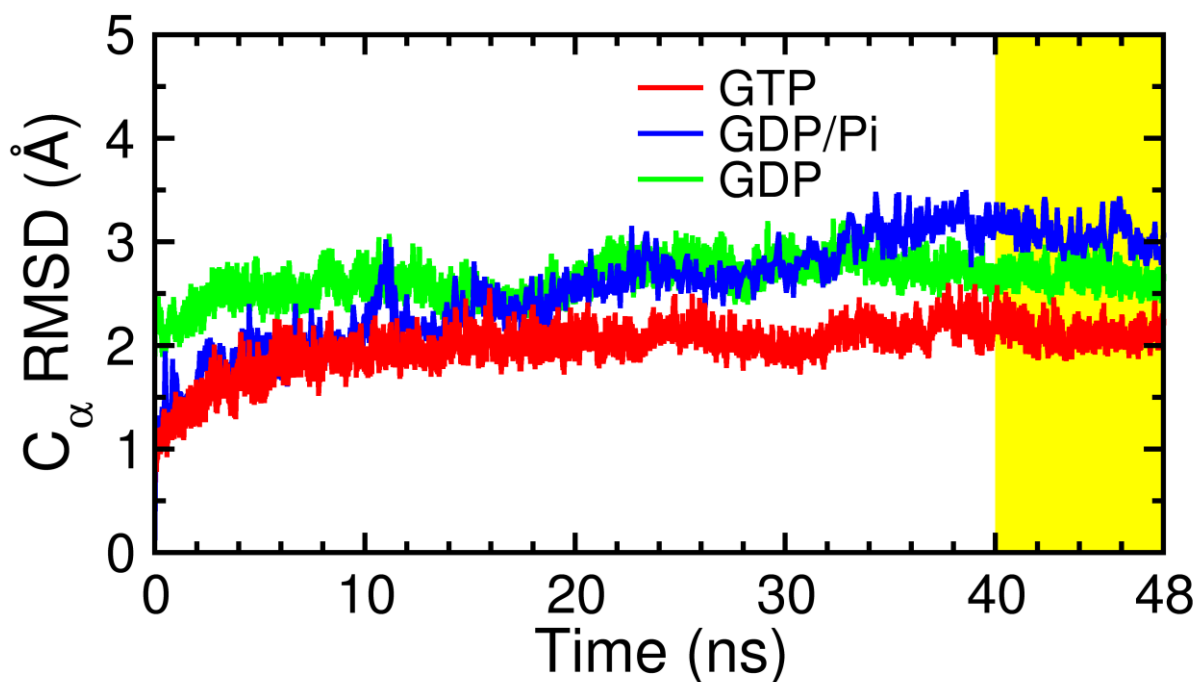


FIGURE S3:  $\alpha\beta\alpha$ -TUBULIN  $C\alpha$  ATOMS RMSD. Red line corresponds to GTP-tubulin, green line to GDP-tubulin and blue line to Pi-tubulin. Analyses were performed on the trajectory highlighted in yellow.

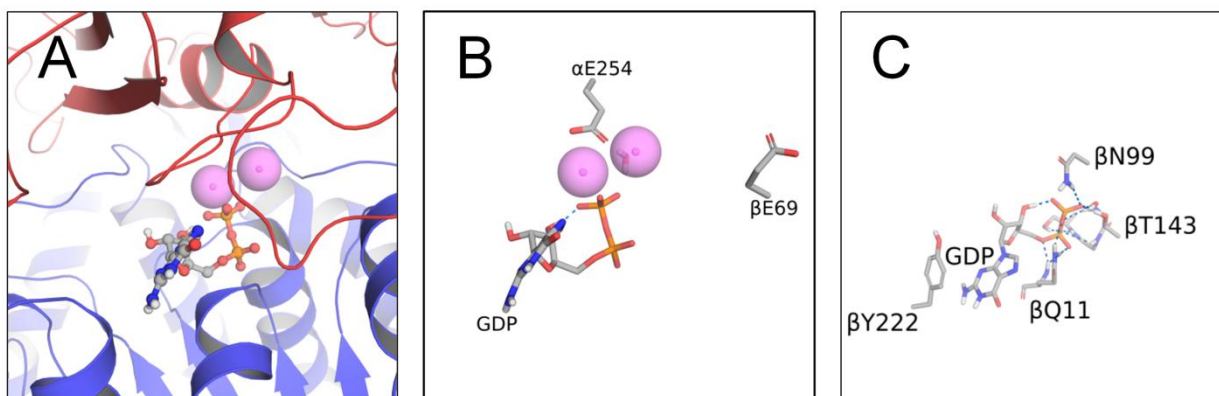


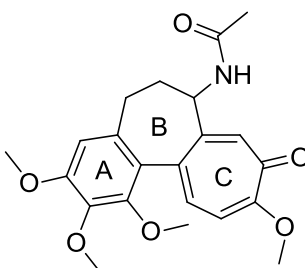
FIGURE S4: REPRESENTATION OF THE NUCLEOTIDE ENVIRONMENT AT THE  $\beta$ -TUBULIN E-SITE IN ABA-TUBULIN-GDP COMPLEX. (A) Blue and red ribbons depict  $\beta 1$ - and  $\alpha 2$ -tubulin subunit respectively. GDP is shown in ball and sticks. Purple spheres illustrate  $\text{Na}^+$  ions. (B) Molecules involved in  $\text{Na}^+$  coordination (C) and residues interacting with the nucleotide are shown in stick. H-bonds are depicted with blue dashes. For the sake of clarity, nonpolar hydrogen atoms have been hidden.

## 2. Construction de molécules hybrides déstabilisatrices du microtubule

### 2.1. Introduction

De part leurs rôles dans de nombreuses fonctions cellulaires, les microtubules forment une cible d'intérêt notamment dans les traitements contre le cancer ou encore contre les maladies infectieuses [122, 123].

La colchicine est une molécule naturelle appartenant à la famille des poisons du fuseau mitotique. Elle est constituée de trois cycles nommés A, B et C respectivement : un cycle triméthoxyphényle, un cycle à sept atomes de carbone portant un groupement acétamide et un cycle méthoxytropone (Figure 39). Elle possède des propriétés antimitotiques, antifibrotiques et anti-inflammatoires qui expliquent son utilisation dans le traitement de la goutte ou encore de la fièvre méditerranéenne familiale. La fixation de la colchicine dans la tubuline perturbe sa structure, et en fonction de la concentration des complexes tubuline-colchicine on assiste à une inhibition de la dynamique des MT (faible concentration) ou alors dépolymérisation (forte concentration). Les microtubules du fuseau mitotique étant plus sensibles que les microtubules à l'interphase, une concentration en colchicine de 50 nM bloque la mitose dans la majorité des cellules (voir revue [48]). La colchicine est très utilisée pour étudier la structure et les propriétés des microtubules mais son utilisation dans le traitement des cancers est limitée du fait de sa toxicité.

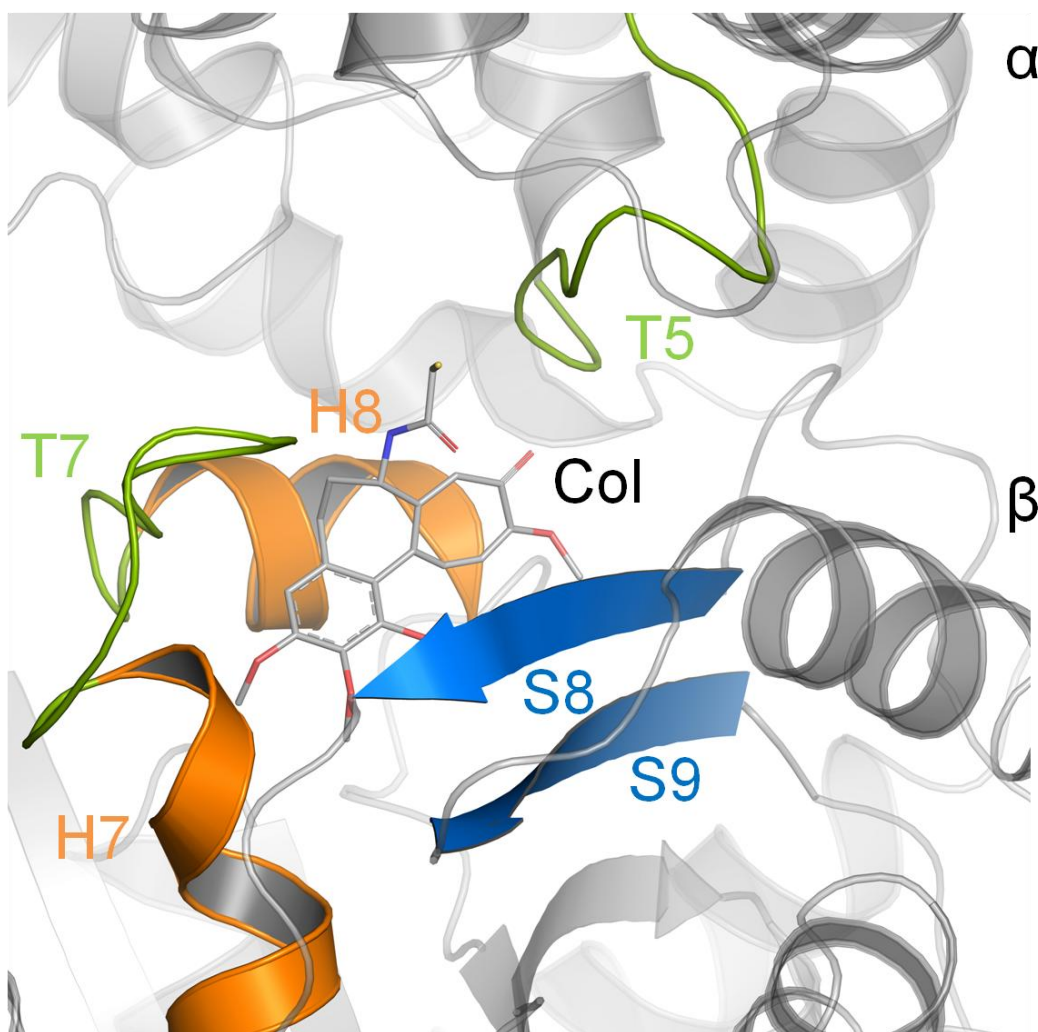


**Figure 39** : Structure de la colchicine

La colchicine possède une forte affinité pour la tubuline soluble ; elle ne se fixe pas dans le microtubule à moins d'avoir formé auparavant un complexe tubuline-colchicine qui peut alors se fixer à l'extrémité d'un microtubule. La fixation de la colchicine sur l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  entraîne des changements conformationnels au sein de la tubuline- $\alpha\beta$  qui rendent le complexe faiblement réversible

(voir revue [48]). Cependant, ces modifications sont différentes de celles induites par l'hydrolyse du nucléotide GTP.

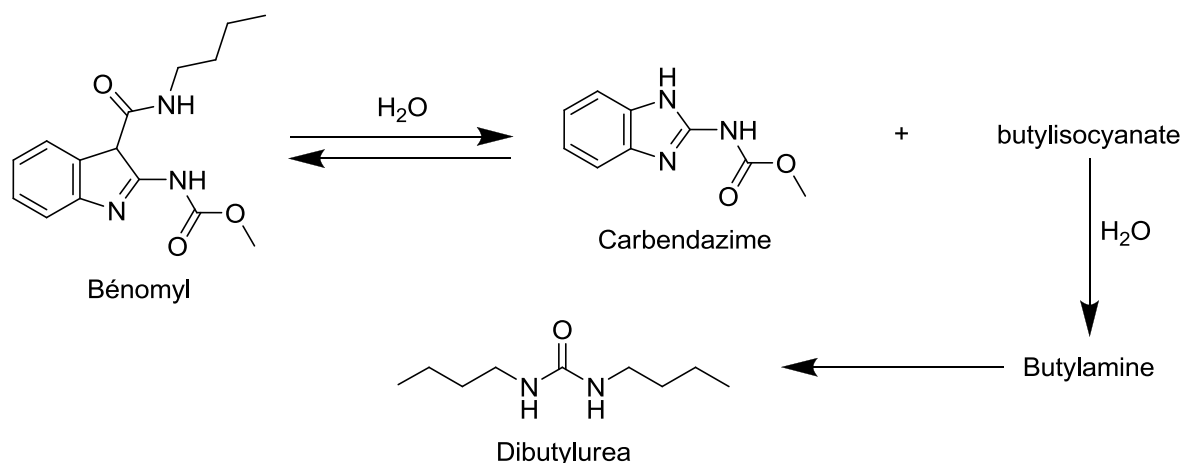
La structure cristallographique du complexe T2R-colchicine a apporté beaucoup d'informations concernant le site de fixation de la colchicine et ses interactions dans tubuline [33]. La colchicine se fixe dans le domaine intermédiaire de la sous-unité tubuline- $\beta$ , au niveau de l'interface intra-dimère. Ainsi, les cycles A et C interagissent avec la sous-unité tubuline- $\beta$  tandis que la chaîne latérale du cycle B interagit avec la boucle T5 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ . La poche de la colchicine est formée entre les brins  $\beta$  S8 et S9, la boucle T7 et les hélices  $\alpha$  H7 et H8 (Figure 40).



**Figure 40** : Site de fixation de la colchicine. Les structures secondaires du complexe tubuline-colchicine sont représentées en rubans. La colchicine est représentée en bâtonnets. Les structures secondaires impliquées dans le site de fixation apparaissent en orange pour les hélices  $\alpha$ , en vert pour les boucles et en bleu pour brins  $\beta$ .

De nombreuses molécules analogues de la colchicine dont certains dérivés du benzimidazole tel que le nocodazole ou le mebendazole peuvent se fixer dans ce site [124-126].

Le bénomyl est un fongicide de la famille des benzimidazoles qui cible le microtubule (Figure 41). Il se dégrade rapidement dans l'eau en deux métabolites : le carbendazime d'une part et la dibutylurée d'autre part (Figure 41). Il a été montré que le bénomyl possède une activité antimittotique chez les champignons [127] mais aussi chez les mammifères [128, 129]. Le bénomyl est moins toxique pour les mammifères du fait de la différence d'affinité pour la tubuline d'origine fongique et pour la tubuline des mammifères [130].



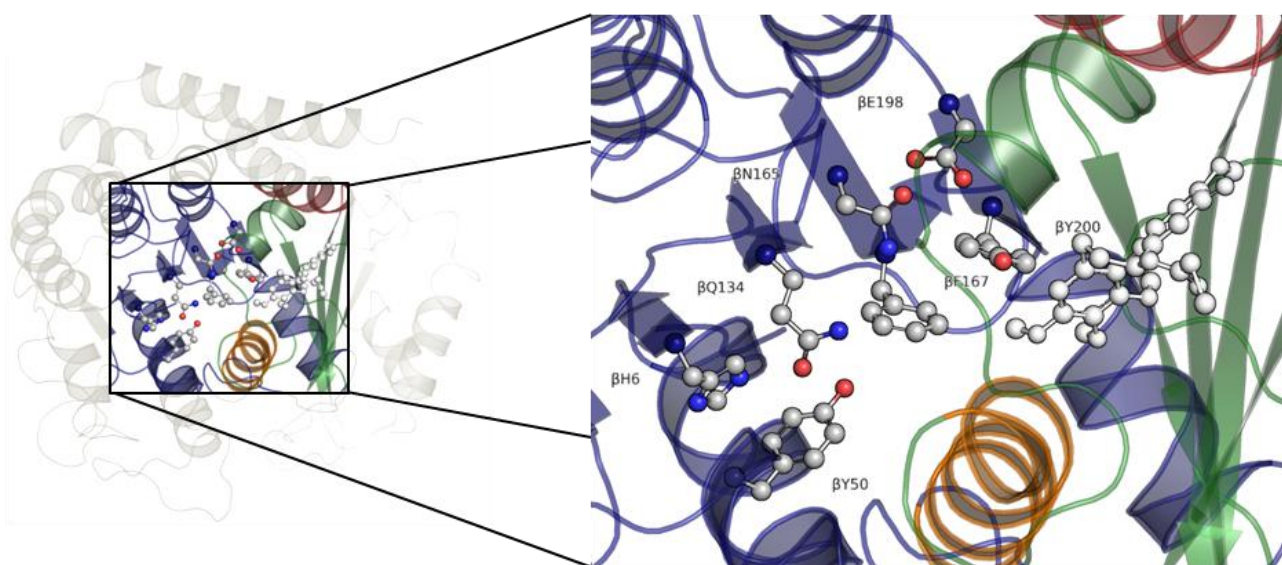
**Figure 41** : Dégradation du bénomyl dans l'eau.

Le site de fixation du bénomyl n'est pas connu précisément. Certains composés de la famille des benzimidazoles inhibent de manière compétitive ou non-compétitive, la fixation de la colchicine [124, 125]. D'autre part, un site différent de celui de la colchicine a été supposé à partir d'une étude de mutagenèse dirigée sur le gène de la tubuline- $\beta$  de la levure [131]. Néanmoins, des travaux réalisés au laboratoire ont démontré que d'une part la colchicine et le bénomyl inhibent la prolifération des cellules HeLa et bloquent la mitose de manière synergétique ce qui suggère l'existence de deux sites distincts et, d'autre part, des expériences RMN ont montré que le carbendazime se fixait dans une poche différente mais proche de celle de la colchicine [132]. Par la suite, Yenjerla et coll. [133] ont confirmé que le carbendazime se fixe sur la tubuline des mammifères dans une nouvelle poche différente de celle de la colchicine ( $K_d$ ,  $42,8 \pm 4,0 \mu\text{M}$ ).

Le carbendazime (Figure 41) est également utilisé comme fongicide notamment dans les productions de céréales et de fruits. Il a été montré que le carbendazime inhibe aussi la prolifération des cellules tumorales chez les mammifères. Plus spécifiquement, il possède une activité antiproliférative contre des lignées cellulaires résistantes aux drogues ou déficientes en p53 telles que le mélanome chez la souris et chez l'homme : le cancer du sein, des ovaires, des poumons ou encore la leucémie. Dans ces lignées cellulaires, le carbendazime bloque la division cellulaire en phase G2/M et entraîne l'apoptose

[134]. Le carbendazime possède également une activité *in vivo* chez l'homme contre les tumeurs du pancréas, du poumon, de la prostate, du colon ou encore du sein [135]. Le carbendazime fait l'objet aux États-Unis de deux études cliniques de phase I, pour traiter les tumeurs solides avancées et les lymphomes (Identifiants : NCT00023816 et NCT00003709).

Tout comme le bénomyl, le site de fixation du carbendazime n'est pas clairement défini. De nombreuses études font référence de mutations sur la sous-unité tubuline- $\beta$  qui affectent l'activité des dérivés du benzimidazole chez différents organismes (voir Annexe 5). Ces mutations concernent les positions 6, 50, 134, 165, 167, 198 et 200, localisées dans le domaine N-terminal de la tubuline vers l'interface intra-dimère (Figure 42).



**Figure 42** : Localisation des résidus de la sous-unité tubuline- $\beta$  impliqués dans la sensibilisation ou la résistance aux dérivés du benzimidazole. Les structures secondaires de la sous-unité tubuline- $\beta$  sont représentées en rubans. Le domaine N-terminal apparaît en bleu, l'hélice H7 en orange, le domaine intermédiaire en vert et le domaine C-terminal en rouge. Les résidus impliqués dans la sensibilisation ou la résistance aux dérivés du benzimidazole et la colchicine sont représentés en boule et bâtonnets.

A partir des informations de mutagenèse de la littérature ainsi que des données RMN obtenues au laboratoire, j'ai d'abord proposé un site de fixation carbendazime puis j'ai décrit l'influence du carbendazime sur la structure de la tubuline. A partir de ces résultats, Christophe Roche, collaborateur chimiste de la société BioQuanta et moi-même avons dessiné de nouvelles molécules hybrides possédant les noyaux colchicine et carbendazime. Une telle molécule pourrait avoir une activité de déstabilisation du microtubule similaire à celle observée en présence de colchicine et de bénomyl mais dans un champ d'applications et une toxicité variables. Dans cette situation idéale, on pourrait alors



obtenir le même effet que la colchicine et avec d'autres propriétés thérapeutiques et pharmacocinétiques.

Une approche d'amarrage moléculaire a été réalisée pour proposer le site de fixation du carbendazime et des simulations de dynamiques moléculaires ont permis d'étudier l'effet de la colchicine, du carbendazime et des molécules hybrides sur la structure de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . A la suite de ces expériences *in silico*, la synthèse d'une des molécules hybrides, son étude RMN ainsi que des tests cellulaires ont été réalisés.

## 2.2. Méthodologie

### 2.2.a. Amarrage moléculaire

Les calculs d'amarrage moléculaire ont été réalisés avec AutoDock version 4.2 [93]. Pour le récepteur et le ligand, les hydrogènes non-polaires ont été supprimés. Puis, les types atomiques ont été définis selon la nomenclature d'AutoDock 4 et les charges atomiques partielles calculées à l'aide de la méthode de Gasteiger. Pour le carbendazime, les torsions ont été autorisées pour l'angle dièdre N-C-O-C uniquement.

La grille de calcul de l'amarrage a été définie sur la structure moyenne de la dynamique moléculaire du complexe tubuline-colchicine décrite ci-dessous. Le centre de la boîte a été positionné au centre géométrique des résidus mutants. La taille de la boîte a été définie de manière à contenir le site de fixation potentiel en respectant les contraintes de distance RMN. Les paramètres de la boîte sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : Paramètres de la boîte pour l'amarrage du carbendazime dans la sous-unité tubuline- $\beta$ .

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs</i>
<i>Centre de la boîte</i>	$x=0,81 ; y=-12,92 ; z=-14,39$
<i>Taille de la boîte (en points)</i>	$x=90 ; y=90 ; z=90$
<i>Espacement entre les points</i>	$0,3 \text{ \AA}$

Un algorithme génétique (voir Chapitre II.6.1) a été utilisé pour générer les poses. Les paramètres suivants ont été utilisés :

**Tableau 6 :** Paramètres de l'algorithme génétique pour l'amarrage moléculaire du carbendazime.

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs</i>
<i>Taille de la population</i>	<i>150</i>
<i>Nombre d'évaluations de l'énergie</i>	<i>2500000</i>
<i>Nombre de générations</i>	<i>27000</i>
<i>Nombre d'individus élites conservés à chaque génération</i>	<i>1</i>
<i>Taux de mutation</i>	<i>0.02</i>
<i>Taux de crossover</i>	<i>0.8</i>
<i>Nombre de poses</i>	<i>100</i>

### 2.2.b. Présentation des systèmes modélisés

La colchicine et le carbendazime se fixent sur la sous-unité tubuline- $\beta$ , à proximité de l'interface intra-dimère. L'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  est un bon modèle pour étudier la fixation de la colchicine et du carbendazime. J'ai construit par homologie les structures des sous-unités tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  humaines. La séquence des isotypes  $\alpha$ 1-tubuline et  $\beta$ 1-tubuline (UNIPROT ID : Q71U36 et Q9H4B7, respectivement) a été obtenue dans la base de données de séquence protéique UNIPROT.

La structure cristallographique du complexe T2R-colchicine (PDB ID : 1SA0) a été utilisée comme référence pour construire les modèles par homologie pour prendre en compte l'effet de la colchicine sur les structures secondaires. Chaque sous-unité a été construite par homologie séparément puis assemblée par superposition sur la structure du complexe tubuline-colchicine.

### 2.2.c. Préparation des paramètres du champ de force

Les paramètres des liaisons, angles et angles dièdres qui servent à décrire les interactions liantes dans la colchicine sont inclus dans le champ de force de Charmm27. En revanche, la topologie, qui décrit la structure interne de la colchicine n'est pas présente. Pour cela, un calcul d'optimisation de structure a été réalisé en mécanique quantique pour obtenir des valeurs *ab initio* des charges atomiques

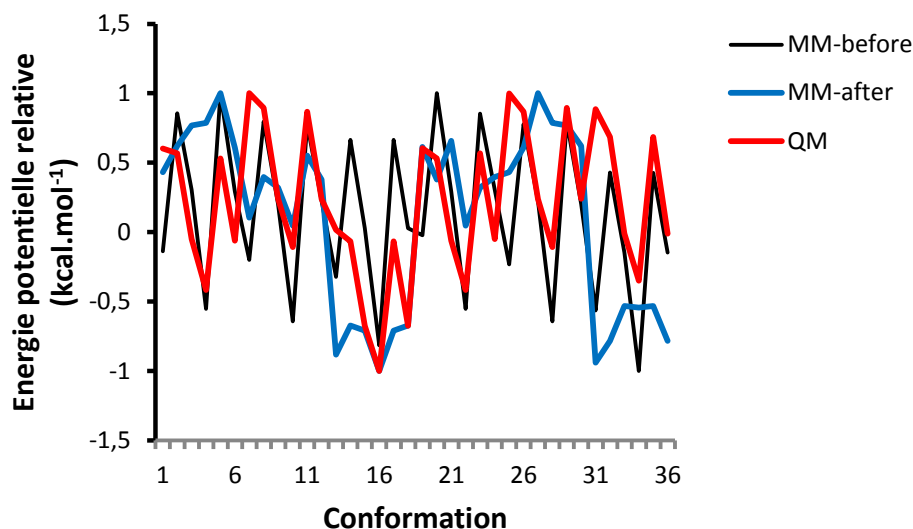
partielles. La méthode MP2 ainsi que la base 6-31G\*\* ont été utilisées pour les calculs d'optimisation. Le champ de force de Charmm ne permet pas de transposer directement les valeurs obtenues à partir de calculs *ab initio*. J'ai donc utilisé les charges atomiques partielles des fragments présents dans la molécule et connus dans le champ de force comme une référence, notamment les atomes d'hydrogènes présents sur les carbones aliphatiques ainsi que la chaîne latérale du cycle B. Enfin, les charges sont déterminées par des ajustements successifs à partir de ces fragments de références afin de conserver le sens, la direction et la valeur du moment dipolaire de la colchicine. Le logiciel VMD [136] a été utilisé pour calculer et observer le moment dipolaire de la molécule optimisé *ab initio* et de la molécule décrite dans le champ de force.

La topologie du carbendazime est également absente du champ de force de même que les paramètres d'angle dièdre entre les atomes N-C-N-C et N-C-O-C. Les charges partielles ont été définies sur la structure du carbendazime la plus stable énergétiquement, d'après les calculs en mécanique quantique.

D'autre part, il a fallu déterminer les paramètres de phase, de périodicité et de constante de force (voir Chapitre II.2.1.c) pour les angles dièdres N-C-N-C et N-C-O-C. Le protocole consiste à réaliser par mécanique quantique une optimisation de la molécule pour différentes valeurs de l'angle dièdre : 12 valeurs entre 0° et 360° par pas de 30°. La méthode MP2 couplée à la base 6-31G\* ont été utilisées pour chacune des optimisations. On obtient un profil énergétique qui indique la multiplicité et la phase. Comme l'énergie ne peut pas être transposée des calculs *ab initio* aux champs de force empiriques, on cherche à reproduire le même profil énergétique en faisant varier la constante de force. J'ai utilisé la méthode décrite par Guvench et MacKerell [137] pour estimer les paramètres de forces. Les paramètres obtenus pour l'angle N-C-N-C sont les suivants : constante de force : 3,00 kcal.mol<sup>-1</sup> ; multiplicité : 2 ; phase : 180° et pour l'angle N-C-O-C : constante de force : 2,76 kcal.mol<sup>-1</sup> ; multiplicité : 2 ; phase : 180°. Les paramètres du champ de forces ont été vérifiés en comparant les énergies potentielles relatives obtenues en mécanique quantique et en mécanique moléculaire pour les angles dièdres N-C-N-C et N-C-O-C (Figure 43).

Des paramètres plus précis auraient pu être obtenus en suivant un protocole plus détaillé, par exemple en comparant l'énergie d'interaction entre des molécules d'eau et la molécule à paramétrer pour mieux déterminer les charges partielles. Pour les angles dièdres, des méthodes de mécanique quantique plus poussées ainsi qu'un nombre plus important d'optimisations affinaient l'évaluation de la constante de force. Toutefois, dans le but d'obtenir rapidement des paramètres, ces analyses n'ont pas été effectuées. Les paramètres obtenues sont donc primitifs et ne permettront pas une analyse fine

de l'énergie libre absolue de liaison mais permettra de discriminer l'énergie d'interaction entre différents ligands dérivés de la colchicine et du carbendazime.



**Figure 43 :** Comparaison de l'énergie relative du carbendazime pour différentes valeurs de l'angle dièdre N-C-N-C et C-N-C-O. L'énergie potentielle a été calculée après l'optimisation avec l'algorithme de Guvench et MacKerell [137] avec Charmm pour la mécanique moléculaire et avec Gaussian 03 pour la mécanique quantique.

### 2.2.d. Dynamiques moléculaires

Le complexe tubuline-colchicine a été construit à partir de la structure cristallographique contenant le dérivée de la colchicine : la DAMA-colchicine (PDB ID : 1SA0). La structure de la DAMA-colchicine a été remplacée par celle de la colchicine. Dans les complexes tubuline-carbendazime et tubuline-colchicine-carbendazime, le carbendazime a été positionné d'après la meilleure pose déterminée par docking satisfaisant également les contraintes NOE. Pour les complexes tubuline-hybrides, les molécules hybrides ont été positionnées dans les poches par superposition avec les noyaux colchicine et carbendazime.

Ensuite, chaque complexe a été placé dans une boîte d'eau orthorhombique. Une couche d'eau de modèle TIP3P d'au minimum 14 Å entoure la protéine ses ligands. Cette valeur est nécessaire pour éviter tout contact de la chaîne C-Terminale de la tubuline- $\alpha\beta$  non structurée et très flexible avec le reste de la protéine. Afin de neutraliser le système, 54 ions Na<sup>+</sup> ont été ajoutés par remplacement de molécules d'eau à l'aide de l'outil *ionize* de VMD.

La totalité du système a été minimisée durant 10000 pas avec l'algorithme de gradient conjugué de NAMD 2.7 [138]. Les interactions de van der Waals ont été atténuées par une fonction de *switch* appliquée à partir de 8 Å et tronquée au de-là de 12 Å. Les énergies électrostatiques ont été également calculées avec un *cutoff* après 12 Å. Ensuite, les vitesses ont été réassignées tous les 100 pas (pas

d'intégration : 1 fs) pour d'augmenter la température du système à 310 K en 31 ps. Enfin, la dynamique moléculaire a été conduite pendant 1 ns dans les conditions NPT (pression constante : 1 atm ; température constante : 310 K) dans les conditions périodiques.

A l'issue des calculs de dynamique moléculaire, j'ai vérifié que les valeurs de température, d'énergie et de pression étaient stables. La stabilité des complexes tubuline-ligand a été évaluée par le calcul du RMSD des C $\alpha$  par rapport à la première structure de la trajectoire. L'extrémité C-terminale est non-structurée et très flexible ; seuls les résidus 1 à 439 ont été pris en compte dans le calcul du RMSD. Une classification des différentes conformations a été réalisée sur la trajectoire stabilisée pour déterminer la conformation du complexe la plus représentative de la trajectoire. Cette mesure a été effectuée à l'aide de la fonction *g\_cluster* du logiciel GROMACS. Les figures ont été réalisées avec ces structures représentatives.

## ***2.3. Résultats et discussion***

### **2.3.a. Rôle de la colchicine dans la déstabilisation du MT**

J'ai réalisé une simulation de dynamique moléculaire du complexe tubuline-colchicine en me basant sur la structure cristallographique du T2R (PDB ID : 1SA0). Ce calcul permet de relaxer la protéine et d'optimiser les interactions protéine-ligand afin de préparer un bon modèle pour la suite des expériences. De plus, nous allons pouvoir appréhender les effets de la colchicine sur la structure et la dynamique de la tubuline. C'est un aspect important pour identifier des paramètres qui permettront d'évaluer par la suite l'effet des molécules hybrides.

Dans un premier temps, le RMSD nous indique que la structure est équilibrée après 700 ps environ (Figure 44). On va pouvoir effectuer les analyses sur les structures issues des 300 ps de la fin de la trajectoire.

La colchicine se fixe au niveau de l'interface intra-dimère, sur la sous-unité tubuline- $\beta$ . Elle en modifie la structure. J'ai calculé le RMSF des atomes C $\alpha$  afin de voir si la colchicine modifiait également la fluctuation de la tubuline (Figure 45).

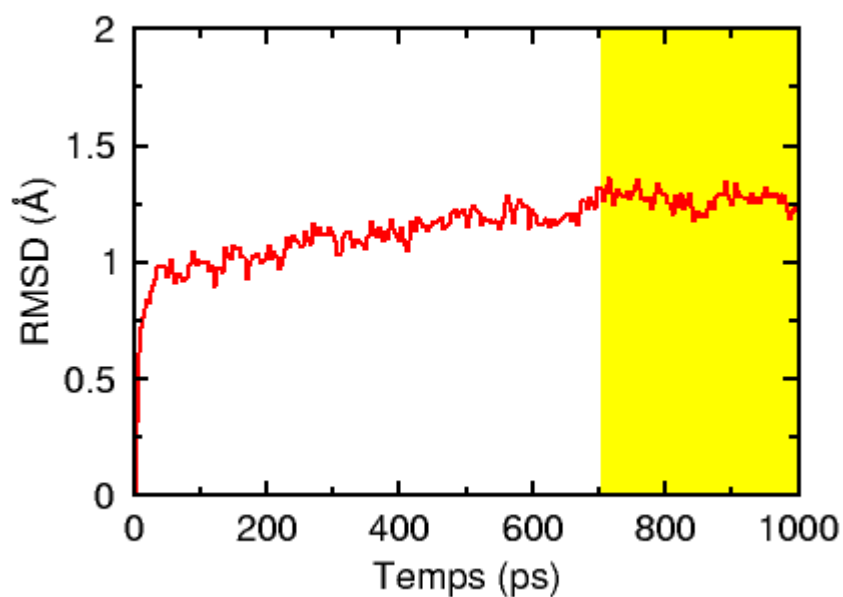


Figure 44 : RMSD calculé sur les C $\alpha$  de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en présence de colchicine.

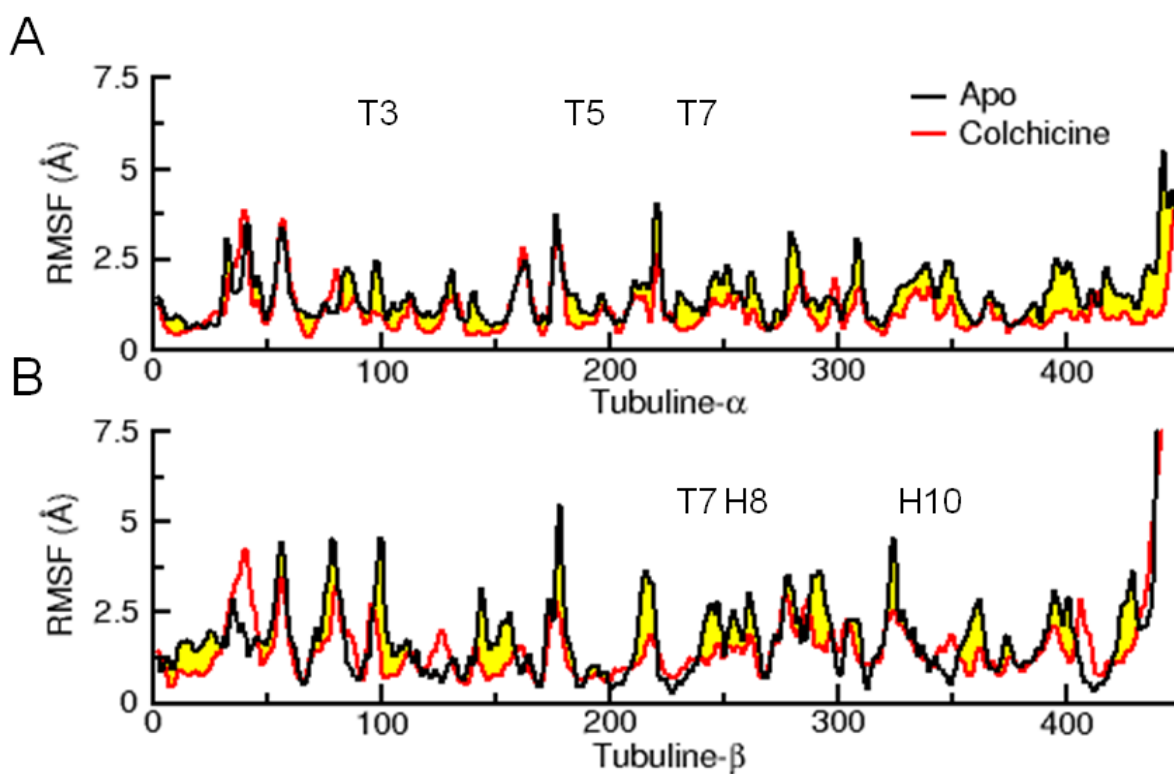
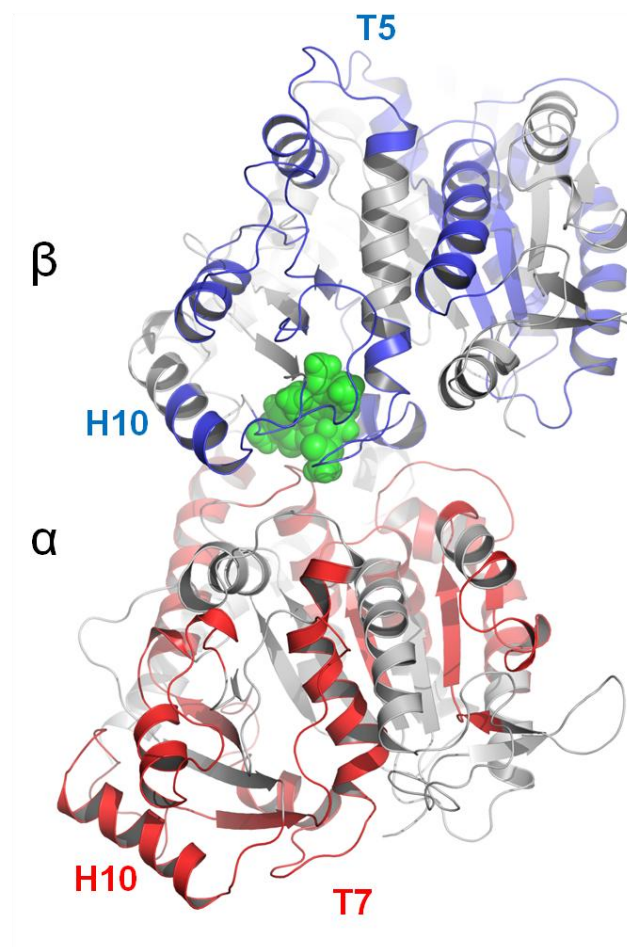


Figure 45 : Comparaison de la fluctuation des C $\alpha$  de la tubuline et du complexe tubuline-colchicine. Les zones en jaune correspondent aux acides aminés pour lesquelles la fluctuation est plus importante pour la tubuline libre que pour le complexe tubuline-colchicine.

Comme l'indiquent les zones en jaunes, la fluctuation est globalement plus faible dans le complexe tubuline-colchicine. Ces zones concernent principalement les structures proches du site de fixation de la colchicine comme la boucle T7 et les hélices H8 et H10 de la sous-unité tubuline- $\beta$  (Figure 45 B) ainsi que les boucles T3 et T5 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ . D'autres structure plus éloignées présentent aussi une fluctuation réduite comme la boucle T7 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  (Figure 45 A) située à environ 45 Å de la colchicine. On observe également que la colchicine affecte la fluctuation de certains brins  $\beta$  du domaine N-terminal des deux sous-unités (Figure 46).

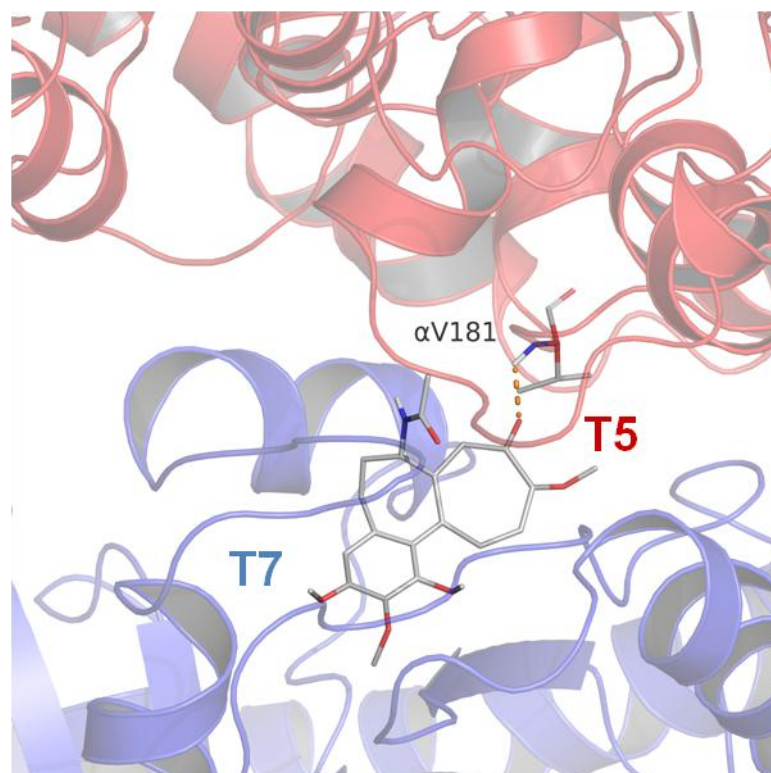
La colchicine déstabilise le microtubule en modifiant la structure de la tubuline ce qui a pour effet de rendre énergétiquement défavorable l'ajout de complexe tubuline-colchicine dans le microtubule [48]. Il y a clairement un effet de la colchicine sur la fluctuation des structures secondaires de la tubuline. On peut imaginer que la réduction de la fluctuation participe également dans l'inhibition de la polymérisation des complexes tubuline-colchicine.



**Figure 46 :** Localisation des zones de fluctuations réduites sur l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  en présence de colchicine. La tubuline est représentée en ruban et la colchicine en sphère verte. Les zones dont la fluctuation est

réduite dans le complexe tubuline-colchicine par rapport à la structure apo sont en rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en bleu pour la sous-unité tubuline- $\beta$ .

Par ailleurs, la structure moyenne de la colchicine calculée sur la trajectoire stabilisée est similaire à celle dans le cristal (PDB : 1SA0). Les interactions entre la tubuline et la colchicine sont principalement hydrophobes ; seule une liaison hydrogène est présente entre le groupement tropone de la colchicine et le groupement amine de la chaîne principale du résidu V181 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Ce résidu appartient à la boucle T5 (Figure 47).



**Figure 47 :** Interaction entre la tubuline et la colchicine à l'issue de la dynamique moléculaire. Les structures secondaires sont représentées en ruban bleu pour la sous-unité tubuline- $\beta$  et rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$ . La colchicine et le résidu avec lequel elle établit une liaison hydrogène sont représentés en bâtonnet. La liaison H est représentée par des pointillés orange.

### 2.3.b. Proposition et validation du site de fixation du carbendazime

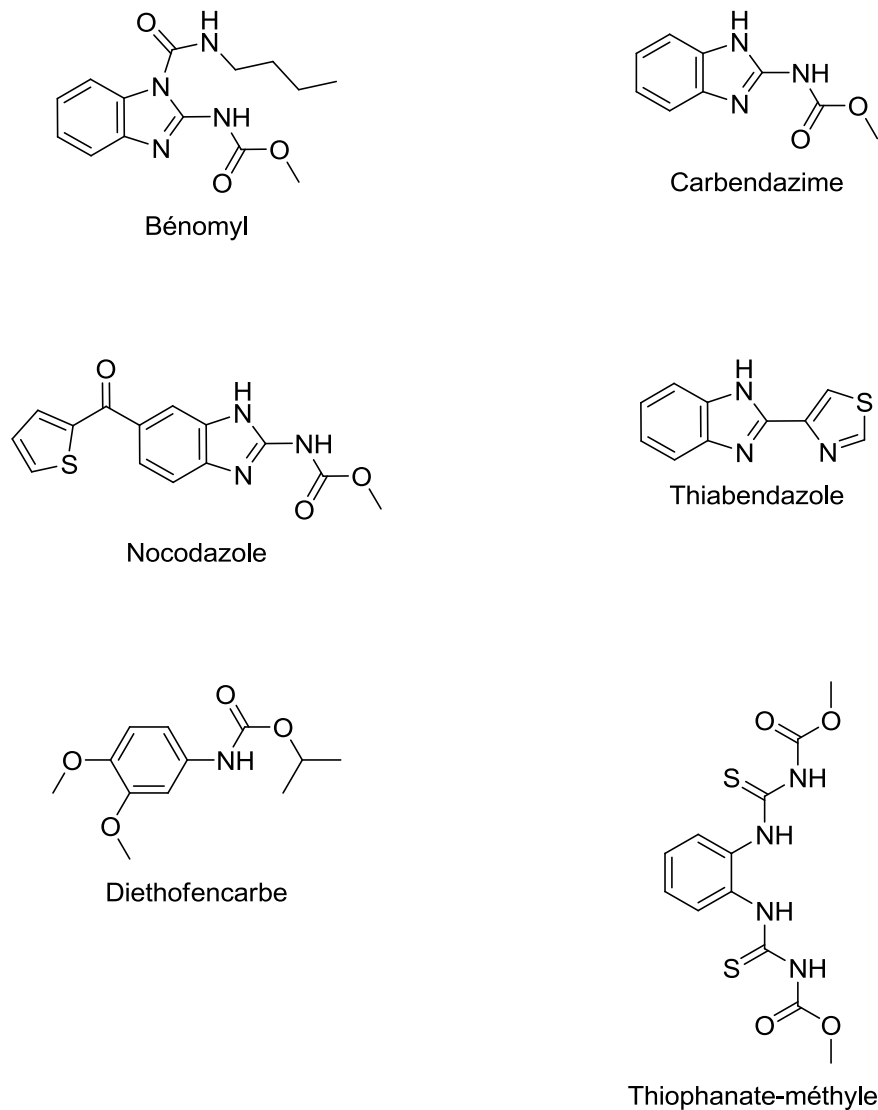
Deux informations relatives au site de fixation sont disponibles : d'une part les données RMN d'interactions entre les protons de la colchicine et ceux du carbendazime obtenues au laboratoire et d'autre part, les résidus qui sont associés à des modifications de l'activité des dérivés du benzimidazole chez certains organismes obtenues dans la littérature. Le site de fixation du carbendazime doit répondre à ces différentes contraintes. J'ai réalisé une étude en m'appuyant sur la structure de la tubuline et sur



les données de mutagenèse disponibles chez les différents organismes connus pour proposer un site de fixation du carbendazime

Les expériences de RMN réalisées au laboratoire ont permis d'identifier un transfert de NOE entre les protons de la colchicine et ceux du carbendazime, indiquant une proximité entre les deux molécules. Les données expérimentales d'inhibition de la dynamique du microtubule montrent aussi que la fixation de la colchicine augmente l'affinité du carbendazime.

Un certain nombre de résidus de la sous-unité tubuline- $\beta$  modifiant l'activité aux dérivés du benzimidazole ont été référencés chez certains organismes. Les mutations dans la tubuline- $\beta$ , qui confèrent la résistance au bénomyl et au carbendazime, bien qu'éloignées dans la séquence primaire, sont regroupées dans le domaine N-terminal, à proximité de l'hélice H7. Ces mutations sont listées en Annexe 5.

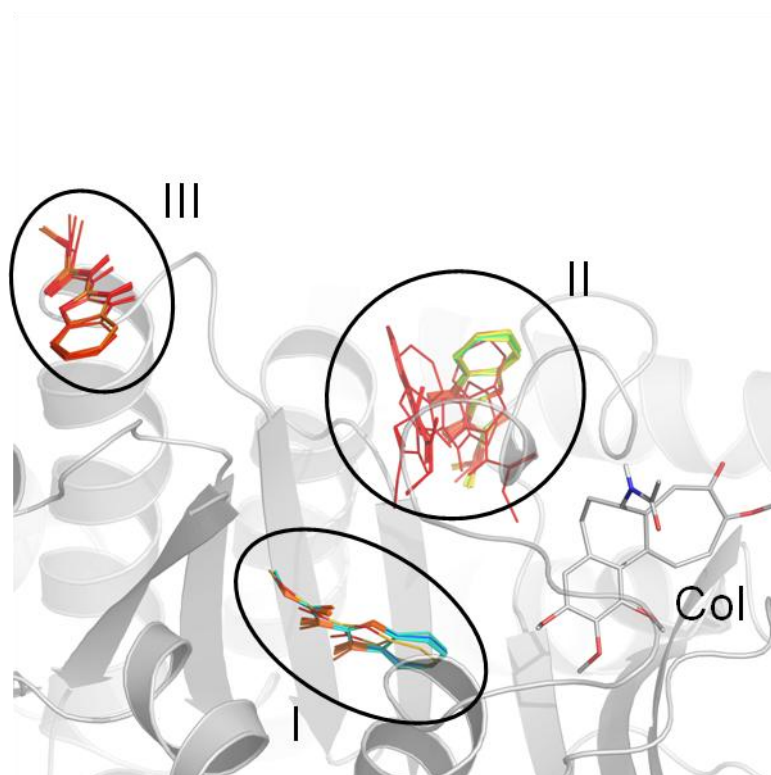


**Figure 48 :** Dérivés du benzimidazole associés à des mutations de la sous-unité tubuline- $\beta$ .

L'ensemble des résidus mutés qui entraînent une résistance au bénomyl ou au carbendazime se trouvent à proximité du site de fixation de la colchicine. Plus précisément, la colchicine se fixe sur le domaine intermédiaire de la tubuline- $\beta$  d'un côté de la boucle T7 (Figure 40) tandis que les résidus mutants se trouvent principalement sur le domaine N-terminal de l'autre coté de la boucle T7.

Comme cela a été présenté précédemment (Figure 41), le bénomyl se dégrade rapidement dans l'eau pour produire le carbendazime et de la dibutylurée [139-141]. J'ai donc considéré que les mutations de la tubuline- $\beta$  observées en présence de bénomyl le sont également en présence de carbendazime.

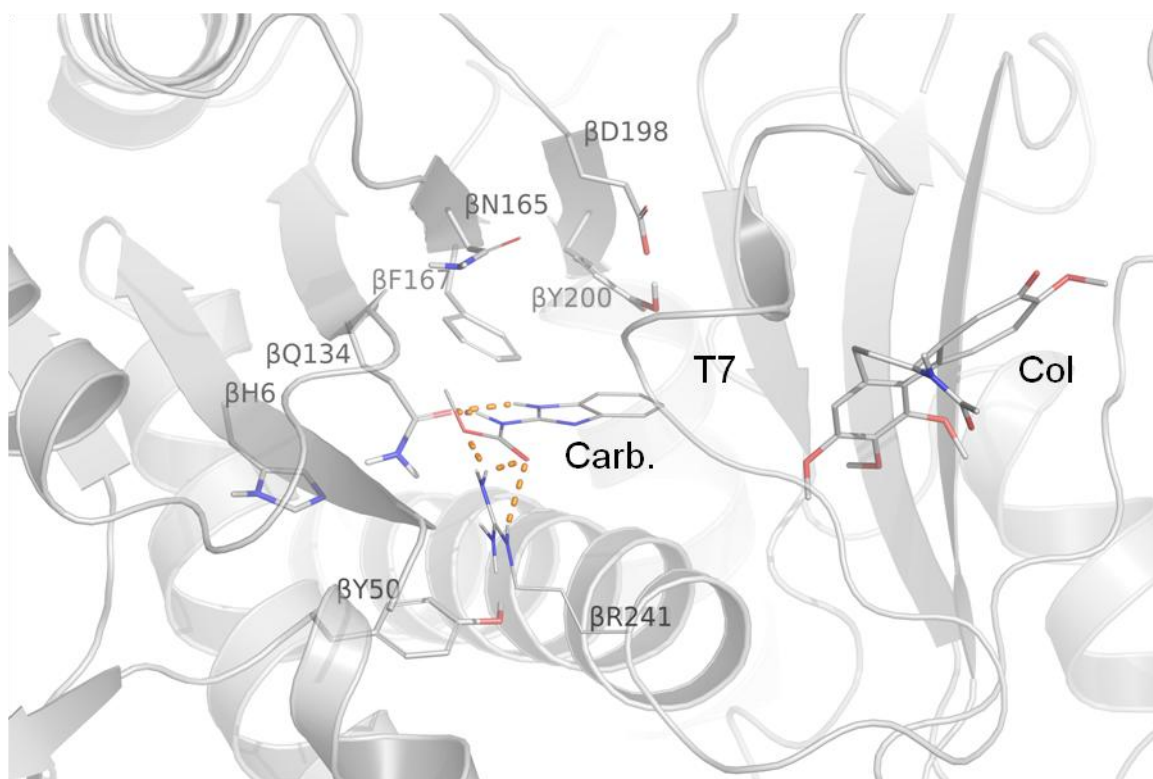
La structure représentative de la dynamique moléculaire du complexe tubuline-colchicine possède une cavité au niveau des résidus associés à la résistance au carbendazime. La fixation du carbendazime dans cette cavité a été estimée par amarrage moléculaire (Figure 49). Le groupe de poses I a l'énergie d'interaction la plus favorable. Il se trouve dans cette cavité enfouie entre l'hélice H7 et le feuillet  $\beta$  du domaine N-terminal.



**Figure 49 :** Cluster des poses du carbendazime dans le complexe tubuline-colchicine. La structure secondaire de la sous-unité tubuline- $\beta$  est représentée en ruban et la colchicine en bâton. Les ellipses indiquent les trois clusters de poses du carbendazime.

L'énergie d'interaction a été estimée à  $-5,86 \text{ kcal.mol}^{-1}$  pour le cluster I,  $-5,66 \text{ kcal.mol}^{-1}$  pour le cluster II et  $-5,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$  pour le cluster III. Les énergies libres d'interaction estimées par AutoDock permettent d'ordonner les clusters. Si les différences d'énergie libre d'interaction sont minimales, on peut discriminer le cluster III puisqu'il est trop éloigné de la colchicine. Au contraire, le cluster I répond mieux aux contraintes de distance énoncées par les données RMN. Par la suite, je me suis focalisé sur les poses du cluster I.

Dans cette poche, le carbendazime établit des interactions avec la sous-unité tubuline- $\beta$  et notamment avec certains résidus associés à la résistance aux dérivés du benzimidazole tels que  $\beta$ Q134 ainsi que les résidus hydrophobes  $\beta$ F198 et  $\beta$ Y200 (Figure 50).

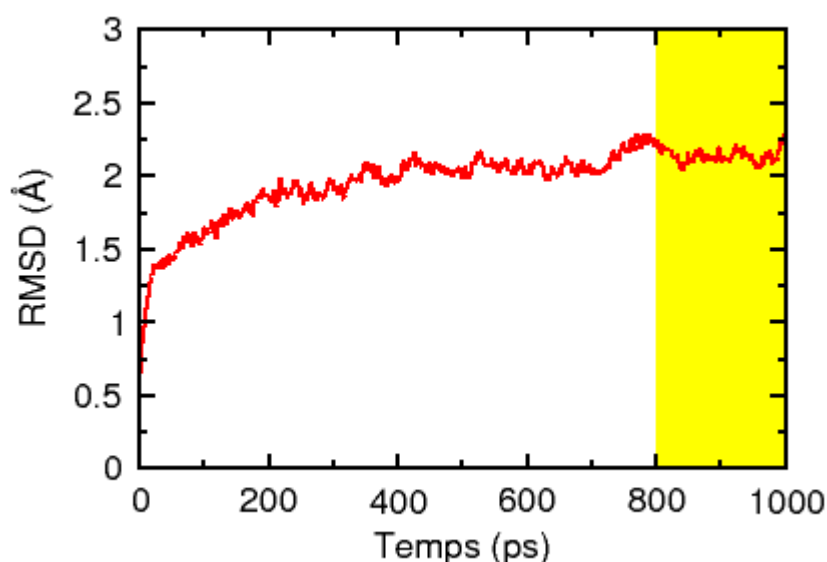


**Figure 50 :** Interaction entre le carbendazime après amarrage sur la sous-unité tubuline- $\beta$ . La structure secondaire de la tubuline- $\beta$  est représentée en ruban. La colchicine et les résidus associés à une résistance aux dérivés du benzimidazole sont représentés en bâton. Les autres résidus qui interagissent avec le carbendazime ainsi que le carbendazime sont représentés en fil de fer. Les pointillés oranges indiquent liaisons hydrogène entre la tubuline et le carbendazime.

### 2.3.c. Rôle du carbendazime dans la déstabilisation du MT

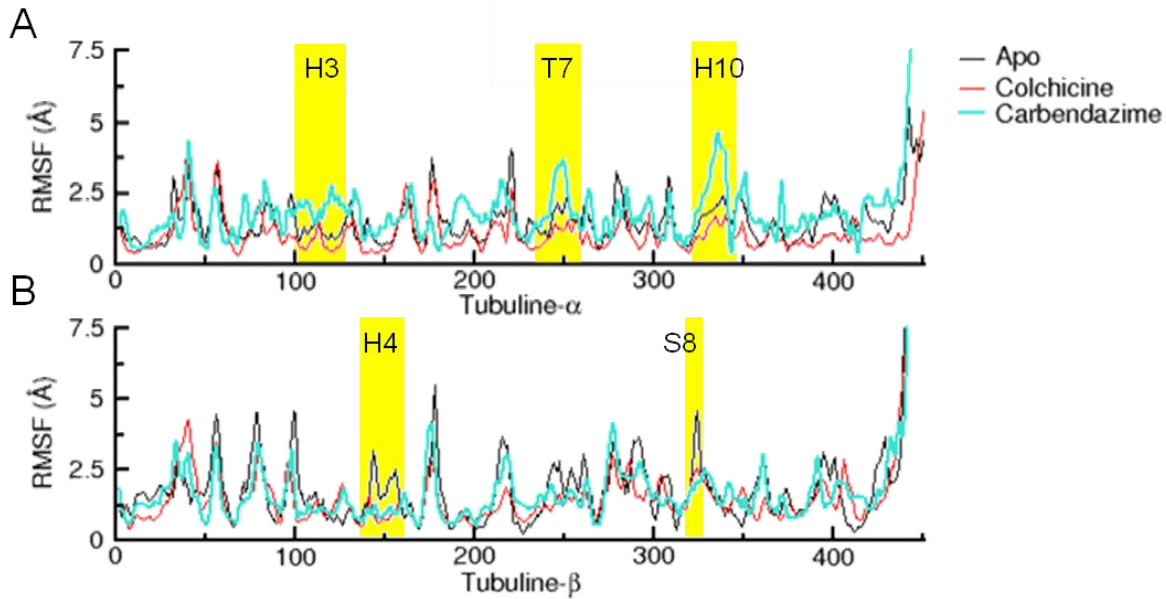
Pour évaluer le site de fixation potentiel du carbendazime, j'ai effectué une dynamique moléculaire du complexe tubuline-carbendazime. Ces simulations ont pour but d'une part de relaxer les complexes et optimiser les interactions entre la tubuline et le carbendazime. D'autre part, on cherche à savoir si l'énergie d'interaction du carbendazime avec la tubuline est favorable en présence de la colchicine, comme le suggère la synergie.

Le RMSD atteint un premier plateau après 400 ps puis se stabilise après 800 ps (Figure 51). Les analyses seront effectuées sur les dernières 200 ps de la trajectoire.



**Figure 51 :** RMSD calculé sur les C $\alpha$  de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en présence de carbendazime.

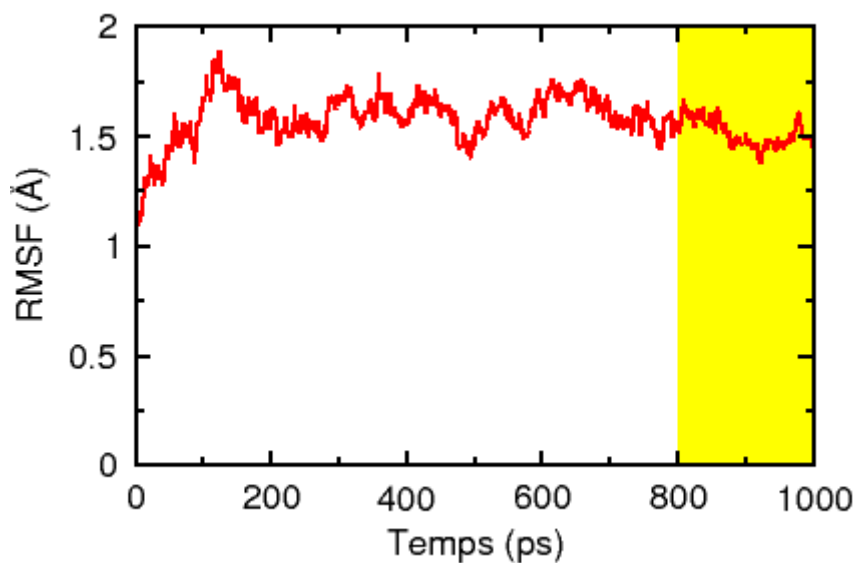
La fluctuation a été mesurée pour les complexes tubuline-carbendazime et tubuline-colchicine-carbendazime (Figure 52). Globalement, le carbendazime n'altère pas beaucoup la fluctuation, surtout dans la sous-unité tubuline- $\beta$ . On remarque toutefois deux tendances différentes entre les sous-unités tubuline- $\alpha$  et - $\beta$ . Dans la première la fluctuation est augmentée au niveau de l'hélice H3 (résidus 100-128), et des boucles T7 (résidus 240-258) et Taxol (résidus 327-347) (Figure 52 A). Ces régions sont éloignées de l'interface intra-dimère où le carbendazime se fixe.



**Figure 52 :** Fluctuation des C $\alpha$  de la tubuline en présence de carbendazime.

Au niveau de la sous-unité tubuline- $\beta$ , la fluctuation est très proche de celle de l'apo-tubuline sauf au niveau de la boucle T4 et de l'hélice H10 où elle est réduite au même niveau que dans le complexe tubuline-colchicine (Figure 52 B). Le site de fixation proposé est constitué du brin  $\beta$  S4 qui précède la boucle T4 ce qui explique le changement de fluctuation en présence de carbendazime. La diminution de la fluctuation de l'hélice H10 pourrait s'expliquer pour la perturbation du réseau d'interactions hydrophobes établi dans le domaine intermédiaire.

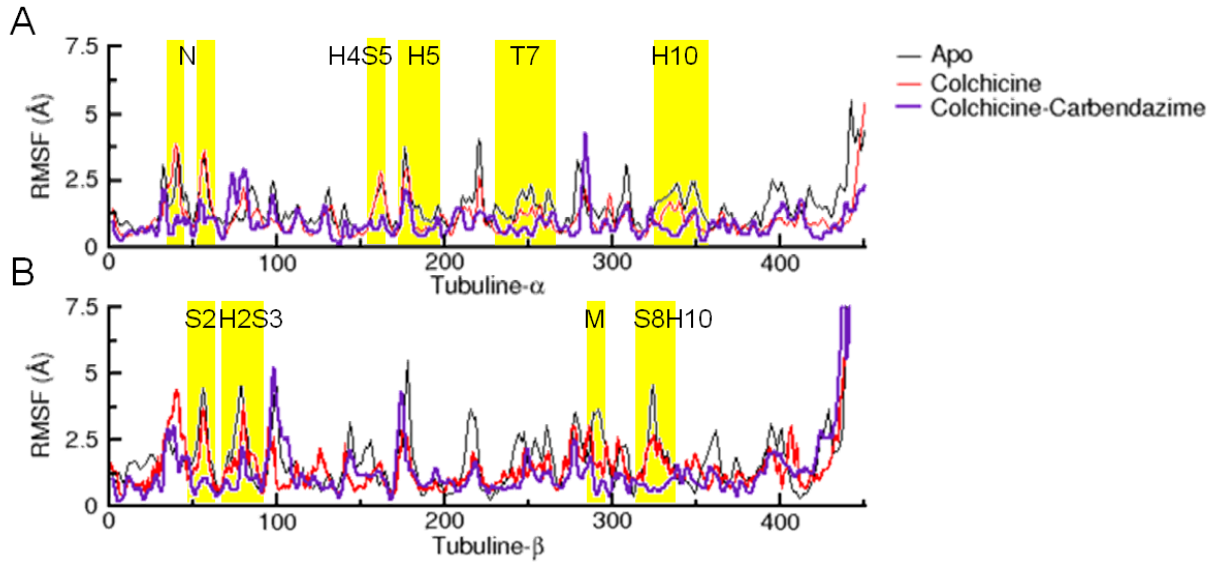
Les expériences biologiques ont montré une synergie de l'activité de la colchicine et du carbendazime. J'ai donc réalisé la dynamique moléculaire du complexe et tubuline-colchicine-carbendazime. Le RMSD est stable durant les dernières 200 ps ce qui nous permet de comparer la fluctuation avec les autres complexes (Figure 53).



**Figure 53 :** RMSD calculé sur les  $C\alpha$  de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en présence de colchicine et de carbendazime.

On observe une réduction de la fluctuation en présence des deux ligands, ce qui corrobore les données expérimentales (Figure 54). Dans la sous-unité tubuline- $\alpha$ , cette diminution est la plus importante au niveau des boucles N, H4S5 et T7 et les hélices H5 et H10. Hormis la boucle H4S5, toutes ces structures sont proches du site de fixation de la colchicine et de l'interface intra-dimère (Figure 54 A).

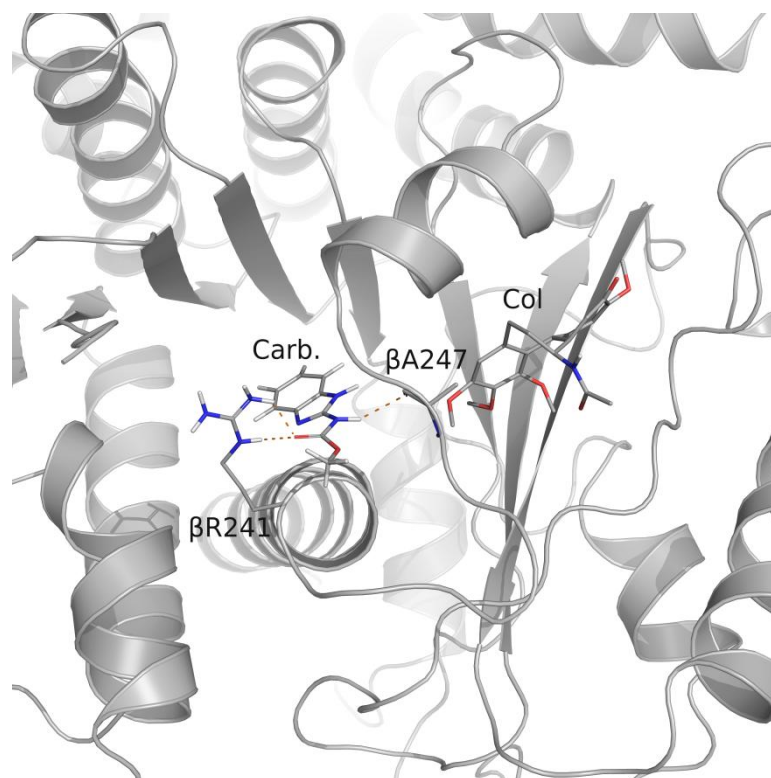
Dans la sous-unité tubuline- $\beta$ , la diminution de la fluctuation ne concerne que les boucles H2S3, M et S8H10, le brin S2. Dans la structure de la tubuline- $\beta$ , la boucle S8H10 se situe entre le brin S9, qui forme le site de fixation de la colchicine et la boucle M. La présence de la colchicine réduit la fluctuation au niveau de la boucle S8H10 qui a son tour stabilise la boucle M au travers des interactions hydrophobes au cœur de la tubuline (Figure 54 B). Il en résulte une réduction de la fluctuation aux interfaces latérales de la sous-unité tubuline- $\beta$ , ce qui peut réduire les contacts entre protofilaments et d'autre part, l'interface longitudinale est moins flexible ce qui rend plus difficile le redressement de l'hétérodimère dans la tubuline, comme cela a été proposé par Bennett et coll. [50].



**Figure 54** : Fluctuation des C $\alpha$  de la tubuline en présence de carbendazime.

Alors que la poche prédite était enfouie au cœur de la sous-unité tubuline- $\beta$ , le carbendazime se positionne vers l'interface intra-dimère en face de la colchicine de l'autre côté de la boucle T7. Il s'éloigne ainsi du cycle C de la colchicine mais se rapproche du cycle A (Figure 55). La contrainte de distance est respectée entre les protons du carbendazime et ceux des groupements méthoxy du cycle A de la colchicine. Le carbendazime dans cette poche reste en contact avec des résidus H6, N165 et F198, dont la mutation est associée à des phénomènes de résistances chez certains champignons (Annexe 5)

La position du carbendazime dans la sous-unité tubuline- $\beta$  change en présence de colchicine reste en accord avec l'hypothèse selon laquelle, la colchicine modifie la structure de la tubuline ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité du carbendazime.



**Figure 55 :** Position du carbendazime dans la structure moyenne du complexe tubuline-colchicine-carbendazime. La structure secondaire de la sous-unité tubuline- $\beta$  est représentée en ruban. La colchicine, le carbendazime et les résidus impliqués dans des liaisons H avec le carbendazime sont représentés en bâtonnets.

En m'appuyant sur les expériences RMN et les données de mutagenèse naturelle, j'ai proposé un site de fixation du carbendazime dans la sous-unité tubuline- $\beta$ . Les simulations de dynamiques moléculaires ont permis de relaxer le complexe tubuline-colchicine-carbendazime et donc de préciser la proposition de site de fixation du carbendazime. Par ailleurs, les analyses montrent que la colchicine et le carbendazime ont un effet synergique sur la fluctuation des  $C\alpha$  de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Ces résultats sont en accord avec les expériences *in vitro*. Enfin, en m'appuyant sur les observations faites sur les complexes tubuline-colchicine et tubuline-colchicine-carbendazime, je propose que la colchicine participe à la déstabilisation des MT en réduisant la flexibilité des interfaces longitudinales de la tubuline, ce qui est défavorable au redressement de l'hétérodimère.

### 2.3.d. Développement de nouvelles molécules hybrides

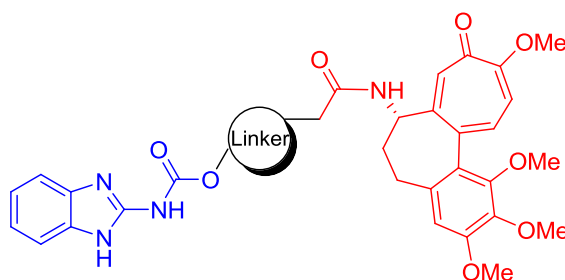
A l'issue de la dynamique moléculaire du complexe tubuline-colchicine-carbendazime, la position des deux ligands permet la création d'un *linker*, *i.e.* une chaîne moléculaire qui lie les deux molécules.



La structure moyenne du complexe tubuline-colchicine-carbendazime a été calculée sur la partie de la trajectoire où le RMSD est stable (Figure 53). Cette structure a été utilisée pour construire les nouvelles molécules contenant le linker. La colchicine et le carbendazime sont séparés par la boucle T7 de la sous-unité tubuline- $\beta$  (Figure 55). Deux voies sont possibles pour lier le carbendazime à la colchicine : i) en liant le groupement benzimidazole du carbendazime avec un des groupements méthoxy du cycle A de la colchicine, ii) en liant le groupement méthyle de la chaîne latérale du carbendazime et de la colchicine.

La distance entre le benzimidazole et le groupement méthoxy est de 6,5 Å, ce qui permet l'utilisation d'un *linker* court et donc de réduire le nombre de degrés de liberté. En revanche, cette construction imposerait un processus particulier dans la fixation de la molécule : dans un premier temps, le carbendazime devrait se positionner dans le site de fixation de la colchicine, puis passer sous la boucle T7, comme un crochet, afin de laisser la place à la colchicine. D'autre part, des études de relations [48] structure-activité sur la colchicine et les molécules se fixant dans sa poche ont montré l'importance du cycle triméthoxyphenyl dans l'interaction avec la sous-unité tubuline- $\beta$ . Pour ces raisons, la liaison entre le cycle A de la colchicine et le benzimidazole a été rejetée.

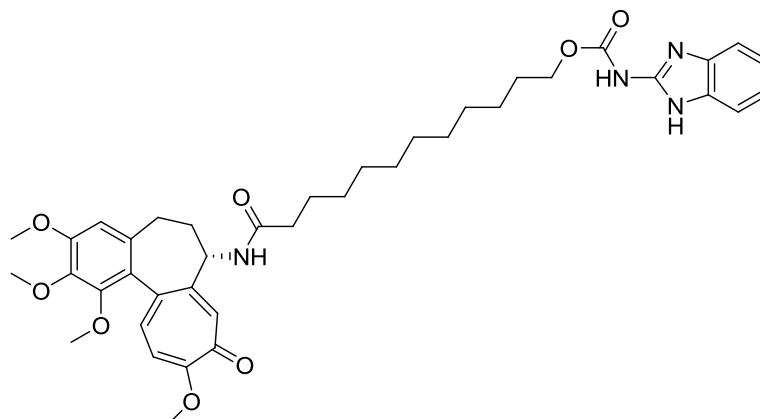
Le groupement méthyle de la chaîne latérale de la colchicine et du carbendazime sont séparés 12,9 Å et sont exposés de la même manière au niveau de la boucle T7. Une chaîne linéaire constituée de 10 atomes de carbone saturés peut-être utilisée comme *linker* entre ces deux groupements (Figure 56). Une première molécule concept est appelée CLC pour Colchicine *Linker* Carbendazime a été construite *in silico* avec un *linker* de 12 atomes de carbone.



**Figure 56** : Concept de molécule hybride colchicine-carbendazime.

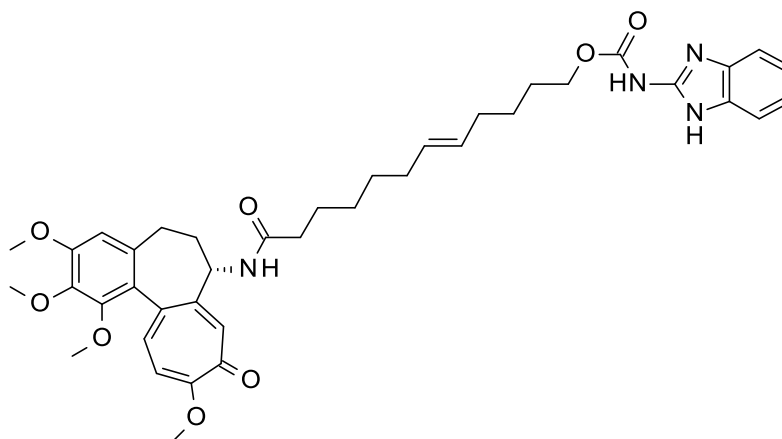
Il s'agit du concept initial de molécule hybride colchicine-carbendazime. A ce moment, aucune optimisation n'est faite au niveau du *linker* pour réduire les degrés de liberté ni pour augmenter les interactions polaires avec l'hétérodimère de tubuline. Deux contraintes ont compliqué le design de

linkers. Plusieurs fragments ont été proposés par Christophe Roche, chimiste et collaborateur de la société BioQuanta S.A., pour optimiser la structure et les interactions potentielles du *linker* ; cependant ces fragments ne sont pas décrits dans le champ de force et nécessitaient donc une étape de paramétrisation coûteuse en temps de calcul. D'un autre côté, j'avais proposé plusieurs modèles de *linker* qui portaient notamment des fonctions hydroxyles pour augmenter les interactions avec la tubuline.



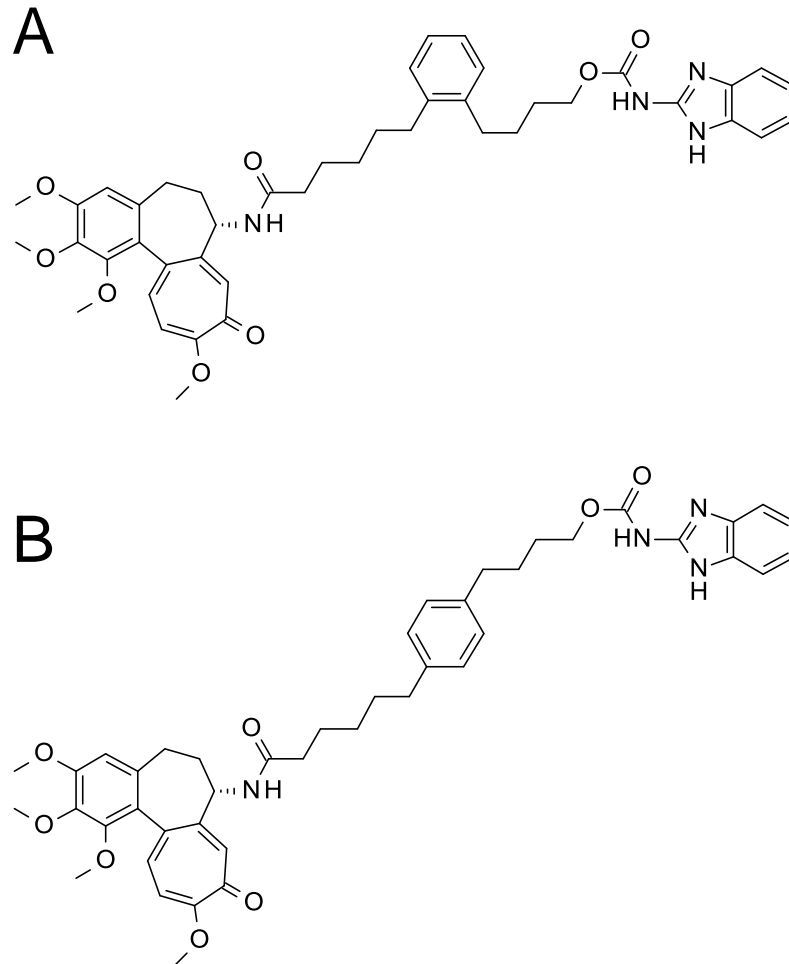
**Figure 57** : Structure planaire de la molécule hybride CLC.

Malheureusement, afin que ces groupements ne réagissent pas chimiquement avec d'autres réactifs, il aurait fallu les protéger et donc complexifier grandement la synthèse. En tenant compte de ces limitations, trois autres linkers ont été construits pour satisfaire les contraintes évoquées ci-dessus. La chaîne de carbones saturés dans la molécule hybride CLC possède un grand nombre d'angle de torsions qui peuvent augmenter l'entropie et potentiellement réduire l'affinité de la molécule. Afin d'apporter plus de rigidité ainsi qu'une courbure dans la molécule, un second *linker* contenant une double liaison a été construit : C2C (Figure 58).



**Figure 58** : Structure planaire de la molécule hybride C2C

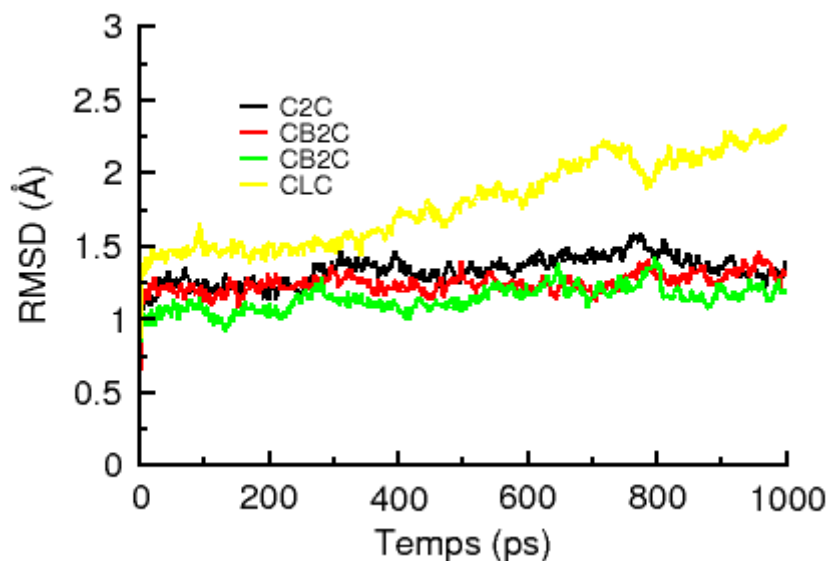
Enfin, un cycle benzène a été introduit à la place de cette double liaison avec les chaînes en position 1,2 (CB2C) et 1,4 (CB4C) (Figure 59). Le rôle du benzène est le même que celui de la double liaison dans la molécule C2C : réduire les torsions et introduire une courbure dans le *linker* pour favoriser la fixation des noyaux carbendazime et colchicine dans leur poche respective.



**Figure 59 :** Structures planaires des molécules hybrides ayant un *linker* avec un cycle aromatique. (A) CB2C. (B) CB4C.

### 2.3.e. Estimation de l'énergie d'interaction des hybrides

Une simulation de dynamique moléculaire a été réalisée pour chaque complexe tubuline-hybride selon le même protocole que le complexe tubuline-colchicine (voir Chapitre III.2.2.d). La stabilité des complexes a été vérifiée par le calcul du RMSD des C $\alpha$  des résidus 1 à 420 de chaque sous-unité de la tubuline- $\alpha\beta$  (Figure 60).



**Figure 60** : RMSD des C $\alpha$  de la tubuline dans les complexes tubuline-molécules hybrides

Ces simulations de dynamiques moléculaires sont courtes mais si l'on ne tient pas compte de l'extrémité C-terminale, le RMSD des complexes atteint un plateau rapidement et devient stable sur les dernières 200 ps au moins. Les mesures d'énergies d'interactions seront réalisées sur cette période.

Les chimères ont des effets globalement proches mais sensiblement différents sur certains résidus. Ces hétérogénéités se traduisent par des interactions différentes et donc des énergies d'interaction différentes. Ces valeurs sont calculées à partir des fichiers de paramètres (.top, .par, .psf) et de la trajectoire.

Dans le deuxième cas, l'énergie totale a été calculée sur les différents systèmes – le ligand, l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  et le complexe tubuline- $\alpha\beta$ -ligand – sur une trajectoire d'une nanoseconde. L'énergie de liaison a été calculée à partir de ces trois valeurs d'après l'équation suivante :

L'énergie d'interaction a d'abord été calculée comme la somme des énergies de van der Waals et des énergies électrostatiques qui ont lieu entre la tubuline et le ligand. On distingue trois groupes de molécules. Le premier groupe est composé des ligands CB2C et CB4C. Ces deux ligands portent un cycle aromatique dans leur linker. Avec cette méthode, l'énergie d'interaction du CB4C est la plus favorable ( $-156,594 \pm 5,023$  kcal/mol). L'énergie d'interaction entre CB2C est proche de celle de CB4C ( $-144,615 \pm 7,277$  kcal/mol).

Le deuxième groupe de molécules est constitué du CLC ( $-114,373 \pm 4,882$  kcal.mol<sup>-1</sup>) et du C2C ( $-120,346 \pm 3,029$  kcal.mol<sup>-1</sup>) ainsi que du complexe colchicine-carbendazime ( $-110,346 \pm 5,843$

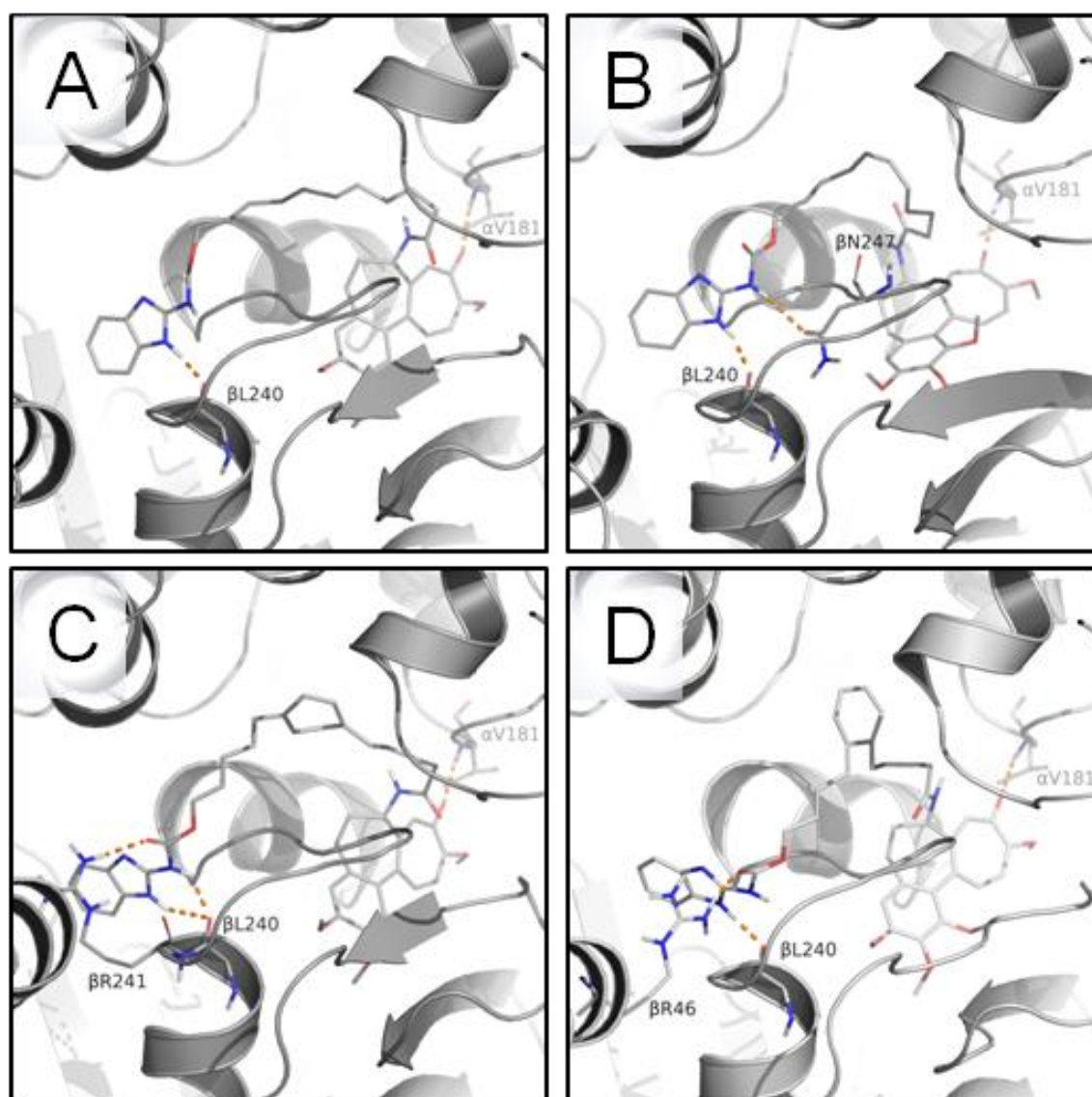
kcal.mol<sup>-1</sup>). Les molécules CLC et C2C possèdent un *linker* saturé. Les énergies d'interactions des trois molécules étant proches, on s'attend à ce qu'elles aient la même activité biologique, avec une réserve toutefois : la trajectoire du complexe tubuline-CLC n'est pas encore bien stabilisée (Figure 60). Prolonger les calculs permettrait d'obtenir des valeurs plus précises de l'interaction entre la tubuline et les ligands. Enfin, le dernier groupe est composé de la colchicine et le carbendazime. Les deux ligands seuls ont des énergies d'interaction plus faibles du fait de leur taille et du plus petit nombre d'interactions auxquelles ils participent.

**Tableau 7 :** Détails des énergies d'interactions non-liantes entre les différents ligands et la tubuline. Les énergies sont moyennées sur la partie stabilisée de chaque trajectoire.

	<i>Énergie (kcal.mol<sup>-1</sup>)</i>	
	<i>Moyenne</i>	<i>Écart-type</i>
<i>Carbendazime</i>	<i>-46,687</i>	<i>5,040</i>
<i>Colchicine</i>	<i>-64,749</i>	<i>3,328</i>
<i>Col-Cbz</i>	<i>-110,197</i>	<i>5,843</i>
<i>CLC</i>	<i>-114,373</i>	<i>4,882</i>
<i>C2C</i>	<i>-120,346</i>	<i>3,029</i>
<i>CB2C</i>	<i>-144,615</i>	<i>7,277</i>
<i>CB4C</i>	<i>-156,594</i>	<i>5,023</i>

Les ligands ont la même conformation. Ainsi, le noyau colchicine présente les mêmes contacts que dans la dynamique moléculaire du complexe tubuline-colchicine. Le noyau carbendazime est déplacé à cause du *linker*. Le groupement benzimidazole s'en trouve plus éloignée du cycle triméthoxyphényl du noyau colchicine, et ce quelque soit le linker. Dans tous les ligands, le noyau benzimidazole carbamate interagit avec la chaîne principale du résidu  $\beta$ L240. D'autres résidus interviennent également dans la fixation des ligands comme l'arginine  $\beta$ R241 pour le CB4C et  $\beta$ R46 pour CB2C quand au C2C, l'amine du groupement carbamate interagit avec la chaîne latérale du résidu  $\beta$ N247.

Le nombre de liaisons H est plus important dans les complexes tubuline-CB4C et -CB2C, ce qui explique leur énergie d'interaction plus favorable. En revanche, le noyau benzimidazole carbamate des molécules hybrides semble sortir de sa poche et de ce fait s'éloigne du noyau colchicine. L'insertion du *linker* semble donc avoir un effet sur la position relative des deux parties molécules hybrides.



**Figure 61 :** Interaction des molécules hybrides avec la tubuline. La structure secondaire de la tubuline- $\alpha\beta$  est représentée en ruban. Les molécules hybrides ainsi que les résidus qui participent à leur fixation sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont identifiées par des pointillés oranges. (A) CLC, (B) C2C, (C) CB2C et (D) CB4C.

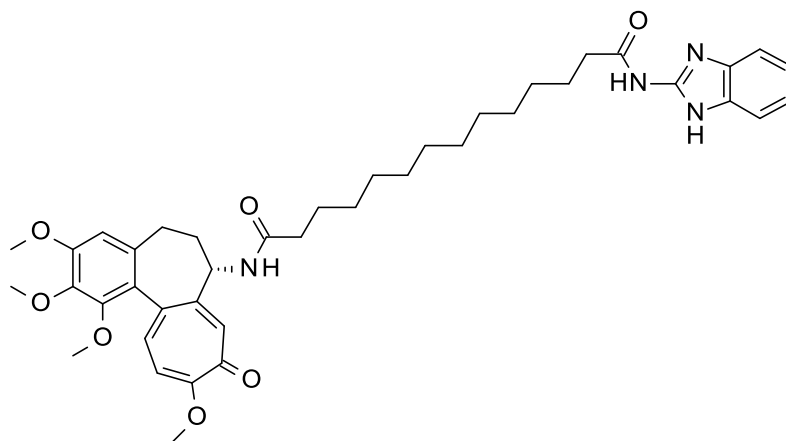
À la suite de ces travaux, nous avons décidé de réaliser la synthèse des molécules hybrides afin d'obtenir des données expérimentales d'activité antiméiotiques ainsi que des données RMN.

### 2.3.f. Synthèse d'une molécule hybride

Après étude de la rétro-synthèse, c'est la molécule CLC qui s'est avérée la plus simple à produire. D'après l'étude *in silico*, la molécule CLC n'est pas la meilleure cependant, elle permet

d'obtenir des données expérimentales préliminaires pour optimiser les prochaines études de modélisation moléculaire.

La première tentative de synthèse consistait à partir du noyau colchicine puis à lier le *linker* et terminer par l'insertion du noyau benzimidazole carbamate. Cette approche s'est soldée par un échec lors de la dernière étape, du fait de la présence de nombreux groupes réactionnels. Une deuxième approche détaillée en Annexe 6 a été réalisée. Cependant, pour faciliter la synthèse, le noyau carbendazime a été modifié : l'atome d'oxygène du groupement cétone de la partie carbendazime a été remplacé par un carbone. D'après les résultats de dynamique moléculaire, cet oxygène n'est pas engagé dans des liaisons hydrogène et son remplacement par un carbone ne devrait pas affecter l'activité de la molécule. Cette molécule est appelée 255q.



**Figure 62 :** Structure plane de la molécule 255q synthétisée

## 2.4. Conclusion

De part son rôle dans la division cellulaire, la tubuline- $\alpha\beta$  est une cible des thérapies anticancéreuses. Le carbendazime, un pesticide dérivé du benzimidazole qui inhibe la polymérisation de la tubuline, d'ailleurs l'objet de deux essais cliniques contre certains cancers. La colchicine est également un inhibiteur du MT mais sa toxicité est trop importante pour qu'elle soit utilisée comme un agent anticancéreux. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'utilisation de la colchicine et du carbendazime augmente de manière synergétique l'activité antiméiotique de ces molécules. De plus, le laboratoire a montré que le site de fixation du carbendazime jusqu'alors inconnu se trouve à proximité de la colchicine.

En m'appuyant sur les données expérimentales obtenues au laboratoire ainsi que sur les données de mutagenèse, j'ai proposé un site de fixation du carbendazime. La poche prédite du carbendazime se trouve enfouie dans la sous-unité tubuline- $\beta$ . Par la suite, une simulation de dynamique moléculaire en présence de colchicine a permis d'optimiser la conformation du carbendazime. En effet, la colchicine en se fixant sur la tubuline, modifie la structure et permet au carbendazime de se fixer d'une manière différente. La comparaison de l'énergie libre de liaison du carbendazime dans la tubuline libre et dans le complexe tubuline-colchicine permettrait de savoir si la colchicine facilite bien la fixation du carbendazime dans sa poche, comme le montre les données expérimentales. De plus, les valeurs d'énergies libres de liaisons obtenues *in silico* pourraient être comparées à celles obtenues par des expériences de calorimétrie de titration isotherme.

L'analyse de la fluctuation montre une synergie des deux ligands sur la flexibilité de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Il est connu que la colchicine modifie la structure de la tubuline de sorte à ce qu'elle soit défavorable à l'insertion d'hétérodimère dans le microtubule. A partir du calcul du RMSF, je propose que le complexe colchicine-carbendazime réduise la flexibilité des structures localisées aux interfaces longitudinales et défavorise le redressement de la tubuline- $\alpha\beta$ .

Ces résultats ont permis ensuite le design de nouvelles molécules hybrides reprenant les noyaux colchicine et carbendazime. Les simulations de dynamique moléculaire et la mesure de l'énergie d'interaction a permis de classer les ligands dans l'optique d'une synthèse chimique. Ces résultats pourront servir au développement de nouveaux linkers qui augmenteraient l'interaction avec la tubuline.

Les simulations de dynamique moléculaires présentées ici sont courtes (1 ns), même dans un contexte de drug design. J'ai réalisé ces simulations au début de ma thèse alors que j'avais accès à une puissance de calcul réduite (8 cœurs, 2,7 GHz) qui ne me permettait pas de conduire plusieurs calculs en même temps. De plus, l'utilisation de logiciel plus rapide tel que GROMACS, comme cela a été fait pour l'étude de l'hydrolyse du GTP dans la tubuline et des interactions tubuline-peptide, permettrait de réduire le temps de calcul pour mieux échantillonner l'espace conformationnel des complexes tubuline-ligand. En augmentant la vitesse de calcul, je pourrais d'une part augmenter la durée des simulations et d'autre part réaliser plusieurs simulations d'un même système avec des graines différentes pour le générateur de nombre aléatoire. Par conséquent, les analyses et notamment l'évaluation de l'énergie d'interaction seraient plus précises.

Les paramètres de champ de force ont également été un facteur limitant pour la construction de nouvelles molécules. Ce n'est qu'à la fin de la thèse j'ai pu utiliser les outils AmberTools qui permettent de faciliter la génération de la topologie et des paramètres des molécules organiques à l'aide du champ de force généraliste GAFF.



Ces travaux de modélisation moléculaire ont mené à la synthèse d'une molécule et à des tests cellulaires qui se sont montrés positifs. D'autres molécules composées de *linker* de différentes tailles vont être synthétisées afin de récolter d'autres informations structurales et d'interaction avec la tubuline.

## 3. Optimisation de peptides dérivés de la stathmine

### 3.1. Introduction

La dynamique intrinsèque des microtubules est régulée dans la cellule par de nombreuses protéines qui se fixent notamment sur l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  libre ; c'est notamment le cas des protéines de la famille de la stathmine.

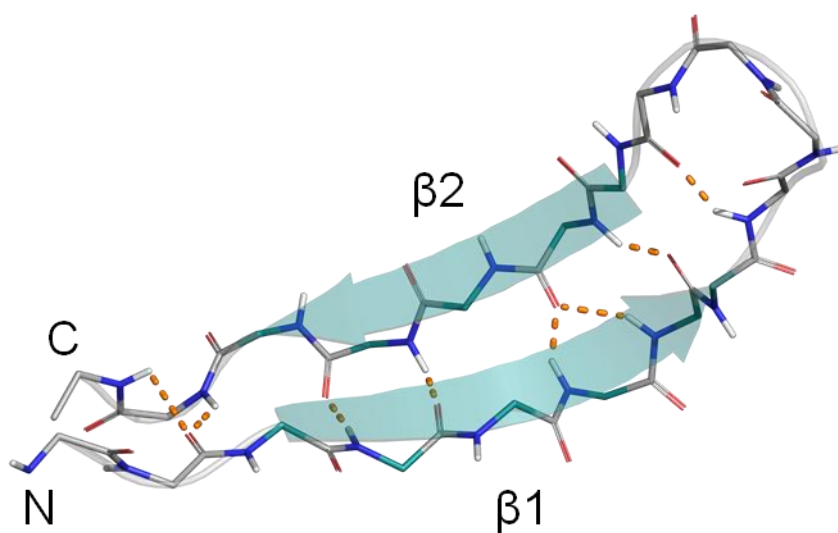
La stathmine est une phosphoprotéine cytosolique et ubiquitaire à la croisée de diverses voies de signalisation intracellulaires [142]. La stathmine interfère avec plusieurs fonctions cellulaires dépendantes des microtubules. La stathmine contrôle l'assemblage du microtubule en séquestrant la tubuline dans un complexe ternaire non-polymérisable constitué de deux hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  pour une stathmine. Ce complexe communément appelé complexe T2S est déstabilisé par la phosphorylation de la stathmine qui entraîne une réduction de son affinité pour la tubuline. Les autres protéines de la famille de la stathmine telle que la protéine RB3 possèdent toutes un domaine *stathmin-like* (SLD) qui permet aussi la séquestration de la tubuline dans un contexte de même stœchiométrie T2-SLD.

L'équipe de Marcel Knossow (LEBS, Gif-sur-Yvette) en collaboration avec Patrick Curmi et André Sobel a déterminé la structure du complexe tubuline/RB3-SLD à une résolution de 3,9 Å puis 3,5 Å [33]. Ces structures ont permis la description de la structure tertiaire du SLD composée de trois sous-domaines : un domaine N-terminal relié par un domaine intermédiaire au troisième domaine hélicoïdal possédant deux sites d'interaction avec les hétérodimères de tubuline (Figure 63).

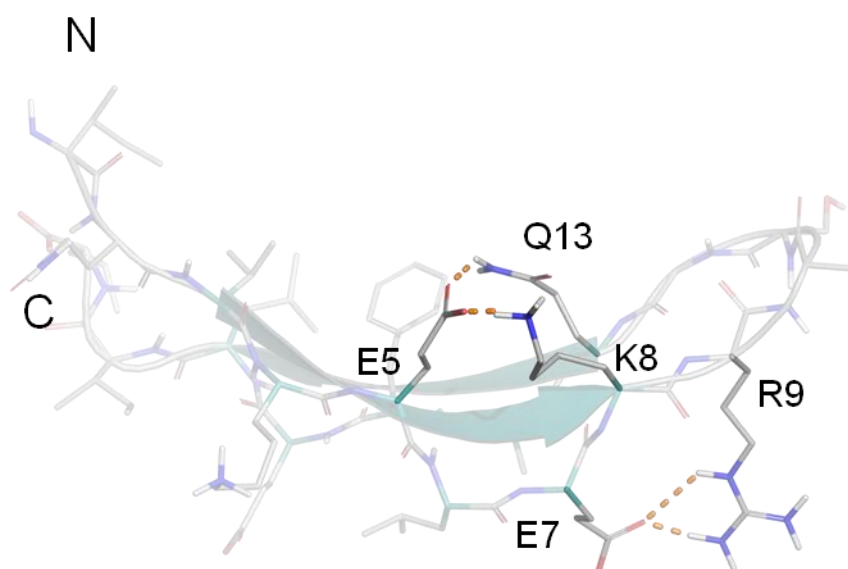
Dans cette structure, le domaine N-terminal de RB3-SLD se structure en épingle  $\beta$  dans le prolongement du feuillet  $\beta$  du domaine intermédiaire de la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Il a été proposé puis démontré [143] que le domaine N-terminal coiffant ainsi la tubuline- $\alpha$  s'oppose à la polymérisation de la tubuline en bloquant son interface longitudinale.



En complément, une étude structurale par RMN a été effectuée pour étudier le peptide I19L libre et en interaction avec la tubuline. Les résultats de la RMN indiquent que le peptide I19L se structure en épingle  $\beta$  constitué de deux brins  $\beta$  appelés  $\beta 1$  et  $\beta 2$  (Figure 65). En solution, le peptide a tendance à former une amorce d'hélice  $\alpha$  entre les résidus 10 et 14 comme cela avait été proposé par le logiciel de prédiction de structure AGADIR.

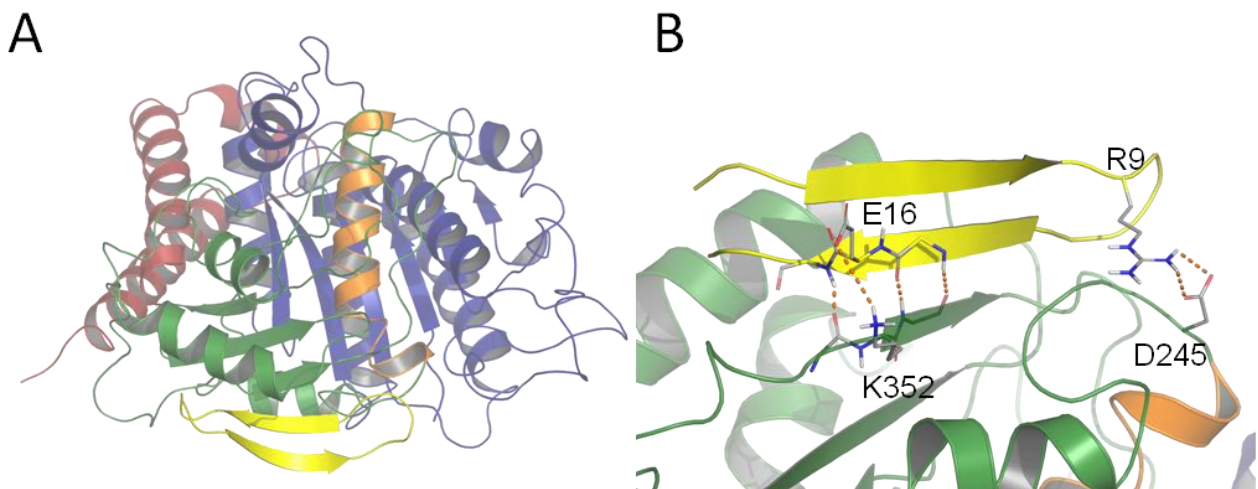


**Figure 65** : Structure RMN de la chaîne principale d'I19L en interaction avec la tubuline. La chaîne principale du peptide est représentée en bâtonnet. La structure secondaire est représentée en ruban. Les liaisons hydrogène qui maintiennent l'épingle  $\beta$  sont indiquées par des pointillés oranges.



**Figure 66** : Interaction électrostatiques et ioniques entre les chaînes latérales du peptide I19L. Les résidus sont représentés en bâtonnet. Pour des raisons de clarté, les hydrogènes non-polaires ont été masqués. La structure secondaire est représentée en ruban. Les liaisons hydrogène et ponts salins sont représentés en pointillés oranges.

Par la suite, des expériences d'amarrage moléculaires ont été réalisées en utilisant les données d'interactions tubuline-I19L issues de la RMN. Les poses obtenues sont comparables à la structure du domaine N-terminal de RB3-SLD dans la structure cristallographique 1SA0 : le peptide s'insère dans le prolongement du feuillet  $\beta$  du domaine intermédiaire de la sous-unité tubuline- $\alpha$ , au niveau d'une poche hydrophobe (Figure 67 A). En effet, plusieurs résidus hydrophobes du brin  $\beta 2$  du peptide sont en interactions avec la sous-unité tubuline- $\alpha$ . De plus, les chaînes latérales des résidus E16 et R9 peuvent potentiellement établir des interactions polaires avec les résidus la sous-unité tubuline- $\alpha$  K352 et D245 respectivement (Figure 67 B).



**Figure 67 :** Interaction entre le peptide I19L et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Le domaine N-terminal de la sous-unité tubuline- $\alpha$  est identifiée en bleu, l'hélice H7 en orange, le domaine intermédiaire en vert et le domaine C-terminal en rouge. Le peptide I19L apparaît en orange. Les résidus participants aux interactions polaires, pointillés oranges, sont représentés en bâtonnet. (A) Représentation en ruban des structures secondaires du complexes tubuline-I19L après le docking. (B) Détails des interactions polaires entre le peptide I19L et la sous-unité tubuline- $\alpha$ .

Au cours de ma thèse, j'ai proposé d'utiliser les outils de modélisation et de dynamique moléculaire pour contribuer à la compréhension des mécanismes d'interactions de ces peptides avec la tubuline et tenté de proposer des variants qui pourraient avoir un effet anti-microtubule plus prononcé.

J'ai ainsi entrepris le développement de peptides cycliques qui permettraient de maintenir la structure en coude  $\beta$  et ainsi réduire le coût énergétique associé à la structuration du peptide lors de sa fixation sur la tubuline. Deux approches de cyclisation ont été étudiées : Dans un premier cas, l'insertion d'un pont disulfure en mutants les résidus K4 et E16 en cystéine et dans un deuxième cas, la cyclisation du peptide par la formation d'une liaison peptidique entre le premier et le dernier résidu.

## 3.2. Méthodologie

### 3.2.a. Construction des systèmes

Le peptide I19L se fixe de façon stœchiométrique sur la tubuline. Le complexe tubuline- $\alpha\beta$ /I19L constitue un bon modèle pour étudier les interactions entre la protéine et le peptide. Tout d'abord, j'ai construit l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  en superposant les sous-unités tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  construites par homologie (voir page 66), sur leur sous-unité respective dans la structure cristallographique du complexe T2R (PDB ID : 1SA0). De cette manière, la structure de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  est courbée, comme cela a été montré pour la tubuline libre[45]. Le site N contient un nucléotide GTP et un ion  $Mg^{2+}$  tandis que le site E ne contient qu'un nucléotide GDP. Cela permet de comparer les résultats issus de la dynamique moléculaire avec les structures cristallographiques.

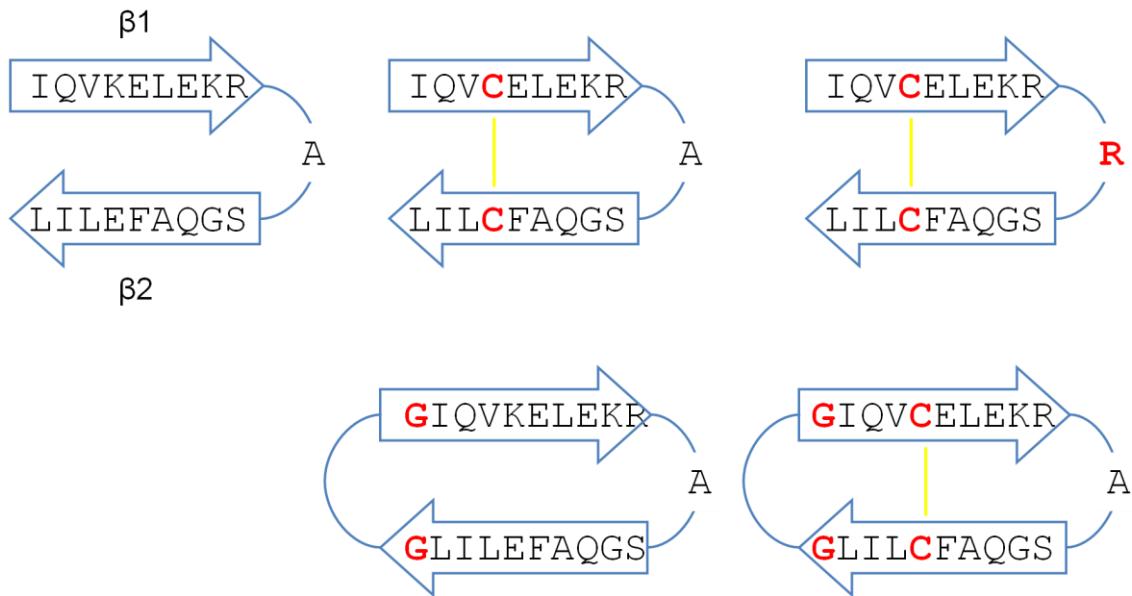
J'ai utilisé la structure du peptide moyen calculé à partir de signaux RMN. J'ai muté les résidus pour obtenir les peptides suivants (Figure 68) :

- peptide cyclique portant les mutations K4C-E16C
- peptide cyclique triple mutant K4C-E16C-A10R
- peptide cyclique G20G.
- et le peptide cyclique double mutant : G20G-K4C-E16C.

La construction a été réalisée avec PyMOL [144]. Les séquences des peptides sont présentées dans la Figure 68.

Chaque système a été préparé pour la nomenclature du champ de force Amber03. Ensuite, les hydrogènes manquants ont été ajoutés à l'aide du logiciel *reduce* présent dans la suite AmberTools 1.5 [66]. Les paramètres des nucléotides GTP et GDP ont été obtenus à partir de la base de données des paramètres du champ de force Amber [113]. Les ponts-disulfure ainsi que la liaison peptidique G19-G1 ont été ajoutés en utilisant le logiciel xLeap de la suite AmberTools 1.5 [66].

Chaque complexe tubuline-peptide été placé dans une boîte d'eau orthorhombique avec pour critère qu'une couche d'eau de 12 Å au moins entoure le complexe. J'ai utilisé le modèle d'eau TIP3P dans toutes les simulations [114].



**Figure 68 :** Illustration des peptides cycliques et des peptides mutés. Les mutations sont indiquées en rouge. Les ponts disulfures sont représentés par un trait jaune. De gauche à droite et de haut en bas : I19L, I19L\_K4C\_E16C, I19L\_K4C\_E16C\_A10R, G20G, G20G\_K4C\_E16C.

Par ailleurs, La charge totale du complexe a été neutralisée en ajoutant des ions  $\text{Na}^+$  dans le solvant. Le potentiel électrostatique est calculé à différents points d'une grille recouvrant le volume du système sur lesquels les ions sont placés. Ainsi, 57 ions  $\text{Na}^+$  ont été ajoutés dans le système tubuline-GTP et 58 dans les systèmes tubuline-Pi et -GDP. La solvation ainsi que la neutralisation des charges ont été réalisées à l'aide du logiciel tLeap de la suite AmberTools 1.5 [66]. Enfin, chaque peptide a été placé dans une boîte d'eau en suivant le même protocole.

### 3.2.b. Minimisation et Dynamiques Moléculaires

Par la suite, les fichiers de topologies et de paramètres ont été convertis du format Amber au format GROMACS à l'aide de l'outil acpype [115]. Un protocole de minimisation a été appliqué à chaque système pour supprimer les contacts atomiques défavorables et optimiser les interactions entre les résidus. La minimisation a été effectuée avec GROMACS selon le protocole suivant :

- 100 pas en utilisant l'algorithme de la pente la plus profonde
  - Critère de convergence :  $1 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$
  - Contraintes sur le complexe
- 5000 pas en utilisant l'algorithme du gradient conjugué
  - Critère de convergence :  $0,01 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$

- Contraintes sur le complexe
- 5000 pas en utilisant l'algorithme du gradient conjugué
  - Critère de convergence :  $1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Contraintes  $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$  sur le peptide
- 5000 pas en utilisant l'algorithme du gradient conjugué
  - Critère de convergence :  $0,01 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$
  - Aucune contrainte

Le calcul des énergies de van der Waals a été tronqué au-delà de  $10 \text{ \AA}$  et permuté entre  $8 \text{ \AA}$  et  $10 \text{ \AA}$  à l'aide de la méthode de *potential switch*. Les énergies électrostatiques ont été calculées à l'aide de la méthode PME pour laquelle la frontière entre espace réel et espace réciproque a été placée à  $12 \text{ \AA}$ . Les calculs ont été réalisés dans les conditions périodiques aux limites. Les mêmes paramètres ont été utilisés lors de la dynamique moléculaire.

A l'issue de la minimisation, j'ai réalisé deux étapes d'équilibration : La première étape a été effectuée avec des restrictions sur les coordonnées du complexe. L'algorithme du saute-mouton avec un pas d'intégration de  $1 \text{ fs}$  pendant  $100 \text{ ps}$  ( $100000$  pas) dans des conditions NVT afin d'équilibrer la pression et la température. La température moyenne a été maintenue à  $310 \text{ K}$  à l'aide du thermostat de Berendsen [116]. Dans la deuxième étape, les restrictions ont été supprimées et l'équilibration a été effectuée dans les conditions NPT. La température moyenne a été maintenue à  $310 \text{ K}$  à l'aide du thermostat de Berendsen et la pression moyenne à  $1 \text{ atm}$  à l'aide du barostat de Berendsen [116]. L'équilibration a été conduite pendant  $3 \text{ ns}$  à l'aide de l'algorithme du saute-mouton avec un pas d'intégration de  $1 \text{ fs}$ .

Enfin, l'étape de production a été menée pendant au moins  $15 \text{ ns}$  dans les conditions NPT (algorithme du saute-mouton ; pas d'intégration de  $1 \text{ fs}$ ). La température moyenne a été maintenue à  $310 \text{ K}$  à l'aide du thermostat « *Velocity Rescale* » [117] et la pression moyenne à  $1 \text{ atm}$  à l'aide du barostat de Berendsen. Les coordonnées du système ont été enregistrées tous les  $1000$  pas (chaque  $1 \text{ ps}$ ).

### 3.2.c. Analyse de l'énergie d'interaction

L'énergie libre d'interaction entre les peptides et l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  a été calculée à l'aide de la méthode MM-PB/GBSA présentée dans la partie Chapitre II.4.1 implémentée dans le logiciel AmberTools 1.5. Dans un premier temps, j'ai extrait  $200$  structures des dix dernières



nanosecondes (1/50) de la trajectoire. L'eau ainsi que les ions qui constituent le solvant ont été supprimés. La même structure est utilisée pour calculer la différence de l'énergie potentielle entre le complexe d'une part et d'autre part, l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  et le peptide. D'autre part, J'ai comparé la composante entropique du peptide dans son état libre et complexé avec la tubuline.

### 3.2.d. Computational Alanine Scanning

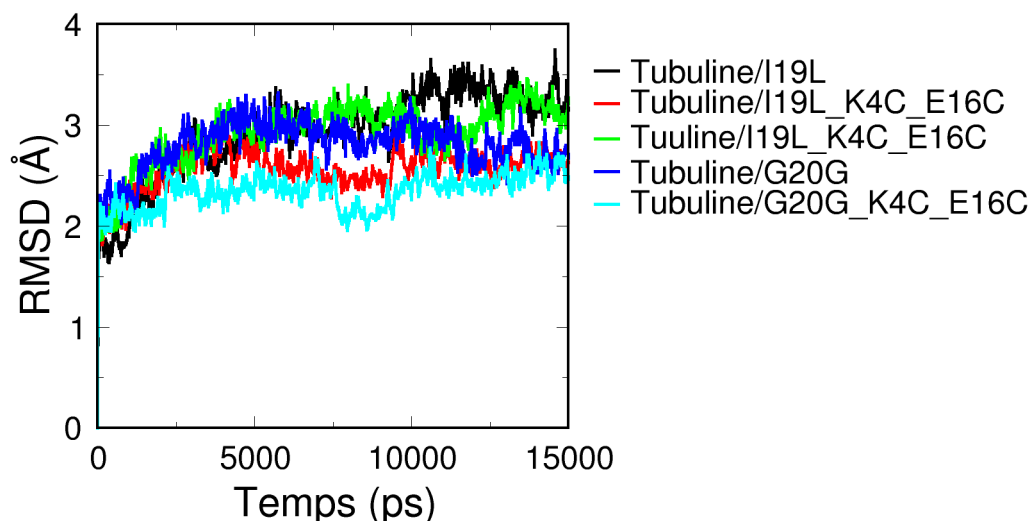
La méthode *computational alanine scanning* consiste à muter chaque résidu d'un peptide en alanine et de calculer l'énergie libre d'interaction du peptide muté pour identifier les résidus les plus importants pour l'interaction dans le complexe. L'énergie d'interaction peut-être calculée avec la méthode MM-PB/GBSA et est implémentée dans le logiciel AmberTools 1.5. J'ai dans un premier temps construit les peptides mutés avec PyMOL. Les résidus glycines et alanines ne sont pas modifiés. Ensuite, j'ai généré la topologie de chaque peptide avec tLEAP pour le champ de force AmberFF. Enfin, le logiciel applique la mutation et mesure l'énergie libre d'interaction pour chaque frame de la trajectoire. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès pour proposer des peptides inhibiteurs de la polymérisation de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  [56].

## 3.3. Résultats et discussion

### 3.3.a. Analyse de la dynamique moléculaire

A l'issue des 15 ns de simulation de dynamique moléculaire, l'énergie totale du système, le volume et la pression ainsi que le rayon de gyration sont stables, ce qui confirme que le système est équilibré. La mesure du RMSD sur les C $\alpha$  nous indique que la structure des complexes s'est stabilisée (Figure 69). En effet, après 5 ns, le RMSD atteint un plateau entre 2,5 et 3,5 Å selon les trajectoires.

Ces valeurs sont raisonnables étant donné que chaque système contient près de 890 résidus. Par la suite les analyses seront donc effectuées sur les cinq dernières nanosecondes. Cela permet d'avoir un grand nombre de structures pour estimer l'énergie d'interaction entre la tubuline et les peptides.

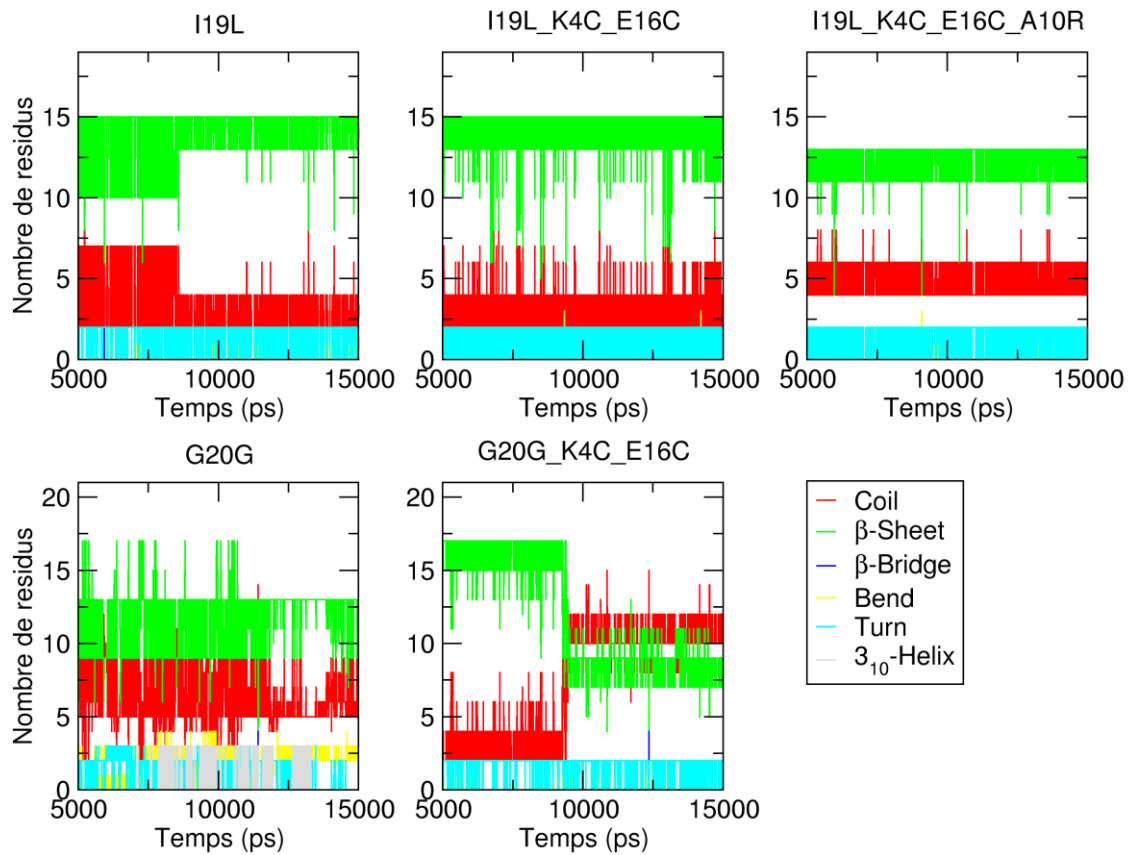


**Figure 69** : RMSD calculé sur les C $\alpha$  des complexes tubuline-peptide

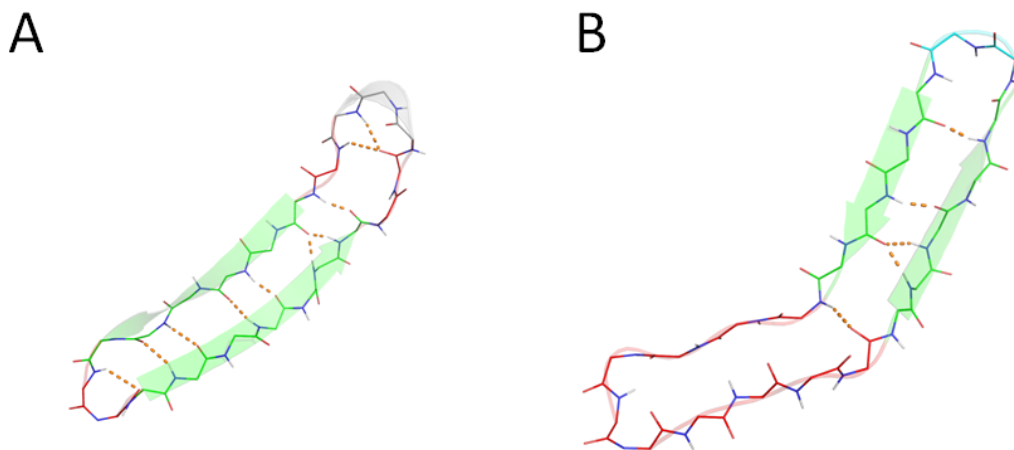
Je me suis également intéressé à l'évolution des structures secondaires dans le peptide (Figure 70). Les brins  $\beta$  sont conservés pour les peptides I19L, I19L\_K4C\_E16C et I19L\_K4C\_E16C\_A104. En revanche, les brins  $\beta$  des peptides G20G et G20G\_K4C\_E16C se déstructure après 9 ns (Figure 70). Dans ce dernier peptide, on passe de 5 résidus non structuré à 11 tandis que dans le cas du peptide G20G, on peut voir la formation d'une structure en hélice 3-10 sur les résidus 10 à 12 du peptide G20G (numérotation similaire au peptide I19L) (Figure 71).

### 3.3.b. Mesure de l'énergie d'interaction

La mesure de l'énergie d'interaction a été réalisée à l'aide de la méthode MM/PBSA sur un échantillon de 100 structures de complexe tubuline-peptide pour les cinq peptides. J'ai utilisé la méthode MM/GBSA. La méthode MM/PBSA donne de meilleurs résultats pour le calcul de l'énergie libre absolue tandis que la seconde est plus rapide et plus performante pour classer les énergies libres d'interaction relatives [145].



**Figure 70 :** Évolution de nombre de résidus impliqués dans des structures secondaires. Le nombre de résidus formant un brin  $\beta$  sont représentés en vert, les  $\beta$ -turn en cyan, les hélices  $3_{10}$  en gris, les coudes en jaune et les résidus non structurés en rouge.



**Figure 71 :** Structure des peptides cycliques. La chaîne principale des peptides est représentée en fil de fer, les liaisons hydrogène en pointillés orange. La structure secondaire est représentée en ruban : les brins  $\beta$  sont en vert, l'hélice  $3_{10}$  en gris, le coude en cyan et les régions non structurées en rouge. (A) Peptide G20G. (B) Peptide G20G\_K4C\_E16C.

Dans tous les cas, l'énergie libre de liaison est négative et donc favorable à la formation du complexe tubuline-peptide (**Tableau 8**). Nous n'observons pas de différence entre le peptide I19L et le double mutant I19L\_K4C\_E16C et ce, quelque soit la méthode utilisée. On peut admettre que l'entropie soit réduite par la présence du pont disulfure d'une part, et d'autre part, par le nombre de liaisons hydrogène intra-peptide plus important. Comme l'énergie d'interaction ne change pas par rapport au peptide I19L, la stabilisation du peptide se fait à la défaveur des interactions avec la tubuline.

**Tableau 8** : Énergie libre d'interaction tubuline-peptide en kcal.mol<sup>-1</sup>.

	MM-GBSA	MM-PBSA
I19L	-76,40 ± 5,70	-83,44 ± 6,57
I19L K4C E16C	-76,05 ± 5,20	-83,92 ± 6,11
I19L K4C E16C A10R	-66,96 ± 7,14	-73,52 ± 10,40
G20G	-69,03 ± 8,09	-71,18 ± 9,43
G20G K4C E16C	-91,16 ± 10,54	-88,73 ± 11,64

En revanche, l'interaction entre le peptide triple mutant I19L\_K4C\_E16C\_A10R et la tubuline est plus faible que le peptide sauvage et le double mutant (**Tableau 8**). C'est surprenant car la mutation A10R devait potentiellement augmenter le nombre de contacts polaires avec la tubuline et par conséquent accroître l'enthalpie. En contrepartie, la chaîne latérale de l'arginine est grande et flexible, ce qui pourrait affecter la structure du peptide ou fragiliser les interactions potentielles avec la tubuline.

Le peptide cyclique G20G possède une énergie libre de liaison proche de celle du peptide triple mutant (**Tableau 8**). L'extension de la séquence du peptide au niveau des extrémités et surtout la formation d'une liaison peptidique doit apporter des contraintes structurales défavorables.

Enfin, le peptide cyclique G20G\_K4C\_E16C se distingue des autres peptides par une énergie libre de liaison plus faible (**Tableau 8**). Ce dernier peptide semble le plus affiné. Ce qui est surprenant c'est qu'il reprend les deux approches de cyclisation, la liaison peptidique et le pont disulfure, qui individuellement dans les autres peptides n'améliorent pas voire dégradent l'interaction avec la tubuline.

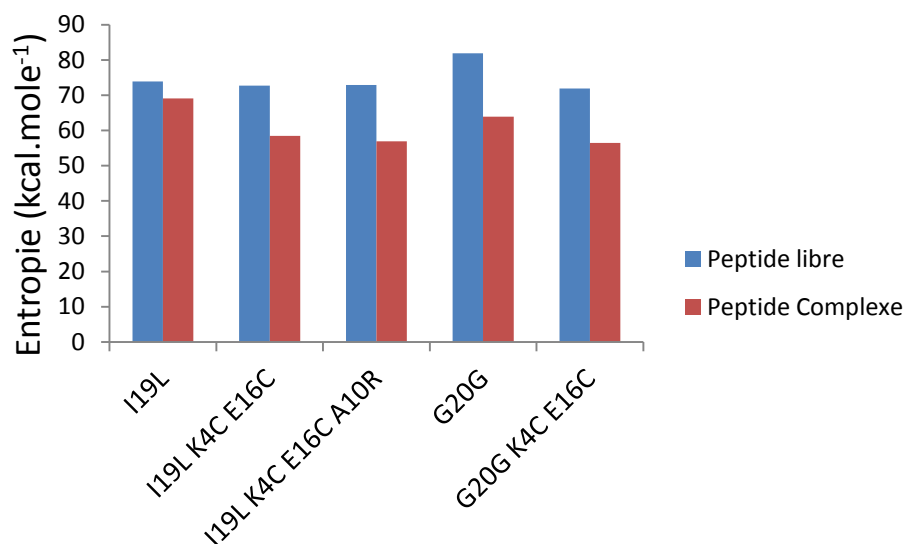
Chaque complexe tubuline-peptide comporte près de 900 résidus et plus de 14000 atomes tandis que le système solvaté contient plus de 100000 atomes. Il s'agit donc de systèmes de tailles conséquentes ce qui peut rendre difficile l'analyse étant donné les moyens de calculs à disposition. C'est pour cette raison que j'ai utilisé la méthode MM/PB(GB)SA en utilisant une seule trajectoire du complexe tubuline-peptide plutôt que trois trajectoires différentes correspondant au complexe, à l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  et au peptide libre. Cependant, l'utilisation d'une seule trajectoire est

justifiée lorsque les changements de structures sont faibles entre d'une part le récepteur et le ligand libre en solution et d'autre part le complexe récepteur-ligand.

A cause de ces contraintes de taille, le calcul de l'énergie libre d'interaction ne prend pas en compte la composante entropique. En effet, la méthode des modes normaux nécessite une minimisation précise de chaque structure des trois systèmes : complexe, récepteur et ligand, ce qui en fait une méthode particulièrement coûteuse en temps de calcul. Une alternative aurait pu consister à calculer les modes normaux uniquement sur les résidus au voisinage du peptide dans le complexe avec la tubuline. Le nombre de paramètres est réduit et la minimisation est donc accélérée. En contrepartie, nous obtenons une approximation dans le calcul de l'entropie. Malheureusement, je n'ai pas réussi à mettre en place ce protocole avec les outils de modélisation moléculaire que je possédais.

L'entropie peut également être estimée par la méthode dite *quasiharmonic entropy* ou *QH entropy* [146] qui requiert la construction et la diagonalisation de la matrice de covariance des fluctuations atomiques. Il s'agit d'une matrice  $3N \times 3N$  avec  $N$  le nombre d'atomes dans le système. A titre informatif, pour le complexe tubuline ligand atomes d'hydrogène inclus, j'obtiens une matrice  $42222 \times 42222$  et la diagonalisation nécessite plus de 16 Go de RAM.

Le peptide I19L se structure en épingle  $\beta$  au contact de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$ . Le gain d'entropie est donc important. Toutefois, l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  est 45 fois plus gros (nombre de résidus) que les peptides dérivés de la stathmine. On peut considérer que l'entropie de l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  n'est que faiblement affectée par la fixation du peptide. A défaut de calculer l'entropie du complexe, j'ai utilisé la méthode *quasiharmonic entropy* pour comparer l'entropie de chaque peptide en solution et dans le complexe avec la tubuline. La différence entre l'entropie du peptide libre et celle du peptide dans le complexe s'apparente au gain entropique apporté par la formation du complexe (Figure 72).



**Figure 72 :** Entropie des peptides libres et en complexes avec la tubuline calculée avec la méthode *quasi-harmonic entropy*. L'entropie est calculée à la température de la simulation à savoir 310 K.

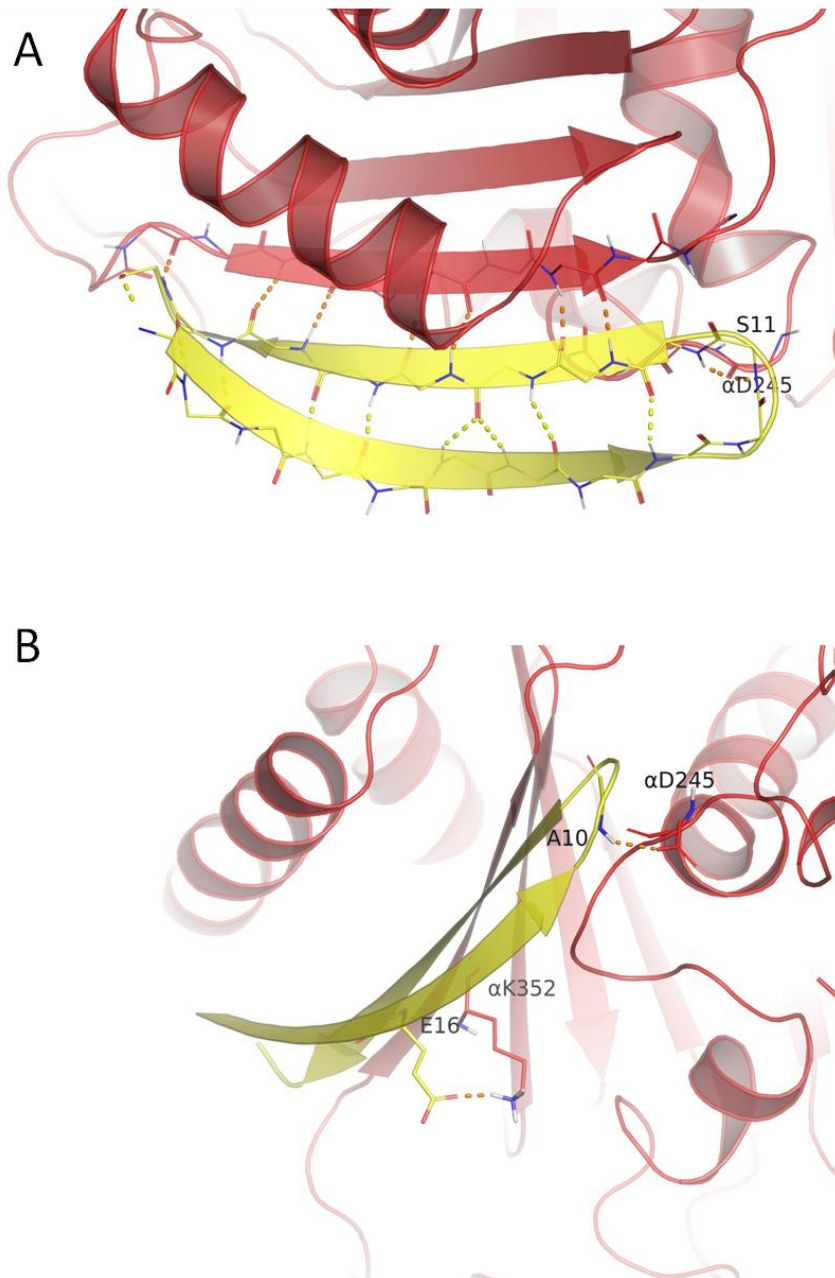
Dans le cas du peptide I19L, la structure est dans une conformation en épingle  $\beta$  au début de la simulation et la conserve tout au long des 15 ns de la trajectoire. Cela montre la stabilité de la structure en épingle  $\beta$  du peptide, même lorsqu'il est en solution. Cependant, les données RMN montrent que le peptide libre en solution n'est pas structuré en épingle  $\beta$  mais présente au contraire une amorce d'hélice  $\alpha$ . La simulation du peptide I19L ne représente donc pas son comportement observé en solution. Il en résulte que l'entropie du peptide libre est fortement sous-estimée. La simulation du peptide « linéaire » pourrait reproduire la conformation observée en RMN et améliorer la mesure de l'entropie.

Quelque soit le peptide, l'entropie est réduite entre le peptide libre et le complexe avec tubuline-peptide. D'autre part, le peptide G20G possède la plus forte entropie en solution. En revanche, on n'observe pas de différence entre les autres peptides qui portent le pont disulfure entre les résidus 4 et 16. La cyclisation du peptide par ses extrémités N- et C- terminales n'améliore pas voire dégrade l'entropie du peptide en solution et dans le complexe. Deux glycines ont été ajoutées au peptide afin de le cycliser. Il se peut que cela ajoute des contraintes stériques qui déstabilisent le peptide. On pourrait envisager de cycliser le peptide par ses extrémités N- et C-terminales en ajoutant une troisième glycine, ou bien un autre motif de stabilisation de l'épingle  $\beta$ .

### 3.3.c. Interactions tubuline-peptide

#### 3.3.c.1. I19L

On observe de nombreuses interactions au niveau des chaînes principales du peptide et de la sous-unité tubuline- $\alpha$  (Figure 73). Le peptide établit 7 liaisons hydrogène avec le brin S9 de la tubuline (Figure 73 A).

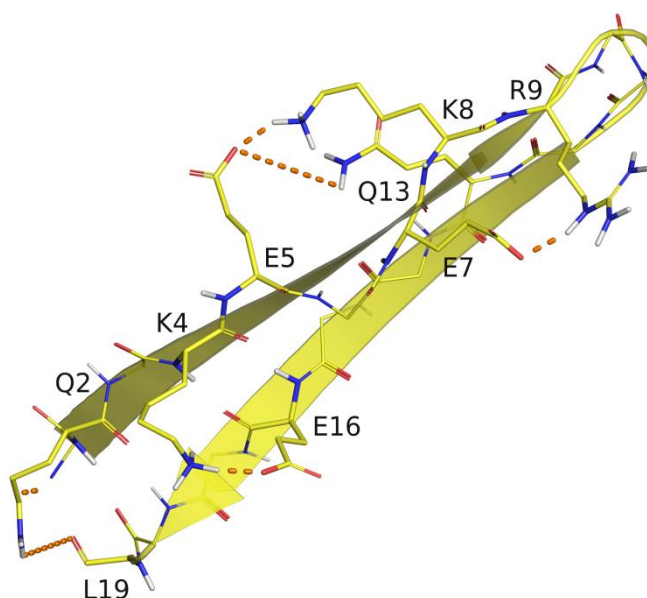


**Figure 73 :** Liaisons hydrogène entre I19L et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Les structures secondaires sont représentées en ruban rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en jaune pour le peptide I19L. (A) Les liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale du peptide sont représentées en pointillés jaunes pour les liaisons

intra-peptide et en orange pour les liaisons hydrogène avec la tubuline. (B) Liaisons hydrogène impliquant les chaînes latérales du peptide I19L.

De plus, le groupement amine du résidu S11 interagit avec le groupement carboxyle du résidu D245 (88 % de présence) de la boucle T7 de la tubuline- $\alpha$  (Figure 73 B). Ce résidu interagit également avec le résidu A10 du peptide *via* le groupement carboxyle (40 % de présence). De même, les résidus E16 du peptide et K352 (20 % de présence) de la tubuline- $\alpha$  forment un pont salin entre leur chaîne latérale (Figure 73 B). Ainsi, on observe en moyenne 9,5 liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\alpha$  et le peptide I19L.

Certains des résidus dont la chaîne latérale interagit avec la tubuline forment également des liaisons hydrogène à l'intérieur du peptide. C'est le cas du résidu R9 qui interagit avec le groupement carboxylique du résidu E7 (227 % de présence) ainsi que du résidu E16 qui interagit avec l'amine de K4 (25,5 % de présence). Par ailleurs, des liaisons hydrogène sont également formées entre les résidus E5 et K8 et entre Q2 et le groupement amine du résidu I16 (21 et 27,5 % de présence, respectivement) (Figure 74).

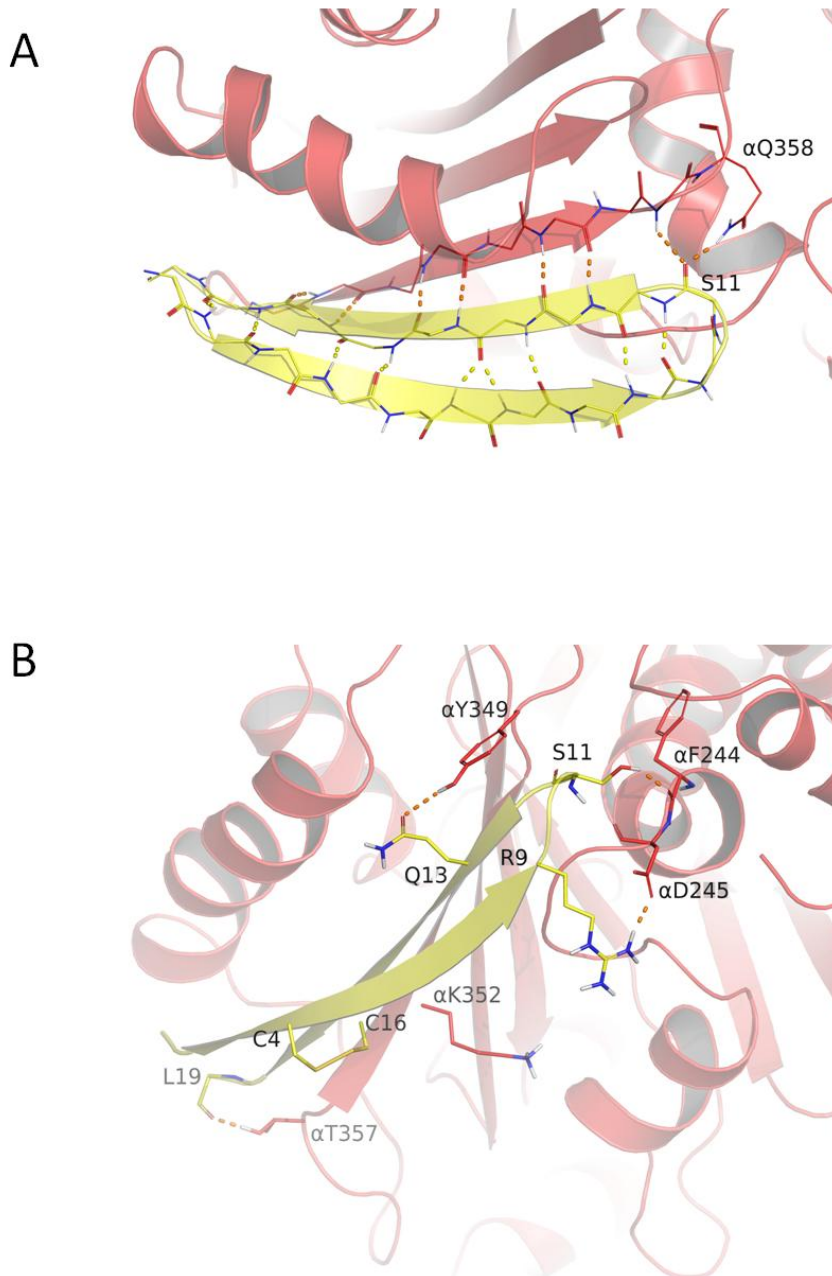


**Figure 74 :** Liaisons hydrogène intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L. La structure secondaire est représentée en ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans les liaisons hydrogène ainsi que la chaîne principale du peptide sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés jaunes.



## 3.3.c.2. I19L\_K4C\_E16C

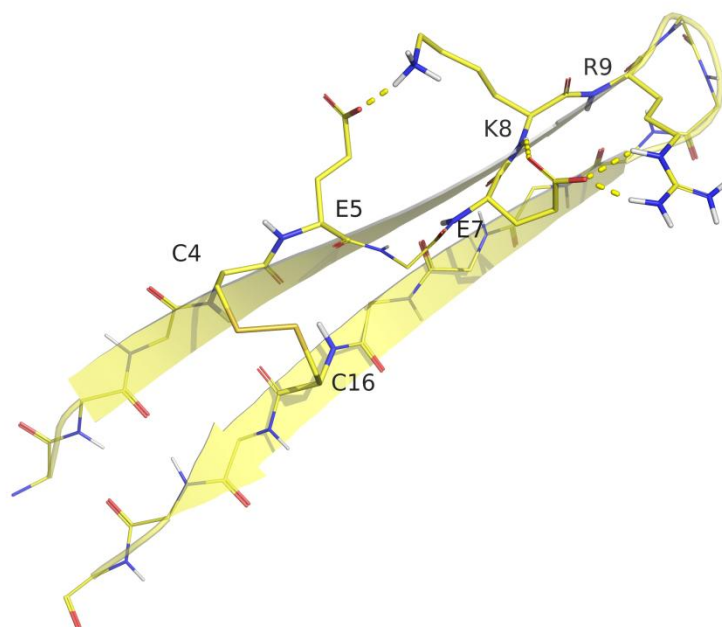
Les interactions entre les chaînes principales de la tubuline et du peptide I19L\_K4C\_E16C sont très proches de celles observées pour le peptide sauvage. La différence principale se fait au niveau du résidu S11 dont le groupement carboxyle interagit avec le groupement amine latéral du résidu Q358 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  (94 % de présence) (Figure 75 A).



**Figure 75 :** Liaisons hydrogène entre I19L\_K4C\_E16C et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Les structures secondaires sont représentées en ruban rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en jaune pour le peptide I19L. (A) Les liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale du peptide sont représentées en pointillés jaunes pour les liaisons intra-peptide et en orange pour les liaisons hydrogène avec la tubuline. (B) Liaisons hydrogène impliquant les chaînes latérales du peptide I19L\_K4C\_E16C.

Conséquence du changement de conformation du squelette du peptide, la chaîne latérale du résidu S11 interagit avec le groupement carboxylique de  $\alpha$ F244 (65% de présence) (Figure 75 B). De même, le résidu  $\alpha$ K352 ne peut plus interagir avec le groupement carboxylique du résidu 16 muté en cystéine et impliqué dans le pont disulfure (Figure 75 B). En revanche, des interactions entre les résidus R9 et  $\alpha$ D245, L19 et  $\alpha$ T349 ou encore entre Q13 et  $\alpha$ Y357 sont observées (71 et 35 et 28 % de présence, respectivement) (Figure 75 B).

Le pont disulfure entre les résidus 4 et 16 est similaire au pont salin entre du peptide sauvage, quoique plus rigide et contraint. On observe également les liaisons hydrogène entre les résidus E5 et K8 (111 % de présence) ainsi qu'entre les résidus E7 et R9 (85 % de présence). Ce dernier résidu engage le groupement amine secondaire et tertiaire de sa chaîne latérale. (Figure 76).

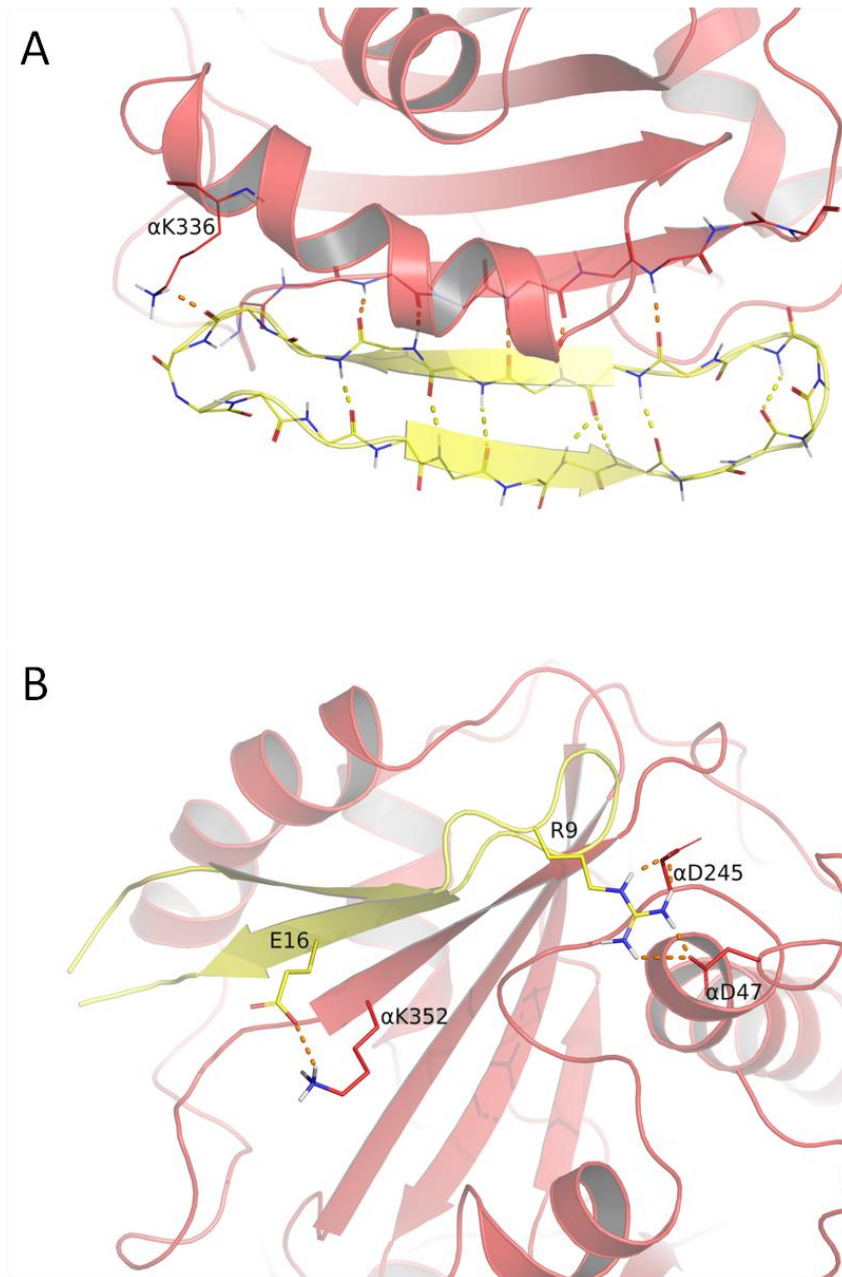


**Figure 76 :** Liaisons hydrogène intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L\_K4C\_E16C. La structure secondaire est représentée en ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans les liaisons hydrogène ainsi que la chaîne principale du peptide sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés jaunes.

Les énergies libres d'interaction entre le peptide I19L ou le peptide I19L\_K4C\_E16C et la tubuline sont proches. En moyenne, 10,4 liaisons H sont observées entre la sous-unité tubuline- $\alpha$  et le peptide I19L\_K4C\_E16C, ce qui est comparable à la moyenne dans le complexe tubuline-I19L. Ceci explique la similarité de l'énergie libre d'interaction.

## 3.3.c.3. I19L\_K4C\_E16C\_A10R

Concernant le peptide I19L\_K4C\_E16C\_A10R, la seule différence que l'on peut observer au niveau des interactions impliquant la chaîne principale et la tubuline est la présence d'une seule liaison hydrogène entre le résidu S11 et le résidu  $\alpha$ D245 (90 % de présence), absente dans le peptide I19L\_K4C\_E16C (Figure 77 A). Nous observons également dans une moindre mesure, une liaison H entre le groupement amine principal du résidu R10 avec le groupement carboxylique du résidu  $\alpha$ D245 (61 % de présence).

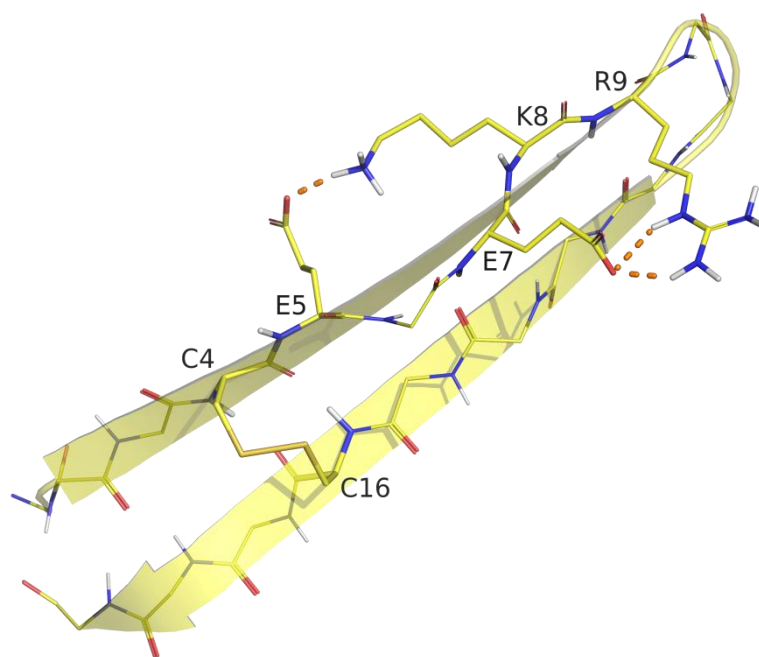


**Figure 77 :** Liaisons hydrogène entre I19L\_K4C\_E16C\_A10R et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Les structures secondaires sont représentées en ruban rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en jaune pour le peptide I19L. (A) Les liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale du peptide sont représentées en pointillés jaunes pour les

liaisons intra-peptide et en orange pour les liaisons hydrogène avec la tubuline. (B) Liaisons hydrogène impliquant les chaînes latérales du peptide I19L\_K4C\_E16C\_A10R.

Les interactions qui impliquent les chaînes latérales du peptide sont fortement réduites par la mutation A10R. En effet, la liaison hydrogène entre le résidu R9 et le résidu  $\alpha$ D245 observée dans le peptide double mutant est réduite (50 % de présence contre 71 % dans le double mutant). Au contraire, le groupement hydroxyle du résidu S11 interagit avec le groupement carboxyle du résidu  $\alpha$ F244 (95 % de présence) comme dans le peptide double mutant (Figure 77 B). Enfin, nous observons également une liaison H renforcée entre les résidus Q13 et  $\alpha$ Y357 (38 % de présence).

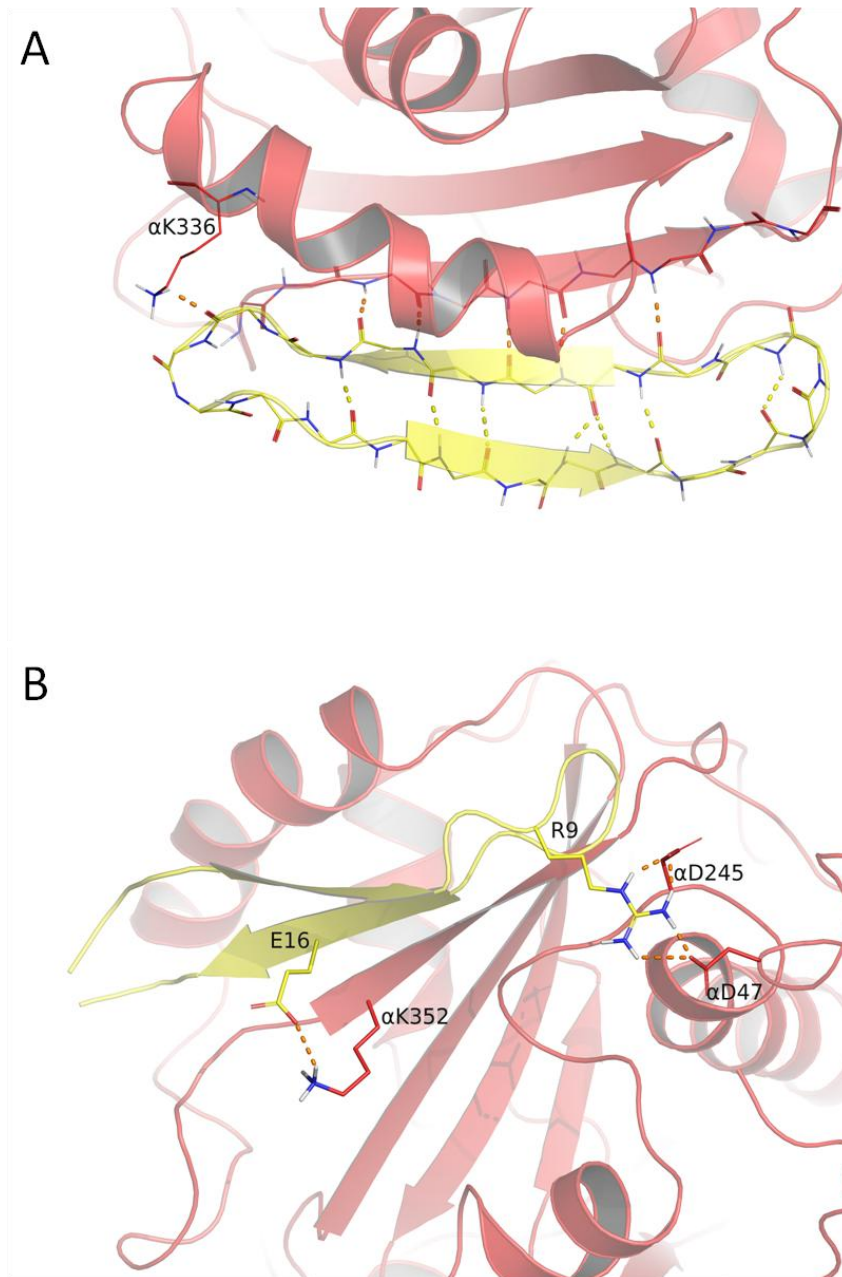
Il y a en moyenne 9,8 liaisons hydrogène entre la sous-unité tubuline- $\alpha$  et le peptide I19L\_K4C\_E16C\_A10R, ce qui est comparable au peptide sauvage et au peptide double mutant. En revanche, l'énergie libre d'interaction est diminuée pour le complexe tubuline-I19L\_K4C\_E16C\_A10R (**Tableau 8**). Cette différence peut s'expliquer par des liaisons hydrogène plus faibles comme entre les résidus R9 et  $\alpha$ D245.



**Figure 78 :** Liaisons hydrogène intra-peptide impliquant les chaînes latérales de I19L\_K4C\_E16C\_A10R. La structure secondaire est représentée en ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans les liaisons hydrogène ainsi que la chaîne principale du peptide sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés oranges.

## 3.3.c.4. G20G

La structure secondaire est perturbée par la cyclisation du peptide au niveau de ces extrémités N- et C-terminale. La longueur des brins  $\beta$  est en effet plus courte que dans le peptide I19L mais les liaisons hydrogène sont conservées dans l'ensemble (Figure 79 A). On observe également une liaison H entre la chaîne latérale du résidu  $\alpha$ K356 et le groupement carboxyle du résidu L19 du peptide. Cette liaison H est dans 55% des structures de la trajectoire stabilisées alors qu'elle n'est pas présente dans les autres peptides.

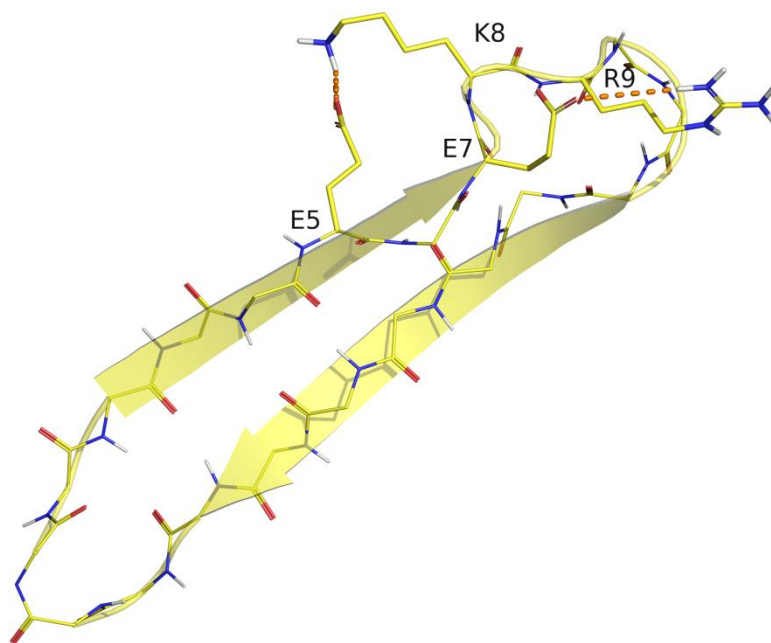


**Figure 79 :** Liaisons hydrogène entre G20G et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Les structures secondaires sont représentées en ruban rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en jaune pour le peptide G20G. (A) Les liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale du peptide sont représentées en pointillés jaunes pour les liaisons

intra-peptide et en orange pour les liaisons hydrogène avec la tubuline. (B) Liaisons hydrogène impliquant les chaînes latérales du peptide G20G.

Par ailleurs, on retrouve le pont salin entre le résidu E16 du peptide et K352 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  bien qu'il soit moins présent que dans le peptide I19L (7% de présence contre 20% dans le peptide sauvage). On observe une interaction entre plusieurs groupements amines du résidu R9 et le résidu  $\alpha$ D245. Le peptide G20G a une interaction favorable avec l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  et je propose que les interactions entre R9 et  $\alpha$ D245 participent de façon plus significative à la réduction de cette énergie libre d'interaction (**Tableau 8**).

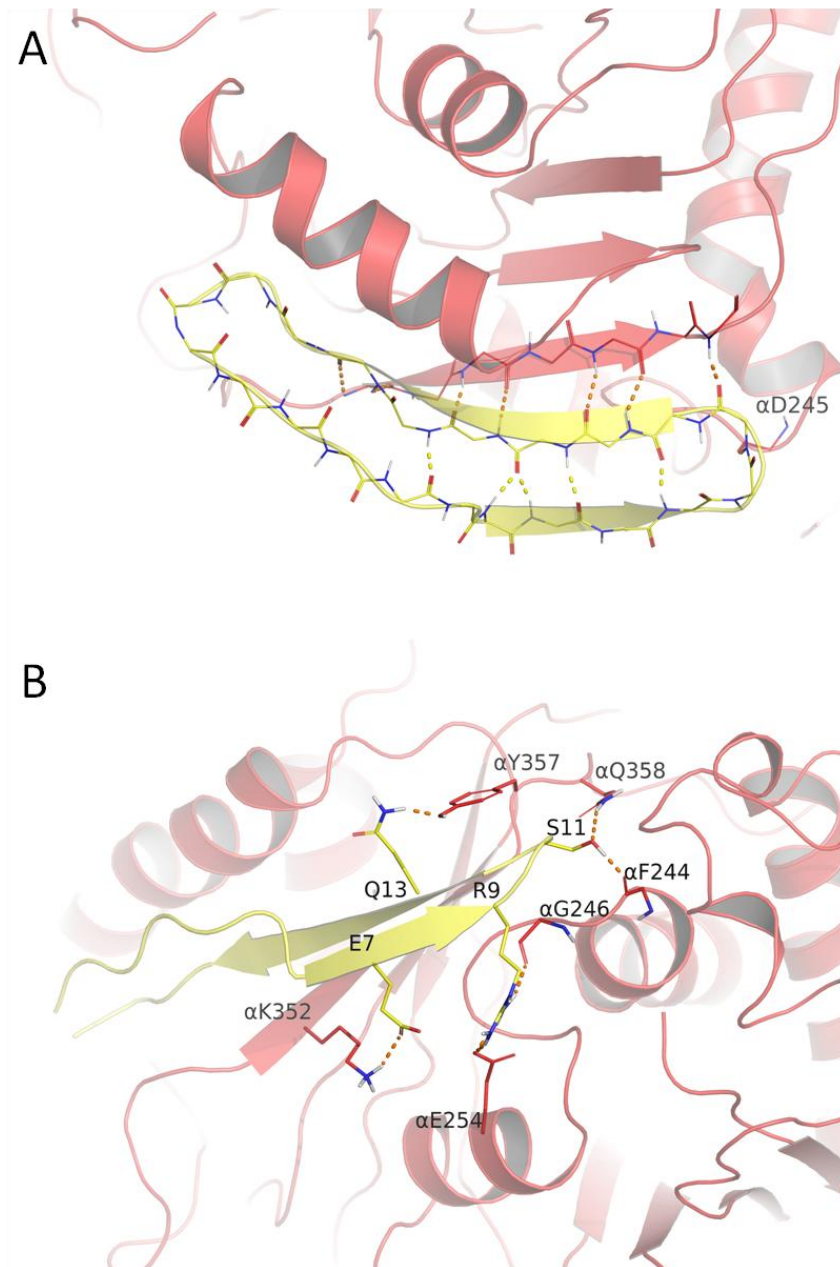
Le pont salin entre E16 et  $\alpha$ K352 réduit l'interaction intra-peptide avec le résidu K4 (8% de présence uniquement). Les résidus K8 et R9 engagent également leur chaîne latérale dans des liaisons H avec les résidus E5 (33% de présence) et E7 (61% de présence) respectivement (Figure 80).



**Figure 80** : Liaisons hydrogène intra-peptide impliquant les chaînes latérales de G20G La structure secondaire est représentée en ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans les liaisons hydrogène ainsi que la chaîne principale du peptide sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés oranges.

## 3.3.c.5. G20G\_K4C\_E16C

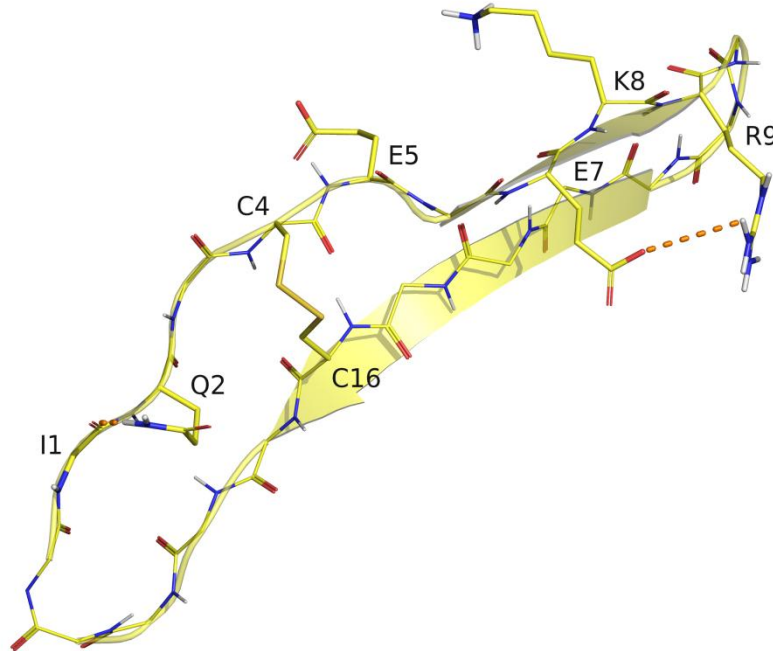
Ce dernier peptide présente l'énergie d'interaction la plus favorable. Le pont disulfure ainsi que la cyclisation au niveau des extrémités modifient la structure des brins  $\beta$  qui se trouve fortement réduite (Figure 70) de même que le nombre de liaisons hydrogène qui stabilisent cette structure (Figure 81 A).



**Figure 81 :** Liaisons hydrogène entre G20G\_K4C\_E16C et la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Les structures secondaires sont représentées en ruban rouge pour la sous-unité tubuline- $\alpha$  et en jaune pour le peptide G20G. (A) Les liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale du peptide sont représentées en pointillés jaunes pour les liaisons intra-peptide et en orange pour les liaisons hydrogène avec la tubuline. (B) Liaisons hydrogène impliquant les chaînes latérales du peptide G20G\_K4C\_E16C.

En revanche, de nombreuses liaisons hydrogène se forment entre le peptide et la sous-unité tubuline- $\alpha$  (Figure 81 B). Tout d'abord, le résidu R9 établit plus d'une liaison hydrogène (122 % de présence) avec le résidu  $\alpha$ E254 impliqué dans l'interaction avec le nucléotide du site E dans le protofilament. Il interagit également avec le groupement carboxyle du résidu G246 de la boucle T7 de la sous-unité tubuline- $\alpha$  (88 % de présence). La sérine S11 participe également à plusieurs liaisons hydrogène avec la chaîne latérale des résidus  $\alpha$ Q358 et  $\alpha$ N356 (82 et 47% de présence respectivement). Des interactions polaires sont également présentes entre Q13 et  $\alpha$ Y357 (48 % de présence) et dans une moindre mesure entre E7 et K352, (26,5 % de présence).

Les interactions qui impliquent la chaîne principale des résidus G20G\_K4C\_E16C sont moins nombreuses que dans les autres peptides. Seulement trois liaisons hydrogène sont partiellement observées entre les résidus I1 et Q2 (25,5 % de présence), E7 et R9 (35 % de présence) et enfin E5 et K8 (52,5 % de présence) (Figure 82). Cette dernière interaction polaire n'est d'ailleurs pas observée dans la structure moyenne.



**Figure 82 :** Liaisons hydrogène intra-peptide impliquant les chaînes latérales de G20G\_K4C\_E16C La structure secondaire est représentée en ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans les liaisons hydrogène ainsi que la chaîne principale du peptide sont représentés en bâtonnets. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés oranges.

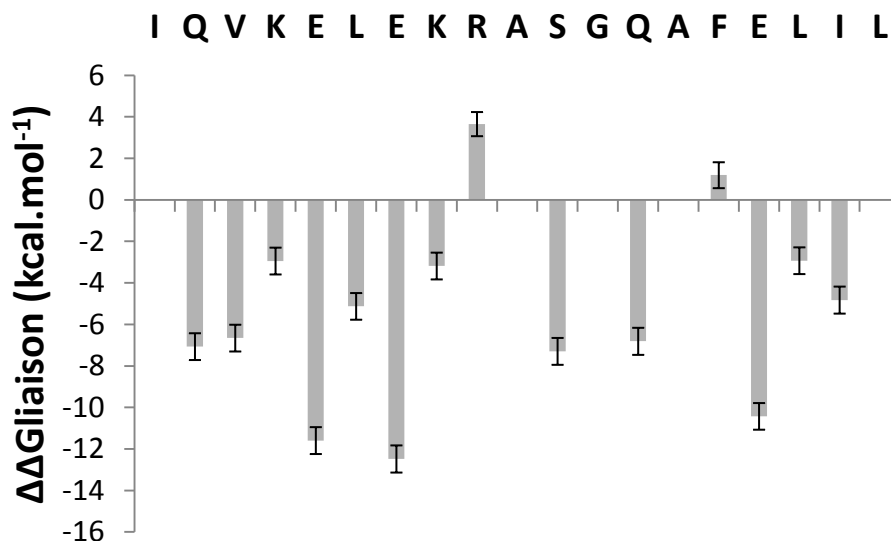


Il y a en moyenne 14 liaisons hydrogène formées entre le peptide G20G\_K4C\_E16C et la sous-unité tubuline- $\alpha$  au cours de la trajectoire stabilisée, ce qui est significativement plus important que pour les autres peptides. Ces nombreuses liaisons H expliquent l'énergie d'interaction aussi favorable du complexe tubuline-G20G\_K4C\_E16C.

L'analyse détaillée des interactions polaires dans le complexe tubuline-peptide apporte des informations supplémentaires aux mesures de l'énergie libre d'interaction et de l'entropie du peptide. La présence du pont disulfure réduit l'entropie. La cyclisation du peptide au niveau des extrémités N- et C-terminal augmente les interactions possibles. Le peptide G20G\_K4C\_E16C offre une base intéressante pour le développement de nouveaux peptides optimisés pour augmenter les interactions avec la tubuline.

### 3.4. *Computational Alanine Scanning*

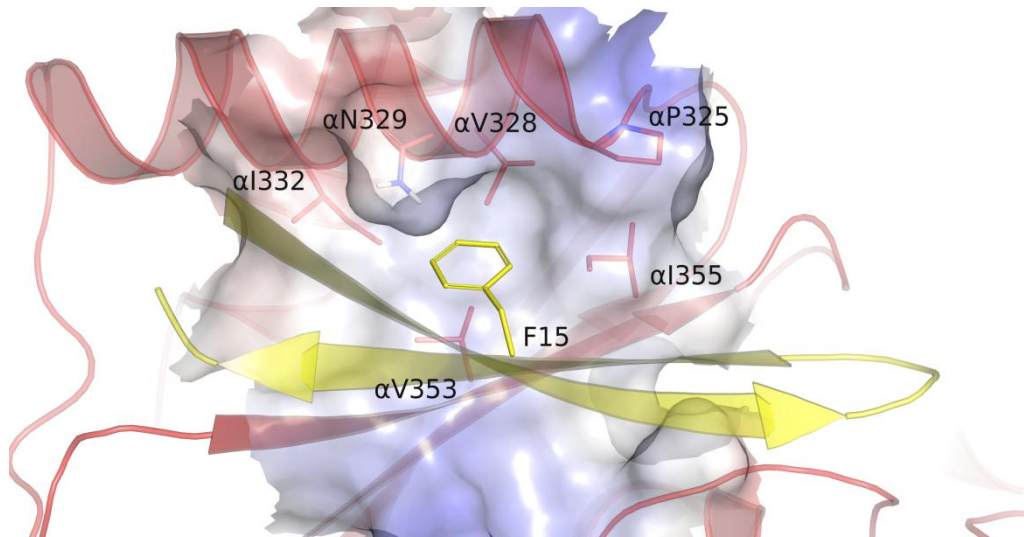
J'ai réalisé une mutagenèse systématique des résidus du peptide I19L en alanine. Par la suite, j'ai calculé l'énergie libre d'interaction relative entre les complexes tubuline-I19L et les complexes tubuline I19L mutés en alanine (Figure 83).



**Figure 83** : Énergie libre de liaison relative entre le complexe tubuline-I19L et les complexes tubuline-I19L mutés. Les barres d'erreur représentent l'erreur type. Une valeur négative de  $\Delta\Delta G$  indique que la mutation est favorable et inversement, une valeur positive une mutation défavorable à l'interaction tubuline-peptide.

Les résidus R9 et F15 ont tous les deux des valeurs positives ce qui suggèrent qu'ils sont importants pour l'interaction avec la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Nous avons vu précédemment que le résidu R9 engage sa chaîne latérale dans des liaisons H avec la sous-unité tubuline- $\alpha$  et notamment le résidu  $\alpha$ D245. De plus, la position 9 est conservée dans toutes les protéines de la famille de la stathmine sauf la protéine RB3 (Figure 64) dont un des peptides issu du domaine SLD présente une activité d'inhibition moins importante [143].

Par ailleurs, la phénylalanine F15 s'insère dans un groupe de résidus hydrophobes (Figure 84). Le peptide I19L couvre une surface hydrophobe en se fixant sur la tubuline- $\alpha$  comme cela a été décrit dans l'article de Clément et coll. [143]. Ces résultats confirment les propositions faites à partir des données RMN obtenues au laboratoire.



**Figure 84** : Environnement hydrophobe du résidu F15 du peptide I19L.

Nous observons également que le  $\Delta\Delta G_{\text{liaison}}$  est le plus faible pour les résidus chargés négativement : E5, E7 et E16. Pourtant, le résidu E16 peut former un pont salin avec la lysine  $\alpha$ K352 de la tubuline (Figure 73 B et Figure 79 B) tandis que les autres résidus glutamate participent aux interactions intra-peptide. Toutefois, les résidus chargés sont plus sensibles au manque de précision des effets électrostatiques et de la solvation modélisés par la fonction d'énergie. La méthode est ainsi moins fiable pour les résidus chargés que pour les résidus aromatiques ou hydrophobes.

La méthode CAS présente certaines limitations. Tout d'abord, chaque structure de la trajectoire est mutée au niveau du résidu d'intérêt et on assume que les complexes protéines-peptides liés ou non liés ont la même conformation, ce que l'on sait ne pas être le cas du peptide I19L. De plus, aucune dynamique moléculaire ou minimisation n'est effectuée pour réarranger les chaînes latérales et optimiser les liaisons polaires et hydrophobes. Enfin, l'entropie n'est pas prise en compte dans ces calculs pour les

raisons explicitées ci-dessus (Chapitre III.3.3.b). Enfin, l'analyse est effectuée en solvant implicite et donc ne prend pas en compte l'effet de molécule d'eau passerelle entre deux résidus polaires ou chargés.

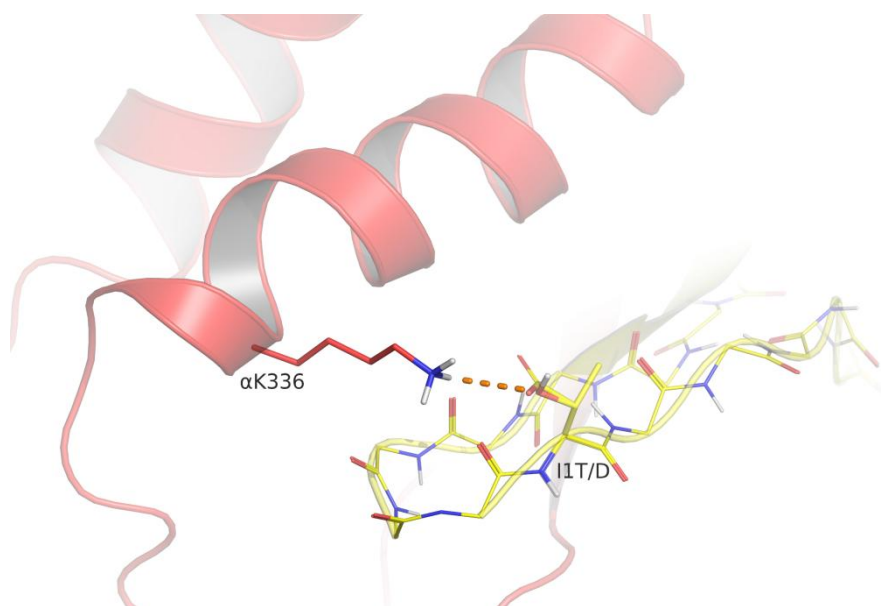
Dans cette étude, l'analyse CAS apporte des informations supplémentaires sur les résidus importants dans l'interaction avec la tubuline. En m'appuyant sur les interactions dans le complexe tubuline-I19L et les données RMN obtenues au laboratoire, je conclus que les résidus R9 et F15 ne doivent pas être modifiés afin de conserver l'affinité.

### ***3.5. Proposition de nouveaux peptides mutants***

A partir de la structure moyenne du complexe tubuline-G20G\_K4C\_E16C et des données de l'analyse CAS, je peux proposer plusieurs mutations qui pourraient augmenter les interactions avec la sous-unité tubuline- $\alpha$ .

#### **3.5.a. Mutations I1T ou I1D**

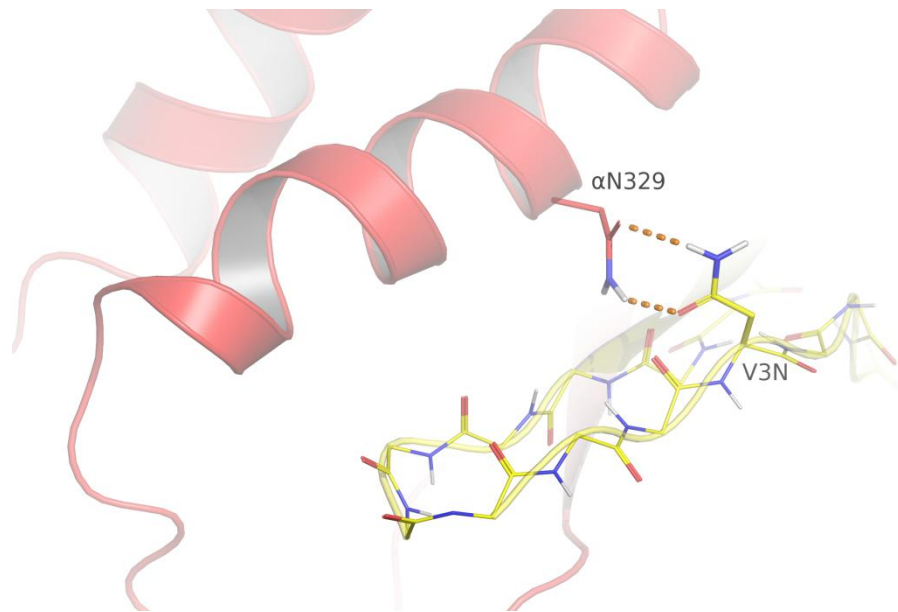
La position 1 dans le peptide est proche du résidu  $\alpha$ K336 de la sous-unité tubuline- $\alpha$ . Cette lysine participe à des liaisons hydrogène avec le groupement carboxyle du résidu G20 (10% de présence). Une mutation du résidu hydrophobe du peptide en un résidu polaire ou chargé permettrait la formation d'interactions électrostatiques supplémentaires (Figure 85).



**Figure 85 :** Interaction potentielle après les mutations I1T ou I1D. La sous-unité tubuline- $\alpha$  est représentée en ruban rouge et le peptide en ruban jaune. La chaîne principale du peptide est représentée en fil de fer et la chaîne latérale des résidus d'intérêts en bâtonnets.

### 3.5.b. Mutation V3N

Dans la structure moyenne du complexe tubuline-G20G\_K4C\_E16C, le résidu  $\alpha$ N329 est proche de la chaîne principale du peptide avec laquelle il s'engage dans des liaisons hydrogène (26,5% de présence avec le résidu Q2). Il se trouve également à proximité du résidu V3. La mutation V3N pourrait former deux liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du résidu  $\alpha$ N329 (Figure 86).



**Figure 86 :** Interactions potentielles après les mutations V3N. La sous-unité tubuline- $\alpha$  est représentée en ruban rouge et le peptide en ruban jaune. La chaîne principale du peptide est représentée en fil de fer et la chaîne latérale des résidus d'intérêts en bâtonnets.

Ces deux mutations pourraient être réalisées en même temps sans pour autant que l'on attende une réduction de leur effet. Ainsi, trois nouvelles liaisons hydrogène pourraient être formées augmentant l'enthalpie de 3,5 à 11  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Ces propositions s'appuient sur les observations effectuées sur la structure moyenne du complexe. Des simulations d'amarrage protéine-protéine dans un premier temps puis de dynamique moléculaire permettront de les valider ou des les invalider informatiquement.

### **3.6. Conclusion**

La stathmine est une phosphoprotéine qui séquestre la tubuline déstabilisant le réseau de microtubule et est surexprimée dans certaines cellules tumorales. Elle a d'ailleurs été proposée comme marqueur de mauvais pronostic dans certains cancers [147]. Le peptide I19L issu de la partie N-terminale de la stathmine possède une activité intrinsèque de déstabilisation des microtubules. En effet, il se structure en épingle  $\beta$  au contact de l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  et empêche son addition dans le microtubule. La détermination de la structure du peptide I19L par RMN a ouvert une nouvelle voie pour le développement de molécules dérivées des protéines et interférant avec le microtubule.

Dans ce contexte, nous avons cherché à optimiser les interactions du peptide I19L avec la tubuline en proposant des peptides dont la structure en épingle  $\beta$  seraient conservée en solution. Dans

cette optique, quatre peptides cycliques ont été proposés puis étudiés seuls et en interaction avec l'hétérodimère de tubuline- $\alpha\beta$  par dynamique moléculaire.

Le peptide G20G\_K4C\_E16C possède l'énergie libre de liaison la plus basse indiquant une meilleure affinité pour la tubuline que les autres peptides. L'analyse *quasiharmonic entropy* indique que les peptides possédant un pont disulfure ont l'entropie la plus basse. Ce peptide constitue une base sur laquelle d'autres mutations pourront être ajoutées pour augmenter les interactions polaires ou hydrophobes avec la sous-unité tubuline- $\alpha$ . A ce titre, l'analyse CAS nous a permis d'identifier deux résidus particulièrement importants : R9 et F15 pour diriger les propositions de mutations.

Des critiques peuvent être apportées aux calculs. Dans un premier temps, la taille du système ne nous a pas permis de calculer l'entropie des complexes tubuline-peptide ni de la tubuline. Une puissance de calcul plus importante aurait permis d'utiliser la méthode des modes normaux ou bien la méthode *quasiharmonic entropy*. L'utilisation de trois trajectoires augmente la précision du calcul l'énergie libre de liaisons notamment au niveau de l'entropie. Dans cette étude je n'ai pas calculé l'entropie donc l'utilisation d'une seule trajectoire pour l'évaluation de l'enthalpie est suffisante. D'autres approches pourraient être utilisées pour estimer l'énergie d'interaction telle que l'*umbrella sampling* ou encore l'intégration thermodynamique. Ces deux méthodes nécessitent d'effectuer plusieurs simulations de chaque complexe dans lesquelles une variable collective comme la distance entre les centres de masse du récepteur et du ligand est appliquée. Ces approches permettent d'obtenir des valeurs précises d'énergie libre de liaison mais sont d'autant plus coûteuse en temps de calcul.

De nouvelles dynamiques moléculaires pourront être effectuées pour simuler les complexes tubuline-G20G\_K4C\_E16C\_I1N et -G20G\_K4C\_E16C\_V2Q. Par la suite, l'énergie d'interaction de ces complexes pourra être calculée avec la méthode MM/PB(GB)SA. Par ailleurs, d'autres simulations pourront être réalisées afin d'étudier les mécanismes de la régulation de l'activité de la stathmine par la phosphorylation sur la sérine S16 de la stathmine (S12 dans le peptide I19L).

En parallèle, le peptide G20G\_K4C\_E16C pourra être synthétisé afin d'étudier son interaction avec la tubuline *in vitro*, sa structure par RMN ou encore mesurer les paramètres thermodynamiques du peptide par calorimétrie de titration isotherme. De nombreux travaux font état de la macrocyclisation de peptides ou de depsipeptides (peptide dont la chaîne principale peut contenir des éthers) les combinaisons « tête-à-queue » ou chaîne latérale à chaîne latérales étant les plus courantes (revue dans [148]). La cyclisation peut se faire de manière chimique ou bien être catalysée par des enzymes. Par

ailleurs, la formation d'une liaison disulfure intra-peptide sera *a priori* facilitée dans un peptide cyclique. Les informations obtenues par les expériences *in vitro* permettront de confirmer ou d'infirmer les hypothèses présentées ici et serviront dans les deux cas à diriger les nouvelles simulations.





# Conclusion Générale

---

Durant ces trois années de thèse, le travail effectué a porté sur l'étude par modélisation moléculaire de complexes tubuline-ligand. Le microtubule est un polymère de tubuline- $\alpha\beta$  qui joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires. Il est notamment impliqué dans la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire, ce qui fait de la tubuline- $\alpha\beta$  une cible dans les traitements contre le cancer. Cependant, les études structurales de la tubuline- $\alpha\beta$  sont rendues difficiles de par sa taille (90 kDa) ainsi que son agrégation à forte concentration. Par conséquent, les seules structures atomiques 3D disponibles à l'heure actuelle représentent la tubuline- $\alpha\beta$  en protofilaments antiparallèles ou bien en structure courbée par un partenaire protéique.

Des méthodes *in silico* telles que la dynamique moléculaire ont permis d'étudier à l'échelle atomique les interactions entre la tubuline et des nucléotides, des inhibiteurs de la polymérisation ainsi que des peptides cycliques afin d'en comprendre les effets sur la tubuline et les microtubules.

L'hydrolyse du nucléotide GTP localisé dans le site E de la tubuline favorise la déstabilisation des microtubules. Ainsi, il est supposé qu'elle induit un changement de la conformation ou de la flexibilité de la tubuline. Cependant, les mécanismes de l'hydrolyse du GTP et les effets des différents états de nucléotides dans le site E, sur la structure de la tubuline ne sont pas totalement élucidés.

C'est pourquoi nous avons réalisé des simulations de dynamiques moléculaires d'hétérotrimères de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  en présence de différents nucléotides dans le site E :  $\text{GTP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{GDP}\cdot\text{Pi}\cdot\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{GDP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  et GDP. L'hétérotrimère de tubuline- $\alpha\beta\alpha$  permet de représenter correctement les interactions longitudinales qui ont lieu dans le microtubule et qui sont requises pour permettre l'hydrolyse du GTP.

La comparaison du site E des différents systèmes a permis d'identifier des résidus importants pour la coordination du magnésium catalytique et la stabilisation du nucléotide. Ainsi, nous observons que le résidu  $\alpha\text{E}254$  participe à la coordination du GTP dans tous les systèmes et le résidu  $\beta\text{E}69$  dans les systèmes en présence de  $\text{P}\gamma$  ou de  $\text{P}\text{i}$ . Ces observations confirment la proposition faite par Löwe et coll. selon laquelle le résidu  $\alpha\text{E}254$  participe à l'hydrolyse du GTP et le résidu  $\beta\text{E}69$  à la coordination du  $\text{Mg}^{2+}$  [31]. Enfin, dans tous les systèmes le résidu  $\beta\text{T}143$  participe à la stabilisation du nucléotide *via* des liaisons hydrogène avec les phosphates  $\text{P}\gamma$  et  $\text{P}\beta$ . Or, une étude de mutagenèse dirigée a montré que la mutation T143G réduit l'affinité du nucléotide et entraîne la mort cellulaire [110]. En revanche, ces résultats ne sont pas en accord avec la description sites de fixation des nucléotides dans les structures sT2R [34]. Ces structures cristallographiques ont été publiées en octobre 2011 durant la rédaction du manuscrit. Elles représentent deux hétérodimères de tubuline- $\alpha\beta$  séquestrés par le domaine SLD de la protéine RB3. Ce partenaire de la tubuline courbe les deux hétérodimères et affectent donc les contacts

aux interfaces intra- et inter-dimères. Au contraire, nos systèmes représentent les interactions longitudinales telles qu'elles ont lieu dans le microtubule.

Nous observons un changement de structure au niveau des interfaces latérales et plus précisément de la boucle N de la sous-unité tubuline- $\alpha$  et de la boucle M de la sous-unité  $\beta$ . Dans les deux cas, ces boucles se rapprochent du cœur de la tubuline une fois que le nucléotide est hydrolysé. Ainsi, les contacts avec les protofilaments adjacents sont potentiellement réduits. Cette conclusion est en accord avec deux études de modélisation moléculaires du complexe tubuline-Taxol et tubuline-dinitroaniline [53, 54]. Enfin, la mesure du nombre de liaisons hydrogène et de la surface de contacts aux interfaces suggèrent un réarrangement dans l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$  pour augmenter les interactions intra-dimères.

Ces observations contribuent donc à la compréhension des effets des nucléotides sur la tubuline. Les modifications des interfaces latérales et leur effet potentiel sur la déstabilisation du microtubule à la suite de l'hydrolyse sont des arguments du modèle *lattice*. Les structures moyennes des différents systèmes nous apportent une vision de l'état initial, intermédiaire et final du nucléotide dans le site E qui pourra être utilisé dans des calculs de mécanique quantique couplée à la mécanique moléculaire (QM/MM) pour étudier les ruptures de liaisons et l'échange de proton qui ont lieu durant l'hydrolyse du GTP. De nouvelles simulations pourront être réalisées à partir des récentes structures cristallographiques représentant l'état non-hydrolysé du nucléotide dans le site E.

Des expériences menées au laboratoire ont montré une inhibition de la division cellulaire par la colchicine et le carbendazime de manière synergique. Il a été montré que le carbendazime interagissait avec la colchicine dans la sous-unité tubuline- $\beta$ . Ces informations confirment que les deux molécules possèdent des sites de fixation distincts, le site du carbendazime restant toutefois inconnu. De ces informations est née l'idée de construire une molécule hybride, constitué d'un noyau colchicine et d'un noyau carbendazime et possédant l'activité synergique des deux noyaux. De cette manière, une dose inférieure serait nécessaire pour obtenir le même effet que la colchicine seule, ce qui permettrait de réduire la toxicité de la molécule.

Nous avons réalisé un amarrage moléculaire en utilisant les données de mutagenèse recueillies dans la littérature et les contraintes RMN obtenues au laboratoire [132]. Un site de fixation du carbendazime a ainsi été prédit puis testé par dynamique moléculaire, en présence et en absence de colchicine. L'analyse du RMSF des  $C\alpha$  montre que la colchicine et le carbendazime réduisent la fluctuation de la tubuline de manière synergique. Ces informations sont donc en accords avec les tests

cellulaires. A partir de la structure moyenne du complexe tubuline-colchicine-carbendazime, plusieurs linkers ont été dessinés. Ces linkers devaient permettre la fixation des deux noyaux dans leur poche respective en réduisant le plus possible les degrés de liberté. Les contraintes imposées par notre volonté de synthétiser une molécule hybride a influencé le design du linker. Au total, quatre molécules ont été simulées en complexe avec la tubuline. La mesure des énergies d'interaction a permis de classer ces molécules. Malgré une énergie d'interaction la moins favorable des quatre molécules, c'est l'hybride CLC contenant le *linker* aliphatique qui a été sélectionné pour les études expérimentales et ce afin de simplifier la synthèse.

La première tentative de synthèse a échoué lors de la dernière étape. Ensuite l'oxygène du groupement cétone du carbendazime a été remplacé par un carbone menant cette fois à une synthèse complète. Au final, deux produits subsistaient lors des tests cellulaires. La molécule hybride CLC est active pour stopper le cycle cellulaire des cellules HeLa en culture. A des concentrations supérieures à 100 nM, le réseau de microtubules est détruit. En dessous de 100 nM, l'activité n'apparaît que 48 H après l'exposition des cellules à la molécule. Des expériences de RMN montrent en outre que les deux moitiés de cet hybride interagissent avec la tubuline. Ces résultats expérimentaux sont encourageants. De nouvelles molécules avec des linkers aliphatiques plus courts devraient être synthétisées. Du point de vue *in silico*, la poursuite des simulations permettra d'améliorer la précision des interactions entre les molécules hybrides et la tubuline.

Ces travaux présentent donc une approche de modélisation moléculaire qui s'apparente au fragment-based drug design et s'appuie sur des données expérimentales. Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, cette étude s'inscrit dans le cadre d'une nouvelle stratégie de développement de molécule thérapeutique. A ce titre, d'autres *linkers* vont être construits et de nouvelles molécules seront synthétisées pour obtenir plus d'information sur la fixation des molécules hybrides. De plus, de nombreuses molécules se fixent dans la poche de la colchicine et pourraient potentiellement servir de noyau pour d'autres molécules hybrides. De la même manière, le noyau carbendazime pourrait être fonctionnalisé pour optimiser les interactions avec la tubuline.

Enfin, des expériences réalisées au laboratoire ont prouvé que le peptide I19L, de la partie N-terminale de la stathmine se fixe sur la sous-unité tubuline- $\alpha$  et empêche la polymérisation du microtubule [143]. Les données RMN de cette étude montrent que le peptide non structuré en solution, se replie en épingle  $\beta$  au contact de la tubuline. Nous avons cherché à optimiser ce peptide afin de réduire le coût entropique associé au repliement en épingle  $\beta$  et donc augmenter son affinité pour la tubuline.

Deux approches de cyclisation de peptides ont été proposées : la mutation de résidus en cystéines pour former ensuite un pont disulfure et l'ajout de deux glycines aux extrémités N- et C-terminales, reliées par une liaison peptidique. Au total, quatre peptides ont été construits à partir de la structure d'I19L. Chaque peptide a été simulé par dynamique moléculaire, seul et en complexe avec la tubuline- $\alpha\beta$ . Par la suite, nous avons réalisé une mesure de l'énergie libre de liaison de chaque peptide. Nous avons également comparé l'entropie des peptides seuls et en complexes avec la tubuline pour connaître quels étaient les peptides les plus stables en solution et en complexe avec la tubuline. Pour ces deux analyses, le meilleur peptide G20G\_K4C\_E16C porte à la fois un pont disulfure entre les résidus 4 et 16 et une liaison peptide entre le dernier et le premier résidu. Ces résultats nous confortent dans l'idée que l'on peut augmenter l'affinité des peptides en réduisant leur entropie. Une analyse de criblage informatique à l'alanine nous a permis d'identifier certains résidus importants pour l'interaction avec la tubuline et après une inspection précise de la structure des peptides et de leurs interactions avec la tubuline, deux mutations ont été proposées pour améliorer les interactions entre G20G\_K4C\_E16C et la tubuline.

Cette étude s'insère dans la continuité des expériences biologiques et de RMN et dans la perspective de développer des molécules inhibitrices à des fins de recherches fondamentales voire une nouvelle stratégie de peptides antimétaboliques. En s'appuyant sur les données structurales, la modélisation moléculaire a permis d'évaluer deux approches de cyclisation et d'optimiser l'interaction.

En conclusion, durant ces trois années de thèse nous avons utilisé la modélisation moléculaire pour étudier les interactions entre la tubuline et ses partenaires dans le but de contribuer aux connaissances fondamentales mais également dans une perspective de développement de nouvelles molécules inhibitrices.



# Bibliographie

---

1. Chretien, D.R.H. Wade, *New data on the microtubule surface lattice*. Biol Cell, 1991. **71**(1-2): p. 161-74.
2. Amos, L.A., *The microtubule lattice--20 years on*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(2): p. 48-51.
3. Mandelkow, E., Y.H. Song, et E.M. Mandelkow, *The microtubule lattice--dynamic instability of concepts*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(7): p. 262-6.
4. Allen, C.G.G. Borisy, *Structural polarity and directional growth of microtubules of Chlamydomonas flagella*. J Mol Biol, 1974. **90**(2): p. 381-402.
5. Wade, R.H.A.A. Hyman, *Microtubule structure and dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(1): p. 12-7.
6. Inoue, S.E.D. Salmon, *Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(12): p. 1619-40.
7. Walker, R.A., E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, et E.D. Salmon, *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1437-48.
8. Moritz, M., M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, B. Alberts, et D.A. Agard, *Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 638-40.
9. Mandelkow, E.M., E. Mandelkow, et R.A. Milligan, *Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study*. J Cell Biol, 1991. **114**(5): p. 977-91.
10. Chretien, D., S.D. Fuller, et E. Karsenti, *Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates*. J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1311-28.
11. Vitre, B., F.M. Coquelle, C. Heichette, C. Garnier, D. Chretien, et I. Arnal, *EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(4): p. 415-21.
12. Tran, P.T., P. Joshi, et E.D. Salmon, *How tubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules*. J Struct Biol, 1997. **118**(2): p. 107-18.
13. Melki, R., M.F. Carlier, D. Pantaloni, et S.N. Timasheff, *Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies*. Biochemistry, 1989. **28**(23): p. 9143-52.
14. Kirshner, B.J., R.R. Dies, et R.A. Brown, *Effects of experimental manipulation of self-disclosure on group cohesiveness*. J Consult Clin Psychol, 1978. **46**(6): p. 1171-7.
15. Mejillano, M.R., J.S. Barton, et R.H. Himes, *Stabilization of microtubules by GTP analogues*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **166**(2): p. 653-60.
16. Carlier, M.F.D. Pantaloni, *Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization*. Biochemistry, 1981. **20**(7): p. 1918-24.
17. Caplow, M.J. Shanks, *Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(4): p. 663-75.
18. Carlier, M.F., D. Didry, R. Melki, M. Chabre, et D. Pantaloni, *Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium*. Biochemistry, 1988. **27**(10): p. 3555-9.
19. Caplow, M.L. Fee, *Concerning the chemical nature of tubulin subunits that cap and stabilize microtubules*. Biochemistry, 2003. **42**(7): p. 2122-6.
20. Caplow, M., R. Ruhlen, J. Shanks, R.A. Walker, et E.D. Salmon, *Stabilization of microtubules by tubulin-GDP-Pi subunits*. Biochemistry, 1989. **28**(20): p. 8136-41.
21. Caplow, M.J. Shanks, *Microtubule dynamic instability does not result from stabilization of microtubules by tubulin-GDP-Pi subunits*. Biochemistry, 1998. **37**(37): p. 12994-3002.
22. Janosi, I.M., D. Chretien, et H. Flyvbjerg, *Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state*. Biophys J, 2002. **83**(3): p. 1317-30.
23. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, et P. Walter, *Molecular Biology of the Cell* 2007: Garland Science.
24. Krauhs, E., M. Little, T. Kempf, R. Hofer-Warbinek, W. Ade, et H. Ponstingl, *Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4156-60.



25. Ponstingl, H., E. Krauhs, M. Little, et T. Kempf, *Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(5): p. 2757-61.
26. Ludueña, R.F.A. Banerjee, *The Isoypes of Tubulin. The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, T. Fojo, Editor 2008, Humana Press. p. 123-175.
27. Huzil, J.T., K. Chen, L. Kurgan, et J.A. Tuszynski, *The roles of beta-tubulin mutations and isotype expression in acquired drug resistance*. Cancer Inform, 2007. **3**: p. 159-81.
28. Seve, P., T. Reiman, et C. Dumontet, *The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2010. **67**(2): p. 136-43.
29. Tang, S.C., *Predictive markers of tubulin-targeting agents in breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2008. **8 Suppl 2**: p. S79-84.
30. Nogales, E., S.G. Wolf, et K.H. Downing, *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography*. Nature, 1998. **391**(6663): p. 199-203.
31. Lowe, J., H. Li, K.H. Downing, et E. Nogales, *Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution*. J Mol Biol, 2001. **313**(5): p. 1045-57.
32. Gigant, B., P.A. Curmi, C. Martin-Barbey, E. Charbaut, S. Lachkar, L. Lebeau, S. Siavoshian, A. Sobel, et M. Knossow, *The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex*. Cell, 2000. **102**(6): p. 809-16.
33. Ravelli, R.B., B. Gigant, P.A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, et M. Knossow, *Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 198-202.
34. Nawrotek, A., M. Knossow, et B. Gigant, *The Determinants That Govern Microtubule Assembly from the Atomic Structure of GTP-Tubulin*. J Mol Biol, 2011. **412**(1): p. 35-42.
35. Chakrabarti, G., M.R. Mejillano, Y.H. Park, D.G. Vander Velde, et R.H. Himes, *Nucleoside triphosphate specificity of tubulin*. Biochemistry, 2000. **39**(33): p. 10269-74.
36. Correia, J.J., A.H. Beth, et R.C. Williams, Jr., *Tubulin exchanges divalent cations at both guanine nucleotide-binding sites*. J Biol Chem, 1988. **263**(22): p. 10681-6.
37. Spiegelman, B.M., S.M. Penningroth, et M.W. Kirschner, *Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells*. Cell, 1977. **12**(3): p. 587-600.
38. Grover, S.E. Hamel, *The magnesium-GTP interaction in microtubule assembly*. Eur J Biochem, 1994. **222**(1): p. 163-72.
39. Carlier, M.F., D. Didry, et D. Pantaloni, *Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation*. Biophys J, 1997. **73**(1): p. 418-27.
40. Carlier, M.F., D. Didry, et D. Pantaloni, *Microtubule elongation and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. Role of guanine nucleotides in microtubule dynamics*. Biochemistry, 1987. **26**(14): p. 4428-37.
41. David-Pfeuty, T., H.P. Erickson, et D. Pantaloni, *Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5372-5376.
42. Desai, A.T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
43. Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Pous, et F. Perez, *Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues*. Science, 2008. **322**(5906): p. 1353-6.
44. Wang, H.W.E. Nogales, *Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 911-915.
45. Buey, R.M.J.F. Díaz, *The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: A polymerization-driven structural change*. Biochemistry, 2006. **45**(19): p. 5933-5938.
46. Rice, L.M., E.A. Montabana, et D.A. Agard, *The lattice as allosteric effector: structural studies of alphabeta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5378-83.
47. Grafmüller, A.G.A. Voth, *Intrinsic Bending of Microtubule Protofilaments*. Structure, 2011. **19**(3): p. 409-417.

48. Bhattacharyya, B., D. Panda, S. Gupta, et M. Banerjee, *Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin*. Med Res Rev, 2008. **28**(1): p. 155-83.
49. Keskin, O., S.R. Durell, I. Bahar, et R.L. Jernigan, *Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin*. Biophys J, 2002. **83**(2): p. 663-680.
50. Bennett, M.J., J.K. Chik, G.W. Slyszy, T. Luchko, J. Tuszynski, D.L. Sackett, et D.C. Schriemer, *Structural mass spectrometry of the  $\alpha\beta$ -tubulin dimer supports a revised model of microtubule assembly*. Biochemistry, 2009. **48**(22): p. 4858-4870.
51. Gebremichael, Y., J.W. Chu, et G.A. Voth, *Intrinsic bending and structural rearrangement of tubulin dimer: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis*. Biophys J, 2008. **95**(5): p. 2487-2499.
52. Mitra, A.D. Sept, *Localization of the antimetabolic peptide and depsipeptide binding site on beta-tubulin*. Biochemistry, 2004. **43**(44): p. 13955-62.
53. Morrissette, N.S., A. Mitra, D. Sept, et L.D. Sibley, *Dinitroanilines bind alpha-tubulin to disrupt microtubules*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(4): p. 1960-8.
54. Mitra, A.D. Sept, *Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules*. Biophys J, 2008. **95**(7): p. 3252-8.
55. Coluccia, A., D. Sabbadin, et A. Brancale, *Molecular modelling studies on Arylthioindoles as potent inhibitors of tubulin polymerization*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(8): p. 3519-25.
56. Pieraccini, S., G. Saladino, G. Cappelletti, D. Cartelli, P. Francescato, G. Speranza, P. Manitto, et M. Sironi, *In silico design of tubulin-targeted antimetabolic peptides*. Nat Chem, 2009. **1**(8): p. 642-8.
57. Palenik, G.J., W.P. Jensen, et I.H. Suh, *The history of molecular structure determination viewed through the Nobel prizes*. Journal of Chemical Education, 2003. **80**(7): p. 753-753.
58. Waston, J.D.F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
59. Pauling, L., R.B. Corey, et H.R. Branson, *The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1951. **37**(4): p. 205-11.
60. Kendrew, J.C.C., G. Bodo, H.M.M. Dintzis, R.G. Parrish, H. Wyckoff, et D.C. Phillips, *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis*. Nature, 1958. **181**(4610): p. 662-666.
61. Berman, H.M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, et P.E. Bourne, *The Protein Data Bank*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 235-42.
62. Allinger, N.L., *Calculation of Molecular Structure and Energy by Force-Field Methods*, in *Advances in Physical Organic Chemistry*, V. Gold and D. Bethell, Editors. 1976, Academic Press. p. 1-82.
63. Brooks, B.R., R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, et M. Karplus, *CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. Journal of computational chemistry, 1983. **4**(2): p. 187-217.
64. MacKerell, A.D., C.L. Brooks, L. Nilsson, B. Roux, Y. Won, et M. Karplus, *CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program*, Schleyer, Editor 1998, John Wiley & Sons: Chichester. p. 271-277.
65. Brooks, B.R., C.L. Brooks, A.D. Mackerell, L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, et M. Karplus, *CHARMM: The biomolecular simulation program*. Journal of computational chemistry, 2009. **30**(10): p. 1545-1614.
66. Case, D.A., T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvai, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, M.J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, et P.A. Kollman, *AMBER 11*, 2010, University of California, San Francisco.

67. Wang, J., W. Wang, P.A. Kollman, et D.A. Case, *Antechamber, An Accessory Software Package For Molecular Mechanical Calculations*. *Molecules*, 2001. **222**(2): p. U403-U403.
68. Wang, J., W. Wang, P.A. Kollman, et D.A. Case, *Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations*. *Journal of molecular graphics and modelling*, 2006. **25**(2): p. 247-260.
69. Duan, Y., C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, et P. Kollman, *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. *Journal of computational chemistry*, 2003. **24**(16): p. 1999-2012.
70. Halgren, T.A., *Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions*. *Journal of computational chemistry*, 1996. **17**(5-6): p. 520-552.
71. Allinger, N.L., *Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms*. *Journal of the American Chemical Society*, 1977. **99**(25): p. 8127-8134.
72. Lii, J.H.N.L. Allinger, *Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics*. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(23): p. 8566-8575.
73. Ponder, J.W., C. Wu, P. Ren, V.S. Pande, J.D. Chodera, M.J. Schnieders, I. Haque, D.L. Mobley, D.S. Lambrecht, R.A. DiStasio, Jr., M. Head-Gordon, G.N. Clark, M.E. Johnson, et T. Head-Gordon, *Current status of the AMOEBA polarizable force field*. *J Phys Chem B*, 2010. **114**(8): p. 2549-64.
74. Gresh, N., G.A. Cisneros, T.A. Darden, et J.P. Piquemal, *Anisotropic, Polarizable Molecular Mechanics Studies of Inter- and Intramolecular Interactions and Ligand-Macromolecule Complexes. A Bottom-Up Strategy*. *J Chem Theory Comput*, 2007. **3**(6): p. 1960-1986.
75. Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, et H.J.C. Berendsen, *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. *Journal of Computational Physics*, 1977. **23**(3): p. 327-341.
76. Hess, B., H. Bekker, H.J.C. Berendsen, et J.G.E.M. Fraaije, *LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations*. *Journal of computational chemistry*, 1997. **18**(12): p. 1463-1472.
77. Miyamoto, S.P.A. Kollman, *Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models*. *Journal of computational chemistry*, 1992. **13**(8): p. 952-962.
78. Rahman, A., *Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon*. *Physical Review*, 1964. **136**(2A): p. A405-A405.
79. Stillinger, F.H., *Improved simulation of liquid water by molecular dynamics*. *The Journal of Chemical Physics*, 1974. **60**(4): p. 1545-1545.
80. McCammon, J.A., B.R. Gelin, et M. Karplus, *Dynamics of folded proteins*. *Nature*, 1977. **267**(5612): p. 585-90.
81. Verlet, L., *Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. *Physical Review*, 1967. **159**(1): p. 98-103.
82. Swope, W.C., *A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters*. *The Journal of Chemical Physics*, 1982. **76**(1): p. 637.
83. van Gunsteren, W.F.H.J.C. Berendsen, *Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics*. *Molecular Physics*, 1977. **34**(5): p. 1311-1327.
84. Darden, T., D. York, et L. Pedersen, *Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems*. *The Journal of Chemical Physics*, 1993. **98**(12): p. 10089.
85. Essmann, U., L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, et L.G. Pedersen, *A smooth particle mesh Ewald method*. *The Journal of Chemical Physics*, 1995. **103**(19): p. 8577.
86. Srinivasan, J., T.E. Cheatham, P. Cieplak, P.A. Kollman, et D.A. Case, *Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate-DNA Helices*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**(37): p. 9401-9409.

87. Karplus, M.J.N. Kushick, *Method for estimating the configurational entropy of macromolecules*. *Macromolecules*, 1981. **14**(2): p. 325-332.
88. Hansson, T., J. Marelus, et J. Aqvist, *Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods*. *J Comput Aided Mol Des*, 1998. **12**(1): p. 27-35.
89. Fiser, A.A. Sali, *Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models*. *Methods Enzymol*, 2003. **374**: p. 461-91.
90. Kim, D.E., D. Chivian, et D. Baker, *Protein structure prediction and analysis using the Robetta server*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Web Server issue): p. W526-31.
91. Lengauer, T.M. Rarey, *Computational methods for biomolecular docking*. *Curr Opin Struct Biol*, 1996. **6**(3): p. 402-6.
92. Kitchen, D.B., H. Decornez, J.R. Furr, et J. Bajorath, *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(11): p. 935-49.
93. Morris, G.M., R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, et A.J. Olson, *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. *J Comput Chem*, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
94. Lunney, E.A., S.E. Hagen, J.M. Domagala, C. Humblet, J. Kosinski, B.D. Tait, J.S. Warmus, M. Wilson, D. Ferguson, D. Hupe, et et al., *A novel nonpeptide HIV-1 protease inhibitor: elucidation of the binding mode and its application in the design of related analogs*. *J Med Chem*, 1994. **37**(17): p. 2664-77.
95. Friedman, A.R., V.A. Roberts, et J.A. Tainer, *Predicting molecular interactions and inducible complementarity: fragment docking of Fab-peptide complexes*. *Proteins*, 1994. **20**(1): p. 15-24.
96. Stoddard, B.L.D.E. Koshland, Jr., *Prediction of the structure of a receptor-protein complex using a binary docking method*. *Nature*, 1992. **358**(6389): p. 774-6.
97. Metropolis, N., *Equation of State Calculations by Fast Computing Machines*. *J. Chem. Phys.*, 1953. **21**(6): p. 1087.
98. Hart, W.E., *Adaptive global optimization with local search*, 1994, University of California at San Diego.
99. Roothaan, C.C.J., *New Developments in Molecular Orbital Theory*. *Reviews of Modern Physics*, 1951. **23**(2): p. 69-89.
100. Møller, C.M.S. Plesset, *Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems*. *Physical Review*, 1934. **46**(7): p. 618-622.
101. Binkley, J.S., J.A. Pople, et W.J. Hehre, *Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements*. *Journal of the American Chemical Society*, 1980. **102**(3): p. 939-947.
102. Clark, T., J. Chandrasekhar, G.W. Spitznagel, et P.V.R. Schleyer, *Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for first-row elements, Li-F*. *Journal of computational chemistry*, 1983. **4**(3): p. 294-301.
103. Frisch, M.J., J.A. Pople, et J.S. Binkley, *Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets*. *The Journal of Chemical Physics*, 1984. **80**(7): p. 3265-3269.
104. Paton, R.S.J.M. Goodman, *Hydrogen bonding and pi-stacking: how reliable are force fields? A critical evaluation of force field descriptions of nonbonded interactions*. *J Chem Inf Model*, 2009. **49**(4): p. 944-55.
105. Wang, F.D.P. Landau, *An efficient, multiple-range random walk algorithm to calculate the density of states*. *Phys. Rev. Lett*, 2008. **30602**: p. 1-4.
106. Laio, A.M. Parrinello, *Escaping free-energy minima*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12562-6.
107. Valiron, O., I. Arnal, N. Caudron, et D. Job, *GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(23): p. 17507-17507.
108. Melki, R., S. Fievez, et M.F. Carlier, *Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay*. *Biochemistry*, 1996. **35**(37): p. 12038-12045.
109. Dai, K., A. Mukherjee, Y. Xu, et J. Lutkenhaus, *Mutations in ftsZ that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP*. *Journal of bacteriology*, 1994. **176**(1): p. 130-136.

110. Dougherty, C.A., C.R. Sage, A. Davis, et K.W. Farrell, *Mutation in the beta-tubulin signature motif suppresses microtubule GTPase activity and dynamics, and slows mitosis*. *Biochemistry*, 2001. **40**(51): p. 15725-15732.
111. Richards, K.L., K.R. Anders, E. Nogales, K. Schwartz, K.H. Downing, et D. Botstein, *Structure-function relationships in yeast tubulins*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(5): p. 1887-1903.
112. Laskowski, R.A., J.A. Rullmann, M.W. MacArthur, R. Kaptein, et J.M. Thornton, *AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*. *J Biomol NMR*, 1996. **8**(4): p. 477-86.
113. Meagher, K.L., L.T. Redman, et H.A. Carlson, *Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field*. *Journal of computational chemistry*, 2003. **24**(9): p. 1016-25.
114. Jorgensen, W.L., J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, et M.L. Klein, *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. *The Journal of Chemical Physics*, 1983. **79**(2): p. 926-926.
115. Sousa Da Silva, A.W., W.F. Wrانken, et E.D. Laue, *ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE*. To be submitted.
116. Berendsen, H.J.C., J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, et J.R. Haak, *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. *The Journal of Chemical Physics*, 1984. **81**(8): p. 3684-3684.
117. Bussi, G., D. Donadio, et M. Parrinello, *Canonical sampling through velocity rescaling*. *The Journal of Chemical Physics*, 2007. **126**(1): p. 014101-014101.
118. Friedman, Z.Y.Y. Devary, *Dissection of the GTPase mechanism of Ras protein by MD analysis of Ras mutants*. *Proteins*, 2005. **59**(3): p. 528-33.
119. Dorleans, A., B. Gigant, R.B. Ravelli, P. Mailliet, V. Mikol, et M. Knossow, *Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(33): p. 13775-9.
120. Nogales, E., K.H. Downing, L.A. Amos, et J. Lowe, *Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases*. *Nat Struct Biol*, 1998. **5**(6): p. 451-8.
121. Xiao, H., P. Verdier-Pinard, N. Fernandez-Fuentes, B. Burd, R. Angeletti, A. Fiser, S.B. Horwitz, et G.A. Orr, *Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(27): p. 10166-73.
122. Jordan, M.A.K. Kamath, *How do microtubule-targeted drugs work? An overview*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(8): p. 730-42.
123. Singh, P., K. Rathinasamy, R. Mohan, et D. Panda, *Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(6): p. 368-75.
124. Friedman, P.A.E.G. Platzer, *Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin*. *Biochim Biophys Acta*, 1978. **544**(3): p. 605-14.
125. Friedman, P.A.E.G. Platzer, *Interaction of anthelmintic benzimidazoles with Ascaris suum embryonic tubulin*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **630**(2): p. 271-8.
126. Xu, K., P.M. Schwarz, et R.F. Ludueña, *Interaction of nocodazole with tubulin isotypes*. *Drug Development Research*, 2002. **55**(2): p. 91-96.
127. Davidse, L.C.W. Flach, *Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 1977. **72**(1): p. 174-93.
128. Gupta, K., J. Bishop, A. Peck, J. Brown, L. Wilson, et D. Panda, *Antimetabolic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin*. *Biochemistry*, 2004. **43**(21): p. 6645-55.
129. Rathinasamy, K.D. Panda, *Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells*. *FEBS J*, 2006. **273**(17): p. 4114-28.
130. Kilmartin, J.V., *Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro*. *Biochemistry*, 1981. **20**(12): p. 3629-33.

131. Downing, K.H., *Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 89-111.
132. Clement, M.J., K. Rathinasamy, E. Adjadj, F. Toma, P.A. Curmi, et D. Panda, *Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin*. Biochemistry, 2008. **47**(49): p. 13016-25.
133. Yenjerla, M., C. Cox, L. Wilson, et M.A. Jordan, *Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(2): p. 390-8.
134. Hammond, L.A., K. Davidson, R. Lawrence, J.B. Camden, D.D. Von Hoff, S. Weitman, et E. Izbicka, *Exploring the mechanisms of action of FB642 at the cellular level*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(5): p. 301-13.
135. Hao, D., J.D. Rizzo, S. Stringer, R.V. Moore, J. Marty, D.L. Dexter, G.L. Mangold, J.B. Camden, D.D. Von Hoff, et S.D. Weitman, *Preclinical antitumor activity and pharmacokinetics of methyl-2-benzimidazolecarbamate (FB642)*. Invest New Drugs, 2002. **20**(3): p. 261-70.
136. Humphrey, W., A. Dalke, et K. Schulten, *VMD -- Visual Molecular Dynamics*. Journal of Molecular Graphics, 1996. **14**: p. 33-38.
137. Guvench, O.A.D. MacKerell, Jr., *Automated conformational energy fitting for force-field development*. J Mol Model, 2008. **14**(8): p. 667-79.
138. Phillips, J.C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kale, et K. Schulten, *Scalable molecular dynamics with NAMD*. J Comput Chem, 2005. **26**(16): p. 1781-802.
139. Calmon, J.P.D.R. Sayag, *Kinetics and mechanisms of conversion of methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (benomyl) to 3-butyl-2,4-dioxo(1,2-a)-s-triazinobenzimidazole (STB) and 1-(2-benzimidazolyl)-3-n-butylurea (BBU)*. J Agric Food Chem, 1976. **24**(2): p. 314-7.
140. Chiba, M.D.F. Veres, *Fate of benomyl and its degradation compound methyl 2-benzimidazolecarbamate on apple foliage*. J Agric Food Chem, 1981. **29**(3): p. 588-90.
141. Sassman, S.A., L.S. Lee, M. Bischoff, et R.F. Turco, *Assessing N,N'-Dibutylurea (DBU) formation in soils after application of n-butylisocyanate and benlate fungicides*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 747-54.
142. Sobel, A., *Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(8): p. 301-5.
143. Clement, M.J., I. Jourdain, S. Lachkar, P. Savarin, B. Gigant, M. Knossow, F. Toma, A. Sobel, et P.A. Curmi, *N-terminal stathmin-like peptides bind tubulin and impede microtubule assembly*. Biochemistry, 2005. **44**(44): p. 14616-25.
144. Schrödinger, L.L.C., *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*, 2010, DeLano Scientific LLC.
145. Hou, T., J. Wang, Y. Li, et W. Wang, *Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations*. J Chem Inf Model, 2011. **51**(1): p. 69-82.
146. Andricioaei, I., *On the calculation of entropy from covariance matrices of the atomic fluctuations*. J. Chem. Phys., 2001. **115**(14): p. 6289.
147. Bieche, I., S. Lachkar, V. Becette, C. Cifuentes-Diaz, A. Sobel, R. Lidereau, et P.A. Curmi, *Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer*. Br J Cancer, 1998. **78**(6): p. 701-9.
148. Davies, J.S., *The cyclization of peptides and depsipeptides*. J Pept Sci, 2003. **9**(8): p. 471-501.
149. Nettles, J.H., H. Li, B. Cornett, J.M. Krahn, J.P. Snyder, et K.H. Downing, *The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography*. Science, 2004. **305**(5685): p. 866-9.
150. Cormier, A., M. Marchand, R.B. Ravelli, M. Knossow, et B. Gigant, *Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands*. EMBO Rep, 2008. **9**(11): p. 1101-6.
151. Barbier, P., A. Dorleans, F. Devred, L. Sanz, D. Allegro, C. Alfonso, M. Knossow, V. Peyrot, et J.M. Andreu, *Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31672-81.

152. Gigant, B., C. Wang, R.B. Ravelli, F. Roussi, M.O. Steinmetz, P.A. Curmi, A. Sobel, et M. Knossow, *Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine*. Nature, 2005. **435**(7041): p. 519-22.
153. Jung, M.K.B.R. Oakley, *Identification of an amino acid substitution in the benA, beta-tubulin gene of Aspergillus nidulans that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity*. Cell Motil Cytoskeleton, 1990. **17**(2): p. 87-94.
154. Goldman, G.H., W. Temmerman, D. Jacobs, R. Contreras, M. Van Montagu, et A. Herrera-Estrella, *A nucleotide substitution in one of the beta-tubulin genes of Trichoderma viride confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate*. Mol Gen Genet, 1993. **240**(1): p. 73-80.
155. Yarden, O.T. Katan, *Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of Botrytis cinerea*. Phytopathology, 1993. **83**(12): p. 1478-1483.
156. Silvestre, A.J. Cabaret, *Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance?* Mol Biochem Parasitol, 2002. **120**(2): p. 297-300.
157. Orbach, M.J., E.B. Porro, et C. Yanofsky, *Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of Neurospora crassa and its use as a dominant selectable marker*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(7): p. 2452-61.
158. Mukherjee, M., R. Hadar, P.K. Mukherjee, et B.A. Horwitz, *Homologous expression of a mutated beta-tubulin gene does not confer benomyl resistance on Trichoderma virens*. J Appl Microbiol, 2003. **95**(4): p. 861-7.
159. Yan, L., J. Chen, C. Zhang, et Z. Ma, *Molecular characterization of benzimidazole-resistant isolates of Cladosporium fulvum*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **278**(2): p. 242-8.
160. Li, J., S.K. Katiyar, et T.D. Edlind, *Site-directed mutagenesis of Saccharomyces cerevisiae beta-tubulin: interaction between residue 167 and benzimidazole compounds*. FEBS Lett, 1996. **385**(1-2): p. 7-10.
161. Fujimura, M., K. Oeda, H. Inoue, et T. Kato, *A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of Neurospora confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity*. Curr Genet, 1992. **21**(4-5): p. 399-404.
162. Cooley, R.N.C.E. Caten, *Molecular analysis of the Septoria nodorum beta-tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation*. Mol Gen Genet, 1993. **237**(1-2): p. 58-64.





# Annexes

---

## Annexe 1 : Liste des structures 3D de l'hétérodimère tubuline- $\alpha\beta$ .

PDB ID	Titre de la structure	Méthode	Resolution	Référence
3RYC	Tubulin: RB3 stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	2.10	
3RYI	GDP-Tubulin: rb3 stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	2.40	
3RYF	GTP-Tubulin: RB3 Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	2.52	[34]
3RYH	GMPCPP-Tubulin: RB3 Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	2.80	
1TVK	The binding mode of epothilone A on $\alpha$ , $\beta$ -tubulin by electron crystallography	Cristallographie électronique	2.89	[149]
1JFF	Refined structure of alpha-beta tubulin from zinc-induced sheets stabilized with taxol	Cristallographie électronique	3.50	[31]
1SA0	TUBULIN-COLCHICINE: STATHMIN-LIKE DOMAIN COMPLEX	Diffraction aux rayons X	3.58	[33]
3HKE	Tubulin-T138067: RB3 stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	3.60	[119]
3HKB	Tubulin: RB3 Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	3.65	
1TUB	TUBULIN ALPHA-BETA DIMER, ELECTRON DIFFRACTION	Cristallographie électronique	3.70	[30]
3HKD	Tubulin-TN16 : RB3 stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	3.70	[119]
3E22	Tubulin-colchicine-soblidotin: Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	3.80	[150]
3HKC	Tubulin-ABT751: RB3 stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	3.80	[119]
1FFX	TUBULIN:STATHMIN-LIKE DOMAIN COMPLEX	Diffraction aux rayons X	3.95	[32]
3N2G	TUBULIN-NSC 613863: RB3 Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	4.00	
3N2K	TUBULIN-NSC 613862: RB3 Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	4.00	[151]
1Z2B	Tubulin-colchicine-vinblastine: stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	4.10	[152]
3DU7	Tubulin-colchicine-phomopsin A: Stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	4.10	[150]
1SA1	Tubulin-podophyllotoxin: stathmin-like domain complex	Diffraction aux rayons X	4.20	[33]

## Annexe 2 : Alignement de séquence de la tubuline- $\alpha$ et de la tubuline- $\beta$ .

```

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      MRECI SVHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFN 50
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDSLQ--LERIN 48
*** : ::**.* *** **: . *****:* * . * . : : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAA 100
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      VYNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRSGPFQIFRPDNFVFGQSGAG 98
. . . : * : . * : ***** : ***** . : * : * : * : * : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      NNYARGHYTIGKELIDLVLDRIRKLADQCTGLQGFLIFHSFGGGTGSFT 150
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      NNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESSECDCLQGFQLTHSLGGGTGSIMG 148
* : * : * : * : * * * : * * * : * : * * * * : * : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      SLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTHTTLEHSDC 200
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      TLLISKIREEYDPRIMNTFSVMSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDE 198
: * : . : : : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      AFMVDNEAIYDICRNLDIRPTYTNLNLIGQIVSSITASLRFDGALNV 250
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      TYCIDNEALYDICFRITLKLTPPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNA 248
: : : * : * : * : * : * * . : * * : * : * : * . : * : * : * : * * *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      DLTEFQTNLVPYRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEFAN 300
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      DLRKLAVNMVFPRLHFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDSKN 298
* * : : . * : * : * : * * : . : * : * : * . : . : * : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      QMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTG 350
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      MMAACDPRHGRYLTVAEIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKSSYFVEWIPNN 348
* . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

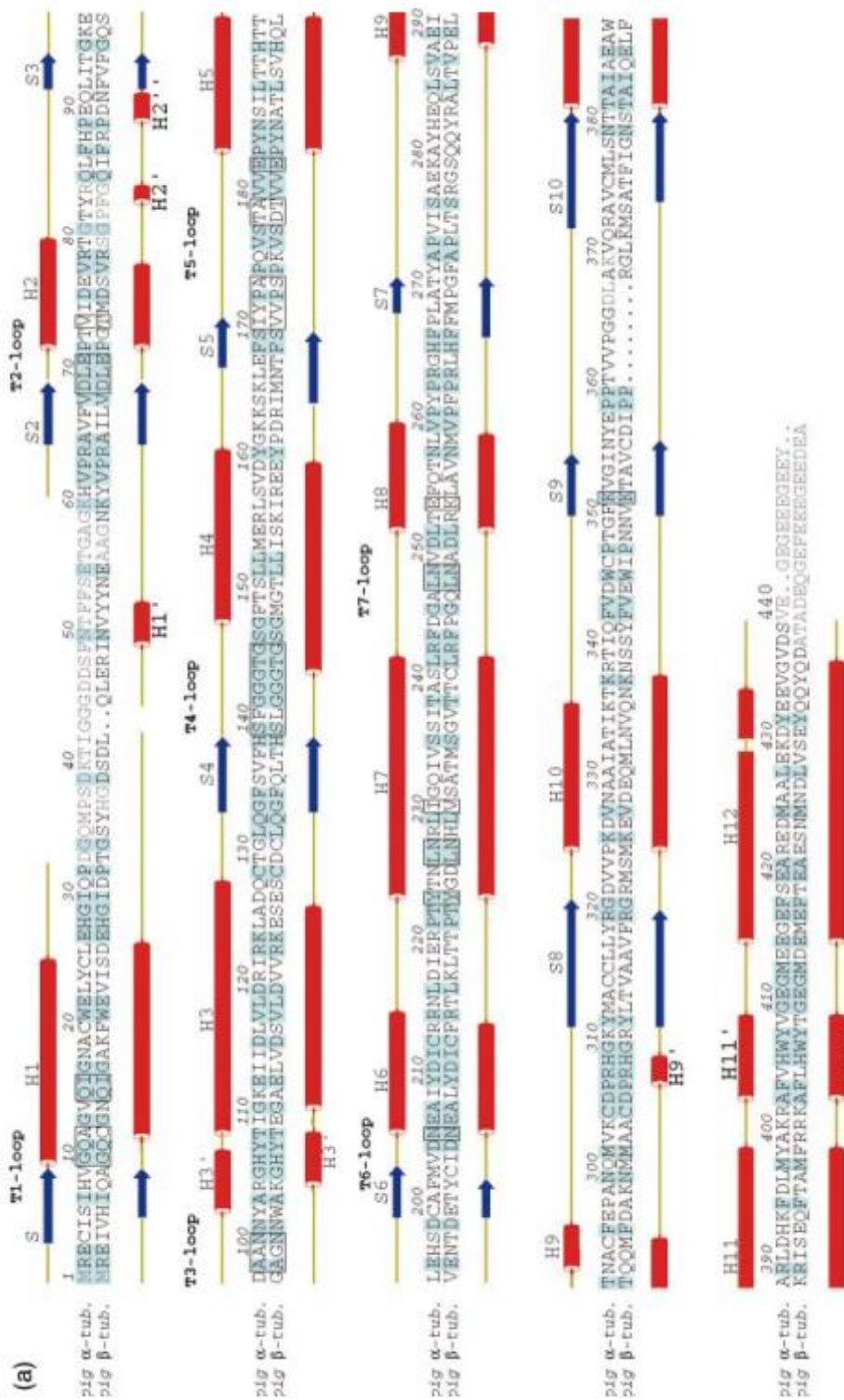
TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      FKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYA 400
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      VKTAVCDIPP-----RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFR 390
. * . : : * * : : : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDMAALEKDYEVEVGMDSVEGEG--EEEE 448
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      RKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGFEEEE 440
: : * : * : * : * : * * * : * : * : * : * * . : * : * : * : * : *

TUBULINE- $\alpha$  BOVINE      GDEY- 452
TUBULINE- $\beta$  BOVINE      GEDEA 445
* : :

```

## Annexe 3 : Structure secondaires des sous-unités tubuline- $\alpha$ et tubuline- $\beta$ .



## Annexe 4 : Séquences de la tubuline- $\alpha$ et de la tubuline- $\beta$ porcines

### Tubuline- $\alpha$ :

```
>sp|Q2HJ86|TBA1D_BOVIN Tubulin alpha-1D chain OS=Bos taurus GN=TUBA1D PE=1 SV=1
MRECISVHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK
HVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKELIDLVLVLD
RIRKLADQCTGLQGFLIFHSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKKSLEFSIYPAPQVSTA
VVEPYNSILTHTTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIRPTYTNLNLRLIGQIVSSITA
SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
QMVKCDPRHGKYMACECLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYQPP
TVVPPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
AREDMAALEKDYEEVGMDSVEGEGEEEEEGDEY
```

### Tubuline- $\beta$ :

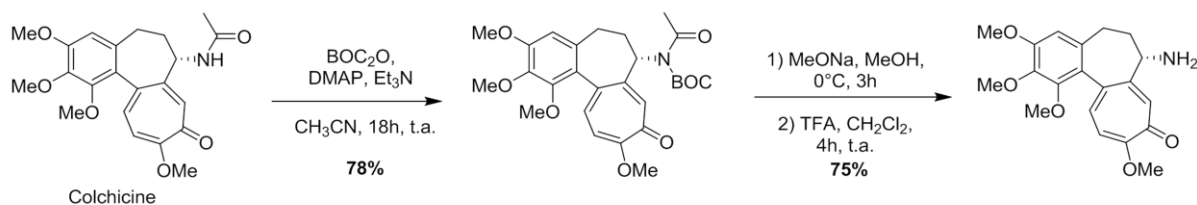
```
>sp|P02554|TBB_PIG Tubulin beta chain OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDSLQLERINVYNEAAGNKYV
PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV
RKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSDTVV
EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL
RFPGQLNADLRKLAVNMPFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMM
AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
EYQQYQDATADEQGEFEEEGEEDEA
```

## Annexe 5 : Liste des mutations de la sous-unité tubuline- $\beta$ associées à une résistance ou une sensibilisation aux dérivés du benzimidazole.

Molécule	Organisme	Mutant	isotype	Sensible / Résistant	Référence
Bénomyl				Sensible	
Carbendazime thiabendazole	<i>A. nidulans</i>	V165A	benA16	Sensible Résistant	[153]
Carbendazime	<i>T. viride</i>	Y6H	tub2	Résistant	[154]
Bénomyl	<i>B. cinerea</i>	198 200		Résistant Résistant	[155]
Benzimidazole	<i>H. contortus</i> ,			Résistant	[156]
	<i>T. colubriformis</i> ,	F200Y		Résistant	
	<i>T. circumcinct</i>			Résistant	
	<i>H. contortus</i> ,			Résistant	
	<i>T. colubriformis</i> ,	F167Y		Résistant	
	<i>T. circumcinct</i>			Résistant	
Bénomyl	<i>N. crassa</i>	F167Y		Résistant	[157]
Benzimidazole	<i>T. virens</i>	H6Y	tub2	Sensible	[158]
Carbendazime	<i>A. nidulans</i>		186 R	Sensible Sensible	[127]
Thiophanate-methyl	<i>C. fulvum</i>	Q198A	BenR1	Résistant	[159]
Thiophanate-methyl	<i>C. fulvum</i>	F200Y	BenR2	Résistant	
Nocodazole				Résistant	
Carbendazime	<i>S. cerevisiae</i>	F167Y		Sensible	[160]
Bénomyl				Sensible	
Carbendazime diethofencarb	<i>N. crassa</i>	Q198		Résistant Sensible	[161]
Carbendazime	<i>S. nodorum</i>	H6Y	Bsm300	Résistant	[162]

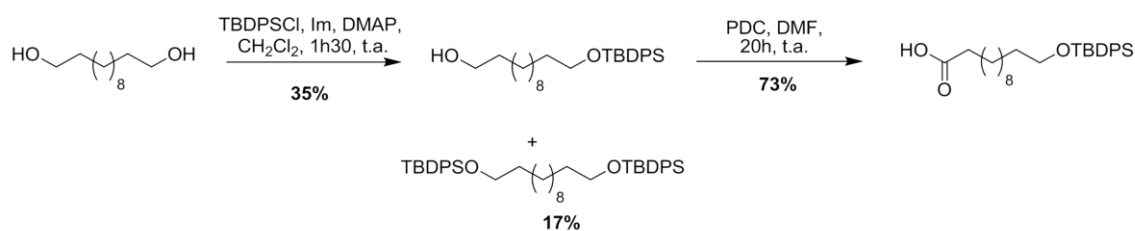
## Annexe 6 : Synthèse des molécules CLC et 255q.

### 1) Préparation de la colchicine décacétylée



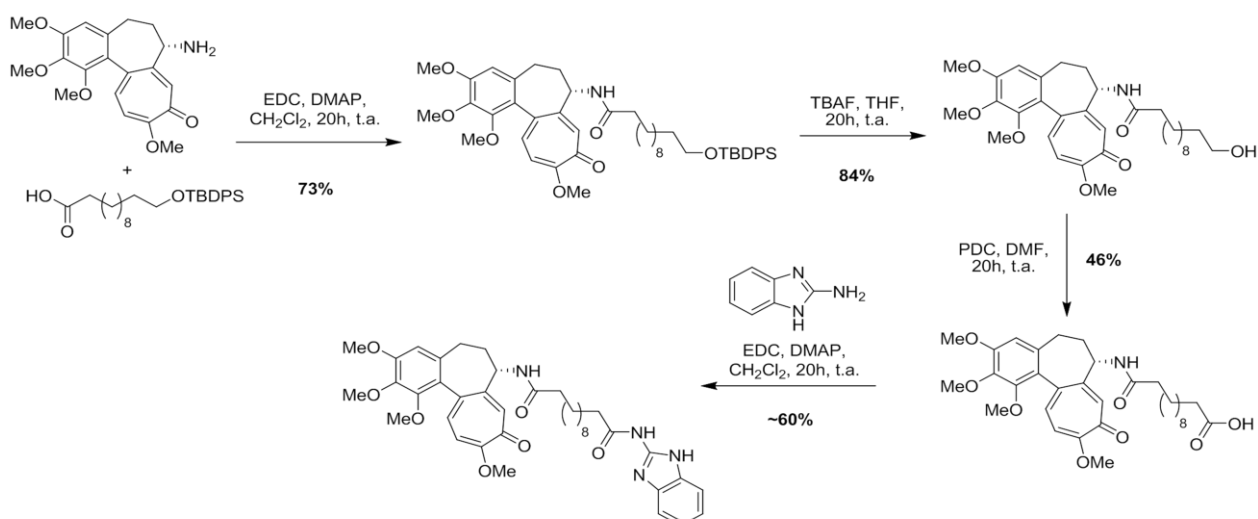
3 étapes : 59%

### 2) Préparation du linker



2 étapes : 25%

### 3) Synthèse de l'hybride



Rem : Produit pas pur, 2 lots soit mélange avec DMAP soit mélange avec un sous-produit





## Résumé

Les microtubules sont des polymères cylindriques de tubuline- $\alpha\beta$ , membres du cytosquelette eucaryote. Ils possèdent une dynamique intrinsèque nécessaire à de nombreuses fonctions cellulaires telle que la mitose. L'hydrolyse du nucléotide GTP dans les polymères de tubuline- $\alpha\beta$  ainsi que les interactions entre la tubuline et les protéines partenaires ou les molécules à visées pharmacologiques, jouent un rôle critique sur la dynamique des microtubules. Durant cette thèse, des approches de modélisation moléculaire ont été utilisées pour mieux appréhender les interactions tubuline-ligand à l'échelle atomique et contribuer au développement de nouvelles molécules actives.

Des simulations de dynamiques moléculaires ont été réalisées pour étudier l'effet de différents nucléotides dans la tubuline- $\beta$  sur la structure et la dynamique du protofilament de tubuline. Nous proposons un rôle du résidu  $\alpha$ E254 dans la coordination du magnésium catalytique. Nous observons également des changements conformationnels aux interfaces latérales et un réarrangement de structure aux interfaces longitudinales qui peuvent affecter la stabilisation du microtubule. Des travaux menés au laboratoire ont montré que la colchicine et le carbendazime se fixent dans des poches voisines dans la sous-unité tubuline- $\beta$  et inhibent la prolifération cellulaire. Nous avons proposé un site de fixation du carbendazime dans les complexes tubuline-colchicine à l'aide de l'amarrage moléculaire et de simulations de dynamiques moléculaires. Ces expériences ont mené au design de molécules hybrides composées des noyaux colchicine et carbendazime reliés par un *linker*. Une de ces molécules hybrides a été synthétisée et testée avec succès sur des lignées de cellules HeLa. Enfin, nous avons construit des peptides cycliques dérivées d'I19L, un peptide anti-microtubule identifié au laboratoire. Des simulations de dynamique moléculaire et des calculs d'énergie libre de liaisons ont permis d'évaluer ces peptides. Enfin, des mutations ont été proposées afin d'optimiser l'interaction entre le meilleur peptide et la tubuline.

Mots-clés : tubuline- $\alpha\beta$  ; dynamique moléculaire ; nucléotide ; colchicine ; peptide anti-microtubule

## Abstract

Microtubules are cylindrical polymers of  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers, members of the eukaryotic cytoskeleton. They possess an intrinsic dynamics which is necessary to any cellular functions such as the mitosis. It has long been recognized that GTP hydrolysis in  $\alpha\beta$ -tubulin polymers plays a critical role in this dynamics as well as the interactions between tubulin and the protein partners or the drugs. In this thesis, molecular modeling approaches are applied to three theoretical studies to gain insight at the atomic scale about tubulin-ligand interactions and to contribute to the development of new active compounds.

Molecular dynamics simulations were used to study the effect of the different nucleotide states at  $\beta$ -tubulin on the protofilament structure and dynamics. We propose a role for residue  $\alpha$ E254 in catalytic magnesium coordination. We also observe conformational changes and structure rearrangement at lateral and longitudinal interfaces that can affect the microtubule stabilization. Previous work carried out in the laboratory showed that colchicine and carbendazime bind neighboring pockets in the  $\beta$ -tubulin subunit and inhibit cell proliferation. We proposed a binding site of carbendazime on the tubulin-colchicine complex, using docking and molecular dynamics simulation, which lead to the design of hybrid molecules composed of both colchicines and carbendazime moieties attached with a linker. One of these hybrid molecules has been synthesized and successfully tested on HeLa cells. Finally, we designed four cyclic peptides based on I19L, an anti-microtubule peptide identified at the laboratory. Molecular dynamic simulations and binding free energy calculations were used to evaluate these peptides. Mutations were then proposed on the best peptide to increase its interactions with tubulin.

Keywords :  $\alpha\beta$ -tubulin; molecular dynamics; nucleotide; colchicine; anti-mitotic peptide