

Thèse de doctorat de l'université d'Orsay (Paris-Sud XI). U.F.R. Sciences

Ecole doctorale : Innovation thérapeutique, du fondamental à l'appliqué, ED 425

Thèse de doctorat,
Présentée pour obtenir le titre de Docteur en Sciences
de l'Université Paris XI,
par Gabriel Gibrat

Sujet : Structure et dynamique de l'état natif et des états dénaturés par la chaleur et la pression de la calmoduline. Une étude par diffusion de neutrons et spectroscopies optiques.

soutenue le 23 Octobre 2007 devant le jury composé de

M. Roger Fourme	<i>Président</i>
M ^{me} Catherine Royer	<i>Rapporteur</i>
M. Guiseppe Zaccai	<i>Rapporteur</i>
M ^{me} Marie-Claire Bellissent-Funel	<i>Directeur de thèse</i>
M. David Bensimon	<i>Examineur</i>
M. Constantin T. Craescu	<i>Examineur</i>
M. Gaston Hui Bon Hoa	<i>Examineur</i>
M. Jeremy C. Smith	<i>Examineur</i>

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Léon Brillouin (LLB), laboratoire mixte CEA/CNRS, au Centre d'Etudes Atomiques de Saclay. Je remercie Pierre Monceau et Michel Alba de m'avoir accueilli dans leur laboratoire, ainsi que Philippe Mangin et Susana Gota-Goldmann. J'associe à ces remerciements Alain Menelle, qui m'a également beaucoup aidé.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Marie-Claire Bellissent-Funel, qui a dirigé et encadré ce travail de thèse, tout au long de ces trois dernières années. Je tiens également à la remercier pour m'avoir fait découvrir la biophysique et tout particulièrement le repliement des protéines.

Roger Fourme m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, et je l'en remercie. Je remercie également Catherine Royer et Giuseppe Zaccai pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je souhaite enfin remercier David Bensimon et Jeremy Smith pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Burkhard Annighöfer sans qui toutes les mesures de diffusion de neutrons sous pression n'auraient pas été possibles. Je le remercie pour m'avoir enseigné les principes de base des hautes pressions, me permettant ainsi de comprendre les contraintes inhérentes à la réalisation d'une cellule pression ; d'avoir dessiné et réalisé toutes les cellules pression que nous avons utilisées ; d'avoir participé à toutes les expériences de diffusion de neutrons sous pression ; je le remercie enfin pour sa patience et sa gentillesse.

Je remercie également sincèrement Gaston Hui Bon Hoa, qui m'a initié à la spectroscopie d'absorbance, et à l'art des spectroscopies optiques sous pression. Je le remercie également pour m'avoir permis de disposer de tout son matériel à de nombreuses reprises.

Je remercie vivement José Teixeira, pour m'avoir appris les rudiments de diffusion de neutrons aux petits angles que je possède à présent ; pour m'avoir appris à me servir de son spectromètre, PAXE ; et pour la richesse, la densité, des discussions, scientifiques ou non, toujours captivantes, que j'ai pu avoir avec lui. Je le remercie également pour m'avoir aidé pour les expériences sur PAXE, et j'associe à ces remerciements Marc Detrez, technicien de PAXE, ainsi que Vania Calandrini.

Je remercie Gil Craescu, pour m'avoir fait découvrir la calmoduline, pour son aide précieuse, et pour avoir apporté des réponses claires à toutes mes questions. Je remercie également Liliane Assairi et Yves Blouquit, qui ont eu le courage d'exprimer et purifier de grandes quantités de calmoduline, d'une grande pureté.

Je remercie Marie-Sousai Appavou, pour m'avoir appris les bases de la préparation d'échantillons biologiques, et Camille Loupiac pour m'avoir appris le secret de la préparation de solutions de guanidine concentrées.

Je remercie Sophie Combet, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur la C-PC ; ainsi qu'Ameziane Ould Ouali et Christelle Cassan pour avoir purifié la C-PC.

Je tiens à remercier mon père, pour m'avoir initié aux mystères de la fluorescence ; pour son aide concernant la C-PC, et pour son soutien au cours de ces trois années.

Je remercie vivement Philippe Dumas, qui m'a initié aux joies de la thermodynamique hors équilibre, et sans qui nous n'aurions pas pu comprendre les expériences sur la C-PC.

Je remercie Fabrice Cousin pour ses grandes qualités humaines, son enthousiasme inaltérable, son entrain, sa bonne humeur. Je le remercie pour les discussions scientifiques passionnantes que nous avons eues ; pour m'avoir enseigné les concepts de base de la physico-chimie, la stabilité colloïdale et le potentiel DLVO entre autres. Je le remercie pour ses conseils avisés, et son soutien sans faille tout au long de ces trois ans ; et pour m'avoir un peu bougé et fait retourner à la piscine, ce qui fut salutaire. Pour finir, je le remercie pour m'avoir converti aux représentations IQ^α ...

Je tiens également à remercier Perrine Vallat, arrivée tardivement au laboratoire, mais dont la bonté, la patience, l'humour et la joie de vivre lui ont permis, en peu de temps, d'occuper une place indispensable à la bonne ambiance au troisième étage ; je la remercie tout particulièrement pour son soutien constant durant cette période difficile qu'est la fin de thèse.

Je remercie tous les thésards du laboratoire qui nous quittés à présent dont Abdes et Sandra ; et tout particulièrement Jérémie Gummel.

J'adresse un grand merci à tous les thésardes, thésards, post-docs et stagiaires du 3^{ème} ; dont Clémence, Karine, Nicolas, Chloé, Marie, Francois, Camilla, ainsi que les permanents du troisième, Fabrice, José, Jean-Marc, Stéphane, Didier, Alain et Annie et les autres, pour la bonne ambiance, et les moments de franche rigolade autour d'un café....

Je tiens à remercier Xavier Agostini, technicien exceptionnellement efficace et sympathique ; ainsi que tous les techniciens du laboratoire.

Je tiens également à remercier Chantal Marais, secrétaire particulièrement efficace et sympathique du laboratoire, dont l'aide est précieuse à tous, et Chantal Pomeau, pour son aide, qui me fut utile à de nombreuses reprises ; ainsi que Bernard Mailleret, qui sait à merveille gérer les

problèmes d'intendance, de travaux, et autres du laboratoire, toujours prêt à rendre service.

Je salue également tous les membres du laboratoire, absents de cette liste, que j'ai croisés pendant ces années

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille, mes soeurs, ma mère, mon père pour leur soutien ; et surtout ma femme, pour m'avoir encouragé en permanence ; et surtout pour m'avoir supporté, Dieu sait par quel miracle, pendant ces années certes difficiles, mais passionnantes.

Sommaire

I	Position du problème, éléments de théorie et méthodes	5
1	Introduction	7
1.1	Considérations générales sur le repliement des protéines	8
1.1.1	Le repliement - compensation entre énergie et entropie	8
1.1.2	Le paradoxe de Levinthal	9
1.1.3	Les modèles séquentiels	10
1.1.4	La vision ensembliste - Le modèle de l'entonnoir	10
1.1.5	Le repliement et le "folding problem"	13
1.2	Objectifs de la thèse	14
1.3	Présentation de la calmoduline	15
1.3.1	La calmoduline dans le monde du vivant	15
1.3.2	De la structure à la fonction	16
1.3.3	La calmoduline : un bon système modèle	22
1.4	Thermodynamique du dépliement et du repliement des protéines	27
1.4.1	Modèles de dénaturation	27
1.4.2	Les paramètres extérieurs	30
1.4.3	Les diagrammes de phase (T,P)	33
2	La diffusion de neutrons	37
2.1	Généralités sur la diffusion de neutrons	38
2.1.1	Qu'il est beau mon neutron	38
2.1.2	(Un peu de) Théorie générale (Mais pas trop...)	39
2.2	La diffusion de neutrons aux petits angles	44
2.2.1	Principe de l'expérience	44
2.2.2	Traitement des données	46
2.2.3	Éléments de théorie	49
2.3	La diffusion quasi-élastique et inélastique de neutrons par la technique de temps de vol	61
2.3.1	Principe de la mesure de temps de vol	62
2.3.2	Traitement des données	62
2.3.3	L'analyse des données	66

3	Les spectroscopies optiques	77
3.1	La spectroscopie d'absorbance UV-Visible en double faisceau	78
3.1.1	Principe de la mesure et traitement des données	78
3.1.2	Éléments de théorie	79
3.2	La spectroscopie de fluorescence	81
3.2.1	Principe de la mesure et traitement des données	82
3.2.2	Éléments de théorie	84
3.2.3	Petit comparatif spectroscopie de fluorescence - spectroscopie d'absorbance appliquée à l'étude des protéines	87
3.3	Le dichroïsme circulaire	87
II	La dénaturation de la calmoduline	91
4	La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline	93
4.1	Aspects structuraux et thermodynamiques	94
4.1.1	Conformation de l'état natif de l'apo-calmoduline	94
4.1.2	"Thermodynamique" du dépliement	94
4.1.3	Conformation des états dénaturés	107
4.1.4	Le repliement de l'apo-calmoduline	111
4.1.5	Résumé	123
4.2	Aspects dynamiques	123
4.2.1	Introduction	123
4.2.2	Facteur de Debye-Waller et déplacements carrés moyens	124
4.2.3	Quasi-élastique - Examen préliminaire des données	124
4.2.4	Ajustement du modèle et premiers résultats	125
4.2.5	Indice de polydispersité des rayons de sphère	131
4.2.6	Relation de dispersion des mouvements internes	131
4.2.7	Distance au squelette peptidique ou exposition au solvant ?	133
4.2.8	Densité d'états vibrationnels	133
4.2.9	Mouvements globaux - Diffusion de translation	134
4.2.10	Résumé	136
5	La dénaturation sous pression de la calmoduline	137
5.1	Aspects structuraux et thermodynamiques	139
5.1.1	Apo et holo calmoduline	139
5.1.2	Aspects thermodynamiques de la dénaturation sous pression - Fluorescence	142
5.1.3	Conformation des états intermédiaires - DNPA	145
5.1.4	Réversibilité de la dénaturation sous pression	150
5.1.5	Résumé	153
5.2	Aspects dynamiques	154

5.2.1	Résumé	156
III	La C-phycoyanine	157
6	La C-PC	161
6.1	Structure de la C-phycoyanine	161
6.2	Les phycobilisomes	162
6.3	Equilibre Monomère \rightleftharpoons Trimère \rightleftharpoons Hexamère	163
7	La Dénaturation de la C-PC	167
7.1	Le mécanisme de dénaturation	167
7.1.1	La dénaturation de la C-PC trimérique $(\alpha\beta)_3$, une transition "à 4 états"	167
7.1.2	La première transition - spectroscopie d'absorbance	169
7.1.3	La dernière transition - DNPA	169
7.1.4	Le début des problèmes	172
7.2	La dénaturation de la CPC - une réaction hors équilibre	173
7.2.1	Observation qualitative des cinétiques	173
7.2.2	Méthodes d'étude de transitions hors-équilibre	173
7.2.3	Dénaturation thermique et chimique : un même mécanisme	176
7.2.4	Première tentative d'analyse quantitative - Dénaturation chimique et méthode "à vitesse constante"	179
7.2.5	Deuxième tentative d'analyse quantitative - Dénaturation thermique et méthode "à vitesse constante"	184
7.2.6	Troisième tentative d'analyse quantitative - Dénaturation chimique et méthode "à temps constant"	185
7.3	Résumé	192
A	Matériels et méthodes expérimentales	241
A.1	Les échantillons de calmoduline	241
A.1.1	Expression et purification de la calmoduline	241
A.1.2	Choix des conditions	241
A.1.3	Protocole de préparation	241
A.2	Conditions expérimentales	242
A.2.1	Les expériences de fluorescence intrinsèque de l'apo-calmoduline en fonction de la température	242
A.2.2	Les expériences de dichroïsme circulaire de l'apo-calmoduline en fonction de la température	243
A.2.3	Les expériences d'absorbance en UV proche de l'apo-calmoduline en fonction de la température	244

A.2.4	Les expériences DNPA en fonction de la température sur des solutions d'apo-calmoduline	244
A.2.5	Les expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol en fonction de la température sur des solutions d'apo-calmoduline	245
A.2.6	Les expériences de fluorescence intrinsèque de la calmoduline sous pression	245
A.2.7	Les expériences de fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline sous pression	246
A.2.8	Les expériences de DNPA sous pression	246
A.2.9	Les expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol sous pression	247
B	Les environnements "pression"	249
B.1	Contraintes liées à la pression, et types de cellules	249
B.2	Absorbance et fluorescence UV-visible	250
B.3	La diffusion de neutrons aux petits angles	252
B.4	Les matériaux	252
B.5	Les cellules DNPA cylindriques	254
B.6	La cellule DNPA à fenêtres amovibles	254
B.7	Le séparateur de pression	255
B.8	La diffusion quasi-élastique de neutrons	256
C	Liste (non exhaustive) des notations et abréviations	261
C.1	Neutrons	261
C.1.1	DNPA	261
C.1.2	QENS	262
C.2	Optique	262
C.2.1	fluorescence	262
C.2.2	absorbance UV-visible	263
C.2.3	dichroïsme circulaire	263
C.3	thermodynamique	263
C.4	chimie - biochimie	263

Première partie

Position du problème, éléments de théorie et méthodes

Chapitre 1

Introduction

Ce travail de thèse traite du dépliement des protéines. Ce problème n'est pas intéressant en soi, car les protéines dénaturées ne sont plus biologiquement actives. Il n'est intéressant que parce que le dépliement des protéines est le processus inverse du repliement ; et que donc, en étudiant le dépliement des protéines, on étudie du même coup le repliement des protéines, qui, lui est un sujet central en biologie. Très logiquement, ce manuscrit commence donc par quelques considérations générales sur le repliement des protéines. Cette partie sera cependant très succincte. Pour des revues sur le dépliement/repliement des protéines, voir [1, 2, 3, 4].

1.1 Considérations générales sur le repliement des protéines

Les protéines sont des chaînes d'acides aminés. Elles sont toutes constituées des mêmes types d'acides aminés (au nombre de vingt) dans des proportions différentes, et dans des ordres différents. La séquence en acides aminés, aussi appelée structure primaire, est codée, au niveau des gènes, dans l'ADN. Chaque protéine adopte une conformation compacte et active, appelée conformation native. On peut distinguer deux niveaux de structure dans les protéines (voir figure 1.1). Localement, les acides aminés adoptent des structures en hélices (hélices- α) ou en feuillets (feuillets- β). C'est la structure secondaire. Ces structures secondaires s'arrangent les unes par rapport aux autres pour former la structure tridimensionnelle de la protéine. C'est la structure tertiaire.

La fonction des protéines est étroitement dépendante de leur structure (ou conformation). L'étude de ce que l'on nomme la "relation structure/fonction" est par conséquent centrale en biologie. Cependant, les protéines étant synthétisées par les ribosomes de manière linéaire, leur fonction est également dépendante de leur capacité à se replier correctement dans des temps compatibles avec les temps biologiques (soit des temps allant de la centaine de microseconde à la minute).

Le mauvais repliement des protéines étant la source de nombreuses maladies[5] (telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson) ; en comprendre le fonctionnement constitue donc un enjeu important.

1.1.1 Le repliement - compensation entre énergie et entropie

Pour une protéine, se replier revient à passer d'une conformation dépliée, hautement dégénérée en énergie, à une conformation native "unique", ou du moins faiblement dégénérée en énergie. Cela revient également à passer d'une conformation où les interactions ne sont pas "optimisées" et donc d'énergie interne élevée, à une conformation d'énergie faible, où par exemple les acides aminés hydrophobes sont regroupés au coeur de la protéine et où les acides aminés hydrophilles sont exposés au solvant. Ainsi donc, dans l'état déplié, le terme ΔH élevé est compensé par un terme $T\Delta S$ élevé également, tandis que dans l'état natif, ces deux termes deviennent faibles. Pour atteindre l'état natif, la protéine doit donc passer une barrière d'énergie libre

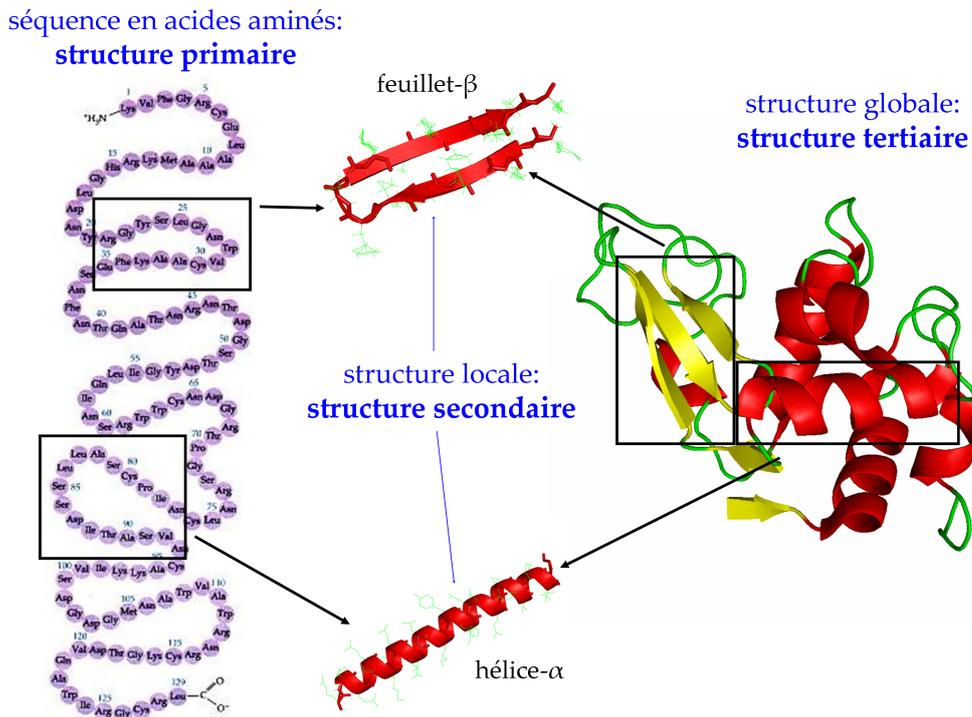


FIG. 1.1 – Les différents niveaux de structure des protéines. In vivo, les protéines sont synthétisées de manière linéaire. Cependant, la plupart d'entre elles ne sont fonctionnelles que sous leur forme repliée. In vivo, les protéines doivent donc se replier, et ce, dans des temps compatibles avec l'activité biologique.

1.1.2 Le paradoxe de Levinthal

Comprendre le repliement n'est cependant pas chose facile. En effet, en 1968, Levinthal [6] a montré qu'un simple modèle "à deux états" ne pouvait en aucune manière décrire le repliement des protéines. Un modèle à deux états signifie qu'il n'existe que deux états pour la protéine : l'état natif, qui correspond à la conformation native de la protéine, considérée unique, et l'état déplié, hautement dégénéré en énergie (il s'agit ici d'énergie interne, et non d'énergie libre), qui correspond à l'ensemble des conformations dépliées de la protéine. Une représentation en paysage énergétique de ce modèle donne un paysage "en terrain de golf" (voir figure 1.3). D'un point de vue cinétique, le repliement s'apparente donc à une marche au hasard. Un calcul "naïf" (avec des hypothèses rudimentaires, conduisant à une borne inférieure, largement sous-estimée, du temps de repliement) démontre que ce modèle ne peut en aucune manière rendre compte du repliement des protéines. On peut en effet considérer qu'il existe au moins deux conformations différentes pour chaque acide aminé dans une protéine. Une petite protéine de 100 résidus a donc au moins 2^{100} conformations différentes. On peut aussi considérer qu'il faut au moins 1 ps pour passer d'une conformation à une autre. Dans le cadre d'une marche au hasard, on obtient donc des temps de repliement supérieurs à 10^{10} ans, et donc supérieurs à l'âge de l'univers. Ceci a été baptisé paradoxe de Levinthal.

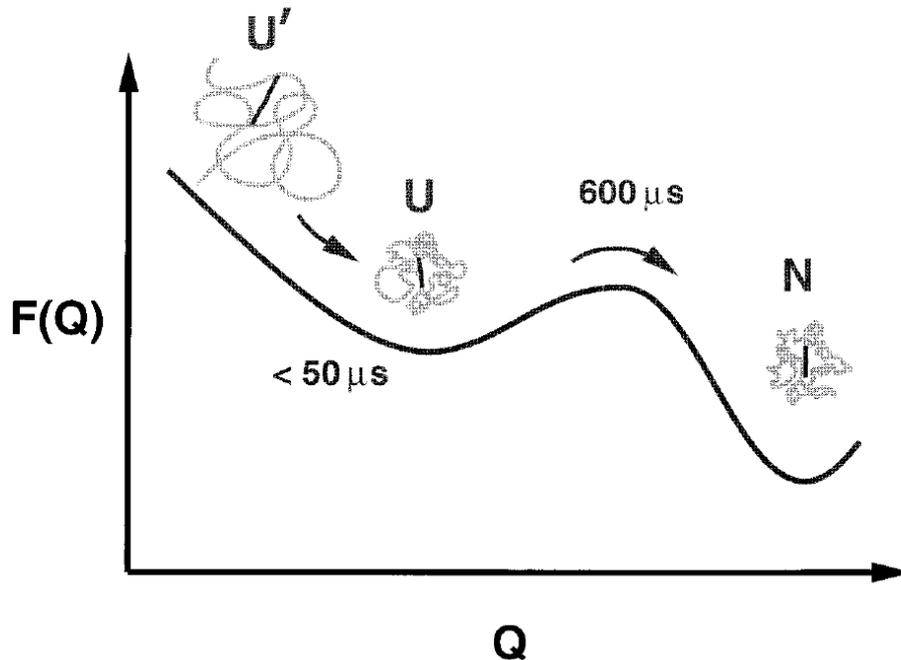


FIG. 1.2 – Energie libre en fonction d'une coordonnée de réaction, Q , mesurant la "nativité" de la structure. Un choix courant pour Q est le nombre de contacts natifs. Ce schéma illustre (il ne s'agit que d'une illustration, pas d'une représentation exacte ou réelle) donc l'évolution de l'énergie libre d'une protéine au cours de son repliement.

1.1.3 Les modèles séquentiels

Il est donc évident que les protéines n'explorent qu'une très faible fraction de l'espace des phases lors du repliement. Pour expliquer cette réduction de l'espace des phases, Levinthal propose l'existence de "chemins préférentiels" de repliement. Les protéines seraient "guidées" par une succession d'états intermédiaires [7] (voir figure 1.4). La réaction de repliement serait donc quasi-linéaire, et donc infiniment plus rapide qu'une marche au hasard dans tout l'espace des phases. Cette vision a été renforcée par la découverte de nombreux états intermédiaires dans le chemin de dépliement des protéines [4, 1], et a prévalu jusqu'à la fin des années 90.

1.1.4 La vision ensembliste - Le modèle de l'entonnoir

Ces modèles séquentiels ont cependant été mis à mal par plusieurs expériences qui, au milieu des années 90, ont mis en évidence des repliements rapides (sub-milliseconde) suivant des cinétiques mono-exponentielles (\Leftrightarrow modèle à deux états), et donc sans états intermédiaires [8, 9, 10]. Une nouvelle vision du repliement des protéines est ainsi apparue à la fin des années 90 : la vision ensembliste, aussi appelée "new-view" [11, 2].

Cette nouvelle vision repose sur l'idée suivante : "*When perfect randomness is not the driver, the*

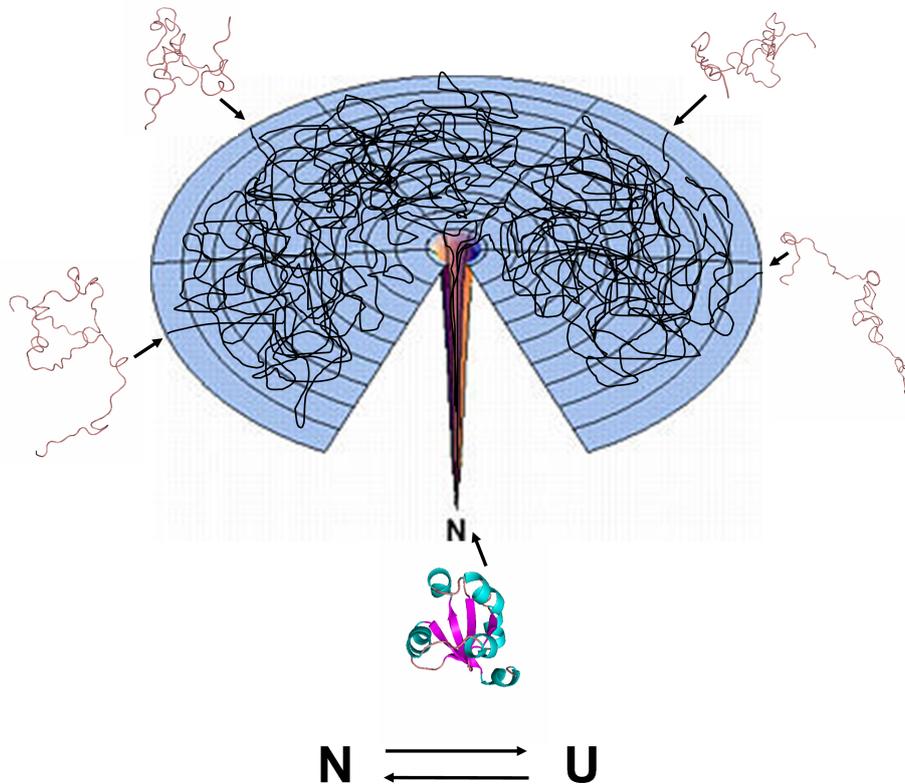


FIG. 1.3 – Le paysage énergétique en terrain de golf de Levinthal, correspondant au modèle à deux états Natif \leftrightarrow Déplié. Toutes les conformations dépliées sont dégénérées en énergie. La conformation native, unique, à une énergie (libre) plus faible. Les protéines dépliées "recherchent au hasard leur conformation native". Ce modèle est irréaliste : une estimation grossière d'une borne inférieure du temps de repliement d'une protéine de taille moyenne (100 résidus) est de 10^{10} ans.

vastness of the search becomes irrelevant to the search time [12]. En clair, le paradoxe de Levinthal n'a de sens que si les conformations dénaturées des protéines sont dégénérées en énergie : "On a large flat golf course, a golf ball will never find the hole by random processes, but if the golf course has even a small tilt that funnels toward the hole, no problem ! [2]". D'après Dill, le bon paysage énergétique n'est pas un paysage énergétique en terrain de golf, mais un paysage énergétique en entonnoir : l'effondrement hydrophobe lève la dégénérescence des états dénaturés, et creuse le paysage énergétique des protéines. En effet, les conformations où les résidus hydrophobes sont regroupés en un coeur plus ou moins compact ont une énergie interne plus faible que celles où ces résidus sont dispersés et exposés au solvant. De plus, l'effondrement hydrophobe conduit à un nombre de plus en plus restreint de conformations, de plus en plus compactes, parmi lesquelles la conformation native. Les protéines ne sont donc plus vues comme recherchant au hasard leur conformation native, ou comme guidées par une rigole vers le trou central du terrain de golf, mais comme tombant dans un entonnoir (voir figure 1.5).

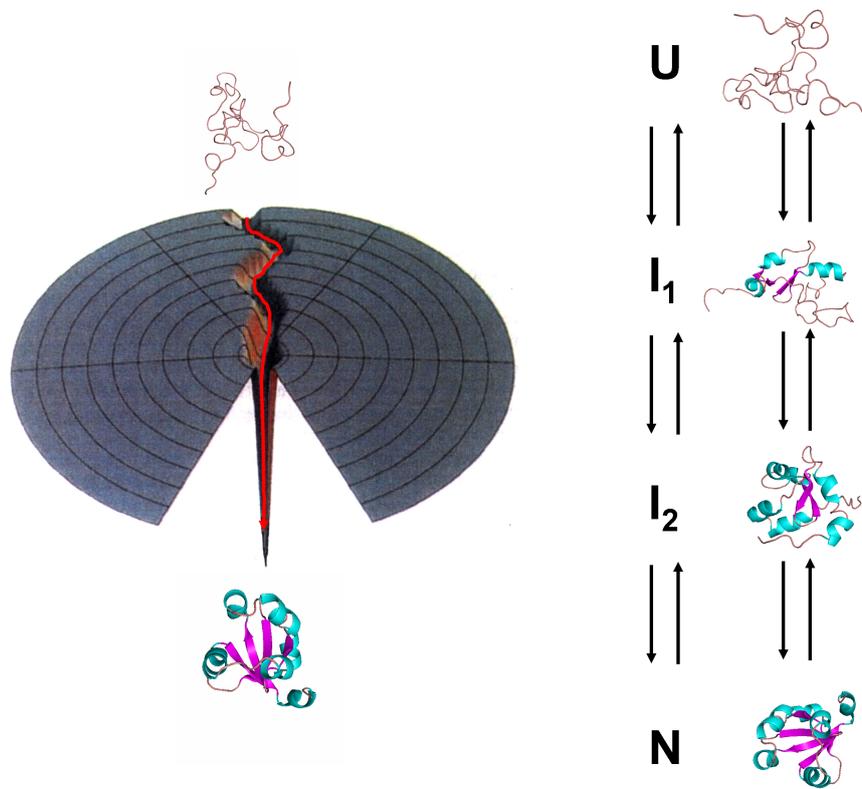


FIG. 1.4 – Le paysage énergétique de la rigole, correspondant au modèle du chemin préférentiel, ou modèle séquentiel. Les protéines sont "guidées le long d'une rigole" par une succession d'états intermédiaires. Ces états intermédiaires réduisent l'espace des phases exploré par les protéines, permettant de retrouver des temps compatibles avec les temps biologiques. Plus grand est le nombre d'états intermédiaire, plus court est le temps de repliement, car plus l'espace des phases exploré est court. Ce modèle semble cependant peu réaliste, car il suppose une conformation dénaturée de départ particulière.

Dans le cas de l'entonnoir de la figure 1.5, les protéines se replient rapidement selon des cinétiques mono-exponentielles. L'entonnoir n'est cependant pas forcément lisse. L'interaction hydrophobe n'est en effet pas la seule en jeu dans les protéines. L'entonnoir peut être "rugueux", avec des creux (\Leftrightarrow pièges cinétiques) et des bosses (\Leftrightarrow barrières énergétiques), comme présenté dans la figure 1.6. Cette rugosité introduit des états intermédiaires observables. La vision ensembliste permet donc d'expliquer à la fois des dépliements/repliements "à deux états" pour certaines protéines, ainsi que la présence d'états intermédiaires dans les chemins de dépliement/repliement d'autres protéines. Elle peut en outre expliquer le mauvais repliement, ainsi que l'irréversibilité du dépliement de certaines protéines.

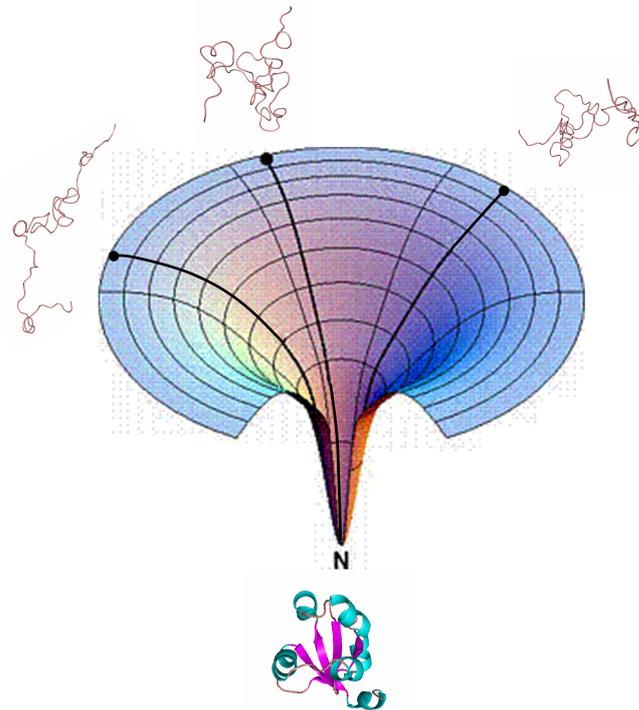


FIG. 1.5 – Paysage énergétique de l'entonnoir de Dill. Les conformations dépliées ne sont pas dégénérées en énergie. L'effondrement hydrophobe lève la dégénérescence des états dénaturés. Plus les conformations sont compactes, avec un coeur hydrophobe structuré, plus leur énergie est faible. Ceci transforme le "terrain de golf" de Levinthal en entonnoir, avec l'état natif au centre. Les protéines ne recherchent plus au hasard leur conformation native sur un terrain de golf ; mais tombent dans l'entonnoir, vers l'état natif. La vitesse du repliement n'est plus limitée que par les vitesse de diffusion des résidus.

Dans la vision ensembliste, les états intermédiaires ne sont plus des "*relais de poste*" accélérant le repliement, mais au contraire des pièges cinétiques le ralentissant. Le repliement n'est plus un processus linéaire, mais se fait de manière parallèle. Les repliements à "deux états" ne sont plus des artefacts paradoxaux, mais impliquent un repliement rapide et fortement coopératif.

1.1.5 Le repliement et le "folding problem"

La résolution du "*folding problem*" est le graal des biologistes et biophysiciens. Il s'agit de comprendre la relation qui existe entre structure primaire et conformation native ; et de prédire la structure d'une protéine à partir de sa seule séquence. Résoudre ce problème ainsi que sa réciproque, "*l'inverse folding problem*", constituerait une avancée décisive pour la recherche pharmaceutique. Cela permettrait en effet de pouvoir trouver la ou les séquences qui correspondent à une structure donnée. La fonction étant donnée par la structure, cela permettrait donc de trouver la ou les séquences correspondant à la fonction désirée. Cela permettrait donc une recherche et une mise au point rationnelle de nouvelles drogues associée à des protéines cibles. Il est cependant

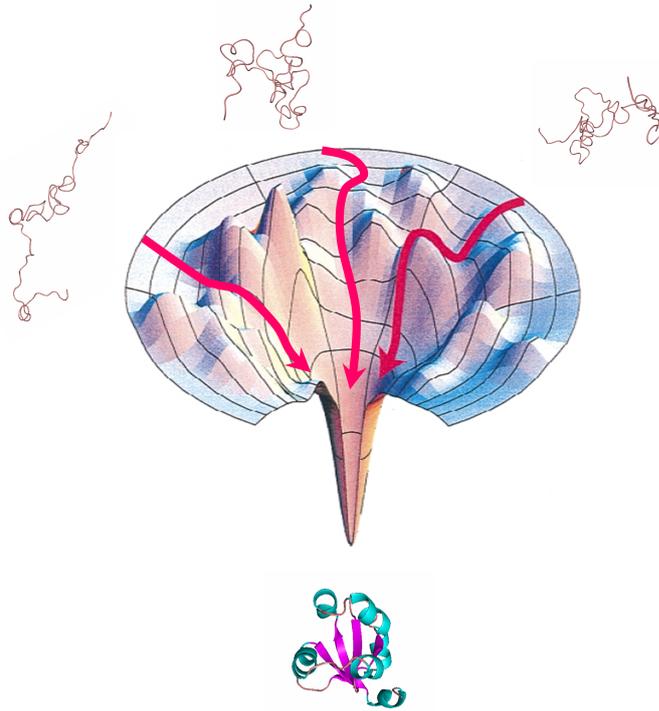


FIG. 1.6 – Paysage énergétique de l'entonnoir rugueux de Dill, variante de l'entonnoir lisse de la figure précédente (1.5). Il n'y a en effet aucune raison (surtout pour les protéines de taille importante) que l'énergie interne soit une fonction monotone de la compacité, ni même qu'elle soit une fonction de la compacité uniquement. En effet, même si l'effondrement hydrophobe semble être le moteur principal du repliement des protéines, il y a d'autres interactions en jeu dans les protéines : interaction électrostatique, liaisons hydrogènes, etc. Il n'y a donc aucune raison que l'entonnoir soit lisse. Il peut avoir une certaine "rugosité". Cette rugosité entraîne l'apparition "d'états intermédiaires", qui apparaissent maintenant comme des pièges cinétiques, ralentissant le repliement ; et non plus l'accélérateur, comme dans le cadre des modèles séquentiels (fig 1.4).

clair que la résolution du "*folding problem*" passe d'abord par une compréhension du repliement.

1.2 Objectifs de la thèse

Le modèle de l'entonnoir repose entièrement sur la non-dégénérescence des conformations dépliées des protéines. Il est donc essentiel de bien caractériser ces conformations. La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) est une technique riche, bien adaptée aux études structurales de macromolécules biologiques en solution. Le premier objectif de cette thèse est donc de caractériser les conformations dénaturées d'une protéine modèle, la calmoduline ; et notamment de comparer les conformation dénaturées par la chaleur et la pression. De nombreux modèles de repliement des protéines font intervenir des états intermédiaires. En l'absence d'états intermédiaires la théorie prévoit des diagrammes de phase (P,T) elliptiques, et donc des chemins de dénaturation en température et sous pression identiques. Comparer les chemins de dénaturation en température

et sous pression est donc un bon moyen de mettre à jour des états intermédiaires. La pression, bien que très délicate à appliquer techniquement, est ainsi indispensable pour étudier le dépliement et le repliement des protéines. Elle a de plus, généralement, l'avantage considérable d'éviter l'agrégation des protéines dénaturées, et de permettre ainsi des études précises de la conformation des états dépliés d'un grand nombre de protéines, dans des conditions (pH, force ionique, ...) variées, pour lesquelles les protéines (natives ou dénaturées) s'agrègent sous l'effet de la température.

Le dépliement d'une protéine est la réaction inverse du repliement ; nous nous sommes donc tout particulièrement attachés à étudier la réversibilité (ou l'irréversibilité) des dénaturations thermiques et sous pression de la calmoduline, notre système modèle. Derrière tous les problèmes d'irréversibilité de dénaturations se cache de plus le problème de "mauvais repliement" ou "*misfolding*". Un autre objectif de cette thèse est donc l'étude de la thermodynamique de la dénaturation thermique et sous pression de la calmoduline, et de la réversibilité de ces dénaturations.

Les protéines ne sont pas des objets statiques, mais des objets dynamiques ; toute étude des états natifs et dénaturés d'une protéine serait donc incomplète sans une étude dynamique. La diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol (IQENS-TOF) permet de sonder la dynamique interne de macromolécules hydrogénées, et est donc bien adaptée à l'étude de protéines.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes également intéressés à un système oligomérique, et donc plus complexe que la calmoduline, la C-phycoyanine (C-PC), une protéine photosynthétique ayant fait l'objet de nombreuses études au sein du groupe "Biologie et systèmes désordonnés" du Laboratoire Léon Brillouin. Ce système nous a amenés, un peu malgré nous, à l'étude de dénaturations hors équilibre. Ceci fera l'objet de la dernière partie de cette thèse.

1.3 Présentation de la calmoduline

Le premier système choisi pour les études de dépliement/repliement est la calmoduline. Dans ce chapitre, notre objectif est de présenter la calmoduline, et plus précisément sa structure et sa fonction biologique ; ainsi que d'expliquer en quoi cette protéine est un bon système modèle, parfaitement adapté aux études de dépliement/repliement.

1.3.1 La calmoduline dans le monde du vivant

La calmoduline (CaM) est une calci-protéine, tout comme ses deux protéines "soeurs", la troponine C et la parvalbumine. Elle est présente dans toutes les cellules eucaryotes du monde animal, végétal, ou protiste. Chez l'animal, elle est présente, en particulier, dans le cerveau, les testicules, le pancréas et les muscles lisses [13]. Elle est impliquée dans de nombreux mécanismes faisant intervenir le calcium. Elle participe notamment à la régulation du métabolisme des nucléotides cycliques (adénylate cyclase, phosphodiesterase des nucléotides cycliques), et du métabolisme

énergétique (NAD kinase des plantes et des oursins de mer, phosphorylase kinase, phosphatase); à la biosynthèse et la libération des neurotransmetteurs (kinase des tryptophanes 5 et tyrosine 3 monooxygénase, NO synthase); à la régulation de la concentration intracellulaire en calcium (ATPase(Ca^{2+}/Mg^{2+})); à la contraction du muscle lisse (kinase des chaînes légères de myosine); aux divisions et proliférations cellulaires; et enfin à la sécrétion et à la motilité cellulaire [14] [15].

1.3.2 De la structure à la fonction

La fonction

De nombreux mécanismes cellulaires, tels la division cellulaire, la contraction musculaire, la biosynthèse des neurotransmetteurs et bien d'autres, sont régulés par le calcium. Pourtant, les protéines impliquées dans ces mécanismes ne sont pas directement sensibles au calcium. La cellule a donc besoin de protéine relais du signal calcique : ce sont les calci-protéines, dont fait partie la calmoduline.

Le rôle de régulateur très universel du calcium est dû en partie à la différence de concentration du cation Ca^{2+} entre le milieu extra- et intra-cellulaire. Chez les vertébrés, le calcium extra-cellulaire est en équilibre lent avec l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ formant le squelette [13]. La concentration extra-cellulaire est donc de 10^{-3} M, alors que la concentration intracellulaire est de 10^{-7} M. Suite à un stimulus externe, la concentration intracellulaire de calcium peut donc brusquement passer de 100 nM à 10 μ M par l'ouverture temporaire des canaux calciques de la membrane plasmique, ou des réservoirs internes comme le réticulum sarcoplasmique. A ce stade, il convient de noter que l'affinité de la calmoduline pour le calcium est de l'ordre du μ M. Quand la concentration en Ca^{2+} est de 100 nM, la calmoduline est donc libre de calcium. On dit qu'elle est sous forme apo. Quand la concentration en Ca^{2+} est de 10 μ M, la calmoduline est saturée en calcium (elle fixe 4 ions Ca^{2+}). On dit alors qu'elle est sous forme holo. Les protéines cibles de la calmoduline sont insensibles à la forme apo, mais elles sont activées par la forme holo. Au repos, les calmodulines sont donc sous forme apo. Suite à un stimulus externe, la concentration intra-cellulaire en calcium augmente brusquement jusqu'à 10 μ M. Les calmodulines passent alors sous la forme holo, se fixent sur leurs protéines cibles et les activent. Celles-ci déclenchent à leur tour le mécanisme cellulaire visé. Quand la concentration intracellulaire en calcium retombe à 100 nM, les calmodulines se séparent de leurs protéines cibles et retournent sous la forme apo. Le système est revenu à son état initial et est prêt pour un nouveau cycle.

Structure de la calmoduline

La calmoduline est une protéine soluble de 17 kDa. Souvent comparée à une haltère, elle est constituée de deux domaines N- et C-terminaux, reliés par une hélice α centrale de huit tours (28 résidus). Les deux domaines présentent un fort taux d'homologie en séquence (69%). Ils sont constitués de 3 hélices α et possèdent deux sites de fixation du calcium, ainsi qu'une zone riche

en sites hydrophobes, appelée poche hydrophobe [16]. Les deux poches, ayant pour dimension 10 Åx 12.5 Åx 9.5 Å, présentent 71% d'homologie dans la composition en acides aminés (Voir Tableau 1.1).

poche N-terminale	poche C-terminale
Phe 19	Phe 92
Ile 27	Ile 100
Leu 32	Leu 105
Val 35	Val 108
Met 36	Met 109
Pro 43	Leu 116
Leu 48	Val 121
Met 51	Met 124
Ile 52	Ile 125
Val 55	Ala 128
Ile 63	Val 136
Phe 68	Phe 141
Met 71	Met 144
Met 72	Met 145

TAB. 1.1 – Résidus de la calmoduline impliqués dans les poches hydrophobes .

Les sites de fixation du calcium

Les quatre sites de fixation du calcium de la calmoduline sont des sites "Main EF" (ou "EF-Hands"). On retrouve ce type de site, décrit pour la première fois par Kretsinger et Nockolds en 1973 [17], dans la parvalbumine ainsi que dans la troponine C. Les sites "Main EF" sont constitués de deux hélices α orthogonales reliées par une boucle de douze acides aminés (voir figure 1.7). Les cinq premiers ligands de l'ion Ca^{2+} sont les atomes d'oxygène des chaînes latérales des premier, troisième, cinquième et douzième résidus de la boucle. Ils sont conservés dans tous les motifs "main-EF". Le sixième ligand est l'oxygène du groupement carbonyle du septième résidu. Ce résidu est moins conservé dans les différents motifs "main-EF" que les quatre cités précédemment. Le dernier ligand de l'ion calcium est l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau. Ces sites peuvent aussi fixer des ions magnésium, mais avec une affinité environ 100 fois plus faible.

La structure de la calmoduline en l'absence de calcium (apoCaM) a été obtenue par RMN en solution. La structure moyenne, disponible dans la Protein Data Bank sous l'identifiant 1CFD, est représentée sur la figure 1.8. L'hélice centrale est partiellement destructurée en son milieu, et les poches hydrophobes sont enfouies.

Effets de la fixation du calcium - apoCaM et holoCaM

La fixation du calcium induit un changement conformationnel de la calmoduline. Il se traduit par une augmentation du rayon de giration [18], ainsi que par une augmentation, d'un facteur

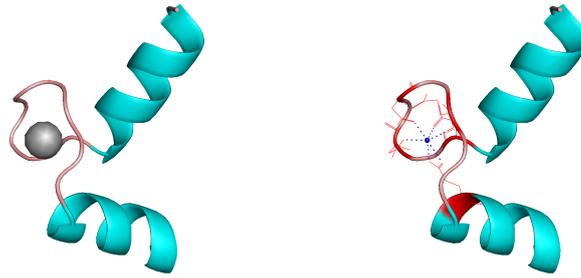


FIG. 1.7 – Site de fixation du calcium en "main EF", constitué de deux hélices α orthogonales reliées par une boucle de douze acides aminés.

27, de l'intensité de fluorescence du 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) en présence de calmoduline [19]. Ces deux phénomènes sont dûs respectivement à une augmentation de la distance interdomaine, et à l'exposition des poches hydrophobes.

La structure cristallographique de la calmoduline en présence de calcium (holoCaM) a été résolue à 1 Å [20], et est disponible dans la Protein Data Bank sous l'identifiant 1EXR. Comme on peut le voir sur la figure 1.9, l'hélice α centrale est maintenant complète, augmentant ainsi la distance interdomaine. On peut, en outre, constater que les poches hydrophobes sont plus exposées au solvant.

Il est à noter que la fixation du calcium affecte la conformation de la calmoduline ; mais affecte également sa stabilité. Si la forme apo de la calmoduline est dépliée à 70°C 4.1, la forme holo est stable jusqu'à 100°C [21]. De plus, si la forme apo de la calmoduline est dépliée en présence de 6 M d'urée, il faut 9,5 M pour déplier la forme holo [22].

La fixation de la calmoduline aux peptides cibles

La fixation du calcium et les modifications structurales qui s'ensuivent permettent la formation de complexes calmoduline - peptides cibles. Par exemple, l'affinité de la calmoduline pour la melittine passe de 10 μ M en l'absence de calcium, à 3 nM en présence de calcium [23]. Soit un rapport de 3000. Elle permet aussi la fixation de drogues hydrophobes, tels les composés de la famille des phénothiazines et des naphthalènesulfonamides. Ces drogues agissent comme des antagonistes de la calmoduline car elles inhibent son effet sur ses peptides cibles. Tanaka et al. ont montré que l'affinité pour la calmoduline des drogues hydrophobes, ainsi que leur capacité d'inhibition, étaient directement reliées à leur hydrophobicité. Il est donc clair que les poches hydrophobes de la calmoduline ont un rôle crucial dans la formation des complexes calmoduline-peptides cibles. Ceci est confirmé par les structures cristallographiques desdits complexes. On peut en effet voir sur la figure 1.10 que les peptides cibles sont ancrés aux poches hydrophobes.

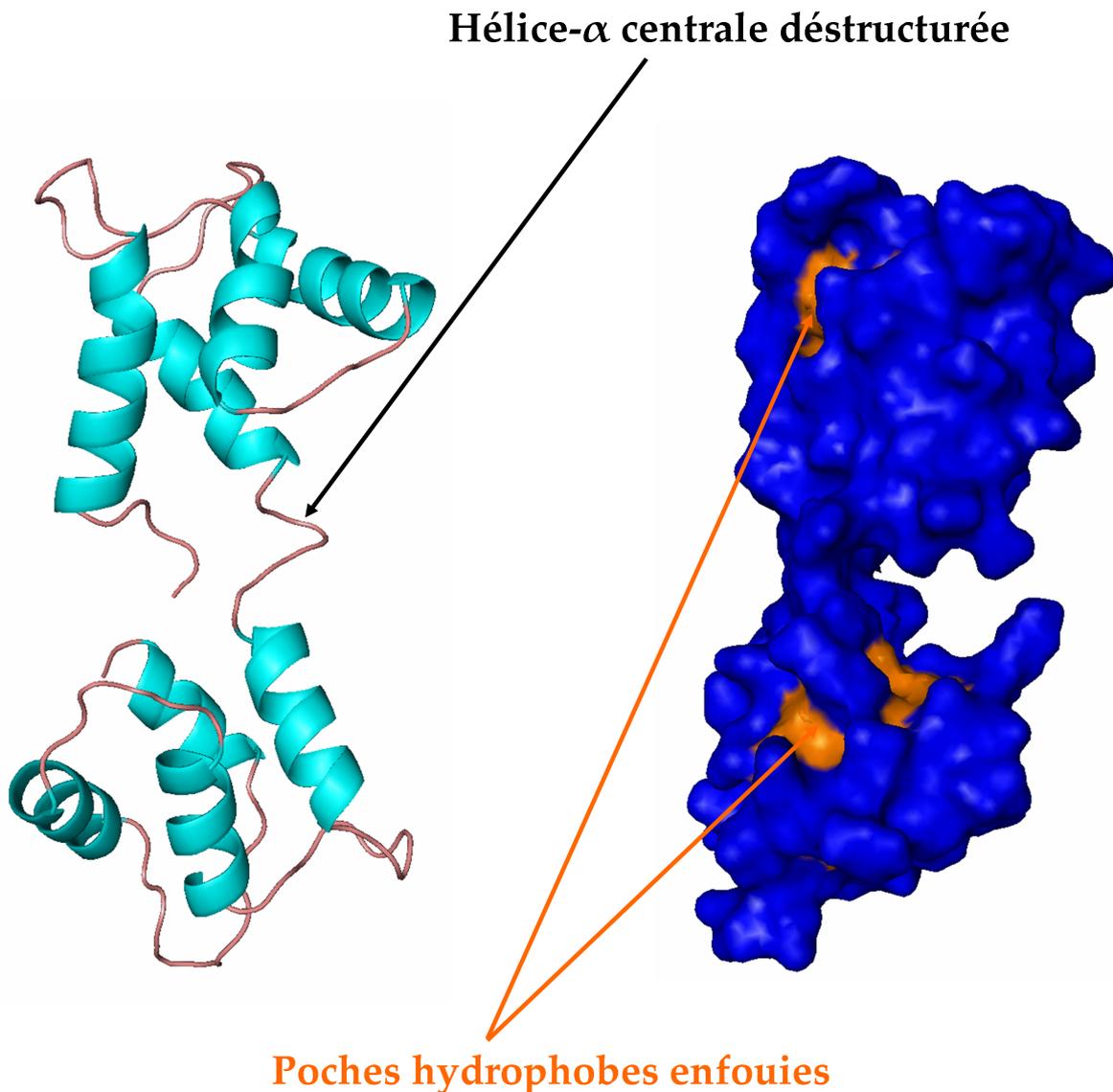


FIG. 1.8 – Structure cristallographique de l'apo-calmoduline (1CFD). À droite, les poches hydrophobes de la calmoduline sont représentées en orange. L'hélice- α centrale, reliant les domaines N- et C-terminaux, est partiellement déstructurée. Les poches hydrophobes sont enfouies, ce qui ne permet pas la fixation aux peptides cibles.

La calmoduline - une protéine flexible en solution

Jusqu'ici nous avons raisonné avec une vision statique de la calmoduline. Or la calmoduline est très flexible en solution, que ce soit sous sa forme apo ou sous sa forme holo. Des structures cristallographiques ont été résolues pour ces deux formes et sont disponibles dans la Protein Data Bank. Toute une série de structures ont été publiées pour la forme holo, et entre autres : [1EXR](#) [20], [1PRW](#) [26] et [1Y6W](#) [27]. Ces structures semblent radicalement différentes, et ne peuvent

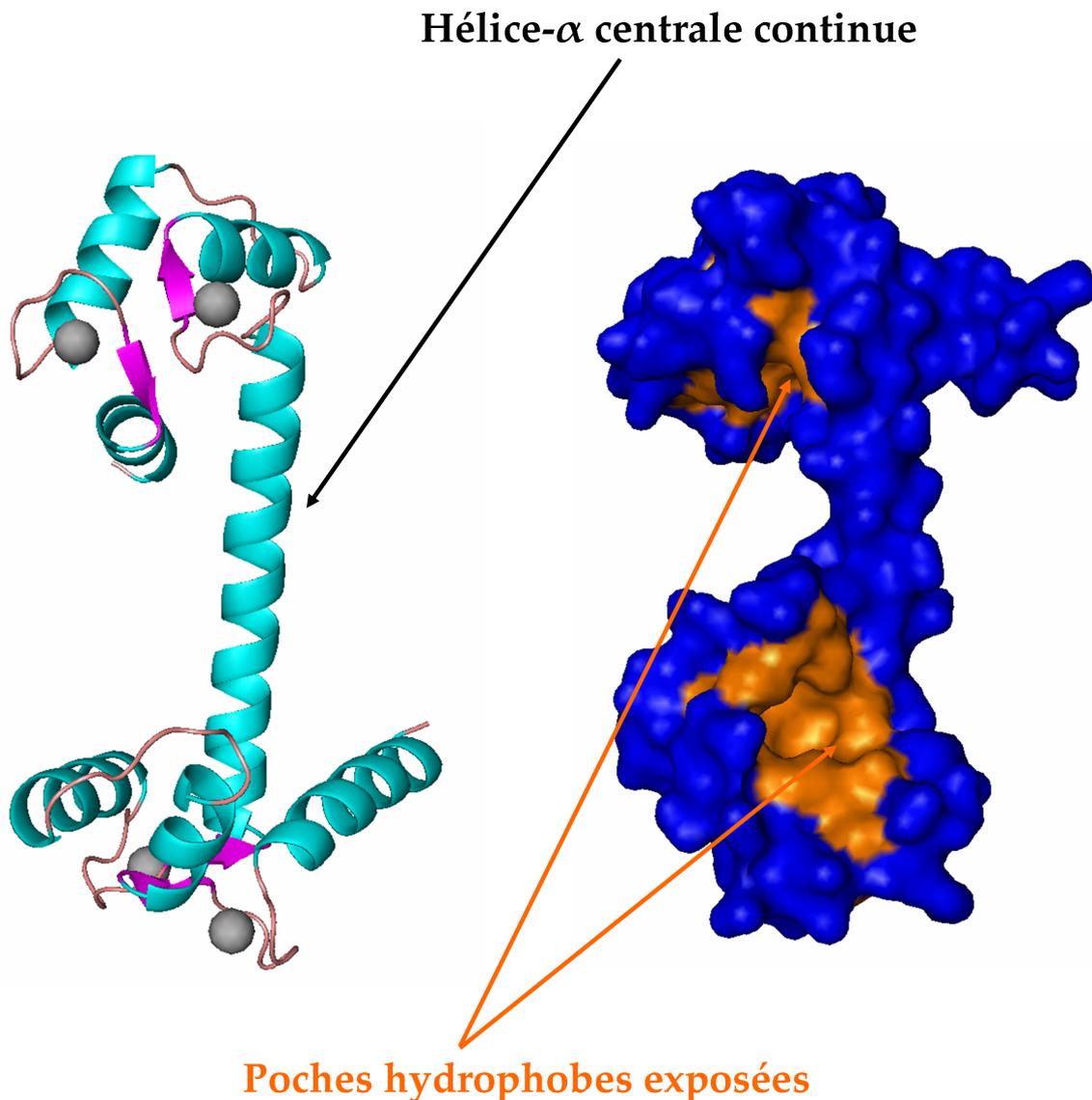


FIG. 1.9 – Structure cristallographique de l'holo-calmoduline (1EXR). A gauche, représentation en rubans. A droite, représentation de la surface de la calmoduline. Les poches hydrophobes de la calmoduline sont apparaissent en orange. L'hélice- α centrale, reliant les domaines N- et C-terminaux, est complète. Les poches hydrophobes sont exposées au solvant, ce qui permet la fixation aux peptides cibles.

être alignées sur toute la séquence. Cependant un alignement partiel peut être réalisé sur le domaine C-terminal uniquement (voir figure 1.11), indiquant que ces structures ne diffèrent en fait que par l'orientation relative des domaines C- et N-terminaux. Ceci laisse supposer une flexibilité de l'hélice- α centrale (également appelée "linker" central) de l'apo-calmoduline et donc une dynamique réorientationnelle des domaines en solution. Pour la forme apo, une seule structure

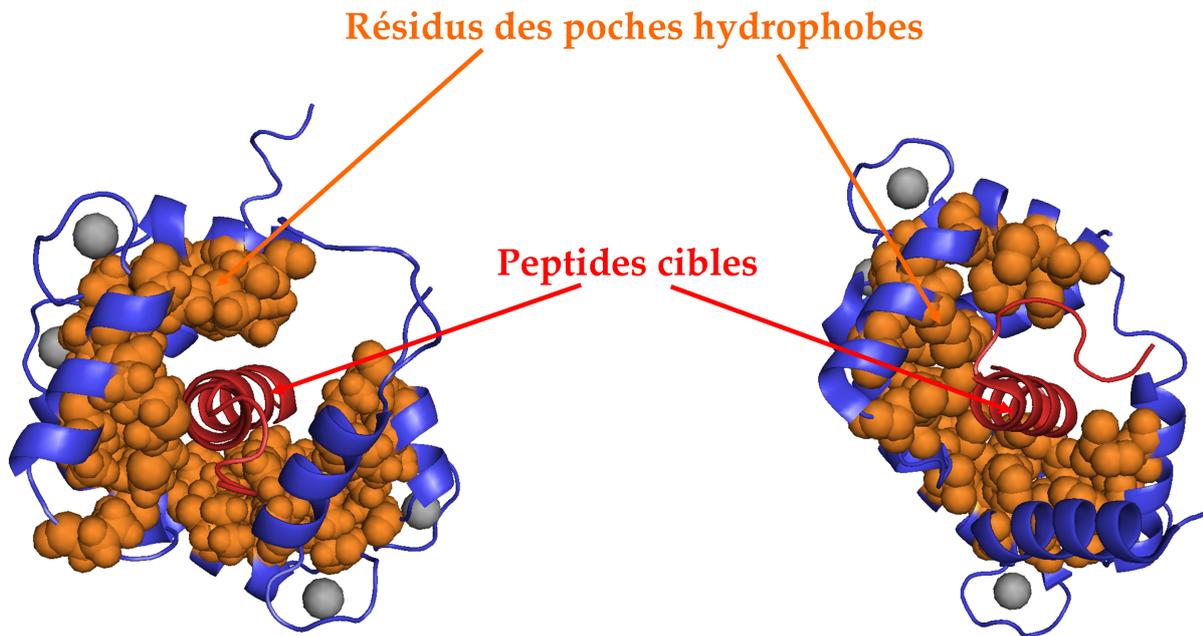


FIG. 1.10 – Structures cristallographiques de l'holo-calmoduline (en bleu) en présence de peptides cibles (en rouge) : fragment de kinase des chaînes légères de myosine (code pdb 2BBM [24]) à gauche et fragment de kinase dépendante de la calmoduline (code pdb 1IQ5 [25]) à droite. Les résidus des poches hydrophobes de la calmoduline sont représentés par des sphères oranges. On peut voir que la calmoduline "enserme" les peptides cibles ; et que ceux-ci sont ancrés aux poches hydrophobes. Ces dernières jouent un rôle crucial dans la fixation aux peptides cibles.

cristallographique est disponible sous le code pdb 1QX5 [28], et une telle comparaison n'est donc pas possible.

Une autre confirmation de cette flexibilité du linker central et de la dynamique réorientationnelle des domaines en solution vient de la RMN. En effet, les structures en solution des formes apo et holo de la calmoduline ont été résolues par RMN, et sont disponibles dans la Protein Data Bank sous les codes 1CFC [29] et 1X02 [30] respectivement. Ces structures pdb contiennent en fait des familles de structures (20 pour la forme holo, 25 pour la forme apo). On peut voir sur la figure 1.12 que ces structures peuvent également s'aligner sur le domaine C-terminal, et ne diffèrent que par l'orientation respective des deux domaines.

La diffusion de neutrons aux petits angles confirme la présence des multiples conformères vus en RMN. On peut voir sur la figure 1.13 que le spectre de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline correspond à la structure moyenne donnée par la RMN (1CFD), et non pas à la structure cristallographique (1QX5). De telles différences entre structure cristallographique et spectre de diffusion aux petits angles en solution avaient déjà été observées pour la forme apo [31].

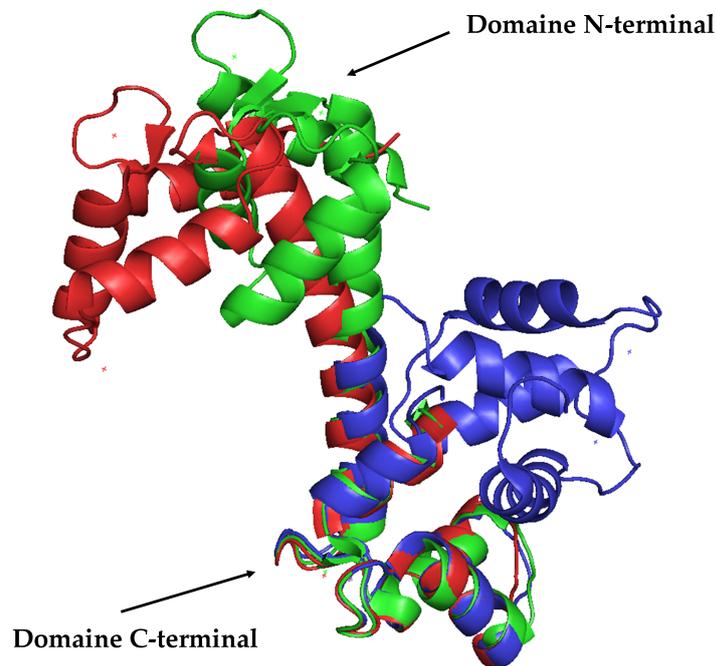


FIG. 1.11 – Structures cristallographiques **1EXR** (en rouge), **1PRW** (en vert) et **1Y6W** (en bleu) de la forme holo de la calmoduline. Les structures sont alignées sur le domaine C-terminal uniquement, car il est impossible de les aligner sur la totalité de la séquence. Il est cependant possible de les aligner sur le domaine N-terminal uniquement. Ceci montre que toutes ces structures sont des conformères, se différenciant uniquement par l'orientation relative des deux domaines.

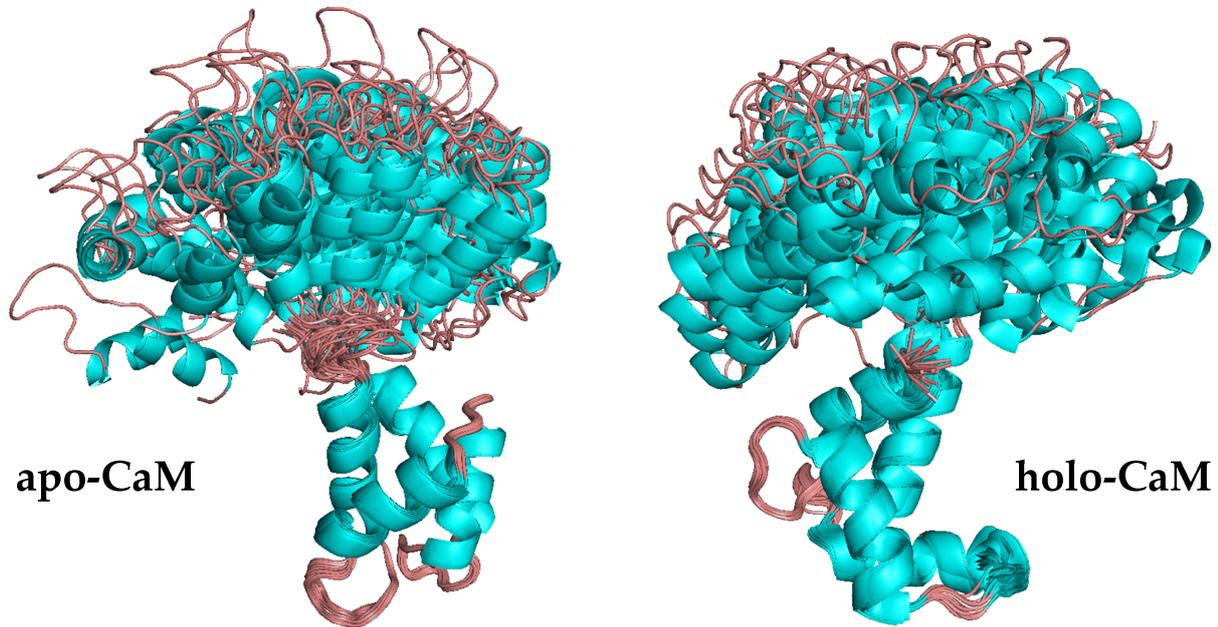
1.3.3 La calmoduline : un bon système modèle

La calmoduline est un très bon système modèle pour l'étude du *protein folding problem*, pour les raisons fondamentales et pratiques suivantes :

La calmoduline et le *folding problem*

La résolution du *protein folding problem* passe par une meilleure compréhension de la relation séquence-"energy-landscape" des protéines, et donc de la relation séquence-stabilité (voir 1.1). Or, les deux domaines de la calmoduline, bien que présentant un très fort taux d'homologie de séquence (70%) et un repliement identique, ont des stabilités sensiblement différentes [32]. Les 30% d'acides aminés qui diffèrent d'un domaine à l'autre n'ont donc pas d'influence sur la structure native de ces domaines, mais ont une influence notable sur leur stabilité. La résolution du *protein folding problem* passe aussi par une meilleure connaissance des interactions "moteur" du repliement. La fixation du calcium par la calmoduline modifie l'électrostatique du système. Cela induit des modifications conformationnelles importantes [18, 19], et modifie radicalement la stabilité de la

Domaine N-terminal



Domaine C-terminal

FIG. 1.12 – Structures RMN en solution des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de la calmoduline. Les différentes structures de chaque "famille" sont alignés sur le domaine C-terminal uniquement. Comme pour la figure précédente (fig. 1.11), les différentes structures peuvent également être alignées sur le domaine N-terminal uniquement ; mais ne peuvent pas l'être sur toute la séquence. Encore une fois, ceci montre que toutes ces structures sont des conformères, ne différant que par l'orientation respective des deux domaines.

calmoduline [33, 34, 22].

La calmoduline et les neutrons - Stabilité colloïdale

D'un point de vue pratique, la calmoduline est un très bon système. Tout particulièrement pour les études de dépliement/repliement en température et sous pression par diffusion de neutrons, qui sont l'objet de cette thèse. Les mesures par diffusion de neutrons nécessitent à la fois des concentrations élevées (de l'ordre de 10 g/L pour les mesures de diffusion de neutrons aux petits angles, et de l'ordre de 100 g/L pour les mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons), et des solutions non-agrégées.

Il n'existe pas d'expression littérale pour le potentiel d'interactions interprotéines. En effet, les protéines sont des objets de forme quelconque, avec des charges et des zones hydrophobes réparties de façon hétérogène à leur surface. Cependant, en négligeant les interactions hydrophobes, et en assimilant les protéines à des sphères dures de rayon a , portant une charge Z_p uniformément

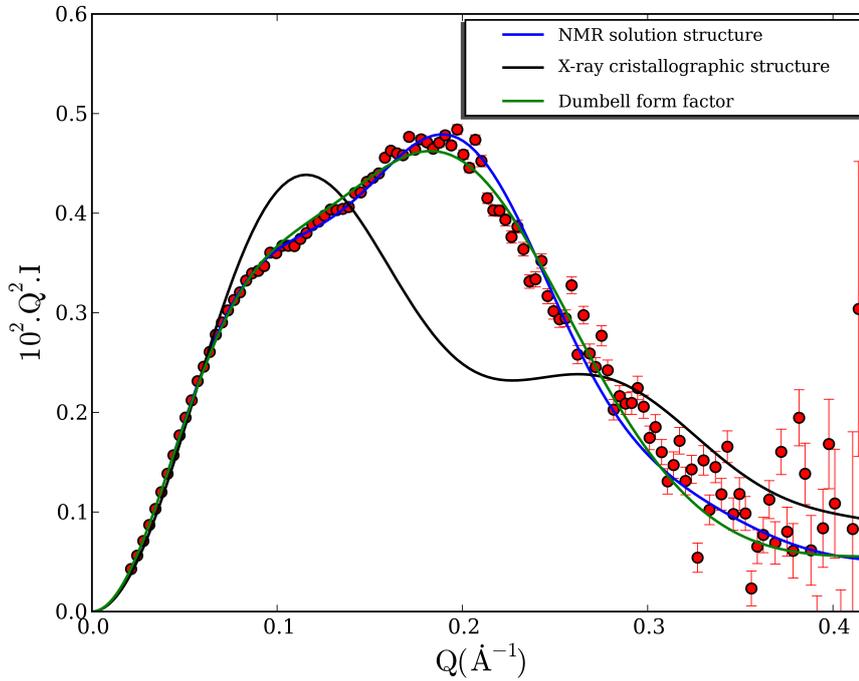


FIG. 1.13 – Représentation de kratky ($Q^2I(Q) = f(Q)$) d'un spectre DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native (\circ), et comparaison avec les spectres simulés à partir des structures RMN **1CFD** (—) et cristallographique **1QX5** (—). En vert, facteur de forme d'un modèle géométrique simple : le modèle "dumbell". La structure RMN en solution, ainsi que le modèle géométrique simple correspondent bien aux données DNPA ; alors que la structure cristallographique est très différente de ces données. Le fait que le modèle géométrique simple reproduise bien les données montre que le problème de la structure cristallographique ne vient pas de la forme des domaines (dans le modèle "dumbell" ceux-ci sont assimilés à des sphères de 15 Å), mais vient d'une mauvaise distance inter-domaines.

répartie, on retrouve le potentiel de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) [35, 36]. Ce potentiel peut être décomposé en trois composantes :

- Une partie répulsive à longue portée, d'origine électrostatique. Un traitement de Poisson-Boltzmann donne une expression pour ce potentiel d'interactions électrostatiques, pour des particules de charge Z_p et de rayon a , avec $1/\kappa$ la longueur de Debye :

$$\frac{V_{pp}(r)}{kT} = \frac{Z_p^2 L_B}{r} \frac{e^{-\kappa(r-2a)}}{(1 + \kappa a)^2}$$

- Une partie attractive, due aux interactions de Van der Waals. On obtient pour le potentiel de Van de Waals :

$$\frac{V_{vdW}(r)}{kT} = -\frac{A}{6} \left[\frac{2a^2}{r^2 - aR^2} + \frac{2a^2}{r^2} + \ln\left(1 - \frac{4a^2}{r^2}\right) \right]$$

- Et le potentiel de coeur dur :

$$V_{SD} = +\infty \quad \text{si } r \leq a$$

$$V_{SD} = 0 \quad \text{si } r > a$$

Une illustration du potentiel DLVO est donnée sur la figure 1.14. La forme générale de ce potentiel présente un minimum primaire (agrégation irréversible des macromolécules), un minimum secondaire (agrégation réversible), et une barrière de potentiel. La hauteur de la barrière de potentiel et l'existence du puits secondaire sont liés à la charge et à la force ionique. Ceci donne donc différentes situations, en fonction de ces deux paramètres, comme le montre l'encadré en bas à droite. La situation a) donne une solution monodisperse. Les situations b) c) et d) donnent lieu à une agrégation réversible d'une fraction plus ou moins importantes des macromolécules. La situation e) entraîne l'agrégation totale et irréversible de la solution de macromolécules.

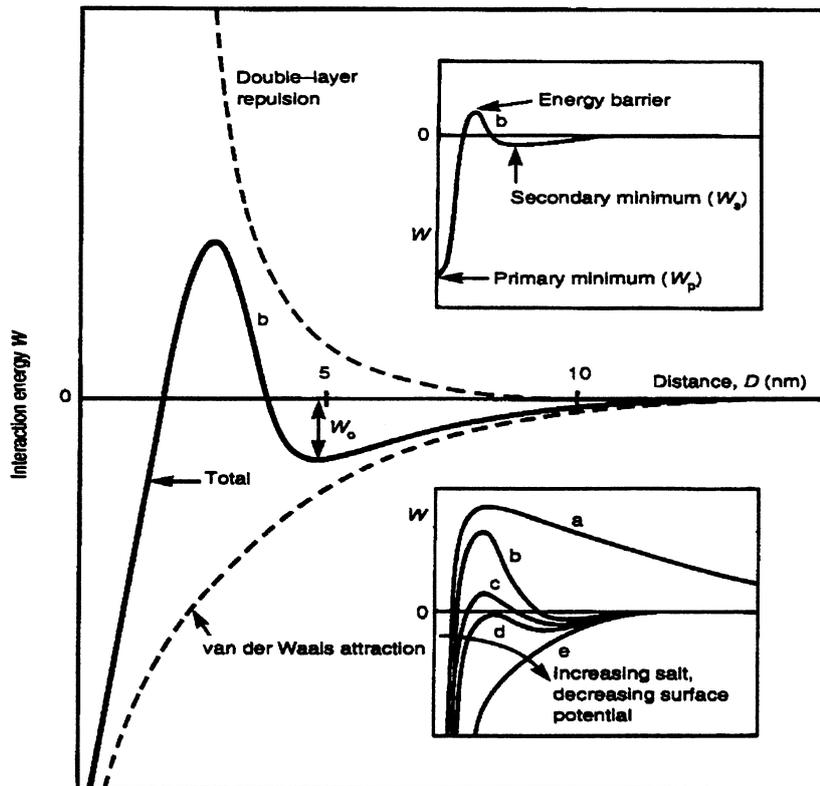


FIG. 1.14 – Représentation du potentiel interparticulaire DLVO, composition d'un terme répulsif d'origine électrostatique, et d'un terme de van de Waals, attractif. L'encadré supérieur repère les points particuliers que sont les minimums principaux et secondaires. L'encadré inférieur représente le potentiel pour différentes valeurs de charge et de force ionique. La figure est issue de [37].

Pour les mesures de diffusion de neutrons, il faut donc obtenir la situation a) ; ce qui nécessite une charge des macromolécules élevée. Pour les protéines, cette charge varie avec le pH : au dessous du pH isoélectrique, la protéine est chargée positivement ; et au dessus du pH isoélectrique, la protéine est chargée négativement. La figure 1.15 montre la courbe de titration de la calmoduline. Il apparaît que le point isoélectrique est relativement bas (pH 3,8) ; et qu'à pH 7,6, le nombre de charges est élevé (21) et varie lentement avec le pH.

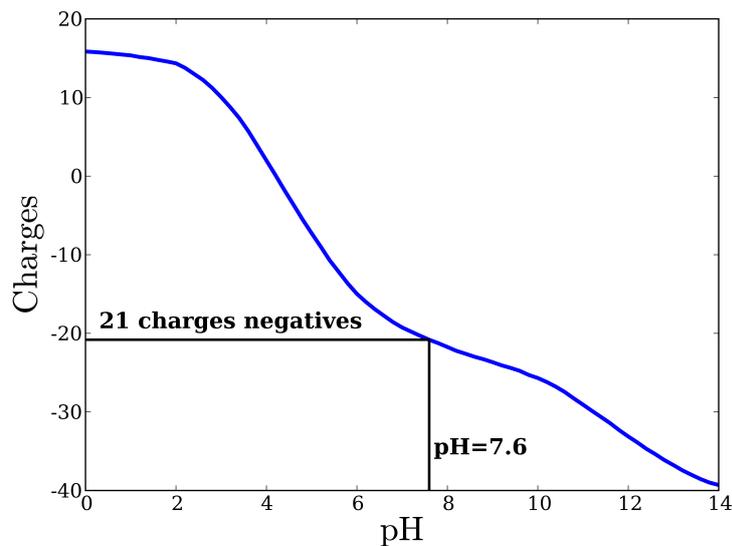


FIG. 1.15 – Courbe de titration théorique de la calmoduline : charge nette en fonction du pH. Le calcul de cette courbe a été effectué à l'aide du programme en ligne H++ [38]. Le point de charge nette nulle est appelé point isoélectrique, ou pH isoélectrique, pH_i . Il vaut ici 3,8. A pH=7,6, condition choisie pour cette thèse, l'apo-calmoduline possède une charge nette négative de 22 charges élémentaires.

Cette forte charge de la calmoduline (à pH 7,6) est essentielle pour les études de dépliement/repliement. En effet, lors du dépliement d'une protéine, des résidus hydrophobes, situés au coeur de la protéine dans l'état natif, sont exposés à la "surface". Ceci se traduit par une augmentation des interactions hydrophobes attractives. De plus, le volume de la protéine augmentant lors du dépliement, la distance moyenne entre protéines diminue. Le dépliement peut donc déstabiliser une solution de protéines, et entraîner une agrégation des protéines. Ce problème se pose d'ailleurs plus souvent avec la dénaturation thermique qu'avec les dénaturations chimiques ou sous pression (voir partie 1.4.2). L'agrégation des protéines lors du dépliement pose plusieurs problèmes. Premièrement, cela peut "fausser" les résultats "thermodynamiques". Ceux-ci n'étant plus liés au dépliement et à la stabilité d'une protéine isolée. Deuxièmement, cela limite fortement, voire biaise, l'information sur la conformation des états dépliés de la protéine. Pour finir, cela interdit toute étude du repliement, l'agrégation des protéines étant généralement irréversible.

Les propriétés de charge de la calmoduline permettent d'obtenir des solutions monodisperses,

même à des concentrations relativement élevées (~ 90 g/L), dans des conditions proches des conditions physiologiques : tampon tris 50 mM pH 7,6 avec $[KCl] \sim 80$ mM. On peut voir sur la figure 1.16, les spectres DNPA de deux solutions d'apo-calmoduline à 5 g/L et à 86 g/L chauffées à 70°C puis refroidies à température ambiante. Les deux spectres sont normalisés par la concentration. Aux deux concentrations, il n'y a aucune remontée du signal à petit Q, ce qui confirme l'absence d'agrégation, même à concentration élevée. De plus, l'intensité normalisée est notablement plus faible à 86 g/L qu'à 5 g/L. Ceci est le signe de fortes interactions répulsives entre protéines. La forte charge de la calmoduline à pH 7,6 induit donc de fortes interactions électrostatiques répulsives entre protéines, qui empêchent l'agrégation des protéines, natives ou dénaturées, et ce, même à des concentrations de l'ordre de 90 g/L.

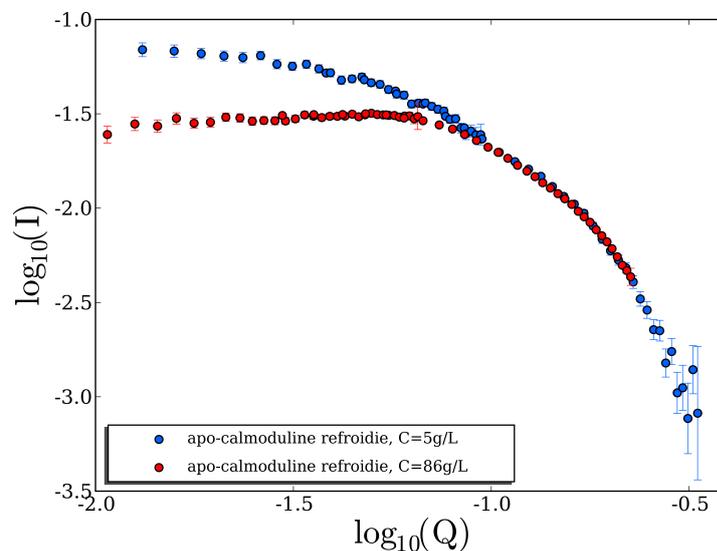


FIG. 1.16 – Spectres DNPA de deux solutions d'apo-calmoduline à 5 g/L (en rouge) et à 86 g/L (en bleu), chauffées à 70°C puis refroidies à température ambiante. Les intensités sont normalisées par la concentration. L'intensité (corrigée de la différence de concentration) est plus faible à 86 g/L que celle à 5 g/L. Ceci est le signe d'interactions répulsives (voir partie 2.2.3). Il n'y a en outre aucune remontée du signal "à petit Q", remontée qui serait synonyme d'agrégation. Ainsi, les interactions électrostatiques répulsives entre protéine empêchent l'agrégation des protéines, natives ou dénaturées, et ce, même à des concentrations de l'ordre de 90 g/L.

1.4 Thermodynamique du dépliement et du repliement des protéines

1.4.1 Modèles de dénaturation

Modèle à deux états

Dans le cas de "petites" protéines globulaires monomériques, les expériences de dépliement de protéines sont assez bien décrites par un modèle extrêmement simple : le modèle de transition à deux états à l'équilibre. Ce modèle ne décrit en aucune manière le détail microscopique du dé-

pliement d'une protéine, mais peut permettre de rendre compte de l'évolution d'une observable en fonction d'un paramètre extérieur (température, pression, concentration de dénaturant, pH, ...). Comme par exemple l'évolution de l'ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$ en fonction de la température. Ce modèle correspond en effet, en termes de description en "paysage d'énergie libre", au modèle de Levinthal. Il ne peut donc pas être exact (voir partie 1.1.2). Il permet cependant de quantifier des stabilités grâce aux valeurs de différence d'énergie libre entre les deux états, à une valeur de référence du paramètre extérieur, ΔG_0 , obtenues ; et de déterminer des paramètres de demi-transition, \mathcal{P}_m (T_m , P_m ou $P_{1/2}$, C_m), valeurs des paramètres extérieurs pour lesquelles l'observable x en question vaut $\frac{x_N + x_D}{2}$ (les indices N et D signifient natif et dénaturé).

Il faut garder à l'esprit que ces deux grandeurs, T_m et ΔG_0 sont attachées à l'observable en question. Bien souvent en effet, ces grandeurs varient selon la technique utilisée ; ce qui est d'ailleurs le signe de la présence d'états intermédiaires dans le système. La manière la plus simple d'appréhender ceci est de l'illustrer par un exemple. Prenons celui d'une dénaturation faisant intervenir un état intermédiaire de type "molten globule". Un état "molten globule" (noté MG) est un état ayant une structure secondaire native, mais une structure tertiaire non native. Considérons l'évolution en température d'une observable de structure secondaire, O_s (ellipticité dans l'UV-lointain, absorbance infrarouge dans la bande amide I, ...), et d'une observable de structure tertiaire, O_t (ellipticité dans l'UV-proche, rayon de giration, volume spécifique, ...). On a donc $O_s^{MG} = O_s^N$, et on peut avoir $O_t^{MG} = O_t^D$. Avec un état intermédiaire de type molten globule, on obtient le mécanisme suivant : $N \xrightleftharpoons{\Delta G_1} MG \xrightleftharpoons{\Delta G_2} D$. Dans ces conditions, les deux observables O_s et O_t semblent bien des transitions à deux états, mais avec des paramètres différents. En fait, seule la première transition est visible par l'observable O_s ; tandis que seule la seconde est visible par l'observable O_t .

Considérons donc le modèle à deux états :



Il permet de décrire l'évolution d'une observable O , en fonction d'un paramètre extérieur \mathcal{P} . On obtient facilement les populations des deux états, f_N et f_D , en fonction de la constante d'équilibre K :

$$f_N(\mathcal{P}) = \frac{1}{1 + K(\mathcal{P})} \quad (1.2)$$

$$f_D(\mathcal{P}) = \frac{K(\mathcal{P})}{1 + K(\mathcal{P})} \quad (1.3)$$

La constante d'équilibre, peut s'exprimer en fonction de la différence d'énergie libre :

$$K_1 = e^{-\frac{\Delta G(\mathcal{P})}{RT}} \quad (1.4)$$

Il suffit donc d'exprimer ΔG en fonction de \mathcal{P} . On verra les différentes expressions pour ΔG en fonction de la température, de la pression et de la concentration en dénaturant chimique. L'évolution de l'observable O est donc :

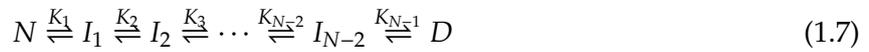
$$O(\mathcal{P}) = f_N O_N(\mathcal{P}) + f_D O_D(\mathcal{P}) \quad (1.5)$$

On note $O_N(\mathcal{P})$ et $O_D(\mathcal{P})$, car l'observable O dépend de l'état de la protéine, mais peut également dépendre intrinsèquement du paramètre \mathcal{P} . A titre d'exemple, la fluorescence dépend de la température (quenching) et de la concentration de dénaturant (constante diélectrique du solvant). La plupart du temps on fait l'hypothèse que cette dépendance est linéaire. Elle est donc modélisée par des coefficients S_N et S_D , qui ne sont pas forcément égaux (le quenching, par exemple, dépend de l'accessibilité au solvant du fluorophore, qui varie généralement entre les états natifs et dénaturés). Ceci se justifie très facilement dans la mesure où cette dépendance intrinsèque est faible (par rapport à l'effet structural $O_N(\mathcal{P}_0) - O_D(\mathcal{P}_0) \equiv O_N - O_D$) et où la transition $N \rightleftharpoons D$ se fait sur une plage de température restreinte. Au final, on obtient :

$$O(\mathcal{P}) = f_N(O_N + S_N \mathcal{P}) + f_D(O_D + S_D \mathcal{P}) \quad (1.6)$$

Modèle à N états, soit N-2 états intermédiaires et N-1 constantes d'équilibre

Le modèle à deux états peut être aisément généralisé. Considérons maintenant un modèle à N états :



Les populations des états en présence deviennent :

$$f_N(\mathcal{P}) = \frac{1}{1 + \sum_{i=1}^{N-1} \left(\prod_{j=1}^i K_j \right)} \quad (1.8)$$

$$f_{I_n}(\mathcal{P}) = \frac{\prod_{j=1}^n K_j}{1 + \sum_{i=1}^{N-1} \left(\prod_{j=1}^i K_j \right)} \quad (1.9)$$

$$f_D(\mathcal{P}) = \frac{\prod_{j=1}^{N-1} K_j}{1 + \sum_{i=1}^{N-1} \left(\prod_{j=1}^i K_j \right)} \quad (1.10)$$

A titre d'exemple, pour un modèle à 4 états, on obtient [39] :

$$\begin{aligned} f_N &= \frac{1}{1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3} \\ f_{I_1} &= \frac{K_1}{1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3} \\ f_{I_2} &= \frac{K_1 K_2}{1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3} \\ f_D &= \frac{K_1 K_2 K_3}{1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3} \end{aligned}$$

Avec bien sûr :

$$K_i = e^{-\frac{\Delta G_i(\mathcal{P})}{RT}} \quad (1.11)$$

Au final, on obtient l'expression suivante pour l'observable O :

$$O(\mathcal{P}) = f_N(O_N + S_N\mathcal{P}) + f_{I_1}(O_{I_1} + S_{I_1}\mathcal{P}) + \dots + f_{I_{N-2}}(O_{I_{N-2}} + S_{I_{N-2}}\mathcal{P}) + f_D(O_D + S_D\mathcal{P}) \quad (1.12)$$

1.4.2 Les paramètres extérieurs

Les paramètres extérieurs peuvent se classer en deux catégories : les paramètres thermodynamiques (température et pression) pour lesquels on peut écrire des expressions exactes pour ΔG ; et les autres, comme les dénaturants chimiques, pour lesquels on doit se contenter d'expressions empiriques.

La température

Pour la température, on obtient l'expression suivante pour la différence d'énergie libre, ΔG ($\equiv G_D - G_N$) :

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \Delta C_p(T \ln \frac{T}{T_0} + T_0 - T) \quad (1.13)$$

T_0 est une température de référence arbitraire. ΔG_0 et ΔS_0 sont les différences d'énergie libre et d'entropie à la température de référence. ΔC_p est la différence de capacité calorifique, $C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_p$. On choisit souvent comme point de référence la température de demi-dénaturation, T_m , pour laquelle $f_N = f_D$, soit $K = 1$, ou encore $\Delta G = 0$. On obtient donc :

$$\Delta G = -\Delta S_m(T - T_m) - \Delta C_p(T \ln \frac{T}{T_m} + T_m - T) \quad (1.14)$$

Certains préfèrent écrire cette expression en fonction de la différence d'enthalpie à la température de demi-dénaturation, ΔH_m :

$$\Delta G = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) + \Delta C_p \left(T - T_m - T \ln \frac{T}{T_m} \right) \quad (1.15)$$

A partir d'une simple courbe d'évolution en température d'une observable, il est généralement impossible de déterminer une valeur de ΔC_p . En général, les erreurs sur ΔC_p obtenues par un ajustement sont supérieures aux valeurs de ΔC_p . Les valeurs de ΔC_p sont donc souvent maintenues à 0 lors de ces ajustements. Généralement, cela ne modifie pas considérablement les résultats obtenus ; mais cela a toutefois une influence généralement supérieure aux barres d'erreur statistiques des ajustements. Toutefois, étant donné que l'application d'un modèle à deux (ou $N \sim 1$) états est hautement douteuse, cela ne nous semble pas dramatique. Cela introduit un léger biais sur des valeurs qui ne sont pas des valeurs absolues et qui doivent plutôt être prises comme des outils de quantification en vue de comparaisons. La microcalorimétrie permet toutefois de mesurer directement ΔC_p et permet donc de fixer ΔC_p à des valeurs ayant un sens lors des ajustements.

D'un point de vue technique, la température est le paramètre extérieur le plus simple à contrôler. Cependant elle a un inconvénient majeur : elle entraîne souvent l'agrégation irréversible des protéines [40]; contrairement aux dénaturants chimiques et à la pression, qui, elle, est même souvent capable de désagréger des protéines [41] [42].

La pression

Pour la pression, on obtient l'expression suivante pour l'énergie libre :

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V_0(P - P_0) + \frac{\Delta\beta}{2}(P - P_0)^2 \quad (1.16)$$

P_0 est une pression de référence arbitraire. ΔG_0 et ΔV_0 sont les différences d'énergie libre et de volume à la pression de référence. $\Delta\beta$ est la différence de compressibilité, $\beta = \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T$. On rencontre le même problème pour $\Delta\beta$ que pour ΔC_p ; à la différence qu'il est très difficile de mesurer des compressibilités, surtout dans les domaines de pression considérés pour le dépliement des protéines (c'est à dire jusqu'à 7000 bar dans cette thèse, et jusqu'à 14000 bar dans certains articles). Dans le cadre du modèle à deux états, on procède donc généralement différemment. On considère :

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V(P)(P - P_0) \quad (1.17)$$

En prenant P_m comme référence, on obtient :

$$\Delta G = \Delta V(P)(P - P_m) \quad (1.18)$$

d'où :

$$K(P) = e^{-\frac{(P-P_m)\Delta V(P)}{RT}} \quad (1.19)$$

Or, dans le cas d'une observable additive, on a :

$$K(P) = \frac{O(P) - (O_N + S_N P)}{(O_D + S_D P) + O(P)} \quad (1.20)$$

En déterminant S_N et S_D par de simples régressions linéaires avant et après la transition, on peut ainsi obtenir la constante d'équilibre K pour chaque pression. On peut donc tracer le log de la constante d'équilibre en fonction de la pression ($\ln K_p = f(P)$). Si le log de la constante d'équilibre est linéaire avec la pression, on peut sans trop de scrupules considérer que le terme en $\Delta\beta$ est négligeable ; et déterminer une différence de volume ΔV_0 , ainsi qu'une pression de demi-dénaturation P_m (aussi parfois notée $P_{1/2}$). On a bien sûr :

$$\Delta G_0 = \Delta V_0 P_m \quad (1.21)$$

Il peut paraître surprenant, à priori que la pression induise le dépliement de protéines. Cela implique en effet que $\Delta V < 0$; et, par conséquent, que le dépliement des protéines s'accompagne d'une diminution de volume. C'est cependant le cas pour un grand nombre de protéines [43]. Il faut garder à l'esprit qu'il ne s'agit pas du volume exploré par la protéine, mais de son volume spécifique. Ce volume peut être décomposé en trois contributions :

$$V = V_{\text{atomes}} + V_{\text{cavités}} + \Delta V_{\text{hydratation}} \quad (1.22)$$

V_{atomes} est le volume des atomes. Il ne change pas dans les gammes de pressions considérées. $V_{\text{cavités}}$ est le volume des cavités internes de la protéine. $\Delta V_{\text{hydratation}}$ est le changement de volume de la solution dû aux interactions entre la protéine et le solvant. Il est donc relié à la densité et à l'extension de la couche d'hydratation de la protéine. $V_{\text{cavités}}$ diminue bien évidemment si la protéine devient plus compacte; mais il devient nul si la protéine se déplie, toutes les cavités devenant accessibles au solvant. Il est également évident que $\Delta V_{\text{hydratation}}$ diminue avec l'exposition de résidus polaires au solvant. Le signe de la variation de $\Delta V_{\text{hydratation}}$ avec l'exposition de résidus hydrophobes est, elle, source de controverse [43].

Les dénaturants chimiques

Pour les dénaturants chimiques, il n'y a aucune expression exacte pour l'énergie libre. On en est donc réduit à utiliser des expressions empiriques. Tanford [44] en 1968, puis Schellman [45] en 1978 ont proposé le modèle de dépendance linéaire. Ce modèle considère qu'il existe une relation linéaire dans la zone de transition entre ΔG et la concentration en dénaturant, C :

$$\Delta G = \Delta G_0 - mC \quad (1.23)$$

Le paramètre m est bien sûr lié au type de dénaturant utilisé; mais il est proportionnel à la différence de surface accessible au solvant (ΔS_{ASA}) entre l'état natif et déplié. Une autre façon d'écrire cette équation est :

$$m = \frac{\partial \Delta G}{\partial C} \quad (1.24)$$

ou encore :

$$m = \Delta \frac{\partial G}{\partial C} \quad (1.25)$$

m apparaît ainsi comme une différence de potentiel chimique :

$$m = \frac{\partial G_1}{\partial C} - \frac{\partial G_2}{\partial C} = \Delta \mu \quad (1.26)$$

On a la relation suivante pour la concentration de demi dénaturation, C_m , obtenue à partir de l'équation 1.23 :

$$C_m = \frac{\Delta G_0}{m} \quad (1.27)$$

Les dénaturants chimiques souffrent du fait qu'il n'existe pas d'expression exacte de l'énergie libre d'une protéine en fonction de la concentration en dénaturant. Ils ont cependant l'avantage d'être facilement mis en oeuvre (il est plus facile techniquement de préparer un échantillon à 8 M d'urée dans une cellule Hellma, que d'atteindre 10000 bar dans une cellule pression) ; et de pouvoir dénaturer la plupart des protéines : même la forme holo de la calmoduline, stable jusqu'à 100°C [21], est entièrement dépliée en présence de 8 M de chlorure de guanidinium ou de 9.5 M d'urée [22]. Ces concentrations sont certes proches des limites de solubilité, mais il existe d'autres dénaturants plus "puissants" tel le thiocyanate de guanidinium. Un dernier avantage des dénaturants chimiques est de limiter l'agrégation. Des dénaturants chimiques sont même capables dans certains cas de resolubiliser des protéines devenues insolubles après une dénaturation thermique [46].

1.4.3 Les diagrammes de phase (T,P)

Théorie de Hawley - Diagrammes de phase elliptiques

Dans le cadre du modèle à deux états, la différentielle de la variation d'énergie libre s'écrit :

$$d\Delta G = -\Delta S dT + \Delta V dP \quad (1.28)$$

En intégrant cette équation à partir d'un point de référence (T_0, P_0) , on obtient :

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V_0(P - P_0) + \frac{\Delta\beta}{2}(P - P_0)^2 - \Delta S_0(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \ln\left(\frac{T}{T_0} - 1\right) + T_0 \right] + \Delta\alpha(P - P_0)(T - T_0) \quad (1.29)$$

Avec $\alpha = \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P = -\left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T$ En 1971, Hawley [47] montre qu'autour de T_0 on peut considérer que :

$$-\Delta C_p \left[T \ln\left(\frac{T}{T_0} - 1\right) + T_0 \right] \approx \frac{\Delta C_p}{2T_0} (T - T_0)^2 \quad (1.30)$$

La ligne de transition est la courbe d'équation $\Delta G = 0$. Dans le cadre de l'approximation faite par Hawley, cette ligne de transition est donc la section d'un cône ; soit une ellipse ou une hyperbole. Cette ligne de transition est elliptique si :

$$(\Delta\alpha)^2 > \frac{\Delta C_p \Delta\beta}{T_0} \quad (1.31)$$

Dans les deux cas étudiés par Hawley [47], le chymotrypsinogène et la ribonucléase, cette inégalité est satisfaite grâce à la différence de signe entre ΔC_p et $\Delta\beta$: $\Delta C_p > 0$ et $\Delta\beta < 0$. La véracité de la condition 1.31 semble cependant très générale pour les protéines, et un grand nombre de diagrammes de phases elliptiques ont été établis pour différentes protéines [48] [49] [50]. Une représentation schématique d'un diagramme de phase elliptique d'une protéine est donné dans la figure 1.17

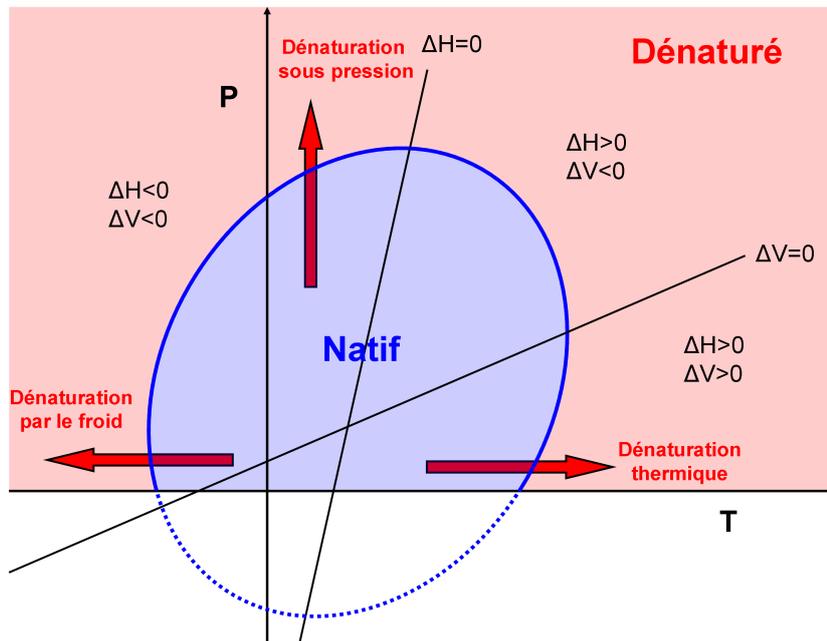


FIG. 1.17 – Diagramme de phase (T,P) elliptique, typique d'une protéine se dénaturant selon un processus à deux états. Figure issue de [51]. Le domaine où l'état natif est majoritaire est représenté en bleu ; celui où l'état dénaturé est majoritaire est représenté en rouge. La ligne de transition, représentée par un trait bleu, correspond à la ligne $\Delta G = 0$. Les chemins de dénaturation thermique et de dénaturation sous pression sont représentés par les flèches rouges. Si le modèle "à deux états" s'applique, le diagramme de phase doit être elliptique, et les chemins de dénaturation en température et sous pression doivent être identiques.

Les limites de la théorie de Hawley

Le calcul de Hawley conduisant à des diagrammes de phases elliptiques ne prend en compte que les termes d'ordre inférieur ou égal à 2. L'influence des termes d'ordre 3, soit des termes en T^3, P^3, T^2P et TP^2 , sur ces diagrammes de phase a été étudiée par Smeller [51]. Ces termes ne modifient pas radicalement l'allure du diagramme de phase, mais distordent légèrement l'ellipse, notamment dans la zone hautes pressions et hautes températures.

La principale limitation de la théorie de Hawley vient du fait qu'elle considère un mécanisme de dénaturation à deux états, à l'équilibre et réversible. Or, il est maintenant communément accepté que le dépliement n'est pas toujours réversible, et qu'il fait souvent intervenir des états intermédiaires [1]. S'il est établi que l'application de la température et de la pression conduisent au dépliement des protéines, leurs "modes d'action sont différents". Augmenter la température favorise les conformations d'entropie supérieures ; alors qu'augmenter la pression favorise les conformations de volume spécifique inférieures. Les états intermédiaires favorisés par une hausse de pression ou par une hausse de température peuvent donc être différents. La présence d'états intermédiaires peut ainsi entraîner des chemins de dépliement en température et sous pression

différents. Afin de détecter les différents états intermédiaires d'une protéine, ou autrement dit, afin de bien explorer l'entonnoir d'énergie libre d'une protéine; il est donc utile de combiner dénaturation thermique et dénaturation sous pression.

Chapitre 2

La diffusion de neutrons

2.1 Généralités sur la diffusion de neutrons

2.1.1 Qu'il est beau mon neutron

La mécanique quantique associe à toute particule une onde, de longueur d'onde $\lambda = \frac{h}{p}$ et d'énergie $E = h\nu$. De par ses caractéristiques uniques, le neutron est un outil irremplaçable pour l'étude de la matière :

- Les neutrons thermiques¹, qui ont une énergie de l'ordre de nombreuses excitations présentes dans la matière condensée, ont une longueur d'onde de l'ordre de l'angström ; et donc de l'ordre des distances interatomiques. L'analyse de la diffusion d'un faisceau de neutrons thermiques par un échantillon donne donc accès à la structure de celui-ci sur des échelles allant de l'angström à la centaine de nanomètres ; et à sa dynamique, sur des échelles de la picoseconde à la centaine de nanosecondes.
- Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes, et non pas avec les électrons. Les noyaux pouvant être considérés comme ponctuels, la longueur de diffusion ne varie pas avec l'angle de diffusion.
- La longueur de diffusion des atomes n'est pas proportionnelle au numéro atomique Z comme dans le cas des rayons X , et ne présente même aucune relation avec Z (voir figure 2.1). Les éléments légers et les éléments lourds ont donc des longueurs de diffusion comparables.
- Des isotopes peuvent avoir des longueurs de diffusion cohérente très différentes, et même de signe opposés. C'est le cas de l'hydrogène et du deutérium par exemple : $b_H = -3,74$ fm et $b_D = 6,67$ fm. Ceci présente un intérêt extraordinaire : le "contrast matching" ou "variation de contraste". En mélangeant de l'eau légère et de l'eau lourde (ou tout autre solvant hydrogéné et deutérié), on peut faire varier à volonté la densité de longueur de diffusion du solvant. Dans le cas de mélanges de composés ayant des longueurs de diffusion différentes (mélanges de polymères hydrogénés et deutériés, polymères greffés sur des particules de silice, complexes de protéines hydrogénées et deutériées, etc), il est donc possible de masquer l'un ou l'autre des composés. Ceci est particulièrement important pour la matière molle et la biologie, où l'hydrogène est très présent.
- Des isotopes peuvent avoir des sections efficaces de diffusion incohérentes très différentes. C'est le cas, par exemple l'hydrogène et du deutérium : $\sigma_H^{inc} = 80,27$ barn et $\sigma_D^{inc} = 2,05$ barn. Comme on le verra par la suite (voir partie 2.3), le signal en diffusion quasi-élastique par temps de vol pour des échantillons "de matière molle" (protéines en solution ou en poudre hydratée, polymères en solution ou en fondu, etc.), technique permettent de sonder la dynamique, est relié à la section efficace de diffusion incohérente. Ainsi, en jouant sur les balances H et D, un peu comme pour la variation de contraste en petits angles, cela permet de faire varier considérablement le signal d'une partie de l'échantillon. Pour une solution de protéine hydrogénée en D_2O , le signal de la protéine devient nettement visible ; alors qu'il

¹les neutrons dont l'énergie est de l'ordre de l'énergie thermique à l'ambiante : 25 meV.

serait noyé dans celui du solvant pour une solution de protéine hydrogénée en H_2O . Pour une poudre de protéine hydrogénée hydratée en D_2O , le signal du "solvant" (on devrait dire "hydratant" dans ce cas) devient même négligeable.

- Le neutron possède un spin, et permet donc de sonder la structure magnétique de la matière. Ceci ne sera pas utilisé dans cette thèse, mais a permis, et permet encore de nombreuses études dans le domaine des semiconducteurs, des supraconducteurs, des verres de spin, etc...

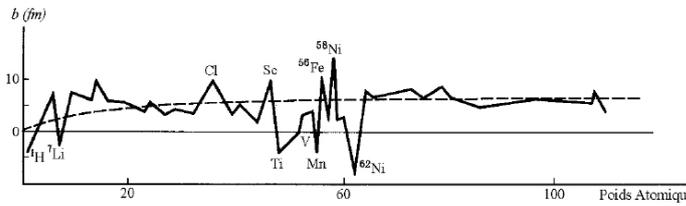


FIG. 2.1 – Longueur de diffusion en fonction de la masse atomique. Il n'existe pas de relation entre longueur de diffusion et numéro atomique. De plus, toutes les longueurs de diffusion sont du même ordre de grandeur. Ceci est un grand avantage des neutrons sur les rayons X, pour lesquels la longueur de diffusion est proportionnelle à Z .

2.1.2 (Un peu de) Théorie générale (Mais pas trop...)

Comme dans toute expérience de diffusion, une expérience de diffusion de neutrons consiste à envoyer un faisceau de neutrons (masse m_n) de vecteur d'onde \vec{k}_i et d'énergie E_i (ou de longueur λ_i) sur un échantillon (voir figure 2.2). Les neutrons interagissent avec l'échantillon (potentiel d'interaction $V(\vec{r}, t)$), et ressortent avec un vecteur d'onde \vec{k}_d et une énergie E_d . On définit le vecteur de diffusion, $\vec{Q} = \vec{k}_d - \vec{k}_i$ et l'énergie échangée $E = \hbar\omega = E_d - E_i = \frac{\hbar}{2m_n}(k_d^2 - k_i^2)$. Q est déterminé de la façon suivante :

$$\frac{Q^2}{k_i^2} = 2 + \frac{\omega}{\omega_i} - 2 \cos(2\theta) \sqrt{\frac{\omega}{\omega_i} + 1} \quad (2.1)$$

où 2θ est l'angle de diffusion. Il est important de noter que Q (notation pour $|\vec{Q}|$) et ω ne sont pas des grandeurs indépendantes. On peut aussi définir le vecteur de diffusion élastique Q_0 , i.e. le vecteur de diffusion obtenu si la diffusion était élastique :

$$Q_0 = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (2.2)$$

Expérimentalement, on mesure la section efficace différentielle de diffusion, par unité d'angle solide $d\Omega$, et par unité de transfert d'énergie $d\omega$: $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$.

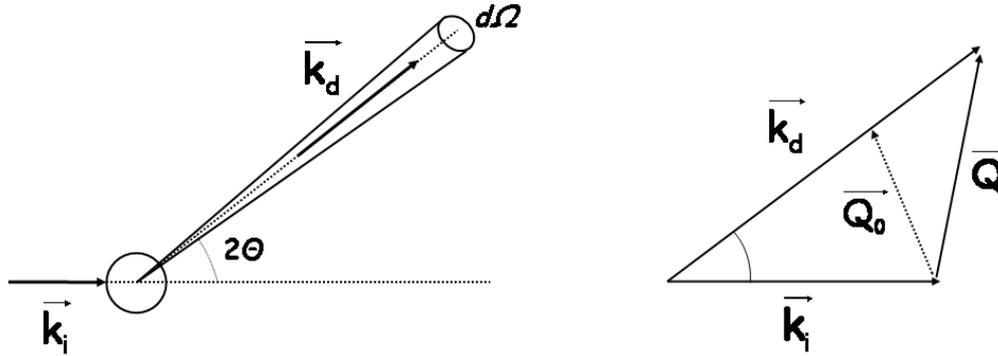


FIG. 2.2 – Principe d’une expérience de diffusion. Lors de la traversée de l’échantillon, les neutrons subissent une modification de vecteur d’onde et d’énergie. \vec{Q}_0 est le vecteur de diffusion élastique, i.e. le vecteur de diffusion pour $\hbar\omega = 0$.

La relation fondamentale

L’état quantique du système neutron-échantillon peut être exprimé, dans une base orthogonale de vecteurs propres, de la manière suivante : $|\vec{k}, s, \alpha\rangle$; où \vec{k} est le vecteur d’onde du neutron, s son spin, et où α décrit l’état quantique de l’échantillon. Comme nous l’avons dit plus haut, il ne sera pas question ici de diffusion magnétique de neutrons. Aucune polarisation particulière du faisceau incident ne sera sélectionnée, et l’état de spin des neutrons diffusés ne sera jamais mesuré. L’état de spin du neutron sera donc omis par la suite, et l’écriture de l’état quantique du système neutron-échantillon se limitera à $|\vec{k}, \alpha\rangle$.

Dans l’approximation de Born, la section efficace différentielle de diffusion est donnée par la relation suivante :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{m_n}{2\pi\hbar^2} \frac{k_d}{k_i} \sum_{\alpha} p_{\alpha} \sum_{\beta} \left| \langle \vec{k}_d, \beta | V | \vec{k}_i, \alpha \rangle \right|^2 \delta(E_{\beta} - E_{\alpha} - \hbar\omega) \quad (2.3)$$

où α est un état initial de l’échantillon d’énergie E_{α} ayant une probabilité de présence p_{α} . β est un état final de l’échantillon d’énergie E_{β} . V est le potentiel d’interaction neutron-échantillon. Les neutrons, particules neutres n’ont pas d’interaction électromagnétique avec la matière, ils interagissent uniquement par interaction forte avec les noyaux (étant donné que les faisceaux incidents et diffusés ne sont pas polarisés, les interactions magnétiques et Zeeman ne sont pas considérées). L’interaction forte est une interaction à courte portée. Sa portée, de l’ordre du fermi est très inférieure à la longueur d’onde des neutrons utilisés. On peut donc considérer cette interaction comme ponctuelle, et ainsi écrire le potentiel d’interaction sous la forme du pseudo-potential de Fermi :

$$V(\vec{r}) = \sum_i \frac{2\pi\hbar}{m_n} b_i \cdot \delta(\vec{r} - \vec{R}_i) \quad (2.4)$$

où b_i est la longueur de diffusion du i^{eme} atome de l'échantillon. On voit donc que l'interaction neutron-matière est entièrement caractérisée par la longueur de diffusion. Cette grandeur est une grandeur complexe, la partie imaginaire traduisant la probabilité d'absorption du neutron. Dans la suite, nous ne tiendrons plus compte de l'absorption dans les calculs de sections efficaces différentielles. Les données expérimentales seront corrigées de l'absorption via les transmissions. L'interaction neutron-noyau n'est pas nécessairement de type coeur dur. Dans le cas où le neutron peut former un noyau composite transitoire, b est négatif (cas de l'hydrogène et du titane par exemple). Cette particularité de la diffusion de neutrons d'avoir des valeurs de b négatives est très importante et est au coeur de la variation de contraste. Après plusieurs lignes de calcul, que nous ne détaillerons pas ici, on obtient l'expression suivante pour la section efficace différentielle :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{k_d}{2\pi k_i} \sum_{i,j} \langle b_i b_j \rangle \int \langle e^{i\vec{Q}(\vec{R}_i(0) - \vec{R}_j(t))} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.5)$$

Diffusion cohérente et diffusion incohérente

On peut décomposer le terme $\langle b_i b_j \rangle$ de l'équation précédente :

$$\langle b_i b_j \rangle = \underbrace{\langle b \rangle^2}_{b_{coh}} + \underbrace{(\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2)}_{b_{inc}} \delta_{ij} = b_{coh} + b_{inc} \delta_{ij} \quad (2.6)$$

On définit ainsi les longueurs de diffusion cohérentes et incohérentes b_{coh} et b_{inc} , et les sections efficaces correspondantes $\sigma_{coh} = 4\pi b_{coh}^2$ et $\sigma_{inc} = 4\pi b_{inc}^2$. En introduisant ces grandeurs dans l'équation 2.5, on peut décomposer la section efficace différentielle en deux parties : une partie cohérente et une partie incohérente :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{coh} + \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{inc} \quad (2.7)$$

où :

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{coh} = \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} \int \sum_{i,j} \langle e^{i\vec{Q}(\vec{R}_i(0) - \vec{R}_j(t))} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.8)$$

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{inc} = \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \int \sum_i \langle e^{i\vec{Q}(\vec{R}_i(0) - \vec{R}_i(t))} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.9)$$

Le formalisme de van Hove

On peut introduire les fonctions suivantes :

le facteur de structure dynamique : $S(\vec{Q}, \omega)$:

$$S(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{N} \int \sum_{i,j} \langle e^{i\vec{Q}(\vec{R}_i(0) - \vec{R}_j(t))} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.10)$$

et son analogue incohérent :

$$S_{inc}(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{N} \int \sum_i \left\langle e^{i\vec{Q}(\vec{R}_i(0) - \vec{R}_i(t))} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.11)$$

La fonction intermédiaire de diffusion : $I(\vec{Q}, t)$

$$I(\vec{Q}, t) = \int S(\vec{Q}, \omega) e^{i\omega t} dt \quad (2.12)$$

et son analogue incohérent :

$$I_{inc}(\vec{Q}, t) = \int S_{inc}(\vec{Q}, \omega) e^{i\omega t} dt \quad (2.13)$$

La fonction de corrélation de van Hove :

$$G(\vec{r}, t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int I(\vec{Q}, t) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{Q} \quad (2.14)$$

et la fonction d'autocorrélation de van Hove :

$$G_s(\vec{r}, t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int I_{inc}(\vec{Q}, t) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{Q} \quad (2.15)$$

On peut montrer que :

$$G(\vec{r}, t) = \frac{1}{N} \left\langle \sum_{i,j} \delta(\vec{r} + \vec{R}_i(0) - \vec{R}_j(t)) \right\rangle \quad (2.16)$$

et que :

$$G_s(\vec{r}, t) = \frac{1}{N} \left\langle \sum_i \delta(\vec{r} + \vec{R}_i(0) - \vec{R}_i(t)) \right\rangle \quad (2.17)$$

G est donc la probabilité de trouver une particule en \vec{r} à l'instant t sachant, qu'il y avait une particule à l'origine ($\vec{r} = 0$) à l'instant $t = 0$. G est la probabilité de trouver une particule en \vec{r} à l'instant t , sachant que cette même particule était en O à l'instant 0 .

On a donc,

$$\frac{2\pi k_i}{k_d} \frac{4\pi}{\sigma_{coh}} \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{coh} = S(\vec{Q}, \omega) = \int I(\vec{Q}, t) e^{-i\omega t} dt = \int G(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q}\vec{r} - \omega t)} d^3\vec{r} dt \quad (2.18)$$

et :

$$\frac{2\pi k_i}{k_d} \frac{4\pi}{\sigma_{inc}} \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{inc} = S_{inc}(\vec{Q}, \omega) = \int I_{inc}(\vec{Q}, t) e^{-i\omega t} dt = \int G_s(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q}\vec{r} - \omega t)} d^3\vec{r} dt \quad (2.19)$$

La diffusion incohérente ne dépend donc que de la fonction d'autocorrélation de van Hove. En langage simple, les neutrons diffusés de manière incohérente "voient" les noyaux comme s'ils

étaient seuls dans l'univers. Ceci n'est bien sûr qu'une image. Etant donné le caractère quantique du problème étudié (la diffusion des neutrons), il n'est évidemment pas possible d'identifier les neutrons diffusés de manière cohérente et ceux de manière incohérente. Grâce au formalisme de van Hove, on peut comprendre que la section efficace différentielle incohérente donne accès à la dynamique individuelle des atomes. La section efficace différentielle cohérente donne, elle, accès aux comportements collectifs des atomes, et donc à leur dynamique collective, ainsi qu'à la structure moyenne d'un échantillon. Dans la suite, avec la diffusion quasi-élastique et inélastique de neutrons, nous ne mesurerons plus que des sections efficaces différentielles incohérentes ; et ce pour des raisons que nous verrons plus loin. Nous nous intéresserons donc uniquement à la dynamique individuelle des atomes, et nous ne parlerons donc plus que de facteurs de structure dynamique incohérents.

Le facteur de structure statique

Dans le cadre d'études structurales, on ne s'intéresse pas aux excitations de l'échantillon. On réalise donc des expériences de diffusion élastique de neutrons. On mesure la section efficace différentielle par unité d'angle solide, sans enregistrer l'énergie échangée entre les neutrons et l'échantillon :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \int \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right) d\omega \quad (2.20)$$

On peut à nouveau séparer entre sections efficaces cohérente et incohérente :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \int \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{coh} d\omega + \int \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{inc} d\omega \quad (2.21)$$

Or, on peut montrer que :

$$\int S_{inc}(\vec{Q}, \omega) d\omega = 1 \quad (2.22)$$

En utilisant de plus le formalisme de van Hove, on obtient :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} \int G(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q}\vec{r} - \omega t)} d^3\vec{r} dt d\omega + \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \quad (2.23)$$

$$= \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} \int G(\vec{r}, t) e^{i\vec{Q}\vec{r}} \delta(t) d^3\vec{r} dt + \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \quad (2.24)$$

$$= \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} \int G(\vec{r}, 0) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} + \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \quad (2.25)$$

On obtient donc pour finir :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} S(\vec{Q}) + \frac{k_d}{2\pi k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \quad (2.26)$$

avec $S(\vec{Q})$ le facteur de structure statique :

$$S(\vec{Q}) = \frac{1}{N} \sum_{i,j} \langle e^{i\vec{Q} \cdot (\vec{R}_i - \vec{R}_j)} \rangle \quad (2.27)$$

Il apparaît donc que la section efficace différentielle incohérente ne contient aucune information structurale. Toute cette information est contenue dans le terme $S(\vec{Q})$, et donc dans la section efficace différentielle cohérente. C'est pourquoi dans les expériences de diffusion élastique de neutrons, l'intensité incohérente est considérée comme un bruit de fond. Le fait que ce bruit de fond soit plat (ne dépende pas de \vec{Q}) le rend très facile à soustraire.

2.2 La diffusion de neutrons aux petits angles

2.2.1 Principe de l'expérience

La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) est un cas particulier de diffusion élastique de neutrons. Comme son nom l'indique, il s'agit de mesurer la section efficace différentielle par unité d'angle solide (sans considération d'énergie) pour des valeurs d'angles faibles (inférieures à 10°), et donc pour des faibles valeurs de Q . Cette technique permet donc de sonder la structure d'échantillons à grande échelle. Typiquement, de la dizaine d'angström au micromètre (pour les appareils classiques, la limite supérieure est plutôt de l'ordre de la centaine de nanomètres).

Le principe de l'expérience, illustré sur la figure 2.3 est très simple : on envoie un faisceau de neutrons monochromatique et collimaté sur un échantillon, et on enregistre l'intensité diffusée sur un détecteur bidimensionnel.

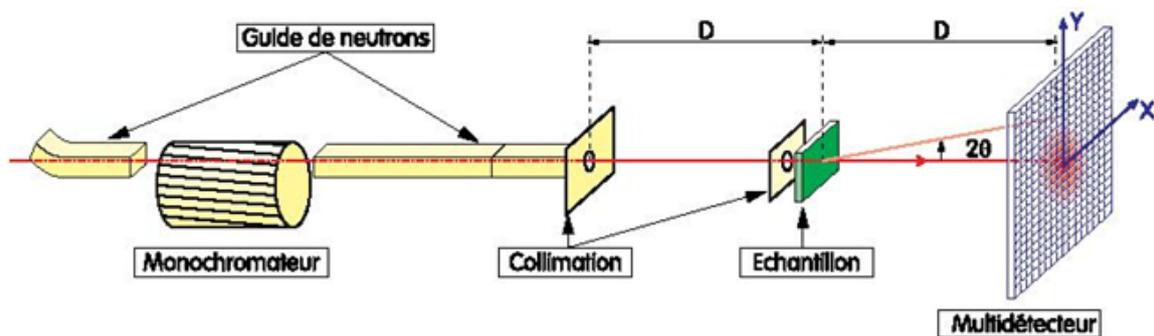


FIG. 2.3 – Principe d'une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles. Issu de [52]. Un faisceau monochromatique et collimaté de neutrons est envoyé sur un échantillon. L'intensité diffusée est enregistrée sur un détecteur 2D. Ceci permet d'obtenir l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion θ , et de l'angle ϕ pour les échantillons anisotropes (ϕ est l'angle par rapport à Ox , dans le plan du détecteur).

Les neutrons sont amenés depuis la source froide jusqu'au spectromètre par un guide de neu-

trons. On appelle source froide un modérateur à basse température (20K). Les neutrons y sont thermalisés à basse température et ressortent donc avec une grande longueur d'onde. Sur les spectromètres à petits angles du LLB, les longueurs d'ondes disponibles sont typiquement comprises entre 5 et 20Å. En fait, il n'y a pas de limite supérieure ; mais le flux diminuant comme λ^5 , il devient très difficile de faire des mesures pour $\lambda > 20\text{Å}$.

A la sortie du guide, on dispose donc d'un faisceau "blanc". La longueur d'onde désirée est sélectionnée par un sélecteur mécanique (voir figures 2.3 et 2.4), avec une largeur de bande d'environ 10% ($\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 0.1$). Le faisceau est ensuite collimaté par une série de diaphragmes en B_4C et en cadmium. L'intensité diffusée par l'échantillon est ensuite enregistrée sur un multidétecteur 2D à gaz, qui peut être un détecteur à fils (PAXE et PAXY, LLB) ou multitubes (D22, ILL). Ces détecteurs ont des résolutions spatiales de l'ordre du centimètre (PAXE : 1cm, PAXY : 5mm, D22 : 7.5mm).

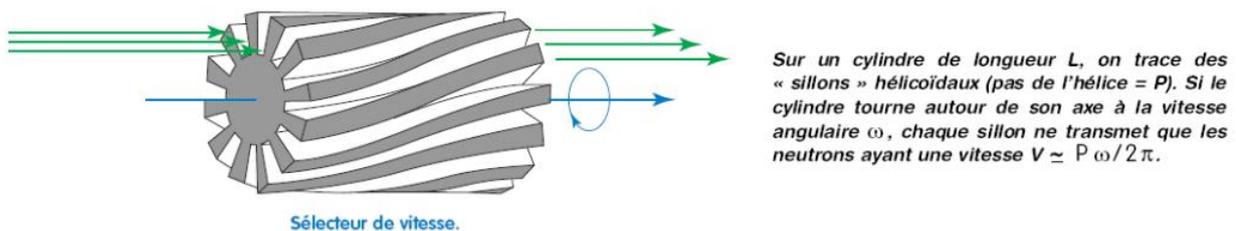


FIG. 2.4 – Principe du sélecteur mécanique. Issu de [53].

Le flux de neutrons délivré par le réacteur n'est pas constant dans le temps. Pour pouvoir corriger les données de ces variations de flux, 2 moniteurs sont installés dans le guide, en dehors de la section utilisée par le spectromètre. Le premier est en amont du sélecteur mécanique, et le second est en aval. Les taux de comptage de ces moniteurs sont donc proportionnels au flux en amont et en aval du sélecteur. Le premier moniteur (moniteur 1) sert à normaliser les données. Le rapport moniteur1/moniteur2 sert à vérifier qu'il n'y a pas de problème au niveau du sélecteur.

Pour pouvoir obtenir la section efficace différentielle par unité de volume $\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}$ (exprimée en cm^{-1}) il faut réaliser deux types de mesures : les mesures de diffusion et les mesures de transmission. Les mesures de diffusion consistent bien évidemment à mesurer le spectre de diffusion. Cependant, le détecteur reçoit à la fois l'intensité diffusée par l'échantillon, mais aussi le faisceau direct (i.e. la partie du faisceau incident qui n'a pas interagi avec l'échantillon). Or, le faisceau direct est très intense et sature le détecteur. On place donc un piège absorbeur de neutrons, ou "beam stop" devant le détecteur pour absorber le faisceau direct ; et on enregistre l'intensité diffusée sur la partie du détecteur non masquée par le beam stop. Les mesures de transmission consistent, elles, à mesurer la fraction du faisceau incident qui traverse l'échantillon sans interagir avec lui. Pour cela, on enlève le beam stop ; on place un atténuateur entre le sélecteur et le collimateur

pour ne pas saturer le détecteur ; et on mesure le faisceau direct sans échantillon ("faisceau vide") et avec échantillon jusqu'à ce que le moniteur 1 atteigne une valeur programmée à l'avance (par exemple 1500 coups). Le rapport de ces deux intensités mesurées nous donne donc la transmission de l'échantillon.

2.2.2 Traitement des données

Nous ne considérerons ici que le cas d'échantillons isotropes. Dans ce cas, l'intensité diffusée ne dépend que de $|\vec{Q}|$; et on peut donc effectuer une moyenne radiale (i.e. sommer les nombres de neutrons détectés par les cellules du détecteur se trouvant à la même distance du centre de la figure de diffusion et correspondant donc aux mêmes valeurs de θ). Cette opération, ainsi que la normalisation au moniteur et la correction d'angle solide (toutes les cellules ne "voient" pas l'échantillon avec le même angle solide) sont effectuées par le programme "REGISO" pour les données de PAXE et PAXY au LLB. D'autres programmes effectuent les mêmes opérations dans les autres centres de diffusion neutronique. On obtient ainsi des spectres $I = f(Q)$.

Le traitement des données peut se décomposer en quatre étapes : soustraction du témoin, de la cellule vide et du bruit de fond ; correction de l'hétérogénéité de l'efficacité du détecteur ; détermination du facteur d'appareil ; et soustraction du bruit de fond incohérent

1) Soustractions

La procédure de soustraction du témoin, de la cellule vide et du bruit de fond dépend de la géométrie utilisée ; à savoir la géométrie de l'échantillon et du conteneur. Les deux géométries les plus couramment rencontrées sont les géométries planes et cylindriques (voir figure 2.5). La géométrie plane est la plus "confortable", les calculs restant de simples opérations algébriques, avec des coefficients qui sont des fonctions simples de l'angle de diffusion 2θ , des épaisseurs et des transmissions. Elle est donc utilisée le plus souvent possible, notamment à pression ambiante. Le conteneur classique, pour pression ambiante, à géométrie plane est la cellule Hellma[®] en quartz Suprasil[®]. Pour les cellules pression, la géométrie la plus pratique techniquement est la géométrie cylindrique. En effet, elle minimise le rapport surface/volume, et l'étanchéité est infiniment plus facile à réaliser avec des conteneurs cylindriques qu'avec des conteneurs à géométrie plane.

Dans tous les cas, pour obtenir le spectre de l'échantillon seul, F_s , soustrait du témoin (le solvant dans le cas d'une solution), il faut mesurer le spectre de l'échantillon (noté I_s) ; celui d'un témoin (noté I_b) ; celui d'une cellule échantillon vide (noté I_c) ; le spectre d'un absorbant de neutrons comme le cadmium (noté B car il correspond au bruit de fond d'origine électronique et à celui dû aux neutrons ambiants) ; et enfin un spectre sans aucun échantillon, ou "faisceau vide" (noté F_v). Les transmissions correspondantes sont notées T_x , et les épaisseurs t_x . Dans la suite nous considérerons que la fraction volumique de l'échantillon occupée par le témoin est égale à 1 (régime dilué). Dans le cas contraire, il ne faudrait bien évidemment pas soustraire toute l'intensité

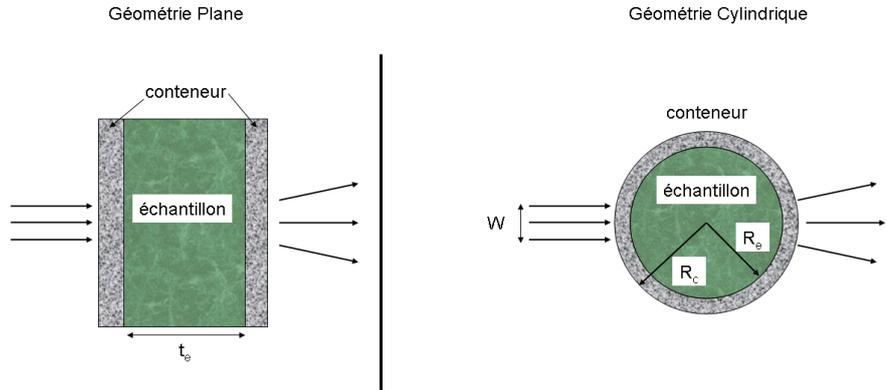


FIG. 2.5 – Les deux géométries les plus utilisées pour la diffusion de neutrons aux petits angles : la géométrie plane et la géométrie cylindrique.

du témoin, mais seulement une fraction f_b de celle-ci.

En géométrie plane, si on néglige les diffusions multiples (mais en considérant l'auto-absorption), il est donc possible d'obtenir une expression littérale exacte pour F_s (le calcul est décrit dans [54]) :

$$\begin{aligned}
 F_s(Q) = & \frac{I_s(Q) - B}{t_s T_s \alpha_s(Q)} - \frac{I_b(Q) - B}{t_b T_b \alpha_b(Q)} - \frac{I_c(Q) - B}{T_c} \left\{ \frac{\beta_s(Q)}{t_s \alpha_b(Q)} - \frac{\beta_b(Q)}{t_b \alpha_b(Q)} \right\} \\
 & + \left\{ \frac{T_c^{\frac{1}{\cos \theta}}}{T_c} \left[\frac{\beta_s(Q)}{t_s \alpha_b(Q)} - \frac{\beta_b(Q)}{t_b \alpha_b(Q)} \right] - \frac{\beta_s(Q) T_s^{\frac{1}{\cos \theta}}}{t_s \alpha_b(Q)} + \frac{\beta_b(Q) T_b^{\frac{1}{\cos \theta}}}{t_b \alpha_b(Q)} \right\} F_v(Q)
 \end{aligned} \quad (2.28)$$

avec $\alpha(Q)$ et $\beta(Q)$ définis de la manière suivante, en posant $a(\theta) = 1 - \frac{1}{\cos(\theta)}$:

$$\alpha_x(\theta) = T_c^{-a(\theta)/2} \frac{1 - \left(\frac{T_x}{T_c}\right)^{-a(\theta)}}{a(\theta) \ln\left(\frac{T_x}{T_c}\right)} \quad (2.29)$$

$$\beta_x(\theta) = \frac{1 - T_c^{-a(\theta)/2}}{a(\theta) \ln(T_c)} \left[1 + \left(\frac{T_x}{T_c}\right)^{-a(\theta)} \right] \quad (2.30)$$

Dans le cas d'une géométrie cylindrique, en négligeant toujours les diffusions multiples, le calcul est bien plus complexe et il n'existe plus d'expression littérale exacte. L'expression de F_s fait intervenir les coefficients de Paalman et Ping : $A_{s,sc}$, $A_{b,bc}$, $A_{c,sc}$, $A_{c,bc}$ et $A_{c,c}$. Ces coefficients sont définis par des intégrales impossibles à calculer de manière exacte, mais pouvant être calculées numériquement. Ces coefficients sont fonctions des coefficients linéiques d'absorption μ_x de l'échantillon, du buffer et du conteneur ; ainsi que des rayons internes et externes du conteneur R_e et R_c ; de la hauteur du conteneur et de W , largeur à mi-hauteur du faisceau incident. Ces

coefficients doivent donc être recalculés pour chaque échantillon. On obtient pour F_s :

$$F_s(Q) = \frac{I_s(Q)}{A_{s,sc}(Q)} - \frac{I_b(Q)}{A_{b,bc}(Q)} - \frac{I_c(Q)}{A_{c,c}(Q)} \left\{ \frac{A_{c,sc}(Q)}{A_{s,sc}(Q)} - \frac{A_{c,bc}(Q)}{A_{b,bc}(Q)} \right\} \quad (2.31)$$

S'il y a des diffusions multiples, l'expression de F_s fait intervenir des fonctions pour lesquelles il n'existe aucune expression : γ_{sc} , γ_{bc} , m_{sc} et m_{bc} . Il est toutefois possible d'évaluer ces fonctions par simulation de type Monte-Carlo. Notamment en faisant l'approximation, uniquement pour le calcul des 4 fonctions, que l'intensité diffusée par la cellule, le buffer et l'échantillon ne dépend pas de Q . Ceci donne de bons résultats pour les échantillons dont les spectres ne présentent pas de variation trop brutale avec Q . Cette méthode de Monte-Carlo est présentée dans [55]

2) Correction de l'inhomogénéité de l'efficacité du détecteur

Ces expressions pour F_s sont exactes dans le cas de spectromètres parfaits, ayant une efficacité constante en Q (ou en θ). Or ceci n'est jamais le cas. On constate des aberrations de type gondole ou parabolique. Cependant, étant donné que l'intensité incohérente est constante en Q , le spectre expérimental d'un diffuseur purement incohérent est proportionnel à l'efficacité du détecteur. On mesure donc le spectre d'un diffuseur incohérent, noté I_i (1 mm d'eau légère par exemple) ; et de sa cellule vide, noté I_{ci} (si elle est différente de l'autre cellule vide, ce qui est le cas, par exemple, quand l'échantillon est dans une cellule pression). On effectue ensuite le traitement correspondant à la géométrie utilisée pour la mesure du diffuseur incohérent (equ. 2.29 ou 2.31), en remplaçant I_s par I_i , I_c par I_{ci} , et en prenant $I_b = 0$. Pour finir, on divise le spectre de l'échantillon par celui ainsi obtenu, corrigeant ainsi le spectre échantillon de l'efficacité du détecteur.

3) Détermination du facteur d'appareil

Dans le cas d'une expérience à géométrie plane, tous ces traitements (soustractions et correction d'efficacité) sont effectuées par le programme PASIDUR.PRO, disponible sur le web : <http://www-llb.cea.fr/pace/pasidur.html>. On obtient ainsi la section efficace différentielle par unité d'angle solide et par unité de volume : $\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}$ à une constante près. Cette constante est appelée facteur d'appareil, ou facteur de normalisation absolue. Le détail de la détermination de ce facteur est explicité dans [56], et requiert la mesure d'un spectre de graphite avec et sans l'atténuateur utilisé pour mesurer les transmissions. Le rapport de ces deux spectres donne la transmission de l'atténuateur. Comme indiqué auparavant, les mesures de transmission passent par la mesure de l'intensité du faisceau incident atténué. Il est donc possible, connaissant la transmission de l'atténuateur, de déterminer le flux incident sur l'échantillon, et donc le facteur d'appareil. D'un point de vue pratique, sachant que les spectres sont normalisés par le spectre d'un échantillon d'eau

légère (ou d'un autre diffuseur incohérent), on multipliera les spectres par le facteur suivant :

$$F_{app} = \frac{\frac{1}{T_{H_2O} e_{H_2O}} \frac{\Sigma_{H_2O}}{M_{H_2O}} - \frac{1}{T_{CV} e_{H_2O}} \frac{\Sigma_{CV}}{M_{CV}}}{\frac{\Sigma_{FV}}{M_{FV}} \frac{1}{T_A} \frac{S}{D^2}} \quad (2.32)$$

avec Σ_X les sommes des spectres bruts, M_X les moniteurs correspondants et T_X les transmissions. T_A est la transmission de l'atténuateur, e_{H_2O} est l'épaisseur du diffuseur incohérent utilisé, D est la distance échantillon-détecteur et S est la surface du détecteur (pour PAXE : $S = 3754,84 \text{cm}^2$).

4) Soustraction du bruit de fond incohérent

Après tous ces traitements, on obtient la section efficace différentielle, par unité d'angle solide, et par unité de volume $\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}$, exprimée en cm^{-1} . Cette section efficace peut se décomposer en une partie cohérente, reliée au facteur de structure statique, et une partie incohérente, ne dépendant pas de Q et ne contenant donc aucune information structurale. Le signal incohérent est donc ici considéré comme un bruit de fond plat qu'il convient de soustraire.

Pour ce faire, on peut soit calculer la section efficace incohérente en cm^{-1} , soit la mesurer. Le calcul est très simple, mais ne correspond que très rarement à la réalité de l'échantillon. En effet, les diverses manipulations de l'échantillon avec des ustensiles contenant de l'hydrogène (cônes de pipettes, verrerie, etc) contaminent l'échantillon avec de l'hydrogène. De plus, l'humidité de l'air apporte elle aussi son lot d'hydrogène, dès que l'échantillon est en contact avec l'air. Même en prenant toutes les précautions possibles (limiter au maximum le nombre de pipetages et de transvasements, laisser les échantillons, les tampons et les bouteilles de D_2O s'équilibrer en température avec l'air ambiant avant de les ouvrir, afin de limiter la condensation de l'humidité de l'air, hydrogénée, dans l'eau lourde, etc...) l'apport d'hydrogène par contamination est la plupart du temps au moins équivalent à la quantité d'hydrogène intrinsèque de l'échantillon (quand il s'agit de solutions diluées de protéines dans de l'eau lourde). La section efficace incohérente des échantillons de matière molle étant dominée par celle de l'hydrogène, il est donc très fréquent d'obtenir des sections efficaces incohérentes différant d'un facteur 2, ou plus, de celle donnée par le calcul. On préférera donc mesurer la section efficace incohérente. Pour cela, il faut mesurer la section efficace dans une gamme de vecteurs d'onde où la section efficace cohérente s'annule. Après soustraction du bruit de fond incohérent, on obtient $(\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega})_{coh}$, exprimée en cm^{-1} , que l'on notera I par la suite.

2.2.3 Eléments de théorie

L'alphabet ne contenant que 26 lettres, nous allons nous retrouver à court. Nous allons donc adopter les notations classiques pour la diffusion de neutrons aux petits angles ; et certaines lettres vont changer de signification. I désignera maintenant la section efficace différentielle cohérente par unité d'angle solide et de volume et sera appelée intensité. S désignera le facteur de structure,

dont la définition sera donnée par la suite et qui diffère de celle du facteur de structure statique. Ces modifications s'appliqueront dès qu'il s'agira de diffusion de neutrons aux petits angles.

L'approximation continue et la notion de contraste

La diffusion aux petits angles, comme son nom l'indique, concerne les petites valeurs de Q et donc les grandes distances (du nm au μm). A ces échelles on ne "distingue" plus les atomes, et la matière peut donc être considérée comme continue. L'intensité diffusée peut donc être écrite sous la forme d'une intégrale, et non plus d'une somme discrète :

$$I(Q) = \frac{1}{V} \left\langle \left| \int \rho(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.33)$$

avec $\rho(\vec{r})$ la densité de longueur de diffusion au point \vec{r} . Dans le cas qui nous intéresse, à savoir des solutions de macromolécules, l'intensité diffusée peut donc s'écrire comme suit, en introduisant la densité de longueur de diffusion moyenne du solvant ρ_s :

$$I(Q) = \frac{1}{V} \left\langle \left| \int [\rho(\vec{r}) - \rho_s] e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.34)$$

$$= \frac{1}{V} \left\langle \left| \int \Delta\rho(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.35)$$

$$= \frac{1}{V} \int \langle \Delta\rho(\vec{r}) \Delta\rho^*(\vec{r}) \rangle e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (2.36)$$

L'intensité diffusée est donc proportionnelle à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de l'excès de densité de longueur de diffusion.

On considère maintenant le cas de macromolécules homogènes, c'est à dire qui ont une densité de longueur de diffusion ne dépendant pas de \vec{r} . Dans ce cas, la limite de cette expression pour $Q \rightarrow 0$, donne :

$$I(Q = 0) = [(\rho_p - \rho_s) v_p]^2 c^2 kT \left(\frac{1}{c} \frac{dc}{d\pi} \right) = K^2 c^2 kT \chi \quad (2.37)$$

avec v_p le volume spécifique de la macromolécule en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, c la concentration massique et π la pression osmotique. L'intensité à l'origine est donc proportionnelle à la compressibilité osmotique $\chi = \frac{1}{c} \frac{dc}{d\pi}$. L'intensité diffusée n'est donc pas seulement reliée à la forme des macromolécules ; mais aussi aux interactions intermoléculaires. Le second terme intervenant dans l'expression de l'intensité est le terme de contraste, K , fondamental pour la diffusion de neutrons aux petits angles. Ce terme est proportionnel au volume spécifique de la macromolécule, et à la différence de densité de longueur de diffusion cohérente entre la macromolécule et le solvant, généralement exprimé en cm/g , s'écrit donc :

$$K = [(\rho_p - \rho_s) v_p] \quad (2.38)$$

Il est à signaler que nous avons choisi de tout exprimer en fonction des concentrations massiques, les contrastes s'expriment donc en cm/g. Cette convention n'est pas la plus naturelle, ni la plus élégante. Elle est toutefois plus usitée en biophysique, sûrement parce que, les échantillons étant souvent préparés en solubilisant une masse m de protéine lyophilisée dans un volume V de solvant, il est plus "parlant" de fonctionner en concentration massique. Cette convention est cependant assez marginale en matière molle. Beaucoup d'ouvrages préfèrent fonctionner avec les fraction volumiques. Dans ce cas, par exemple, l'équation 2.37 s'écrit, en fonction de la fraction volumique Φ et du volume d'un objet v :

$$I(Q = 0) = \Phi v \Delta \rho k T \chi \quad (2.39)$$

Le terme de contraste se réduit alors à $\Delta \rho$.

La variation de contraste

Les longueurs de diffusion des principaux éléments constituant les molécules organiques sont présentées dans le tableau 2.1.

Element	C	N	O	S	H	D
b_{coh}	6,65	9,36	5,80	2,85	-3,74	6,67

ТАВ. 2.1 – Longueurs de diffusion cohérente, en fermi ($1 fm = 10^{-13} cm$) des principaux éléments constituant les molécules organiques. Toutes ces longueurs de diffusion sont du même ordre de grandeur. On remarquera que les longueurs de diffusion de l'hydrogène et du deutérium sont de signe opposé. Ceci est à la base de la variation de contraste.

Il y a deux points remarquables à noter dans ce tableau : toutes les longueurs de diffusion sont du même ordre de grandeur ; et la longueur de diffusion de l'hydrogène (H) est négative tandis que celle du deutérium (D) est positive. Or, l'hydrogène est l'élément majoritaire de la plupart des composés et solvants organiques. Il est donc possible, en jouant sur la proportion H/D, de faire varier la densité de longueur de diffusion de ces composés ou solvants sur une large gamme. Par exemple, on peut faire varier la densité de longueur de diffusion de l'eau entre $\rho = -0,56.10^{10} cm^{-2}$, et $\rho = 6,33.10^{10} cm^{-2}$. Celle de la calmoduline pourrait varier entre $\rho = 1,93.10^{10} cm^{-2}$ (complètement hydrogénée), et $\rho = 7,34.10^{10} cm^{-2}$ (complètement deutériée).

Ces deux atouts des neutrons sont à la base de la variation de contraste. Dans le cas de mélanges de deux composés de densités de longueur de diffusion différentes en solution dans un solvant organique, il est souvent possible de faire varier la densité de longueur de diffusion du solvant en jouant sur son rapport H/D afin d'annuler le contraste de l'un ou l'autre des composés, et ainsi de "l'éteindre". Il est possible de calculer le rapport H/D du solvant qui éteint un composé donné. Il faut toutefois connaître la densité de celui-ci, et tenir compte du fait que certains hydrogènes de ce composé peuvent être labiles (les hydrogènes des fonctions acides, alcools et amines par exemple), et donc s'échanger avec les éventuels hydrogènes labiles du solvant (tous ceux de l'eau, un seul

pour l'éthanol par exemple).

S'il est relativement facile d'obtenir certains polymères, lipides et détergents deutériés (certains sont d'ailleurs disponibles auprès d'entreprises spécialisées), il est bien plus difficile d'obtenir des protéines deutériées. En effet, ces dernières doivent être synthétisées par des bactéries ou des levures cultivées en milieu deutérié ; et il s'avère que le D₂O est létal pour tous ces organismes vivants. Ceci nous amène à une limitation de la variation de contraste : bien que l'eau légère et l'eau lourde soient identiques sur bien des points ; il existe certaines différences assez subtiles. Par exemple, l'angle de valence de la molécule d'eau, ainsi que la distance O-H sont légèrement modifiées dans l'eau lourde. Par voie de conséquence, les diagrammes de phase de l'eau légère et de l'eau lourde diffèrent légèrement ; ainsi que la force de la liaison hydrogène [57] et les propriétés d'hydratation [58]. Ainsi, dans certains cas, faire varier le taux H/D de l'eau peut modifier certains paramètres physiques du système, comme la solubilité [59], la stabilité [60, 61] ou le degré d'oligomérisation [62] de certaines protéines. Il faut donc étudier l'influence du D₂O sur un système avant de procéder à des études de variation de contraste.

Nous n'avons pas pu obtenir la calmoduline deutériée. Nous n'avons donc travaillé qu'avec un seul contraste : calmoduline hydrogénée dans 100% de D₂O.

Le cas des solutions idéales - Définition du facteur de forme

Après cette longue digression sur le contraste, revenons à l'expression de l'intensité à l'origine :

$$I(Q = 0) = K^2 c^2 kT \left(\frac{1}{c} \frac{dc}{d\pi} \right)$$

Pour une solution idéale, solution sans interactions, pouvant être assimilée à un gaz parfait, la pression osmotique peut s'écrire :

$$\pi = \frac{kTcN_A}{M} \quad (2.40)$$

D'où l'expression de la compressibilité osmotique :

$$\left(\frac{1}{c} \frac{dc}{d\pi} \right) = \frac{M}{kTN_A c} \quad (2.41)$$

Il vient donc, pour une solution idéale :

$$I(Q = 0) = \frac{Mc}{N_A} K^2 \quad (2.42)$$

Une solution idéale est une solution de particules identiques et sans interactions. L'intensité diffusée par une telle solution est donc l'intensité diffusée par une particule, multipliée par le nombre

de particule. On peut donc écrire :

$$I(Q) = \frac{N}{V} \left\langle \left| \int_{\Omega} (\Delta\rho(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r}) \right|^2 \right\rangle \quad (2.43)$$

où l'intégrale porte sur le volume Ω de la particule, et où N est le nombre de particules. Pour des particules homogènes, on obtient :

$$I(Q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 \frac{1}{\Omega} \left\langle \left| \int_{\Omega} e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.44)$$

Ainsi vient la définition du facteur de forme, $P(\vec{Q})$:

$$P(\vec{Q}) = \frac{1}{\Omega} \left\langle \left| \int_{\Omega} e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.45)$$

$P(\vec{Q})$ est appelé facteur de forme, car dans le cas d'une solution isotrope, la moyenne sur le temps revient à une moyenne sur toutes les orientations de la particule. Et ainsi $P(\vec{Q})$ ne dépend plus que de la norme de \vec{Q} , et n'est reliée qu'à la forme de la particule. Dans le cas de solution anisotropes, telles des solutions de cristaux liquides, $P(\vec{Q})$ dépend également du paramètre d'ordre. Par la suite, il ne sera plus question que de solutions isotropes, et donc de facteurs de formes isotropes également. On peut définir le rayon de giration R_g d'une particule (paramètre qui interviendra souvent par la suite) :

$$R_g^2 = \frac{1}{\Omega} \int_{\Omega} r^2 d^3\vec{r} \quad \text{ou} \quad R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_i^2 \quad (2.46)$$

Le rayon de giration est donc relié à la taille globale de l'objet. Par exemple, dans le cas d'une sphère de rayon R , $R_g = \sqrt{3/5}R$. Les définitions du facteur de forme et du rayon de giration viennent naturellement pour des particules homogènes. Elles peuvent cependant être généralisées au cas de molécules inhomogènes :

$$P(\vec{Q}) = \frac{1}{K^2\Omega} \left\langle \left| \int_{\Omega} \Delta\rho(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.47)$$

$$R_g^2 = \frac{1}{K\Omega} \int_{\Omega} \Delta\rho(\vec{r}) r^2 d^3\vec{r} \quad \text{ou} \quad R_g^2 = \frac{\sum_{i=1}^N b_i r_i^2}{\sum_{i=1}^N b_i} \quad (2.48)$$

Exemples de facteurs de formes et expression limites

Pour certains objets simples, il est possible d'obtenir des expressions littérales exactes pour le facteur de forme, ainsi le facteur de forme d'une sphère de rayon R :

$$P_{sphere}(Q) = \left[\frac{3(\sin QR - QR \cos QR)}{(QR)^3} \right]^2 \quad (2.49)$$

ou pour une chaîne polymère idéale de rayon de giration R_g :

$$P_{Debye}(Q) = \frac{2}{(QR_g)^4} \left(e^{-(QR_g)^2} + (QR_g)^2 - 1 \right) \quad (2.50)$$

ou pour un Dumbell (deux sphères de rayon r séparées par une distance d) :

$$P_{Dumbell}(Q) = 2 \left[\frac{3(\sin QR - QR \cos QR)}{(QR)^3} \right]^2 \left(1 + \frac{\sin Qd}{Qd} \right) \quad (2.51)$$

Il est également possible de calculer numériquement des expressions approchées pour des objets plus complexes, tel un cylindre de rayon R et de demi longueur L :

$$P(Q) = \int_0^{\pi/2} j_0(QL \cos \alpha) \frac{J_1(QR \sin \alpha)}{QR \sin \alpha} \sin \alpha d\alpha \quad (2.52)$$

ou pour un ellipsoïde de révolution de demi-axes a et b , $a > b$ avec $v = a/b$:

$$P(Q) = \int_0^1 \left[\frac{3 \left(\sin Qa \sqrt{1+x^2(v^2-1)} - Qa \sqrt{1+x^2(v^2-1)} \cos Qa \sqrt{1+x^2(v^2-1)} \right)}{(Qa \sqrt{1+x^2(v^2-1)})^3} \right]^2 dx \quad (2.53)$$

Cependant, l'analyse du spectre d'un échantillon réel à l'aide de ces facteurs de forme passe par l'ajustement d'une forme idéale (sphère parfaite, chaîne idéale) sur le spectre d'un échantillon qui ne l'est pas. L'inconvénient de cette méthode est que les paramètres obtenus ne sont pas des paramètres objectifs, mais dépendent de l'adéquation entre le modèle et l'échantillon réel, qu'il est en général impossible d'estimer. Ceci n'est donc pas très rassurant. Il est en général plus confortable d'obtenir des paramètres objectifs, qui ne dépendent d'aucun modèle, et qui ne font appel à aucune hypothèse sur la nature de l'échantillon. C'est pour cette raison qu'il est souvent fait appel aux formes limites du facteur de forme. Elles sont des développements limités du facteur de forme, valables dans un certain domaine de Q , et faisant appel à des hypothèses minimales sur l'échantillon (hypothèses qui sont d'ailleurs souvent vérifiables par la cohérence de plusieurs formes limites).

De plus, sur un spectromètre à petits angles classique, on a généralement $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \approx 10\%$; la résolution est donc assez mauvaise ($\frac{\Delta Q}{Q} > 10\%$). Selon le type de facteur de forme utilisé, il est donc nécessaire de le convoluer avec la résolution du spectromètre avant de l'ajuster sur un spectre réel. Pour les facteurs de forme variant lentement avec Q , cette convolution ne change pas grand chose; comme l'illustre la figure 2.6, avec le cas de la chaîne gaussienne. Pour ce type de facteurs de forme, dont la variation en Q est "douce"; et dont font partie les facteurs de forme de chaîne polymères ainsi que toutes les formes limites (voir ci-après); ne pas tenir compte de la résolution introduit des erreurs relatives inférieures à 0,1%. Compte tenu de toutes les autres erreurs expérimentales possibles, il est donc parfaitement inutile de tenir compte de la résolution

dans ces cas. En revanche, pour les facteurs de formes variant très brutalement avec Q , il est très important de tenir compte de la résolution ; comme l'illustre la figure 2.6, avec le cas du facteur de forme d'une sphère. En effet, la résolution écrase significativement les oscillations de sphère à grand Q . Ceci modifie en général considérablement les résultats d'ajustements de facteurs de forme présentant des oscillations ; tels les facteurs de forme de sphères, d'ellipsoïdes avec ν peu différent de 1, ou de "dumbbells". Ceci est encore un autre avantage des formes limites : elles sont insensibles à la résolution.

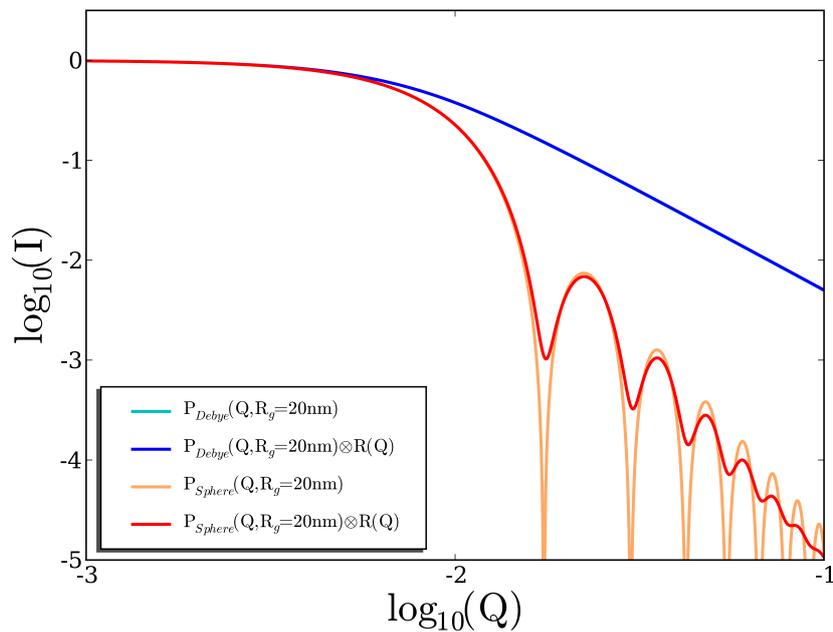


FIG. 2.6 – Représentation "loglog" des facteurs de forme d'une sphère et d'une chaîne polymère gaussienne avant et après convolution par la résolution. La résolution considérée est une résolution gaussienne avec $\Delta Q/Q = 10\%$. La convolution par la résolution ne modifie pas les facteurs de formes "à variation douce", comme la loi de Debye. Elle écrase par contre les variations brutales, et modifie donc les facteurs de forme comme le facteur de forme d'une sphère.

Dans le domaine de Guinier strict, i.e. dans une gamme de Q telle que $QR_g \ll 1$, on obtient l'expression suivante, exacte quel que soit le type d'objets [63] :

$$P(Q) = 1 - (QR_g)^2 / 3 \quad (2.54)$$

En traçant $I(Q)$ en fonction de Q^2 , on peut donc aisément obtenir le rayon de giration, premier paramètre objectif. Malheureusement il est en général impossible, pour des raisons pratiques, de mesurer $I(Q)$ dans une gamme de Q telle que $QR_g \ll 1$. En effet, dans ce domaine de Guinier strict, l'intensité augmente lentement quand Q diminue ; et le flux sur les spectromètres diminue comme λ^5 et comme D^4 (D =distance échantillon-détecteur) d'une configuration à l'autre. Dans les configurations du spectromètre qui correspondent au domaine de Guinier strict, le flux est donc

souvent très faible en rapport avec la section efficace ; et dans bien des cas ne permet pas d'acquérir des données avec une statistique correcte dans des temps raisonnables. Il existe cependant deux approximations un peu moins générales que le développement de l'équation 2.54 ; mais valable dans un domaine de Q plus étendu, le domaine de Guinier étendu, tel que $QR_g \leq \sqrt{2}$ (par la suite nous ne précisons pas forcément "étendu"). La première est l'approximation de Zimm (équation 2.55), valable pour les objets linéaires (polymères, bâtons). La représentation associée est $1/I(Q) = f(Q^2)$

$$P(Q) \approx \left[1 + (QR_g)^2 / 3 \right]^{-1} \quad (2.55)$$

Le deuxième est l'approximation de Guinier (équation 2.56), valable pour les objets compacts (billes, protéines). La représentation associée est $\ln(I(Q)) = f(Q^2)$

$$P(Q) \approx e^{-(QR_g)^2/3} \quad (2.56)$$

Ces deux dernières formes limites permettent d'obtenir le rayon de giration de la particule ou de la macroméculé observée ; pourvu que l'on ait mesuré proprement son facteur de forme, et que l'on sache à quelle classe d'objet il appartient.

En fait, il n'est généralement même pas nécessaire de savoir si l'objet mesuré est un polymère ou un objet compact. En effet, si la mesure est suffisamment propre (mesure du facteur de forme pur, absence d'agrégation, statistique correcte), et si elle est effectuée sur une gamme en Q suffisamment étendue ($0,4R_g < Q < 3R_g$ par exemple) ; il est possible de faire la différence entre les deux types d'objets. En effet, les deux formes limites précédentes doivent être valables dans le "domaine de Guinier étendu", soit jusqu'à $QR_g = \sqrt{2}$, si elles sont appliquées au bon type d'objet. Mais elles ne sont valables que dans le "domaine de Guinier strict" si elles sont appliquées au mauvais type d'objet. Pour déterminer la forme limite adaptée, il suffit de tracer le spectre expérimental ainsi que les deux lois ajustées, dans les deux représentations. La "bonne" approximation doit suivre la courbe expérimentale jusqu'à $QR_g = \sqrt{2}$; la mauvaise doit décrocher bien plus tôt. Un exemple est donné sur la figure 2.7.

Il existe une troisième forme limite, valable pour toutes les chaînes polymères, qui se trouve être la loi de Debye. En effet, le facteur de forme de n'importe quelle chaîne polymère suit une loi de Debye, jusqu'à $QR_g < 3$. Pour bénéficier d'une représentation commode, nous utiliserons en fait une approximation de la loi de Debye, valable avec une erreur inférieure à 0,4% jusqu'à $QR_g = 3$ [64] :

$$P(Q) \approx \left[1 + 0,359 (QR_g)^{2,206} \right]^{-1} \quad (2.57)$$

Ces formes limites dans le domaine de Guinier donnent accès au rayon de giration, soit à la dimension globale de l'objet (à petit Q on regarde des grandes échelles). A grand Q , dans le domaine

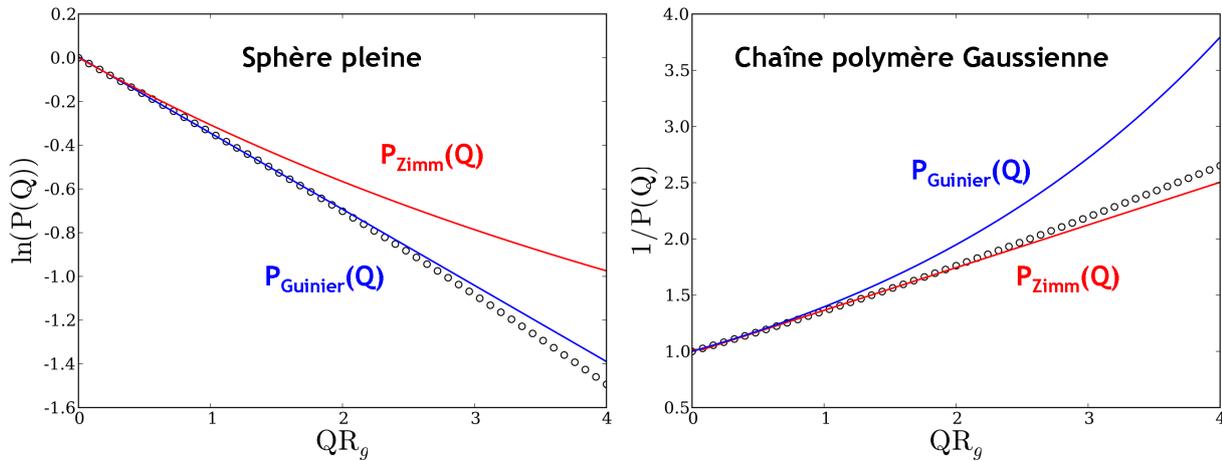


FIG. 2.7 – A gauche, facteur de forme d'une sphère (○) en représentation de Guinier. A droite, facteur de forme d'une chaîne polymère idéale (○) en représentation de Zimm. Dans les deux cas, on a représenté les approximations de Guinier (—) et de Zimm (—). Les deux formes limites se rejoignent pour $QR_g \ll 1$, car leurs développements limités sont identiques ; mais seule la "bonne" forme limite est valable l'intégralité du domaine de Guinier étendu ($QR_g < \sqrt{2}$). Inspiré de [63].

intermédiaire, tel que $a \geq QR_g \geq 4$ (a est la taille caractéristique des diffuseurs élémentaires et est donc de l'ordre des distances interatomiques ; au delà de $1/a$ finit la diffusion aux petits angles, et commence la diffraction), le facteur de forme suit des lois de puissance dont les exposants donnent une indication sur la dimension fractale de l'objet observé. Les exposants couramment rencontrés sont récapitulés dans le tableau 2.2.

Une représentation souvent utilisée pour les facteurs de forme dans le régime intermédiaire est la représentation de Kratky, soit $Q^2 \cdot I(Q) = f(Q)$. Cette représentation permet en effet de bien faire la différence entre les différents comportements possibles. Ainsi que l'illustre la figure 2.8, à grand Q , la courbe d'une particule compacte tendra vers zéro ; celle d'une chaîne polymère gaussienne tendra vers un plateau ; celles d'un polyélectrolyte, d'un objet unidimensionnel, d'une chaîne polymère à volume exclu ou d'une chaîne polymère à longueur de persistance tendront vers l'infini.

Ces formes limites peuvent donc permettre de déterminer le type d'objet observé si celui-ci est inconnu. Mais elles peuvent aussi permettre de déterminer le bruit de fond incohérent à soustraire quand le type d'objet observé est certain. Par exemple, pour une protéine native, objet compact, on doit obtenir une décroissance en Q^{-4} à grand Q et on peut donc déterminer la "quantité" de bruit de fond à soustraire pour obtenir ce Q^{-4} .

L'utilisation de ces formes limites à grand et petit Q est un peu délicate à cause de leur forte autocohérence. Par exemple, pour déterminer le type de l'objet observé, il faut déterminer le domaine intermédiaire. Mais pour déterminer ce domaine intermédiaire, il faut connaître le rayon de

Type d'objet	Forme limite
Particule ou macromolécule compacte	$P(Q) \propto Q^{-4}$
Chaîne polymère idéale	$P(Q) \propto Q^{-2}$
Chaîne polymère à volume exclu	$P(Q) \propto Q^{-1.7}$
Objet 1D (polyélectrolyte, bâton)	$P(Q) \propto Q^{-1}$
Objet 2D (disque, sphère creuse)	$P(Q) \propto Q^{-2}$

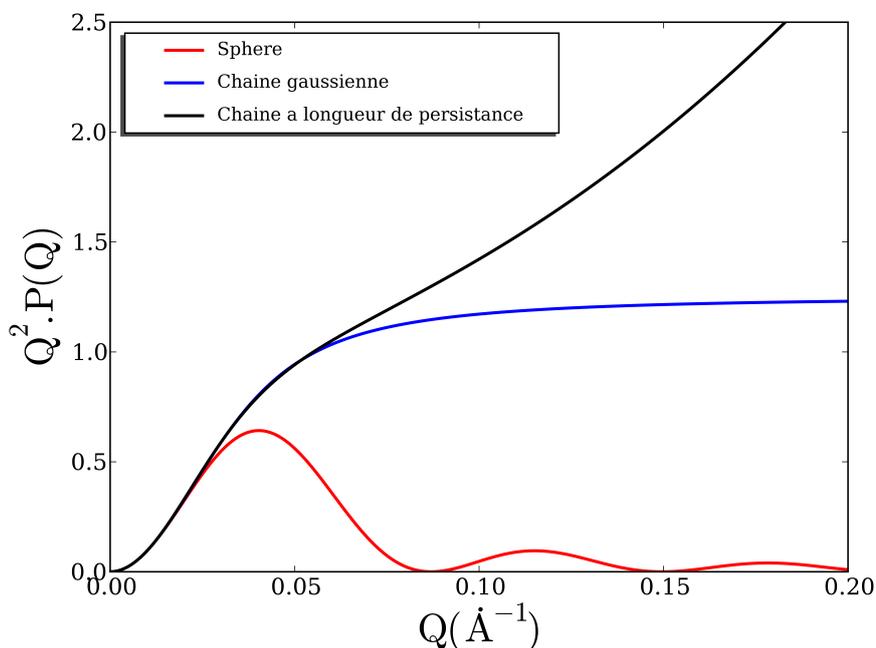
TAB. 2.2 – Formes limites à grand Q ($QR_g > 4$) du facteur de forme de différents types d'objets

FIG. 2.8 – Représentation de Kratky ($Q^2 \cdot I(Q) = f(Q)$) des facteurs de forme d'une sphère, d'une chaîne polymère gaussienne, et d'une chaîne polymère à longueur de persistance de même rayon de giration. Le facteur de forme d'une chaîne gaussienne présente un plateau "à grand Q ". Ceux d'objets plus compacts, comme par exemple une sphère, tendent vers 0 "à grand Q "; ceux d'objets "moins compacts", comme par exemple une chaîne à longueur de persistance ou à volume exclu, tendent vers l'infini "à grand Q ". Cette représentation est donc très usitée pour les études de dépliement de protéines, où les protéines passent d'une conformation compacte (Q^{-4}), à une conformation de type chaîne polymère gaussienne (Q^{-2}) ou à volume exclu ($Q^{-1.7}$), ou encore à longueur de persistance.

giration de l'objet. Pour connaître le rayon de giration il faut non seulement connaître le domaine de Guinier, également défini en fonction du rayon de giration, mais aussi le type de l'objet observé. Seule une méthode itérative peut permettre de résoudre ce problème. Cette méthode d'analyse peut donc sembler fastidieuse et inutile. Cependant son autocohérence fait aussi sa force, et permet d'obtenir des ensembles de résultats fiables et solides.

Pour en finir avec ces formes limites, il peut exister un dernier domaine : le domaine de Fujisawa [65], situé entre le domaine de Guinier et le domaine intermédiaire. Ce domaine existe dans le cas d'objets de type "dumbell" (la calmoduline native en fait partie), c'est à dire des objets constitués de deux sous-parties identiques (de rayon de giration r_g , et de facteur de forme $p(Q)$) séparées par une distance d . Pour ce type d'objet, le facteur de forme peut s'écrire :

$$P(Q) = \frac{p(Q)}{2} \left[1 + \frac{\sin(Qd)}{(Qd)} \right] \quad (2.58)$$

Dans le domaine en Q tel que $QR_g \leq 1$, avec R_g le rayon de giration global de la molécule, le facteur de forme suit l'approximation de Guinier, avec :

$$R_g^2 = r_g^2 + \frac{d^2}{4} \quad (2.59)$$

Un développement limité autour de $Q \approx \frac{2\pi}{d}$ du facteur de forme donne l'expression suivante :

$$P(Q) = \frac{Qd}{2} e^{-\frac{(Qr_g)^2}{3}} \quad (2.60)$$

En représentation de Fujisawa ($\ln \frac{I}{Q}$ en fonction de Q^2), autour de la valeur $Q = \frac{2\pi}{d}$, l'intensité varie linéairement avec Q . La pente de cette droite donne r_g .

Les solutions réelles - Facteur de structure et développements du viriel

Pour une solution idéale, il vient :

$$I(Q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 P(Q) \quad (2.61)$$

Cependant, une solution idéale n'existe pas (du moins dans cette thèse), ce n'est que la limite infiniment diluée d'une solution réelle. On peut donc seulement écrire :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I(Q)}{c} \right) = \frac{M}{N_A} K^2 P(Q) \quad (2.62)$$

Quand la concentration n'est pas nulle, on a :

$$I(Q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 [P(Q) + (Mc) S_2(Q, c)] \quad (2.63)$$

où $P(Q)$ est relié aux corrélations intramoléculaires de la densité, et où $S_2(Q)$ est relié aux corrélations intermoléculaire de la densité. Dans le cas de macromolécules ou de particules à symétrie sphérique, le problème se simplifie. En effet, l'excès de densité (de longueur de diffusion) de la

solution peut s'écrire :

$$\Delta\rho(\vec{r}) = \Delta\rho_{intra}(r) \otimes \sum_{i=1}^n \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \quad (2.64)$$

avec $\Delta\rho^{intra}(\vec{r})$ l'excès de densité d'une particule ayant son centre de "masse" (en fait, son centre de longueur de diffusion) en 0, et où la somme porte sur les n centres de masse présents dans la solution aux coordonnées \vec{r}_i . L'équation 2.36 peut donc s'écrire :

$$I(Q) = \left(\frac{1}{\Omega} \int_{\Omega} \langle \Delta\rho_{intra}(\vec{r}) \Delta\rho_{intra}^*(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \rangle \right) * \left(\frac{1}{n} \left\langle \sum_{i=1}^n e^{i\vec{Q}\vec{r}_i} \right\rangle \right) \quad (2.65)$$

ou encore :

$$I(Q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 P(Q) S(Q, c) \quad (2.66)$$

Avec $S(Q, c)$ le facteur de structure de la solution. L'écriture du facteur de structure ainsi obtenue est une écriture en description discrète :

$$S(Q, c) = \left(\frac{1}{n} \left\langle \sum_{i=1}^n e^{i\vec{Q}\vec{r}_i} \right\rangle \right) \quad (2.67)$$

Il existe aussi une définition en description continue, faisant appel à la fonction de corrélation de paires $g(\vec{r}, c)$:

$$S(Q, c) = 1 + \frac{cN_A}{M} \left\langle \int [g(r, c) - 1] e^{i\vec{Q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right\rangle \quad (2.68)$$

Le facteur de structure n'est évidemment défini que pour des objets sans orientation privilégiée (des sphères), et ayant un centre de masse invariant dans le temps. Il n'est donc pas défini pour les polymères, ni même pour les protéines en toute rigueur. Dans tous les cas, $S(Q, c)$ et $S_2(Q, c)$ ont les propriétés suivantes :

$$\lim_{Q \rightarrow \infty} S(Q, c) = 1 \quad (2.69)$$

$$\lim_{Q \rightarrow \infty} S_2(Q, c) = 0 \quad (2.70)$$

Pour $QR_g \gg 1$, $S(Q, c)$ et $S_2(Q, c)$ sont donc négligeables, et seul le facteur de forme est mesuré. Cependant, pour $QR_g \lesssim 1$, soit dans le domaine de Guinier, ces termes peuvent être prépondérants. S'il n'est pas possible d'atteindre une concentration telle que ces termes soient négligeables, ceci empêche une bonne détermination du rayon de giration et de la masse molaire. Dans ces cas, il est d'usage de procéder à des extrapolations à concentration nulle. En effet, à concentration non nulle, l'intensité à l'origine, I_0 , s'écrit :

$$I_0 = K^2 c^2 kT \left(\frac{1}{c} \frac{dc}{d\pi} \right) \quad (2.71)$$

Or, un développement du viriel de la pression osmotique donne :

$$\pi = \frac{kTN_A}{M}c(1 + A_2Mc + O(c^2))^{-1} \quad (2.72)$$

Ceci donne donc :

$$\frac{c}{I_0} = \frac{M}{N_A}K^2(1 + 2A_2Mc + O(c^2)) \quad \text{pour } A_2Mc \ll 1 \quad (2.73)$$

En se plaçant dans un domaine de concentrations tel que $A_2Mc \ll 1$, il est donc possible d'extrapoler linéairement l'intensité à concentration nulle ; et d'obtenir par la même occasion le deuxième coefficient du viriel, A_2 , qui quantifie les interactions intermoléculaires en régime dilué. Le signe de A_2 notamment est très important : une valeur positive de A_2 implique des interactions répulsives, une valeur négative, des interactions attractives. Pour extrapoler l'intensité à concentration nulle, il suffit de tracer $\frac{c}{I_0}$ en fonction de c (représentation de Zimm ou "Zimm plot"). L'ordonnée à l'origine donne I_0 , la pente donne A_2 . Le même genre d'extrapolation peut être effectué pour le rayon de giration. En effet, d'après l'approximation de Zimm [66] :

$$S_2(Q, c) = -2A_2McP^2(Q) \quad (2.74)$$

On obtient donc la relation suivante :

$$R_g^{-2}(c) = R_g^{-2}(0) [1 + 2A_2Mc + O(c^2)] \quad (2.75)$$

Les extrapolations à concentration nulle pour l'intensité à l'origine et pour le rayon de giration sont valables pour tous les objets, à symétrie sphérique ou non, ayant un centre de masse invariant ou non. En effet, les développements du viriel de $S(Q, c)$ et de $S_2(Q, c)$ conduisent aux mêmes formes d'équations.

2.3 La diffusion quasi-élastique et inélastique de neutrons par la technique de temps de vol

La diffusion de neutrons aux petits angles, diffusion élastique, permet donc d'accéder à la structure de macromolécules en solution. Pour étudier leur dynamique interne, il faut maintenant mesurer les échanges d'énergie entre les neutrons et ces macromolécules. Ou, plus précisément, mesurer la section efficace différentielle par unité d'angle solide et par unité d'énergie $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$: c'est la diffusion quasi-élastique et inélastique de neutrons. Il existe plusieurs techniques qui permettent de réaliser cette mesure : l'écho de spin (ou "spin-écho"), la rétrodiffusion (ou backscattering), et le temps de vol (TDV ou "time-of-flight", TOF). Nous avons utilisé la technique de temps de vol ; la mieux adaptée pour mesurer la dynamique interne de la protéine à l'échelle de la picoseconde ou de la dizaine de picosecondes.

2.3.1 Principe de la mesure de temps de vol

Le but de ce type d'expériences est de mesurer $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$; et donc de mesurer la fraction de neutrons diffusés à l'angle 2θ , et ayant échangé une énergie ω avec l'échantillon. Il faut donc mesurer l'énergie des neutrons diffusés, en connaissant leur énergie initiale. La technique de temps de vol le fait le plus simplement possible (dans le principe) : on envoie une bouffée de neutrons monochromatiques (et donc monocinétiques), d'énergie ω_0 , sur l'échantillon au temps t_0 ; et des détecteurs, placés à différents angles θ et tous à la même distance D de l'échantillon, comptent le nombre de neutrons en fonction du temps (on chronomètre les neutrons). Une fois tous les neutrons arrivés, on peut recommencer. Le temps τ mis par un neutron pour arriver jusqu'au détecteur est appelé "temps de vol". Le nombre de neutrons n , diffusés par un échantillon de transmission T soumis à un flux incident Φ_0 et détectés dans un canal correspondant à un temps de vol compris entre $\tau - \Delta\tau/2$ et $\tau + \Delta\tau/2$ par le détecteur d'efficacité eff situé à l'angle 2θ , et couvrant l'angle solide $\Delta\Omega$ durant le temps de mesure t , est :

$$n = \Phi_0.t.\Delta\Omega.eff(\omega).T(\theta, \omega).\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\tau}\right)\Delta\tau \quad (2.76)$$

Un spectre brut de temps de vol peut donc donner accès, après traitement, à $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\tau}$. Or, le temps de vol, τ , d'un neutron est directement relié à l'énergie ω qu'il a échangée avec l'échantillon :

$$\tau^2 = \frac{m_n D^2}{2\hbar(\omega_0 + \omega)} \quad (2.77)$$

ce qui implique :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\tau} = \frac{2}{\sqrt{\omega_0}} \left(\frac{m_n}{2\hbar}\right)^{3/2} \frac{D^3}{\tau^4} \frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \quad (2.78)$$

Le spectre brut de temps de vol permet ainsi d'obtenir $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$, la quantité recherchée.

La figure 2.9 présente le schéma du spectromètre à temps de vol du LLB, MIBEMOL. On peut y voir le système de six disques "hacheurs" de faisceau, ou "choppers", qui permet d'obtenir des bouffées de neutrons monocinétiques ; les moniteurs, qui servent à normaliser les spectres ; et les détecteurs ${}^3\text{He}$ situés sur un arc de cercle, à 3,58 m de l'échantillon.

2.3.2 Traitement des données

Les spectres sont normalisés au moniteur pour corriger des variations de Φ_0 . Comme pour la DNPA, il faut soustraire le spectre d'une cellule vide ainsi que celui d'un témoin (on ne soustrait pas ici de bruit de fond, ni de faisceau vide). Il peut, dans certains cas, être nécessaire d'effectuer une correction d'auto-écranage (ou auto-atténuation), i.e. corriger du fait que la transmission dépend de l'angle de diffusion 2θ .

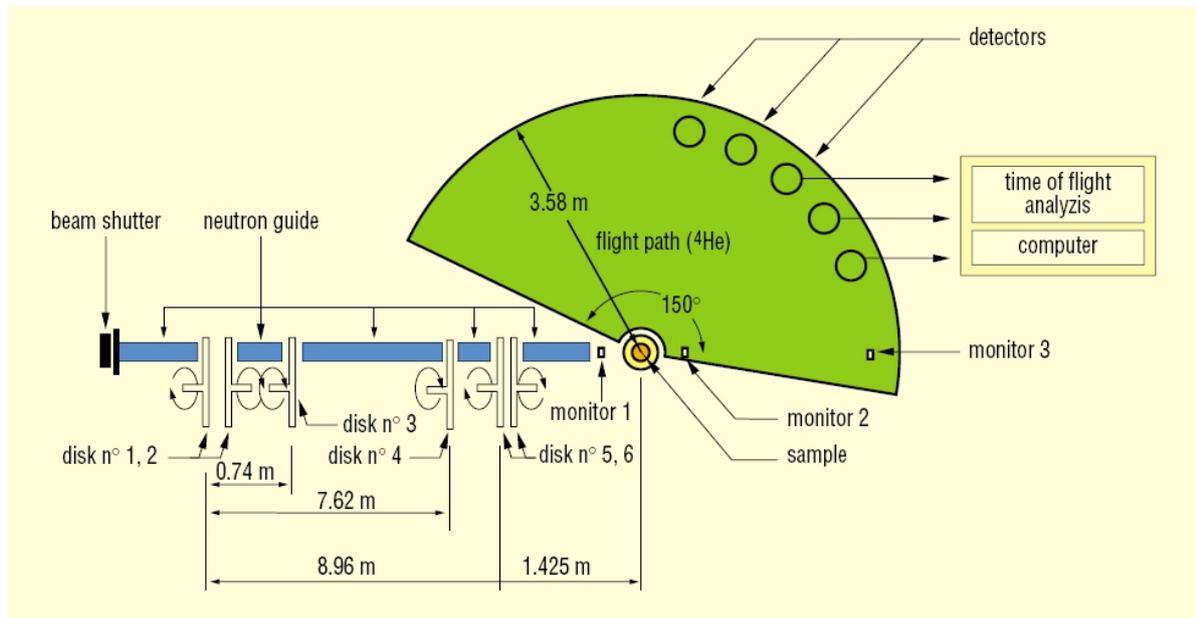


FIG. 2.9 – Le spectromètre à temps de vol du LLB, MIBEMOL. Un système de 6 "choppers" produit des bouffées de neutrons monocinétiques, qui sont envoyés sur un échantillon. Une banque de détecteurs, placés à distance fixe de l'échantillon, et couvrant un large domaine angulaire (150°), enregistre le nombre de neutrons, en fonction de l'angle de diffusion 2θ , et du "temps de vol", temps mis par le neutron pour parcourir la distance séparant l'échantillon des détecteurs.

Comme pour la diffusion aux petits angles, deux types de géométries sont couramment utilisées : la géométrie plane et la géométrie cylindrique. Avec toutefois quelques différences : 1) la diffusion multiple étant beaucoup plus gênante qu'en diffusion aux petits-angles, on se limite à des transmissions à angle nul ($T(\theta = 0)$) de 0.9 pour l'échantillon (ce qui correspond à des épaisseur d'1mm pour des solutions de protéines concentrées en D_2O) ; 2) les faisceaux sont beaucoup plus étendus qu'en DNPA : 25 mm x 50mm pour MIBEMOL, contre 7 mm de diamètre pour PAXE ; 3) les angles de diffusion sont beaucoup plus élevés qu'en DNPA : $\theta_{max} \sim 75^\circ$ en temps de vol contre $\theta_{max} \sim 10^\circ$ en DNPA. La figure 2.10 présente les deux géométries utilisées en temps de vol.

Les principales différences avec la DNPA, sont donc : 1) en géométrie cylindrique, les échantillons sont des cylindres creux et non pleins, comme pour les petits angles ; 2) en géométrie plane, la cellule est inclinée d'un angle α , valant typiquement 45° ou 55° afin de ne pas avoir une absorption totale pour $2\theta = 90^\circ$ (sinon, pour $2\theta = 90^\circ$, l'épaisseur d'échantillon traversée par les neutrons devient de l'ordre de la largeur de la cellule, soit de l'ordre de 30 mm, et la transmission y est donc très proche de 0).

Soustractions

En géométrie plane, l'épaisseur moyenne traversée par les neutrons variant fortement avec l'angle de diffusion, il est nécessaire d'effectuer les corrections d'auto-écrantage lors de la sous-

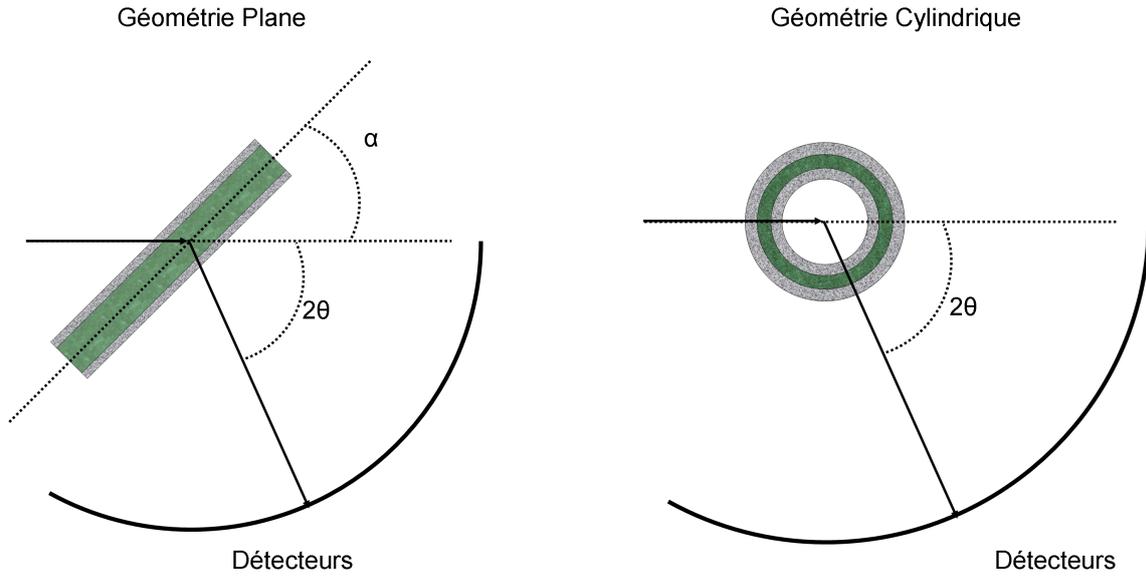


FIG. 2.10 – Les deux géométries les plus utilisées pour la diffusion de neutrons par temps de vol : La géométrie plane et la géométrie cylindrique.

traction, et on obtient :

$$I_s(\theta, \tau) = \frac{I_{s+c}(\theta, \tau) - \gamma_{s,c}(\theta, \tau)I_c(\theta, \tau)}{\alpha_s(\theta, \tau)\phi_c(\theta, \tau)} - (1 - f)\frac{I_{b+c}(\theta, \tau) - \gamma_{b,c}(\theta, \tau)I_c(\theta, \tau)}{\alpha_b(\theta, \tau)\phi_c(\theta, \tau)} \quad (2.79)$$

Avec f la fraction volumique de l'objet étudié dans la solution, qui est généralement beaucoup plus élevée qu'en DNPA. Le calcul des coefficients $\gamma_{s,c}$, $\gamma_{b,c}$, α_s , α_b et ϕ_c (qui dépendent de l'angle de diffusion, ainsi que de la longueur d'onde des neutrons incidents et diffusés, et donc de τ), et la soustraction sont effectués par les programmes de traitement de données de temps de vol.

En géométrie cylindrique, l'épaisseur moyenne traversée par les neutrons varie peu avec l'angle de diffusion. De plus, les transmissions à angle nul de l'échantillon sont généralement supérieures à 0,9, et sont très proches de celles du témoin. A pression ambiante, les cellules utilisées sont des cellules fines en aluminium, ayant une transmission proche de 1. Les transmissions de la cellule, de l'échantillon dans la cellule, et du témoin dans la cellule varient donc peu avec l'angle de diffusion. Dans ces conditions, on peut donc considérer que :

$$I_s(\theta, \tau) = \left[\frac{I_{s+c}(\theta, \tau)}{T_{s+c}(\theta = 0)} - \frac{I_c(\theta, \tau)}{T_c(\theta = 0)} \right] - (1 - f) \left[\frac{I_{s+c}(\theta, \tau)}{T_{s+c}(\theta = 0)} - \frac{I_c(\theta, \tau)}{T_c(\theta = 0)} \right] \quad (2.80)$$

Quand la cellule a une transmission élevée, la géométrie cylindrique est donc plus confortable. D'autant plus que dans cette géométrie, il n'y a pas le problème d'orientation de la cellule (orienter une cellule dans un cryostat sur un spectromètre à temps de vol n'est pas trivial). C'est donc cette géométrie que nous avons choisi pour les études à pression ambiante.

Correction de l'efficacité du détecteur

En DNPA, il est d'usage d'utiliser l'eau ou le plexiglass en tant que diffuseurs incohérents pour corriger de l'efficacité du détecteur. Cependant, l'eau et le plexiglass ne sont pas purement incohérents. Ceci, n'est pas gênant pour la DNPA, car l'eau et le plexiglass n'ont pas de structure aux échelles sondées dans ce type d'expériences. Ils diffusent donc de manière purement incohérente aux petits angles. Les expériences de temps de vol concernent d'autres gammes de Q . Sur MIBEMOL, par exemple, les gammes en Q des différentes configurations du spectromètres sont comprises entre $0,1 \text{ \AA}^{-1} < Q < 6 \text{ \AA}^{-1}$. Dans cette gamme de Q , l'eau a une structure, très étudiée par ailleurs, et présente notamment deux pics de corrélation liquide autour de 2 \AA^{-1} et 4 \AA^{-1} . L'eau ne peut donc pas servir à corriger de l'efficacité des détecteurs pour les expériences de temps de vol. Pour cela, on utilise le vanadium, qui a une longueur de diffusion cohérente 10 fois plus faible que celle de l'hydrogène. Le vanadium possède en plus l'avantage d'être un diffuseur purement élastique. Le spectre du vanadium permet donc à la fois de corriger de l'efficacité des détecteurs, mais aussi de mesurer la résolution en énergie de l'appareil.

Regroupement et Rebin

Pour améliorer la statistique, on procède ensuite à un regroupement des spectres mesurés par des détecteurs situés dans un même domaine angulaire. Sur MIBEMOL par exemple, on rassemble en général les spectres en 11 groupements distincts. Les données peuvent ensuite soit être directement ajustées avec des modèles $M(\theta, \tau)$ exprimés en angle de diffusion et en temps de vol; soit transposées dans l'espace (Q, ω) à l'aide des relations 2.1 et 2.77 (cette étape est couramment appelée "rebin") et ensuite ajustées par des modèles $M(Q, \omega)$

Résolution et ajustement des modèles

La production de bouffées de neutrons monocinétiques est assurée par un système de "choppers" (six en général, voir figure 2.11). Les neutrons ne traversent un couple de choppers que pendant le bref instant où leurs fentes coïncident. Les couples (1,2) et (5,6), séparés par la distance d , ont la même fréquence de rotation, N ; mais sont déphasés de ϕ . Les fentes du couple (5,6) ne seront donc en coïncidence qu'au temps $t = \frac{\phi}{2\pi N}$, le temps de référence ($t = 0$) étant le temps de coïncidence du couple (1,2). Seuls les neutrons ayant une vitesse

$$V_0 = \frac{2\pi Nd}{\phi + n\pi} \quad n \in Z \quad (2.81)$$

peuvent traverser le système [(1,2);(5,6)]. Les choppers 3 et 4 éliminent les ordres $n > 1$. Cependant, les fentes ayant une taille non nulle, la bouffée monocinétique n'est pas parfaite : elle a une durée non nulle, et sa distribution de vitesses a une largeur non nulle également. Cela induit une certaine incertitude sur l'énergie échangée par les neutrons : c'est la résolution expérimentale $R(\omega)$. La

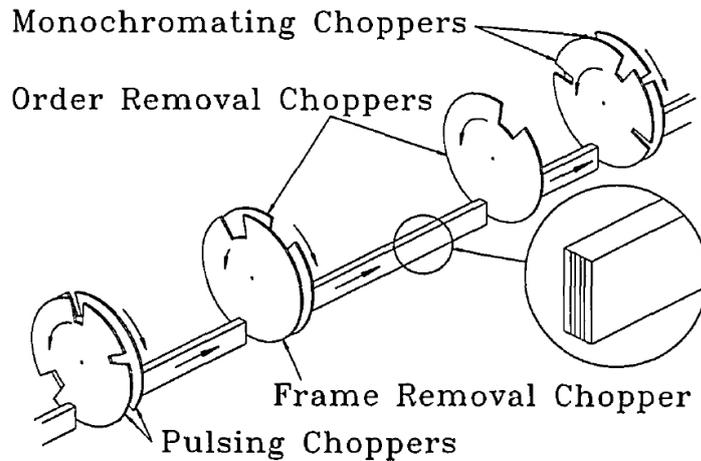


FIG. 2.11 – Schéma d'un système de "choppers" assurant la production de bouffées monocinétiques sur un spectromètre à temps de vol.

quantité mesurée est donc :

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)^{exp} = S(Q, \omega) \otimes R(\omega) \quad (2.82)$$

L'ajustement d'un modèle sur les spectres expérimentaux nécessite donc la mesure de la résolution $R(\omega)$. Pour cela, on utilise le vanadium, diffuseur purement élastique et incohérent. Le facteur de structure dynamique du vanadium est donc :

$$S_{vana}(Q, \omega) = C.\delta(\omega) \quad (2.83)$$

Et le spectre du vanadium est donc tout naturellement :

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{vana}^{exp} = C.R(\omega) \quad (2.84)$$

Le spectre du vanadium a déjà été utilisé pour corriger de l'efficacité des détecteurs. Il sert également à déterminer la résolution expérimentale.

2.3.3 L'analyse des données

Diffusion cohérente et incohérente

Dans le domaine de Guinier, l'intensité cohérente diffusée par une protéine native ou dépliée diminue respectivement selon une loi de Guinier ou de Debye. Dans le régime intermédiaire, elle diminue comme Q^{-4} ou Q^{-2} . L'intensité incohérente, elle, ne dépend pas de Q . Il existe donc une valeur de Q particulière, Q_c , pour laquelle l'intensité incohérente devient égale à l'intensité cohérente. Pour la calmoduline (en solution) l'intensité incohérente est de $0,3 \text{ cm}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{L}$. Q_c est

autour de $0,3 \text{ \AA}^{-1}$ pour la protéine native, et de $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ pour la protéine dépliée. Pour $Q = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$, l'intensité cohérente représente moins de 10% de l'intensité totale. Or, les gammes de Q des expériences de temps de vol que nous avons réalisées sont justement comprises entre $0,6 \text{ \AA}^{-1}$ et $2,5 \text{ \AA}^{-1}$. On peut donc considérer que seule la section efficace différentielle incohérente $\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}\right)_{inc}$ a été mesurée lors de ces expériences. Dans la suite, il ne sera donc plus question que de diffusion inélastique ou quasi-élastique incohérente, et donc de dynamique individuelle. De plus, pour des protéines (et pour beaucoup de polymères), la section efficace différentielle incohérente des protons représente 99% de la section efficace différentielle incohérente totale. On peut donc raisonnablement considérer que ces expériences mesurent uniquement la dynamique individuelle des protons. Or, l'hydrogène est l'élément le plus abondant dans les protéines, et il est réparti uniformément dans toute la protéine. C'est donc une bonne sonde pour la dynamique interne des protéines.

Les mouvements élémentaires

Nous considérerons ici deux types de mouvements : les mouvements vibrationnels, et les mouvements diffusifs.

Le facteur de structure dynamique incohérent d'une assemblée de N atomes vibrant de manière harmonique dans les 3 dimensions peut se décomposer en $3N-6$ modes normaux :

$$S_{inc}^{vib}(Q, \omega) = \left\langle \sum_{i=1}^N e^{-2W_i(Q)} \left\{ \delta(\omega) + \sum_{\lambda=1}^{3N-6} \frac{kT}{2m_i} \frac{Q^2 |C_i^\lambda|^2}{3\omega_\lambda^2} \left[e^{\frac{\hbar\omega}{kT}} \delta(\omega - \omega_\lambda) + e^{-\frac{\hbar\omega}{kT}} \delta(\omega + \omega_\lambda) \right] \right\} \right\rangle \quad (2.85)$$

Avec $e^{-2W_i(Q)}$ le facteur de Debye-Waller qui, dans le cas d'échantillons isotropes, peut s'exprimer en fonction du déplacement quadratique moyen $\langle u^2 \rangle$:

$$e^{-2W_i(Q)} = e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle} \quad (2.86)$$

Seuls deux points nous intéresseront par la suite. Le premier est que :

$$\lim_{Q \rightarrow 0} \left[\frac{6\omega}{\hbar Q^2} \left(e^{-\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1 \right) S_{inc}^{vib}(Q, \omega) \right] = \sum_{\lambda=1}^{3N-6} \sum_{i=1}^N \frac{|C_i^\lambda|^2}{m_i} \delta(\omega - \omega_\lambda) = G(\omega) \quad (2.87)$$

où $G(\omega)$ est la densité d'états pondérée, qui permet d'estimer la vraie densité d'états $g(\omega)$

$$g(\omega) = \sum_{\lambda=1}^{3N-6} \delta(\omega - \omega_\lambda) \quad (2.88)$$

Le deuxième point est que la partie vibrationnelle d'un facteur de structure dynamique incohérent

peut se décomposer en une partie élastique et une partie inélastique :

$$S_{inc}^{vib}(Q, \omega) = e^{-Q^2 \langle u \rangle^2} \left[\delta(\omega) + S_{inc}^{ine}(Q, \omega) \right] \quad (2.89)$$

Les facteurs de structure dynamique de tous les mouvements diffusifs (diffusion libre, diffusion confinée, diffusion de rotation, etc) sont des lorentziennes normalisées, $\mathcal{L}(\Gamma(Q), \omega)$, de la forme :

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(Q)}{\Gamma^2(Q) + \omega^2} = \mathcal{L}(\Gamma(Q), \omega) \quad (2.90)$$

Seule la relation de dispersion change. Pour une diffusion libre :

$$\Gamma(Q) = DQ^2 \quad (2.91)$$

avec D le coefficient de diffusion. Pour une diffusion par sauts :

$$\Gamma(Q) = \frac{DQ^2}{1 + DQ^2\tau_0} \quad (2.92)$$

Pour une rotation, la largeur de raie est constante et vaut :

$$\Gamma(Q) = 2D_r \quad (2.93)$$

Le facteur de structure total

Dans le cas d'une protéine en solution, le facteur de structure dynamique incohérent total peut s'écrire :

$$S_{inc}(Q, \omega) = S_{inc}^{trans}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{rot}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{vib}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{int}(Q, \omega) \quad (2.94)$$

avec *trans* pour la diffusion de translation globale de la protéine, *rot* pour la diffusion de rotation globale de la protéine, *vib* pour les vibrations des atomes, et *int* pour les mouvements diffusifs internes de la protéine. En utilisant 2.89, on obtient :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-Q^2 \langle u \rangle^2} S_{inc}^{trans}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{rot}(Q, \omega) \otimes \left[\delta(\omega) + S_{inc}^{ine}(Q, \omega) \right] \otimes S_{inc}^{int}(Q, \omega) \quad (2.95)$$

Le terme $S_{inc}^{ine}(Q, \omega)$ ne prend des valeurs non nulles que pour des grandes valeurs de transfert d'énergie. Dans la zone quasi-élastique, soit pour $|\omega| < 2$ meV dans notre cas, ce terme est négligeable. Par la suite, nous dissocierons donc l'analyse en deux parties : étude de la densité d'états dans la zone inélastique ; et ajustement de modèles de facteur de structure dynamique incohérent dans la zone quasi-élastique. Ces modèles peuvent donc s'écrire :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-Q^2 \langle u \rangle^2} S_{inc}^{trans}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{rot}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{int}(Q, \omega) \quad (2.96)$$

De plus, des simulations donnent pour le coefficient de diffusion rotationnel de la calmoduline : $D_r = 0,04 \text{ ns}^{-1}$ [67]. Ceci donne une largeur de raie $\Gamma_{rot} = 52 \text{ neV}$. Des expériences de RMN [68] donnent un temps de corrélation rotationnel de 6 ns, correspondant à un coefficient de diffusion de rotation $D_r = 0,03 \text{ ns}^{-1}$ ($D_r = \frac{1}{6\tau_r}$). Aux résolutions accessibles en temps de vol (15 μeV au maximum), $S_{inc}^{rot}(Q, \omega)$ peut donc être assimilé à un dirac $\delta(\omega)$, et donc :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-Q^2\langle u \rangle^2} S_{inc}^{trans}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{int}(Q, \omega) \quad (2.97)$$

ou encore :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-Q^2\langle u \rangle^2} \mathcal{L}(DQ^2, \omega) \otimes S_{inc}^{int}(Q, \omega) \quad (2.98)$$

Pour un ensemble d'atomes ayant une dynamique identique, caractérisée par des mouvements diffusifs d'énergie caractéristique $\Gamma_{int}(Q)$, on obtient pour S_{inc}^{int} l'expression suivante :

$$S_{inc}^{int}(Q, \omega) = A(Q)\delta(\omega) + [1 - A(Q)] \mathcal{L}(\Gamma_{int}(Q), \omega) \quad (2.99)$$

où $A(Q)$ est l'EISF (pour elastic incoherent structure factor), une fonction décrivant la géométrie des mouvements. Il peut être vu comme le "facteur de forme" du volume de confinement des atomes. Pour résumer, on obtient donc :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-Q^2\langle u \rangle^2} \left\{ A(Q)\mathcal{L}(DQ^2, \omega) + [1 - A(Q)] \mathcal{L}(DQ^2 + \Gamma_{int}(Q), \omega) \right\} \quad (2.100)$$

Volino et Dianoux [69] ont développé un modèle simple de diffusion confinée dans une sphère, couramment utilisé pour décrire la dynamique interne de protéines. Ils donnent l'expression suivante pour l'EISF :

$$A(Q) = \left(\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right)^2 \quad (2.101)$$

Ils donnent également les propriétés suivantes pour la relation de dispersion :

$$\begin{aligned} \Gamma_{V\&D}(Qa) &= 4,33 \frac{D_{sph}}{a^2} \text{ pour } Qa < \pi \\ \Gamma_{V\&D}(Qa) &= D_{sph}Q^2 \text{ pour } Qa \gg \pi \end{aligned} \quad (2.102)$$

Attention, ici D_{sph} est le coefficient de diffusion local des atomes qui diffusent dans la sphère. L'inconvénient de ce modèle est qu'il considère que tous les atomes ont une dynamique identique ; il ne considère qu'une seule catégorie d'atomes, ayant des mouvements diffusifs d'énergie $\Gamma_{int}(Q)$, dans un volume de facteur de forme $A(Q)$. Or la dynamique interne d'une protéine est assez hétérogène (ainsi que nous le verrons plus tard). Pour être réaliste, il faudrait donc considérer des ensembles d'atomes, ayant des dynamiques distinctes ; et donc introduire une distribution de

rayons de sphère, $P(a)$ et considérer :

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-\frac{Q^2 \langle u^2 \rangle}{3}} \int_0^{+\infty} P(a) \left\{ A(Q, a) \cdot \mathcal{L}(DQ^2, \omega) + [1 - A(Q, a)] \cdot \mathcal{L}(DQ^2 + \Gamma_{int}(Q, a), \omega) \right\} da \quad (2.103)$$

Malheureusement, ce modèle est bien trop complexe pour être ajusté sur des données de temps de vol sur des protéines en solution, qui ont une statistique insuffisante. Zanotti et al. [70] ont modifié le modèle de l'équation 2.100 en introduisant une fraction de protons immobiles, p . Ce modèle considère donc une fraction de protons immobiles $(1-p)$, diffusant avec une énergie caractéristique $\Gamma_{int}(Q)$ dans une sphère de rayon a . On obtient ainsi pour l'EISF :

$$A = p + (1-p) A_0(Q) = p + (1-p) \left(\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right)^2 \quad (2.104)$$

A_0 est le pseudo-EISF, soit l'EISF de la fraction $(1-p)$ de protons mobiles. Ce modèle permet de rendre compte des données expérimentales. En effet, du moins pour les protéines globulaires natives et pour les résolutions habituelles en temps de vol ($200 \mu\text{eV} < 2\Gamma_R < 100 \mu\text{eV}$), l'EISF ne tombe jamais à 0 à grand Q ($Q \sim 2 \text{ \AA}^{-1}$). L'introduction de la fraction immobile de protons permet en fait de rendre compte en partie de l'hétérogénéité de la dynamique interne des protéines. Certains protons, comme les protons du squelette peptidique par exemple, doivent être très confinés ; et ainsi diffuser très lentement, et explorer des volumes "très faibles". D'autres, comme les protons situés à l'extrémité de longues chaînes latérales par exemple, doivent être beaucoup moins confinés ; et ainsi diffuser beaucoup plus rapidement, et explorer de "grands" volumes.

Ajustement des données

Le modèle de l'équation 2.103 étant trop complexe pour être utilisé, nous avons donc choisi d'ajuster les spectres expérimentaux avec un modèle à une énergie caractéristique $\Gamma_{int}(Q)$, puis d'analyser l'EISF avec un modèle approprié. Autrement dit, nous avons ajusté les spectres expérimentaux angle par angle avec une somme de deux lorentziennes non normalisées $L(\Gamma(Q), \omega) = \frac{\mathcal{A}_L(Q)}{\pi} \cdot \frac{\Gamma(Q)}{\Gamma^2(Q) + \omega^2}$, de largeur $\Gamma(Q)$ et d'aire $\mathcal{A}_L(Q)$:

$$I_{inc}(Q, \omega) = L_{diff}(\Gamma_{diff}(Q), \omega) + L_{int}(\Gamma_{diff}(Q) + \Gamma_{int}(Q), \omega) \quad (2.105)$$

Ceci nous donne donc la largeur caractéristique des mouvements internes $\Gamma_{int}(Q)$ et la largeur caractéristique des mouvements internes $\Gamma_{diff}(Q)$, ainsi que les aires des deux lorentziennes, $\mathcal{A}_{L_{diff}}(Q)$ et $\mathcal{A}_{L_{int}}(Q)$, pour chaque angle et donc pour chaque valeur de Q . Par identification avec l'équation 2.100, on obtient l'EISF :

$$A(Q) = \frac{\mathcal{A}_{L_{diff}}(Q)}{\mathcal{A}_{L_{diff}}(Q) + \mathcal{A}_{L_{int}}(Q)} \quad (2.106)$$

Le modèle d'EISF de l'équation 2.104 donne des résultats corrects pour la calmoduline native. Il donne cependant de bien moins bons résultats pour la calmoduline dépliée, à 70°C. Nous avons

donc été amenés à considérer un modèle d'EISF avec une distribution de rayons de sphères, $P(a)$:

$$A(Q) = p + (1 - p) \int_0^\infty P(a) \left[\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right]^2 da \quad (2.107)$$

Distribution lognormale des rayons de sphère

Nous avons choisi d'utiliser une distribution lognormale pour les rayons de sphère, et ce pour deux raisons. La première d'ordre théorique, la deuxième d'ordre pratique. La distribution lognormale est couramment utilisée en matière molle pour décrire la polydispersité d'échantillons. En effet, une variable a une distribution lognormale quand elle est le produit d'un grand nombre de variables aléatoires indépendantes, décrites par des distributions identiques (voir). Pour l'agrégation de particules, ce choix est donc naturel. On peut en effet considérer que les particules s'agrègent deux à deux selon un processus stochastique, donnant naissance à une nouvelle particule, de masse double. Ces nouvelles particules ainsi créées peuvent à leur tour s'agréger à d'autres particules ; et ainsi de suite. Dans le cas où la probabilité de rencontre de deux particules ne dépend pas de leur masse, l'agrégation de particules est bien le produit d'un grand nombre d'évènements indépendants (la rencontre de deux particules). Le rayon des particules agrégées doit donc bien suivre une distribution lognormale.

Dans notre cas, c'est à dire pour modéliser les rayons des sphères explorés par les atomes des chaînes latérales des résidus d'une protéine, le choix de la distribution lognormale est un peu moins évident (et rigoureux). Carpentier et al [71] ont montré que le rayon exploré par les hydrogènes d'une chaîne aliphatique, fixée à une extrémité, variait linéairement avec la distance au point d'attache. En effet, le mouvement d'un hydrogène lié au $n^{ème}$ carbone de la chaîne (compté à partir du point d'attache) est la résultante des mouvements des (n-1) carbones précédents. Ainsi, dans le cas de chaînes latérales aliphatiques infiniment longues, le rayon exploré par les hydrogènes liés à un carbone serait la résultante d'un grand nombre d'évènements indépendants et identiquement distribués : les mouvements indépendants de tous les carbones situés plus près du point d'attache (le carbone α). Le choix d'une distribution lognormale serait pleinement justifié. Dans le cas d'une protéine, les chaînes latérales sont de longueur finie, et sont de nature différentes (chaînes aliphatiques longues comme les arginines, chaînes courtes comme les alanines, cycles aromatiques comme pour les phénylalanines, etc ...). Il ne s'agit donc pas d'un grand nombre d'évènements indépendants ; et le choix d'une distribution lognormale n'est pas rigoureusement justifié.

Dans le tableau 2.3 tous les hydrogènes non labiles des 20 acides aminés ont été regroupés en 5 catégories, appelées "rang". Un proton appartenant au squelette peptidique est compté comme proton de rang 0 ; un proton lié au premier carbone après le carbone α et compté comme proton de rang 1 ; et ainsi de suite. Le tableau donne également le nombre de protons de chaque rang pour la calmoduline. On peut remarquer que la calmoduline possède 51% de protons de rangs 0 ou 1. Comme on le verra plus tard (voir partie 4.2), il semble que le facteur principal déterminant

la dynamique des protons de la calmoduline soit la distance au squelette peptidique. Ces 51% de protons de rang 0 et 1 devraient donc correspondre au 44% de protons immobiles dans l'état natif, à 15°C, et à 180 μeV de résolution. Plus exactement, les protons immobiles doivent être des protons de rang 0 et 1 ; quelques protons de rang 1 à la surface de la protéine peuvent toutefois apparaître mobiles, expliquant la légère différence entre ces deux pourcentages (l'appartenance à la surface ou à l'intérieur de la protéine semble également influencer la dynamique, mais comme facteur secondaire). Seuls les protons de rang 2, 3 et 4, apparaissant comme mobiles dans l'état natif, sont donc décrits par la distribution de rayons de sphère. Ainsi, si le choix d'une distribution lognormale n'est pas rigoureusement justifié ; celui d'une distribution gaussienne l'est encore moins. En effet, une distribution gaussienne correspond à une somme de facteurs indépendants. Une distribution gaussienne ne serait justifiée que dans le cas d'une protéine composée uniquement de glycines, et donc uniquement de protons de rang 0. Nous avons donc fait le choix d'une distribution lognormale, d'autant plus qu'elle est utilisable dans notre cas, au contraire d'une distribution gaussienne.

En effet, une distribution lognormale, contrairement à une distribution gaussienne normalisée ($P(a) \propto e^{-\frac{(a-c)^2}{2s^2}}$), s'annule pour $a = 0$. Or, un atome diffusant dans une sphère de rayon nul est un atome immobile ; et il y a déjà un paramètre dans le modèle pour décrire les protons immobiles : la proportion de protons immobiles, p . Autrement dit, la proportion de protons immobiles, p , et la fraction de protons diffusant dans des sphères de rayon $a < 2\pi/Q_{\max}$, soit $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da$, représentent les mêmes atomes. Etant donné que $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da$ est une fonction de c et s ; les trois paramètres ajustables du modèle pour l'EISF, p , c et s ne sont pas indépendants, ce qui est la condition nécessaire (mais pas suffisante) d'un bon ajustement. Dans le cas d'une distribution gaussienne, il y a même une très forte corrélation entre les trois paramètres (p , c et s) qui fait diverger toute tentative d'ajustement. En effet, pour une distribution gaussienne, $P(a=0)$ n'est pas nul (de manière générale), et peut même être le maximum de $P(a)$ si $c = 0$; et ainsi $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da$ peut prendre des valeurs importantes. Dans le cas d'une distribution lognormale, $\lim_{a \rightarrow 0} P(a) = 0$ (en toute rigueur, $P(a=0)$ n'est pas défini), et donc $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da \approx 0$ (ou du moins est négligeable), ce qui fait disparaître la corrélation entre p , c et s , permettant ainsi de bons ajustements. Il est également possible d'empêcher la divergence des ajustements en utilisant une gaussienne centrée ($P(a) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}s} \cdot e^{-\frac{a^2}{2s^2}}$). Cependant, la divergence n'est supprimée que par la réduction du nombre de paramètres ; et le problème de fond, à savoir le fait que $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da$ n'est pas nul, n'est pas réglé. Au contraire, il est même aggravé car imposer $c = 0$ maximise $\int_0^{2\pi/Q_{\max}} P(a)da$. Dans le même esprit de réduction du nombre de paramètres, il aurait été possible d'utiliser une "distribution lognormale centrée" ($P(a) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi a}} \cdot e^{-\frac{(\ln a)^2}{2s^2}}$). Cependant, cette distribution semble s'appeler "distribution de Gibrat" (<http://140.177.205.23/GibratsDistribution.html>), ce qui n'aurait pas fait très sérieux. Et surtout, rien ne semble pouvoir justifier ce choix. Il est en effet tout à fait possible qu'à très haute température par exemple, tous les atomes diffusent dans des sphères de grand rayon, et qu'il y ait un "gap" autour de $a = 0$.

Residu	rang 0	rang 1	rang 2	rang 3	rang 4	Occurence
Ala	2	3	0	0	0	11
Arg	1	2	2	2	0	6
Asn	1	2	0	0	0	6
Asp	1	2	0	0	0	17
Cys	1	2	1	0	0	0
Glu	1	2	2	0	0	6
Gln	1	2	2	0	0	21
Gly	2	0	0	0	0	11
His	1	2	2	0	0	1
Ile	1	1	5	3	0	8
Leu	1	2	1	0	6	9
Lys	1	2	2	2	2	8
Met	1	2	2	0	3	10
Phe	1	2	5	0	0	8
Pro	7	0	0	0	0	2
Ser	1	2	0	0	0	4
Thr	1	1	3	0	0	12
Trp	1	2	5	0	0	0
Tyr	1	2	4	0	0	2
Val	1	2	6	0	0	7
Occurence	183	263	279	52	100	
Fraction	21%	30%	32%	6%	11%	

TAB. 2.3 – Tableau détaillant le nombre d’hydrogènes non labiles de chaque rang ; pour chaque type d’acide aminé, ainsi que pour la calmoduline. Un proton appartenant au squelette peptidique est compté comme proton de rang 0 ; un proton lié au premier carbone après le carbone α et compté comme proton de rang 1 ; et ainsi de suite. Cas particuliers : Tous les protons des prolines sont comptés comme rang 0 ; les cycles sont comptés comme un carbone, ainsi tous les hydrogènes appartenant à un cycle sont comptés comme appartenant au même rang, à savoir le rang du 1^{er} carbone du cycle ; Les atomes de soufre ou d’azote sont pris en compte de la même façon que les atomes de carbone pour l’établissement des rangs. Tous les protons OH, NH, NH₂, sont considérés labiles.

Pour finir, l'EISF a donc été ajusté à l'aide de la fonction suivante :

$$A(Q, \begin{Bmatrix} p \\ c \\ s \end{Bmatrix}) = p + (1 - p) \int_0^\infty \frac{1}{s \sqrt{2\pi a}} \cdot e^{-\left(\frac{\ln a/c}{\sqrt{2s}}\right)^2} \left[\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right]^2 da \quad (2.108)$$

Facteurs de Debye-Waller

Comme pour l'EISF, il est possible de calculer les facteurs de Debye-Waller ($e^{-Q^2\langle u^2 \rangle}$) à partir des aires des deux lorentziennes :

$$e^{-Q^2\langle u^2 \rangle} = \mathcal{A}_{L_{diff}}(Q) + \mathcal{A}_{L_{int}}(Q) \quad (2.109)$$

Il est cependant possible d'obtenir ces facteurs de Debye-Waller d'une manière plus simple, en dehors de tout ajustement et donc de manière totalement "modèle-indépendante". De plus, en ne passant pas par l'ajustement, il est possible d'obtenir les facteurs de Debye-Waller à partir de données non regroupées ; et donc pour des valeurs de Q bien plus nombreuses. En effet, sachant que les lorentziennes de l'équation 2.100 sont des lorentziennes normalisées, on obtient :

$$\int S_{inc}(Q, \omega) d\omega = e^{-Q^2\langle u^2 \rangle} \quad (2.110)$$

Le facteur de Debye-Waller est donc tout simplement donné par l'intégrale de $S_{inc}(Q, \omega)$. Cependant, l'expression de l'équation 2.100 est un modèle pour la partie quasi-élastique uniquement. Il convient donc de n'effectuer cette intégration que dans le domaine quasi élastique (pour $|\hbar\omega| \leq 1 \text{ meV}$ par exemple). En effet, selon la règle dite "des sommes" 2.22, l'intégrale sur tout le domaine en énergie est constante : $\int S_{inc}(\vec{Q}, \omega) d\omega = 1$ (dans le cas d'une diffusion cohérente, $\int S_{inc}(\vec{Q}, \omega) d\omega = S(\vec{Q})$). Les facteurs de Debye-Waller seront donc déterminés à une constante près de la manière suivante :

$$DW(Q) = \int_{|\hbar\omega| \leq 1 \text{ meV}} I_{inc}(Q, \omega) d\omega \propto e^{-Q^2\langle u^2 \rangle} \quad (2.111)$$

Les déplacements carrés moyens seront donc déterminés par un simple ajustement linéaire en Q^2 de ces facteurs ainsi obtenus.

Grandeurs issues de l'analyse des spectres QENS

On peut définir plusieurs paramètres pour décrire les facteurs de structure dynamique ainsi analysés :

Le déplacement quadratique moyen :

$$\langle u^2 \rangle$$

La proportion de protons immobiles :

$$p$$

Le volume moyen exploré par les protons :

$$\mathcal{V}_m = \frac{4}{3}\pi \langle a \rangle^3$$

Le volume majoritairement exploré par les protons (ou volume le plus "probable") :

$$\bar{\mathcal{V}} = \frac{4}{3}\pi \bar{a}$$

L'indice de polydispersité des volumes explorés par les protons :

$$I_p = \left(\frac{\sqrt{\langle a^2 \rangle - \langle a \rangle^2}}{\langle a \rangle} \right)$$

Et le coefficient de diffusion moyen des atomes diffusant dans les sphères :

$$D_{sph} \sim \frac{\langle a \rangle^2}{4,33} \lim_{Q \rightarrow 0} \Gamma_{int} \approx \frac{\langle a \rangle^2}{4,33} \langle \Gamma_{int} \rangle_{Q \langle a \rangle < 1}$$

Toutes ces relations ne sont évidemment pas exactes ; mais en première approximation nous nous en contenterons. En effet, ceci est un problème récurrent du temps de vol : le manque de statistique empêche d'employer des méthodes entièrement rigoureuses. De même, pour la densité d'états, on prendra :

$$G(\omega) = \lim_{Q \rightarrow 0} \left[\frac{6\omega}{\hbar Q^2} \left(e^{-\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1 \right) S_{inc}(Q, \omega) \right] \sim \sum_{i=1}^N \left[\frac{6\omega}{\hbar Q_i^2} \left(e^{-\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1 \right) S_{inc}(Q_i, \omega) \right] \quad (2.112)$$

Une autre limitation est que Q dépend à la fois de θ et de ω (voir équation 2.1). Or, on enregistre des spectres $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}(\theta, \tau)$ alors que les modèles sont exprimés en (Q, ω) . Il existe donc deux façons correctes de procéder : exprimer les modèles dans l'espace (θ, τ) et les ajuster sur les spectres bruts ; ou rééchantillonner (faire un "rebin") les spectres dans l'espace (Q, ω) . La première méthode est la meilleure, mais elle est très lourde ; et très peu de programmes permettent de le faire (à notre connaissance, seulement celui de R. Kahn). La deuxième méthode, elle, n'est pas satisfaisante. Elle limite grandement la gamme en Q des données ; et, de plus, comme toute interpolation, elle introduit un biais dans les données, ce qui peut affecter les ajustements. Or, comme le montre la figure 2.12, Q varie lentement avec ω autour du pic élastique, et donc dans la zone quasiélastique. Compte tenu de toutes les approximations précédentes, et compte tenu de la largeur des regroupements (on regroupe usuellement les détecteurs par paquets de 7 à 10 selon les appareils et la statistique des données) et donc de l'incertitude sur θ , il est donc justifié de ne pas transformer les données en (Q, ω) et de considérer les valeurs élastiques de Q , $Q_0 = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$.

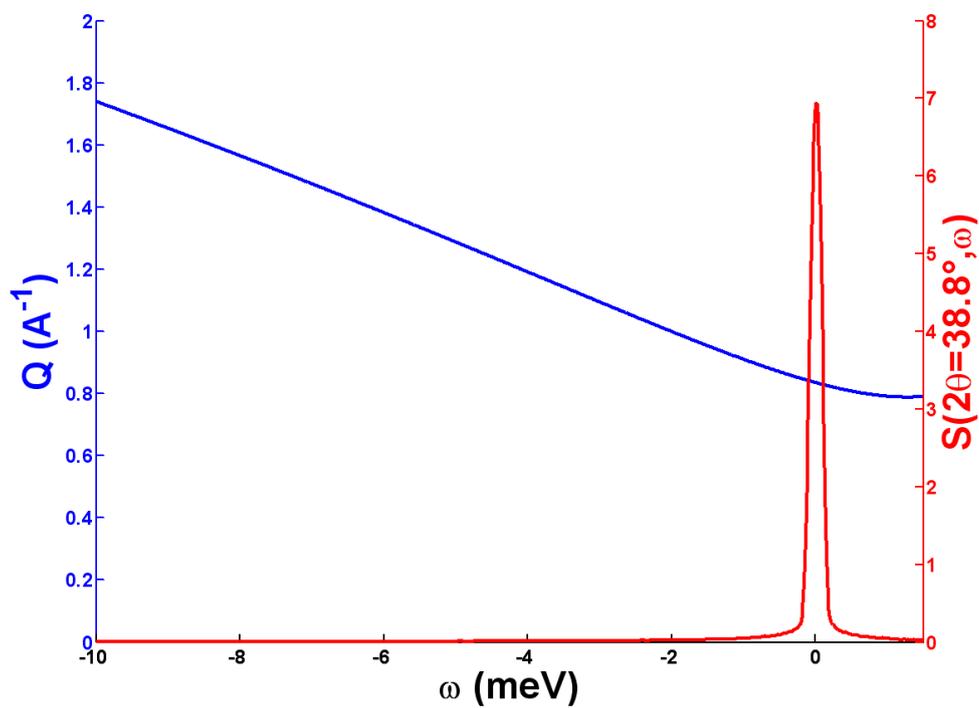


FIG. 2.12 – En rouge : spectre de D_2O à $15^\circ C$ à une résolution de $180 \mu eV$, et pour un angle de $38,8^\circ$, correspondant à un Q_0 élastique de $0,83 \text{\AA}^{-1}$. En bleu, Q en fonction du transfert d'énergie, ω . Q varie peu dans la zone quasi-élastique. Du moins cette variation ne dépasse pas l'erreur sur la mesure de Q , ΔQ . Il n'est donc généralement pas utile de transformer les données (Q, ω) .

Chapitre 3

Les spectroscopies optiques

3.1 La spectroscopie d'absorbance UV-Visible en double faisceau

Les photons possèdent une énergie $E = h\nu = hc/\lambda$. Un photon d'énergie $h\nu$ peut être absorbé par des atomes ou des molécules ayant un état fondamental S_0 et un ensemble d'états excités S_i si, et seulement si, il existe un état excité S_i tel que $E(S_i) - E(S_0) = h\nu$ (au principe d'Heisenberg près). Les atomes ou les molécules ayant absorbé un tel photon passent ainsi de l'état fondamental S_0 à un état excité S_i . La spectroscopie d'absorption permet donc de sonder les états excités des atomes et des molécules dans un domaine d'énergie donné. Nous nous intéresserons ici à la spectroscopie UV-visible. Les photons UV, ou visibles, ayant des énergies de l'ordre de grandeur de celles des électrons de valence, il ne sera question dans cette partie, ainsi que dans la suivante, que de transitions électroniques.

3.1.1 Principe de la mesure et traitement des données

Le schéma de principe de l'expérience est présenté sur la figure 3.1. Une lampe (ou deux : soit une lampe Xénon à arc, soit une lampe halogène pour l'UV et une lampe à incandescence pour le visible) et un système de miroirs permettent d'obtenir un faisceau lumineux blanc. Un monochromateur tournant et une fente réglable permettent de sélectionner une longueur d'onde particulière, avec une certaine résolution (donnée par l'ouverture de la fente). Un système de deux "choppers" en phase et de deux miroirs permet d'envoyer alternativement ce faisceau monochromatique sur un échantillon ou sur une cuve de référence, et de l'envoyer ensuite sur un détecteur (exactement à la même position). Le détecteur enregistre donc alternativement l'intensité de référence I_0 et l'intensité I transmise par l'échantillon. Le spectromètre enregistre la transmission de l'échantillon $T = \frac{I}{I_0}$. Comme les deux faisceaux frappent le détecteur à la même position, il n'y a pas de problème d'inhomogénéité du détecteur.

Pour corriger du bruit de fond et d'éventuels défauts de l'appareil qui pourraient entraîner une légère différence d'intensité entre les deux faisceaux, ainsi que de l'absorbance d'un témoin, on enregistre la transmission d'un échantillon noir, $T_{0\%}$, du témoin (le solvant par exemple), $T_{100\%}$, et de l'échantillon T_{exp} . La transmission de l'échantillon, T_s est :

$$T_s = \frac{T_{exp} - T_{0\%}}{T_{100\%} - T_{0\%}} \quad (3.1)$$

Il est pratique de travailler avec une grandeur additive, or la transmission ne l'est pas. L'absorbance, A , ou densité optique (DO) l'est :

$$A = -\log T \quad (3.2)$$

D'un point de vue pratique, la plupart des spectromètres peuvent faire des mesures fiables de DO comprises entre 0.1 et 2. Certains spectromètres peuvent lire des DO allant jusqu'à 7. Ils sont essentiellement utilisés pour des mesures d'absorbance en phase solide.

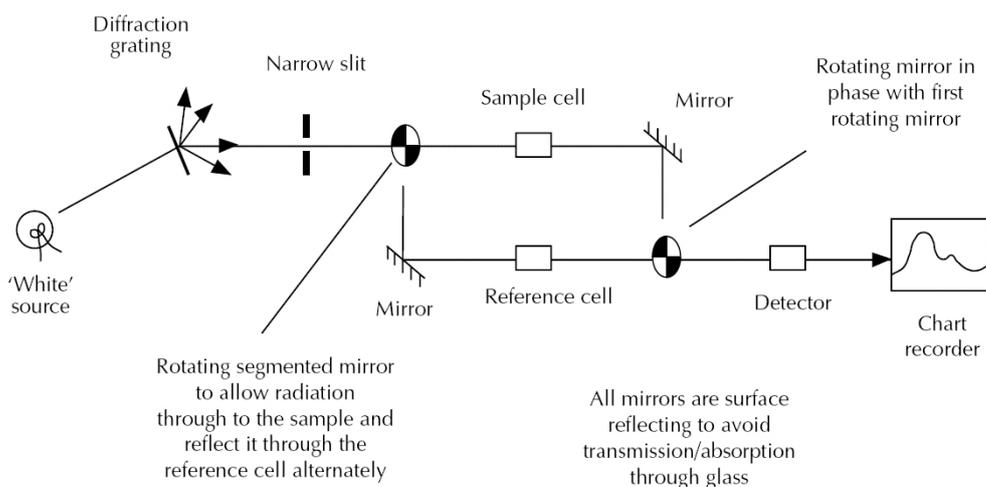


FIG. 3.1 – Schéma de principe d'un spectromètre d'absorbance UV-Visible "double-faisceau". Une lampe et un monochromateur produisent un faisceau lumineux monochromatique, dirigé alternativement, à l'aide d'un système de deux "choppers", sur un échantillon ou sur une cuve de référence, puis sur un détecteur. Le faisceau de référence permet de corriger des variations temporelles ou en longueur d'onde du faisceau lumineux incident. Le rapport I_{ech}/I_{ref} , rapport des intensités des faisceaux passant par l'échantillon et de référence, donne la transmission de l'échantillon.

3.1.2 Éléments de théorie

On définit le coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda)$, exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$. Pour une solution, on a la relation suivante, connue sous le nom de Loi de Beert-Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.c \quad (3.3)$$

avec l le chemin optique, et c la concentration. Ce coefficient d'extinction molaire est une caractéristique d'un composé donné, dans un état donné, et dans un environnement donné. L'absorption de photons UV ou visibles est liée à des changements de niveaux d'énergie des électrons de valence. Les transitions électroniques mises en jeu en absorbance UV-Visible sont indiquées sur la figure 3.2. L'absorption de photons UV, ou visibles, est souvent reliée à des transition de type $\sigma \rightarrow \pi$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$; c'est pourquoi la plupart des chromophores contiennent des doubles ou des triples liaisons. Dans le cas de liaisons conjuguées, on voit souvent apparaître plusieurs pics d'absorbance distincts. Deux exemples de spectre d'absorbance de tels chromophores sont donnés sur la figure 3.3.

L'absorbance (et en particulier l'intensité et la position des pics d'absorbance) d'un composé dépend de l'état chimique de son ou ses chromophores (nombre de coordination pour l'hème par exemple). Mais elle dépend également du champ électrique local au niveau des chromophores. Dans le cas d'un chromophore isolé, elle dépend donc de la constante diélectrique du solvant [72]. Dans le cas d'un chromophore faisant partie d'une macromolécule, elle dépend donc aussi de la conformation de cette macromolécule (à titre d'exemple : [73]). L'immense majorité des protéines

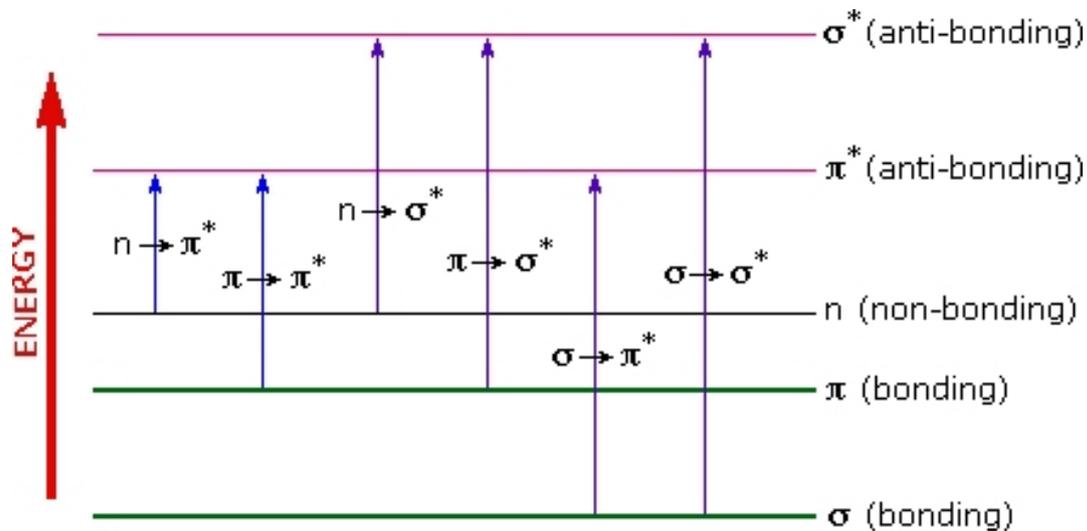


FIG. 3.2 – Transitions électroniques des électrons de valence mises en jeu en absorbance UV-Visible. L'absorption de photons UV, ou visibles, est souvent reliée à des transition de type $\sigma \rightarrow \pi$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$; c'est pourquoi la plupart des chromophores contiennent des doubles ou des triples liaisons.

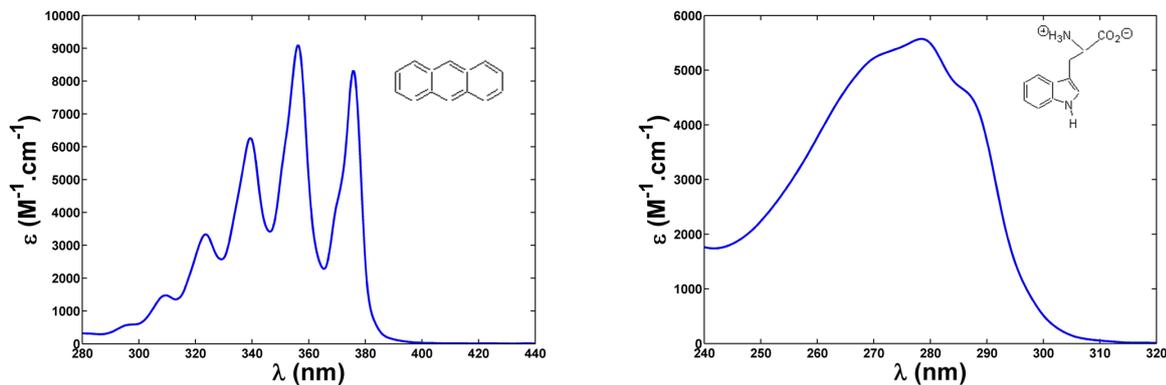


FIG. 3.3 – Spectre d'absorbance de deux chromophores, l'Anthracène et le tryptophane. Issu de <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>. La présence de liaisons conjuguées entraîne l'apparition de multiples bandes.

contient des chromophores. En effet, les acides aminés aromatiques, à savoir les Tyrosines (Tyr, Y), les Tryptophanes (Trp, W) et les Phénylalanines (Phe, F), absorbent dans l'UV proche. Les longueurs d'onde des maximums d'absorbance; ainsi que les coefficients d'extinctions molaires correspondants des ces résidus sont présentés dans le tableau 3.1. Ceci permet donc d'étudier les modifications de conformation d'un très grand nombre de protéines, en suivant les modifications d'intensité et de position des pics d'absorption des résidus aromatiques ou d'éventuels autres chromophores présents dans la protéine. Quand les différents pics d'absorption d'une protéine se recouvrent, il est possible de les isoler en dérivant 2 ou 4 fois les spectres d'absorbance. La dérivée seconde présente des minima coïncidant avec les pics d'absorbance, et permet ainsi d'en déterminer

Chromophores	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Trp	279	5580
Tyr	274	1405
Phe	257	195

ТАВ. 3.1 – Longueurs d'onde des maxima d'absorbance et coefficients d'extinctions molaires correspondants des résidus aromatiques.

la position. La dérivée quatrième, elle, présente des maxima et permet une détermination plus précise des longueurs d'onde des bandes d'absorbance. Un exemple issu de [74] est présenté dans la figure 3.4

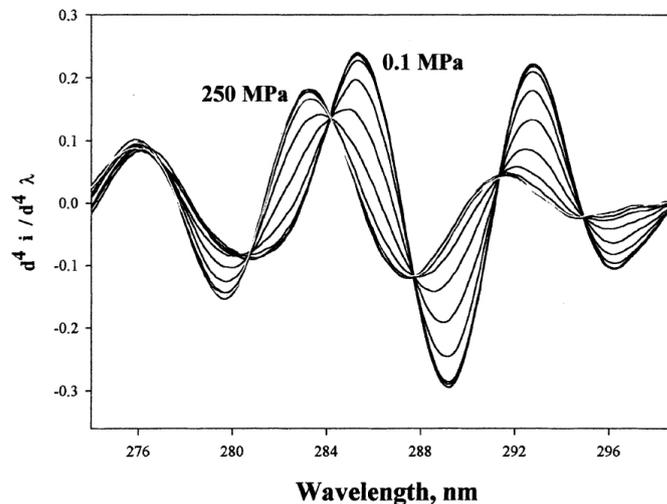


FIG. 3.4 – Dérivée quatrième des spectres d'absorbance de la protéine de 33-kDa du photosystème II de l'épinard ("33-kDa protein from the spinach photosystem II particle") à différentes pressions. Les pics correspondent aux maxima d'absorbance des tryptophanes et tyrosines de la protéine. Figure issue de [74].

3.2 La spectroscopie de fluorescence

On a vu dans la partie précédente que les photons UV ou visibles pouvaient être absorbés par des chromophores. L'absorption d'un photon $h\nu$ fait passer le chromophore de son état fondamental vers un état excité S_i tel que $E(S_i) - E(S_0) = h\nu$. Le chromophore doit ensuite restituer cette énergie $h\nu$ pour retourner à son état fondamental S_0 . Certains chromophores, appelés fluorophores, peuvent le faire en restituant une partie de cette énergie sous forme lumineuse : ce sont les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence. Ces deux phénomènes sont très similaires, mais sur des échelles de temps différentes. La fluorescence se déroule sur des temps inférieurs à la milliseconde (de quelques nanosecondes à quelques microsecondes typiquement). La phospho-

rescence se déroule sur des temps bien plus longs pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours. Ainsi, à notre échelle de temps, la fluorescence semble s'arrêter instantanément quand on cesse d'illuminer un fluorophore. La phosphorescence, elle, semble perdurer. Dans la suite, il sera uniquement question de fluorescence.

3.2.1 Principe de la mesure et traitement des données

On peut effectuer plusieurs types de mesures différentes en fluorescence. Le premier type d'expérience est la durée de vie de fluorescence. Il s'agit d'exciter le fluorophore à une longueur d'onde λ_{ex} , et de mesurer la durée de vie de la fluorescence de longueur d'onde λ_{em} . Le temps de vie de fluorescence est directement proportionnel au rendement quantique de fluorescence. Nous n'avons toutefois pas eu l'occasion de réaliser ce type d'expériences; il n'en sera donc plus fait mention par la suite.

On peut mesurer des spectres d'émission de fluorescence. Il s'agit d'exciter le fluorophore à une longueur d'onde fixe λ_{ex} et d'enregistrer un spectre de fluorescence $I=f(\lambda_{em})$ en balayant les longueurs d'onde d'émission λ_{em} . On peut également mesurer des spectres d'excitation. Il s'agit de mesurer l'intensité de fluorescence émise à une longueur d'onde fixe λ_{em} , en fonction de la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} . On peut aussi bien sûr réaliser une mesure simple en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde fixe λ_{em} par un fluorophore excité avec une longueur d'onde λ_{ex} fixe également. Ce type de mesure est commode pour mesurer dans des temps raisonnables l'évolution de la fluorescence en fonction d'un paramètre quelconque (température, pression, concentration de dénaturant, ...). Certains appareils permettent d'effectuer des spectres 2D de fluorescence, c'est à dire un spectre complet $I = f(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$. Ces spectres sont cependant généralement très longs à obtenir.

Le schéma de principe d'un spectrophotomètre de fluorescence stationnaire est présenté sur la figure 3.5. La source lumineuse est souvent une lampe Xénon à arc. On sélectionne la longueur d'onde d'excitation avec un monochromateur tournant. Le faisceau incident monochromatique ainsi produit est dirigé sur l'échantillon. L'intensité de fluorescence étant émise de manière isotrope, on mesure généralement l'intensité émise à 90° , pour ne pas être trop gêné par la lumière transmise ou diffusée par l'échantillon. La lumière émise à 90° passe donc à travers un second monochromateur tournant, qui envoie la fraction de lumière de longueur d'onde λ_{em} sur un photomultiplicateur. Ce système permet d'enregistrer l'intensité de fluorescence émise en fonction de λ_{ex} et de λ_{em} . On peut également introduire deux polariseurs avant et après l'échantillon pour enregistrer l'intensité de fluorescence émise en fonction de $\alpha = (P_{ex}^{\rightarrow}, P_{em}^{\rightarrow})$, l'angle entre les deux directions de polarisation (ceci peut permettre d'avoir accès à la dynamique de réorientation des fluorophores, mais il n'en sera plus fait mention par la suite).

Cependant, il est nécessaire de corriger les données ainsi collectées du fait que l'intensité de

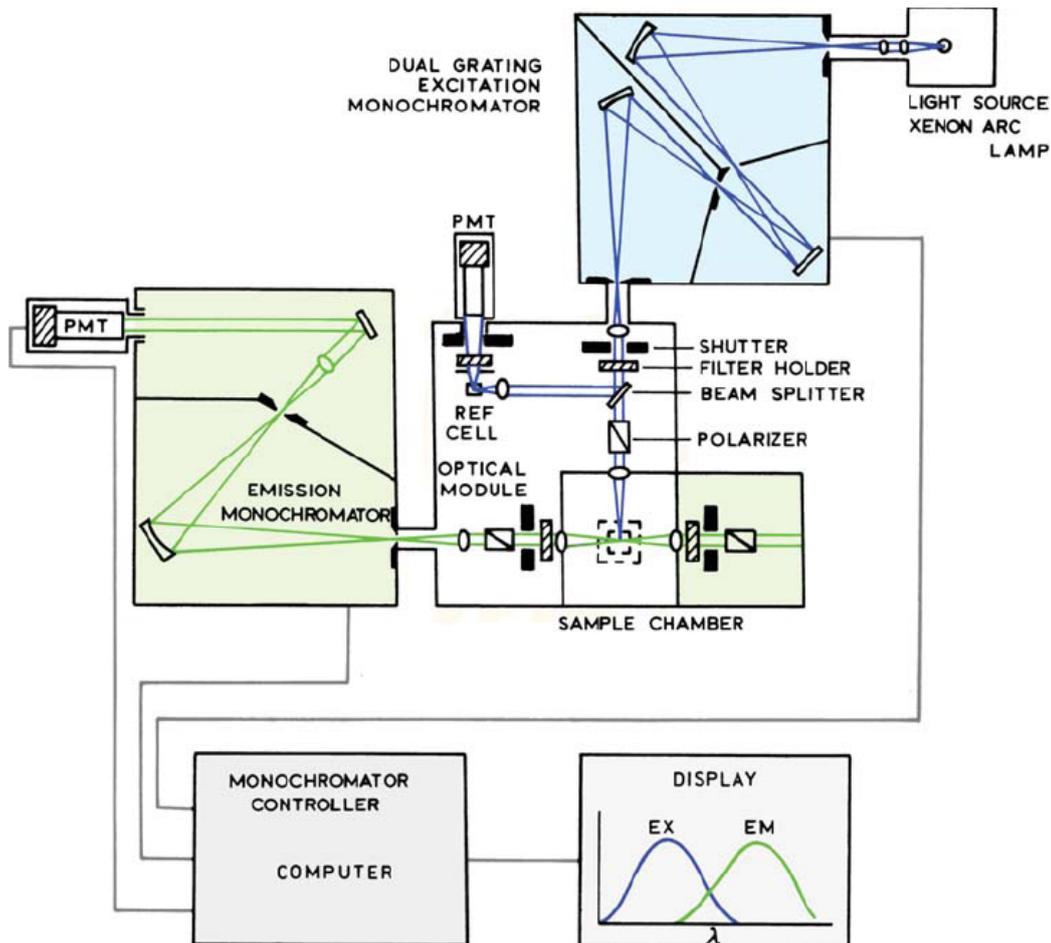


FIG. 3.5 – Schéma optique d'un spectrophotomètre classique de fluorescence stationnaire, issu de http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9780387312781-c2.pdf?SGWID=0-0-45-351714-p134266323. Une lampe Xénon à arc, et un monochromateur tournant produisent un faisceau lumineux monochromatique, de longueur d'onde réglable. Ce faisceau est séparé en deux par une lame partiellement réfléchissante ; et envoyé sur l'échantillon d'une part, sur une cellule de référence, contenant un "Quantum Counter", d'autre part. La lumière émise par la cellule de référence est collectée par un PM, situé à 90°. Le signal de ce PM sert à normaliser des variations temporelles ou en longueur d'onde de l'intensité lumineuse du faisceau d'excitation. La lumière émise par l'échantillon passe par un deuxième monochromateur réglable, puis est collectée par un PM. Il est donc possible de mesurer $IF(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$. Des polariseurs permettent de mesurer $IF(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha)$, où alpha est l'angle entre les deux polariseurs.

la lampe Xénon à arc n'est pas toujours constante dans le temps, et qu'elle n'est jamais constante en longueur d'onde. Pour cela, une lame partiellement réfléchissante dévie une petite partie du faisceau incident sur une cellule de référence, ou directement sur une photodiode. Dans le cas où la fraction du faisceau incident est dirigée sur une photodiode, le signal du photomultiplicateur (PM) "échantillon" (généralement appelé channel A) est tout simplement divisé par le signal de

la photodiode (généralement appelé channel B). Dans le cas où la fraction du signal incident est dirigé sur une cellule de référence, le signal du PM "échantillon" est divisé par le signal d'un deuxième PM (channel C), placé à 90° de la cellule de référence. La cellule de référence contient alors un "Quantum Counter", c.a.d. une solution de fluorophore dont le rendement de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde dans la gamme de longueur d'onde considérée. Un "Quantum Counter" couramment utilisé est une solution à 3g/L de Rhodamine B (RhB) dans l'éthylène glycol. Son rendement de fluorescence varie de moins de 5% dans la gamme 220 nm - 580 nm. Mais d'autres "Quantum Counter" sont également utilisés, tels des solutions à 2 g/L de fluorescéine dans une solution de NaOH 0.1M, ou des solutions à 5 g/L de $Ru(bpy)_3^{2+}$ dans du méthanol.

Pour limiter les problèmes d'auto-absorption, on se place généralement dans des conditions telles que la DO de l'échantillon soit inférieure à 0.1. Cependant, certains systèmes, tels les lecteurs de microplaques, permettent de réaliser des mesures à 180°. Dans cette configuration, l'auto-absorption est moins gênante, ce qui permet de travailler à des DO, et donc des concentrations, plus élevées.

3.2.2 Éléments de théorie

Les diagrammes de Jablonski sont utiles pour visualiser les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence. Un exemple en est donné sur la figure 3.6. Dans ce diagramme, nous ne parlerons pas de la branche faisant intervenir l'état excité triplet, qui correspond à la phosphorescence. Pour la fluorescence, tout commence avec l'absorption d'un photon, phénomène très rapide (10^{-15} s), qui amène le fluorophore de l'état fondamental $S_{0,j}$ vers l'état $S_{i,j'}$. i est un "nombre quantique électronique"; j un "nombre quantique vibrationnel". Cette étape est appelée excitation. Le fluorophore se désexcite ensuite rapidement (10^{-12} s) vers l'état $S_{i,0}$ de manière non radiative (échange de chaleur avec le solvant par exemple). Cette étape est appelée relaxation ou conversion interne. Pour finir, le fluorophore se désexcite vers son état fondamental $S_{0,j''}$ de manière radiative (en émettant un photon d'énergie $h\nu = S_{i,0} - S_{0,j''}$). Cette étape lente (10^{-9} s) est appelée fluorescence. Ceci est le cas idéal. Il existe cependant des "fuites" de fluorescence, c'est à dire des désexcitations directes et non radiatives de $S_{i,j'}$ vers $S_{0,j''}$. A cause de ces fuites, les spectres d'absorbance et d'excitation peuvent être légèrement différents (leur importance peut en effet dépendre de la longueur d'onde).

Après avoir absorbé un photon d'énergie $h\nu_{ex}$, le fluorophore se désexcite de manière non radiative, puis émet un photon de fluorescence d'énergie $h\nu_{em}$. On a donc $h\nu_{em} \leq h\nu_{ex}$: le spectre d'émission est donc décalé vers le rouge par rapport au spectre d'excitation. Les spectres d'excitation et d'émission de la Rhodamine 123 dans le méthanol sont donnés à titre d'exemple sur la figure 3.7. On définit le rendement quantique d'un fluorophore dans des conditions données comme le rapport entre le flux lumineux incident et le flux lumineux émis par le fluorophore, $\eta = \frac{\Phi_{em}}{\Phi_{ex}}$. Toutefois, les mesures absolues en fluorescence ne sont pas simples. On se contente donc en général

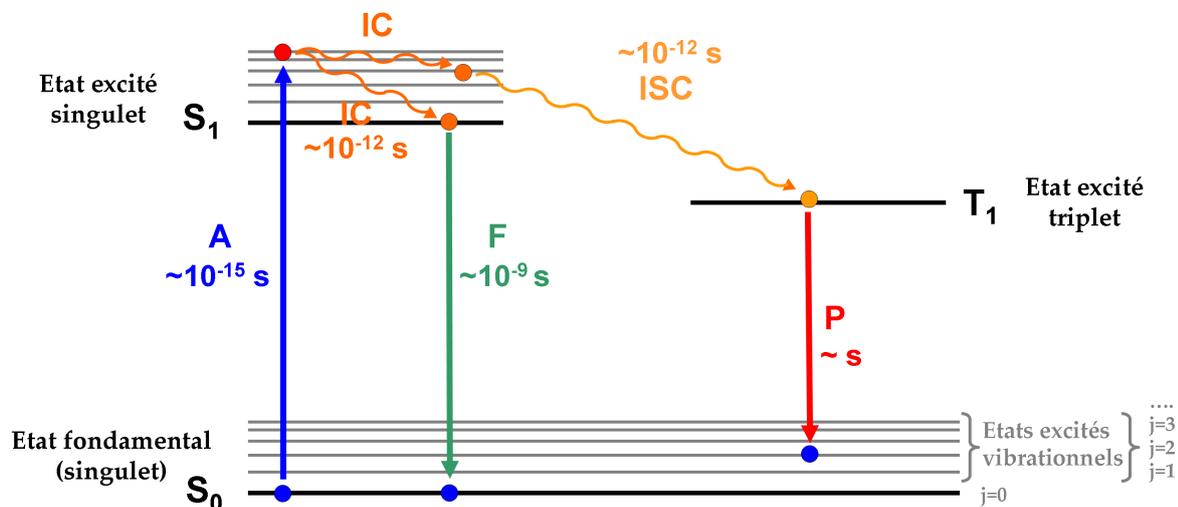


FIG. 3.6 – Exemple de diagramme de Jablonski. A $t = 0$, le fluorophore est dans l'état fondamental $S_{0,j}$ (ici sur l'état $S_{0,0}$). Il absorbe un photon d'énergie $h\nu_1$, et passe donc dans un état excité $S_{i,j'}$ (ici $S_{1,5}$). Ce processus, schématisé ici par la flèche bleue, dure environ 10^{-15} . Le fluorophore peut ensuite se désexciter par conversion interne (IC), non radiative, vers un état de même i , mais de j inférieur. Ce processus, schématisé par des flèches ondulantes oranges, dure environ 10^{-12} s. Deux phénomènes différents peuvent ici avoir lieu : la phosphorescence ou la fluorescence. Pour la phosphorescence, le fluorophore peut à nouveau se désexciter de manière non radiative vers un état triplet. Ce processus, non radiatif, appelé croisement inter-système (ISC pour "inter-system crossing"), dure environ 10^{-12} s. Il est schématisé ici par une flèche ondulante jaune. Le fluorophore peut ensuite se désexciter en émettant un photon dit de phosphorescence. Ce processus, schématisé par la flèche rouge peut être extrêmement long. Il est généralement de l'ordre de la seconde, mais peut être bien plus lent dans certains cas. Le deuxième phénomène pouvant avoir lieu est la fluorescence. Il correspond à une désexcitation directe, par émission d'un photon dit de fluorescence, de l'état $S_{i,j'}$ vers l'état $S_{0,j''}$ (nous avons ici représenté un passage de l'état $S_{1,0}$ vers l'état $S_{0,0}$ mais ce n'est qu'un cas particulier). Ce processus, schématisé ici par la flèche verte dure environ 10^{-9} s. Tous les temps donnés ici ne sont que des ordres de grandeur. Ils peuvent varier significativement d'un fluorophore à un autre.

de mesures relatives ; on s'intéresse donc à des glissements spectraux ou à des variations relatives d'intensité. Un bon moyen d'obtenir rapidement des variations relatives de rendement quantique est la durée de vie de fluorescence. L'intensité de fluorescence décroît en effet exponentiellement avec le temps ($I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$), et le temps de vie de fluorescence τ est proportionnel au rendement quantique.

Comme l'absorbance, la fluorescence est sensible au champ électrique local au niveau du fluorophore. Elle est cependant beaucoup plus sensible que l'absorbance ; et il n'est pas rare de voir

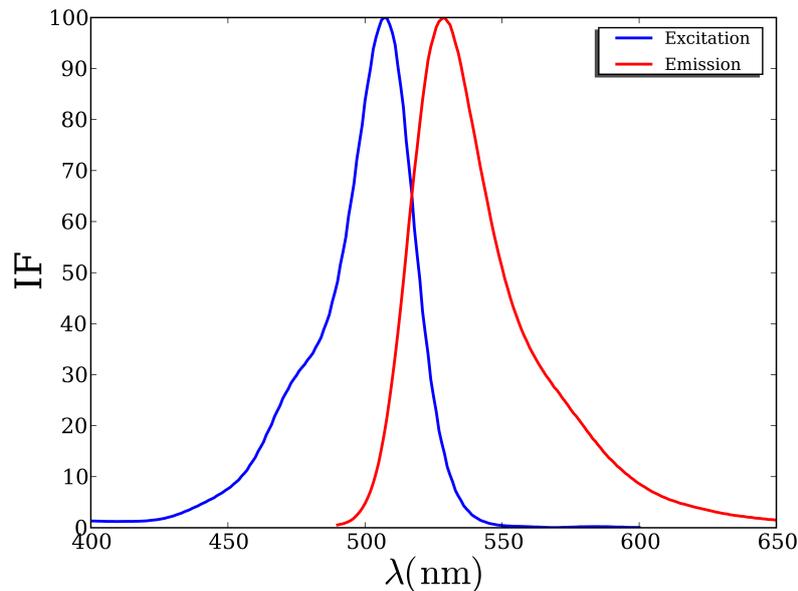


FIG. 3.7 – Spectres d'excitation et d'émission de la Rhodamine 123 dans le méthanol. Données issues de <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectra>. Le spectre d'émission est décalé vers le rouge par rapport au spectre d'excitation. Les photons émis ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés, à cause des désexcitations non radiatives précédant la fluorescence (voir figure 3.6). Ceci est une loi très générale en fluorescence.

des variations de rendement quantique d'un facteur 100. A titre d'exemple, le passage de l'eau au dioxane entraîne pour l'ANS un changement d'absorbance de 30%, et des glissements des bandes d'absorbance de 10 nm environ. Elle entraîne un glissement de plus de 30 nm et un changement d'intensité de plus d'un facteur 200 en fluorescence [75]. La fluorescence est donc très bien adaptée à l'étude des modifications conformationnelles des protéines, et permet d'effectuer des études comparables à des concentrations beaucoup plus faibles.

Cependant, la spectroscopie de fluorescence n'est pas une "spectroscopie d'absorbance améliorée". En effet, au delà du simple différentiel de sensibilité avec la spectroscopie d'absorbance, la fluorescence ne dépend pas que du champ électrique local ; elle dépend aussi très fortement de l'accessibilité au solvant (plutôt un avantage), et de la température (plutôt un inconvénient). En effet, les fluorophores peuvent se désexciter et passer directement de l'état $S_{i,j}$ vers $S_{0,j}$ de manière non radiative, notamment suite à des collisions avec d'autres molécules. C'est ce qu'on appelle le "quenching" de fluorescence. Il existe des molécules "quencheurs" qui peuvent "tuer" complètement la fluorescence d'un fluorophore, pour peu qu'elles y aient accès. Certains quencheurs sont assez universels, tels le Césium (Cs) ou le Dansyl polymyxin B (DPX) ; d'autres sont plus spécifiques d'un fluorophore. Ceci permet toute une gamme d'expériences dites de "quenching de fluorescence". Cependant toutes les molécules peuvent "quencher" plus ou moins efficacement la fluorescence, y compris les molécules d'eau. Le "quenching de fluorescence", et donc le rendement quantique de fluorescence, est donc très dépendant de l'accessibilité au solvant du fluorophore, mais également

à l'agitation thermique (de par la probabilité de collision fluorophore-"quencheur"), et donc à la température.

3.2.3 Petit comparatif spectroscopie de fluorescence - spectroscopie d'absorbance appliquée à l'étude des protéines

1. Inconvénient - La fluorescence est plus chère (et donc plus rare). Il y a au moins un facteur 4 entre le prix d'un spectromètre d'absorbance et d'un spectromètre de fluorescence.
2. Avantage - La fluorescence est beaucoup plus "robuste" optiquement. Elle est moins sensible à une légère agrégation ou turbidité de l'échantillon, ainsi qu'à des bulles ou poussières dans l'échantillon. En effet, la fluorescence est émise de manière isotrope ; une légère diffusion de la lumière avant ou après fluorescence n'est donc pas dramatique. En absorbance, au contraire, l'intensité diffusée est "comptée" comme une intensité absorbée.
3. Avantage - La fluorescence est beaucoup plus sensible. A titre d'exemple le passage de l'eau au dioxane entraîne pour l'ANS un changement d'absorbance de 30%, et des glissements des bandes d'absorbance de 10nm environ. Il entraîne un glissement de plus de 30 nm, et un changement d'intensité de plus d'un facteur 200 en fluorescence [75]. Certaines transitions invisibles en absorbance peuvent ainsi devenir très nettes en fluorescence
4. Inconvénient - A cause du quenching, la fluorescence est très sensible à la mobilité du fluorophore et à l'accessibilité au solvant (ce qui peut être un avantage); mais également à l'agitation thermique et donc à la température, ce qui peut être un gros inconvénient. L'intensité de fluorescence varie donc ainsi fortement avec la température, en l'absence de toute transition structurale, et avec des "pentes" qui dépendent de l'accessibilité au solvant, et qui peuvent donc être très différentes avant et après une transition structurale

3.3 Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire s'apparente à la spectroscopie d'absorbance. En fait, il s'agit de mesurer la différence de coefficient d'extinction molaire pour une onde polarisée circulairement droite (R pour "right") ou gauche (L pour "left") : $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$. On peut aussi définir l'ellipticité θ d'une lumière polarisée elliptiquement comme indiqué dans la figure 3.8. Si $\Delta\epsilon$ est différent de 0, l'ellipticité varie après traversée de l'échantillon. De plus, comme $\Delta\epsilon$ est généralement faible, θ suit aussi la loi de Beert-Lambert (de manière exacte, c'est $\tan\theta$ qui suit la loi de Beert-Lambert). On peut donc définir une ellipticité molaire $[\theta]$ (en degrés par molaire et par centimètre). On a la relation suivante entre $[\theta]$ et $\Delta\epsilon$:

$$[\theta] = 3,2982 \cdot 10^3 \Delta\epsilon \quad (3.4)$$

L'ellipticité est reliée à l'activité optique et à la chiralité des molécules. Concernant les protéines, on peut distinguer deux types d'expériences : le dichroïsme en UV-lointain et en UV-proche. L'UV-lointain permet de sonder la structure secondaire. L'UV-proche permet, lui, de sonder la structure

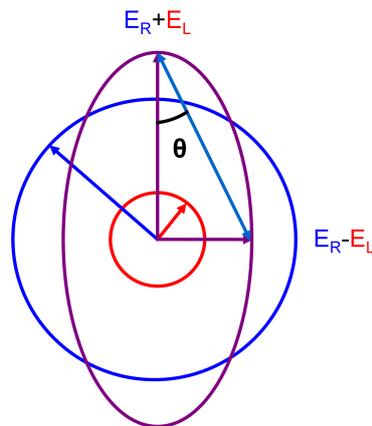


FIG. 3.8 – Décomposition d'une onde polarisée elliptiquement (en violet) en une somme d'une onde polarisée circulaire droite (en bleu, R pour "right") et d'une onde polarisée circulaire gauche (en rouge, L pour "left"); et définition de géométrie de l'ellipticité θ . Si un échantillon absorbe différemment les ondes polarisés droites et gauches, il modifie l'ellipticité des ondes polarisée elliptiquement; d'où la correspondance entre $[\theta]$ et $\Delta\epsilon$.

tertiaire des protéines. La liaison peptidique absorbe dans l'UV-lointain, entre 200 nm et 240 nm typiquement. Etant donné que les structures secondaires, comme les hélices- α ou les feuillets- β , sont chirales, elles ont un signal dichroïque caractéristique entre 200 nm et 240 nm (voir figure 3.9). Il est donc en théorie possible de déterminer la proportion de structures secondaires d'une protéine à partir de son spectre dichroïque. Ceci ne sera cependant pas fait dans cette thèse. Pour les protéines "tout α ", c'est à dire composées uniquement d'hélices α et de structures désordonnées, l'ellipticité à 222 nm est reliée aux taux d'hélices- α , et donc au taux de structures secondaires. Il est donc possible de suivre simplement l'évolution de la structure secondaire avec la température en suivant l'ellipticité à 222 nm en fonction de la température. C'est un type d'expériences très courant; et la plupart des spectrophotomètres dichroïques sont équipés de bains Pelletier programmables permettant d'effectuer des mesures d'ellipticité en fonction de la température avec des rampes de températures contrôlées (typiquement 1°C/min). Pour les protéines "tout β ", on peut suivre l'ellipticité à 217 nm.

Dans l'UV-proche, ce sont les acides aminés aromatiques qui absorbent (voir partie 3.1); ainsi que les cystéines. Il est généralement admis que le signal dichroïque dans cette région est lié à la structure tertiaire des protéines. Cela sert même de "définition" de l'état "molten globule". C'est un état qui a un signal dichroïque natif dans l'UV-lointain, mais un signal dichroïque quasi-nul dans l'UV-proche. Et donc un état qui a une structure secondaire native (ou "quasi-native"), mais une structure tertiaire mal définie [76].

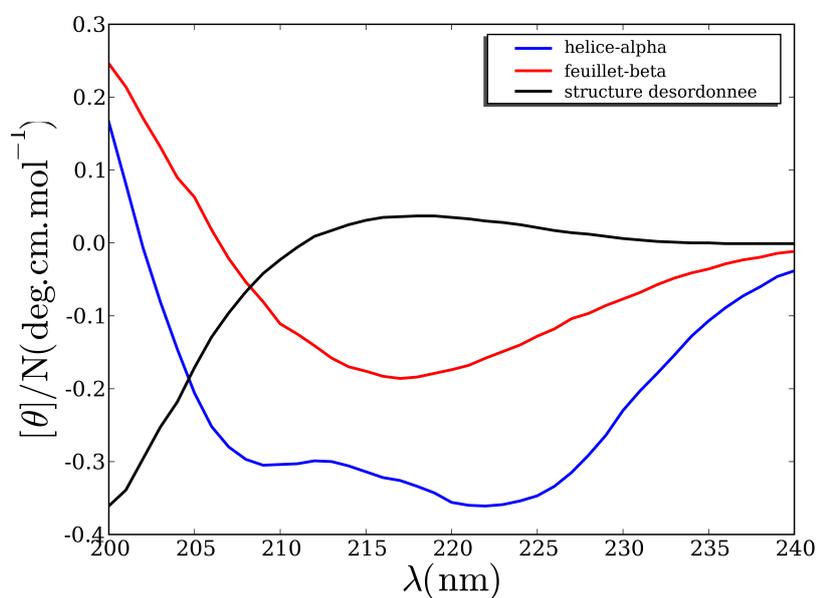


FIG. 3.9 – Spectres dichroïques des trois principaux types de structure secondaire : hélices- α , feuillets- β , et structures désordonnées. Données issues de <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>. Le spectre des hélices- α présente un pic à 222 nm ; celui des feuillets- β , à 217 nm.

Deuxième partie

La dénaturation de la calmoduline

Chapitre 4

La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline

Cette thèse vise à étudier le dépliement et le repliement de la calmoduline. La calmoduline étant obtenue sous forme native, il faut commencer par étudier le dépliement. Le moyen le plus simple techniquement pour déplier une protéine est de la chauffer. En effet, en augmentant la température, on favorise les conformations de plus grande entropie, et donc les conformations dépliées. Nous avons donc commencé par étudier la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline. Nous n'avons pas étudié la dénaturation thermique de la forme holo de la calmoduline, pour la bonne raison que celle-ci est stable jusqu'à 100°C [21], ce qui rend impossible toute étude de dénaturation thermique en solution aqueuse à pression ambiante.

4.1 Aspects structuraux et thermodynamiques

4.1.1 Conformation de l'état natif de l'apo-calmoduline

Ainsi que mentionné dans la partie 1.3.2, les spectres DNPA obtenus pour l'apo-calmoduline en solution diluée correspondent à la structure RMN en solution 1CFD [29]. Ceci atteste de la qualité des données DNPA. Toutefois, comme il n'existe pas de structure RMN des états dénaturés de l'apo-calmoduline, il est nécessaire d'obtenir, à partir des spectres DNPA, des informations sur la conformation de l'apo-calmoduline. Et ce, indépendamment de toute comparaison avec des structures RMN ou cristallographiques.

La figure 4.1 présente le spectre DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native, en représentation "loglog", et en représentation de kratky ($Q^2 I(Q) = f(Q)$) à droite. A grand Q ($Q > 0,2 \text{ \AA}^{-1}$), le spectre suit une loi de Porod (i.e. une décroissance en Q^{-4}). Cela signifie que l'apo-calmoduline native est bien compacte. A petit Q ($Q < 0,07 \text{ \AA}^{-1}$), le spectre suit très logiquement une loi de Guinier, avec un rayon de giration de 19 \AA . On peut vérifier l'auto-cohérence : sachant que $\sqrt{2}/19 \approx 0,075$ et que $4/19 \approx 0,21$, on a bien une loi de Guinier pour $Q < \sqrt{2}/R_g$, et une loi de Porod pour $Q > 4/R_g$. On peut également voir un "creux" dans le spectre autour de $0,1 \text{ \AA}^{-1}$. Ce creux, caractéristique des structures "dumbell" est dû à l'interférence des "ondes" diffusées par les deux domaines. De cette valeur de $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ on peut immédiatement déduire que les deux domaines sont distants d'environ 30 \AA ($\pi/0,1$).

4.1.2 "Thermodynamique" du dépliement

La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline a été suivie par fluorescence des tyrosines (TYR-99 et TYR-138), et par dichroïsme circulaire (voir figure 4.2). Les mesures ont été effectuées dans D_2O et dans H_2O . En effet, les mesures de diffusion de neutrons sont réalisées dans D_2O pour des raisons de contraste. Il est donc important de comparer les mesures de diffusion de neutrons avec des mesures optiques dans le même solvant. Il est, de plus, intéressant de déterminer l'influence du solvant sur le chemin de dépliement de l'apo-calmoduline.

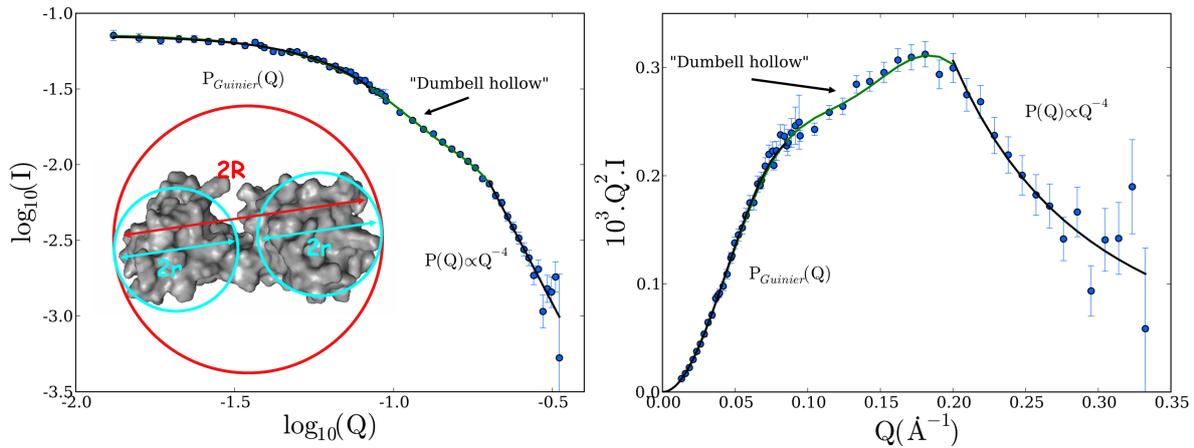


FIG. 4.1 – Spectre DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native, en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl, en représentation "loglog" à gauche, et en représentation de kratky ($Q^2 I(Q) = f(Q)$) à droite. En vert, ajustement du modèle "dumbell" (voir équation 2.51). Le spectre de l'apo-calmoduline native suit une loi de Guinier pour $QR_g < \sqrt{2}$, et une loi de Porod pour $QR_g > 4$. L'apo-calmoduline native est donc compacte. Les spectres présente un léger "creux" autour de $0,1 \text{ \AA}^{-1}$, bien reproduit par l'ajustement du modèle "dumbell". Ce creux est dû à l'interférence destructive des ondes diffusées par les deux domaines N- et C- terminaux, quasi-identiques. Les spectres DNPA obtenus correspondent bien à la structure "en haltère" donnée par la RMN en solution. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB)

Transitions à deux et trois états

Il n'est pas très évident, à cause de la forte pente initiale, que les courbes de dichroïsme circulaire correspondent à une transition à trois états. C'est cependant le cas, et un modèle à deux états ne peut pas rendre compte correctement de ces courbes. Ceci a déjà été noté [22, 77], et est en accord avec les mesures de calorimétrie [78] et de RMN [32] montrant un dépliement successif des deux domaines C-terminal puis N-terminal, décalés d'environ 15°C (légère variation selon les conditions). Pour s'en convaincre, on peut regarder la figure 4.3. Elle présente deux ajustements de la courbe obtenue en H_2O , à l'aide d'un modèle "à deux états" et d'un modèle "à trois états", ainsi que les résidus de ces ajustements. Il est clair que pour l'ajustement avec un modèle "à trois états", les résidus ne montrent aucune dépendance en température et se comportent comme un bruit blanc de valeur moyenne, signe de la validité de l'ajustement. Ceci n'est pas le cas avec le modèle "à deux états" : les résidus montrent une forte dépendance en température et n'ont rien d'un bruit blanc, signe que l'ajustement est mauvais et que le modèle "à deux états" ne correspond pas à la "réalité".

Il est encore moins évident au premier coup d'oeil que les courbes de fluorescence correspondent à des transitions "à deux états". C'est cependant bien le cas. L'allure inhabituelle des courbes est uniquement due aux fortes pentes initiales et finales, et donc à la dépendance en

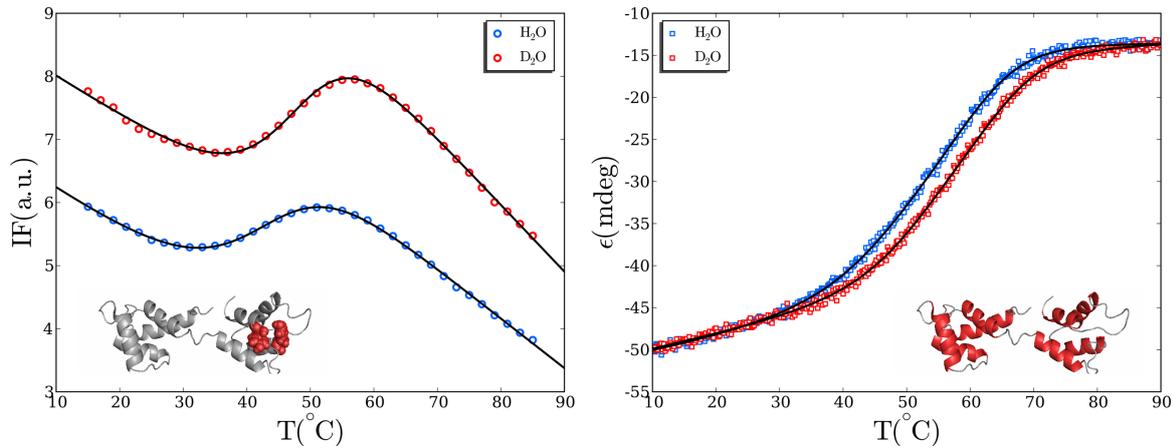


FIG. 4.2 – A gauche : Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H₂O (en rouge) et dans D₂O (en bleu) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. A droite : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$, de l'apo-calmoduline dans H₂O (en rouge) et dans D₂O (en bleu) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à trois états. Les tyrosines sont situées exclusivement dans le domaine C-terminal ; alors que le dichroïsme circulaire est, lui, sensible à la quantité de structure secondaire de toute la protéine. Il est donc logique de trouver une transition à deux états en fluorescence intrinsèque des tyrosines, et à trois états en dichroïsme circulaire. Le D₂O décale les courbes d'environ 4°C vers les hautes températures. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl ; la concentration de calmoduline est de 20 μ M (0,33 g/L).

température intrinsèque de la fluorescence (voir partie 3.2.2). Pour une transition à deux états, on obtient :

$$IF(T) = (IF_N + S_N T) f_N(T) + (IF_D + S_D T) f_D(T) \quad (4.1)$$

avec IF_N et IF_D les intensités de fluorescence des états natif et dénaturé de la protéine ; f_N et f_D les populations des deux états. S_N et S_D décrivent la dépendance en température des intensités de fluorescence des états natif et dénaturé de la protéine. L'allure inhabituelle des courbes de fluorescence est uniquement due au fait que S_N et S_D ne sont pas négligeables devant $\frac{IF_N - IF_D}{\Delta T}$, avec ΔT le domaine de température dans lequel la transition a lieu. Il est cependant possible de calculer simplement la fraction de protéine native, en ajustant les pentes S_N et S_D loin de la transition :

$$f_N(T) = \frac{IF(T) - IF_D - S_D T}{IF_N - IF_D + (S_N - S_D) T} \quad (4.2)$$

En traçant f_N en fonction de la température (ce qui revient à corriger des pentes initiales et finales), on retrouve une apparence classique pour une transition à deux états (voir exemple dans la figure 4.4).

Les deux tyrosines Tyr-99 et Tyr-138 étant situées dans le domaine C-terminal, il est logique d'obtenir une transition "à deux états" pour les courbes de fluorescence. Les guillemets sont là pour signaler qu'il ne s'agit que d'un raccourci de langage. Il faut entendre : "transition dont il peut être rendu compte à l'aide d'un modèle à deux états". Cependant, pour éviter toute lourdeur excessive,

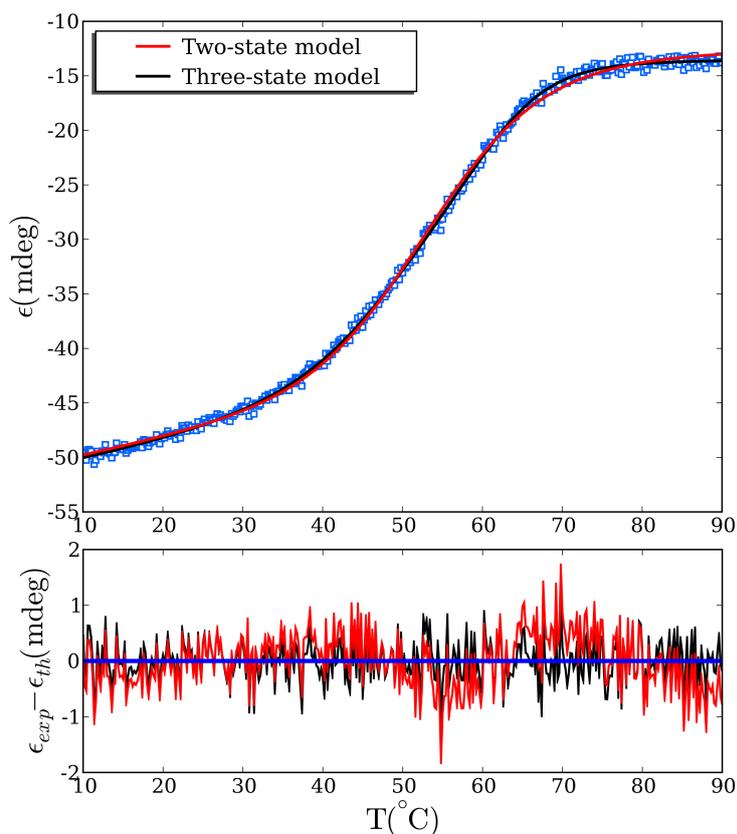


FIG. 4.3 – Haut : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$ de l'apo-calmoduline dans H_2O en fonction de la température (en bleu). En noir, ajustement avec un modèle à trois états ; en rouge ajustement avec un modèle à deux états. Bas : résidus des deux ajustements. Il apparaît clairement que le modèle à trois états décrit mieux l'évolution en température de l'ellipticité que le modèle à deux états. Les résidus de l'ajustement du modèle à trois états ne présentent aucune variation particulière en température, signe d'un "bon" ajustement ; alors que ceux de l'ajustement du modèle à deux états présentent de fortes oscillations. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μM (0,33 g/L).

cette périphrase sera rarement employée par la suite. Les paramètres "thermodynamiques" obtenus sont regroupés dans le tableau 4.1. Thermodynamique est entre guillemets, car il ne s'agit en fait pas de paramètres thermodynamiques, au sens classique du terme, ainsi que l'on pourra s'en rendre compte par la suite. Cet abus de langage étant également couramment employé et permettant d'éviter une longue périphrase, il sera utilisé ici aussi. On retrouve bien le décalage d'environ 15°C entre les températures de dénaturation des deux domaines signalé plus haut.

Effet du D_2O

Il apparaît également que les courbes obtenues dans H_2O et dans D_2O sont décalées d'environ 4°C. Il semble s'agir cependant d'un décalage assez homogène des courbes : leur forme ne semble

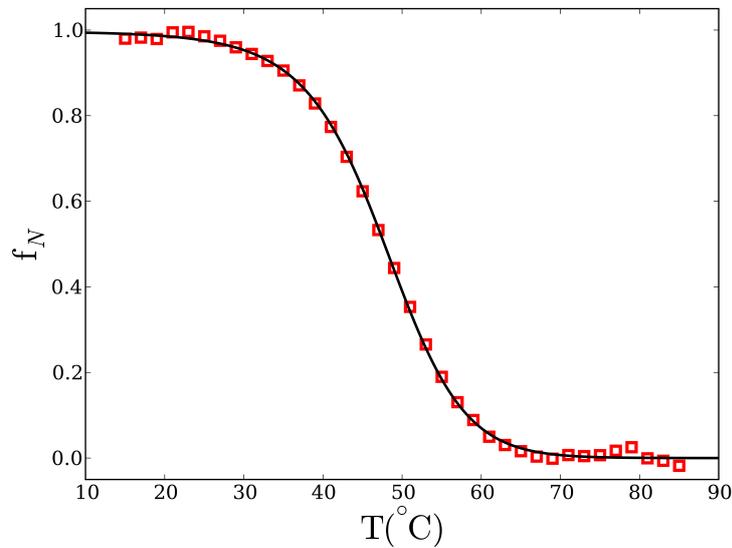


FIG. 4.4 – Fraction "expérimentale" d'apo-calmoduline native en D_2O en fonction de la température, calculée en utilisant l'équation 4.2, à partir de la courbe de la figure 4.2. Ainsi corrigée des pentes d'"effet solvant", S_N et S_D , les courbes "ressemblent" à des courbes classiques de transitions à deux états.

pas affectée. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse que les chemins de dépliement sont identiques dans H_2O et dans D_2O ; et que les stabilités des états intermédiaires sont décalées "en bloc" vers les hautes températures. Cet effet du D_2O est intéressant. En effet, la dénaturation thermique (et chimique) de l'apo-calmoduline était connue pour dépendre fortement du pH (et donc de la charge), ainsi que de la force ionique [78, 22, 32]. Ceci met en évidence le fait que la stabilité de l'apo-calmoduline dépend fortement des interactions électrostatiques. Le fait que les transitions soient décalées dans D_2O indique que l'hydratation et les liaisons hydrogènes avec le solvant jouent également un rôle dans la stabilité de l'apo-calmoduline. En effet, l'influence du D_2O sur la stabilité des protéines est connu pour être dû à des différences de propriétés d'hydratation et de force de la liaison hydrogène entre H_2O et D_2O [61, 60, 58].

Différences fluorescence/dichroïsme - Etats intermédiaires

On peut également noter que les températures de demi-transition issues des mesures de fluorescence et des mesures de dichroïsme sont différentes. Ces différences (significatives d'un point de vue statistique) de comportement entre une information globale sur l'état de la structure secondaire de l'apo-calmoduline et une information plus "locale" sur l'environnement des tyrosines est un signe de la présence d'états intermédiaires dans le dépliement du domaine C-terminal au moins (on ne peut rien affirmer quant au domaine N-terminal). Donc, bien que la dénaturation du domaine C-terminal, vue par une technique donnée, apparaisse comme une transition à deux états; elle n'est pas forcément une dénaturation à deux états. Biekofsky et al. [32] ont étudié le dépliement

de l'apo-calmoduline par RMN 1H - ^{15}N sur des protéines sélectivement marquées (^{15}N][Ile). Ils ont également trouvé une certaine dispersion des valeurs de T_m . Cependant, cette dispersion n'est pas franchement significative d'un point de vue statistique étant donné la relative importance des barres d'erreur (de 1°C à 3°C). Les paramètres obtenus par ajustement de modèles thermodynamiques simples sont donc relatifs à une technique, et à une "sonde". Ceci est la première raison des guillemets mis à "thermodynamique" depuis le début de la partie 4.1.2. Ces paramètres, bien qu'utiles pour des comparaisons (afin de mettre en évidence et de "quantifier" l'influence du pH, de la force ionique, du D_2O , ou autres sur la stabilité), ne doivent donc pas être pris comme des "vérités" thermodynamiques.

L'absorbance UV, une technique complémentaire de la fluorescence

Une des faiblesses de la fluorescence pour l'étude de la dénaturation thermique est qu'elle dépend intrinsèquement, de manière très forte, de la température, en l'absence de toute transition structurale (voir partie 3.2.2). D'où les fortes pentes avant et après la transition sur les courbes de fluorescence (figure 4.2). Pour se rassurer quant aux résultats obtenus en fluorescence, nous avons effectué des mesures en absorbance UV, connues pour dépendre beaucoup moins de la température (voir partie 3.2.3). De plus l'absorbance UV permet également de suivre l'évolution en température de l'environnement des tyrosines, situées majoritairement dans le domaine N-terminal (5 phénylalanines dans le domaine N-terminal, 3 dans le domaine C-terminal). Ces expériences étant très consommatrices en calmoduline, elles n'ont été effectuées que dans D_2O .

Comme expliqué dans la partie 3.1.2, les multiples pics d'absorption des tyrosines et des phénylalanines se recouvrent fortement. Il a donc été nécessaire de dériver quatre fois les spectres d'absorbance de l'apo-calmoduline. Le résultat de cette dérivation est présenté sur la figure 4.5. Les spectres en dérivée quatrième présentent des pics aux longueurs d'onde de maximum d'absorption de chaque bande d'absorption. La bande située entre 280 nm et 290 nm correspond aux tyrosines. Les quatre bandes situées entre 250 nm et 270 nm correspondent aux phénylalanines. La ou les bandes comprises entre 275 nm et 280 nm correspondent à une superposition de deux bandes (une des phénylalanines, et une des tyrosines). Elles ne seront donc pas prises en compte. Cette affectation des bandes, bien qu'assez classique [72], est basée sur des mesures que nous avons effectuées sur des solutions de tyrosine et de phénylalanine. La bande comprise entre 245 nm et 250 nm est affectée par des effets de bord lors de la dérivation, mais surtout par l'absorption du solvant (tampon), et ne sera donc pas non plus prise en compte.

Tyrosines et phénylalanines

Les longueurs d'onde de maximum d'absorption, λ_{max} , des bandes des tyrosines et des phénylalanines sont tracées en fonction de la température sur les figures 4.6 et 4.7. Pour les tyrosines, on retrouve bien une transition à deux états, comme pour la fluorescence. La validité de la description à l'aide d'un modèle à deux états est attestée par la présence d'un point isobestique autour de 284

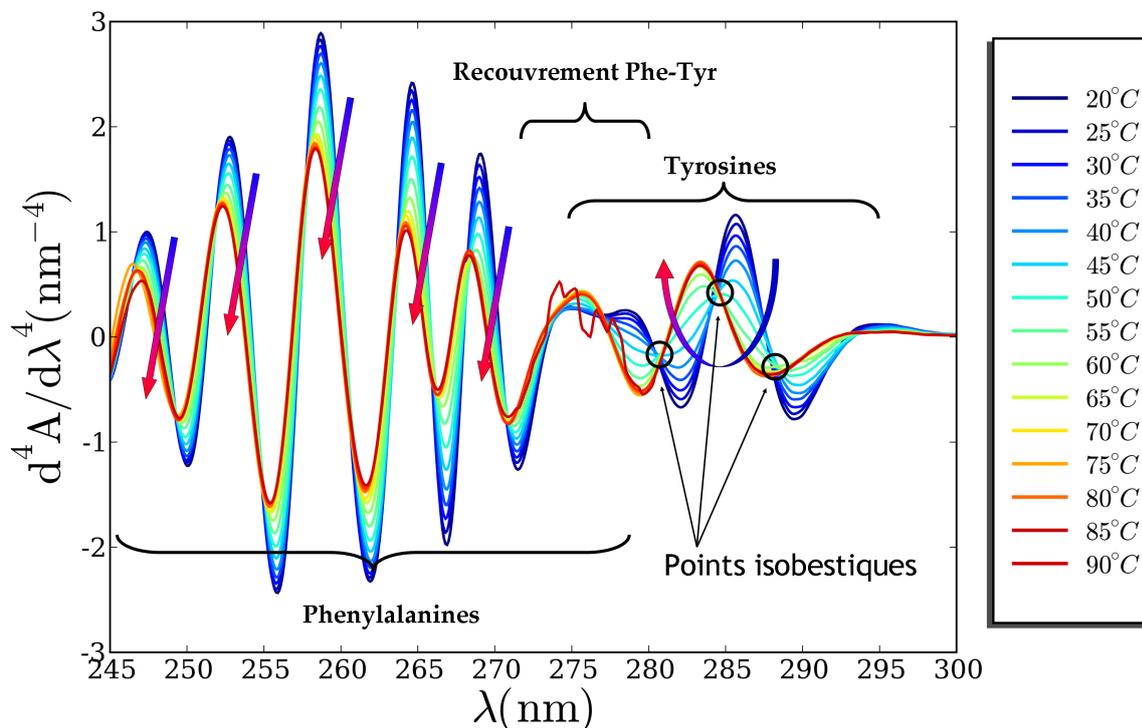


FIG. 4.5 – Dérivée quatrième des spectres d'absorbance de l'apo-calmoduline dans D_2O à plusieurs températures, comprises entre $20^\circ C$ and $90^\circ C$. Les dérivées quatrième exhibent une série de pics, correspondant aux longueurs d'ondes d'absorption maximum des résidus aromatiques. Entre 245 nm et 270 nm, les bandes peuvent être attribuées aux phénylalanines seules ; entre 280 nm et 290 nm, aux tyrosines exclusivement. Entre 270 nm et 280 nm, il s'agit d'une superposition de bandes des deux types de résidus aromatiques. On peut constater sur toutes les bandes, un "blue-shift" en température, généralement signe d'exposition accrue au solvant. La transition est plus marquée pour la bande des tyrosines. La présence de points isobestiques indique qu'il s'agit d'une transition à deux états. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 340 μM (5,7 g/L)

nm, visible sur la figure 4.5. La température de demi-transition obtenue est légèrement plus élevée que celle issue de la fluorescence, mais pas de manière franchement significative. L'enthalpie de dénaturation, elle, est supérieure de plus d'un facteur 2 à celle déterminée en fluorescence. Ceci signe encore une fois la présence d'états intermédiaires.

Pour les phénylalanines, il est évident qu'un modèle à deux états n'est aucunement justifié, ces dernières étant présentes dans les deux domaines C- et N- terminaux. Cependant, étant donné que le signal des phénylalanines est bien plus faible que celui des tyrosines ($\epsilon_{max}^{Phe} = 190 M^{-1} cm^{-1}$, $\epsilon_{max}^{Tyr} = 1400 M^{-1} cm^{-1}$), et qu'il varie peu avec la température (il est bien connu que le (ou les) λ_{max} des phénylalanines varie beaucoup moins avec la constante diélectrique que le λ_{max} des tyrosines [79]), il est impossible d'ajuster un modèle à trois états. Nous avons donc tout de même ajusté un modèle à deux états, sur la base du fait qu'il y a plus de phénylalanines dans le domaine

N-terminal que dans le domaine C-terminal (3 contre 5). Les paramètres obtenus sont inclus dans le tableau 4.1, mais ils ne doivent être pris que comme de simples indicateurs. On peut cependant noter que la température de demi-transition obtenue pour les phénylalanines (la moyenne sur les 4 bandes considérées) est supérieure à celle obtenue pour les tyrosines ; et inférieure à celle obtenue en dichroïsme pour le domaine N-terminal. Ceci est encore une fois cohérent avec un dépliement des deux domaines décalé en température. En ajustant l'évolution de λ_{max} des phénylalanines avec un modèle à deux états, on ajuste en quelque sorte deux transitions (dépliement du domaine C- puis N-terminal) avec une seule. On doit donc obtenir une température de demi-transition intermédiaire entre celle du domaine C-terminal et celle du domaine N-terminal.

"Blue-shift" et exposition au solvant

La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline s'accompagne d'une diminution de λ_{max} pour les tyrosines et les phénylalanines, appelée "blue-shift". Ce phénomène est généralement associé à une exposition accrue au solvant. La figure 4.6 permet d'aller un peu plus loin pour le cas des tyrosines. La longueur d'onde d'absorption des tyrosines de l'apo-calmoduline native est très différente de celle de tyrosines isolées en solution. Cependant, après la transition, cette longueur d'onde se rapproche de celle de tyrosines en solution. Sachant que la longueur d'onde d'absorption est inversement proportionnelle à la constante diélectrique locale [79], ceci implique que les tyrosines passent donc d'un environnement relativement apolaire à un environnement avec une polarité proche de celle du D₂O. Il n'est donc pas déraisonnable de penser que ceci s'explique par une grande accessibilité des tyrosines au solvant dans les états dénaturés. Ceci, ajouté au fait que ces états dénaturés ont beaucoup moins de structures secondaires que l'état natif, amène à penser que ces états dénaturés peuvent être des états dépliés.

	$T_m^C(^{\circ}C)$	$\Delta H_m^C(kcal.mol^{-1})$	$T_m^N(^{\circ}C)$	$\Delta H_m^N(kcal.mol^{-1})$
CD dans H ₂ O	46,1 ± 0,5	31,3 ± 2,0	60,5 ± 0,5	45,4 ± 2,0
fluo dans H ₂ O	41,7 ± 0,5	31,4 ± 2,0	—	—
CD dans D ₂ O	50,9 ± 0,5	40,0 ± 2,0	64,1 ± 0,5	47,1 ± 2,0
fluo dans D ₂ O	47,1 ± 0,5	35,2 ± 2,0	—	—
UV dans D ₂ O	49,4 ± 1,0	82,3 ± 4,0	59,3 ± 2,0	42,0 ± 5,0

ТАВ. 4.1 – Paramètres "thermodynamiques" extraits des courbes de dénaturation thermique de l'apo-calmoduline. CD signifie dichroïsme circulaire et fluo signifie fluorescence intrinsèque . Les exposants C et N signifient domaine C- et N-terminal respectivement. Comme attendu, les températures de demi-dénaturation des deux domaines sont décalées d'environ 15°C. On peut noter un décalage d'environ 4°C en D₂O, indiquant que l'hydratation et les liaisons hydrogènes avec le solvant jouent également un rôle dans la stabilité de l'apo-calmoduline. On peut également noter que les températures de demi-dénaturation issues des expériences de fluorescence et de dichroïsme circulaire sont nettement différentes (de plus de 4°C). Ceci signe la présence d'états intermédiaires dans le dépliement de l'apo-calmoduline.

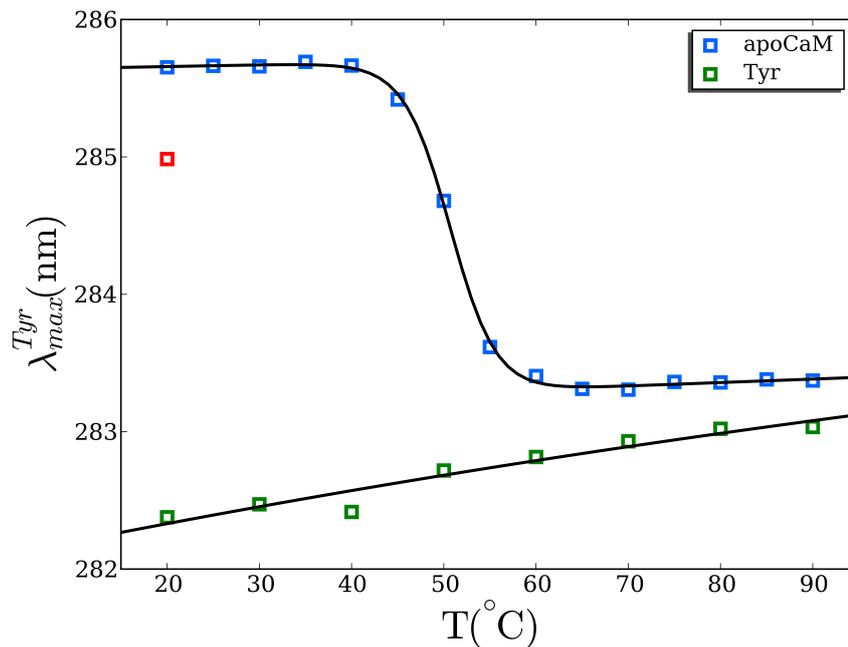


FIG. 4.6 – Longueur d'onde de maximum d'absorption, λ_{max} , de la bande des tyrosines, déterminée à partir de la courbe 4.5, en fonction de la température. En bleu, pour les tyrosines de la calmoduline sous forme apo ; en vert, pour des tyrosines isolées en solution. Le point rouge correspond au retour à température ambiante de l'apo-calmoduline. En noir, ajustement d'un modèle à deux états. La transition, clairement visible sur cette courbe, et correspondant au dépliement du domaine C-terminal, se traduit donc par un "blue-shift". Après la transition, la longueur d'onde d'absorbance des tyrosines de l'apo-calmoduline devient très proche de celle de tyrosines isolées en solution. La polarité de l'environnement local des tyrosines de l'apo-calmoduline devient donc proche de celle du solvant. Il est donc vraisemblable que le domaine C-terminal de l'apo-calmoduline soit déplié, et que les tyrosines soient ainsi très exposées au solvant.

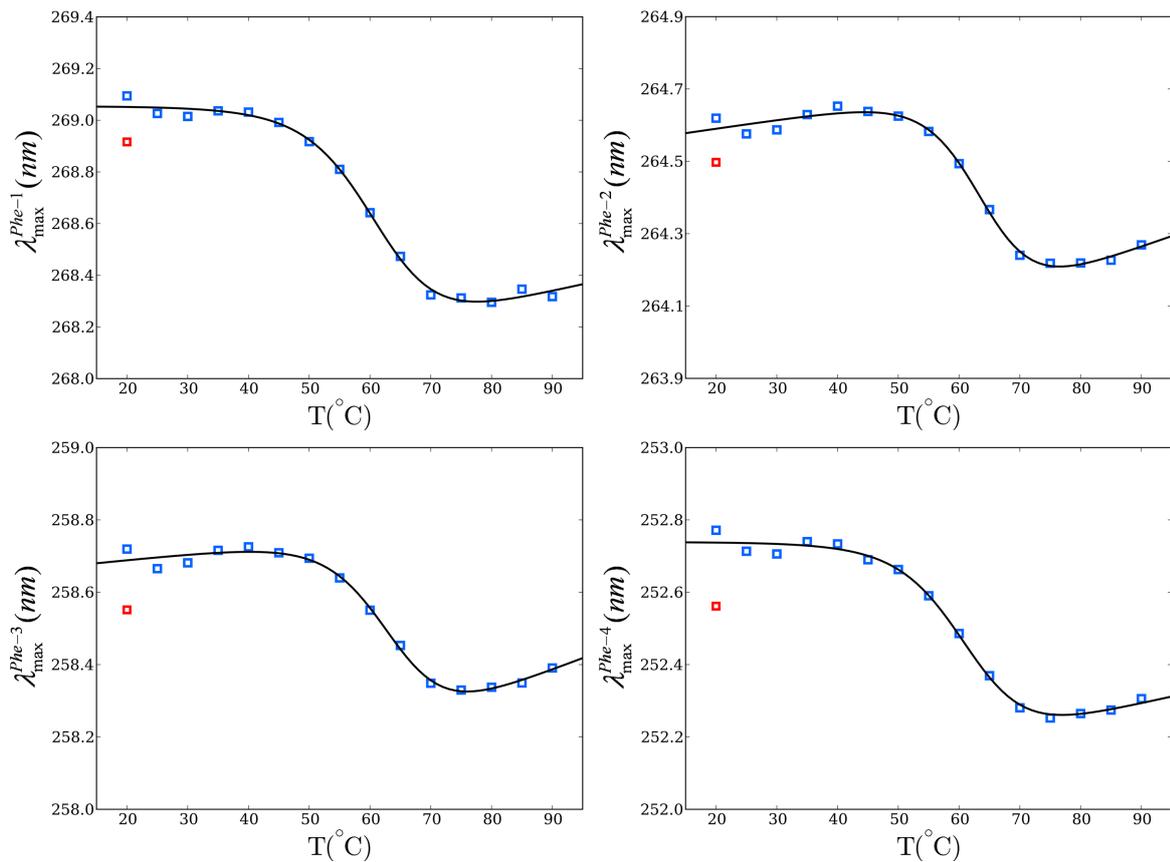


FIG. 4.7 – Longueurs d’onde de maximum d’absorption, λ_{\max} , des bandes des phénylalanines de la calmoduline sous forme apo, déterminées à partir de la courbe 4.5, en fonction de la température. Le point rouge correspond au retour à température ambiante. Les courbes sont ajustées à l’aide d’un modèle de deux états (en noir), bien que les phénylalanines soient présentes dans les deux domaines. Les températures de demi-transition ainsi obtenues, sont intermédiaires entre celle du domaine C-terminal et celle du domaine N-terminal.

Structure secondaire et structure tertiaire - Etat intermédiaire "molten globule" ?

Nous avons jusque ici comparé l'évolution en température de la structure secondaire et de l'environnement local de "sondes" aromatiques. Il est également intéressant de comparer l'évolution en température de la structure secondaire et de la structure tertiaire, deux informations globales sur l'état de la protéine. Pour caractériser l'état de la structure tertiaire, un bon indicateur est le rayon de giration, issu des mesures DNPA.

Les spectres DNPA à plusieurs températures d'une solution diluée d'apo-calmoduline à 5 g/L sont tracés en représentation de Guinier figure 4.8. Les pentes à petit Q ($Q < R_g^{-1}$) donnent accès au rayon de giration (voir partie 2.2.3). La solution étant diluée, dans une première approximation on négligera l'effet des interactions, et on considérera que les valeurs du rayon de giration ainsi obtenues sont assimilables aux valeurs "à concentration nulle" (voir partie 2.2.3). Ces valeurs du rayon de giration sont tracées en fonction de la température dans la partie droite de la figure 4.9. Il est possible de rendre compte de l'évolution du signal dichroïque et du rayon de giration, et donc de la structure tertiaire et de la structure secondaire, avec le même modèle à trois états et avec les mêmes paramètres "thermodynamiques". Les évolutions en température de la structure secondaire et de la structure tertiaire semblent donc synchrones. Ceci semble indiquer qu'il n'y a pas d'état intermédiaire de type "molten-globule" notablement stable (suffisamment stable pour affecter les courbes de transition) dans la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline. En effet, un état intermédiaire de type "molten-globule" est un état ayant une structure secondaire native ou quasi-native ; mais une structure tertiaire mal définie, plus "lâche". Ces états ont donc un signal dichroïque natif ou quasi-natif ; mais une valeur de rayon de giration significativement plus élevée que celle de l'état natif.

Pour finir, il apparaît que les valeurs de rayon de giration après la transition sont notablement plus élevées (de près de 50%, ce qui correspond grossièrement à une augmentation de volume d'un facteur 3 environ) que celles obtenues à basse température. Ceci plaide à nouveau en faveur d'un dépliement à haute température.

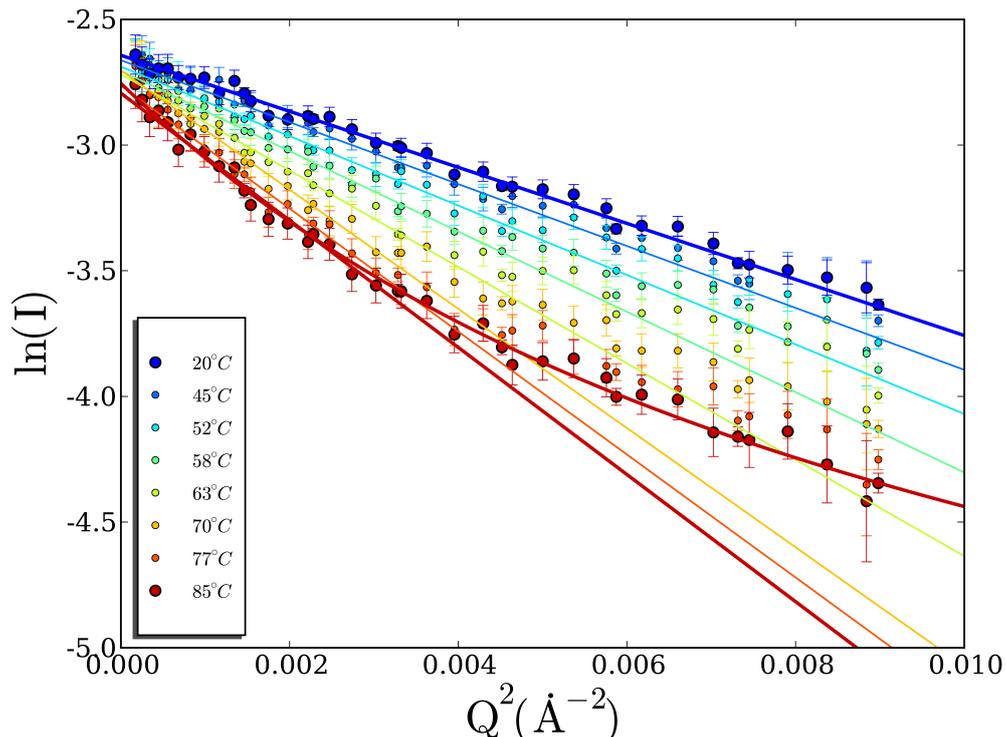


FIG. 4.8 – Représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$) des spectres DNPA d'une solution d'apo-calmoduline à 5 g/L à plusieurs températures, comprises entre 20°C (en bleu) et 85°C (en rouge). Les droites en traits pleins sont des ajustements de Guinier, dont les pentes conduisent à des valeurs de rayon de giration. La courbe rouge incurvée est un ajustement du spectre DNPA à 85°C avec une loi de Debye. Mesures effectuées sur PAXE, LLB. Les rayons de giration sont tracés en fonction de la température sur la figure 4.9.B. Au fur et à mesure que le rayon de giration augmente, les spectres, "à petit Q ", dévient de la loi de Guinier, et tendent vers la loi de Debye. L'apo-calmoduline perd donc progressivement sa structure moyenne à grande échelle et adopte une conformation "de type chaîne polymère". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB)

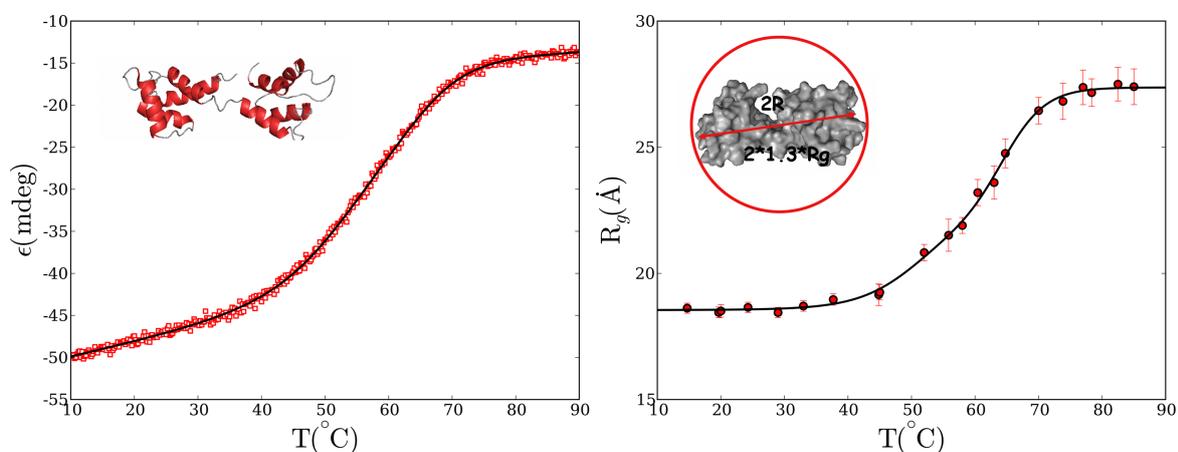


FIG. 4.9 – A gauche : ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$ de d'une solution de 20 μM d'apo-calmoduline dans D_2O en fonction de la température. A droite : rayon de giration, R_g , de l'apo-calmoduline dans D_2O à 5 g/L en fonction de la température. Mesures effectuées sur PAXE, LLB. Les deux courbes sont ajustées avec le même modèle à trois états, avec les mêmes paramètres "thermodynamiques". L'évolution en température de la structure secondaire (ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$) et de la structure tertiaire (rayon de giration, R_g) est donc synchrone. Ceci signe l'absence d'états intermédiaires de type "molten globule" suffisamment stable pour affecter les courbes de transition. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O .

4.1.3 Conformation des états dénaturés

Les aspects "thermodynamiques" de la dénaturation thermique ayant été abordés, reste la question de la conformation des états dénaturés de l'apo-calmoduline. Cette question est essentielle. Tout d'abord pour savoir si l'on peut parler de dépliement, ou seulement de dénaturation (dénaturée signifie seulement que le protéine n'est plus native, mais elle peut encore avoir une structure native; dépliée signifie que la protéine n'a plus de structure moyenne). Mais surtout parce que la conformation des états dépliés (et leur "dégénérescence") joue un rôle central dans les modèles théoriques du repliement des protéines les plus récents (voir partie 1.1.4).

Comparaison des conformations natives et dénaturées

Les spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline dans l'état natif (à 20°C) et à haute température (à 85°C) sont tracés en représentation "log-log" et en représentation de Kratky, légèrement modifiée pour des raisons que nous verrons un peu plus loin. Ces deux représentations sont usuelles en DNPA (et plus généralement en diffusion aux petits angles). Elles permettent en effet de bien mettre en lumière les différents comportements à grand Q (grand devant R_g). Comme indiqué dans la partie 2.2.3, dans ce régime de vecteurs d'onde, dit "*régime intermédiaire*", les spectres suivent des lois de puissance. La représentation "log-log" est donc naturelle. La représentation de Kratky ($Q^2 \cdot I(Q) = f(Q)$) est utilisée plus spécifiquement en physique des polymères. En effet, dans cette représentation, le spectre d'une chaîne polymère donne un plateau à grand Q . Les objets moins "compacts" (chaîne à volume exclu, à longueur de persistance, polyélectrolyte ...) donnent des courbes tendant vers l'infini. Et les objets plus "compacts" (billes, protéines natives, ...) donnent des courbes tendant vers 0.

Le premier point à noter est qu'à petit Q , le spectre DNPA de l'apo-calmoduline ne suit plus une loi de Guinier, mais une loi de Debye. Ceci est d'ailleurs plus évident sur la figure 4.8, où l'on peut s'apercevoir qu'à 85°C le spectre DNPA de l'apo-calmoduline ne suit plus une loi de Guinier que de manière asymptotique à très petit Q ; mais qu'elle suit parfaitement une loi de Debye dans tout le domaine de Guinier au sens large (ces problèmes de domaines de validité sont discutés dans la partie 2.2.3). La loi de Debye étant caractéristique de chaînes polymères, il est possible d'affirmer qu'à haute température l'apo-calmoduline perd sa structure et adopte une conformation de type polymère. Il est donc possible désormais de parler de dépliement et d'états dépliés. A grand Q cependant, on obtient un exposant 2,3, et non l'exposant 2 des chaînes gaussiennes, ou l'exposant 1,7 des chaînes à volume exclu (d'où la représentation de Kratky modifiée). Cet exposant 2,3 correspond à un objet plus "compact" qu'une chaîne polymère. En résumé, à haute température l'apo-calmoduline "ressemble" à une chaîne polymère à grande échelle, mais "semble" plus "compacte" qu'une chaîne polymère à l'échelle locale. Ceci est en accord avec la présence de structures secondaires résiduelles à haute température, établie par dichroïsme circulaire [80]. Ces structures secondaires résiduelles rendraient l'apo-calmoduline à haute température plus compacte qu'une chaîne polymère gaussienne.

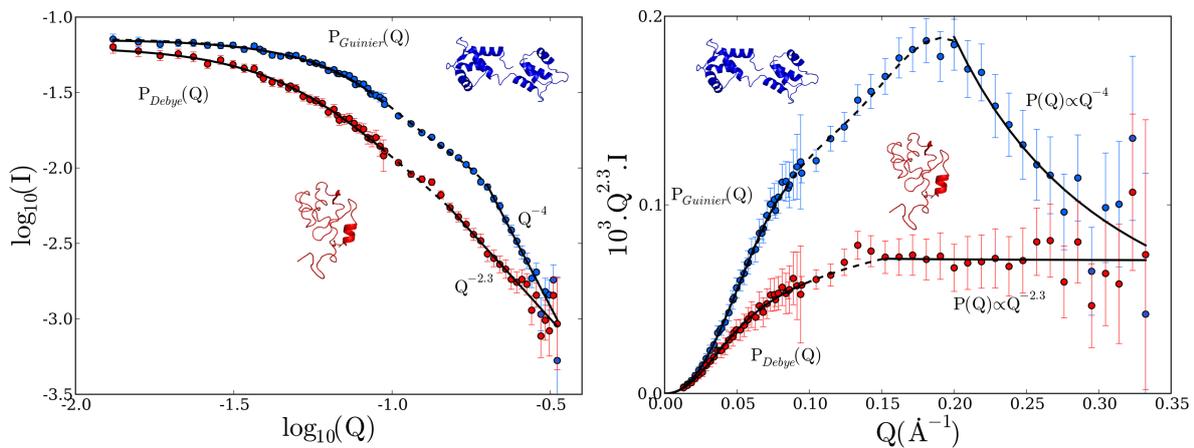


FIG. 4.10 – Représentation "log-log" (à gauche) et représentation de Kratky modifiée ($Q^{2,3} \cdot I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline à 20°C (en bleu) et à 85°C (en rouge). Le spectre de l'apo-calmoduline native suit une loi de Guinier jusqu'à $QR_g = \sqrt{2}$, et une loi de Porod pour $QR_g > 4$. L'apo-calmoduline native est donc compacte. A haute température ($T > 70^\circ\text{C}$), le spectre de l'apo-calmoduline suit une loi de Debye pour $QR_g < 3$ et une loi de puissance d'exposant 2,3 pour $QR_g > 4$ ($\frac{4}{R_g} \sim 0.13$). L'apo-calmoduline a donc perdu toute structure moyenne et adopté une conformation "de type polymère". L'exposant 2,3 est légèrement supérieur à l'exposant 2 des chaînes polymères gaussiennes. Ceci est sûrement dû à la présence de structures secondaires résiduelles à haute température. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

La transition $Q^{-4} \rightarrow Q^{-2,3}$, ou la perte de structure moyenne

Revenons un instant sur le sujet de la partie précédente. Les spectres DNPA d'une solution relativement concentrée (18 g/L) d'apo-calmoduline à plusieurs températures, comprises entre 20°C et 77°C, sont tracés en représentation de Kratky modifiée sur la figure 4.11. On retrouve une loi de Porod (Q^{-4}) dans l'état natif, et un exposant 2,3 à haute température (il est toujours rassurant de vérifier ce genre de chose). Il semble surtout que la perte de structure moyenne, ou la transition *compact* \rightarrow *déplié*, ou encore la transition $Q^{-4} \rightarrow Q^{-2,3}$, soit assez progressive et concomitante de l'augmentation du rayon de giration (cette augmentation se fait entre 40°C et 70°C) et de la perte de structure secondaire.

Apo-calmoduline dépliée - Loi de Debye ou loi de Guinier ?

Après cette légère digression, revenons à la conformation des états dépliés de l'apo-calmoduline. La figure 4.8 n'est peut être pas très convaincante en ce qui concerne la comparaison loi de Guinier / loi de Debye. Dans la figure 4.12, les spectres DNPA à haute température (77°C) de solutions d'apo-calmoduline à plusieurs concentrations sont tracés en représentation $1/I(Q) = f(Q^{2,206})$. Dans cette représentation, la loi de Debye est quasi-linéaire (avec une déviation inférieure à 0.4%)

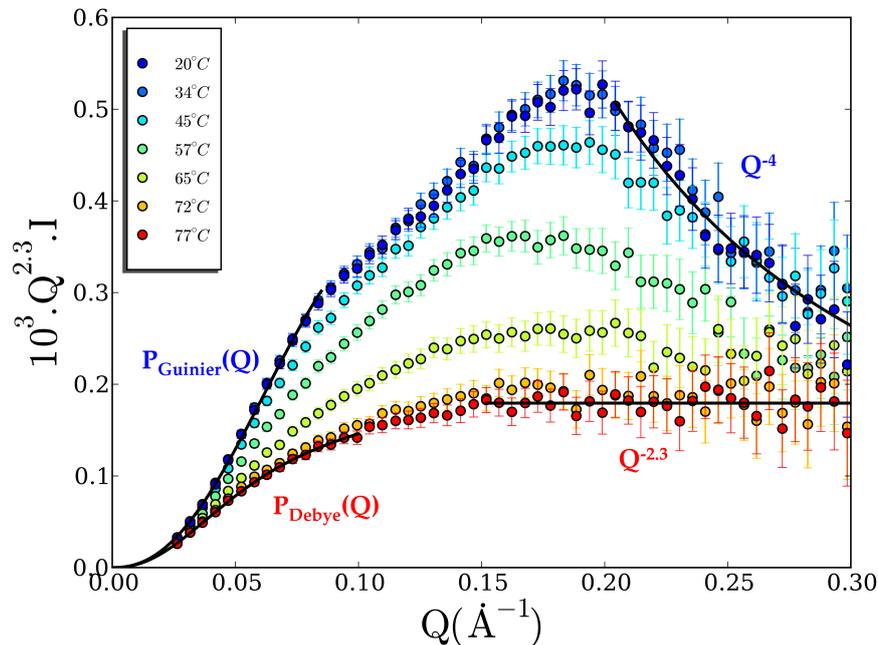


FIG. 4.11 – Représentation de Kratky modifiée ($Q^{2.3} \cdot I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution relativement concentrée (18 g/L) d'apo-calmoduline à plusieurs températures, comprises entre 20°C (en bleu) et 77°C (en rouge). L'exposant "à grand Q " passe progressivement de 4 à 2,3 quand la température passe de 20°C à 77°C. L'apo-calmoduline passe donc d'une conformation compacte à une conformation de type "chaîne polymère", sans structure moyenne. Cette perte de structure moyenne semble concomitante de l'augmentation du rayon de giration (voir figure 4.9). Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

jusqu'à $QR_g = 3$. Aux trois concentrations, le spectre DNPA de l'apo-calmoduline à haute température suit bien une loi de Debye, et non une loi de Guinier. Les valeurs obtenues pour le rayon de giration sont proches de 30 \AA , ce qui permet de vérifier que le spectre DNPA de l'apo-calmoduline à haute température suit bien la loi de Debye jusqu'à $Q = 3/R_g$ ($(3/30)^{2.206} \approx 0,006$). On peut également vérifier, sur la figure 4.11 que l'apo-calmoduline à haute température suit bien une loi de puissance (d'exposant 2,3) à partir de $QR_g \approx 4$ ($4/R_g = 0.13$).

Extrapolations à concentration nulle

Jusqu'à présent, nous avons négligé les effets des interactions intermoléculaires, et assimilé une solution de calmoduline à 5 g/L à une solution idéale. Ceci nous a permis d'obtenir des résultats intéressants, et de suivre assez finement l'évolution en température de la structure tertiaire de l'apo-calmoduline, en utilisant un "temps de faisceau" raisonnable. Nous verrons par la suite que le biais dû aux effets de concentration ainsi introduit est "raisonnable", surtout comparé à d'autres biais sur lesquels nous reviendrons par la suite. Cependant, en toute rigueur, ceci est faux. D'ailleurs, nous avons tout fait pour que les solutions mesurées ne soient surtout pas des

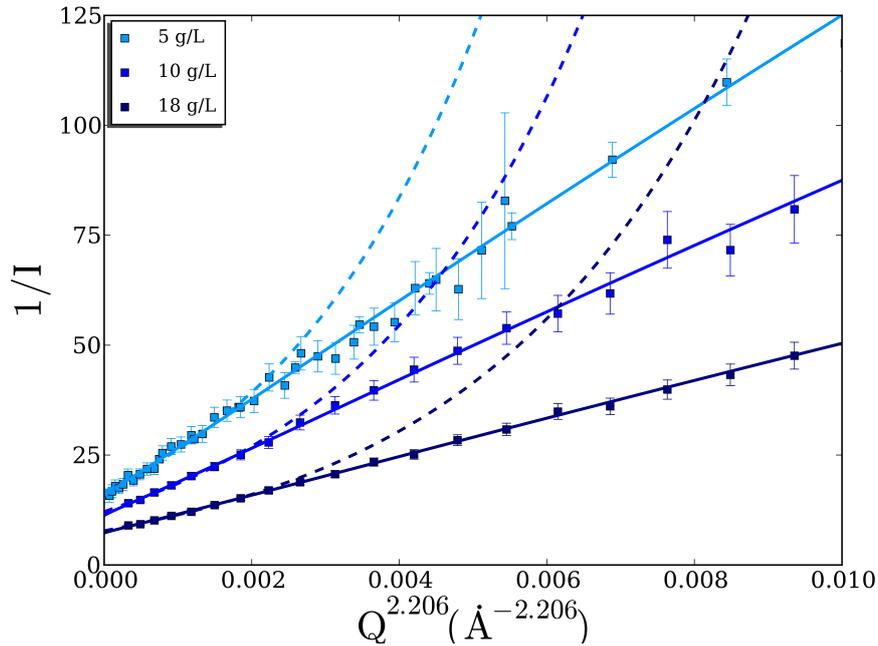


FIG. 4.12 – Représentation $1/I(Q) = f(Q^{2,206})$ des spectres DNPA à haute température (77°C) de solutions d'apo-calmoduline à plusieurs concentrations. En traits plein, ajustements de lois de Debye ; en pointillés, ajustements de lois de Guinier. La loi de Guinier n'est valable qu'asymptotiquement, à très petit Q . La loi de Debye, elle, est valable dans tout son domaine de validité, à savoir $QR_g < 3$ ($(3/R_g)^{2,206} \sim 0.006$). En fait, la loi de Debye semble valable au delà de son domaine de validité. Ceci est dû au fait que l'exposant à grand Q est 2,3, soit peu différent de l'exposant 2 d'une chaîne gaussienne. Le facteur de forme de l'apo-calmoduline est donc très proche de celui d'une chaîne polymère gaussienne, qui se trouve être la Loi de Debye. Ceci montre toutefois sans conteste qu'à grande échelle l'apo-calmoduline, à 77°C , a perdu sa structure moyenne et adopté une conformation de type polymère gaussien. Il faut également préciser que les rayons de giration, issus des ajustements de Guinier présentés ici sont largement biaisés (plus de 3 \AA de différence avec ceux issus de la loi de Debye). En effet, pour un objet de type polymère gaussien, l'approximation de Guinier n'est valable que dans le régime de Guinier strict, soit $QR_g \ll 1$, condition insatisfaite ici. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM $\text{pH}=7.5$ avec 80 mM KCl et $500 \text{ }\mu\text{M}$ d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

solutions idéales. En effet, comme discuté dans la partie 1.3.3, de fortes interactions répulsives sont nécessaires pour éviter l'agrégation, et tout spécialement lors de la dénaturation thermique. Pour obtenir des valeurs réelles des rayons de giration de l'apo-calmoduline dans l'état natif et dans l'état déplié, et pour vérifier la validité des mesures précédentes, il est nécessaire de procéder à des extrapolations à concentration nulle.

Les valeurs du rayon de giration obtenues à partir d'ajustements de Guinier dans l'état natif, et de Debye à haute température (77°C), sont tracées en fonction de la concentration en représentation de Zimm ($1/R_g^2 = f(C)$) dans la figure 4.13. Comme indiqué dans la partie 2.2.3, on

obtient un comportement linéaire ; et l'ordonnée à l'origine donne accès au rayon de giration à concentration nulle, i.e. au "vrai" rayon de giration (le terme "vrai" rayon de giration est encore une fois un abus de langage courant ; il s'agit juste du rayon de giration ; les valeurs obtenues à concentration non nulle ne sont tout simplement pas des rayons de giration, mais des estimations biaisées). On obtient, pour l'apo-calmoduline native $R_g = 18,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$, et pour l'apo-calmoduline à 77°C $R_g = 32,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$. Soit une augmentation conséquente de près de 75%, correspondant à une augmentation de volume d'un facteur 5. Quant à la validité de l'utilisation des mesures à 5 g/L, on peut noter que la valeur du rayon de giration dans l'état natif trouvée à 5 g/L, soit $R_g = 18,3 \pm 0,25 \text{ \AA}$, ne diffère pas significativement (étant donné l'incertitude statistique sur les mesures) de la valeur extrapolée, soit $18,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$.

A haute température, cette différence dépasse les incertitudes statistiques, puisque la valeur obtenue à 5 g/L est $R_g = 31,1 \pm 0,3 \text{ \AA}$, alors que la valeur extrapolée est égale à $R_g = 32,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$ pour la valeur extrapolée. Cette différence est toutefois bien plus faible que la différence entre les valeurs issues d'ajustements de Guinier et de Debye, respectivement $R_g = 27,1 \pm 0,7 \text{ \AA}$ et $R_g = 31,1 \pm 0,3 \text{ \AA}$ à 5 g/L. Cette différence est due au fait que pour une chaîne polymère, l'approximation de Guinier n'est plus valable que dans le domaine de Guinier strict, soit $QR_g \ll 1$; et qu'il est impossible de se placer dans de telles conditions pour des raisons de flux. Sachant qu'il est extrêmement difficile de justifier d'un changement de loi (de Guinier à Debye) en cours de route, et surtout de justifier le choix de la température à partir de laquelle on cesse d'utiliser la loi de Guinier pour passer à la loi de Debye, toutes les valeurs de rayon de giration de la figure 4.9 sont issues d'ajustements de Guinier. Il en découle que le problème de concentration est mineur, et que les limitations majeures sont en fait la gamme en Q de mesure et le domaine de validité de la loi de Guinier.

4.1.4 Le repliement de l'apo-calmoduline

Aspects "thermodynamiques" - Fluorescence et dichroïsme circulaire

La conformation de l'état déplié de la calmoduline étant maintenant caractérisée, nous pouvons passer à l'étude du repliement de l'apo-calmoduline. La figure 4.14 présente l'évolution en température des signaux de fluorescence intrinsèque et de dichroïsme circulaire, dans H_2O et dans D_2O , lors de la descente en température. Les descentes en températures ont été effectuées juste après les montées en températures présentées figure 4.2, et sur les mêmes échantillons. Il apparaît immédiatement que le dépliement n'est pas réversible.

Tout d'abord, comme le montre la figure 4.14, il y a une hystérésis sur toutes les courbes, en dichroïsme circulaire et en fluorescence, dans H_2O et dans D_2O . Toutes les transitions sont décalées de 3°C vers les basses températures. Cette hystérésis est un signe de non-équilibre. C'est donc la deuxième raison des guillemets à "thermodynamiques", au sujet des paramètres issus de l'ajustement des modèles à deux et trois états. Ces paramètres ne pourraient être qualifiés de thermodynamiques que si la dénaturation thermique était réversible.

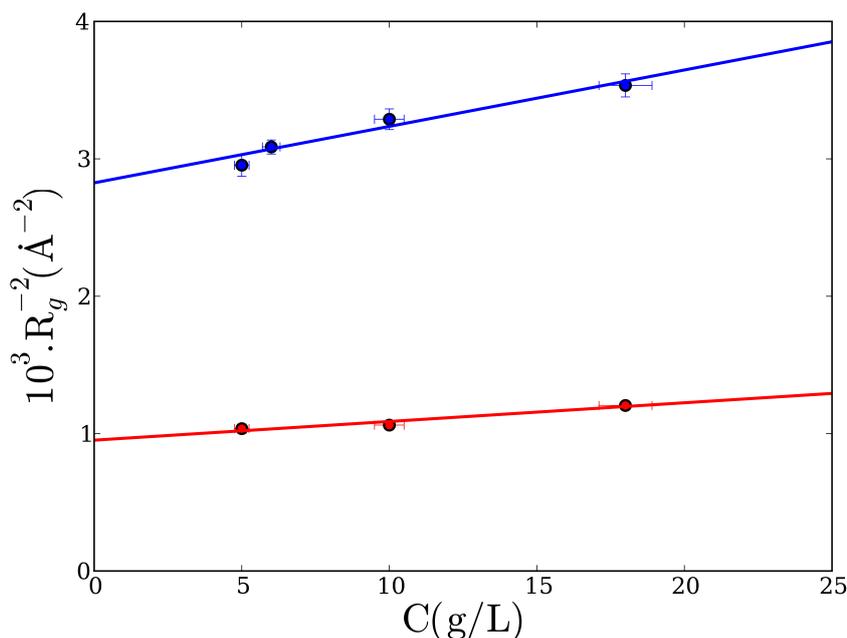


FIG. 4.13 – Représentation de Zimm ($1/R_g^2 = f(C)$) du rayon de gyration en fonction de la concentration, pour l'apo-calmoduline native (20°C, en bleu) et dépliée (77°C, en rouge). Les traits continus sont des ajustements linéaires, dont l'ordonnée à l'origine donne le rayon de gyration à concentration nulle, i.e. le "vrai" rayon de gyration. On obtient ainsi, pour l'apo-calmoduline native $R_g = 18,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$, et pour l'apo-calmoduline à 77°C $R_g = 32,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$. Soit une augmentation conséquente de près de 75%, correspondant à une augmentation de volume d'un facteur 5. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

Ensuite, même si l'apo-calmoduline semble retrouver une structure secondaire proche de sa structure secondaire native, elle ne la retrouve pas exactement. De plus, le signal de fluorescence des tyrosines est, lui, hautement irréversible. Cette irréversibilité est confirmée par les mesures UV-visible. Comme le montre la figure 4.15, la dérivée quatrième du spectre d'absorbance de l'apo-calmoduline refroidie est largement différente de celle de l'apo-calmoduline native, et de celle de l'apo-calmoduline dépliée. On peut également voir sur les figures 4.6 et 4.7, que les longueurs d'ondes de maximum d'absorption, λ_{max} , des tyrosines et des phénylalanines après refroidissement sont systématiquement inférieures à celles de l'état natif. Après refroidissement, les acides aminés aromatiques se retrouvent donc dans un environnement plus polaire que dans l'état natif.

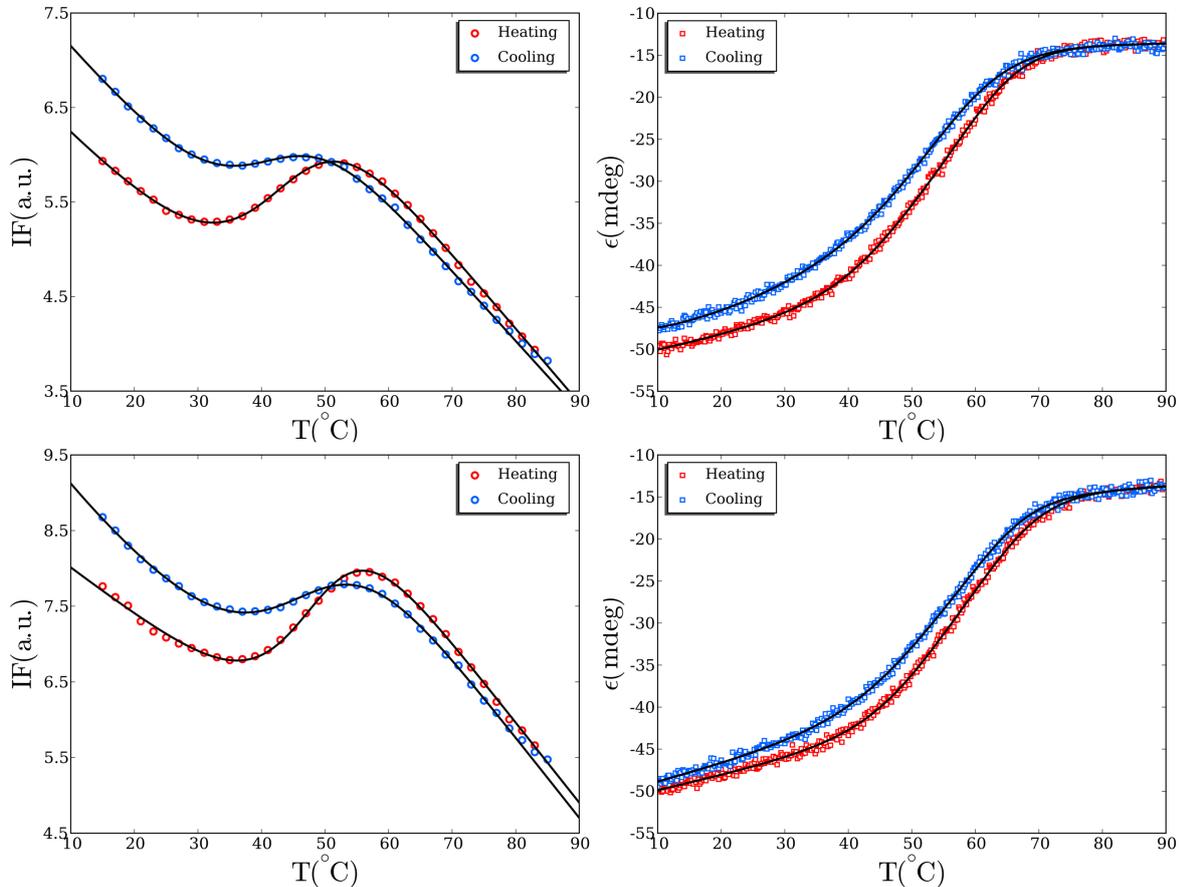


FIG. 4.14 – A gauche : Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H_2O (en haut) et dans D_2O (en bas) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. A droite : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$, de l'apo-calmodulin dans H_2O (en haut) et dans D_2O (en bas) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à trois états. Les montées en températures sont en rouge, les descentes en bleu. Il est clair que la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline est irréversible. Ceci est d'ailleurs plus flagrant en fluorescence intrinsèque. Il y a de plus un hystérésis sur toutes les courbes, en dichroïsme circulaire et en fluorescence, dans H_2O et dans D_2O . Toutes les transitions sont décalées de 3°C vers les basses températures. Cet hystérésis est un signe de non-équilibre. Il prouve également que l'irréversibilité n'est pas due à l'agrégation irréversible d'une faible fraction de protéines dépliées ; agrégation qui empêcherait le repliement des protéines concernées. Un tel mécanisme entraînerait un décalage sur l'axe des y , pas sur l'axe des x . Le fait que l'irréversibilité soit plus marquée en fluorescence qu'en dichroïsme va également à l'encontre de cette hypothèse. En effet, la fraction agrégée devant être la même en fluorescence et en dichroïsme, l'irréversibilité devrait être comparable dans les deux cas (la concentration des solutions utilisées était identique). Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μM (0,33 g/L).

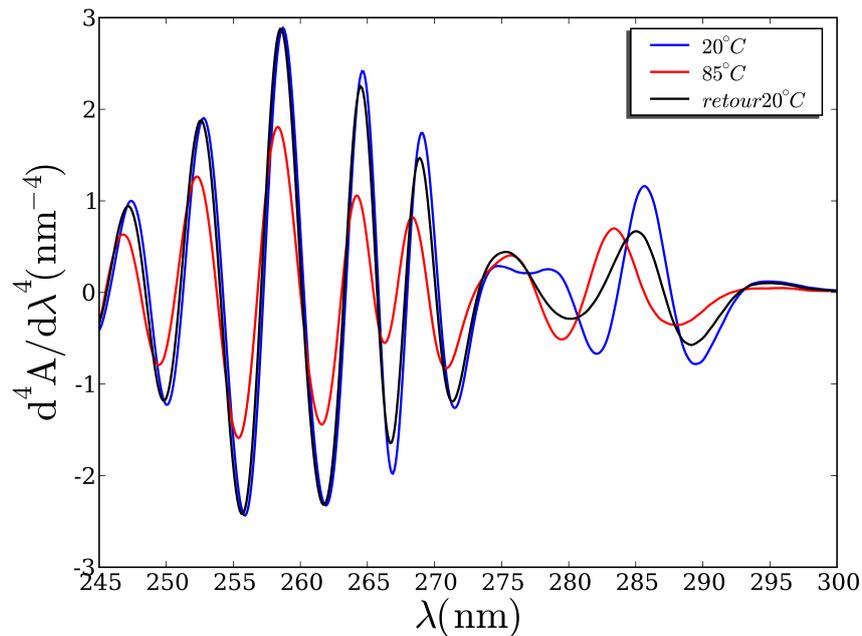


FIG. 4.15 – Dérivée quatrième des spectres d'absorbance d'une solution de $340 \mu\text{M}$ ($5,7 \text{ g/L}$) apo-calmoduline dans D_2O à 20°C (état natif, en bleu), 90°C (état déplié, en rouge) et après retour à 20°C (en noir). Le spectre "retour" est sensiblement différent du spectre "natif", notamment dans la zone des tyrosine ($280 \text{ nm} - 290 \text{ nm}$). La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline est donc irréversible. La spectroscopie d'absorbance est très sensible à l'agrégation. Il est donc peu vraisemblable que l'irréversibilité observée soit due à un phénomène d'agrégation, car elle eût été certainement visible sur les spectres d'absorbance. De plus, l'agrégation dépend très violemment de la concentration. Or, nous avons obtenu des spectres d'absorbance extrêmement similaires, avec toujours une forte irréversibilité au niveau de la zone des tyrosines, avec une solution d'apo-calmoduline à 86 g/L , chauffée à 70°C (la solution utilisée pour l'expérience sur MIBEMOL). Si il y avait eu agrégation à $5,7 \text{ g/L}$, l'agrégation serait devenue catastrophique à 86 g/L , et aurait interdit l'acquisition de spectres de bonne qualité. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM $\text{pH}=7,5$ avec 80 mM KCl et $500 \mu\text{M}$ d'EDTA.

Conformation de l'état "refroidi" - DNPA

Les spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native et d'apo-calmoduline refroidie sont tracés en représentation de Kratky figure 4.16. Le spectre de l'apo-calmoduline refroidie suit une loi de Porod à grand Q . L'apo-calmoduline refroidie a donc retrouvé une structure compacte. Sachant qu'elle retrouve également une structure secondaire, on peut parler d'apo-calmoduline "repliée". Le spectre DNPA de l'apo-calmoduline "repliée" est toutefois différent de celui de l'apo-calmoduline native. En particulier, le maximum de la courbe en représentation de Kratky semble décalé vers les petites valeurs de Q , ce qui est la signature d'une augmentation de taille. On peut en outre remarquer que le modèle "dumbell" (en pointillés sur la figure 4.16) ne rend pas aussi bien compte du spectre de l'apo-calmoduline repliée que celui de l'apo-calmoduline native. Ceci peut être dû à une brisure de la symétrie entre les deux domaines, ou à un effet accru des interactions interprotéines (facteur de structure). Pour essayer de répondre à cette question, et pour aller un peu plus loin, il est donc nécessaire d'effectuer des extrapolations à concentration nulle.

Extrapolations à concentration nulle

Les spectres DNPA de l'apo-calmoduline native et repliée à plusieurs concentrations sont tracés en représentation de Guinier dans la figure 4.17. On distingue deux régimes linéaires, satisfaisant à la relation d'autocohérence de Guinier, ce qui est une caractéristique des objets de type "dumbell". Le régime linéaire à petit Q est le régime de Guinier, donnant accès au rayon de giration de la protéine, et donc à sa taille globale. Le deuxième régime linéaire pourrait être qualifié de "pseudo régime de Guinier". Il donne accès au rayon de giration des domaines isolés, soit à la taille des domaines, mais de manière moins directe que le "vrai" régime de Guinier (voir partie 2.2.3). En se basant sur le modèle du "dumbell", qui considère deux sphères identiques de rayon r séparées d'une distance d , Fujisawa [65] a proposé une méthode graphique pour extraire le rayon de giration des domaines isolés, r_g ; ainsi que la distance d entre les domaines de protéines en haltère, à partir de leurs spectres DNPA ou DXPA (voir partie 2.2.3).

Au vu de la figure 4.17.A, il semble donc que l'apo-calmoduline "repliée" ait une structure "dumbell", comme la protéine native. La méthode de Fujisawa consiste à tracer $\ln(I/Q)$ en fonction de Q^2 . La figure 4.17.B présente les courbes de la figure 4.17.A, en représentation de Fujisawa. Comme prévu, les courbes de la figure 4.17.B présentent un régime linéaire autour de $Q = 2\pi/d$. La pente de cette droite donne le rayon de giration des domaines isolés.

Les rayons de giration des domaines isolés, r_g , et les ("vrais") rayons de giration, R_g , obtenus sont tracés en représentation de Zimm en fonction de la concentration sur la figure 4.18. On peut constater que, contrairement aux ("vrais") rayons de giration, les rayons de giration des domaines isolés ne dépendent pas de la concentration. Ceci n'a rien de très surprenant, sachant

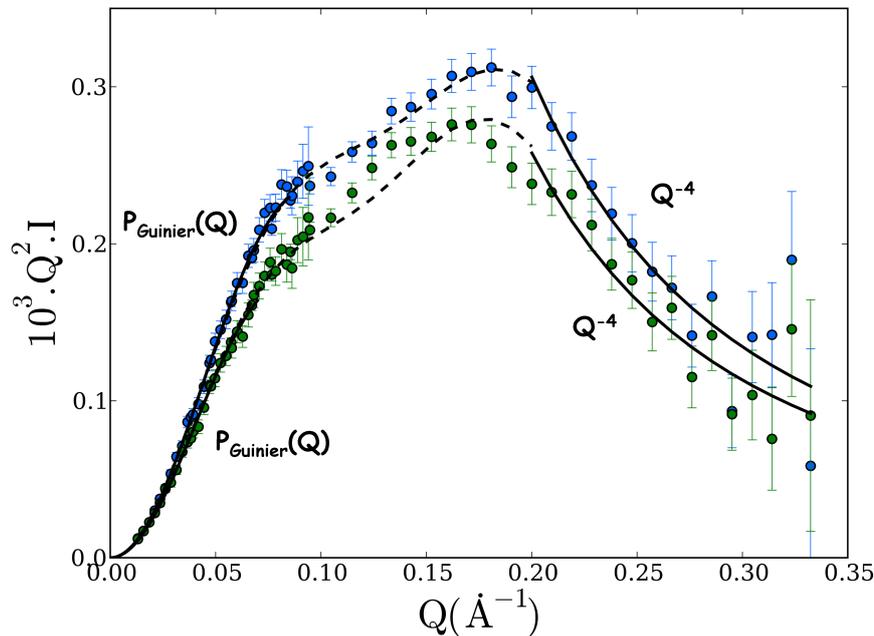


FIG. 4.16 – Représentation de Kratky ($Q^2.I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native (en bleu) et d'apo-calmoduline refroidie (en vert). Lignes discontinues : modèle "dumbell". Le spectre de l'apo-calmoduline "refroidie" suit une loi de Porod (i.e. une décroissance en Q^{-4}) pour $QR_g > 4$; ainsi qu'une loi de Guinier pour $QR_g < \sqrt{2}$. L'apo-calmoduline refroidie est donc compacte. On parlera donc d'apo-calmoduline repliée. On pourra noter que le modèle "dumbell" décrit moins bien le spectre de l'apo-calmoduline repliée que celui de l'apo-calmoduline native. Les différences entre le spectre expérimental et la modèle sont cependant assez faibles : il faut garder à l'esprit que l'ordonnée est $Q^2I(Q)$, ce qui exalte les différences à grand Q . Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

que les rayons de giration des domaines isolés sont déterminés dans des gammes de vecteur d'onde au delà du régime de Guinier, et que $\lim_{Q \rightarrow \infty} S(Q, c) = 1$ (voir partie 2.2.3). Les valeurs extrapolées à concentration nulle des rayons de giration, des rayons de giration des domaines isolés, ainsi que des distances interdomaine ($d^2 = 4(R_g^2 - r_g^2)$) pour l'apo-calmoduline native et l'apo-calmoduline repliée sont regroupés dans le tableau 4.2. On peut constater que le rayon des giration des domaines isolés de l'apo-calmoduline "repliée" est supérieur à celui de l'apo-calmoduline native. Ceci pouvait être pressenti au vu du déplacement du maximum du spectre DNPA en solution diluée en représentation de Kratky. Il apparaît de plus que la distance interdomaine augmente également.

Irréversibilité ou agrégation partielle ?

Une hypothèse souvent avancée pour expliquer l'irréversibilité de la dénaturation thermique est qu'une fraction de protéines dépliées s'agrège irréversiblement. Cette hypothèse ne peut en

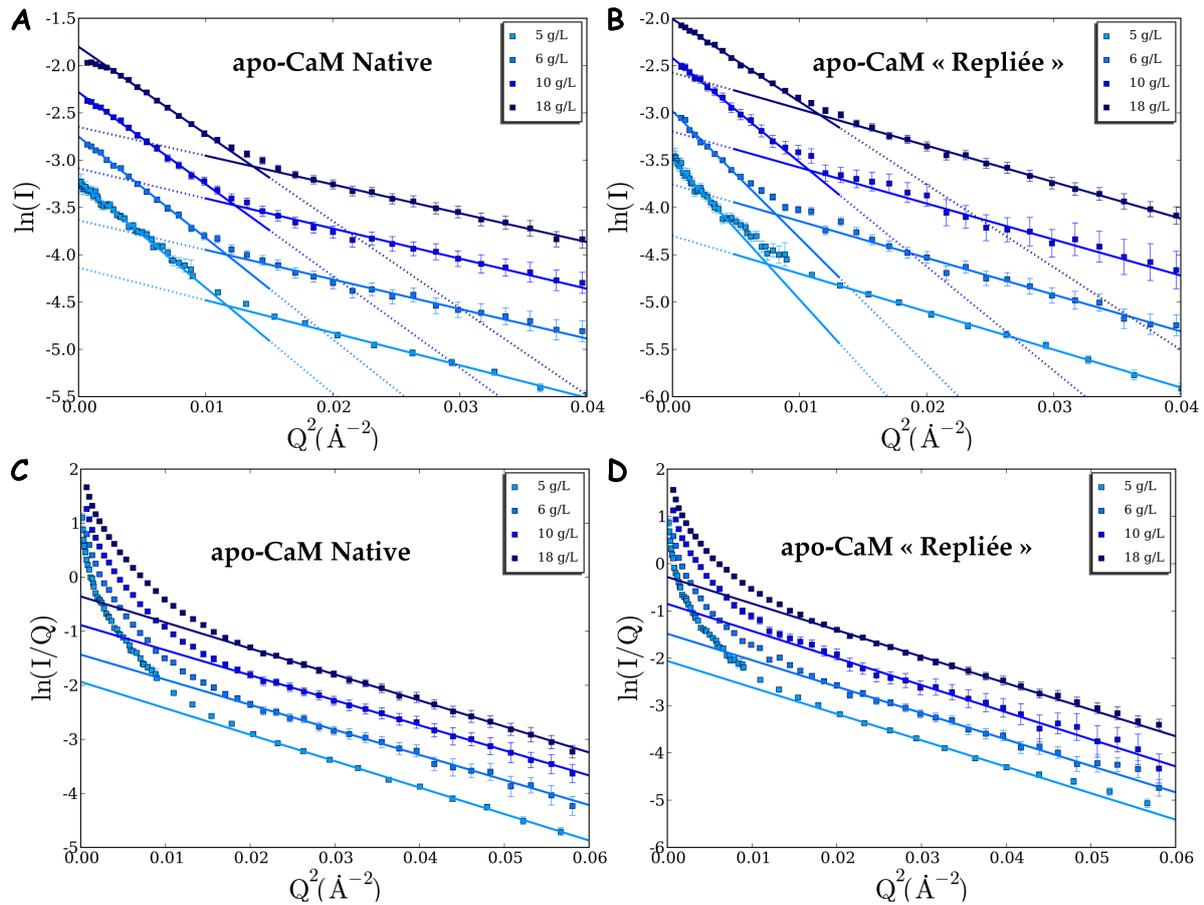


FIG. 4.17 – Représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$) ; en haut, A et B) et de Fujisawa ($\ln \frac{I}{Q} = f(Q^2)$) ; en bas, C et D) des spectres DNPA de l'apo-calmoduline native (à gauche, A et C) et repliée (à droite, B et D) à plusieurs concentrations (18 g/L, 10 g/L, 6 g/L et 5 g/L), et à 20°C. Les courbes à 5 g/L ont été décalées vers le bas pour plus de clarté. En traits pleins, ajustements linéaires. Les spectres de l'apo-calmoduline "repliée" présentent deux régimes linéaires en représentation de Guinier, comme ceux de l'apo-calmoduline native. L'apo-calmoduline repliée a donc également une conformation "dumbbell". Les valeurs de R_g et de r_g , obtenues à partir des pentes des ajustements linéaires sont tracées en représentation de Zimm, en fonction de la concentration dans la figure 4.18. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

	R_g (\AA)	r_g (\AA)	d (\AA)
Apo-calmoduline native	$18,7 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,2$	$28,9 \pm 1,0$
Apo-calmoduline repliée	$22,4 \pm 0,7$	$13,0 \pm 0,2$	$36,5 \pm 2,0$

ТАВ. 4.2 – Paramètres, R_g , r_g , et d , issus de la méthode de Fujisawa extrapolés à concentration nulle pour l'apo-calmoduline native et repliée

aucune manière expliquer l'irréversibilité observée ici. Tout d'abord, la figure 4.18.C présente les intensités à l'origine de l'apo-calmoduline native et de l'apo-calmoduline repliée, en représentation

de Zimm ($\frac{C}{I_0} = f(C)$), en fonction de la concentration ; ainsi que les extrapolations à concentration nulle du rapport ($\frac{C}{I_0} = f(C)$). Ce rapport, connaissant le volume spécifique de la protéine, ainsi que sa densité de longueur de diffusion, permet d'obtenir la masse molaire. Pour l'apo-calmoduline native, ceci donne $17,7 \pm 0,5$ kDa, contre 16,8 kDa en théorie. Compte tenu des erreurs possibles sur le calcul du contraste et sur le volume spécifique issu de la littérature (erreurs non prises en compte dans l'erreur statistique donné ci-avant), l'accord est correct. Pour l'apo-calmoduline "repliée", ceci donne une masse molaire de $16,4 \pm 0,8$; soit, aux erreurs près, égale à celle de l'apo-calmoduline native. Ceci plaide encore une fois en défaveur de l'hypothèse selon laquelle l'irréversibilité observée serait due à une agrégation des protéines.

On peut, en outre, arguer que la spectroscopie d'absorbance est très sensible à l'agrégation. Il est donc peu vraisemblable que l'irréversibilité observée soit due à un phénomène d'agrégation, car elle eût certainement été visible sur les spectres d'absorbance de la figure 4.15. De plus, l'agrégation dépend très violemment de la concentration. Or, nous avons obtenu des spectres d'absorbance extrêmement similaires, avec toujours une forte irréversibilité au niveau de la zone des tyrosines, avec une solution d'apo-calmoduline à 86 g/L, chauffée à 70°C (la solution utilisée pour l'expérience sur MIBEMOL). Si il y avait eu agrégation à 5.7 g/L, l'agrégation serait devenue catastrophique à 86 g/L, et aurait interdit l'acquisition de spectres de bonne qualité. Enfin, le spectre DNPA de cette même solution, disponible sur la figure 1.16, ne montre aucun signe d'agrégation.

Pour finir, il y a un hystérésis sur toutes les courbes de la figure 4.14, en dichroïsme circulaire et en fluorescence, dans H₂O et dans D₂O. Toutes les transitions sont décalées de 3°C vers les basses températures. Cet hystérésis est un signe de non-équilibre. Il prouve que l'irréversibilité n'est pas due à l'agrégation irréversible d'une faible fraction de protéines dépliées ; agrégation qui empêcherait le repliement des protéines concernées. Un tel mécanisme entraînerait un décalage sur l'axe des *y*, pas sur l'axe des *x*. Le fait que l'irréversibilité soit plus marquée en fluorescence qu'en dichroïsme va également à l'encontre de cette hypothèse. En effet, la fraction agrégée devant être la même en fluorescence et en dichroïsme, l'irréversibilité devrait être comparable dans les deux cas (la concentration des solutions utilisées était identique).

L'apo-calmoduline native, un état métastable ?

Se pose ensuite la question de la stabilité de cet état "replié". Si l'on chauffe et refroidit à nouveau l'apo-calmoduline "repliée", l'évolution de la fluorescence reste la même que lors du premier refroidissement, comme on peut le voir sur la figure 4.19. De plus, même après plusieurs cycles de chauffage/refroidissement, on retrouve le même spectre DNPA que lors du premier refroidissement, comme on peut le voir sur la figure 4.20. Ceci pose la question suivante : "*l'état natif de l'apo-calmoduline est-il métastable*".

Cette irréversibilité de la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline pourrait également

être due à une modification chimique subtile de la calmoduline, lors de la montée en température. Au titre de ces modification chimiques possibles, figurent les déamidations, par exemple. Ces modifications n'affectent toutefois que les chaînes latérales des acides aminés, et nous semblent peu susceptibles d'entraîner des modification conformationnelles drastiques, telles que celles observées ici. De plus, l'irréversibilité reportée ici, est observée dès 85°C, température couramment atteinte en dénaturation des protéines. L'irréversibilité observée pourrait également être due à la présence de calcium résiduel non chélaté par l'EDTA dans la calmoduline, calcium qui serait relargué lors de la première dénaturation de la calmoduline. Des expériences sont actuellement en cours pour tenter d'établir la présence ou l'absence de calcium résiduel dans les échantillons de calmoduline utilisés.

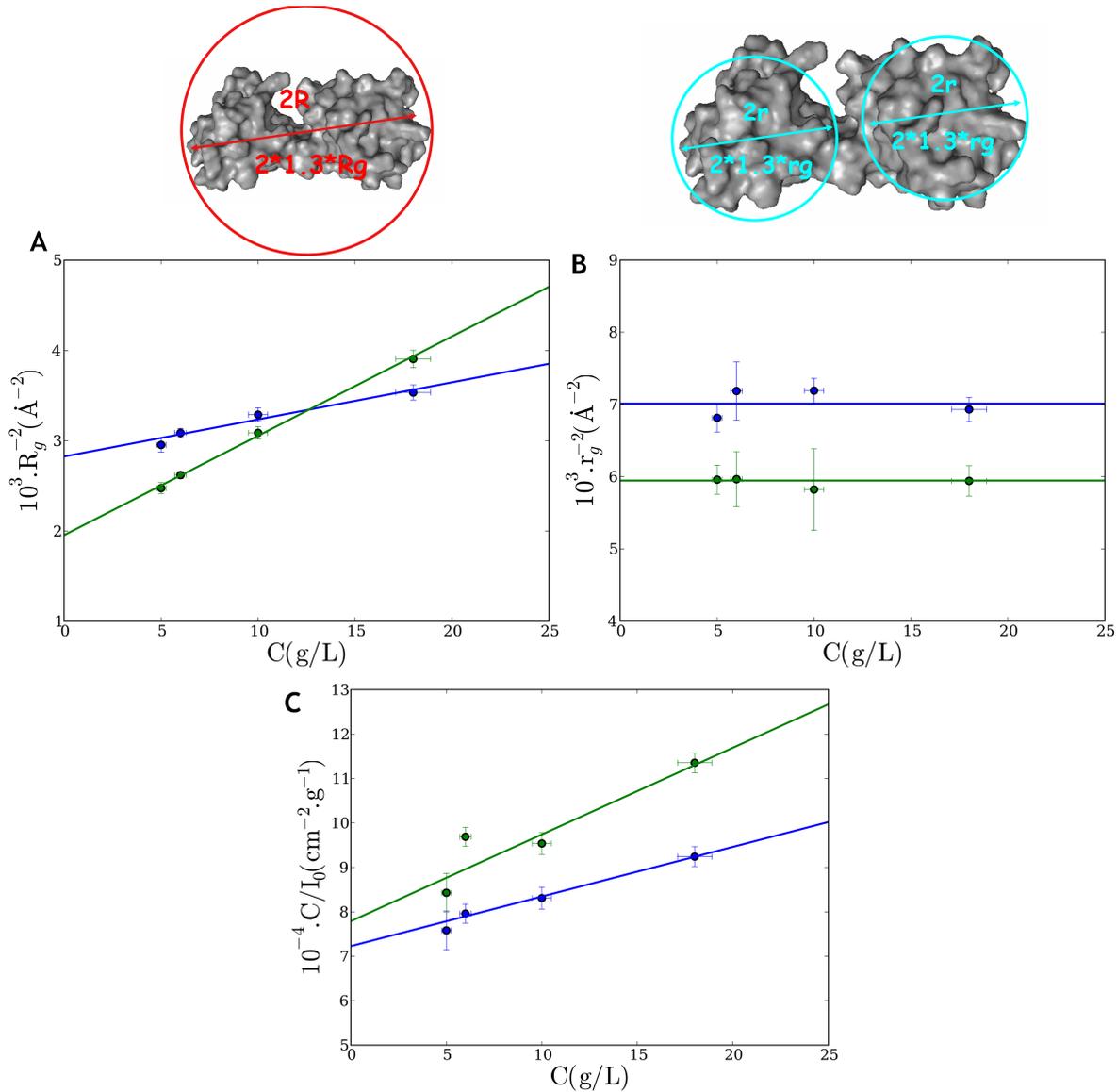


FIG. 4.18 – A et B : Représentation de Zimm ($\frac{1}{R_g^2} = f(C)$) des rayons de gyration (A) et des rayons de gyration des domaines isolés (B) de l'apo-calmoduline native (en bleu) et repliée (en vert), en fonction de la concentration. En traits pleins, extrapolations linéaires menant aux valeurs de ces paramètres à concentration nulle. C : Représentation de Zimm ($\frac{C}{I_0} = f(C)$) de l'intensité à l'origine (i.e. à $Q = 0$) de l'apo-calmoduline native (en bleu) et repliée (en vert), en fonction de la concentration. En traits pleins, extrapolations linéaires conduisant au rapport $\frac{C}{I_0}$ à concentration nulle. Les rayons de gyration R_g et r_g de l'apo-calmoduline repliée sont supérieurs à ceux de l'apo-calmoduline native. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 4.2. Le rapport $\frac{C}{I_0}$ à concentration nulle, connaissant le volume spécifique de la protéine, ainsi que sa densité de longueur de diffusion, permet d'obtenir la masse molaire. Pour l'apo-calmoduline native, ceci donne $17,7 \pm 0,5$ kDa, contre 16,8 kDa en théorie. Pour l'apo-calmoduline "repliée", ceci donne une masse molaire de $16,4 \pm 0,8$ kDa ; soit, aux erreurs près, égale à celle de l'apo-calmoduline native. Ceci plaide encore une fois en défaveur de l'hypothèse selon laquelle l'irréversibilité observée serait due à une agrégation des protéines. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

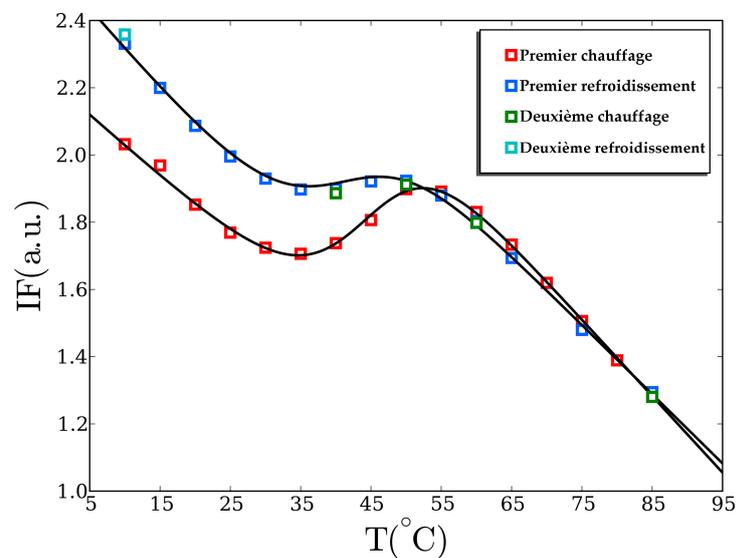


FIG. 4.19 – Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H₂O en fonction de la température sur deux cycles chauffage/refroidissement. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. **En rouge** : first heating ; **en bleu** : first cooling ; **en vert** : second heating ; **en cyan** : second cooling. Après un premier hystérésis lors du premier cycle de chauffage-refroidissement, la transition redevient réversible. Ceci pose la question suivante : "l'état natif de l'apo-calmoduline est-il métastable". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μ M (0,33 g/L).

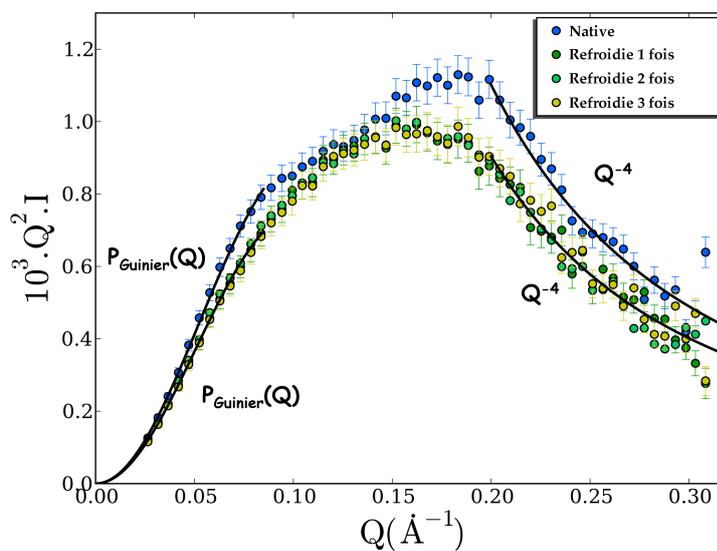


FIG. 4.20 – Représentation de Kratky modifiée ($Q^{2,3}.I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution relativement concentrée (18 g/L) d'apo-calmoduline native (○), refroidie une fois (◐), refroidie deux fois (◑), et refroidie trois fois (◒). Il est clair que, bien que la dénaturation thermique de la calmoduline soit irréversible, la conformation de la calmoduline n'est plus modifiée par les cycles ultérieurs de chauffage-refroidissement. Comme pour l'expérience de fluorescence de la figure 4.19, ceci ouvre la question suivant "l'état natif de l'apo-calmoduline est-il métastable?". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB).

4.1.5 Résumé

Pour résumer, la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline est sensible au D₂O; ce qui souligne le rôle de l'hydratation et des liaisons hydrogène protéine-solvant dans la stabilité de l'apo-calmoduline. Le "chemin" de dénaturation fait intervenir des états intermédiaires, mais aucun état de type "molten globule" n'a été détecté. Cette dénaturation thermique est un dépliement : l'apo-calmoduline perd sa structure et adopte une conformation "de type chaîne polymère gaussienne" à grande échelle avec, toutefois, des structures résiduelles. L'environnement des acides aminés aromatiques devient plus polaire, et atteint même une polarité proche de celle du solvant dans le cas des tyrosines. Il apparaît également que l'apo-calmoduline "se replie mal" après refroidissement. Elle retrouve l'essentiel de sa structure secondaire native et une conformation compacte; mais avec des domaines "gonflés" (avec un rayon de giration supérieur), et un environnement des acides aminés aromatiques plus polaire. L'augmentation de la distance interdomaine pose la question de l'altération de l'état de l'hélice- α centrale. En effet, cette distance interdomaine, qui est une moyenne temporelle, est imposée par la flexibilité de cette hélice- α (voir partie 1.3.2).

4.2 Aspects dynamiques

4.2.1 Introduction

Depuis que Levinthal [6] a montré qu'un modèle thermodynamique simple (à deux états) ne permettait pas d'expliquer le repliement des protéines, le repliement (et le dépliement) des protéines a donné lieu à de nombreuses études et à une littérature abondante. Nombre de ces études ont visé à comprendre la thermodynamique du repliement. De nombreux travaux ont également porté sur la caractérisation de la conformation des états dénaturés des protéines, sachant que la fonction des protéines est donnée par leur conformation. Il a cependant été démontré que la dynamique a également une influence sur la fonction [81, 82, 83]. Plus récemment donc, des études ont porté sur la dynamique des états dénaturés, et sur la comparaison de la dynamique d'une protéine native et d'une protéine dénaturée [84, 85, 86].

C'est dans cette logique, qu'après avoir considéré les aspects thermodynamiques et conformationnels de la dénaturation thermique, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la dynamique interne de l'apo-calmoduline au cours de la dénaturation thermique. Pour cela, nous avons eu recours à la diffusion incohérente quasi-élastique de neutrons par temps de vol. Cette technique, détaillée dans la partie 2.3 (le lecteur désireux de plus de détails sur cette technique pourra se tourner vers l'ouvrage de M. Bée [87]), permet de sonder la dynamique à l'échelle temporelle, de

la picoseconde à la centaine de picosecondes typiquement. Contrairement à la RMN ou à la spectroscopie de relaxation diélectrique qui ne donnent qu'une information temporelle, la diffusion quasi-élastique de neutrons donne également une information spatiale, et permet d'accéder à la géométrie des différents mouvements au sein d'une protéine. Des revues sur son application à la dynamique des protéines sont disponibles [88].

Les expériences présentées dans cette partie ont été effectuées sur MIBEMOL (LLB, Saclay, France). Les détails concernant le traitement des données ainsi que les modèles utilisés pour leur analyse et leur interprétation sont disponibles dans les parties 2.3.2 et 2.3.3. Les mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons ont été réalisées à trois températures : 15°C (état natif), 50°C (domaine C-terminal déplié, domaine N-terminal intact) et 70°C (domaine C-terminal déplié, domaine N-terminal déplié à 95%). Nous nous sommes limités à 70°C pour éviter toute agrégation, compte tenu de la haute concentration utilisée (86 g/L).

4.2.2 Facteur de Debye-Waller et déplacements carrés moyens

Le logarithme de l'intensité élastique est tracé en fonction de Q^2 , pour les trois températures, sur la figure 4.21. Les déplacements carrés moyens sont déduits des pentes des droites ajustées (voir tableau 4.3). Il apparaît que l'évolution en température du déplacement carré moyen n'est pas linéaire (en Kelvin). Ceci signe la présence d'une transition dynamique entre 15°C et 70°C. L'apo-calmoduline étant native à 15°C et dépliée à 70°C (pas totalement certes, mais on obtient déjà une loi de Debye pour $QR_g < 3$), il semble raisonnable d'associer cette transition dynamique avec le dépliement de l'apo-calmoduline décrit dans la partie précédente.

4.2.3 Quasi-élastique - Examen préliminaire des données

Pour pouvoir aller un peu plus loin, et pouvoir caractériser cette transition dynamique, il convient d'examiner la partie quasi-élastique des spectres, et d'ajuster le modèle défini dans la partie 2.3.3. Des exemples de spectres quasi-élastique pour deux valeurs de Q (1 \AA^{-1} et 2 \AA^{-1}) et à deux températures (15°C et 70°C) sont représentés sur la figure 4.22, avec les ajustements correspondants.

Il est possible de dégager quelques informations basiques au premier regard. Premièrement, l'EISF, donné par le rapport $\mathcal{A}_{L_{diff}}(Q)/(\mathcal{A}_{L_{diff}}(Q) + \mathcal{A}_{L_{int}}(Q))$, diminue significativement avec Q entre 1 \AA^{-1} et 2 \AA^{-1} . Dans le cadre du modèle de diffusion dans une sphère, ceci implique que le rayon moyen de sphère doit être de l'ordre de 1 \AA . En effet, pour $\langle a \rangle \ll 1$, l'EISF serait constant ; et pour $\langle a \rangle \gg 1$, il serait nul. Deuxièmement, les deux lorentziennes sont plus larges à haute température qu'à basse température. Les mouvements (internes, et globaux) sont donc plus rapides à haute température qu'à basse température. Encore une fois, ceci semble naturel. Pour finir, aux deux valeurs de Q , l'EISF semble diminuer avec la température. Ceci implique une diminution de la proportion de protons immobiles p , ou une augmentation du rayon moyen des sphères $\langle a \rangle$, ou

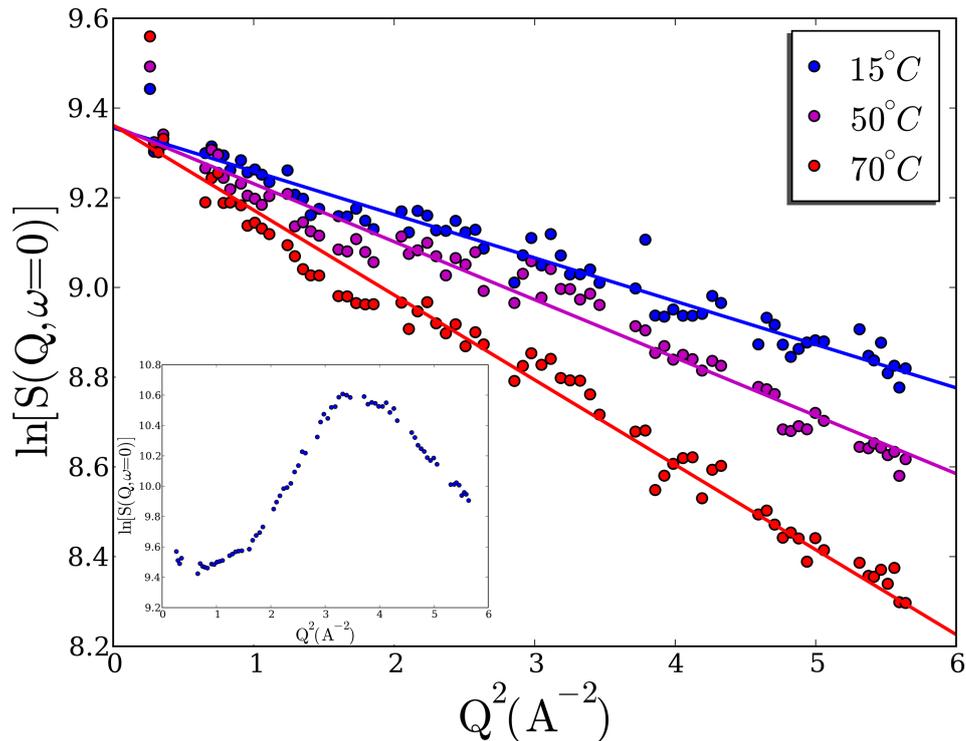


FIG. 4.21 – Représentation de Guinier de l'intensité élastique (calculée comme $\int_{|\hbar\omega| \leq 1 \text{ meV}} I_{inc}(Q, \omega) d\omega \propto e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle}$) d'une solution concentrée d'apo-calmodulin à trois températures : \bullet : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins, ajustements linéaires conduisant aux valeurs de déplacements carrés moyens $\langle u^2 \rangle$. Les valeurs de $\langle u^2 \rangle$ ainsi obtenues sont rassemblées dans le tableau 4.3. On peut constater que ces courbes sont bien linéaires, notamment autour de $1,9 \text{ \AA}^{-1}$ ($3,6 \text{ \AA}^{-2}$). Ceci valide la qualité de la soustraction du signal du solvant. En effet, celui-ci présente un pic très prononcé pour cette valeur de Q (voir insert présentant le logarithme de l'intensité élastique du solvant, à 288 K, en fonction de Q^2), et atteint le quadruple de l'intensité élastique diffusée par la protéine. Toute erreur, même minimale, dans la soustraction du signal de solvant se traduirait donc par un "creux" ou une "bosse" dans cette région. Un autre "bon" point concernant ces données est que l'intensité élastique (extrapolée) à $Q = 0$ est indépendante de la température. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

les deux, et correspond donc à une diminution du confinement. Ceci semble assez naturel, sachant que la protéine se déplie. Cet examen rapide des données permet donc de s'assurer de l'absence d'aberrations évidentes, et de dégager certains comportements généraux, avant tout ajustement.

4.2.4 Ajustement du modèle et premiers résultats

Une fois effectué cet examen préliminaire des données, il est possible de passer à l'ajustement des spectres, selon la méthode décrite dans la partie 2.3.3. Les valeurs obtenues pour Γ_{int} et Γ_{diff}

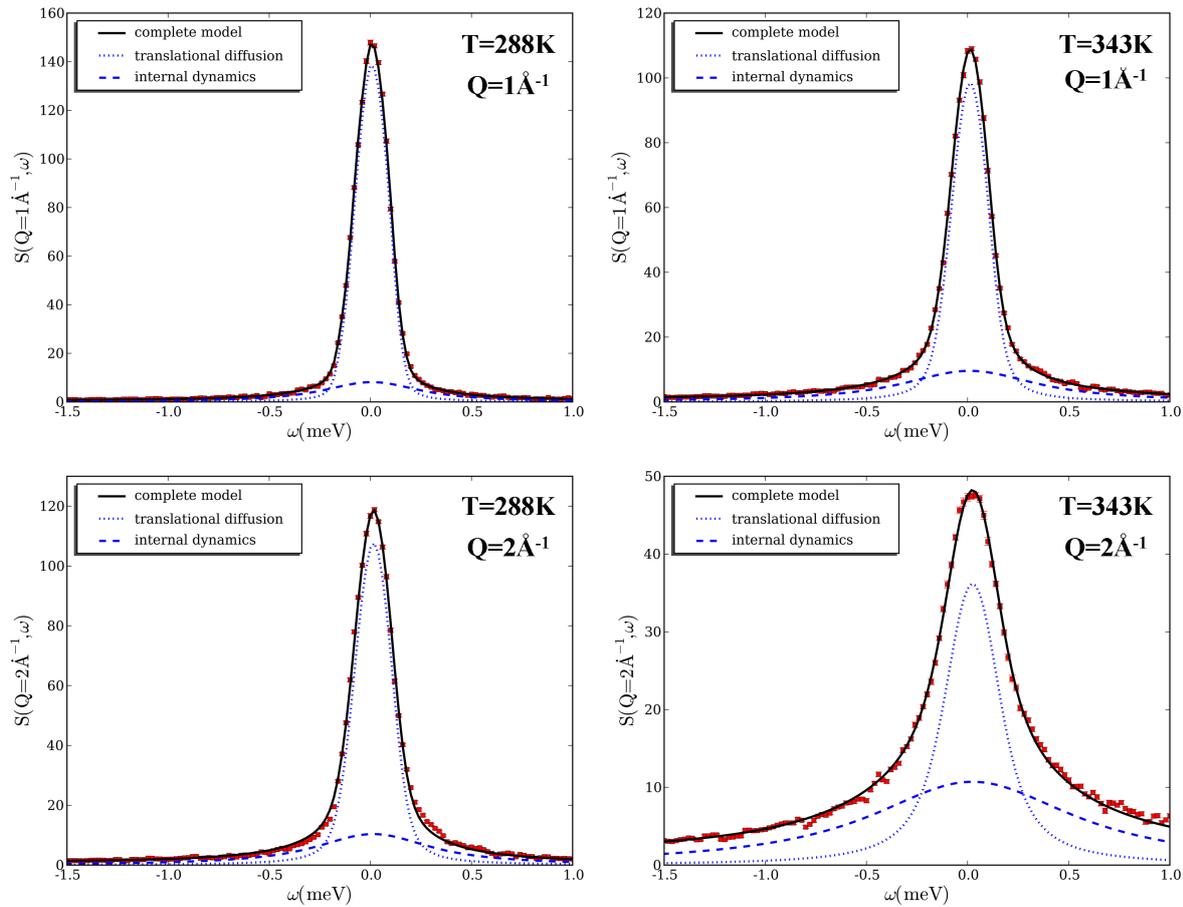


FIG. 4.22 – Spectres quasi-élastiques d'une solution concentrée d'apo-calmoduline pour deux valeurs de Q (1 \AA^{-1} et 2 \AA^{-1}), et à deux températures (15°C et 70°C , ou 288 K et 343 K). En traits pleins : ajustement du modèle complet. En traits discontinus : lorentziennes décrivant les mouvements internes. En pointillés : lorentzienne décrivant la diffusion de translation. On constate au premier coup d'oeil que, pendant que l'intensité de la lorentzienne de mouvements internes, $\mathcal{A}_{L_{int}}$, augmente, l'intensité de la lorentzienne de diffusion, $\mathcal{A}_{L_{diff}}$, diminue avec Q (EISF) et avec la température (augmentation, en énergie et en amplitude, de la dynamique avec la température, sous l'effet "du kT " et du déplieement). Ceci est conforme à ce attendu. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM $\text{pH}=7.5$ avec 80 mM KCl et $500 \mu\text{M}$ d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L . Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

aux trois températures sont tracées en fonction de Q^2 sur les figures 4.24 et 4.25. L'EISF aux trois températures est tracé en fonction de Q , avec les ajustements de la fonction de l'équation 2.108 correspondants. Les distributions de rayon de sphère correspondantes sont représentées dans l'insert. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 4.3.

Comme il apparaît dans le tableau 4.3, le volume moyen des sphères dans lesquelles les atomes diffusent, $\langle a \rangle$, ainsi que le coefficient de diffusion (dans les sphères) de ces mêmes atomes, D_{sph} ,

augmentent avec la température. Le volume moyen des sphères passe de $13,9 \text{ \AA}^3$ à 15°C à $16,6 \text{ \AA}^3$ à haute température ; et le coefficient de diffusion passe de $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ à 15°C à $3,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ à 70°C . En même temps, la proportion de protons immobiles, p , qui est supérieure à 50% à 15°C ($p = 0,56 \pm 0,03$), devient quasi nulle à haute température ($0,05 \pm 0,03$). Des valeurs comprises entre 50% et 60% pour la proportion de protons immobiles sont classiques pour les protéines en solution à basse température (autour de 20°C) [89, 90] ; et une valeur quasi-nulle pour une protéine dénaturée thermiquement a déjà été observée par Russo et al. [84]. Tout ceci indique donc une forte diminution du confinement lors du dépliement, amenant un nombre plus élevé de protons à explorer un plus grand volume. La fraction résiduelle de protons immobiles pourrait correspondre aux atomes du squelette peptidique des structures secondaires résiduelles.

T(°C)	15	50	70
T(K)	288	323	343
$\langle u^2 \rangle (\text{\AA}^2)$	$0,097 \pm 0,001$	$0,129 \pm 0,002$	$0,189 \pm 0,002$
$D_{trans} (\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$(6,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$	$(25,2 \pm 1,5) \cdot 10^{-7}$	$(44,1 \pm 2,0) \cdot 10^{-7}$
$\frac{4\pi}{3} \langle a \rangle^3 (\text{\AA}^3)$	$13,8 \pm 0,3$	$15,1 \pm 0,3$	$16,6 \pm 0,3$
$D_{sph} (\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$(230 \pm 20) \cdot 10^{-7}$	$(315 \pm 30) \cdot 10^{-7}$	$(390 \pm 30) \cdot 10^{-7}$
p	$0,56 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$
I_p	$0,07 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,03$	$2,37 \pm 0,04$
$\frac{4\pi}{3} \bar{a}^3 (\text{\AA}^3)$	$7,0 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$

ТАВ. 4.3 – Paramètres du modèle décrit dans la partie 2.3.3 : le déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$, le coefficient de diffusion de translation D_{trans} , le volume moyen des sphères $\frac{4\pi}{3} \langle a \rangle^3$, la fraction de protons immobiles p , l'indice de polydispersité des volumes des sphères I_p , le volume de sphère "le plus probable" $\frac{4\pi}{3} \bar{a}^3$ et le coefficient de diffusion moyen des atomes dans les sphères D_{sph} . On peut déjà remarquer que le déplacement carré moyen, $\langle u^2 \rangle$, n'est pas proportionnel à la température en Kelvins. Il y a donc une transition dans la dynamique de la calmoduline.

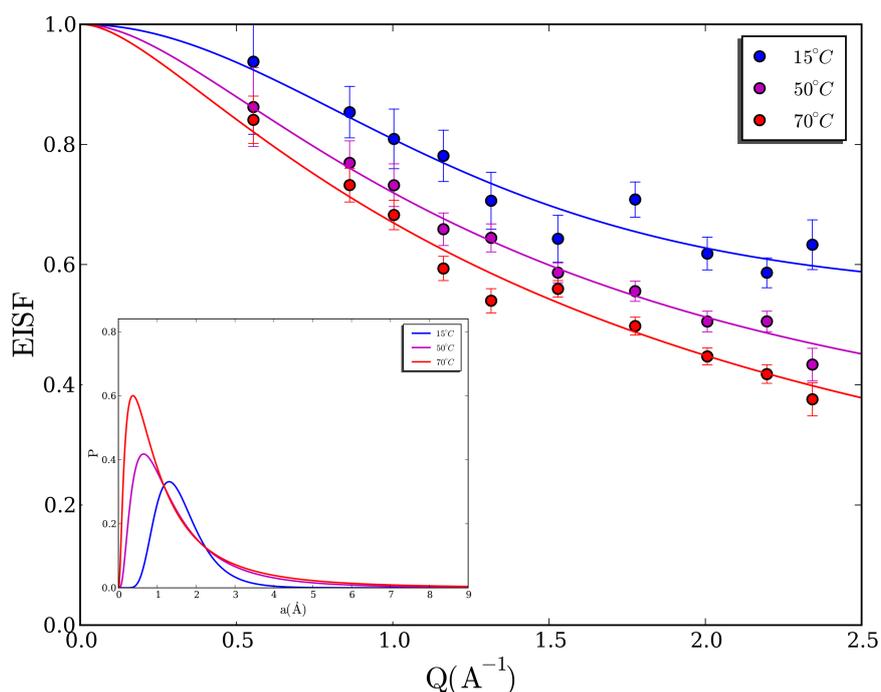


FIG. 4.23 – EISF de l'apo-calmodulin en fonction de Q pour plusieurs températures : \bullet : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins, ajustement de l'expression de l'équation 2.108. Les distributions (lognormales) de rayon de sphère correspondantes sont représentées dans l'insert. La moyenne de cette distribution augmente avec la température ; mais la valeur "la plus probable", elle, diminue avec la température. De plus, la variance de la distribution augmente considérablement. Les résultats de ces ajustements sont rassemblés dans le tableau 4.3. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

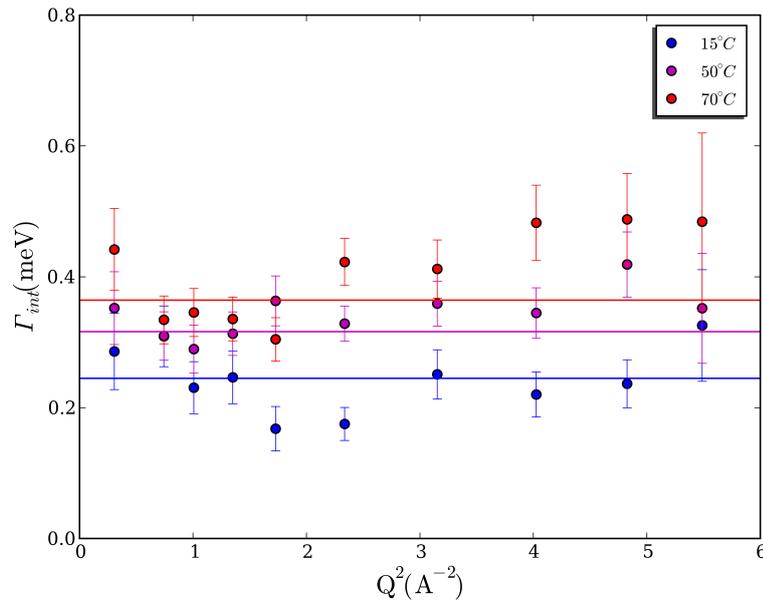


FIG. 4.24 – Largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, Γ_{int} , en fonction de Q^2 pour plusieurs températures : \circ : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins : "ajustements" d'une fonction constante dans la région $0 < Q < \frac{\pi}{\langle a \rangle}$ conduisant au coefficient de diffusion D_{sph} (voir équation 2.102). Le coefficient de diffusion D_{sph} augmente avec la température. On peut toutefois noter que pour les trois températures, le rayon moyen de sphère, $\langle a \rangle$, est compris entre 1,48 et 1,58. D'après l'équation 2.102, Γ_{int} doit être constant pour $Q < \pi/a$. En ne considérant que les valeurs moyennes du rayon de sphère, $\langle a \rangle$, Γ_{int} devrait donc être constant pour $Q^2 < 4$ (au moins), et ne devrait commencer à augmenter qu'à l'extrémité de la gamme en Q accessible dans cette expérience ; et ce pour les trois températures. Or, si Γ_{int} est bien constant à 15°C, elle augmente significativement au delà de $Q = 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ à 70°C. Ceci implique donc qu'à haute température, certains atomes diffusent dans des sphères de grand rayon, sans que la valeur moyenne des rayons soit très affectée. Ceci est totalement en accord avec l'augmentation de la polydispersité rapportée ci-avant ; et donc avec le fait qu'à haute température, la distribution lognormale des rayons de sphère prenne des valeurs non nulles pour de grandes valeurs de rayon. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

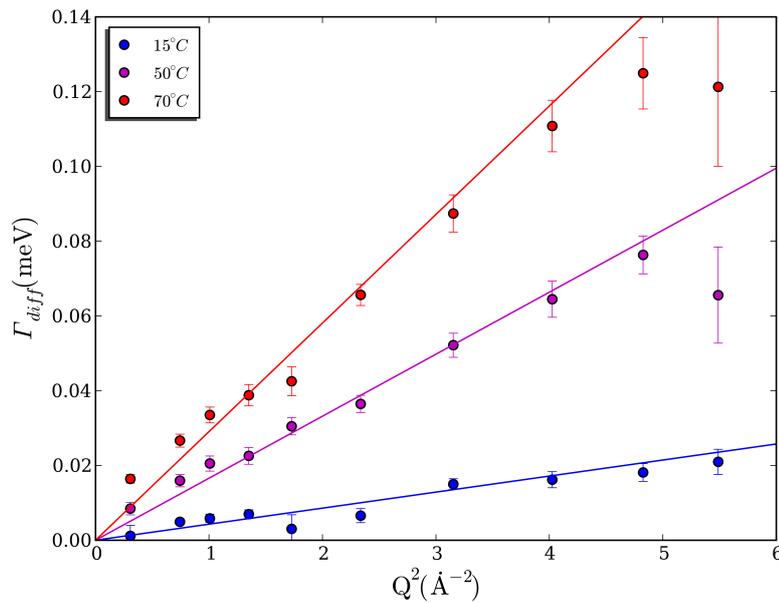


FIG. 4.25 – Largeur de la lorentzienne décrivant la diffusion de translation globale de l'apo-calmoduline, Γ_{diff} , en fonction de Q^2 pour plusieurs températures : \circ : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins : ajustements linéaires conduisant au coefficient de diffusion de translation D_t . Le coefficient de diffusion de translation D_t augmente avec la température, ce qui est assez logique. Cependant, si ce coefficient de diffusion suit bien la loi de Stokes-Einstein dans l'état natif ; ce n'est plus le cas à haute température. Ceci n'est guère surprenant car, si l'hypothèse de découplage des mouvements globaux et internes, à la base du modèle de l'équation 2.100, est assez bien justifiée pour des protéines compactes ; elle l'est un peu moins pour des objets de type polymère (objets hautement flexibles, et dont on ne peut pas vraiment considérer qu'ils diffusent comme des objets "rigides"). La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

4.2.5 Indice de polydispersité des rayons de sphère

L'augmentation du volume moyen des sphères s'accompagne d'une augmentation spectaculaire de leur polydispersité (I_p passe de 0,07 à 2,37); mais également d'une diminution du volume de sphère "le plus probable". Ceci ne peut s'expliquer qu'en faisant appel à trois grandes populations de protons (au moins). La première comprend les atomes qui sont mobiles à basse température (sûrement les protons situés "loin" du squelette peptidique). La deuxième est plus confinée ou contrainte, et apparaît donc immobile à basse température dans l'état natif; mais devient mobile à haute température dans l'état déplié (sûrement les protons situés près ou sur le squelette peptidique). La dernière population, très minoritaire, est immobile à toutes les températures, et il s'agit probablement des protons appartenant au squelette peptidique des structures secondaires résiduelles [80]. Cette affectation en fonction de la distance au squelette peptidique des trois populations est suggérée par les travaux de Carpentier et al. [71], qui ont montré que le rayon de sphère de confinement des hydrogènes d'une chaîne aliphatique fixée à une extrémité augmente linéairement avec la distance au point d'ancrage. Quand la protéine se déplie, la première population devient moins confinée et explore donc un volume plus important. Comme le confinement de la deuxième population diminue également, elle diffuse plus vite et explore également un volume plus important. Elle apparaît donc maintenant comme mobile, mais elle explore un volume plus faible que celui exploré par la première population car elle est plus proche du squelette peptidique, et donc du "point d'ancrage". Cette hypothèse peut donc expliquer l'augmentation observée de la polydispersité. En effet, le modèle ne considère qu'une seule distribution de rayons de sphère, ce qui, à haute température revient à ajuster une distribution sur deux distributions disjointes. En faisant maintenant l'hypothèse que le volume exploré par la deuxième population dans l'état déplié est inférieur à celui exploré par la première population dans l'état natif, on peut expliquer la diminution du volume de sphère "le plus probable".

Ce raisonnement simpliste est illustré dans la figure 4.26. Il n'a pas pour objet de décrire la réalité, mais juste de mettre en lumière la cause de l'augmentation de la polydispersité; ainsi que de démontrer qu'une seule distribution d'atomes est insuffisante pour rendre compte de la dynamique de l'apo-calmoduline.

4.2.6 Relation de dispersion des mouvements internes

Jusqu'ici, l'augmentation de la polydispersité des rayons de sphère a été mise en évidence uniquement par l'ajustement de l'EISF. L'examen de la relation de dispersion de Γ_{int} ($\Gamma_{int} = f(Q)$) permet de conforter cette information essentielle. Cette relation de dispersion est tracée sur la figure 4.24. Pour les trois températures, le rayon moyen de sphère est compris entre 1,48 et 1,58. D'après l'équation 2.102, Γ_{int} doit être constant pour $Q < \pi/a$. Si on considère uniquement les valeurs moyennes, Γ_{int} devrait donc être constant jusqu'à $Q^2 = 4 (\pi/1,58 \approx 2)$ au moins, et ne devrait commencer à augmenter qu'à l'extrémité de la gamme en Q accessible dans cette expérience (sur les deux derniers points pour être exact); et ce pour les trois températures. Or, si Γ_{int} est bien

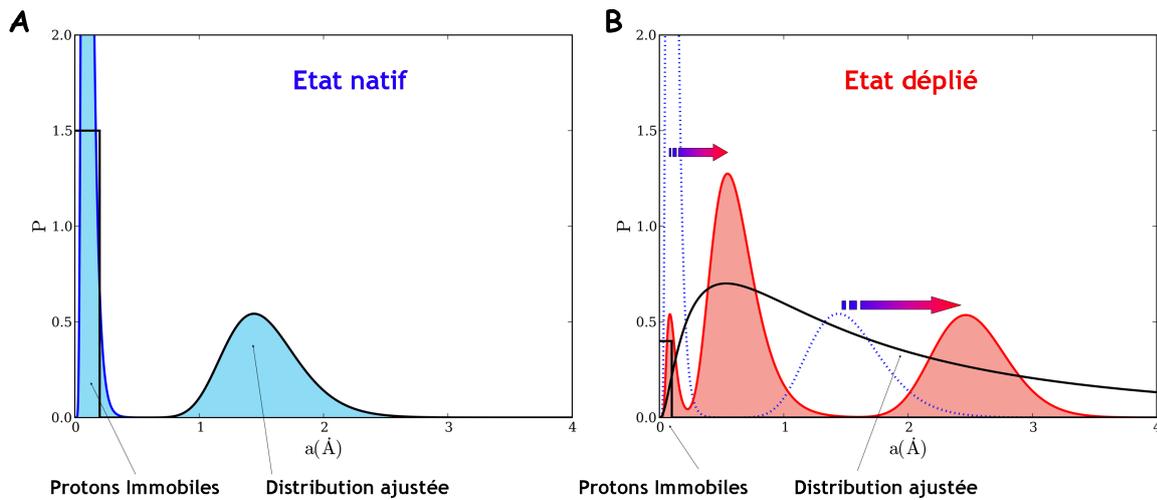


FIG. 4.26 – Représentation schématique du "mécanisme" hypothétique proposé ci-avant. En bleu et rouge, les rayons de sphère explorés par les trois "populations" de protons, dans l'état natif et déplié respectivement. En noir les proportions de protons immobiles et les distributions lognormales des rayons de sphère correspondantes. La courbe noire représente donc le modèle "ajusté" dans les deux situations. A : Dans l'état natif, les deux premières populations apparaissent comme immobiles (dans le modèle, elles sont représentées par le rectangle noir), la troisième population apparaît mobile (dans le modèle, elle est représentée par la distribution lognormale en noir). B : La protéine se déplie, et le confinement des chaînes latérales diminue. Les rayons explorés par les différentes populations de protons augmentent, et sont maintenant indiqués en rouge (le déplacement est matérialisé par les flèches en dégradé de couleur). La troisième population, sûrement des protons appartenant au squelette peptidique des structures secondaires résiduelles (représentée par la petite "bosse" à très petits rayons) apparaît toujours immobile. La première population, déjà mobile dans l'état natif, explore des rayons plus importants (elle est représentée par la "bosse" entre 2 et 3 Å, choix purement arbitraire). Cependant, la deuxième population, immobile dans l'état natif, apparaît maintenant mobile, mais explore des rayons inférieurs à ceux explorés par la première population dans l'état natif (elle est représentée par la "bosse" entre 0.3 et 1 Å, choix toujours arbitraire). Le modèle utilisé ne considère qu'une seule distribution de protons mobiles. Ainsi, les deux populations maintenant mobiles et distinctes, ne sont "ajustées" que par une seule distribution lognormale. La distribution "ajustée" a donc une valeur moyenne légèrement plus élevée que celle de l'état natif ; mais une valeur de rayon "le plus probable" inférieure. Et surtout, la variance de cette distribution (qui donne l'indice de polydispersité I_p) est considérablement plus élevée que dans l'état natif.

constant à 15°C, elle augmente significativement au delà de $Q = 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ à 70°C. Ceci implique donc qu'à haute température, certains atomes diffusent dans des sphères de grand rayon, sans que la valeur moyenne des rayons soit très affectée. Ceci est totalement en accord avec l'augmentation de la polydispersité rapportée ci-avant ; et donc avec le fait qu'à haute température, la distribution lognormale des rayons de sphère prend des valeurs non nulles pour de grandes valeurs de rayon. Cette cohérence est assez rassurante quant à la réalité des ajustements de l'EISF.

4.2.7 Distance au squelette peptidique ou exposition au solvant ?

Cette augmentation de la polydispersité lors du dépliement implique que le facteur principal déterminant la dynamique des atomes de la calmoduline n'est pas l'exposition au solvant ; mais bien la distance au squelette peptidique. En effet, à haute température, l'apo-calmoduline dépliée adopte une conformation proche d'une chaîne polymère gaussienne. Tous les résidus sont donc exposés au solvant. Au contraire, pour l'apo-calmoduline native, seuls les résidus à la surface de la protéine le sont. Si l'exposition au solvant des résidus déterminait la dynamique des atomes, le dépliement de l'apo-calmoduline irait de pair avec une plus grande homogénéité de la dynamique, et notamment avec une polydispersité des volumes de sphère inférieure, ou de l'ordre de celle de l'état natif. La polydispersité de l'état déplié, supérieure de plus d'un ordre de grandeur à celle de l'état natif, ne peut s'expliquer que si la dynamique est principalement déterminée par la distance au squelette peptidique, et si l'exposition au solvant ne joue qu'un rôle secondaire. Ceci est en accord avec les résultats de Serge Dellerue et al. [91]. En comparant expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons et simulation de dynamique moléculaire, les auteurs ont en effet montré, pour la C-phycoyanine, qu'il existait de grandes différences de dynamique (aussi bien au niveau de Γ_{int} que de l'EISF), entre les protons de la chaîne polypeptidique et les protons des chaînes latérales des résidus. Ils ont également montré que la distance au centre de masse (et donc l'appartenance à l'intérieur ou à la surface) influait également sur la dynamique des atomes, à nouveau au niveau de Γ_{int} et de l'EISF, mais dans des proportions moindres.

4.2.8 Densité d'états vibrationnels

La figure 4.27 présente les densités d'états vibrationnels de l'apo-calmoduline, $G(\omega) \equiv g(\omega)$, à 288 K et 343 K, soit dans l'état natif, et dans l'état déplié. Cette figure présente également la densité d'états du tampon à 288K, dans les mêmes unités arbitraires. La densité d'états du solvant est donc environ deux fois plus élevée que celle de la protéine. Ce rapport signal/bruit de 50% n'est certes pas idéal, mais est hautement raisonnable. On peut remarquer que la bande à 50 meV du solvant semble bien soustraite : on ne voit ni "creux" ni "bosse" dans les spectres de la protéine à cette énergie. On peut en outre constater, au regard de la figure 4.21 que l'intensité élastique est bien linéaire autour de $Q = 1,9 \text{ \AA}^{-1}$ ($Q^2 = 3,6 \text{ \AA}^{-2}$). Le solvant présentant un pic très intense à cette valeur, ceci indique que le signal du solvant est correctement soustrait. L'intensité élastique du solvant à $Q = 1,9 \text{ \AA}^{-1}$ étant 4 fois plus élevée que celle du solvant, une mauvaise soustraction serait immédiatement visible. Ainsi rassurés sur la qualité de la soustraction, et la réalité du signal présenté dans la figure 4.27.A, nous pouvons passer à l'interprétation de ces spectres.

Le spectre de la protéine présente deux bandes : la première à 8 meV, la deuxième autour de 30 meV. Cette première bande très large, autour de 8 meV (ou 65 cm^{-1}) a été vue en simulation sur la myoglobine [92], et par diffusion de neutrons sur la dihydrofolate réductase [93]. La bande à 30 meV (240 cm^{-1}) est intéressante, car elle est très amortie à 288 K, mais devient nettement plus visible à 343 K. Cette bande correspondrait bien à la bande de torsion des méthyles, donnée à 29 meV

par Drexel et al. [94], dans le cas de la polyalanine. Ainsi donc, les mouvements de libration des méthyles des chaînes latérales semblent moins contraints dans l'état déplié de l'apo-calmoduline que dans l'état natif. Ceci rejoint les résultats précédemment exposés, à savoir l'augmentation du volume exploré par les protons et surtout de la polydispersité de ces mêmes volumes.

4.2.9 Mouvements globaux - Diffusion de translation

Concernant maintenant la diffusion de translation, des mesures de diffusion de lumière [95] ont donné un rayon hydrodynamique de 2.5 nm pour l'apo-calmoduline native. Ceci n'est pas très différent du rayon de sphère équivalent au rayon de giration, $R = \sqrt{5/3} * R_g = \sqrt{5/3} * 1,9 = 2,4$ nm. D'après la relation de Stokes-Einstein ($D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$), ceci conduit à un coefficient de diffusion $D = 5,9.10^{-7}$ cm²/s à 15°C (viscosité du D₂O à 15°C : $\eta_{D_2O} = 1,4365$ cP), en bon accord avec la valeur de $6,5.10^{-7} \pm 0.4$ cm²/s que nous trouvons (voir figure 4.25 et tableau 4.3). A haute température, nous avons obtenu un rayon de giration d'environ 3.2 nm. Pour une chaîne polymère gaussienne, cela correspond à un rayon hydrodynamique de 2.6 nm ($R_g/R_h = 1,241$ [96]). Ceci donne, à 70°C, un coefficient de diffusion $D = 19.10^{-7}$ cm²/s. L'accord avec les données expérimentales ($D = 44.10^{-7}$ cm²/s) est nettement moins bon qu'à 15°C (cet accord à 15°C est d'ailleurs assez surprenant, compte tenu de la résolution de l'expérience). Ceci est cependant assez logique. En effet, la relation $R_g/R_h = 1,241$ utilisée pour calculer le rayon hydrodynamique est valable pour une chaîne gaussienne ; or l'apo-calmoduline dépliée n'est pas tout à fait une chaîne gaussienne. De plus, si l'hypothèse de découplage des mouvements globaux et internes, à la base du modèle de l'équation 2.100, est assez bien justifiée pour des protéines compactes ; elle l'est un peu moins pour des objets de type polymère (objets hautement flexibles, et dont on ne peut pas vraiment considérer qu'ils diffusent comme des objets "rigides").

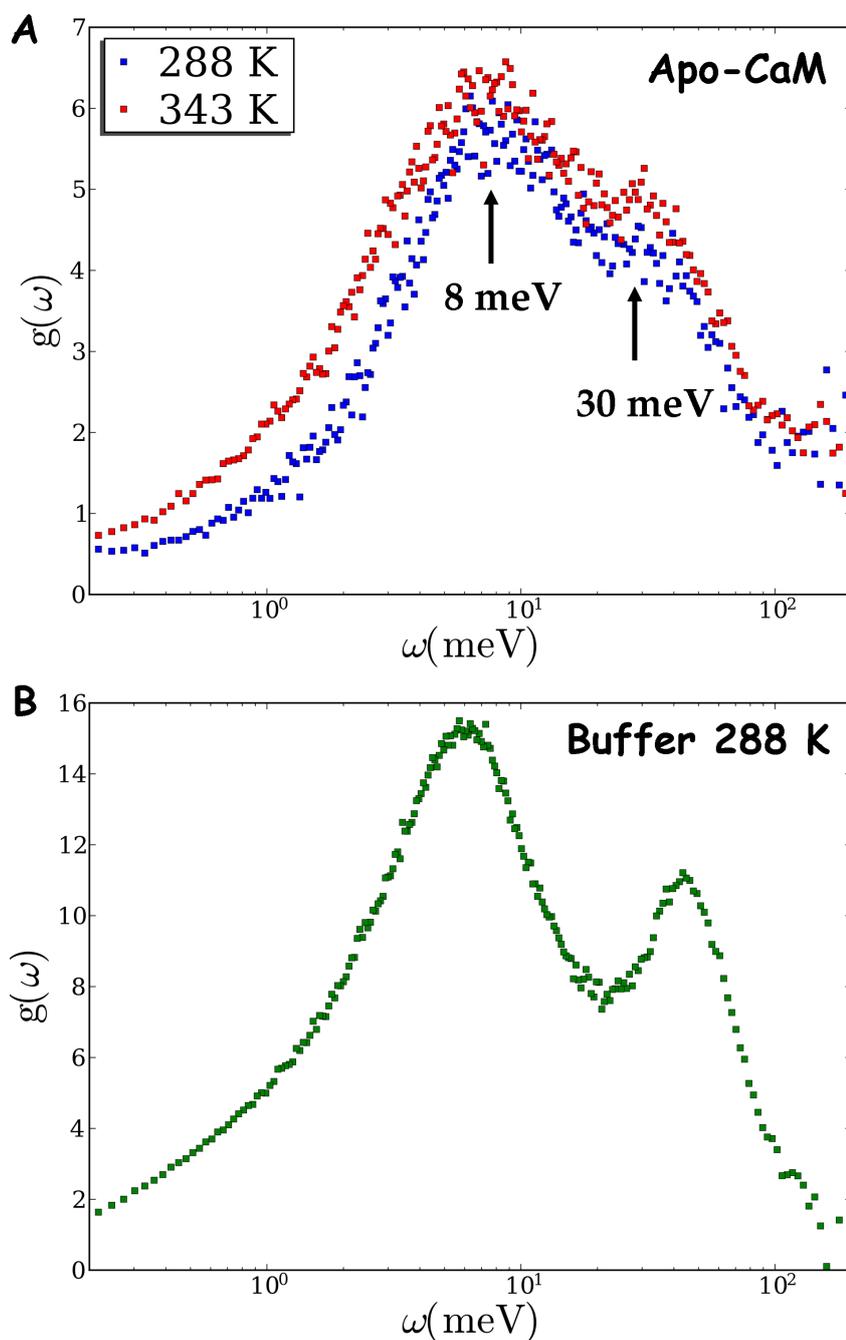


FIG. 4.27 – A. Densité d'états vibrationnels, $G(\omega) \equiv g(\omega)$, de l'apo-calmoduline à 15°C (en bleu) et 70°C (en rouge) (288 K et 343 K). B. Densité d'états du tampon D_2O à 288K, en vue de comparaison. On peut remarquer que la bande à 50 meV du tampon semble bien soustraite sur les spectres de la figure A. Les densités d'états ont été calculées avec le programme de Jean-Marc Zanotti (QENSH), conformément à l'équation 2.112. La bande à 30 meV (240 cm^{-1}) semble correspondre à la bande de torsion des méthyles. Elle très amortie dans l'état natif ; mais apparaît nettement dans l'état déplié. Ceci corrobore donc la diminution du confinement des chaînes latérales observé auparavant. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB).

4.2.10 Résumé

Pour résumer, la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline, transition structurale, s'accompagne d'une transition dynamique (visible sur les $\langle u^2 \rangle$). Alors que dans l'état natif, à 15°C, seuls 44% des protons apparaissent comme mobiles à une résolution de 180 μeV (FWHM), quasiment tous les protons (entre 92% et 98%) le deviennent à 70°C, quand la protéine est dépliée. Cette augmentation du nombre de protons mobiles s'accompagne d'une légère augmentation du volume de confinement des atomes (de $13,8 \pm 0.3 \text{ \AA}^3$ à $16,6 \pm 0.3 \text{ \AA}^3$). Mais également d'une diminution du volume de confinement "le plus représenté" ou "le plus probable"; ainsi que d'une augmentation d'un facteur 30 de l'indice de polydispersité des volumes explorés. Cette explosion de la polydispersité implique que le facteur principal déterminant la dynamique des atomes de l'apo-calmoduline n'est pas l'exposition au solvant des résidus, ou leur appartenance au coeur ou à la surface de la protéine, mais la distance de ces atomes au squelette peptidique. L'exposition au solvant ne jouant qu'un rôle secondaire. Ceci est en accord avec les résultats obtenus pour la C-phycocyanine par Serge Dellerue [91], grâce à une comparaison entre simulations de dynamique moléculaire et expériences de diffusion quasi élastique de neutrons dans l'état natif.

Chapitre 5

La dénaturation sous pression de la calmoduline

Nous nous sommes jusqu'ici intéressés à la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline. Du point vue de structural, il est apparu que le "chemin" de dénaturation thermique devait comprendre des états intermédiaires. Cependant, la présence de ces états intermédiaires n'a été détectée que de manière très indirecte. L'utilisation de la pression offre un moyen supplémentaire de mettre en évidence la présence d'états intermédiaires, et la déviation par rapport à une transition "à deux états".

En effet, dans le cadre de transitions "à deux états", les diagrammes de phase doivent être elliptiques (voir partie 1.4.3), comme représenté par le schéma de la figure 5.1 ; et les chemins de dénaturation thermique et sous pression doivent être identiques. Avec, bien entendu des états identiques, mais également des stabilités identiques (ΔG_0). Cette symétrie ne peut être brisée que par la présence d'états intermédiaires. L'utilisation de la pression va donc permettre de comparer les ΔG_0 obtenus par une même technique, en température et en pression ; et éventuellement mettre en évidence la présence d'états intermédiaires de manière beaucoup plus convaincante que la comparaison des ΔG_0 issus de différentes techniques effectuée dans le chapitre précédent.

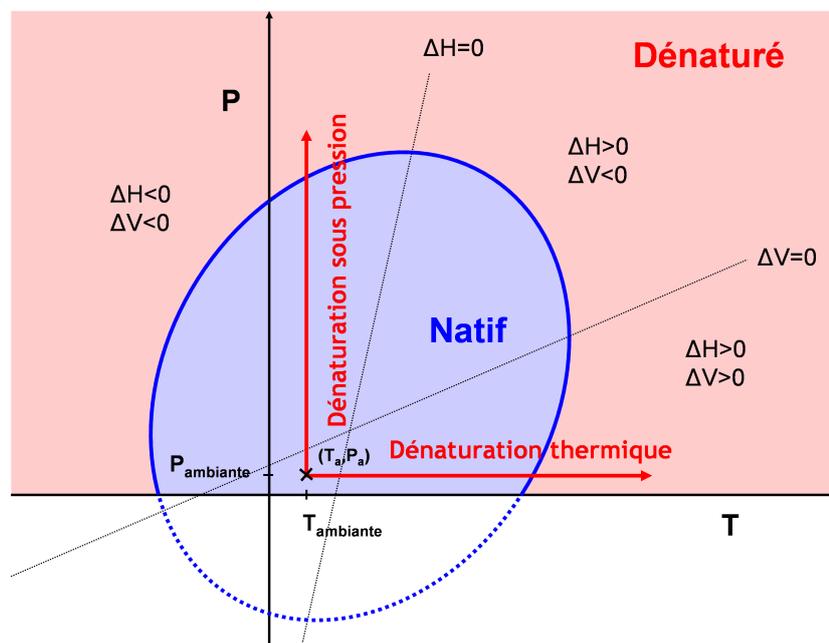


FIG. 5.1 – Diagramme de phase (T,P), pour une protéine se dénaturant selon un mécanisme "à deux états", natif (en bleu) et dénaturé (en rouge). Figure issue de [51]. Les chemins de dénaturation thermique et de dénaturation sous pression sont représentés par les flèches rouges. Si le modèle "à deux états" s'applique, le diagramme de phase doit être elliptique, et les chemins de dénaturation en température et sous pression doivent être identiques.

Ceci est donc la première raison de l'utilisation de la pression. La deuxième est que nous espérons ainsi pouvoir comparer les chemins de dénaturation des formes apo et holo de la calmo-

duline. Chose impossible en utilisant la température, la forme holo de la calmoduline étant stable jusqu'à 100°C. Le dernier avantage de la pression concerne l'étude de la dynamique interne des états dénaturés, et sa comparaison avec celle de l'état natif. En effet, la dynamique étant par nature très dépendante de kT , la température n'est pas le paramètre le plus pertinent pour ce type d'étude.

Toutes les mesures présentées dans cette partie ont été effectuées en D₂O.

5.1 Aspects structuraux et thermodynamiques

5.1.1 Apo et holo calmoduline

Un des buts de l'utilisation de la pression est la comparaison des stabilités des formes apo et holo. Avant de comparer les stabilités de ces deux formes, il est utile de comparer leurs conformations natives.

Propriétés de fluorescence - Aspects locaux

Pour commencer, l'ANS (une sonde hydrophobe) ne fluoresce pas de la même façon en présence des deux formes de calmoduline. Ceci n'a rien de nouveau et est connu depuis les années 80 [19] (voir partie 1.3.2). Nous retrouvons bien cette différence dans nos expériences. Laporte et al. mentionnent un facteur 27, mais nous n'obtenons qu'un facteur 12. Ce désaccord est sûrement dû au fait que nous travaillons en ANS saturant. Ainsi, le signal de l'ANS libre n'est pas négligeable devant celui de l'ANS lié à l'apo-calmoduline ; ce qui entraîne une surestimation de la fluorescence de l'ANS en présence d'apo-calmoduline. Quoi qu'il en soit, cette différence entre apo- et holo-calmoduline est due à une différence d'exposition des poches hydrophobes (enfouies pour l'apo-calmoduline, et exposées pour l'holo-calmoduline).

Les spectres de fluorescence intrinsèque (tyrosines) des formes apo et holo de la calmoduline sont également différents. Outre un facteur 2 sur l'intensité totale (intégrée) de fluorescence ($\frac{\int IF_{holo}(\lambda)d\lambda}{\int IF_{apo}(\lambda)d\lambda} = 1.9$) ; les deux spectres ne sont pas isomorphes. Ceci est visible sur la figure 5.2, qui présente les spectres de fluorescence intrinsèque normalisés ($\frac{IF(\lambda)}{\int IF(\lambda)d\lambda}$) des formes apo et holo. Le barycentre du spectre de la forme holo est décalé vers les courtes longueurs d'onde ("*blue shift*") par rapport à celui de la forme apo, ce qui signe une différence de au niveau de l'environnement local des tyrosines entre les deux formes de calmoduline. Ceci n'a rien d'étonnant, la fixation du calcium induisant une ouverture des domaines et une rotation des hélices alpha. Cela a pour effet d'exposer les poches hydrophobes à la surface ; mais aussi de modifier l'orientation des tyrosines.

DNPA - Conformation globale

La figure 5.3 présente les spectres DNPA (en représentations de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$) et de Kratky ($Q^2 I = f(Q)$)) de solutions à 10 g/L de calmoduline native sous forme apo et holo. Les

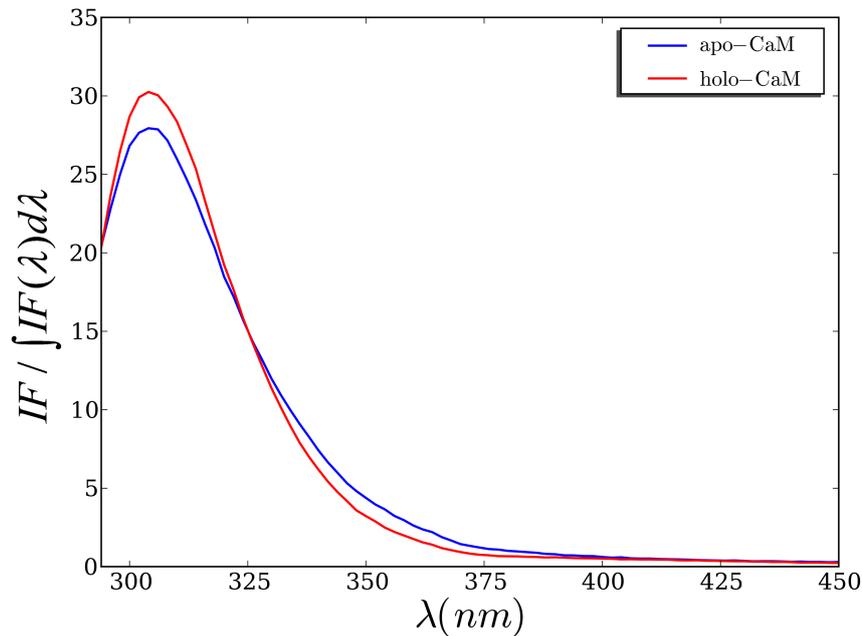


FIG. 5.2 – Spectres de fluorescence intrinsèque normalisés (par l'intégrale) des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. Les spectres des deux formes de calmoduline ne sont pas isomorphes. L'environnement local des tyrosines diffère donc entre les deux formes de calmoduline. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O; la concentration de calmoduline est de 100 μ M (1,65 g/L). La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de CaCl₂.

spectres des deux formes de calmoduline suivent une loi de Porod à grand Q . La forme holo, comme la forme apo, de la calmoduline est donc compacte dans l'état natif. Pour les deux formes, on distingue en représentation de Guinier deux régimes linéaires, signe d'une structure de type "Dumbell" (voir partie 4.1.4). La forme holo a cependant un rayon de giration, R_g , légèrement plus important ($18,6 \pm 0,2 \text{ \AA}$ contre $17,7 \pm 0,2 \text{ \AA}$) ainsi qu'un rayon de giration des domaines isolés, r_g , significativement plus grand ($12,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$ contre $11,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$) que la forme apo. D'un point de vue purement statistique, la différence de rayon de giration est significative. Cependant, ces valeurs ne sont pas des valeurs extrapolées à concentration nulle, mais des valeurs "à 10 g/L". Ce ne sont donc que des valeurs apparentes à une certaine concentration, entachées de l'effet des interactions intermoléculaires.

En ce qui concerne les valeurs de rayon de giration des domaines isolés, ce problème ne se pose pas, comme expliqué dans la partie 4.1.4. En effet, ces valeurs étant déterminées dans une gamme en Q intermédiaire, elles sont indépendantes de la concentration dans un régime de concentration raisonnable (jusqu'à 18 g/L au moins). En faisant abstraction des effets de concentration, on obtient les paramètres du "dumbell" récapitulés dans le tableau 5.1. L'augmentation d' $1,5 \text{ \AA}$ du rayon de giration des domaines isolés est cohérente avec "l'ouverture" des domaines induite par la fixation du calcium (visible sur les structures cristallographiques de l'holo-calmoduline). Cepen-

dant, l'augmentation du rayon de giration ne semble pas due à une augmentation de la distance interdomaine, mais uniquement à la dilatation des domaines. Ceci laisserait supposer que l'état de l'hélice- α centrale (ou "linker central") n'est pas affecté par la fixation du calcium. Toutefois, il faudrait procéder à des extrapolations à concentration nulle pour pouvoir être affirmatif quant à ce point.

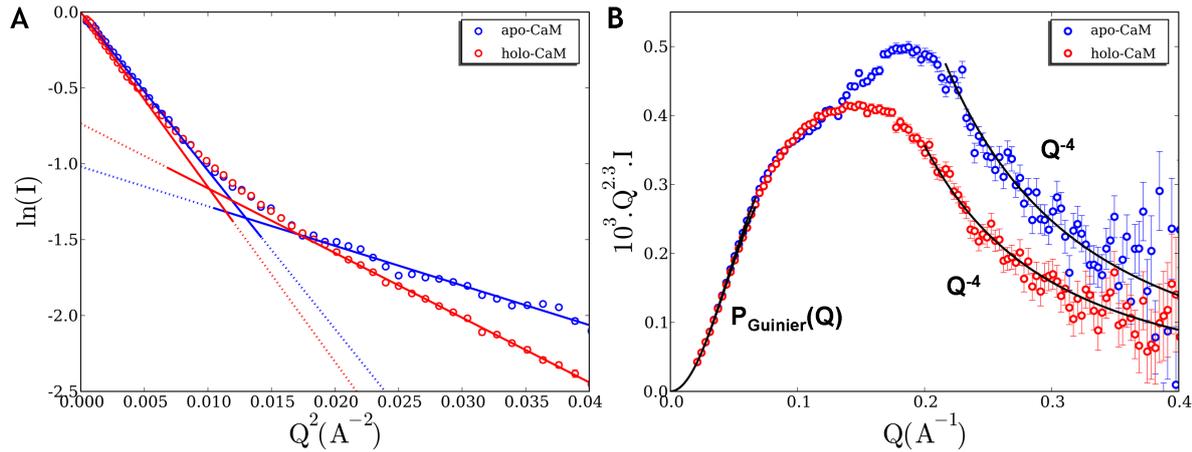


FIG. 5.3 – Spectres DNPA, à 10 g/L, en représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$ à gauche (A)) et de Kratky ($Q^2 I = f(Q)$ à droite, (B)) des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline native. La représentation de Kratky indique clairement que les deux formes sont compactes (loi de Porod "à grand Q", i.e. décroissance en Q^{-4}), mais ont des surfaces spécifiques différentes (donnée par la "hauteur" du Q^{-4} , i.e. par le préfacteur du Q^{-4}). Les deux formes de calmoduline ont des rayons de giration, R_g (donnés par les pentes "à petit Q" en représentation de Guinier), mais également des rayons de giration des domaines isolés, r_g (donnés par les pentes "à grand Q" en représentation de Guinier), différents. Les valeurs de rayon de giration sont reportées dans le tableau 5.1. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL)..

	R_g	r_g	d
Apo-calmoduline native	$17,7 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,1$	$26,9 \pm 0,7$
Holo-calmoduline native	$18,6 \pm 0,2$	$12,9 \pm 0,1$	$26,8 \pm 0,7$

TAB. 5.1 – Paramètres, en Å, issus de la méthode de Fujisawa pour les formes apo et holo de la calmoduline native, à 10 g/L. Il semble que la distance interdomaine, d , soit identique pour les deux formes de calmoduline. Le rayon de giration des domaines isolés, lui, est significativement différent. Les domaines de la forme holo de la calmoduline sont plus "ouverts" que ceux de la forme apo. Ceci correspond bien aux structures RMN en solution des deux formes. Cette ouverture des domaines de la forme holo permet l'exposition des poches hydrophobes. Les valeurs du tableau sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.3.

5.1.2 Aspects thermodynamiques de la dénaturation sous pression - Fluorescence

Fluorescence intrinsèque - Décalages spectraux ?

La figure 5.4 présente les spectres de fluorescence intrinsèque (tyrosines) des formes apo et holo de la calmoduline pour plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 6800 bar. On remarque tout d'abord une diminution de l'intensité de fluorescence avec la pression, plus marquée pour la forme holo que pour la forme apo. La fluorescence native de la forme holo étant nettement supérieure à celle de la forme apo, cela n'a rien de surprenant. La fluorescence des tyrosines des formes apo et holo deviennent comparables à haute pression, ce qui est logique si les deux formes sont dépliées à ces pressions.

En regardant attentivement les courbes, il semble que l'on puisse distinguer un léger "red-shift" pour la forme apo, et un très léger "blue-shift" pour la forme holo. Ces décalages spectraux sont cependant trop faibles pour être exploités de manière crédible, compte tenu de l'imprécision des courbes, due aux conditions expérimentales (cellule pression). On peut toutefois garder à l'esprit cette asymétrie de comportement sous pression des formes apo et holo. Nous y reviendrons par la suite.

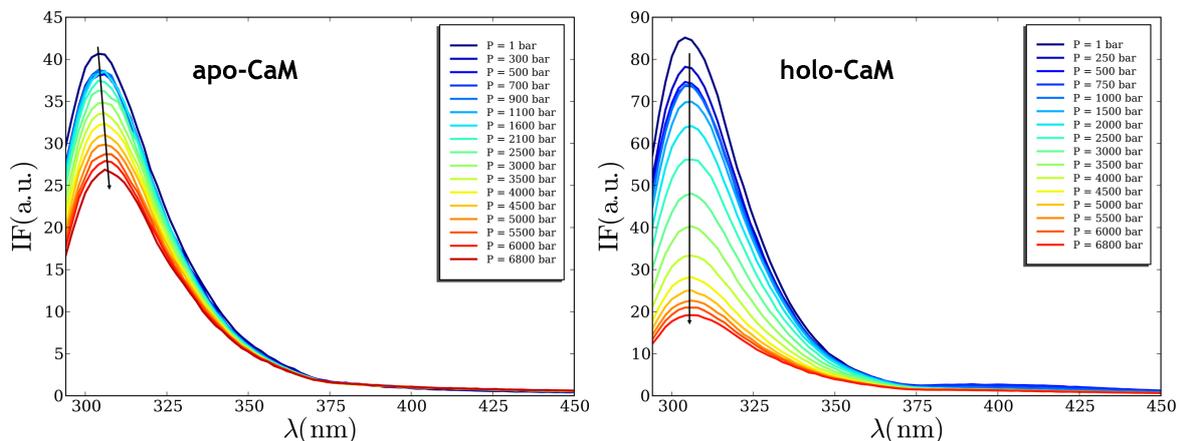


FIG. 5.4 – Spectres de fluorescence intrinsèque des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de la calmoduline pour plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 6800 bar. La fluorescence intrinsèque des deux formes de calmoduline diminue avec la pression. La diminution est plus marquée pour la forme holo ; mais la fluorescence de la forme holo est plus forte que celle de la forme apo, dans l'état natif. La fluorescence des tyrosines des formes apo et holo deviennent comparables à haute pression, ce qui est logique si les deux formes sont dépliées à ces pressions. Il semble que l'on puisse distinguer un léger "red-shift" pour la forme apo, et un très léger "blue-shift" pour la forme holo. Bien que ces décalages soient trop faibles pour être exploités, on peut garder cette asymétrie de comportement à l'esprit ; elle apparaîtra plus clairement par la suite. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline est de 100 μ M (1,65 g/L). La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de $CaCl_2$. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression de Gaston Hui Bon Hoa, présenté dans l'annexe B.2.

Fluorescence intrinsèque - Une transition "à deux états"

Pour augmenter la statistique, nous travaillerons par la suite avec l'intensité intégrée de fluorescence, $\int IF(\lambda)d\lambda$. Les courbes de transition sous pression semblent correspondre à des transitions "à deux états", et ont donc été analysées selon la méthode décrite partie 1.4.2. Le logarithme de la constante d'équilibre ($K(P) = \frac{\int IF(\lambda,P)d\lambda - \int IF_N(\lambda)d\lambda}{\int IF_D(\lambda)d\lambda + \int IF(\lambda,P)d\lambda}$) obtenue à chaque pression est tracé dans la figure 5.5, pour les deux formes de calmoduline. On obtient bien des comportements linéaires ; ce qui nous permet de nous rassurer quant à la validité de l'approximation consistant à négliger la variation de compressibilité $\Delta\beta$ (voir également partie 1.4.2). Il apparaît immédiatement que les deux formes de calmoduline ont des pressions de demi-dénaturation très proches, les deux courbes se croisant près de $\ln K = 0$ (en effet $\ln K = 0 \Rightarrow K = 1 \Rightarrow [D] = [N]$; et la pression de demi-dénaturation est la pression pour laquelle les populations natives et dénaturées sont égales). Les volumes d'activations, ΔV , des deux formes sont cependant sensiblement différents : $\frac{\Delta V^{holo}}{\Delta V^{apo}} \approx 2$. Les paramètres obtenus sont résumés dans le tableau 5.2. Les courbes de transition en représentation classique sont représentées sur la figure 5.6.

La comparaison des stabilités issues des mesures de fluorescence intrinsèque en pression et en température pour la forme apo est intéressante. Il apparaît en effet que ces stabilités sont significativement différentes : $4,2 \pm 0,5$ kJ/mol contre $7,5 \pm 0,8$ kJ/mol. Ceci signe encore une fois la présence d'états intermédiaires dans le dépliement de la forme apo.

	$P_{1/2}(bar)$	$\Delta V(ml.mol^{-1})$	$\Delta G_0(kJ.mol^{-1})$	$\Delta G_{25^\circ C}(kJ.mol^{-1})$
Apo-calmoduline	3086 ± 20	-13 ± 2	$4,2 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,8$
Holo-calmoduline	2860 ± 10	-27 ± 1	$7,7 \pm 0,2$	-

Tab. 5.2 – Paramètres thermodynamiques des modèles à deux états issus des courbes de transition de fluorescence intrinsèque (figures 5.5 et 5.6). La dernière colonne, $\Delta G_{25^\circ C}$ correspond aux stabilités issues des courbes de transition en fonction de la température (chapitre précédent). Les deux formes de calmoduline ont des pressions de demi-dénaturation très proches, d'environ 3000 bar ; mais leurs volumes d'activation diffèrent d'un facteur 2 (voir tableau 5.2). Ceci donne des stabilité très différentes. Toutefois, la comparaison de la stabilité issue de l'analyse de la courbe de transition en fonction de la pression avec celle issue de l'analyse de la courbe de transition en température montre clairement que le modèle "à deux états" ne tient pas (dans le cadre du modèle "à deux états", on devrait obtenir des stabilités identique ; il y a une différence d'un facteur deux).

Fluorescence intrinsèque - Transition à basse pression ?

Les courbes de transition de la figure 5.6 ont été analysées à l'aide de modèles "à deux états". Il apparaît cependant une autre transition, de très faible amplitude, à très basse pression (sur les premiers points). Il est malheureusement impossible d'affirmer qu'il s'agit bien d'une transition "physique", et non pas d'un artefact de mesure. En effet, à basse pression il peut y avoir un petit "jeu" au niveau des fenêtres de la cellule pression. Dans les cellules pression, l'étanchéité est assurée par

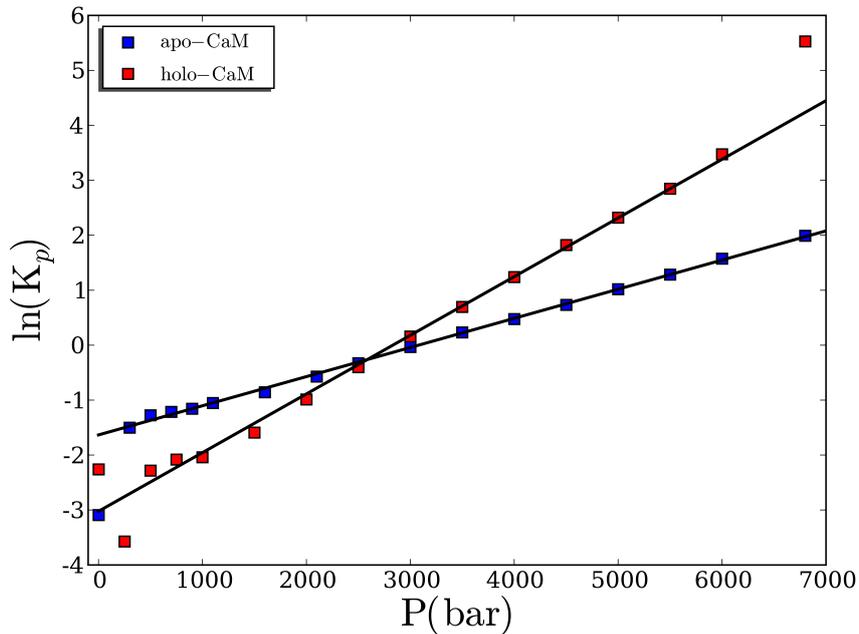


FIG. 5.5 – Logarithme des constantes d’équilibre pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline en fonction de la pression. En noir, ajustements linéaires. La pente de ces droites donne la différence de volume, ou volume d’activation, ΔV ; leur intersection avec la droite $\ln K = 0$ donne la pression de demi-dénaturation. Les deux formes de calmoduline ont des pressions de demi-dénaturation très proches, d’environ 3000 bar. Elles ont cependant des volumes d’activation différent d’un facteur 2 (voir tableau 5.2). Les valeurs de constante d’équilibre sont issues de l’analyse des courbes de la figure 5.4.

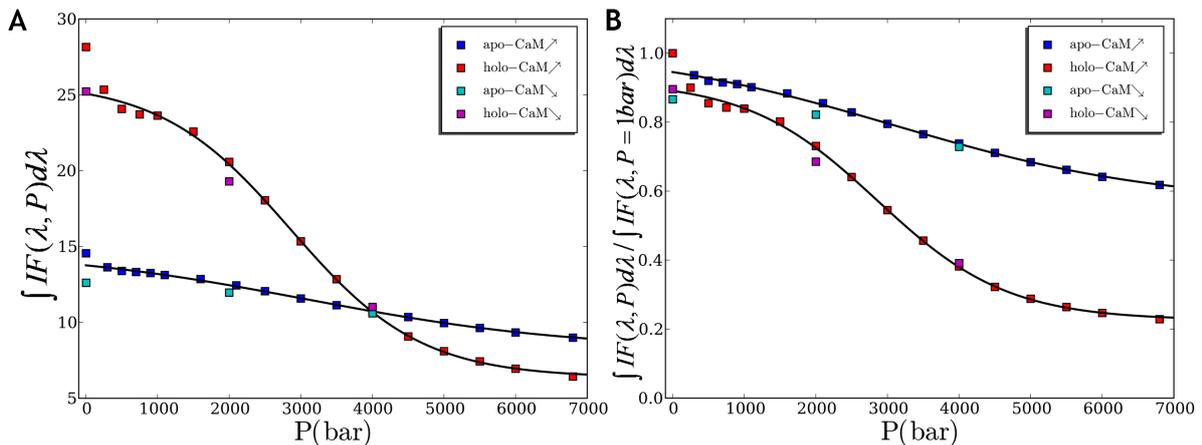


FIG. 5.6 – Variations absolues (à gauche) et relatives (à droite) de l’intensité de fluorescence ($\int IF(\lambda, P)d\lambda$) en fonction de la pression, pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. Les flèches dans la légende indiquent les montées et descentes en pression. En noir, modèle "à deux états". Le dénaturation sous pression de la forme holo semble réversible ; pas celle de la forme apo. Les valeurs d’intensité intégrée de fluorescence sont issues de l’analyse des courbes de la figure 5.4.

le fait que les fenêtres sont plaquées sur les joints par la force de pression, et par l'écrasement des dits joints. La fluorescence intrinsèque des tyrosines étant faible, un léger mouvement des fenêtres peut induire une variation mesurable du signal. Nous avons répété ces expériences, et avons toujours retrouvé ces légères transitions. Cela ne veut cependant pas dire qu'elles sont "physiques". Ce genre de transitions n'a d'ailleurs pas été observé lors des expériences de fluorescence de l'ANS, pour lesquelles le signal est bien plus important. Il nous est donc impossible de conclure quant à ceci, et, dans la mesure où ces transitions sont de toute manière trop faibles en amplitude, et concernent un domaine de pression trop réduit pour être ajustées, il en a été fait abstraction pour les ajustements.

Fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline - Une transition "à trois états"

La fluorescence intrinsèque donne une information très locale, et concernant le domaine C-terminal uniquement. Il est intéressant de disposer d'une information plus globale. Malheureusement, dichroïsme circulaire et pression ne sont pas très compatibles. En effet, les cellules pression adaptées aux techniques optiques utilisent des fenêtres très épaisses (~ 1 cm) en cristaux transparents, généralement en saphir. Or, la pression modifie de manière non négligeable les axes cristallins de ces fenêtres, et peut donc modifier leur signal dichroïque. Ceci rend donc toute soustraction délicate. Nous nous sommes donc tournés vers la fluorescence de sondes extrinsèques, et plus particulièrement de l'ANS. L'ANS est une sonde hydrophobe, c'est à dire une sonde qui ne fluoresce pas dans l'eau ou en milieu polaire ; mais qui fluoresce fortement quand elle se trouve dans un milieu apolaire (éthanol, dioxane, poches hydrophobes de protéines). Elle est couramment utilisée dans l'étude du dépliement des protéines car elle permet d'étudier la structuration de poches hydrophobes, quand elles existent ; mais également l'accessibilité au solvant du coeur hydrophobe [97, 98].

L'intensité de fluorescence de l'ANS, en présence des deux formes de calmoduline (apo et holo) est tracée en fonction de la pression sur la figure 5.7. Pour les deux formes, l'évolution de l'intensité de fluorescence de l'ANS n'est pas monotone. Ceci implique la présence d'états intermédiaires dans le dépliement. Il peut bien évidemment en exister plusieurs ; mais il en existe au moins un, avec un maximum de peuplement autour de 3000 bar pour les deux formes de calmoduline. On peut encore une fois constater des comportements opposés pour les deux formes de calmoduline : diminution puis augmentation de la fluorescence pour la forme apo, et augmentation puis diminution pour la forme holo.

5.1.3 Conformation des états intermédiaires - DNPA

La présence de ces états intermédiaires permet de conclure définitivement quant à la validité du modèle à deux états pour le dépliement de la calmoduline. Nous ne disposons cependant jusqu'à présent que d'une information très limitée sur les chemins de dépliement sous pression, et surtout sur la nature de ces états intermédiaires. Une information structurale apparaît donc nécessaire.

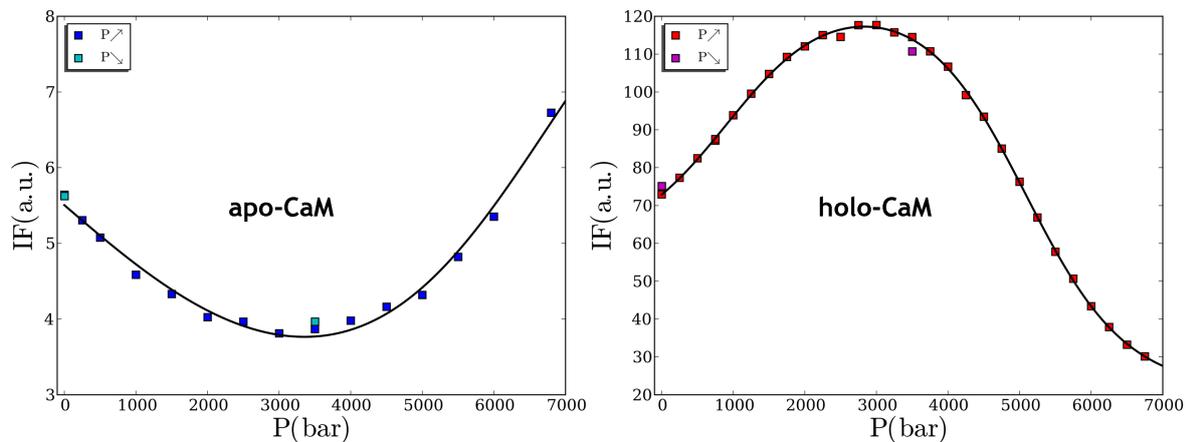


FIG. 5.7 – Intensité de fluorescence de l'ANS, en présence des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de calmoduline. En noir, ajustements de modèles "à trois états". Pour les deux formes, les courbes présentent un extremum, autour de 3000 bar. Ce comportement non monotone de la fluorescence sous pression est incompatible avec une dénaturation "à deux états", que laissaient supposer les expériences de fluorescence intrinsèque sous pression (voir figures 5.5 et 5.6). On peut également constater des comportements opposés pour les deux formes de calmoduline : diminution puis augmentation de la fluorescence pour la forme apo, et augmentation puis diminution pour la forme holo. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline est de 30 μ M (0,5 g/L), celle d'ANS de 200 μ M. La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression de Gaston Hui Bon Hoa, présenté dans l'annexe B.2.

Nous avons donc effectué des mesures de DNPA sous pression. Nous n'avons malheureusement pas pu aller jusqu'à 7000 bar ; nous avons été limités à 2500 bar. Ceci ne nous a donc pas permis d'étudier la conformation des états dépliés sous pression et de la comparer à celle des états dépliés en température, objectif important de cette thèse. Ces expériences nous ont cependant permis d'obtenir des informations intéressantes quant à la nature de ces états intermédiaires. Nous avons toutefois mis au point une deuxième cellule pression, à géométrie plane, permettant d'atteindre des pressions plus élevées ; et des expériences sur D22 (ILL) sont prévues.

Etats intermédiaires compacts

Les spectres DNPA obtenus à plusieurs pressions, entre 1 bar et 2800 bar, sont tracés en représentations de Kratky d'une part, de Guinier et de Fujisawa d'autre part, sur les figures 5.8 et 5.9. Il apparaît immédiatement, au vu des représentations de Kratky, que les deux formes de calmoduline restent compactes jusqu'à 2500 bar ; tous les spectres suivant des lois de Porod à grand Q. Il est donc possible d'affirmer que les états intermédiaires observés précédemment sont des états compacts. Les spectres DNPA des deux formes de calmoduline présentent deux régimes linéaires en représentation de Guinier, et présentent un régime linéaire dans un domaine en Q intermédiaire en représentation de Fujisawa ; et ce, à toutes les pressions. Il semble donc que ces états intermédiaires aient des conformations "Dumbell", comme les états natifs des deux formes.

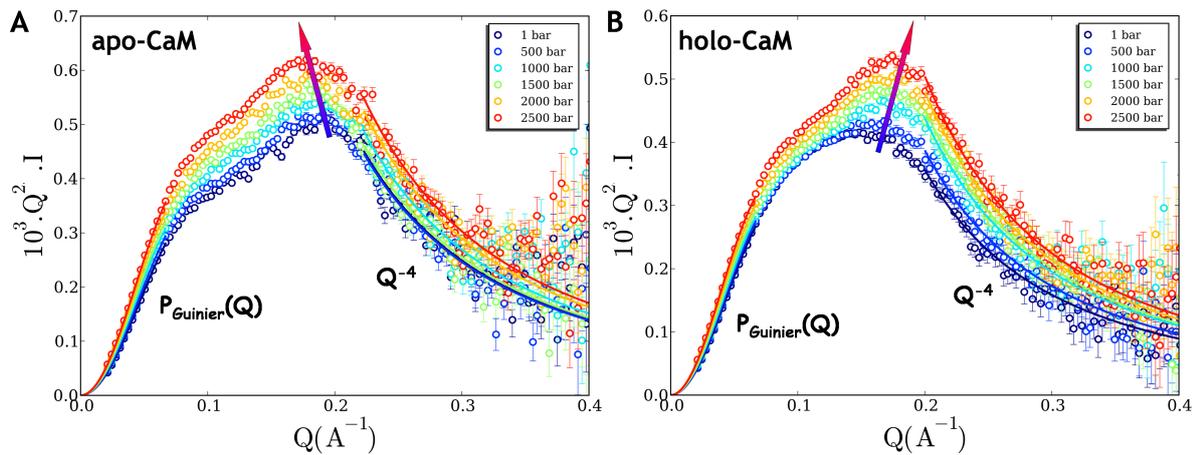


FIG. 5.8 – Représentation de Kratky ($Q^2I = f(Q)$) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (à gauche) et holo (à droite) à plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 2500 bar. En traits pleins, lois limites de Guinier (à petit Q) et de Porod (à grand Q). Ces formes limites, respectant les conditions d'autocohérence, indiquent que les deux formes de calmoduline restent compactes quelle que soit la valeur de pression, jusqu'à 2500 bar. Les états intermédiaires vus en fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline (voir figure 5.7) sont donc compacts. Les deux flèches en dégradé de couleur matérialisent le déplacement du pic "à grand Q " (à petit Q , on n'a pas un pic, mais un épaulement), pour les deux formes. Ce pic "à grand Q ", correspond donc à de "petites" échelles. La position de ce pic est donc liée à la taille des domaines. Avec la pression, ce pic se décale vers les petites valeurs de Q pour la forme apo, et vers les grandes valeurs de Q pour la forme holo. Sous pression, la taille des domaines augmente donc pour la forme apo ; elle diminue pour la forme holo. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de $CaCl_2$. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL)..

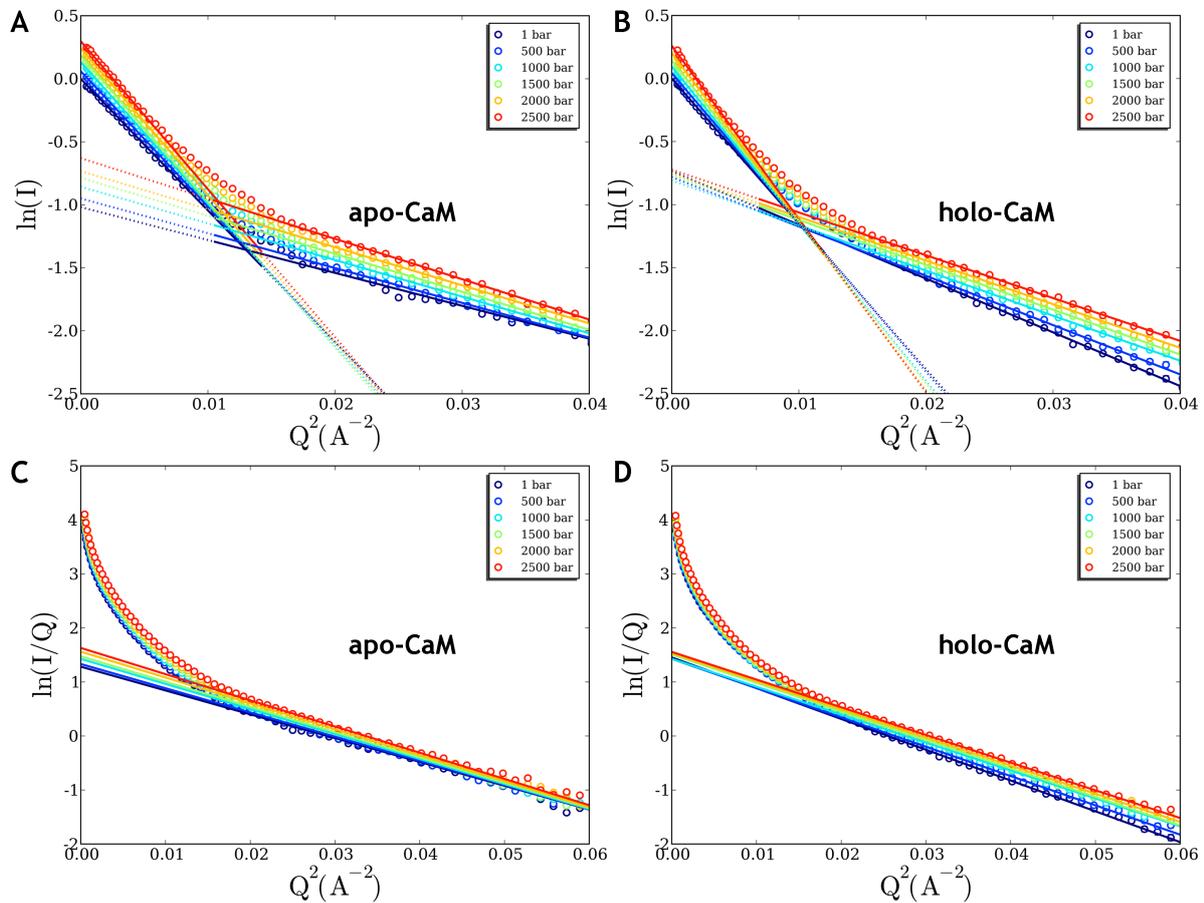


FIG. 5.9 – Représentations de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$, en haut) et de Fujisawa ($\ln I/Q = f(Q^2)$, en bas) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (à gauche) et holo (à droite) à plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 2500 bar. En traits pleins, ajustements linéaires. Les spectres des deux formes de calmoduline présentent deux régimes linéaires en représentation de Guinier, quelle que soit la valeur de pression, jusqu'à 2500 bar. Les deux formes de calmoduline conservent donc une structure "dumbell" sous pression. Ceci implique que les états intermédiaires vus en fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline (voir figure 5.7) ont, comme les formes natives, une structure "dumbell". Cette structure "dumbell" est confirmée par les régimes linéaires en représentation de Fujisawa. On retrouve également le comportement opposé des deux formes de calmoduline concernant le rayon de giration des domaines isolés, r_g , sous pression (r_g est donné par la pente du régime linéaire "à grand Q "), visible en représentation de Kratky 5.8. La pente du régime "à petit Q " en représentation de Guinier, elle, augmente avec la pression pour les deux formes. Le rayon de giration des deux formes de calmoduline augmente donc sous pression. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de $CaCl_2$. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL)..

Asymétrie de comportement apo/holo calmoduline

On peut voir sur les figures 5.9.A et 5.9.B que pour les deux formes de calmoduline le rayon de giration, donné par les pentes "à petit Q", augmentent avec la pression. Il en va autrement pour le rayon de giration des domaines isolés, relié aux pentes "à grand Q". Il augmente pour la forme apo, mais diminue pour la forme holo. Ceci est également visible en représentation de Kratky (voir figure 5.8). Dans cette représentation, la position du pic "à grand Q", correspondant donc "à de petites échelles", est reliée à la taille des domaines isolés. Il est très net que ce pic se déplace vers les petites valeurs de Q pour la forme apo, et vers les grandes valeurs de Q pour la forme holo. La représentation de Fujisawa (voir figure 5.9.C et 5.9.D) permet d'être plus quantitatif : les pentes des régimes linéaires autour de $Q = \frac{2\pi}{d}$ donnent accès au rayon de giration des domaines isolés. Les rayons de giration isolés ainsi obtenus, ainsi que les distances interdomaines (calculées en utilisant l'équation 2.59) sont reportés sur la figure 5.10. On retrouve bien sûr le comportement opposé des deux formes de calmoduline concernant le rayon de giration des domaines isolés. Ces valeurs de r_g sont assez fiables, car elles dépendent peu de la concentration (voir partie 4.1.4). Quant à l'augmentation du rayon de giration notée plus haut, elle se traduit par une augmentation conséquente de la distance interdomaine. Ces valeurs de distance interdomaine sont, elles, fortement dépendantes de la concentration. Ces valeurs n'étant pas extrapolées à concentration nulle ; elles sont à manipuler avec précaution. Il est cependant intéressant de noter que la distance interdomaine pour les deux formes de calmoduline sont égales à pression ambiante. Ceci semblerait aller contre l'idée que la conformation de la forme holo est plus "ouverte" que celle de la forme apo. Toutefois, sans extrapolations à concentration nulle, il est impossible de conclure quant à ceci d'une manière sûre.

Volumes spécifiques et compressibilité

Il est possible, pour une solution idéale, de calculer le volume spécifique d'une macromolécule, connaissant sa masse molaire et sa densité de longueur de diffusion, à partir de l'intensité diffusée à l'origine (l'intensité à l'origine est généralement extrapolée à $Q = 0$ à l'aide de la forme limite appropriée, loi de Guinier ou de Debye par exemple). En effet :

$$I(Q = 0) = \frac{Mc}{N_A} \left[\langle \rho_p \rangle - \rho_s \right]^2 v_p \quad (5.1)$$

d'où :

$$v_p = \frac{\sqrt{\frac{I(Q=0)N_A}{Mc}}}{\langle \rho_p \rangle - \rho_s} \quad (5.2)$$

Pour une solution réelle, ceci n'est vrai que pour l'intensité extrapolée à concentration nulle. En utilisant l'intensité à une concentration donnée, le volume spécifique obtenu n'est qu'un volume spécifique apparent. Il est cependant raisonnable de considérer que 10 g/L est une concentration raisonnable pour des solutions de calmoduline à pH = 7,6 avec une force ionique de 130 mM ; et

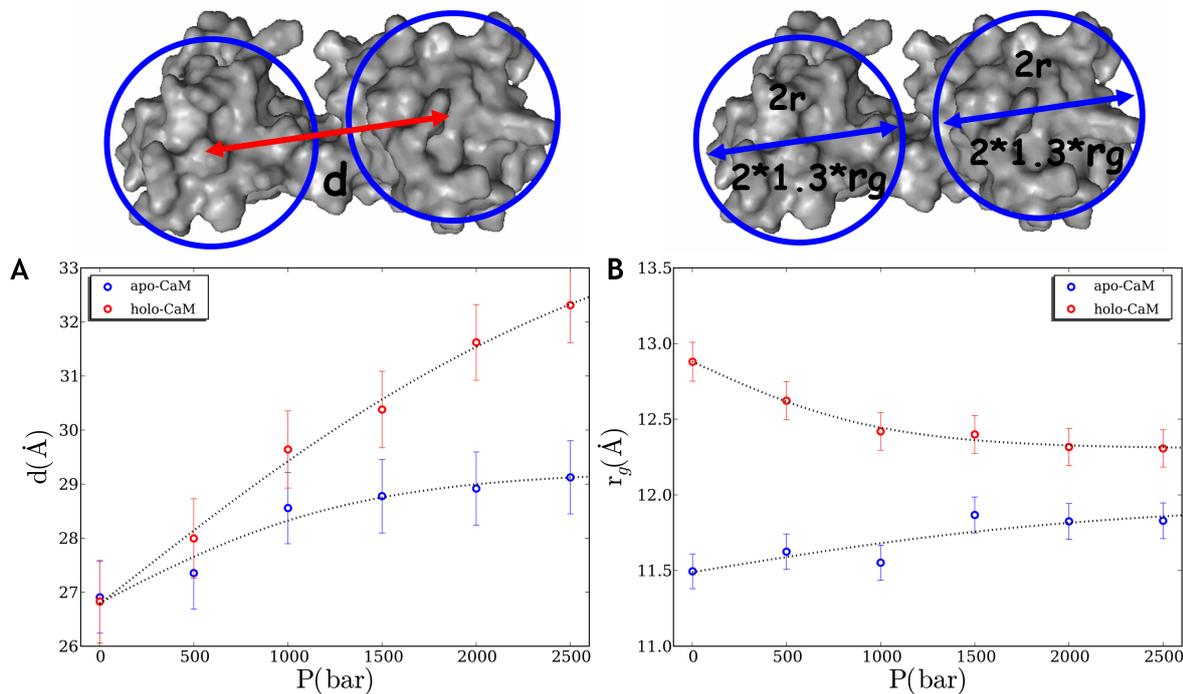


FIG. 5.10 – Distance interdomaine, d , (A) et rayon de gyration des domaines isolés, r_g , (B) en fonction de la pression pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. En pointillés, guides pour les yeux. Pour les deux formes de calmoduline la distance interdomaine augmente avec la pression. Par contre, concernant le rayon de gyration des domaines isolés, les deux formes de calmoduline ont un comportement opposé : augmentation pour la forme apo, et diminution pour la forme holo. Les valeurs de d et r_g sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.9.

que le volume spécifique apparent obtenu à cette concentration ne doit pas être très différent du volume spécifique réel. Ce volume spécifique apparent des deux formes de calmoduline est tracé en fonction de la pression sur la figure 5.11. La variation de volume spécifique apparent avec la pression est plus importante pour la forme holo que pour la forme apo. Ceci est cohérent avec les différences de volumes d'activation observées en fluorescence des tyrosines (voir tableau 5.2). Les courbes en pointillés de la figure 5.11 sont des "ajustements" de compressibilité. Compte tenu du faible nombre de points ; mais surtout du fait qu'il ne s'agit que de volumes apparents, ces courbes ne doivent être prises que comme des guides pour les yeux. Il n'est pas question d'en tirer des valeurs exactes de compressibilité. On peut toutefois noter une tendance à la diminution de la compressibilité avec la pression pour les deux formes. Il semblerait donc que les états intermédiaires sous pression dont il est question dans cette partie aient une compressibilité plus faible que celle des états natifs correspondants.

5.1.4 Réversibilité de la dénaturation sous pression

On peut voir, sur la figure 5.12, que la dénaturation sous pression des deux formes est complètement réversible jusqu'à 2500 bar. En effet, les spectres DNPA à pression ambiante de calmoduline

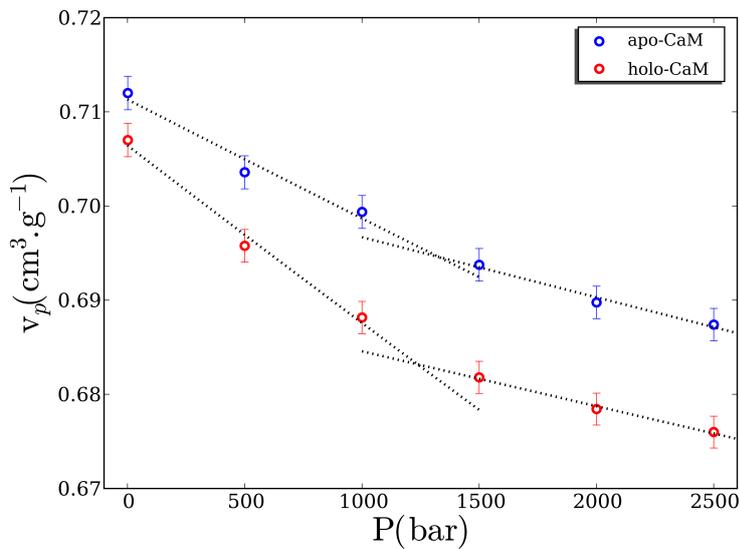


FIG. 5.11 – Volume spécifique apparent à 10 g/L des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline en fonction de la pression. En pointillés, guides pour les yeux : "ajustements" compressibilité. La compressibilité semble diminuer avec la pression. Les états intermédiaires sous pression, dont le maximum de peuplement est atteint autour de 3000 bar, doivent donc avoir une compressibilité plus faible que celle des états natifs correspondants. Les valeurs de v_p sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.9.

native (en bleu sur la figure), et de calmoduline comprimée à 2500 bar (en noir sur la figure) se superposent parfaitement ; et ce, pour les deux formes de calmoduline. Quant à la réversibilité jusqu'à 7000 bar (6800 bar pour être précis), elle semble, vue par fluorescence, très bonne en ce qui concerne la forme holo. Pour la forme apo, la réversibilité semble très bonne en ce qui concerne la fluorescence de l'ANS ; mais il apparaît une irréversibilité non négligeable en fluorescence des tyrosines. Ceci semble indiquer que la protéine se replie, et que les parties hydrophobes de la protéine redeviennent inaccessibles au solvant ; mais que le repliement local n'est pas parfait, au moins au niveau des tyrosines.

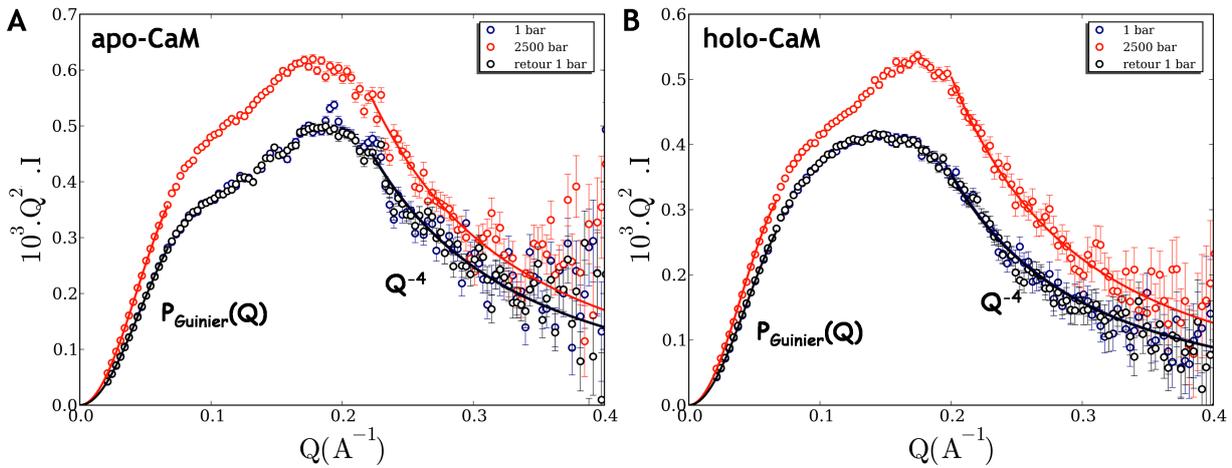


FIG. 5.12 – Représentation de Kratky ($Q^2 I = f(Q)$) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (A) et holo (B) à 1 bar (en bleu), 2500 bar (en rouge), et après retour à pression ambiante (en noir). En traits pleins, lois limites de Guinier (à petit Q) et de Porod (à grand Q). Les spectres des deux formes de calmoduline après retour à pression ambiante, en noir, se superposent parfaitement aux spectres de ces mêmes formes de calmoduline native, à pression ambiante (en bleu). L'effet de la pression, jusqu'à 2500 bar, est totalement réversible. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O . La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de $CaCl_2$. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL).

5.1.5 Résumé

Pour résumer, la dénaturation sous pression des formes apo et holo de la calmoduline comporte au moins un état intermédiaire compact, avec un maximum de peuplement autour de 3000 bar. Ces états intermédiaires ont une structure "dumbell", comme les états natifs, mais avec une distance interdomaine plus élevée ; et semblent avoir une compressibilité plus faible que celle des états natifs correspondants. Le passage de l'état natif à l'état intermédiaire semble parfaitement réversible pour les deux formes. Il apparaît cependant une dissymétrie dans le comportement des deux formes de calmoduline : les domaines de la forme holo sont compactés sous pression, ceux de la forme apo se dilatent sous pression. Le calcium modifie donc non seulement la conformation de la calmoduline, mais également son chemin de dénaturation.

L'utilisation de la pression a donc permis d'identifier clairement un état intermédiaire dans le chemin de dépliement des deux formes de calmoduline, qui n'apparaît pas en dénaturation thermique. L'étude de la dénaturation sous pression de la calmoduline permet donc de démontrer clairement que le dépliement de la calmoduline n'est pas une simple transition "Natif \leftrightarrow Dénaturé"; contrairement à ce que l'étude de la dénaturation thermique pourrait laisser penser. En effet, le décalage de 15°C du dépliement des deux domaines de l'apo-calmoduline en dénaturation thermique, bien qu'induisant un état intermédiaire, ne constitue pas une déviation par rapport à la transition Natif \leftrightarrow Dénaturé. Il s'agit seulement d'une double transition Natif \leftrightarrow Dénaturé : $C_T^N - N_T^N \leftrightarrow C_T^D - N_T^N \leftrightarrow C_T^D - N_T^D$. Ainsi, domaine par domaine, la dénaturation thermique s'apparente à une transition "à deux états", et seuls les légers décalages des transitions entre différentes techniques laissent supposer la présence d'états intermédiaires.

5.2 Aspects dynamiques

Tout logiquement, après avoir étudié la thermodynamique du dépliement sous pression, ainsi que la conformation des états dénaturés sous pression, nous avons réalisé une expérience de diffusion quasi-élastique de neutrons sous pression, pour comparer la dynamique de l'état natif et des états dénaturés sous pression. Nous nous sommes limités à la forme apo pour ces expériences, coûteuses en échantillon et en temps de faisceau. La figure 5.13 fournit des exemples de spectres quasi-élastiques obtenus, pour deux valeurs de Q , 1 \AA^{-1} et $1,5 \text{ \AA}^{-1}$, et pour les deux valeurs de pression extrêmes (1 bar et 6000 bar); ainsi que les ajustements correspondants (voir equ. 2.105).

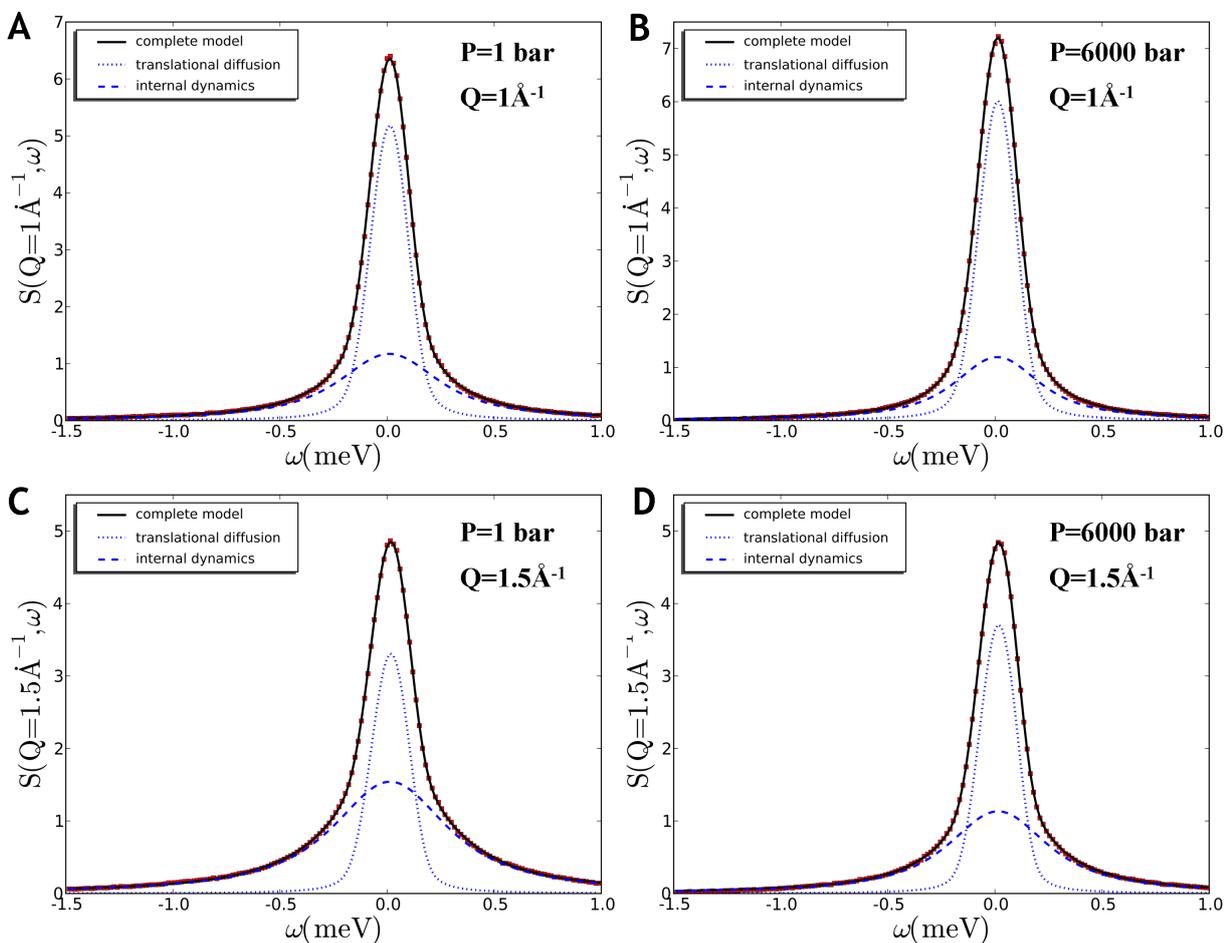


FIG. 5.13 – Spectres quasi-élastiques d’une solution concentrée d’apo-calmoduline pour deux valeurs de Q , 1 \AA^{-1} (A et B) et $1,5 \text{ \AA}^{-1}$ (C et D), et pour les deux valeurs extrêmes de pression (1 bar et 6000 bar). En traits pleins : ajustement du modèle complet. En traits discontinus : lorentziennes décrivant les mouvements internes. En pointillés : lorentzienne décrivant la diffusion de translation. Les spectres sont soustraits du signal du solvant. Mesures effectuées sur IN5 (ILL). La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μM d’EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l’aide du dispositif pression présenté dans l’annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL).

Les courbes ont une bonne allure générale. On retrouve bien une lorentzienne "étroite", correspondant à la diffusion globale de la protéine ; et une lorentzienne "large", correspondant aux mouvements internes. A première vue, le rapport des aires des lorentziennes semble raisonnable, et diminue bien avec Q . On peut remarquer que les spectres sont plus "étroits" à 6000 bar qu'à 1 bar. Ceci est d'ailleurs plus évident sur la figure 5.14, en superposant les spectres intégrés en Q , normalisés par l'intensité à $\omega = 0$, obtenus pour les deux valeurs extrêmes de pression : 1 bar et 6000 bar. Cette figure montre également le spectre intégré de l'apo-calmoduline après retour à pression ambiante. Il apparaît ainsi que les variations en pression de la dynamique de l'apo-calmoduline sont réversibles.

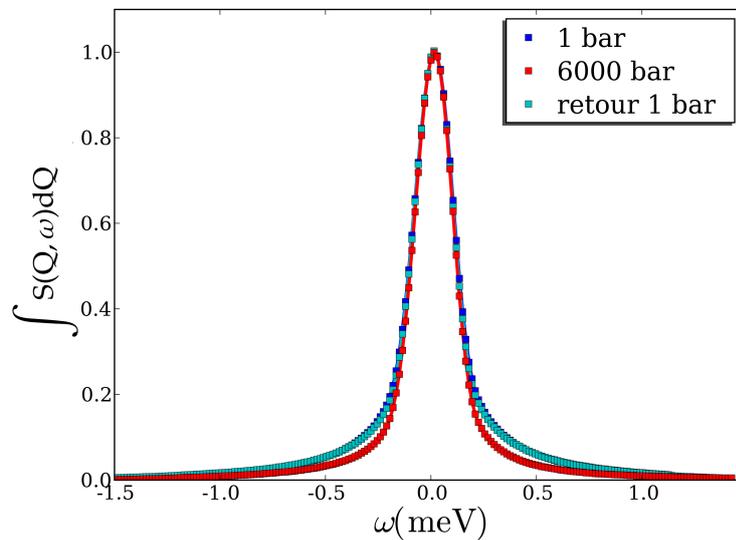


FIG. 5.14 – Spectres quasi-élastiques intégrés (en Q) d'une solution concentrée d'apo-calmoduline, $S(\omega) = \int S(Q, \omega) dQ$, pour les deux valeurs extrêmes de pression : 1 bar (en bleu) et 6000 bar (en rouge), et après retour à pression ambiante (en cyan). Les spectres sont normalisés par l'intensité à $\omega = 0$. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression présenté dans l'annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL).

La figure 5.15.B présente la largeurs de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, Γ_{int} en fonction de la pression. Les valeurs de Γ_{int} sont parfaitement cohérentes avec celles obtenues au chapitre précédent (voir figure 4.24, partie 4.2.4), soit autour de 250 μ eV. Il apparaît une transition autour de 3000 bar, se traduisant par une diminution de Γ_{int} . Les mouvements internes semblent donc ralentis lors du "passage" à l'état intermédiaire. Les mouvements internes semblent ensuite s'accélérer à nouveau, aux pression où l'apo-calmoduline se déplie. Cependant, nous n'avons pas réussi à ajuster correctement la lorentzienne de diffusion globale de la protéine. La largeur Γ_{diff} , à 1 bar, est plus élevée que celle obtenue à pression ambiante sur MIBEMOL, et ne tend pas vers 0 quand Q tend vers 0. Ceci est peut être dû à la diffusion multiple. En effet, la transmission de la cellule est de 0,75. Cette valeur, faible pour une cellule pression allant

jusqu'à 7000 bar, et tout à fait acceptable pour la diffusion de neutrons aux petits angles, peut être plus gênante en diffusion quasi-élastique de neutrons. La diffusion multiple a pour effet "d'étaler" les spectres en énergie et en vecteur d'onde, et pourrait donc expliquer les problèmes rencontrés. L'ajustement de la lorentzienne de diffusion de translation étant mauvais, il nous a été impossible d'obtenir un EISF correct. Il nous est donc impossible de pousser l'analyse plus loin.

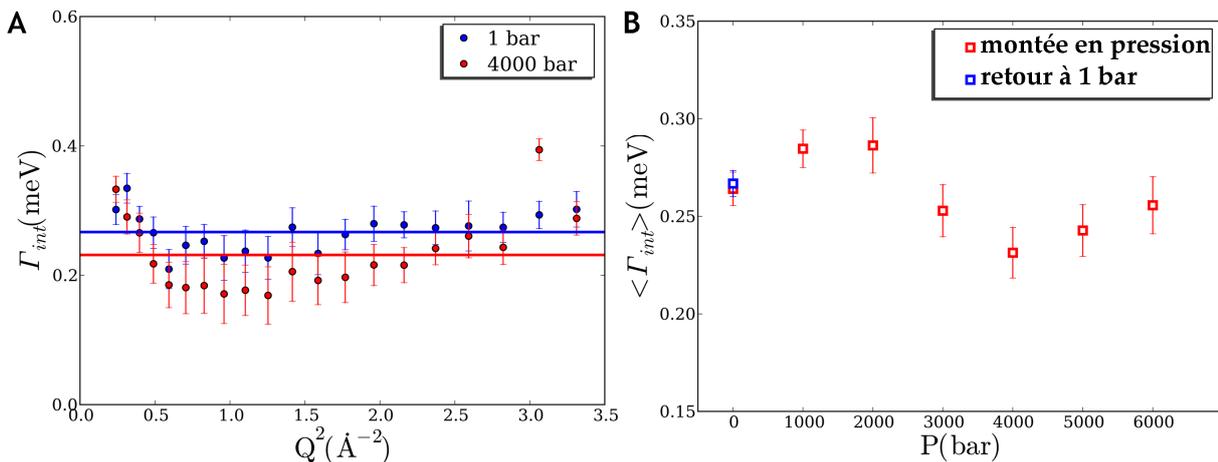


FIG. 5.15 – A : Largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, Γ_{int} , en fonction de Q^2 , pour deux pressions : 1 bar (○) et 4000 bar (○). B : Valeur moyenne de la largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, $\langle \Gamma_{int} \rangle$ en fonction de la pression. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression présenté dans l'annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL).

5.2.1 Résumé

Pour résumer, la dénaturation sous pression de la forme apo de la calmoduline semble s'accompagner d'un ralentissement de la dynamique interne, lors du passage à l'état intermédiaire, et peut être d'une accélération lors du dépliement. Cependant, nous n'avons pas réussi à ajuster correctement la lorentzienne de diffusion globale de la protéine, peut-être à cause de la diffusion multiple. Il n'est donc pas possible de conclure clairement quant à ceci.

Troisième partie

La C-phycocyanine

Après avoir étudié le dépliement de la calmoduline, système monomérique, nous nous sommes intéressés à la dénaturation d'un système oligomérique, donc plus complexe, la C-phycoyanine. Ceci nous a entraîné sur le chemin de l'étude d'une dénaturation hors équilibre. Ces notions de non-équilibre, abordées avec la dénaturation de l'apo-calmoduline, nous paraissant importantes ; et l'étude de systèmes de plus en plus complexes nous semblant être une évolution naturelle du sujet, nous avons décidé d'aborder le sujet. Cette étude est l'objet de la dernière partie de ce manuscrit.

Chapitre 6

La C-PC

La C-phycoyanine, ou C-PC, est une protéine soluble des cyanobactéries participant à la photosynthèse. Elle contient en effet des pigments (ou chromophores), des tétrapyrrolles, liés covalamment par un pont thioéther à ses cystéines. La C-PC absorbe donc la lumière, dans le rouge ($\lambda_{max} = 620$ nm, ce qui la rend bleue). Ceci lui permet de jouer un rôle de "collecteur de lumière" dans les principaux complexes photosynthétiques des cyanobactéries, les phycobilisomes. Nous nous sommes intéressés à la C-phycoyanine issue de *synechococcus elongatus*, système, qui a fait l'objet de nombreuses études au sein du groupe biologie et systèmes désordonnés du LLB [91, 99, 100, 101, 102].

6.1 Structure de la C-phycoyanine

La C-PC est une protéine constituée de deux chaînes, appelées α et β . Leur structure cristallographique est connue [103] (voir figure 6.1), et référencée dans la PDB sous le code 1JBO. Ces deux chaînes ont des poids moléculaires proches : respectivement 17.4 kDa et 18.2 kDa (162 et 172 résidus) ; et sont toutes deux composées de 8 hélices- α . Mais la chaîne α n'a qu'un chromophore, alors que la chaîne β en possède deux.

Ces chaînes α et β sont hautement associatives. Les chaînes α et β peuvent former un hétérodimère, noté $(\alpha\beta)$. Cet hétérodimère est également appelé 3S dans les expériences d'ultracentrifugation [104]. Il peut ensuite s'associer en trimères d'hétérodimères, noté $(\alpha\beta)_3$ ou 6S. Ces trimères (dans un esprit de légèreté des notations, on omettra fréquemment le "d'hétérodimères") peuvent enfin s'associer en hexamères, notés $(\alpha\beta)_6$ ou 11S. Pour finir, in vivo, la C-PC est sous forme de dodécamère, $(\alpha\beta)_{12}$ ou 19S. Les principaux niveaux d'organisation de la C-PC sont résumés dans la figure 6.2.

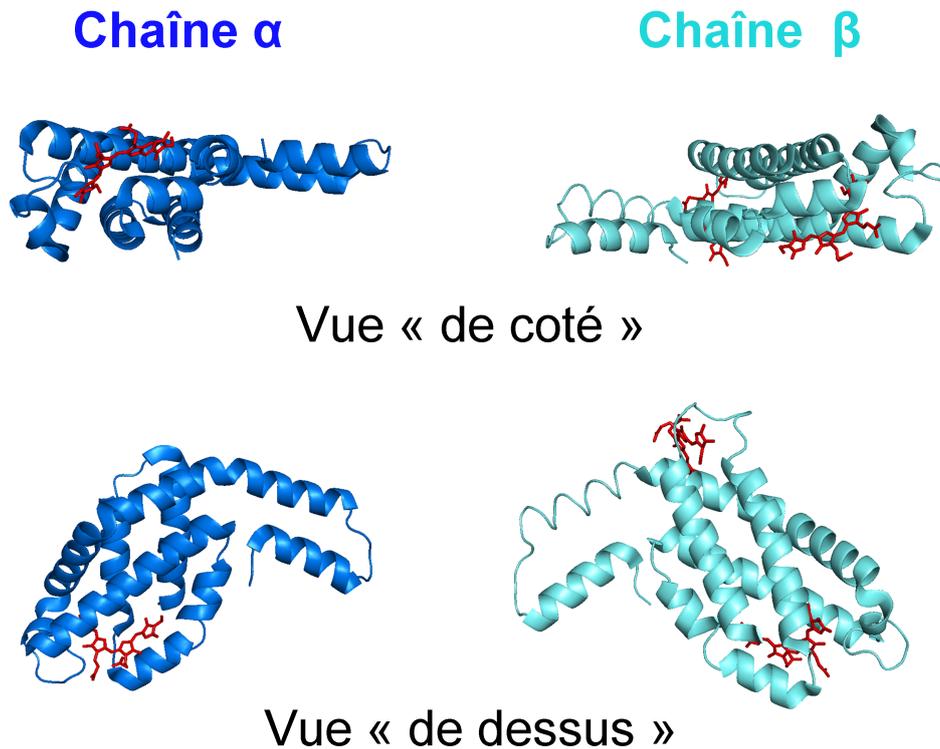


FIG. 6.1 – Structure cristallographique des chaînes α et β de la C-phycoerythrine. En rouge, les chromophores, liés covalamment aux cystéines de la protéine, et enchâssés dans les chaînes α et β .

6.2 Les phycobilisomes

Les phycobilisomes sont les principaux complexes photosynthétiques des cyanobactéries. Ils sont situés à la surface des membranes thylacoïdes. Les phycobilisomes sont extramembranaires, attachés aux photosystèmes I et II, intramembranaires. Ils sont constitués de trois types de protéines contenant des chromophores : phycoerythrine (PE), phycocyanine (PC) et allophycocyanine (APC) [105]. L'organisation du phycobilisome est représentée figure 6.3. Ces phycobilisomes sont visibles en microscopie électronique (voir figure 6.4). Au coeur du phycobilisome se trouvent 3×2 hexamères d'APC. A ce coeur sont attachés des "antennes", constituées, du coeur vers l'extérieur, de deux hexamères de PC puis de deux hexamères de PE. Les propriétés spectroscopiques de ces protéines dépendent de leur degré d'oligomérisation (on trouve dans la littérature le terme agrégation, mais celui-ci désignant également un processus stochastique n'ayant rien à voir avec le processus en question ici, nous lui préférons le terme oligomérisation). De manière très schématique, PE, PC et APC absorbent respectivement la lumière autour de ${}^{PE}\lambda_{max}^{ex} = 565 \text{ nm}$, ${}^{PC}\lambda_{max}^{ex} = 620 \text{ nm}$ et ${}^{APC}\lambda_{max}^{ex} = 650 \text{ nm}$ [106], avec des spectres très larges. Elles fluorescent respectivement autour de ${}^{PE}\lambda_{max}^{em} = 580 \text{ nm}$, ${}^{PC}\lambda_{max}^{em} = 650 \text{ nm}$ [106] et ${}^{APC}\lambda_{max}^{em} = 660 \text{ nm}$ [107] avec des spectres larges également. Cette organisation permet des transferts de fluorescence selon le schéma de la figure 6.5. Ainsi, des phycobilisomes excités à 545 nm fluorescent autour de 660 nm [108]. In vivo, les

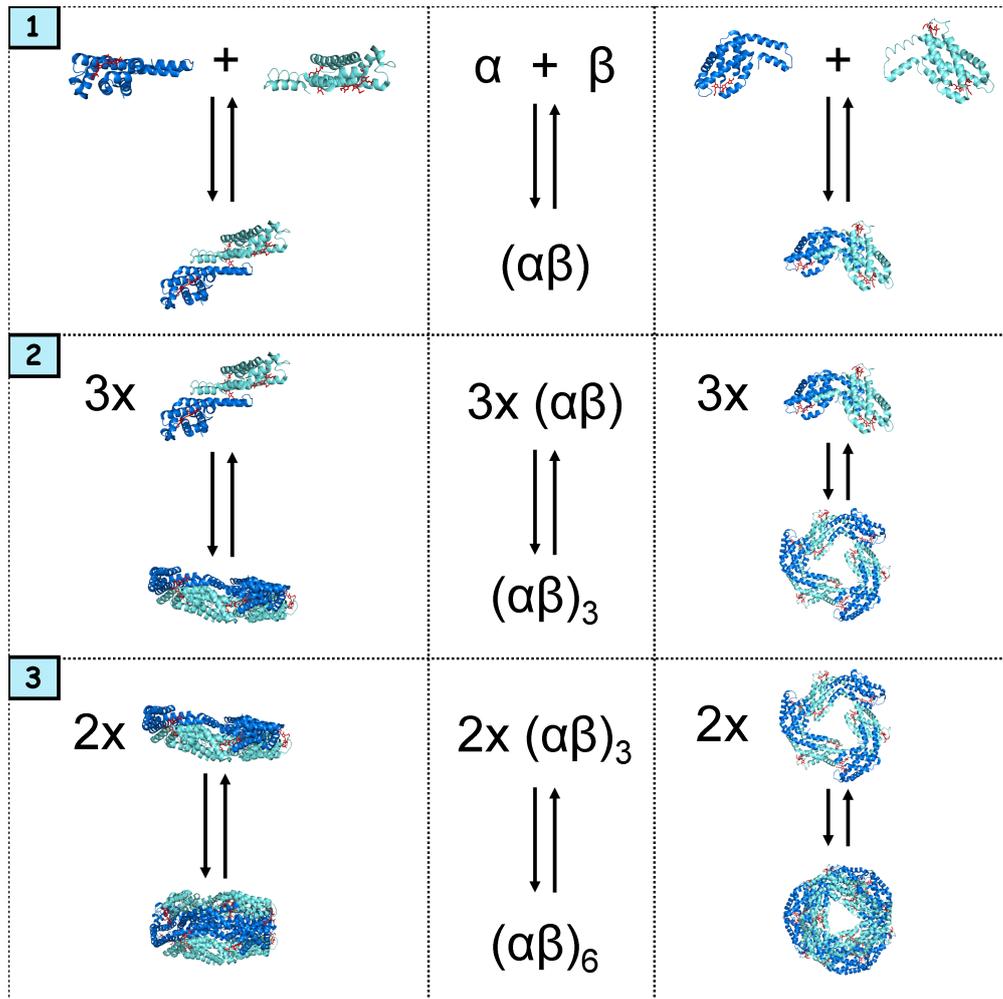


FIG. 6.2 – Niveaux d'architecture de la C-PC. Les chaînes α et β sont représentées en bleu et en cyan respectivement ; les chromophores sont en rouge. Les chaînes α et β s'associent pour former le monomère de C-PC, noté $\alpha\beta$. Trois de ces monomères peuvent s'associer pour former un trimère, en forme de tore, noté $(\alpha\beta)_3$. Deux de ces trimères peuvent s'associer, "en s'empilant", pour former un hexamère, noté $(\alpha\beta)_6$. In vivo, la C-PC est présente dans les phycobilisomes sous forme d'un empilement de deux hexamères (voir figure 6.3).

phycobilisomes "collectent" donc la lumière, et transfèrent l'énergie collectée aux photosystèmes I et II, où cette énergie est utilisée pour l'hydrolyse de l'eau.

6.3 Equilibre Monomère \rightleftharpoons Trimère \rightleftharpoons Hexamère

Il est évident que les différents oligomères de C-PC sont en équilibre en solution. Des expériences d'ultracentrifugation ont été effectuées à divers pH et forces ioniques, et dans de larges gammes de concentration (de 15 g/L à 8 mg/L) [109, 110, 104]. Il n'a jamais été vu de dissociation des hétérodimères $(\alpha\beta)$. Nous les considérerons donc comme indissociables en condition normale (température proche de l'ambiante, pression atmosphérique et sans dénaturant). L'équilibre que

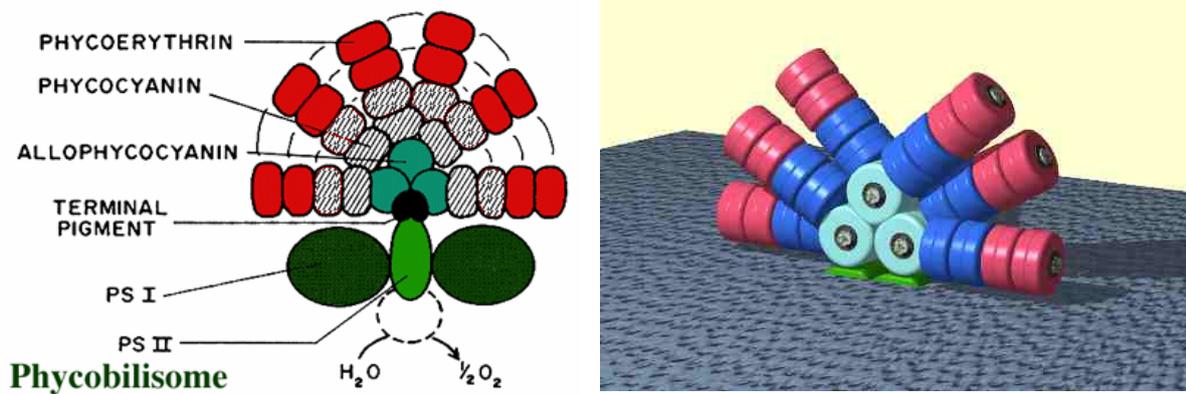


FIG. 6.3 – Structure du phycobilisome, "unité collectrice d'énergie lumineuse" des cyanobactéries. 3x2 hexamères d'allo-phycocyanine en constituent le coeur. De ce coeur partent des antennes, constituées de deux hexamères de phycocyanine, prolongés par deux hexamères de phycoerythrine.

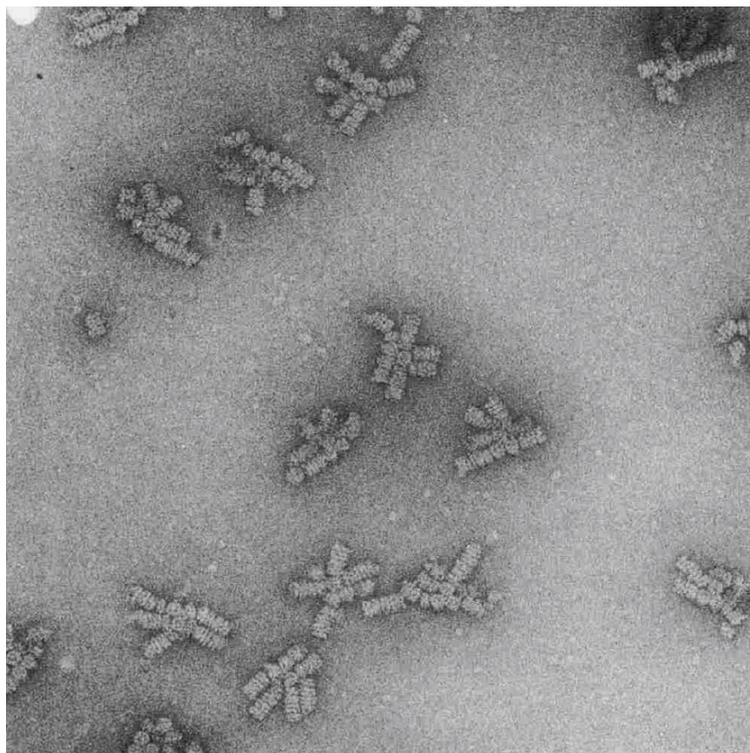
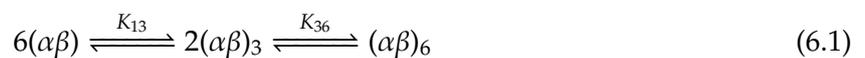


FIG. 6.4 – Images de microscopie électronique de phycobilisomes. On peut, sur ces images, distinguer parfaitement les différentes parties du phycobillisome, représentées sur le schéma de la figure 6.3.

nous considérerons est donc le suivant :



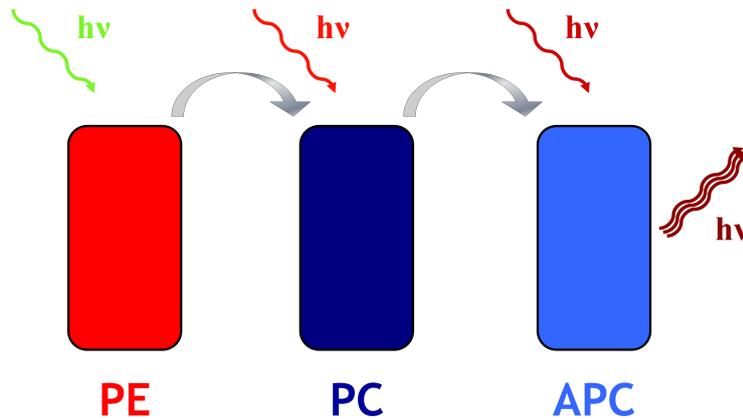


FIG. 6.5 – Schéma des transferts de fluorescence dans les phycobilisomes. La lumière est absorbée par toutes les protéines photosynthétiques du phycobilisome. De plus les protéines sont "rangées", de l'extrémité des antennes vers le coeur, par ordre croissant de longueur d'onde d'absorbance. L'énergie absorbée par les protéines des antennes est ainsi transférée directement (de manière non radiative), de proche en proche, vers le coeur du phycobilisome. Celui-ci concentre ainsi toute l'énergie lumineuse collectée par le phycobilisome. In vivo, cette énergie est finalement transférée aux photosystèmes I et II, où elle servira à l'hydrolyse de l'eau. In vitro, dans le cas de phycobilisomes isolés, elle est évacuée par fluorescence.

On peut donc écrire les équations suivantes :

$$[(\alpha\beta)] + 3K_{13}[(\alpha\beta)]^3 + 6K_{36}K_{13}^2[(\alpha\beta)]^6 = C \quad (6.2)$$

$$[(\alpha\beta)_3] = K_{13}[(\alpha\beta)]^3$$

$$[(\alpha\beta)_6] = K_{36}[(\alpha\beta)_3]^2$$

(6.3)

Avec C la concentration totale en C-phycocyanine, exprimée en molaire d'unités $(\alpha\beta)$. Huang et Berns [109] donnent les valeurs suivantes pour la constante d'équilibre à pH=4.8 et 100 mM de force ionique : $K_{13} = 1.4 \cdot 10^{12} \text{ (L/mol)}^2$ et $K_{36} = 6.1 \cdot 10^5 \text{ (L/mol)}$. Ces valeurs permettent de calculer les concentrations de toutes les espèces en fonction de la concentration totale en C-PC. Cependant, ces conditions de pH et de force ionique ne permettent malheureusement pas d'étudier la dénaturation de la C-PC dans de bonnes conditions. En effet, la combinaison d'une force ionique élevée et d'un pH proche du point isoélectrique ($\text{pH}_i = 4.7$) entraînent une agrégation massive à haute concentration lors de l'ajout de dénaturant. Nous avons donc décidé de travailler à pH=7 et à faible force ionique (10 mM). L'augmentation du pH (et donc vraisemblablement la diminution de force ionique également) a tendance à dissocier la C-PC [104]. Les valeurs des constantes d'équilibre de Huang et Berns nous serviront donc à évaluer une borne supérieure pour le degré d'association de la C-PC. Ainsi par exemple, à 200 μM , nous avons : 91% d'hexamères, 8.5% de trimères et 0.5% de monomères ; à 4 μM , nous avons : 48% d'hexamères, 35% de trimères et 17% de monomères ; à 0.4 μM , nous avons : <1% d'hexamères, 25% de trimères et 75% de monomères. Pour le régime des

basses concentrations, nous utiliserons la valeur de constante d'équilibre de Saito et al. [111]. Ceux-ci ont analysé leur données de sédimentation avec une simple dissociation $(\alpha\beta)_3 \xrightleftharpoons{K_{13}} 3(\alpha\beta)$; et n'ont pas considéré l'espèce $(\alpha\beta)_6$. Les valeurs de population ainsi obtenues pour $(\alpha\beta)$ et $(\alpha\beta)_3$ sont biaisées, mais Saito et al. donnent une valeur de K_{13} à pH 7 en tampon phosphate 10 mM : $K_{13} = 2.10^{11} M^{-2}$. Les équations correspondant au simple équilibre $3(\alpha\beta) \xrightleftharpoons{K_{13}} (\alpha\beta)_3$ s'écrivent :

$$\begin{aligned} [(\alpha\beta)] + 3K_{13}[(\alpha\beta)]^3 &= C \\ [(\alpha\beta)_3] &= K_{13}[(\alpha\beta)]^3 \end{aligned} \tag{6.4}$$

Pour conclure sur ces problèmes d'association de la C-PC, il apparaît en outre que le D₂O a tendance à augmenter le degré d'association de la C-PC [62]. Il s'agit là du premier indice que l'association de la C-PC est due, au moins en partie, à des interactions hydrophobes et des énergies d'hydratation.

Chapitre 7

La Dénaturation de la C-PC

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la dénaturation de la C-PC. Nous avons commencé par étudier la dénaturation thermique. Cependant, à concentration élevée (~ 10 g/L), la C-PC dénaturée thermiquement s'agrège irréversiblement. Ceci est sûrement dû à l'exposition de parties hydrophobes à la surface. Cette tendance à l'agrégation a d'ailleurs été rapportée dans une "short communication" de Murphy et O'Carra dans BBA en 1970 [46]. Cette communication contient d'ailleurs toutes les observations préliminaires à ce qui sera exposé à la fin de ce chapitre. Nous avons donc laissé de côté la dénaturation thermique, et nous nous sommes penchés sur la dénaturation chimique (sans connaître à l'époque les observations de Murphy et O'Carra). Il y a beaucoup moins de problèmes d'agrégation en dénaturation chimique. Ceci peut se comprendre facilement : les hautes doses de dénaturant "écrantent" les interactions hydrophobes, limitant ainsi l'agrégation. Murphy et O'Carra notent d'ailleurs que la C-PC dénaturée thermiquement (ou par exposition à pH très acide) est soluble dans une solution d'urée 8 M, et retrouve environ 40% de son absorbance native après dialyse de l'urée.

7.1 Le mécanisme de dénaturation

Pour éviter l'agrégation nous nous sommes donc placés à pH=7, en tampon phosphate 10 mM. Nous avons également rajouté 4 mM d'ascorbate, pour des raisons que nous verrons par la suite. Pour être dans un état relativement pur, nous avons utilisé des concentrations de C-PC comprises entre 4 μ M et 8 μ M. Ceci correspond en fait aux conditions utilisées comme standard pour l'état trimère $(\alpha\beta)_3$ par Thoren et al. [112].

7.1.1 La dénaturation de la C-PC trimérique $(\alpha\beta)_3$, une transition "à 4 états"

La C-PC étant une protéine photosynthétique, et donc étant un chromophore/fluorophore, il est naturel de mesurer l'absorbance et la fluorescence. Nous avons donc commencé par titrer la C-PC par deux dénaturants chimiques classiques, le chlorure de guanidinium (GdmHCl) et le thiocyanate de guanidinium (GdmSCN); et à mesurer l'absorbance à 620 nm et la fluorescence à

640 nm. Les courbes obtenues sont représentées dans la figure 7.1.

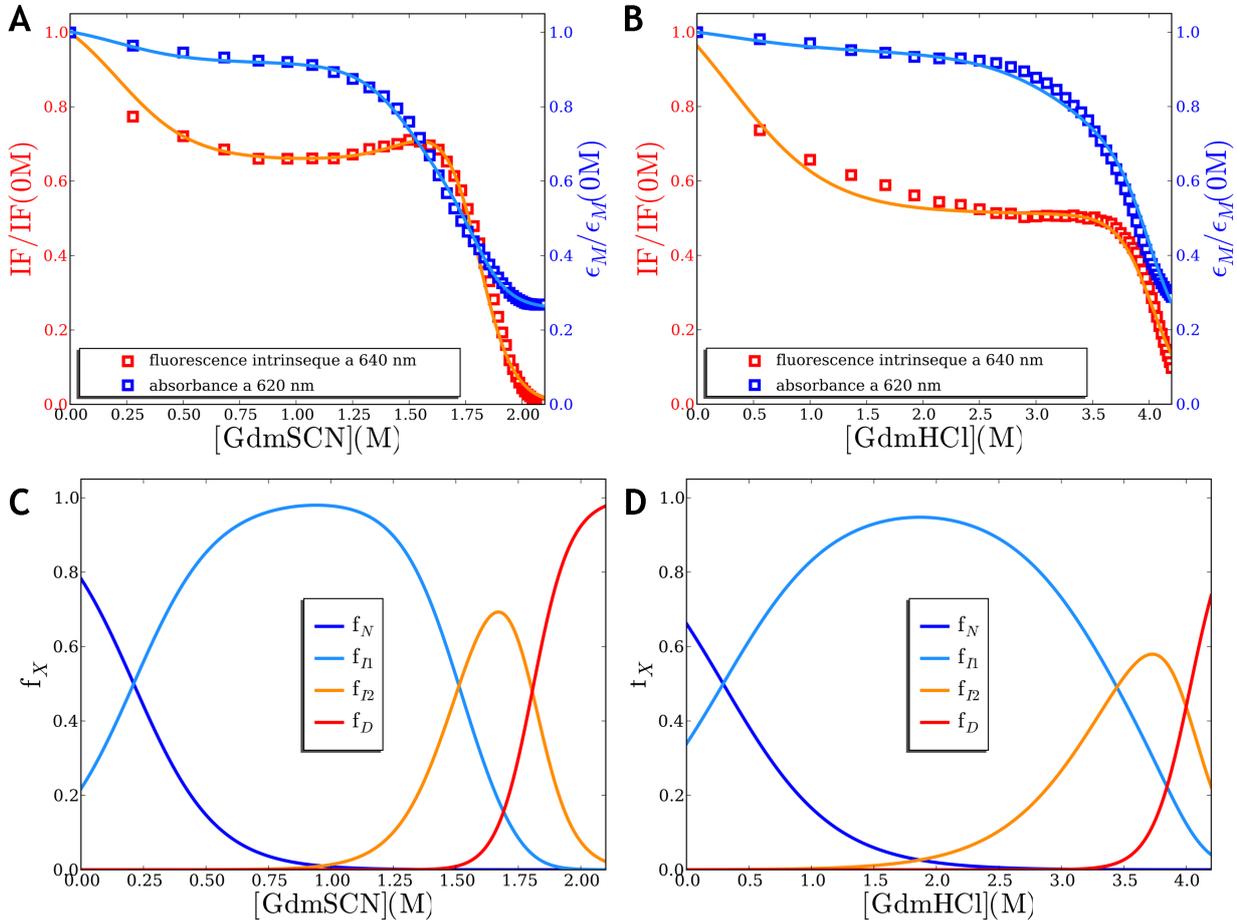


FIG. 7.1 – A et B : Titration de solutions de C-PC trimérique à $4 \mu\text{M}$ par GdmSCN (A) et GdmHCl (B). En bleu, absorbance ; en rouge, fluorescence. Les traits continus noir représentent des ajustements (fluorescence et absorbance sont ajustées en même temps) avec un modèle à 4 états. C et D : populations des 4 états, données par les ajustements susdits. Les ajustements du modèle à 4 états peuvent ne pas paraître très "bons", mais le fait que ce modèle puisse décrire simultanément les courbes de fluorescence et d'absorbance atteste de leur qualité. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

Dans les deux cas, les courbes ne peuvent être ajustées qu'avec un modèle "à 4 états" (au moins). Ceci est évident pour les courbes obtenues avec le GdmSCN, notamment à cause du pic de fluorescence autour de 1.6 M. Au vu des seules courbes de fluorescence ou d'absorbance avec GdmHCl, il pourrait sembler que la dénaturation par le GdmHCl correspond à une transition à trois états seulement. Toutefois, en regardant attentivement les deux courbes en même temps (les mesures de fluorescence et d'absorbance ont été effectuées simultanément sur le même échantillon), on aperçoit un décalage très significatif des deux courbes (la fluorescence décroît avant l'absorbance). Ce décalage ne peut s'expliquer que par la présence d'un quatrième état, comme avec le GdmSCN.

En fait, le pic de fluorescence visible en GdmSCN, est masqué en GdmHCl car les deux dernières transitions sont beaucoup plus rapprochées et se recouvrent plus en GdmHCl qu'en GdmSCN. Les ajustements peuvent ne pas paraître très bons, mais pour limiter le nombre de paramètres ajustés, nous avons imposé les pentes des "effet solvant" (S_x) à 0. Ceci fait légèrement dévier la courbe ajustée des données, mais permet d'être plus confiant quant à la validité de l'ajustement, et quant à la signification des paramètres obtenus. De plus, les courbes de fluorescence et d'absorbance sont ajustées simultanément, ce qui augmente le nombre de contraintes sur l'ajustement et le rend ainsi plus fiable, mais moins "joli".

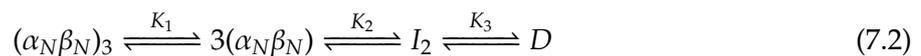
La dénaturation de la C-PC peut donc être relativement bien décrite par un modèle "à quatre états" :



Il reste à déterminer les différents états de cette équation.

7.1.2 La première transition - spectroscopie d'absorbance

L'état natif de la C-PC, dans les conditions choisies, est connu pour être $(\alpha_N\beta_N)_3$ (du moins majoritairement). Nous avons donc dans un premier temps cherché à déterminer l'état I_1 . Nous avons pour cela mesuré les spectres d'absorbance de la C-PC à plusieurs doses de dénaturant, correspondant à la première transition. Ces spectres sont représentés dans la figure 7.2. Dans les deux cas, on constate un décalage des spectres vers les courtes longueurs d'onde, ou "blue shift" (de 618 nm vers 612 nm). Ce décalage est en relativement bon accord avec celui donné par Glazer et al. [106] pour la transition $(\alpha_N\beta_N)_3 \xrightleftharpoons{K} 3(\alpha_N\beta_N)$, à savoir 620 nm \rightleftharpoons 616 nm. Le mécanisme de dénaturation de la C-PC s'écrirait donc :



Le décalage des spectres vers les courtes longueurs d'onde observé en GdmHCl et GdmSCN se retrouve également en Ethanol (voir figure 7.2.C). L'association $3(\alpha\beta) \xrightleftharpoons{K} (\alpha\beta)_3$ semble donc bien être due, en partie, à des interactions hydrophobes ; et non pas uniquement à des interactions électrostatiques (cette association dépend également du pH et de la force ionique). Ceci est confirmé par le fait que cette association dépend également du D_2O [62].

7.1.3 La dernière transition - DNPA

Pour déterminer le dernier état, nous avons mesuré les spectres DNPA de solutions de C-PC native de concentration 200 μM , et en présence de 2.8 M de GdmSCN, de 6M de GdmHCl et de 6 M d'Urée. Lesdits spectres sont représentés sur la figure 7.3.

La C-PC native est bien compacte, puisque le spectre obtenu suit une loi de Porod à grand Q (pour $Q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$; soit pour $QR_g > 4,1$, ce qui respecte bien la condition d'auto-cohérence). A

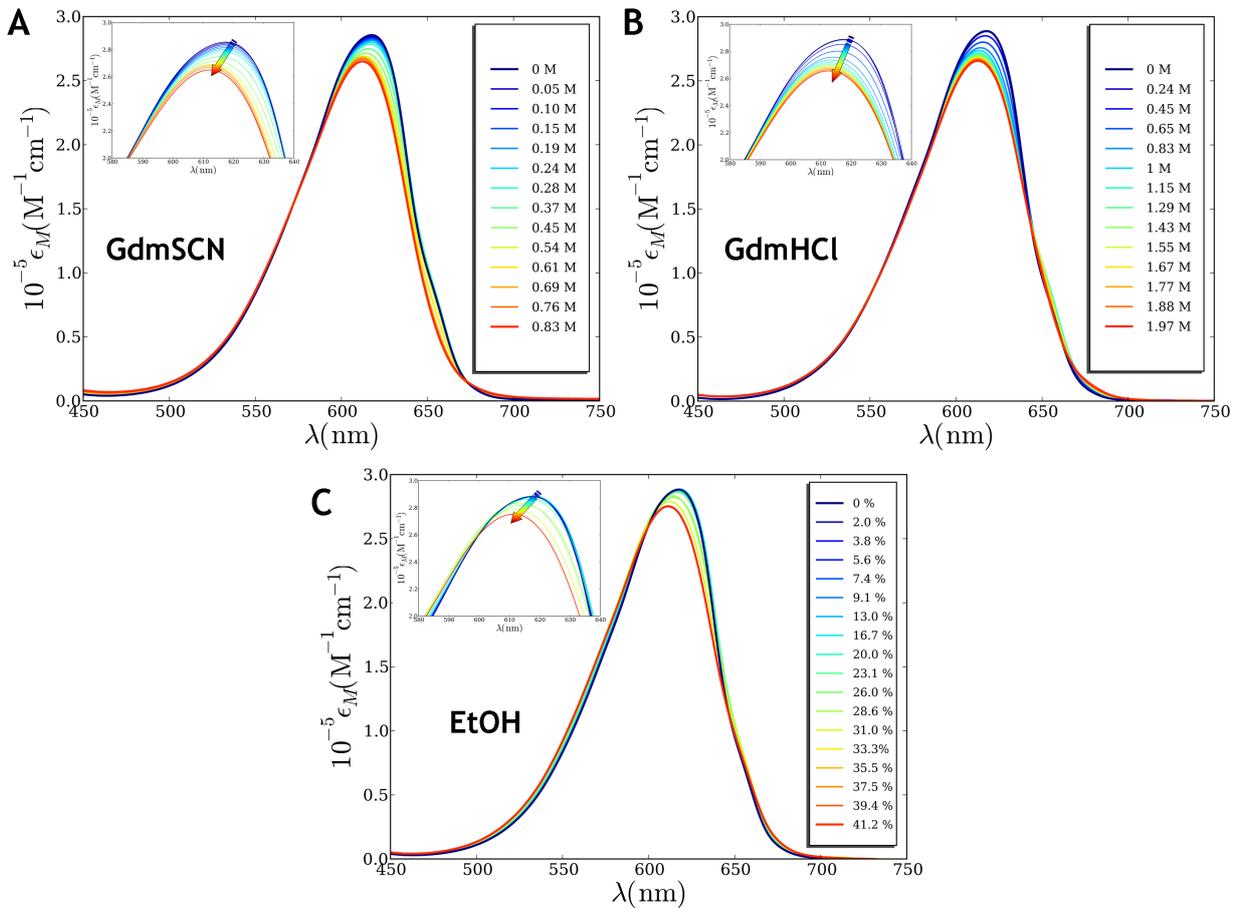


FIG. 7.2 – A et B : Spectres d'absorbance de solutions de C-PC à $6 \mu\text{M}$ à différentes concentrations de GdmSCN (A) et GdmHCl (B). C : Spectres d'absorbance de solutions de C-PC à $6 \mu\text{M}$ à différentes fractions d'éthanol. Dans tous le cas, on constate un "blue-shift" (de 618 nm vers 612 nm), accompagné d'une légère diminution de l'absorbance. Ceci est en relativement bon accord avec ce donné par Glazer et al. [106] pour la transition $(\alpha_N\beta_N)_3 \xrightleftharpoons{K} (\alpha_N\beta_N)$. La première transition correspondrait donc à la dissociation des trimères. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM $\text{pH}=7$.

petit Q (pour $Q < 5 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$; soit pour $QR_g < 2$, extension maximale du domaine de Guinier), le spectre suit tout logiquement une loi de Guinier, donnant un rayon de giration de $41,3 \pm 1 \text{ \AA}$. Ceci correspond bien au rayon de giration attendu pour la C-PC hexamérique $(\alpha\beta)_6$, soit 41 \AA [113]. Les solutions étant plus concentrées ($200 \mu\text{M}$) que celles utilisées en fluorescence et en absorbance, il est logique de trouver la C-PC sous forme hexamérique plutôt que trimérique.

La C-PC en présence de $2,8 \text{ M}$ de GdmSCN ou de 6 M d'Urée est dépliée. Les deux spectres correspondants suivent une loi de puissance à grand Q (pour $QR_g > 4$, $4/R_g \approx 0,08$), avec un exposant compris entre $1,7$ et 2 . A petit Q (jusqu'à $Q \sim 0,06 \text{ \AA}^{-1}$, soit jusqu'à $QR_g = 3$, domaine attendu pour une loi de Debye), lesdits spectres suivent une loi de Debye, conduisant respectivement à des rayons de giration de $52,7 \pm 1,5 \text{ \AA}$ et $51,3 \pm 1,5 \text{ \AA}$. En présence de 6 M de GdmHCl, la C-PC est

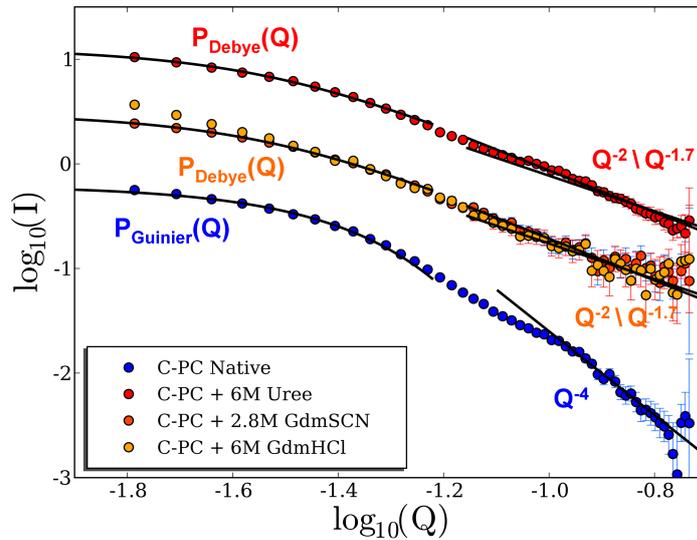
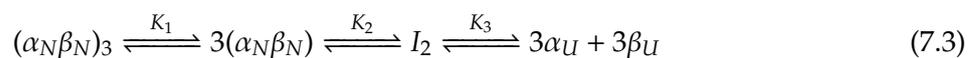


FIG. 7.3 – Spectres DNPA de solutions de C-PC à 200 μM , native (en bleu), et en présence de 2, 8 M de GdmSCN (en orange foncé), de 6 M de GdmHCl (en orange clair) et de 6 M d'urée (en rouge). Les courbes ont été translâtées pour plus de clarté. Le spectre de la C-PC native suit une loi de Porod pour $QR_g > 4$, et une loi de Guinier por $QR_g < 2$, donnant un rayon de giration, R_g , de $41, 3 \pm 1 \text{ \AA}$. Cette valeur correspond au rayon de giration de la C-PC hexamérique, et non trimérique. Ce qui n'a rien d'étonnant au vu de la concentration élevée utilisée en DNPA. En présence de 2, 8 M de GdmSCN ou de 6 M d'urée, le spectre de la C-PC à suit une loi de puissance pour $QR_g > 4$, avec un exposant compris entre 1,7 et 2 (il n'est pas possible de discriminer entre ces deux exposants). Dans ces conditions, la C-PC est donc dépliée. En présence de 6 M de GdmHCl, le spectre de la C-PC suit également une loi de puissance "à grand Q", avec un exposant compris entre 1,7 et 2; mais la remontée de l'intensité à petit Q indique que la C-PC est agrégée. La dernière transition correspond donc au dépliement de la C-PC. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

également dépliée (exposant à grand Q compris entre 1,7 et 2), mais semble un peu agrégée (l'intensité remonte à petit Q par rapport à celle diffusée par la C-PC en présence de GdmSCN). Ceci n'est pas extrêmement surprenant au vu de la concentration utilisée. Toutefois, au vu de ces résultats, nous avons abandonné le GdmHCl au profit de l'urée (qui ne contient pas de sel) pour la suite.

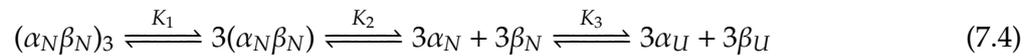
Il est donc maintenant possible de compléter le schéma de la dénaturation de la CPC, en notant α_U et β_U les chaînes dépliées :



Il est vrai que la concentration utilisée en DNPA était beaucoup plus élevée que celle utilisée en fluorescence et absorbance ; et que la C-PC "de départ" en DNPA était hexamérique et non trimérique. Donc, en toute rigueur, le fait que l'état final à 200 μM soit un état déplié ne signifie pas que l'état final à 4 μM soit également un état déplié. Cependant, on attend de la C-PC qu'elle soit

plus stable (si ce n'est aussi stable) à haute concentration qu'à basse concentration, et non l'inverse.

Pour finir, nous proposons le mécanisme suivant, bien que nous n'ayons aucune preuve de la nature de l'état I_2 .



Cette attribution de l'état I_2 semble cependant logique, et a été proposée par Thoren et al. [112].

7.1.4 Le début des problèmes

Bien que cela ne soit pas très académique, nous nous permettons ici d'inclure une petite partie "historique". Et ce, pour permettre au lecteur de saisir un certain nombre d'éléments dans la partie précédente; ainsi que dans la partie qui va suivre. Pour améliorer la détermination des paramètres thermodynamiques, et ajuster les pentes des "effets solvant", nous avons décidé d'effectuer des compléments de titration en partant de doses de dénaturant non nulles, et en titrant par des solutions de concentration différentes. Nous avons alors obtenu des courbes "difficiles à raccorder", dont un exemple est fourni figure 7.4.

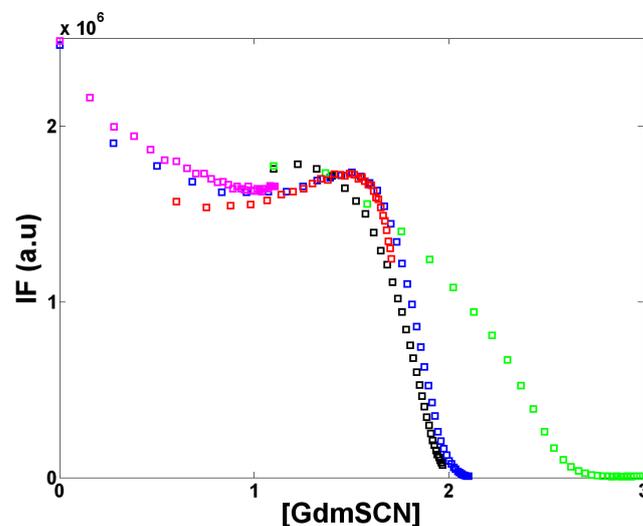


FIG. 7.4 – Superposition de plusieurs titrations de solutions de C-PC $4 \mu\text{M}$ par différentes solutions de GdmSCN, partant de points différents. Les courbes obtenues ne sont pas superposables. Ainsi, l'état de la C-PC ne dépend pas uniquement de la concentration de dénaturant; mais également de l'histoire de l'échantillon, ou du "chemin de dénaturation" suivi. Ceci est un signe de non-équilibre. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

Clairement, l'état de la C-PC ne dépend pas uniquement de la concentration de dénaturant; mais également de l'histoire de l'échantillon, ou du "chemin de dénaturation" suivi. Ceci est un signe de non-équilibre, comme mentionné par Lairez et al. [114]. Il se trouve que la C-PC, en

présence de dénaturant, évolue dans le temps, comme décrit dans la "short communication" de Murphy et O'Carra [46]. Cette évolution n'est pas due à un effet de "photo bleaching", puisque il a lieu même dans le noir. Il ne s'agit pas non plus de problème d'oxydation, puisqu'il a lieu même en présence de réducteurs, ainsi qu'en absence d'oxygène (après bullage à l'argon ou à l'azote). Il s'agit donc bien d'un problème d'équilibre. C'est pour cela que nous n'avons pas mesuré de spectres DNPA des états ($\alpha_N\beta_N$) et $\alpha_N + \beta_N$: ces états ne sont pas stables sur des temps suffisamment longs pour permettre des mesures DNPA.

7.2 La dénaturation de la CPC - une réaction hors équilibre

7.2.1 Observation qualitative des cinétiques

La C-PC soumise à une perturbation, telle une concentration donnée d'urée, évolue donc au cours du temps, comme le montre la figure 7.5. Un autre argument en faveur du non-équilibre, et en défaveur d'un phénomène d'oxydation ou de photobleaching, est que cette évolution en fonction du temps dépend fortement de la dose d'urée. Ainsi donc, la C-PC n'est pas à l'équilibre sur des temps compatibles avec l'expérimentation classique (à l'exclusion des stop-flows). Les paramètres thermodynamiques que nous avons obtenus dans la partie précédente (voir partie 7.1) sont faux.

Ces phénomènes de non-équilibre ne sont pas une caractéristique de la dénaturation chimique. La C-PC soumise à une température élevée évolue également dans le temps, comme indiqué dans la figure 7.6. La seule différence avec la dénaturation chimique est que la C-PC chauffée agrège légèrement. Ceci est visible par l'intermédiaire de l'absorbance à 450 nm : cette absorbance augmente légèrement avec le temps à haute température, mais reste parfaitement stable en présence d'urée. Dans les deux cas apparaissent des temps de relaxation de l'ordre de l'heure (voire du jour, et même au delà) ; et non pas de la microseconde ou de la centaine de microseconde, temps classiquement rencontrés en dénaturation des protéines [115, 116, 117]. Ces temps sont plutôt de l'ordre de ceux rencontrés pour les dissociations de multimères [118, 119].

La figure 7.7 présente les cinétiques d'évolution de l'absorbance de la C-PC trimérique à plusieurs températures. La représentation utilisée, $\epsilon = f(\ln t)$, peut sembler étrange, et moins appropriée qu'une représentation $\ln \epsilon = f(t)$. Cependant, dans cette représentation, les décroissances exponentielles apparaissent comme des sigmoïdes, et sont plus faciles à identifier. Cette figure montre clairement que l'absorbance de la C-PC décroît selon des cinétiques multiexponentielles ; et que les temps caractéristiques des dites exponentielles varient fortement avec la température.

7.2.2 Méthodes d'étude de transitions hors-équilibre

La C-PC n'étant pas à l'équilibre, il est très important de bien contrôler le paramètre temps. Il est donc nécessaire d'utiliser des appareils pouvant faire des mesures rapides, à des temps précis.

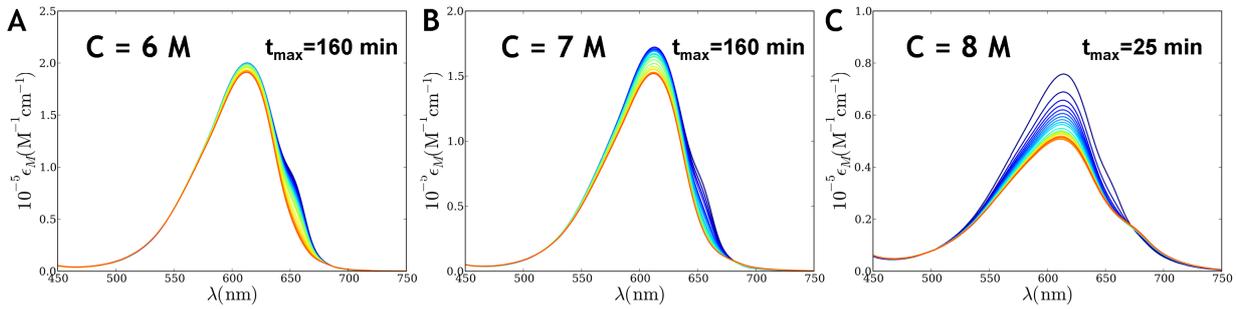


FIG. 7.5 – Spectre d'absorbance de la C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction du temps pour trois doses d'urée : 6 M (A), 7 M (B) et 8 M (C). L'absorbance de la C-PC ne dépend pas uniquement de la concentration en dénaturant ; elle dépend également du temps. La dénaturation de la C-PC n'est pas à l'équilibre sur les temps de l'expérimentation humaine (temps de l'ordre de la dizaine de minutes ou de l'heure, ou même plus). Le temps de relaxation dépend de la dose d'urée, il ne s'agit donc pas d'une dégradation de la protéine, mais bien de transitions avec des k_{on} et des k_{off} "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

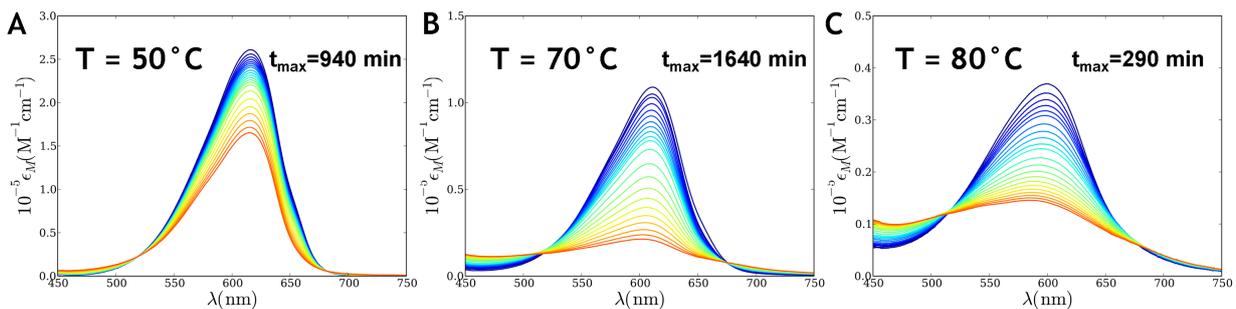


FIG. 7.6 – Spectre d'absorbance de la C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction du temps pour trois températures : 50°C (A), 70°C (B) et 80°C (C). L'absorbance de la C-PC ne dépend pas uniquement de la température ; elle dépend également du temps. La dénaturation de la C-PC, sous l'effet de la température comme des dénaturants chimiques, n'est pas à l'équilibre sur les temps de l'expérimentation humaine (temps de l'ordre de la dizaine de minutes ou de l'heure, ou même plus). Le temps de relaxation dépend de la dose d'urée, il ne s'agit donc pas d'une dégradation de la protéine, mais bien de transitions avec des k_{on} et des k_{off} "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine.

L'expérimentation "à la main" ne permet pas d'obtenir des résultats reproductibles. Nous nous sommes donc orientés vers un lecteur de microplaques Wallac[®] Victor 2 pour les mesures de fluorescence ; et un spectrophotomètre d'absorbance à barrette de diodes pour les mesures d'absorbance.

Pour pouvoir obtenir des paramètres thermodynamiques, deux méthodes sont possibles. Très schématiquement, la première consiste à effectuer des mesures à vitesse constante (par exemple des titrations à vitesse constante d'ajout de dénaturant pour la dénaturation chimique ; ou des mesures en fonction de la température avec une rampe de température constante pour la dénaturation

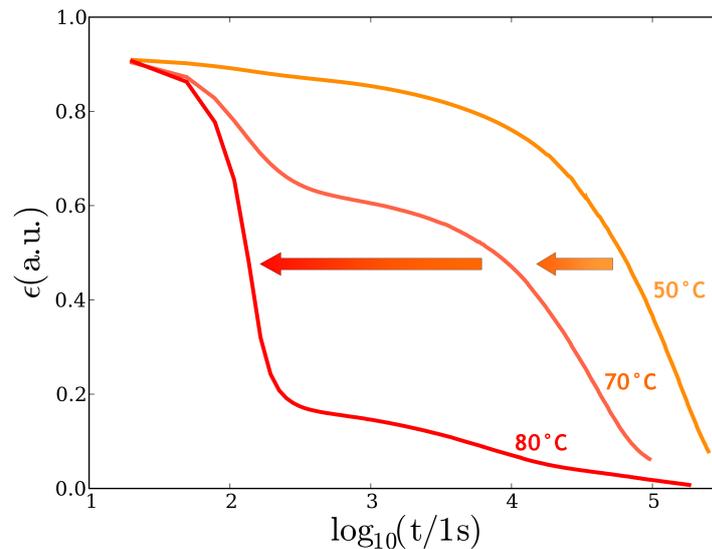


FIG. 7.7 – Cinétiques d'évolution de l'absorbance à 620 nm de solutions de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) pour trois températures : 50°C (A), 70°C (B) et 80°C (C). A une température donnée, l'absorbance de la C-PC décroît selon des cinétiques multiexponentielles. Comme l'indiquait la figure 7.6, les temps de relaxation dépendent de la température. Les k_{on} et des k_{off} des transitions de dénaturation de la C-PC sont "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

thermique) et à "extrapoler" les résultats obtenus à vitesse nulle ("extrapoler" est entre guillemets, car il ne s'agit en aucun cas de faire une extrapolation linéaire ; comme on le verra par la suite, les choses sont un peu plus compliquées). La seconde consiste à mesurer une série d'échantillons à concentration de dénaturant variable ou température variable, à plusieurs temps, et à extrapoler les résultats obtenus à temps infini. Il est clair que la première méthode est bien adaptée à la dénaturation thermique, des rampes de température constante étant assez facile à obtenir avec un bain Peltier programmable. Elle l'est cependant moins à la dénaturation chimique. En effet, si des titrations à $\frac{dV_D}{dt}$ (avec V_D le volume de solution de dénaturant ajouté) constante sont assez faciles à obtenir avec un appareil tel que le lecteur de microplaques Wallac Victor 2 ; il est moins facile d'effectuer des titrations à $\frac{d[D]}{dt}$ (avec $[D]$ la concentration de dénaturant) constante. La deuxième méthode, elle, est bien adaptée à la dénaturation chimique ; mais pas à la dénaturation thermique. Il est en effet assez facile de remplir une microplaque avec une série d'échantillons à concentration variable de dénaturant, et d'effectuer des lectures successives, à temps déterminé, de cette microplaque. Il est en outre possible de recouvrir les puits de la microplaque d'huile de silicone, et ainsi d'éviter toute évaporation. Cette méthode n'est cependant pas réalisable pour la dénaturation thermique, car il n'existe pas de dispositif permettant d'appliquer des gradients de température contrôlés à des microplaques.

7.2.3 Dénaturation thermique et chimique : un même mécanisme

Les courbes présentées dans la partie 7.1.1 ont été effectuées en partant d'une concentration de dénaturant nulle, et en ajoutant progressivement le dénaturant à $\frac{dV_D}{dt}$ constante. Ainsi, si les paramètres thermodynamiques obtenus sont biaisés par le non-équilibre, le mécanisme à quatre états que nous avons déterminé est, lui, correct.

Comme indiqué ci-avant, le "bon" type d'expériences pour l'étude de la dénaturation thermique, est celui "à vitesse constante". Nous avons donc choisi de mesurer les spectres d'absorbance de la C-PC en fonction de la température, à $\frac{dT}{dt}$ constant, sur un spectromètre à barrette de diodes permettant d'enregistrer simultanément l'intégralité du spectre. Les spectres obtenus entre 25°C et 85°C, avec une rampe de 1°C/min, sont représentés dans la figure 7.8. Le "blue-shift" initial rappelle celui obtenu à faible dose de dénaturant ou d'éthanol. Le spectre de l'état final rappelle également celui obtenu pour l'état final en urée (urée 8M, t=25 min, figure 7.5.C) ; à la seule différence que l'agrégation en dénaturation thermique induit une ligne de base hyperbolique sur les spectres d'absorbance. Ceci amène à penser que le mécanisme de la dénaturation thermique est bien le même que celui de la dénaturation chimique.

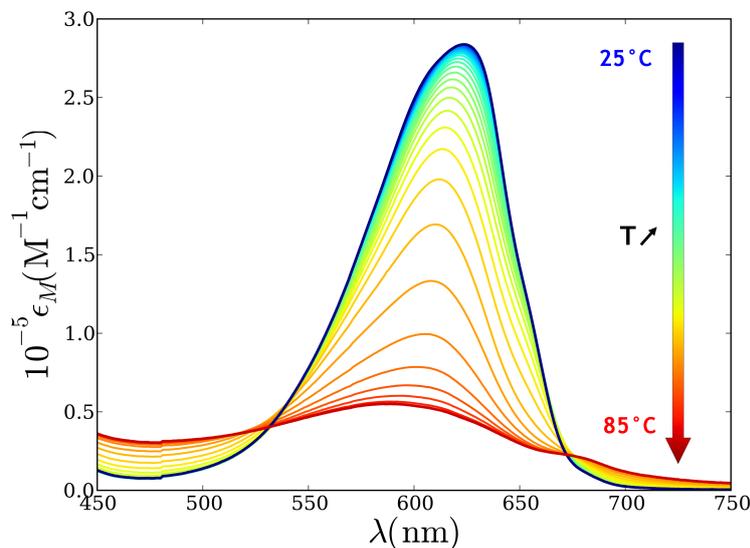


FIG. 7.8 – Spectres d'absorbance d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) à plusieurs températures, comprises entre 25°C et 85°C. Les spectres ont été obtenus en imposant une rampe constante de 1°C/min. On retrouve le même comportement qu'en dénaturation chimique : "blue shift" initial, diminution de l'absorbance jusqu'à atteindre un spectre très large, peu intense, avec deux "bosses", à 600 nm et 680 nm. On peut toutefois noter une certaine agrégation à haute température, signalée par la remontée de la ligne de base à courte longueur d'onde. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

Toutefois, au vu des évolutions en température de l'absorbance de la C-PC à une longueur

d'onde donnée (voir figure 7.9.A), il peut sembler que la C-PC, sous l'action de la température, se dénature selon une transition à deux états. En fait, les courbes aux trois longueurs d'onde sont décalées, signe de la présence d'états intermédiaires. Ceci est d'ailleurs nettement plus visible sur les rapports des absorbances à des longueurs d'onde différentes (voir figure 7.9.B). Tout particulièrement, le rapport $\epsilon(\lambda = 650 \text{ nm})/\epsilon(\lambda = 640 \text{ nm})$ (en vert sur la figure) démontre sans conteste qu'il s'agit bien également d'une transition à quatre états (les trois transitions sont repérées grossièrement par les flèches noires sur la figure). Pour s'en convaincre, on peut également regarder la figure 7.10, présentant les ellipticités à 595 nm et à 222 nm d'une solution de C-PC en fonction de la température pour une vitesse de chauffe de 1°C/min. Le signal à 595 nm est relié à l'asymétrie de l'environnement des chromophores. Il est donc censé varier lors du dépliement. Mais il varie également selon le degré d'association de la C-PC (il est notamment sensible au passage trimère-monomère [106]). Le signal à 222 nm est, lui, relié à la proportion d'hélices- α , et est donc censé varier essentiellement lors du dépliement. L'ellipticité à 595 nm présente un pic autour de 74°C. Ceci suggère que les transitions avant 74°C correspondent à des dissociations de la C-PC, et que la transition au delà de 74°C correspond au dépliement. L'ellipticité à 222 nm, elle, ne présente aucune variation significative avant 70°C (à l'exclusion de la pente "d'effet solvant"), et varie brutalement au delà de 70°C. Ceci confirme donc que les deux premières transitions sont des dissociations ; et que la dernière est le dépliement des chaînes α et β .

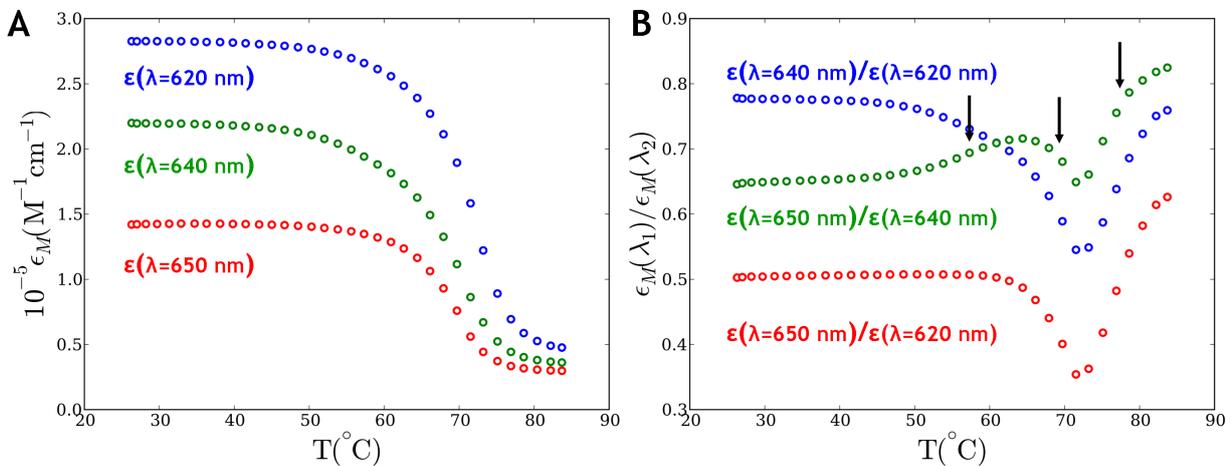


FIG. 7.9 – A : Absorbances à trois longueurs d'onde (620 nm, 640 nm et 650 nm) d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction de la température, entre 25°C et 85°C (rampe constante de 1°C/min). B : Rapports des dites absorbances en fonction de la température. Au vu des courbes à longueur d'onde fixe (A), on pourrait croire à une transition "à deux états". Cependant, les courbes aux différentes longueurs d'onde sont décalées, signe d'états intermédiaires. Les rapports d'absorbance à différentes longueurs d'onde font clairement apparaître 3 transitions, repérées par les flèches noires. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

A simple titre de comparaison, la figure 7.11 présente la courbe obtenue en fluorescence pour une titration à 38°C et une vitesse moyenne d'ajout de dénaturant $\left\langle \frac{dC}{dt} \right\rangle = 417 \mu\text{M s}^{-1}$ (comme

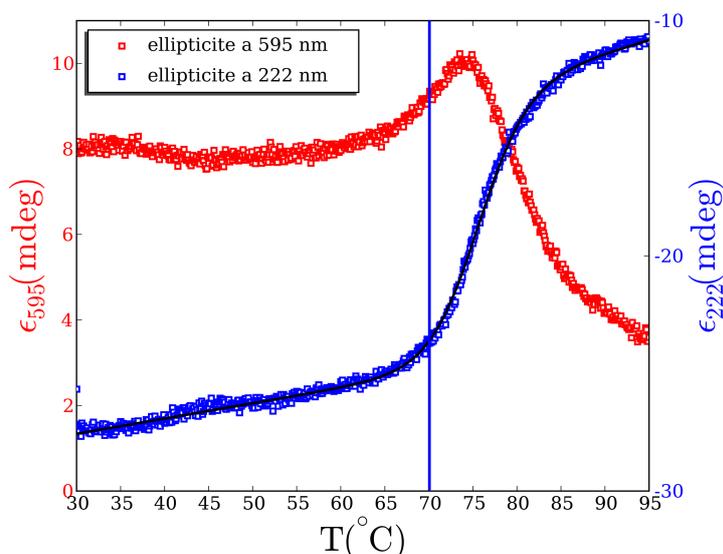


FIG. 7.10 – Ellipticités à 222 nm (en bleu) et à 595 nm (en rouge) d'une solution de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction de la température, pour une vitesse de chauffe de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. L'ellipticité à 222 nm est reliée à la quantité de structures secondaires, soit à la quantité d'hélices- α pour la C-PC. L'ellipticité à 595 nm est reliée à l'asymétrie de l'environnement local des chromophores, et dépend du degré d'association de la C-PC. La remontée du signal entre 55°C et 75°C peut être attribuée à la dissociation de la C-PC ; la descente de ce signal après 75°C est, elle, associée au dépliement de la C-PC, et s'accompagne d'une diminution de l'ellipticité à 222 nm. On peut noter que l'ellipticité à 222 nm ne diminue qu'après que la C-PC se soit dissociée, ce qui conforte l'hypothèse de mécanisme proposée dans l'équation 7.4. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

précisé plus tôt, il ne s'agit pas de titrations à $\frac{dC}{dt}$ constant, mais à $\frac{dV}{dt}$ constant). Cette courbe correspond également à une transition à quatre états. On peut donc conclure que les mécanismes de dénaturation thermique et chimique de la C-PC sont identiques.

Pour conclure sur la dénaturation thermique, il s'avère que l'agrégation de la C-PC est considérablement accélérée en présence de 2 mM de dithiothreitol (DTT). Le DTT est connu pour réduire les ponts disulfures. Or, les chromophores de la C-PC sont liés covalamment aux cystéines de celle-ci. Une explication possible de l'effet du DTT est qu'il réduit les liaisons C-PC/chromophores ; rendant ainsi les cystéines de la C-PC disponibles pour former des ponts disulfures interprotéiques non-spécifiques ; et favorisant ainsi l'agrégation. A condition d'accepter cette explication, la figure 7.12 révèle un point intéressant. Cette figure présente les spectres d'absorbance d'une solution de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) à 70°C , à plusieurs temps ; ainsi que l'évolution en fonction du temps de l'absorbance à deux longueurs d'onde : 620 nm et 400 nm. En première approximation, il est raisonnable de considérer que l'absorbance à 620 nm est uniquement reliée à l'état de la C-PC ; et que l'absorbance à 400 nm est une pure mesure de turbidité (i.e. que l'absorbance à 400 nm est uniquement reliée à l'agrégation ; et est indépendante de l'état des chromophores et de leur

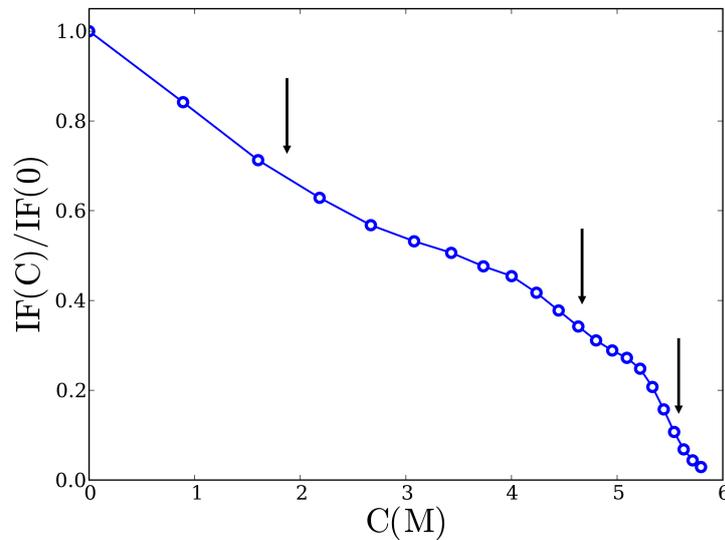


FIG. 7.11 – Fluorescence à 670 nm ($\lambda_{ex} = 620$ nm) d'une solution de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction de la concentration en urée, pour une température donnée (38°C) et une vitesse d'ajout donnée ($\langle \frac{dC}{dt} \rangle = 417 \mu\text{Ms}^{-1}$). Comme pour la dénaturation thermique, on retrouve 3 transitions, signalées par les flèches noires. Les mécanismes de dénaturation sous l'effet de la température et sous l'effet de dénaturants chimiques semblent identiques. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

environnement local). On peut remarquer que l'explosion de l'agrégation n'intervient qu'après la dernière transition de la C-PC. Il a été vérifié que la C-PC native n'agrège pas en présence de DTT. De plus, il semble logique que seule la C-PC dépliée s'agrège en présence de DTT (pour la C-PC compacte, les cystéines sont très protégées, et ne doivent donc pas pouvoir former de ponts disulfures interprotéines). Il semble donc que la C-PC ne soit dépliée qu'après la dernière transition. Ceci plaide encore une fois en faveur d'une dénaturation séquentielle et hors équilibre dont le dépliement est la dernière étape.

7.2.4 Première tentative d'analyse quantitative - Dénaturation chimique et méthode "à vitesse constante"

Méthode

La bonne méthode à utiliser en dénaturation chimique est celle "à *temps constant*" (voir partie 7.2.2). Cependant, cette méthode est coûteuse en protéine, et plus délicate à mettre en oeuvre. Nous avons donc commencé par la méthode "à *vitesse pseudo-constante*". Comme précisé dans la partie 7.2.2, cette méthode n'est pas vraiment rigoureuse car c'est la vitesse d'injection qui est constante ; et non pas la vitesse d'augmentation de concentration de dénaturant. Toutefois, ce point-ci n'est pas le principal des problèmes rencontrés en dénaturation chimique. La première vraie difficulté, et l'une des plus importantes, est de définir [D] quand celle-ci atteint des concentrations telles que 8 M. En effet, à 8 M, il n'y a plus que 7 molécules d'eau par molécules de dénaturant, ce

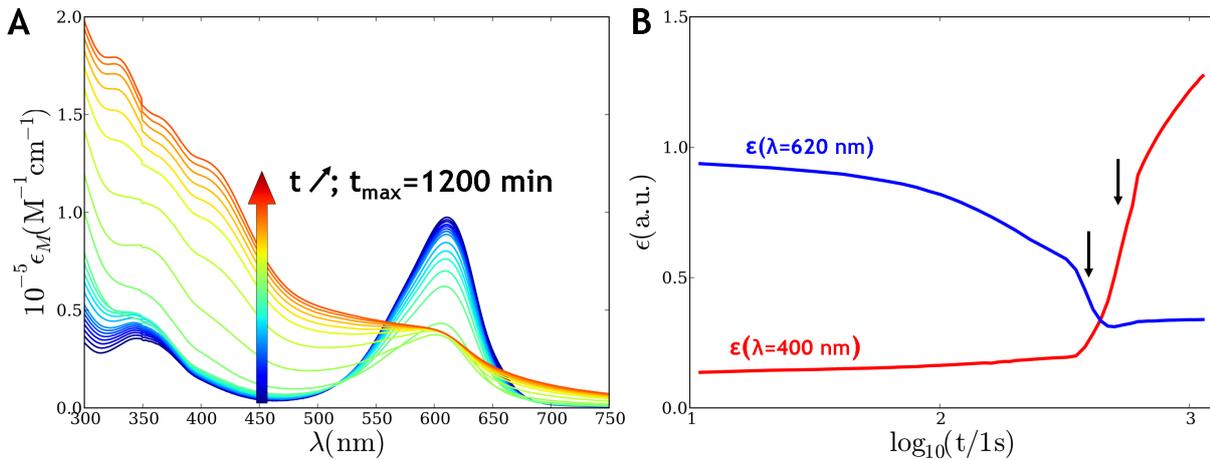


FIG. 7.12 – A : Spectre d'absorbance d'une solution de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) à 70°C en fonction du temps. B : Absorbance à deux longueurs d'onde : 620 nm et 400 nm (turbidité). L'absorbance à 620 nm est principalement reliée à l'état de l'environnement des chromophores de la C-PC. "L'absorbance" à 400 nm est une mesure de turbidité, est donc reliée à l'agrégation de la C-PC. On constate une diminution de la bande d'absorbance à 620 nm , signe de la dissociation et du dépliement de la C-PC ; ainsi que l'apparition et l'augmentation d'une ligne de base hyperbolique, signe d'agrégation. Cette agrégation est fortement accrue par l'ajout de DTT, permettant la formation de ponts disulfures interprotéines. La figure B montre clairement que l'agrégation n'explose (flèche noire la plus à droite) qu'après que l'absorbance à 620 nm ait atteint un plateau autour de $0.4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (le flèche noire la plus à gauche repère la dernière transition, correspondant au dépliement des chaînes α et β). La C-PC ne s'agrège donc qu'une fois les trois premières transitions finies. Ceci plaide à nouveau pour le mécanisme séquentiel proposé dans l'équation 7.4. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM $\text{pH}=7$.

qui pose quelques soucis. La deuxième difficulté est qu'il n'existe pas d'expression exacte pour l'énergie libre d'une protéine en fonction de la concentration en dénaturant. Il faut se contenter de l'approximation linéaire : $\Delta G = mC$. De plus, bien que les vitesses $\left(\frac{dC}{dt}\right)_i$ ne soient pas constantes lors de ces expériences, le rapport de ces vitesses, lui, est bien constant (soit deux vitesses constantes, $\left(\frac{dV}{dt}\right)_1$ et $\left(\frac{dV}{dt}\right)_2$, d'injections d'une solution de dénaturant de concentration donnée ; le rapport des vitesses d'augmentation de la concentration de dénaturant correspondantes $\left(\frac{dC}{dt}\right)_1 \left(\frac{dC}{dt}\right)_2^{-1}$ est, lui, constant).

Confirmation de l'absence d'équilibre

La figure 7.13 présente les courbes de fluorescence en fonction de la concentration d'urée, pour plusieurs vitesses d'injection (7.13.A), et pour plusieurs températures (7.13.B). Comme attendu pour des transitions hors équilibre, les trois transitions de dénaturation de la C-PC se décalent vers les basses concentrations quand la vitesse d'injection diminue. Malheureusement, la dernière transition est hors de la "fenêtre de concentration" pour la plupart des vitesses, et ne devient visible qu'à très faible vitesse. Elle n'est donc pas exploitable. La première transition n'est pas exploitable

non plus, en raison du manque de résolution à basse concentration. La deuxième transition, elle, est visible dans une gamme de vitesses raisonnablement étendue ; et la résolution dans le domaine de concentration correspondant est plus que correcte.

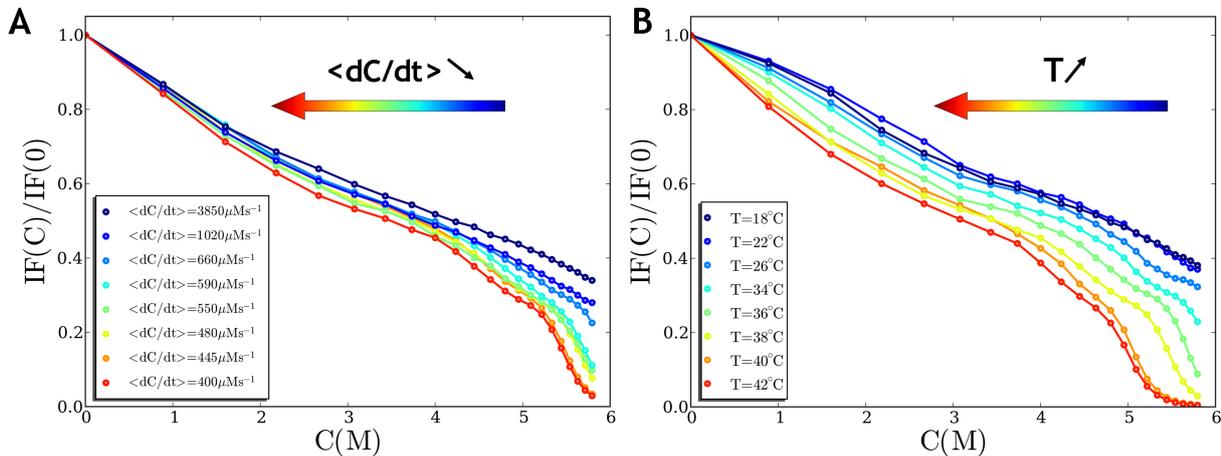


FIG. 7.13 – A : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction de la concentration en urée, à plusieurs vitesses moyennes d'augmentation de la concentration en dénaturant $\langle \frac{dC}{dt} \rangle$, et pour une température de 38°C . B : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de C-PC trimérique (à $4 \mu\text{M}$) en fonction de la concentration en urée, à plusieurs températures, et pour une vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant $\langle \frac{dC}{dt} \rangle$ de $400 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. Dans les deux cas, la concentration de la solution d'urée injectée est de 8 M . Les transitions se décalent vers les basses concentrations d'urée quand la température augmente, ce qui n'a rien de surprenant (Arrhénius) ; mais également quand la vitesse d'injection diminue, ce qui est un signe très net de non-équilibre. Les concentrations de transition visibles sur ces figures ne sont pas des concentrations de demi-dénaturation, mais des concentrations de relaxation. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM $\text{pH}=7$.

Un potentiel chimique d'activation

Grâce à un algorithme de dérivation sophistiqué, mis au point par P. Dumas, il est possible de déterminer précisément la concentration de "demi-transition" correspondante, en fonction de la vitesse d'injection. Comme la transition n'est pas à l'équilibre, cette concentration n'est en fait pas une concentration de demi-transition C_m comme usuellement (pour les transitions à l'équilibre) ; mais une concentration de relaxation, concentration de dénaturant pour laquelle le système rejoint l'équilibre. Bien que cela ne soit pas académique, nous nous permettons ici une petite image. Quand on court vers une falaise, on tombe quand on atteint le bord de la falaise, soit à C_m . Un personnage de cartoon, lui est hors équilibre. Il ne tombe pas quand il atteint le bord de la falaise ; mais quand il se rend compte qu'il a dépassé le bord de la falaise, soit à C_r . Un système hors équilibre accumule du retard par rapport à la perturbation imposée (à basse concentration d'urée, on ajoute de l'urée très rapidement, et il ne se passe rien). Cependant, le système relaxe de plus en plus vite au fur et à mesure que la perturbation augmente. Il arrive donc une valeur de perturbation pour

laquelle le système relaxe tellement vite qu'il "rattrape tout le retard accumulé". On voit donc à cette valeur de perturbation une transition brutale, car le temps de relaxation suit une loi d'Arrhénius.

Plus formellement, à chaque concentration de dénaturant C , le système met un temps τ pour relaxer une perturbation ΔC . Ceci est également valable pour la température : à chaque température T , le système met un temps τ pour relaxer une perturbation ΔT . En imposant une rampe de concentration (ou de température) "en escalier", on fait varier C de ΔC tous les Δt (ou T de ΔT tous les Δt), en imposant $\frac{\Delta C}{\Delta t} = V_C$ (ou $\frac{\Delta T}{\Delta t} = V_T$). A chaque "marche", le système met donc un temps $\tau(C, \Delta C)$ (ou $\tau(T, \Delta T)$) pour relaxer. On peut écrire une condition d'équilibre :

$$\tau(C, \Delta C) \ll \Delta t \quad \text{ou} \quad \tau(T, \Delta T) \ll \Delta t \quad (7.5)$$

Si on est à l'équilibre, cette condition est réalisée pour toutes les concentrations (ou toutes les températures). Si on est hors équilibre, τ étant une fonction exponentiellement décroissante (Arrhénius) de la concentration en dénaturant (ou de la température), il existe une concentration C_r (ou une température T_r) particulière à partir de laquelle le système rejoint la condition d'équilibre. C'est la concentration (ou la température) de relaxation :

$$\tau(C_r, \Delta C) \sim \Delta t \quad \text{ou} \quad \tau(T_r, \Delta T) \sim \Delta t \quad (7.6)$$

ou encore :

$$\tau(C_r, V_C \Delta t) \sim \Delta t \quad \text{ou} \quad \tau(T_r, V_T \Delta t) \sim \Delta t \quad (7.7)$$

D'après les calculs et simulations de P. Dumas (en cours de publication) dans le cas d'une dénaturation thermique, la température de relaxation (température à laquelle on rejoint l'équilibre) doit varier comme :

$$\Delta \left(\frac{1}{T_r} \right) = - \frac{R}{E_{off}} \Delta \left(\ln \frac{dT}{dt} \right) \quad (7.8)$$

où E_{off} est l'énergie d'activation de l'assemblage en question. Par analogie, on peut écrire :

$$\Delta(C_r) = \frac{RT}{m_{off}} \Delta \left(\ln \frac{dC}{dt} \right) \quad (7.9)$$

Ceci semble assez bien marcher dans notre cas (voir figure 7.14), et conduit à une différence de potentiel chimique d'activation de $m_{off} = 2,26 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$. L'ordre de grandeur de cette valeur semble raisonnable, mais il n'existe aucune valeur correspondante dans la littérature, concernant la C-phycoyanine, ni même un système semblable, pour pouvoir la comparer.

Effets de la dilution

Ainsi que suggéré dans la partie 7.2.1, les temps de relaxation rencontrés sont plus de l'ordre de grandeur de ceux rencontrés pour les dissociations de multimères, que de l'ordre de grandeur

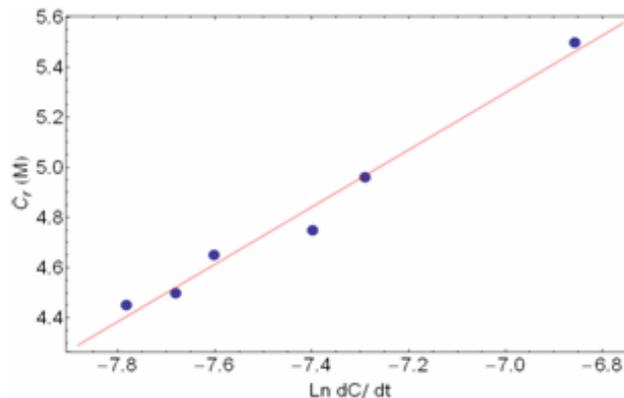


FIG. 7.14 – Concentration (de dénaturant) de relaxation de la deuxième transition en fonction du logarithme de la vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant. Selon l'équation 7.9, la concentration de relaxation doit varier comme le logarithme de la vitesse d'injection, ce qui semble le cas ici. La pente donne une valeur de différence de potentiel chimique d'activation, m_{off} , raisonnable, mais impossible à comparer avec des valeurs de la littérature. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

de ceux rencontrés habituellement pour le dépliement de protéines monomériques. Ceci suggère donc l'idée que le non équilibre de la dénaturation de la C-PC est dû à son degré d'association. Un bon moyen de tester cette hypothèse est de regarder l'effet de la dilution sur les transitions de dénaturation. La figure 7.15 présente les courbes obtenues en fluorescence en titrant des solutions de C-PC de concentration variable par une solution d'urée 8 M, à 38°C et pour une vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant $\left\langle \frac{dC}{dt} \right\rangle$ de 400 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. Les courbes se décalent vers les basses concentrations quand le facteur de dilution augmente ; démontrant que le non-équilibre de la C-PC est bien dû au degré d'association de la C-PC. Ainsi le degré d'association "protège" la C-PC de la dénaturation. Sous forme de trimère, la C-PC "résiste", à température et temps égaux, à des doses d'urée bien plus élevées que la C-PC monomérique. La dissociation des oligomères de C-PC apparaît comme une étape limitante de la dénaturation ; "il faut dissocier la C-PC avant de pouvoir la déplier".

On peut cependant constater qu'il faut diluer la C-PC 1000 fois pour que les courbes arrêtent de se décaler ; et qu'une dilution d'un facteur 3 n'affecte pas la courbe de transition. Ceci est un autre signe de non-équilibre. En effet, d'après la constante d'équilibre de Saito [111] (les populations données par cette constante d'équilibre sont biaisées car Saito et al n'ont pas pris en compte les hexamères, mais nous ne nous en servons qu'à titre de comparaison), la population de trimères doit diminuer très rapidement avec la dilution, et devenir quasi-nulle à $[\text{C-PC}] = 0.44 \mu\text{M}$. Or, on constate que les courbes se décalent très peu entre 4 μM et 0,44 μM . De plus, il faut atteindre 5 nM pour voir les courbes arrêter de se décaler ; alors que la population de trimère est censée être nulle dès 150 nM. Tout ceci s'explique très bien par le fait que la C-PC n'est pas à l'équilibre : elle est "en retard" par rapport à la perturbation imposée par la dilution. Aux faibles dilutions, la perturbation

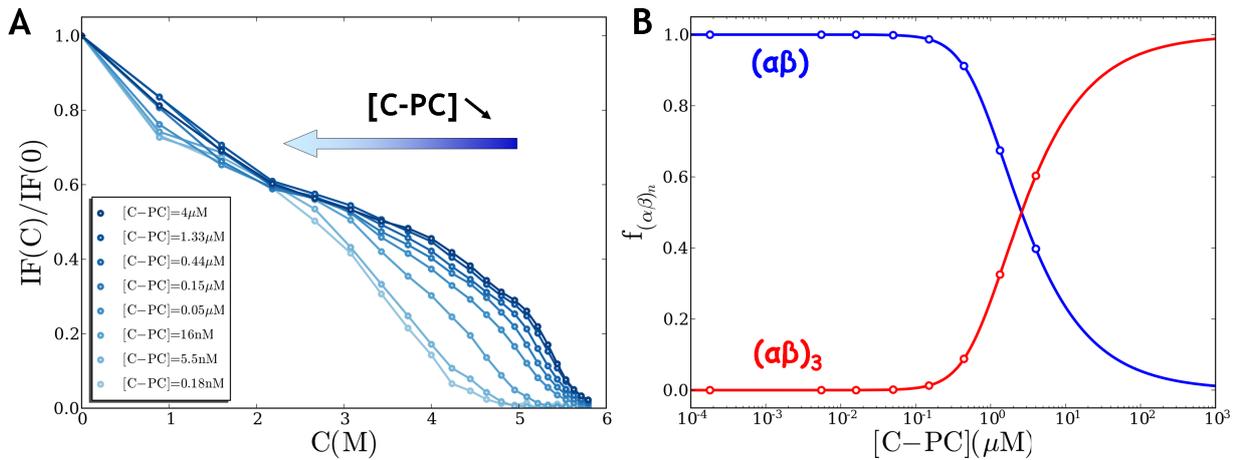


FIG. 7.15 – A : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de solutions de C-PC à plusieurs concentrations, comprises entre 4 μM et 0, 18 nM, en fonction de la concentration en urée ; à 38°C et pour une vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant $\langle \frac{dC}{dt} \rangle$ de 400 $\mu M.s^{-1}$. Dans les deux cas, la concentration de la solution d'urée injectée est de 8 M. B : Proportions de monomères (en bleu) et de trimères (en rouge) en fonction de la concentration de C-PC, d'après la constante de Saito [111]. Les points correspondent aux concentrations de C-PC de la figure A. Les courbes se décalent vers les basses concentrations avec la dilution, signe que le mécanisme de dénaturation de la C-PC fait bien intervenir des dissociations. Cependant, ce décalage est en "retard" sur la diminution du degré d'association prévue par la constante d'équilibre de Saito et al. Ceci est, encore une fois, signe de non-équilibre : il faut un certain temps au système pour relaxer de la perturbation de dilution imposée. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

imposée est tellement faible que la C-PC "ne sent pas la dilution". Aux très fortes dilutions, la perturbation imposée devient suffisamment conséquente pour que la C-PC rejoigne rapidement son équilibre. En fait, le mécanisme de relaxation décrit plus haut ne s'applique pas uniquement à des perturbations telles que l'augmentation de température ou l'ajout de dénaturant. Il doit également s'appliquer à la dilution. Il doit donc exister une concentration de relaxation $[C-PC]_r$, définie de manière analogue aux températures de relaxation T_r et concentration de dénaturant de relaxation C_r . En deçà de cette concentration (de C-PC) de relaxation, $[C-PC]_r$, le système doit relaxer de toute perturbation de dilution $\Delta[C-PC]$ en un temps très inférieur à Δt . Ici, Δt est délicat à définir. Il correspond au temps de préparation de l'expérience de titration, et est donc de l'ordre de quelques minutes.

7.2.5 Deuxième tentative d'analyse quantitative - Dénaturation thermique et méthode "à vitesse constante"

Des problèmes d'appareillage nous ont empêché de réaliser des mesures d'absorbance à d'autres rampes que 1°C/min (mesure présentée partie 7.2.3). Ces mesures sont reportées mi-septembre au mieux. Nous avons donc décidé de réaliser des mesures en dichroïsme circulaire.

En effet, Glazer et al. [106] ont montré que l'ellipticité entre 500 nm et 650 nm dépendait du degré d'association de la C-PC. Il est évident qu'il varie également lors du dépliement. En effet, l'environnement des chromophores pour la protéine dépliée ne peut être aussi asymétrique que pour la protéine native. Une protéine dépliée s'apparente en effet à une chaîne polymère. Or, une chaîne polymère gaussienne est complètement symétrique et isotrope.

La figure 7.16 présente la variation de l'ellipticité à 595 nm en fonction de la température pour trois vitesses de chauffe. Comme pour la dénaturation chimique, les transitions se décalent, de manière sensible, vers les basses températures quand la vitesse de chauffe diminue (pour la dénaturation chimique, il ne s'agit pas d'une vitesse de chauffe ; mais d'une vitesse d'augmentation de la concentration de dénaturant). Cependant, ces résultats souffrent d'un manque de reproductibilité. Les transitions se décalent toujours dans le même sens avec la vitesse de chauffe ; mais la hauteur du pic varie d'une expérience à l'autre, et le décalage des transitions n'est pas très régulier. Une des explications possibles est un défaut dans le contrôle de la rampe de température. En effet, il nous a semblé, lors des expériences, que la température indiquée par le bain ne variait pas de manière très régulière. Elle semblait accélérer et décélérer de manière significative. Il est donc possible que les rampes de températures n'aient pas été parfaitement constantes, mais aient oscillé autour de valeurs moyennes. Or, étant donné que les transitions ne sont pas à l'équilibre, la constance des rampes est primordiale (en réalité ce n'est pas tant la constance que la reproductibilité qui compte ; il faut que, pour chaque température, les vitesses soient homothétiques ; autrement dit, il faut que les rapports des différentes vitesses de chauffe soient constants). Étant donné que l'appareil n'enregistre pas la température en fonction du temps, il nous est impossible de vérifier cette hypothèse. Au delà de ce manque de reproductibilité, on peut constater une instabilité du signal à basse température. Tout ceci interdit tout ajustement correct des courbes, et toute extrapolation en fonction de la vitesse de chauffe.

Pour les expériences d'absorbance, l'appareil a enregistré la température en fonction du temps ; ce qui a permis de constater que la rampe était presque parfaite (voir figure 7.17), bien que légèrement différente de celle demandée (0.93°C/min au lieu de 1°C/min). Les expériences d'absorbance semblent donc plus adaptées à l'étude de ces transitions hors équilibre que les expériences de dichroïsme circulaire.

7.2.6 Troisième tentative d'analyse quantitative - Dénaturation chimique et méthode "à temps constant"

La méthode "à temps constant" a un gros avantage : elle permet d'obtenir les populations de chaque état, en fonction de la concentration de dénaturant et du temps en tant que variables indépendantes. Autrement dit, elle permet d'obtenir $f_X(C, t)$, et non pas $f_X(C(t), t)$, ce qui simplifie grandement le problème. Elle a cependant un gros inconvénient : elle est beaucoup plus difficile à mettre en oeuvre, expérimentalement parlant. Nous avons obtenu le mécanisme suivant pour la

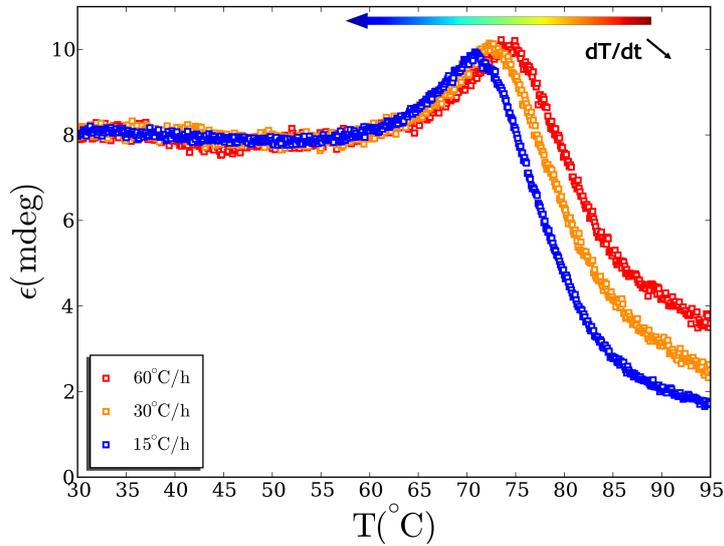


FIG. 7.16 – Ellipticité à 595 nm d’une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction de la température, pour trois vitesses de chauffe : 1°C/min (en rouge), 0,5°C/min (en orange) et 0,25°C/min (en bleu). Comme pour la dénaturation chimique (voir figure 7.13.A), les courbes de transition se décalent vers les basses températures quand la vitesse de chauffe diminue. Les températures de transition visibles sur ces figures ne sont pas des températures de demi-dénaturation, mais des températures de relaxation. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

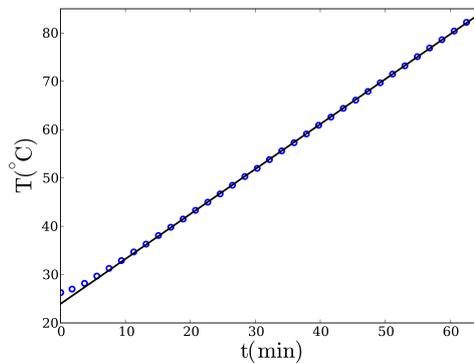
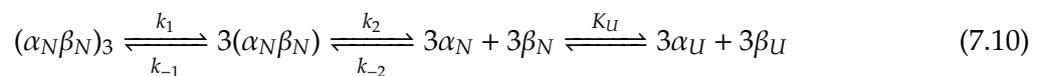


FIG. 7.17 – Température en fonction du temps lors de l’expérience de la figure 7.9. La vitesse de chauffe lors de cette expérience était presque parfaitement constante. La rampe de température était bien contrôlée.

dénaturation de la C-PC :



Nous faisons ici l’hypothèse (un peu ad hoc) que le dépliage des chaînes α et β est à l’équilibre, et que seules les dissociations sont hors équilibre. Ceci donne les équations suivante, avec [C – PC]_i

la concentration initiale de C-PC (en équivalent monomère) :

$$\begin{aligned} \frac{d[(\alpha_N\beta_N)_3]}{dt} &= -k_1[(\alpha_N\beta_N)_3] + k_{-1}[(\alpha_N\beta_N)]^3 & (7.11) \\ \frac{d[(\alpha_N\beta_N)]}{dt} &= -3\frac{d[(\alpha_N\beta_N)_3]}{dt} + k_{-2}[\alpha_N + \beta_N]^2 - k_2[(\alpha_N\beta_N)] \\ [\alpha_D + \beta_D] &= K_U[\alpha_N + \beta_N] \\ 3[(\alpha_N\beta_N)_3] + [(\alpha_N\beta_N)] + [\alpha_N + \beta_N] + [\alpha_D + \beta_D] &= [C - PC]_i \end{aligned}$$

En divisant les système d'équations par $[C - PC]_i$, en dérivant les deux dernières équations, et en posant

$$\bar{y} = \begin{bmatrix} f_{(\alpha_N\beta_N)_3} \equiv 3[(\alpha_N\beta_N)_3]/[C - PC]_i \\ f_{(\alpha_N\beta_N)} \equiv [(\alpha_N\beta_N)]/[C - PC]_i \\ f_{\alpha_N+\beta_N} \equiv [\alpha_N + \beta_N]/[C - PC]_i \\ f_{\alpha_D+\beta_D} \equiv [\alpha_D + \beta_D]/[C - PC]_i \end{bmatrix} \quad \text{et} \quad \bar{k} = \begin{bmatrix} k_1 \\ k_{-1}[C - PC]_i^2 \\ k_2 \\ k_{-2}[C - PC]_i \\ K_U \end{bmatrix} \quad (7.12)$$

où tous les éléments de \bar{k} sont homogènes à l'inverse d'un temps, à l'exception de $\bar{k}[5]$, qui est sans dimension, le système peut s'écrire :

$$\begin{aligned} \bar{y}[3] &= \frac{1 - \bar{y}[1] - \bar{y}[2]}{1 + \bar{k}[5]} & (7.13) \\ \bar{y}[4] &= \bar{k}[5] \cdot \bar{y}[3] \\ \frac{d\bar{y}[1]}{dt} &= -\bar{k}[1] \cdot \bar{y}[1] + 3 \cdot \bar{k}[2] \cdot \bar{y}[2]^3 \\ \frac{d\bar{y}[2]}{dt} &= -\frac{d\bar{y}[1]}{dt} - \bar{k}[3] \cdot \bar{y}[2] + \bar{k}[4] \cdot \bar{y}[3]^2 \end{aligned}$$

Il est possible, connaissant \bar{y} au temps t , de calculer $\frac{d\bar{y}}{dt}$, et d'estimer ainsi \bar{y} au temps $t + dt$. Ce système est donc soluble numériquement, par une méthode d'Euler ou de Runge-Kutta. D'autre part, on peut écrire :

$$\Delta G_i = -RT \ln \frac{k_{-i}}{k_i} \quad (7.14)$$

En identifiant cette équation à l'équation

$$\Delta G_i = \Delta G_i^0 - mC \quad (7.15)$$

on obtient :

$$\begin{aligned} \ln k_i &= \ln k_i^0 + \frac{m_i C}{RT} \\ \ln k_{-i} &= \ln k_{-i}^0 + \frac{m_{-i} C}{RT} \end{aligned} \quad (7.16)$$

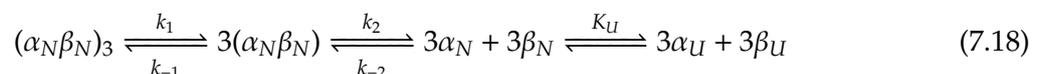
En utilisant ceci, Erilov et al. [120] ont réussi à rendre compte d'une dénaturation à deux états, hors-équilibre. Dans notre cas, on obtient, pour le vecteur \bar{k} l'expression suivante :

$$\ln \bar{k} = \begin{bmatrix} \ln k_1^0 + \frac{m_1 C}{RT} \\ \ln [C - PC]_1^2 k_{-1}^0 + \frac{m_{-1} C}{RT} \\ \ln k_2^0 + \frac{m_2 C}{RT} \\ \ln [C - PC]_2 k_{-1}^0 + \frac{m_{-2} C}{RT} \\ \ln K_U^0 + \frac{m_U C}{RT} \end{bmatrix} \quad (7.17)$$

En utilisant les équations 7.13 et 7.17, il est donc possible, connaissant les fluorescences et absorbances de chaque état, les vitesses de réaction en absence de dénaturant ($k_{\pm i}^0$), ainsi que les dépendances en concentration de dénaturant des vitesses de réaction $m_{\pm i}$, de calculer la fluorescence et l'absorbance d'une solution de C-PC en fonction de la concentration de dénaturant et du temps, lors d'une expérience "à temps constant". Ceci permet, en théorie, d'ajuster une expérience "à temps constant".

Nous avons donc réalisé une expérience "à temps constant" sur une solution de C-PC trimérique à 4 μM , en présence d'urée, en utilisant un lecteur de microplaque. Des exemples de courbes obtenues à différents temps sont représentés dans la figure 7.18.

Nous avons essayé d'ajuster ces courbes avec le modèle décrit par le système d'équations 7.13, mais n'avons pas réussi à obtenir un ajustement convaincant. La première explication est que, le modèle étant extrêmement complexe, les routines classiques d'ajustement par moindres carrés ne trouvent que des minima locaux. Si cette explication est la bonne, il faut soit trouver "à la main" un jeu initial de paramètres suffisamment proche de la solution pour que l'ajustement n'explore pas de minima locaux; soit utiliser un algorithme de minimisation plus sophistiqué. Une autre explication possible est que le modèle, trop simple, ne soit pas assez proche de la réalité. En effet, nous avons considéré le modèle "hors équilibre" le plus simple possible :



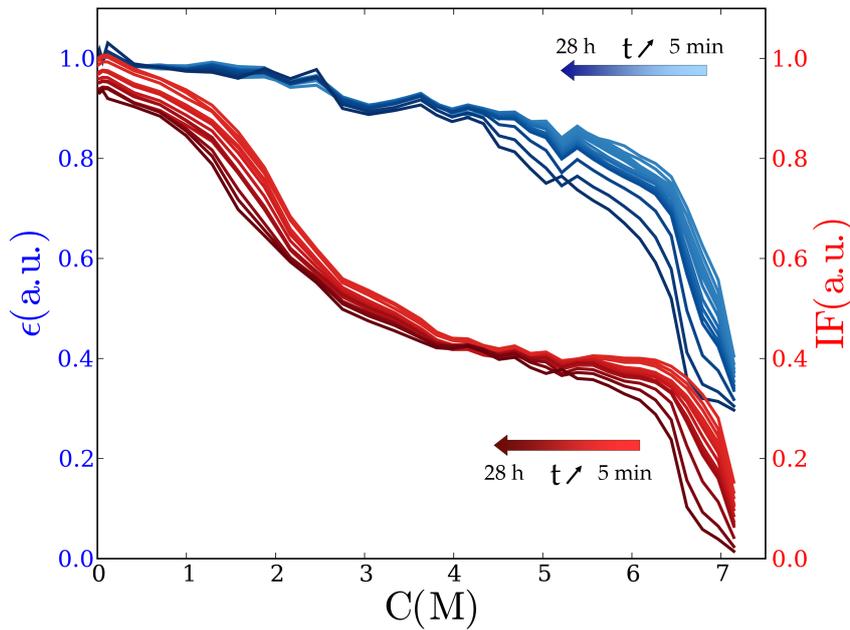
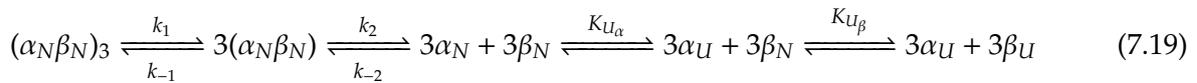
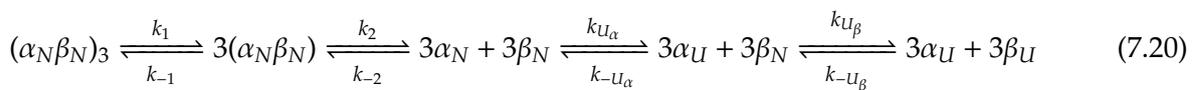


FIG. 7.18 – Absorbance à 620 nm (en bleu) et fluorescence à 640 nm (en rouge) de la C-PC (4 μM), en fonction de la concentration en urée, et pour plusieurs temps, de 5 min à 28 h (du plus clair au plus foncé), lors d’une expérience "à temps constant". Les courbes de transition se décalent vers les basses concentrations avec le temps, comme attendu pour une dénaturation hors équilibre. Il doit être possible d’ajuster ces courbes avec un modèle du type de celui présenté dans l’équation 7.10, mais le minimum du χ^2 est très délicat à trouver, et nous n’avons pas pu à l’heure actuelle produire un ajustement satisfaisant. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

Mais on ne peut exclure d’autres modèles, comme par exemple :

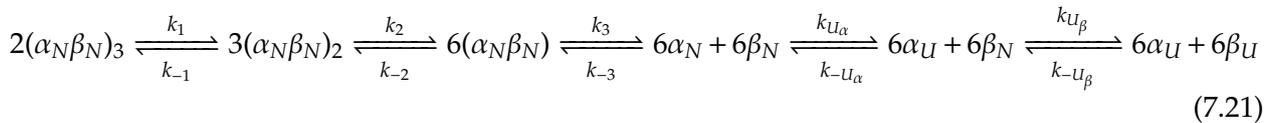


Nous avons en outre considéré que le dépliement des chaînes α et β était à l’équilibre. Ceci est suggéré par le fait que ces deux sous unités sont de faible poids moléculaire ($\sim 17\text{kD}$), et que le dépliement des petites protéines correspond généralement à des temps très courts ($\sim 1 \mu\text{s} - 100 \mu\text{s}$). Mais rien ne vient prouver cette hypothèse, et il faudrait donc peut être considérer le modèle suivant :

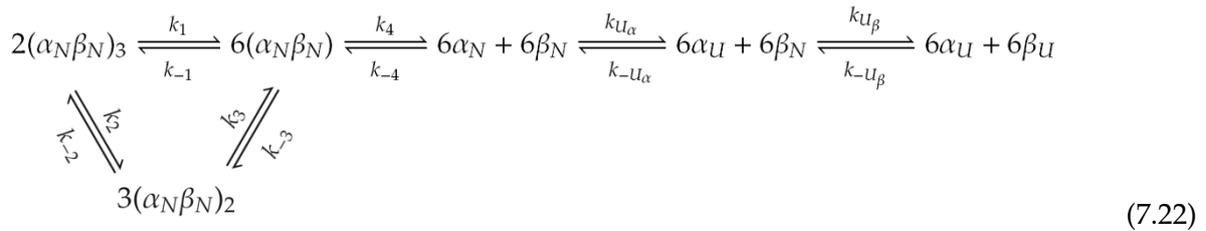


De plus, nous n’avons pas considéré l’espèce dimérique $(\alpha\beta)_2$, car celle-ci n’apparaît pas dans la littérature. Il est cependant possible qu’elle apparaisse de manière transitoire, et que sa population reste toujours très faible, mais qu’elle soit suffisante pour affecter le devenir des autres populations.

Le modèle deviendrait alors :



Pour finir, le "bon" modèle n'est pas forcément linéaire. Il peut être encore plus complexe, comme par exemple :



Bref, la complexité du modèle est extensible à volonté. Il convient donc de trouver le modèle le plus simple rendant compte des données. Le modèle que nous avons choisi (equ 7.10) nous semble raisonnable, d'autant plus que les titrations à vitesse constante sont bien décrites par un modèle à 4 états. Il nous semble donc que le modèle n'est pas en défaut, mais seulement l'ajustement de ce modèle.

Le choix de l'urée pour l'expérience "à *temps constant*" n'était pas en fait le plus judicieux. En effet, les trois transitions ne sont pas très clairement visibles, les deux dernières transition se chevauchant de manière non négligeable. Les transitions apparaissent plus nettement en GdmSCN (voir figure 7.1). Nous avons donc réalisé une expérience identique à celle de la figure 7.18, en remplaçant l'urée par le GdmSCN. Les courbes obtenues sont présentées sur la figure 7.18. Ces courbes sont encore plus claires, mais sont toujours difficiles à ajuster.

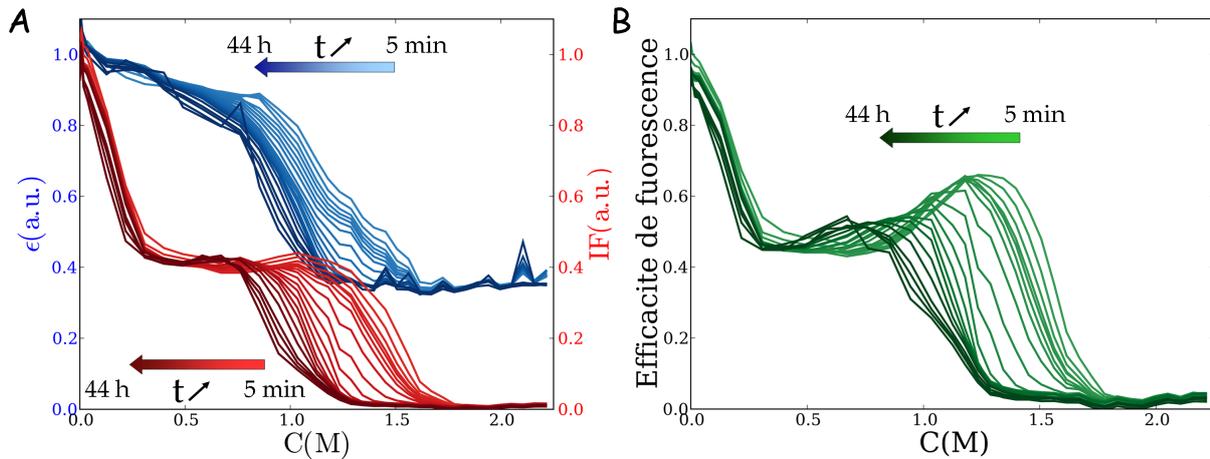


FIG. 7.19 – A : Absorbance à 620 nm (en bleu) et fluorescence à 640 nm (en rouge) de la C-PC ($4 \mu\text{M}$), en fonction de la concentration en urée, et pour plusieurs temps, de 5 min à 44 h (du plus clair au plus foncé), lors d'une expérience "à temps constant". B : Efficacité de fluorescence, soit le rapport $\frac{IF}{\epsilon}$. Il est clair, surtout au vu des courbes d'efficacité de fluorescence (avec une forte remontée à concentrations intermédiaires de GdmSCN) que ces courbes ne peuvent correspondre qu'à un modèle à 4 états au moins. Les courbes de transition se décalent vers les basses concentrations avec le temps, comme attendu pour une dénaturation hors équilibre. Il doit être possible d'ajuster ces courbes avec un modèle du type de celui présenté dans l'équation 7.10, mais le minimum du χ^2 est très délicat à trouver, et nous n'avons pas pu à l'heure actuelle produire un ajustement satisfaisant. On peut noter que les courbes d'absorbance deviennent bruitées à temps long. Ceci est dû à la formation de petites bulles, n'affectant pas la fluorescence, plus "robuste" optiquement (voir partie 3.2.3). Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.

7.3 Résumé

Il semble que la C-PC trimérique (à 4 μM , en tampon phosphate 10 mM, pH=7) se dénature, sous l'action de la température ou de dénaturants chimiques, selon un mécanisme à 3 transitions (et donc à 4 états). Les premières transitions doivent correspondre respectivement à la dissociation des trimères en monomères $((\alpha_N\beta_N)_3 \rightleftharpoons 3(\alpha_N\beta_N))$ et à la dissociation des monomères $(\alpha_N\beta_N) \rightleftharpoons \alpha_N + \beta_N$, la dernière étape correspondant au dépliement des chaînes α et β $(\alpha_N + \beta_N \rightleftharpoons \alpha_U + \beta_U)$. L'état final correspond bien à un état complètement déplié : la conformation de l'état final est une conformation de type chaîne polymère gaussienne ou à volume exclu (il ne nous a pas été possible de discriminer entre ces deux conformations). Il est apparu clairement que ce mécanisme n'était pas à l'équilibre, à l'échelle de temps classique de l'expérimentation en biophysique ou biochimie, soit à l'échelle de la minute ou de l'heure, voire de la journée. Nous avons tenté de modéliser cette dénaturation à l'aide du modèle le plus simple possible : $(\alpha_N\beta_N)_3 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} 3(\alpha_N\beta_N) \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} 3\alpha_N + 3\beta_N \xrightleftharpoons{K_U} 3\alpha_U + 3\beta_U$, mais nous n'avons pas pu, à l'heure actuelle, ajuster ce modèle de manière convenable.

A l'heure actuelle des expériences sont toujours en cours, en vue d'obtenir les meilleures données possibles, et afin de faciliter l'ajustement d'un modèle.

Conclusions et perspectives

Le dépliement de la calmoduline

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié la dénaturation, par la chaleur et par la pression, de la calmoduline, par spectroscopies optiques et par diffusion de neutrons. La combinaison de ces techniques a permis d'étudier les aspects thermodynamiques, structuraux et dynamiques de la dénaturation de cette protéine modèle.

Aspects thermodynamiques

La comparaison des paramètres thermodynamiques issus de différentes techniques (absorbance, fluorescence, dichroïsme), mais surtout la comparaison de paramètres thermodynamiques obtenus en dénaturation thermique et sous pression, a permis de démontrer que les modèles de dénaturation du type $N \xrightleftharpoons{K} D$, bien que capables de décrire les courbes de transition en fonction d'un paramètre donné (température, pression), et obtenues par une technique donnée, ne peuvent décrire le processus de dénaturation dans son ensemble. Il apparaît clairement que la dénaturation de la calmoduline fait intervenir des états intermédiaires, qui peuvent être vus comme des pièges cinétiques dans l'entonnoir de repliement. Ces "états intermédiaires" rendent les chemins de dénaturation en température et sous pression différents. Ainsi, l'étude de la dénaturation des protéines par la pression, bien qu'extrêmement délicate techniquement se justifie pleinement, et apparaît comme une étape indispensable pour la compréhension du dépliement et du repliement des protéines.

Aspects structuraux

L'utilisation de la diffusion de neutrons aux petits angles, technique parfaitement adaptée à l'étude de la conformation de protéines (et de macromolécules organiques en général), notamment sous pression, nous a permis d'obtenir des informations précises sur les états natifs et dénaturés de la calmoduline. la DNPA sous pression, par exemple, a permis d'identifier les états intermédiaires observés sous pression (autour de 3000 bar), pour les deux formes de calmoduline, comme compacts. Elle a également mis au jour une asymétrie de comportement des deux formes de calmoduline sous pression : dilatation des domaines sous pression pour la forme apo ; compaction pour la forme holo. Cette observation, bien que non expliquée, nous semble un point important, à étudier plus en avant.

Pour finir, la DNPA a permis d'identifier l'état final de la dénaturation thermique de la forme apo de la calmoduline comme ayant une conformation "*de type polymère*", proche d'une chaîne polymère Gaussienne, avec toutefois des structures résiduelles locales. Il reste à déterminer les conformations des états dénaturés sous pression des formes apo et holo de la calmoduline, pour vérifier si ces états sont identiques pour les deux formes ; mais surtout pour comparer les conformations des états dénaturés par la chaleur et par la pression. Cette expérience a fait l'objet d'une

proposition d'expérience sur D22, à l'ILL ; et nous avons réalisé, au laboratoire, une nouvelle cellule pression à géométrie plane, adaptée à la DNPA. Malheureusement, cette expérience ne pourra être réalisée que début septembre, et ne pourra donc pas être incluse dans ce manuscrit.

Aspects dynamiques

La diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol, quant à elle, nous a permis de comparer les dynamiques des états natifs et dénaturés par la chaleur de l'apo-calmoduline, à l'échelle de la pico-seconde et de l'Å. Il est apparu que la dynamique, à ces échelles, des états dépliés par la chaleur de l'apo-calmoduline, était plus hétérogène que celle de l'état natif. Ceci permet de conclure que le facteur principal déterminant la dynamique des atomes de l'apo-calmoduline n'est pas l'exposition au solvant des résidus, ou leur appartenance au coeur ou à la surface de la protéine, mais la distance de ces atomes au squelette peptidique, en accord avec les résultats obtenus par Serge Dellerue [91] sur la C-PC native, en comparant diffusion quasi-élastique de neutrons et simulations par dynamique moléculaire. Il serait intéressant de comparer les dynamiques des états dénaturés par la chaleur, et par la pression ; mais nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir de résultats concluants quant à ce point.

Réversibilité de la dénaturation

L'étude systématique et détaillée de la réversibilité de la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline a fait apparaître des hystérésis intéressants, généralement signe de non-équilibre. Se pose donc la question de savoir si l'état natif de l'apo-calmoduline ne serait pas un état métastable. Quoiqu'il en soit, ceci montre qu'il est intéressant d'étudier précisément la réversibilité de la dénaturation. Il est payant de faire des mesures "de retour", symétriques des mesures de dénaturation, et de ne pas se contenter de faire un retour rapide à température ou pression ambiante.

Perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons progressé sur le plan technique, en ce qui concerne les cellules et dispositifs "pression". Nous avons, entre autres, réalisé une cellule "pression" adaptée à la DNPA, à géométrie plane et à fenêtres amovibles. Cette cellule permet de réaliser plus facilement des expériences sous pression, jusqu'à 7000 bar, en changeant uniquement les fenêtres au cours de l'expérience, pour atteindre des pressions de plus en plus élevées, en sacrifiant au fur et à mesure le rapport signal/bruit. Nous avons ainsi réalisé une expérience sur les deux formes de calmoduline, en régime dilué (3 g/L) à basse pression (jusqu'à 3000 bar), et en régime semi-dilué (10 g/L) à plus haute pression. Cette expérience est actuellement en cours d'analyse.

Le niobium s'est révélé un très bon matériau pour la diffusion de neutrons sous pression, à Q intermédiaire ($Q > 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$). Malheureusement, ce matériau ne permet pas de dépasser 3000 bar. Une solution pour dépasser cette pression est de durcir le niobium par ajout d'impuretés. Une

piste semble être l'ajout de faibles quantités d'oxygène (0,2 %). Un ajout contrôlé et très homogène d'oxygène devrait permettre d'atteindre des pressions bien plus élevées (de l'ordre de 7000 bar), sans trop altérer le signal du matériau. Ceci permettrait de réaliser des expériences à haute pression en régime dilué, et ainsi d'obtenir des informations précises sur la conformation et la compressibilité des états dépliés sous pression de la calmoduline.

En ce qui concerne la dynamique, il serait intéressant d'obtenir des données de meilleure statistique et avec une meilleure définition en vecteur d'onde, pour pouvoir ajuster des modèles plus complexes et plus proches de la réalité. Il serait également intéressant de poursuivre ces études, à plus grand vecteur de diffusion. En effet, seules les valeurs à grand Q de l'EISF permettent de déterminer précisément la proportion de protons immobiles ; mais surtout de faire la différence entre les divers modèles utilisés (diffusion dans une sphère, rotation sur une sphère, etc.), et entre les différentes distributions utilisées pour décrire l'hétérogénéité de la dynamique interne (distribution lognormale, Gaussienne, ou autres...).

Le dépliement de la C-phycoyanine

Après avoir étudié le dépliement de la calmoduline, système monomérique, nous nous sommes intéressés à la dénaturation d'un système oligomérique, donc plus complexe, la C-phycoyanine.

Un dépliement hors équilibre

La C-PC trimérique (à 4 μM , en tampon phosphate 10 mM, pH=7) se dénature, sous l'action de la température ou de dénaturants chimiques, selon un mécanisme séquentiel, à 3 transitions (et donc à 4 états). Les premières transitions correspondent respectivement à la dissociation des trimères en monomères et à la dissociation des monomères (les "monomères" sont en fait des hétérodimères), la dernière étape correspondant au dépliement des chaînes α et β . L'état final correspond bien à un état complètement déplié : la conformation de l'état final est une conformation de type chaîne polymère gaussienne ou à volume exclu (il ne nous a pas été possible de discriminer entre ces deux conformations). Il est apparu clairement que ce mécanisme n'était pas à l'équilibre, à l'échelle de temps classique de l'expérimentation en biophysique ou biochimie, soit à l'échelle de la minute ou de l'heure, voire de la journée. Nous avons tenté de modéliser cette dénaturation à l'aide du modèle le plus simple possible : $(\alpha_N\beta_N)_3 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} 3(\alpha_N\beta_N) \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} 3\alpha_N + 3\beta_N \xrightleftharpoons{K_U} 3\alpha_U + 3\beta_U$, faisant intervenir des vitesses d'association et de dissociation k_{on} et k_{off} , et considérant que le dépliement était, lui, à l'équilibre, mais nous n'avons pas pu, à l'heure actuelle, ajuster ce modèle de manière convenable.

Perspectives

Ce travail est loin d'être achevé. Il reste à effectuer les mesures d'absorbance à différentes rampes de température, et ainsi déterminer les énergies d'activation E_{off} . Il faudrait également obtenir des meilleures mesures "à temps constant" en dénaturation chimique ; et les ajuster avec un modèle. La vérification de la cohérence des résultats obtenus en dénaturation chimique et en dénaturation thermique permettrait de valider l'ensemble des résultats obtenus. Pour finir, il serait intéressant d'étudier les réactions inverses. Autrement dit, de partir d'un état complètement dénaturé, et de diminuer la température ou la concentration de dénaturant. Ceci permettrait, par exemple, de vérifier que le dépliement proprement dit des chaînes α et β dissociées est à l'équilibre, et que seules les différentes étapes d'association/dissociation de la C-PC sont hors équilibre.

Dans un futur plus lointain, il serait intéressant d'étudier la dénaturation sous pression de la C-PC. La pression est en effet bien plus adaptée que la température ou les agents dénaturants à l'étude de la dénaturation de la C-PC. Le seul obstacle technique est la mise au point de dispositifs automatisés d'application de la pression, capables d'imposer des rampes contrôlées de pression. La C-PC absorbant et fluorescent dans le visible, il est tout à fait possible de suivre la dénaturation sous pression, grâce aux dispositifs de Gaston Hui Bon Hoa.

Conclusion générale - De l'utilité de la pression

Au cours de ce travail de thèse nous avons commencé par étudier la dénaturation thermique et sous pression d'une protéine modèle, la calmoduline. Nous avons poursuivi notre travail par l'étude de la dénaturation thermique et chimique d'une protéine oligomérique, la C-phycoyanine.

La pression a d'énormes avantages sur la température et les dénaturants chimiques. En fait, elle combine tous les avantages de ces deux méthodes, et même plus. La "thermodynamique" de la pression est beaucoup plus simple que celle de la dénaturation chimique, ou du moins plus exacte ; et la pression limite généralement, voire prévient, l'agrégation, souvent problématique en dénaturation thermique. Pour la C-phycoyanine, elle éviterait sûrement les problèmes d'agrégation rencontrés en dénaturation thermique, même à faible concentration. Pour la calmoduline, elle permettrait de travailler à des pH plus proches du point isoélectrique, et à des forces ioniques plus élevées. Les mesures des valeurs de la pression imposées sont au moins aussi précises que celles de la température, et bien plus que celles de la concentration de dénaturant (l'erreur de mesure sur la pression est généralement de l'ordre du bar, et est donc très faible comparée aux valeurs de pressions appliquées, de l'ordre de 1000 bar ; il est par contre quasiment impossible de descendre au dessous du % d'erreur pour les concentrations en dénaturant). Pour la C-phycoyanine, on obtiendrait ainsi des courbes beaucoup plus "lisses" que celles obtenues avec des dénaturants chimiques. L'homogénéisation de la pression est quasiment instantanée. Il n'y a donc pas de gradient dans l'échantillon, comme pour la température ; et il est donc possible d'effectuer des mesures cinétiques

continues, du dixième de seconde jusqu'à l'heure, et même bien au delà (pour la température ou les dénaturants chimiques, il faut utiliser un stop flow pour les mesures inférieures à la minute ; et des dispositifs classiques au-delà). Pour la C-PC, cela permettrait des mesures "à temps constant" sur une gamme de temps bien plus étendue qu'en dénaturation chimique ou thermique. La pression permet d'effectuer des mesures à vitesse ou à temps constant sans imposer de dilution initiale au système (en dénaturation chimique, il nous a fallu imposer des facteurs de dilution 4 au minimum ; en dénaturation thermique, il faut à peu près les mêmes facteurs de dilution pour les expériences "à temps constant"). Si, pour les dénaturations à l'équilibre de protéines monomériques (comme la calmoduline) ces facteurs de dilution sont sans importance ; ils sont problématiques pour les protéines oligomériques hors équilibre sur les temps de l'expérimentation humaine (comme la C-PC, pour laquelle la simple dilution entraîne une réponse cinétique).

Pour finir, la pression ne déplie pas les protéines exactement de la même façon que la température ou les dénaturants chimiques. La pression favorise les conformations de faible volume spécifique, alors que la température favorise les conformations de grande entropie. Le mode d'action des dénaturants chimiques est, lui, plus mystérieux ; et la dénaturation chimique est donc un peu à part des deux autres principales dénaturations (thermique et sous pression). Les dénaturants chimiques sont tous des chaotropes, qui modifient la structure de l'eau ; et une solution de dénaturant chimique à forte concentration n'a plus grand chose à voir avec de l'eau. Les protéines, ainsi privées de leur solvant favori, se déplient. Il se trouve que la pression et la température conduisent toutes deux au dépliement de protéines, car les conformations dépliées sont à la fois les conformations de plus haute entropie et de plus faible volume spécifique. Leur mode d'action différent produit toutefois des chemins de dépliement potentiellement différents. Pour la calmoduline, par exemple, apparaissent sous pression des états intermédiaires invisibles en dénaturation thermique. L'étude de la dénaturation sous pression des protéines apparaît donc comme une étape indispensable à la compréhension du dépliement et du repliement des protéines.

Bibliographie

- [1] Privalov P. L. Intermediate states in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 258(5) :707–725, 1996. 122.
- [2] Dill K. A. Polymer principles and protein folding. *Protein Science*, 8(6) :1166–1180, 1999. 103.
- [3] Yon J. M. Protein folding : concepts and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(7) :557–567, 1997. 151.
- [4] Ptitsyn O. B. Structures of folding intermediates. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(1) :74–78, 1995.
- [5] Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1) :49–60, 2003. 148.
- [6] Levinthal C. Are there pathways for protein folding. *J. Chim. Phys.*, 65(1) :44–45, 1968.
- [7] Ptitsyn O. B. How does protein-synthesis give rise to the 3d-structure. *Febs Letters*, 285(2) :176–181, 1991. 68.
- [8] Huang G. S. and Oas T. G. Submillisecond folding of monomeric λ repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15) :6878–6882, 1995. 41.
- [9] Chan C. K., Hu Y., Takahashi S., Rousseau D. L., Eaton W. A., and Hofrichter J. Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5) :1779–1784, 1997. 54.
- [10] Fersht A. R. Nucleation mechanisms in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(1) :3–9, 1997. 72.
- [11] Dill K. A. and Chan H. S. From levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.*, 4(1) :10–19, 1997.
- [12] K. A. Dill. Folding proteins : finding a needle in a haystack. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(1) :99–103, 1993. 37.
- [13] Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 56 :395–433, 1987.
- [14] Means AR and Dedman JR. Calmodulin - an intracellular calcium receptor. *Nature*, 285(5760) :73–7, 1980.
- [15] Gnegy ME. Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33 :45–70, 1993.

- [16] Babu YS, Bugg CE, and Cook WJ. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 204(1) :191–204, 1988.
- [17] Kretsinger RH and Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. ii. structure determination and general description. *J. Biol. Chem.*, 248(9) :3313–26, 1973.
- [18] Seaton BA, Head JF, Engelman DM, and Richards FM. Calcium-induced increase in the radius of gyration and maximum dimension of calmodulin measured by small-angle x-ray scattering. *Biochemistry*, 24(24) :6740–3, 1985.
- [19] LaPorte DC, Wierman BM, and Storm DR. Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochemistry*, 19(16) :3814–9, 1980.
- [20] M. A. Wilson and A. T. Brunger. The 1.0 Å crystal structure of Ca²⁺-bound calmodulin : an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J. Mol. Biol.*, 301(5) :1237–1256, 2000. 60.
- [21] Wallace R.W., Talant E.A., and Cheung W.Y. *Assay, preparation, and properties of calmodulin. Calcium and cell function*, Vol. 1, pp. 13–40. Academic Press, New York, 1980.
- [22] Masino L, Martin SR, and Bayley PM. Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin. *Protein Sci.*, 9(8) :1519–29, 2000.
- [23] Maulet Y and Cox JA. Structural changes in melittin and calmodulin upon complex formation and their modulation by calcium. *Biochemistry*, 22(24) :5680–6, 1983.
- [24] Ikura M., Clore G. M., Gronenborn A. M., Zhu G., Klee C. B., and Bax A. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional nmr. *Science*, 256(5057) :632–638, 1992. 89.
- [25] Kurokawa H., Osawa M., Kurihara H., Katayama N., Tokumitsu H., Swindells M. B., Kainosho M., and Ikura M. Target-induced conformational adaptation of calmodulin revealed by the crystal structure of a complex with nematode Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase peptide. *Journal of Molecular Biology*, 312(1) :59–68, 2001. 40.
- [26] Fallon J. L. and Quijoch F. A. A closed compact structure of native Ca²⁺-calmodulin. *Structure*, 11(10) :1303–U7, 2003. 23.
- [27] Grabarek Z. Structure of a trapped intermediate of calmodulin : Calcium regulation of EF-hand proteins from a new perspective. *Journal of Molecular Biology*, 346(5) :1351–1366, 2005. 58.
- [28] Schumacher M. A., Crum M., and Miller M. C. Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/sk potassium channel gating domain complex. *Structure*, 12(5) :849–860, 2004. 52.
- [29] Kuboniwa H, Tjandra N, Grzesiek S, Ren H, Klee CB, and Bax A. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.*, 2(9) :768–76, 1995.
- [30] Kainosho M., Torizawa T., Iwashita Y., Terauchi T., Ono A. M., and Guntert P. Optimal isotope labelling for nmr protein structure determinations. *Nature*, 440(7080) :52–57, 2006. 37.

- [31] Heidorn D. B. and Trewhella J. Comparison of the crystal and solution structures of calmodulin and troponin c. *Biochemistry.*, 27(3) :909–15, 1988.
- [32] Biekofsky RR, Martin SR, McCormick JE, Masino L, Fefeu S, Bayley PM, and Feeney J. Thermal stability of calmodulin and mutants studied by (1)h-(15)n hsqc nmr measurements of selectively labeled [(15)n]ile proteins. *Biochemistry*, 41(21) :6850–9, 2002.
- [33] Komeiji Y, Ueno Y, and Uebayasi M. Molecular dynamics simulations revealed ca(2+)-dependent conformational change of calmodulin. *FEBS Lett.*, 521(1-3) :133–9, 2002.
- [34] Project E, Friedman R, Nachliel E, and Gutman M. A molecular dynamics study of the effect of ca2+ removal on calmodulin structure. *Biophys. J.*, 90(11) :3842–50, 2006.
- [35] Derjaguin B V and Landau L. Theory of stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta physicochim. URSS*, 14 :633–662, 1997.
- [36] Verwey E J W and Overbeek J T G. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, Amsterdam, 1948.
- [37] Israelachvili J. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London, 1992.
- [38] Alexey Onufriev et al. H++ website <http://biophysics.cs.vt.edu/H++/>. Virginia Tech - Computer Science.
- [39] Tachiki H, Kato R, Masui R, Hasegawa K, Itakura H, Fukuyama K, and Kuramitsu S. Domain organization and functional analysis of thermus thermophilus muts protein. *Nucleic. Acids. Res.*, 26(18) :4153–9, 1998.
- [40] Markossian K. A., Khanova H. A., Kleimenov S. Y., Levitsky D. I., Chebotareva N. A., Asryants R. A., Muronetz V. I., Saso L., Yudin I. K., and Kurganov B. I. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 45(44) :13375–13384, 2006.
- [41] Gorovits B. M. and Horowitz P. M. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. *Biochemistry*, 37(17) :6132–6135, 1998.
- [42] Foguel D., Suarez M. C., Ferrao-Gonzales A. D., Porto T. C. R., Palmieri L., Einsiedler C. M., Andrade L. R., Lashuel H. A., Lansbury P. T., Kelly J. W., and Silva J. L. Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17) :9831–9836, 2003.
- [43] Royer C.A. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1595(1-2) :201–209, 1978.
- [44] Tanford C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 23 :121–282, 1968.
- [45] Schellman J.A. Solvent denaturation. *Biopolymers*, 17 :1305–1322, 1978.

- [46] Murphy R. F. and O'Carra P. Reversible denaturation of c-phycoyanin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 214(2) :371–373, 1970. 10.
- [47] Hawley S. A. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10(13) :2436–2442, 1971.
- [48] Lesch H., Hecht C., and Friedrich J. Protein phase diagrams : The physics behind their elliptic shape. *Journal of Chemical Physics*, 121(24) :12671–12675, 2004.
- [49] Panick G., Vidugiris G. J. A., Malessa R., Rapp G., Winter R., and Royer C. A. Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 38(13) :4157–4164, 1999.
- [50] Zhang J., X. D. Peng, A. Jonas, and J. Jonas. Nmr study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease a. *Biochemistry*, 34(27) :8631–8641, 1995.
- [51] Smeller L. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2) :11–29, 2002.
- [52] "Les spectromètres" http://www-llb.cea.fr/presllb/Part_3.pdf.
- [53] "La source et les faisceaux sortis" http://www-llb.cea.fr/presllb/Part_2.pdf.
- [54] "Soustraction du bruit de fond en DNPA" <http://www-llb.cea.fr/menl/BdF.pdf>.
- [55] Petrillo C. and Sacchetti F. Analysis of neutron-diffraction data in the case of high-scattering cells. *Acta Crystallographica Section A*, 46 :440–449, 1990. 12 Part 6.
- [56] "Calibration absolue par la mesure du faisceau direct" <http://www-llb.cea.fr/menl/DNPA-Calibration.pdf>.
- [57] Gough C. A. and Bhatnagar R. S. Differential stability of the triple helix of (pro-pro-gly)(10) in h₂o and d₂o : Thermodynamic and structural explanations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17(3) :481–491, 1999. 34.
- [58] Lopez M M and Makhatadze G I. Solvent isotope effect on thermodynamics of hydration. *Biophys. Chem.*, 74(2) :117–125, 1998.
- [59] Gripon C., Legrand L., Rosenman I., Vidal O., Robert M. C., and Boue F. Lysozyme solubility in h₂o and d₂o solutions : A simple relationship. *Journal of Crystal Growth*, 177(3-4) :238–247, 1997. 30.
- [60] Makhatadze G I, Clore GM, and Gronenborn AM. Solvent isotope effect and protein stability. *Nat. Struct. Biol.*, 2(10) :852–855, 1995.
- [61] Oas T G and Toone E J. Thermodynamic solvent isotope effects and molecular hydrophobicity. *Adv. Biophys. Chem.*, 6 :1–52, 1997.
- [62] Lee J. J. and Berns D. S. Protein aggregation - effect of deuterium oxyde on large protein aggregates of c-phycoyanin. *Biochemical Journal*, 110(3) :465–470, 1968. 21.
- [63] J. P. Cotton. Dnpa : introduction et variations sur le contraste. *Journal De Physique IV*, 9(Pr1) :21–49, 1999.

- [64] Calmettes P., Durand D., Desmadril M., Minard P., Receveur V., and Smith J. C. How random is a highly denatured protein? *Biophysical Chemistry*, 53(1-2) :105–113, 1994. 52.
- [65] Fujisawa T, Ueki T, and Iida S. Structural change of troponin c molecule and its domains upon Ca^{2+} binding in the presence of Mg^{2+} ions measured by a solution x-ray scattering technique. *J. Biochem. (Tokyo)*, 107(3) :343–51, 1990.
- [66] Zimm B H. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.*, 16(12) :1093–99, 1948.
- [67] Yang C and Kuczera K. Molecular dynamics simulations of calcium-free calmodulin in solution. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 19(5) :801–19, 2002.
- [68] Torok K., Lane A. N., Martin S. R., Janot J. M., and Bayley P. M. Effects of calcium binding on the internal dynamic properties of bovine brain calmodulin, studied by nmr and optical spectroscopy. *Biochemistry*, 31(13) :3452–3462, 1992. 79.
- [69] Volino F. and Dianoux A. Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry : general formalism and application to diffusion inside a sphere. *J. Molecular Physics*, 41(2) :271–279, 1980.
- [70] Zanotti J. M., Bellissent-Funel M. C., and Parello J. Dynamics of a globular protein as studied by neutron scattering and solid-state nmr. *Physica B*, 234 :228–230, 1997. 3.
- [71] Carpentier L., Bee M., Giroudgodquin A. M., Maldivi P., and Marchon J. C. Alkyl chain motions in columnar mesophases - a quasielastic neutron scattering study of dicopper tetrapalmitate. *Molecular Physics*, 68(6) :1367–1378, 1989. 6.
- [72] Blanco S. E., Gasull E. I., and Ferretti F. H. Uv solvatochromic shifts of 4-hydroxybenzophenone and 2,4-dihydroxybenzophenone in ethanol-acetonitrile mixtures. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(13) :2985–2995, 2003. 21.
- [73] Latypov R. F., Cheng H., Roder N. A., Zhang J., and Roder H. Structural characterization of an equilibrium unfolding intermediate in cytochrome c. *Journal of Molecular Biology*, 357(3) :1009–1025, 2006. 90.
- [74] Ruan K. C., Xu C. H., Yu Y., Li J., Lange R., Bec N., and Balny C. Pressure-exploration of the 33-kda protein from the spinach photosystem ii particle. *European Journal of Biochemistry*, 268(9) :2742–2750, 2001. 39.
- [75] Geuskens G. and Soukrati A. Investigation of polyacrylamide hydrogels using 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate as fluorescent probe. *European Polymer Journal*, 36(8) :1537–1546, 2000.
- [76] De Filippis V., de Laureto P.P., Toniutti N., and Fontana A. Acid-induced molten globule state of a fully active mutant of humaninterleukin-6. *Biochemistry*, 35(35) :11503–11, 1996.
- [77] Sorensen B. R. and Shea M. A. Interactions between domains of apo calmodulin alter calcium binding and stability. *Biochemistry*, 37(12) :4244–4253, 1998. 70.

- [78] Protasevich I, Ranjbar B, Lobachov V, Makarov A, Gilli R, Briand C, Lafitte D, and Haiech J. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin : role of electrostatic mutations. *Biochemistry*, 36(8) :2017–24, 1997.
- [79] Lange R., Frank J., Saldana J. L., and Balny C. Fourth derivative uv-spectroscopy of proteins under high pressure .1. factors affecting the fourth derivative spectrum of the aromatic amino acids. *Eur. Biophys. J.*, 24(5) :277–283, 1996. 39.
- [80] Kleinjung J, Fraternali F, Martin SR, and Bayley PM. Thermal unfolding simulations of apo-calmodulin using leap-dynamics. *Proteins*, 50(4) :648–56, 2003.
- [81] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, and D. Tsernoglou. Temperature dependent x-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 280(5723) :558–563, 1979. 38.
- [82] M. Karplus and G. A. Petsko. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 347(6294) :631–639, 1990. 29.
- [83] B. F. Rasmussen, A. M. Stock, D. Ringe, and G. A. Petsko. Crystalline ribonuclease a loses function below the dynamical transition at 220 k. *Nature*, 357(6377) :423–424, 1992. 17.
- [84] Russo D., Perez J., Zanotti J. M., Desmadril M., and Durand D. Dynamic transition associated with the thermal denaturation of a small beta protein. *Biophysical Journal*, 83(5) :2792–2800, 2002. 57.
- [85] M. Tehei, D. Madern, C. Pfister, and G. Zaccai. Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and bsa measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25) :14356–14361, 2001. 32.
- [86] Receveur V., Calmettes P., Smith J. C., Desmadril M., Coddens G., and Durand D. Pico-second dynamical changes on denaturation of yeast phosphoglycerate kinase revealed by quasielastic neutron scattering. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 28(3) :380–387, 1997. 32.
- [87] M. Bée. *Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 1988.
- [88] Smith J. C. Protein dynamics : comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 24(3) :227–291, 1991. 223.
- [89] Perez J., Zanotti J. M., and Durand D. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophysical Journal*, 77(1) :454–469, 1999. 46.
- [90] Zanotti J. M., Bellissent-Funel M. C., and Parello J. Hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and nmr : The case of the typical ef-hand calcium-binding parvalbumin. *Biophys. J.*, 76(5) :2390–2411, 1999. 96.
- [91] Dellerue S., Petrescu A. J., Smith J. C., and Bellissent-Funel M. C. Radially softening diffusive motions in a globular protein. *Biophysical Journal*, 81(3) :1666–1676, 2001. 69.

- [92] Balog E., Becker T., Oettl M., Lechner R., Daniel R., Finney J., and Smith J. C. Direct determination of vibrational density of states change on ligand binding to a protein. *Physical Review Letters*, 93(2) :4, 2004. 40.
- [93] Moritsugu K. and Smith J. C. Langevin model of the temperature and hydration dependence of protein vibrational dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(24) :12182–12194, 2005. 60.
- [94] Drexel W. and Peticolas W. L. Neutron-scattering spectroscopy of the alpha- and beta- forms of poly-l-alanine. motion of the methyl side chain. *Biopolymers*, 14(4) :715–721, 1975. 12.
- [95] Papish AL, Tari LW, and Vogel HJ. Dynamic light scattering study of calmodulin-target peptide complexes. *Biophys. J.*, 83(3) :1455–64, 2002.
- [96] Oono Y. Crossover-behavior of transport-properties of dilute polymer solutions : Renormalization group approach. iii. *Journal of Chemical Physics*, 79(9) :4629–4642, 1983. 81.
- [97] Leal S. S. and Gomes C. M. Studies of the molten globule state of ferredoxin : Structural characterization and implications on protein folding and iron-sulfur center assembly. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(3) :606–616, 2007. 69.
- [98] Ruan K. C., Lange R., Bec N., and Balny C. A stable partly denatured state of trypsin induced by high hydrostatic pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(1) :150–154, 1997. 26.
- [99] Bellissent-Funel M. C., Filabozzi A., and Chen S. H. Measurement of coherent debye-waller factor in in vivo deuterated c-phycoyanin by inelastic neutron scattering. *Biophysical Journal*, 72(4) :1792–1799, 1997. 23.
- [100] Dellerue S. and Bellissent-Funel M. C. Relaxational dynamics of water molecules at protein surface. *Chemical Physics*, 258(2-3) :315–325, 2000. 58.
- [101] Dellerue S., Petrescu A., Smith J. C., Longeville S., and Bellissent-Funel M. C. Collective dynamics of a photosynthetic protein probed by neutron spin-echo spectroscopy and molecular dynamics simulation. *Physica B*, 276 :514–515, 2000. 6.
- [102] Gabel F. and Bellissent-Funel M. C. C-phycoyanin hydration water dynamics in the presence of trehalose : An incoherent elastic neutron scattering study at different energy resolutions. *Biophysical Journal*, 92(11) :4054–4063, 2007. Gabel, Frank Bellissent-Funel, Marie-Claire 55.
- [103] Nield J., Rizkallah P. J., Barber J., and Chayen N. E. The 1.45 angstrom three-dimensional structure of c-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *synechococcus elongatus*. *Journal of Structural Biology*, 141(2) :149–155, 2003. 25.
- [104] Maccoll R., Lee J. J., and Berns D. S. Protein aggregation in c-phycoyanin - studies at very low concentrations with photoelectric scanner of ultracentrifuge. *Biochemical Journal*, 122(4) :421–426, 1971. 13.
- [105] Glazer A. N. Light guides - directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1) :1–4, 1989. 38.

- [106] Glazer AN, Fang S, and Brown DM. Spectroscopic properties of c-phycoyanin and of its alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.*, 248(16) :5679–85, 1973.
- [107] Lundell D. J. and Glazer A. N. Allophycoyanin b - a common beta subunit in synechococcus allophycoyanin b (lambda max 670 nm) and allophycoyanin (lambda max 650 nm). *Journal of Biological Chemistry*, 256(23) :2600–2606, 1981. 36.
- [108] Rigbi M., Rosinski J., Siegelman H. W., and Sutherland J. C. Cyanobacterial phycobilisomes : Selective dissociation monitored by fluorescence and circular dichroism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77(4) :1961–1965, 1980. 34.
- [109] Huang C and Berns DS. An ultracentrifuge study of c-phycoyanin aggregation. *Biochemistry*, 20(24) :7016–21, 1981.
- [110] Berns DS and Scott E. Protein aggregation in a thermophilic protein. phycoyanin from synechococcus lividus. *Biochemistry*, 5(5) :1528–33, 1966.
- [111] Saito T, Iso N., and Mizuno H. Solution properties of phycoyanin. i. studies of dissociation-association by sedimentation measurement. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 47(6) :1375–1379, 1974.
- [112] Thoren K. L., Connell K. B., Robinson T. E., Shellhamer D. D., Tamaro M. S., and Gindt Y. M. The free energy of dissociation of oligomeric structure in phycoyanin is not linear with denaturant. *Biochemistry*, 45(39) :12050–12059, 2006. 44.
- [113] Dellerue S. *Structure et dynamique de protéines photosynthétiques étudiées par diffusion de neutrons et simulation par dynamique moléculaire*. PhD thesis, Université Paris XI, 2000.
- [114] Lairez D., Pauthe E., and Pelta J. Refolding of a high molecular weight protein : Salt effect on collapse. *Biophysical Journal*, 84(6) :3904–3916, 2003. 42.
- [115] Xu Y., Purkayastha P., and Gai F. Nanosecond folding dynamics of a three-stranded beta-sheet. *Journal of the American Chemical Society*, 128(49) :15836–15842, 2006. Xu, Yao Purkayastha, Pradipta Gai, Feng 61.
- [116] Vu D. M., Myers J. K., Oas T. G., and Dyer R. B. Probing the folding and unfolding dynamics of secondary and tertiary structures in a three-helix bundle protein. *Biochemistry*, 43(12) :3582–3589, 2004. 54.
- [117] Huang C. Y., Balakrishnan G., and Spiro T. G. Early events in apomyoglobin unfolding probed by laser t-jump/uv resonance raman spectroscopy. *Biochemistry*, 44(48) :15734–15742, 2005. 39.
- [118] Luke K., Perham M., and Wittung-Stafshede P. Kinetic folding and assembly mechanisms differ for two homologous heptamers. *Journal of Molecular Biology*, 363(3) :729–742, 2006. Luke, Kathryn Perham, Michael Wittung-Stafshede, Pernilla 68.
- [119] Lee H. S., Kim J. S., Shim K., Kim J. W., Inouye K., Oneda H., Kim Y. W., Cheong K. A., Cha H., Woo E. J., Auh J. H., Lee S. J., Kim J. W., and Park K. H. Dissociation/association properties of a dodecameric cyclomaltoextrinase. *Febs Journal*, 273(1) :109–121, 2006. 26.

- [120] D. Erilov, C. Puorger, and R. Glockshuber. Quantitative analysis of nonequilibrium, denaturant-dependent protein folding transitions. *J.A.C.S.*, 129(29) :8938–9, 2007.
- [121] Yang A., Miron S., Duchambon P., Assairi L., Blouquit Y., and Craescu C.T. The n-terminal domain of human centrin 2 has a closed structure, binds calcium with a very low affinity, and plays a role in the protein self-assembly. *Biochemistry*, 45(3) :880–889, 2006.
- [122] Neuman RC, Kauzmann W, and Zipp A. Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.*, 77 :2687–91, 1973.
- [123] Kim J. and Vipulanandan C. Effect of ph, sulfate and sodium on the edta titration of calcium. *Cement and Concrete Research*, 33(5) :621–627, 2003. 14.
- [124] Richard D, Ferrand M, and Kearley G J. *LAMP, the Large Array Manipulation Program*. http://www.ill.fr/data_treat/lamp/front.html. Institut Laue-Langevin.
- [125] Rols S. *Qens_fit, An IDL routine to fit quasielastic lines using a set of Lorentzian and Gaussian functions*. http://whisky.ill.fr/Computing/TOFHR-help/QENS_fit.pdf. Institut Laue-Langevin.
- [126] Royer C. A. Insights into the role of hydration in protein structure and stability obtained through hydrostatic pressure studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(8) :1167–1173, 2005.

Liste des tableaux

- 1.1 Résidus de la calmoduline impliqués dans les poches hydrophobes 17
- 2.1 Longueurs de diffusion cohérente, en fermi ($1\text{fm} = 10^{-13}\text{cm}$) des principaux éléments constituant les molécules organiques . Toutes ces longueurs de diffusion sont du même ordre de grandeur. On remarquera que les longueurs de diffusion de l'hydrogène et du deutérium sont de signe opposé. Ceci est à la base de la variation de contraste. 51
- 2.2 Formes limites à grand Q ($QR_g > 4$) du facteur de forme de différents types d'objets 58
- 2.3 Tableau détaillant le nombre d'hydrogènes non labiles de chaque rang ; pour chaque type d'acide aminé, ainsi que pour la calmoduline. Un proton appartenant au squelette peptidique est compté comme proton de rang 0 ; un proton lié au premier carbone après le carbone α et compté comme proton de rang 1 ; et ainsi de suite. Cas particuliers : Tous les protons des prolines sont comptés comme rang 0 ; les cycles sont comptés comme un carbone, ainsi tous les hydrogènes appartenant à un cycle sont comptés comme appartenant au même rang, à savoir le rang du 1^{er} carbone du cycle ; Les atomes de soufre ou d'azote sont pris en compte de la même façon que les atomes de carbone pour l'établissement des rangs. Tous les protons OH, NH, NH₂, sont considérés labiles. 73
- 3.1 Longueurs d'onde des maxima d'absorbance et coefficients d'extinctions molaires correspondants des résidus aromatiques. 81

- 4.1 Paramètres "thermodynamiques" extraits des courbes de dénaturation thermique de l'apo-calmoduline. CD signifie dichroïsme circulaire et fluo signifie fluorescence intrinsèque. Les exposants C et N signifient domaine C- et N-terminal respectivement. Comme attendu, les températures de demi-dénaturation des deux domaines sont décalées d'environ 15°C. On peut noter un décalage d'environ 4°C en D₂O, indiquant que l'hydratation et les liaisons hydrogènes avec le solvant jouent également un rôle dans la stabilité de l'apo-calmoduline. On peut également noter que les températures de demi-dénaturation issues des expériences de fluorescence et de dichroïsme circulaire sont nettement différentes (de plus de 4°C). Ceci signe la présence d'états intermédiaires dans le dépliement de l'apo-calmoduline. 101
- 4.2 Paramètres, R_g , r_g , et d , issus de la méthode de Fujisawa extrapolés à concentration nulle pour l'apo-calmoduline native et repliée 117
- 4.3 Paramètres du modèle décrit dans la partie 2.3.3 : le déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$, le coefficient de diffusion de translation D_{trans} , le volume moyen des sphères $\frac{4\pi}{3} \langle a \rangle^3$, la fraction de protons immobiles p , l'indice de polydispersité des volumes des sphères I_p , le volume de sphère "le plus probable" $\frac{4\pi}{3} \bar{a}^3$ et le coefficient de diffusion moyen des atomes dans les sphères D_{sph} . On peut déjà remarquer que le déplacement carré moyen, $\langle u^2 \rangle$, n'est pas proportionnel à la température en Kelvins. Il y a donc une transition dans la dynamique de la calmoduline. 127
- 5.1 Paramètres, en Å, issus de la méthode de Fujisawa pour les formes apo et holo de la calmoduline native, à 10 g/L. Il semble que la distance interdomaine, d , soit identique pour les deux formes de calmoduline. Le rayon de giration des domaines isolés, lui, est significativement différent. Les domaines de la forme holo de la calmoduline sont plus "ouverts" que ceux de la forme apo. Ceci correspond bien aux structures RMN en solution des deux formes. Cette ouverture des domaines de la forme holo permet l'exposition des poches hydrophobes. Les valeurs du tableau sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.3. 141
- 5.2 Paramètres thermodynamiques des modèles à deux états issus des courbes de transition de fluorescence intrinsèque (figures 5.5 et 5.6). La dernière colonne, $\Delta G_{25^\circ C}$ correspond aux stabilités issues des courbes de transition en fonction de la température (chapitre précédent). Les deux formes de calmoduline ont des pressions de demi-dénaturation très proches, d'environ 3000 bar ; mais leurs volumes d'activation diffèrent d'un facteur 2 (voir tableau 5.2). Ceci donne des stabilités très différentes. Toutefois, la comparaison de la stabilité issue de l'analyse de la courbe de transition en fonction de la pression avec celle issue de l'analyse de la courbe de transition en température montre clairement que le modèle "à deux états" ne tient pas (dans le cadre du modèle "à deux états", on devrait obtenir des stabilités identique ; il y a une différence d'un facteur deux). 143

Table des figures

- 1.1 Les différents niveaux de structure des protéines. In vivo, les protéines sont synthétisées de manière linéaire. Cependant, la plupart d'entre elles ne sont fonctionnelles que sous leur forme repliée. In vivo, les protéines doivent donc se replier, et ce, dans des temps compatibles avec l'activité biologique. 9
- 1.2 Energie libre en fonction d'une coordonnée de réaction, Q , mesurant la "nativité" de la structure. Un choix courant pour Q est le nombre de contacts natifs. Ce schéma illustre (il ne s'agit que d'une illustration, pas d'une représentation exacte ou réelle) donc l'évolution de l'énergie libre d'une protéine au cours de son repliement. 10
- 1.3 Le paysage énergétique en terrain de golf de Levinthal, correspondant au modèle à deux états Natif \leftrightarrow Déplié. Toutes les conformations dépliées sont dégénérées en énergie. La conformation native, unique, à une énergie (libre) plus faible. Les protéines dépliées "recherchent au hasard leur conformation native". Ce modèle est irréaliste : une estimation grossière d'une borne inférieure du temps de repliement d'une protéine de taille moyenne (100 résidus) est de 10^{10} ans. 11
- 1.4 Le paysage énergétique de la rigole, correspondant au modèle du chemin préférentiel, ou modèle séquentiel. Les protéines sont "guidées le long d'une rigole" par une succession d'états intermédiaires. Ces états intermédiaires réduisent l'espace des phases exploré par les protéines, permettant de retrouver des temps compatibles avec les temps biologiques. Plus grand est le nombre d'états intermédiaire, plus court est le temps de repliement, car plus l'espace des phases exploré est court. Ce modèle semble cependant peu réaliste, car il suppose une conformation dénaturée de départ particulière. 12
- 1.5 Paysage énergétique de l'entonnoir de Dill. Les conformations dépliées ne sont pas dégénérées en énergie. L'effondrement hydrophobe lève la dégénérescence des états dénaturés. Plus les conformations sont compactes, avec un coeur hydrophobe structuré, plus leur énergie est faible. Ceci transforme le "terrain de golf" de Levinthal en entonnoir, avec l'état natif au centre. Les protéines ne recherchent plus au hasard leur conformation native sur un terrain de golf ; mais tombent dans l'entonnoir, vers l'état natif. La vitesse du repliement n'est plus limitée que par les vitesses de diffusion des résidus. 13

- 1.6 Paysage énergétique de l'entonnoir rugueux de Dill, variante de l'entonnoir lisse de la figure précédente (1.5). Il n'y a en effet aucune raison (surtout pour les protéines de taille importante) que l'énergie interne soit une fonction monotone de la compacité, ni même qu'elle soit une fonction de la compacité uniquement. En effet, même si l'effondrement hydrophobe semble être le moteur principal du repliement des protéines, il y a d'autres interactions en jeu dans les protéines : interaction électrostatique, liaisons hydrogènes, etc. Il n'y a donc aucune raison que l'entonnoir soit lisse. Il peut avoir une certaine "rugosité". Cette rugosité entraîne l'apparition "d'états intermédiaires", qui apparaissent maintenant comme des pièges cinétiques, ralentissant le repliement ; et non plus l'accélération, comme dans le cadre des modèles séquentiels (fig 1.4). 14
- 1.7 Site de fixation du calcium en "main EF", constitué de deux hélices α orthogonales reliées par une boucle de douze acides aminés. 18
- 1.8 Structure cristallographique de l'apo-calmoduline (1CFD). A droite, les poches hydrophobes de la calmoduline sont représentées en orange. L'hélice- α centrale, reliant les domaines N- et C-terminaux, est partiellement destructurée. Les poches hydrophobes sont enfouies, ce qui ne permet pas la fixation aux peptides cibles. 19
- 1.9 Structure cristallographique de l'holo-calmoduline (1EXR). A gauche, représentation en rubans. A droite, représentation de la surface de la calmoduline. Les poches hydrophobes de la calmoduline sont apparaissent en orange. L'hélice- α centrale, reliant les domaines N- et C-terminaux, est complète. Les poches hydrophobes sont exposées au solvant, ce qui permet la fixation aux peptides cibles. 20
- 1.10 Structures cristallographiques de l'holo-calmoduline (en bleu) en présence de peptides cibles (en rouge) : fragment de kinase des chaînes légères de myosine (code pdb 2BBM [24]) à gauche et fragment de kinase dépendante de la calmoduline (code pdb 1IQ5 [25]) à droite. Les résidus des poches hydrophobes de la calmoduline sont représentés par des sphères oranges. On peut voir que la calmoduline "enserme" les peptides cibles ; et que ceux-ci sont ancrés aux poches hydrophobes. Ces dernières jouent un rôle crucial dans la fixation aux peptides cibles. 21
- 1.11 Structures cristallographiques 1EXR (en rouge), 1PRW (en vert) et 1Y6W (en bleu) de la forme holo de la calmoduline. Les structures sont alignées sur le domaine C-terminal uniquement, car il est impossible de les aligner sur la totalité de la séquence. Il est cependant possible de les aligner sur le domaine N-terminal uniquement. Ceci montre que toutes ces structures sont des conformères, se différenciant uniquement par l'orientation relative des deux domaines. 22

- 1.12 Structures RMN en solution des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de la calmoduline. Les différentes structures de chaque "famille" sont alignés sur le domaine C-terminal uniquement. Comme pour la figure précédente (fig. 1.11), les différentes structures peuvent également être alignées sur le domaine N-terminal uniquement ; mais ne peuvent pas l'être sur toute la séquence. Encore une fois, ceci montre que toutes ces structures sont des conformères, ne différant que par l'orientation respective des deux domaines. 23
- 1.13 Représentation de kratky ($Q^2I(Q) = f(Q)$) d'un spectre DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native ((\odot)), et comparaison avec les spectres simulés à partir des structures RMN 1CFD (—) et cristallographique 1QX5 (—). En vert, facteur de forme d'un modèle géométrique simple : le modèle "dumbell". La structure RMN en solution, ainsi que le modèle géométrique simple correspondent bien aux données DNPA ; alors que la structure cristallographique est très différente de ces données. Le fait que le modèle géométrique simple reproduise bien les données montre que le problème de la structure cristallographique ne vient pas de la forme des domaines (dans le modèle "dumbell" ceux-ci sont assimilés à des sphères de 15 Å), mais vient d'une mauvaise distance inter-domaines. 24
- 1.14 Représentation du potentiel interparticulaire DLVO, composition d'un terme répulsif d'origine électrostatique, et d'un terme de van de Waals, attractif. L'encadré supérieur repère les points particuliers que sont les minimums principaux et secondaires. L'encadré inférieur représente le potentiel pour différentes valeurs de charge et de force ionique. La figure est issue de [37]. 25
- 1.15 Courbe de titration théorique de la calmoduline : charge nette en fonction du pH. Le calcul de cette courbe a été effectué à l'aide du programme en ligne H++ [38]. Le point de charge nette nulle est appelé point isoélectrique, ou pH isoélectrique, pH_i . Il vaut ici 3,8. A pH=7,6, condition choisie pour cette thèse, l'apo-calmoduline possède une charge nette négative de 22 charges élémentaires. 26
- 1.16 Spectres DNPA de deux solutions d'apo-calmoduline à 5 g/L (en rouge) et à 86 g/L (en bleu), chauffées à 70°C puis refroidies à température ambiante. Les intensités sont normalisées par la concentration. L'intensité (corrigée de la différence de concentration) est plus faible à 86 g/L que celle à 5 g/L. Ceci est le signe d'interactions répulsives (voir partie 2.2.3). Il n'y a en outre aucune remontée du signal "à petit Q", remontée qui serait synonyme d'agrégation. Ainsi, les interactions électrostatiques répulsives entre protéine empêchent l'agrégation des protéines, natives ou dénaturées, et ce, même à des concentrations de l'ordre de 90 g/L. 27

1.17	Diagramme de phase (T,P) elliptique, typique d'une protéine se dénaturant selon un processus à deux états. Figure issue de [51]. Le domaine où l'état natif est majoritaire est représenté en bleu ; celui où l'état dénaturé est majoritaire est représenté en rouge. La ligne de transition, représentée par un trait bleu, correspond à la ligne $\Delta G = 0$. Les chemins de dénaturation thermique et de dénaturation sous pression sont représentés par les flèches rouges. Si le modèle "à deux états" s'applique, le diagramme de phase doit être elliptique, et les chemins de dénaturation en température et sous pression doivent être identiques.	34
2.1	Longueur de diffusion en fonction de la masse atomique. Il n'existe pas de relation entre longueur de diffusion et numéro atomique. De plus, toutes les longueurs de diffusion sont du même ordre de grandeur. Ceci est un grand avantage des neutrons sur les rayons X, pour lesquels la longueur de diffusion est proportionnelle à Z.	39
2.2	Principe d'une expérience de diffusion. Lors de la traversée de l'échantillon, les neutrons subissent une modification de vecteur d'onde et d'énergie. \vec{Q}_0 est le vecteur de diffusion élastique, i.e. le vecteur de diffusion pour $\hbar\omega = 0$	40
2.3	Principe d'une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles. Issu de [52]. Un faisceau monochromatique et collimaté de neutrons est envoyé sur un échantillon. L'intensité diffusée est enregistrée sur un détecteur 2D. Ceci permet d'obtenir l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion θ , et de l'angle ϕ pour les échantillons anisotropes (ϕ est l'angle par rapport à Ox, dans le plan du détecteur).	44
2.4	Principe du sélecteur mécanique. Issu de [53].	45
2.5	Les deux géométries les plus utilisées pour la diffusion de neutrons aux petits angles : la géométrie plane et la géométrie cylindrique.	47
2.6	Représentation "loglog" des facteurs de forme d'une sphère et d'une chaîne polymère gaussienne avant et après convolution par la résolution. La résolution considérée est une résolution gaussienne avec $\Delta Q/Q = 10\%$. La convolution par la résolution ne modifie pas les facteurs de formes "à variation douce", comme la loi de Debye. Elle écrase par contre les variations brutales, et modifie donc les facteurs de forme comme le facteur de forme d'une sphère.	55
2.7	A gauche, facteur de forme d'une sphère (○) en représentation de Guinier. A droite, facteur de forme d'une chaîne polymère idéale (○) en représentation de Zimm. Dans les deux cas, on a représenté les approximations de Guinier (—) et de Zimm (—). Les deux formes limites se rejoignent pour $QR_g \ll 1$, car leurs développements limités sont identiques ; mais seule la "bonne" forme limite est valable l'intégralité du domaine de Guinier étendu ($QR_g < \sqrt{2}$). Inspiré de [63].	57

2.8	Représentation de Kratky ($Q^2 \cdot I(Q) = f(Q)$) des facteurs de forme d'une sphère, d'une chaîne polymère gaussienne, et d'une chaîne polymère à longueur de persistance de même rayon de giration. Le facteur de forme d'une chaîne gaussienne présente un plateau "à grand Q ". Ceux d'objets plus compacts, comme par exemple une sphère, tendent vers 0 "à grand Q "; ceux d'objets "moins compacts", comme par exemple une chaîne à longueur de persistance ou à volume exclu, tendent vers l'infini "à grand Q ". Cette représentation est donc très usitée pour les études de dépliement de protéines, où les protéines passent d'une conformation compacte (Q^{-4}), à une conformation de type chaîne polymère gaussienne (Q^{-2}) ou à volume exclu ($Q^{-1.7}$), ou encore à longueur de persistance.	58
2.9	Le spectromètre à temps de vol du LLB, MIBEMOL. Un système de 6 "choppers" produit des bouffées de neutrons monocinétiques, qui sont envoyés sur un échantillon. Une banque de détecteurs, placés à distance fixe de l'échantillon, et couvrant un large domaine angulaire (150°), enregistre le nombre de neutrons, en fonction de l'angle de diffusion 2θ , et du "temps de vol", temps mis par le neutron pour parcourir la distance séparant l'échantillon des détecteurs.	63
2.10	Les deux géométries les plus utilisées pour la diffusion de neutrons par temps de vol : La géométrie plane et la géométrie cylindrique.	64
2.11	Schéma d'un système de "choppers" assurant la production de bouffées monocinétiques sur un spectromètre à temps de vol.	66
2.12	En rouge : spectre de D_2O à $15^\circ C$ à une résolution de $180 \mu eV$, et pour un angle de $38,8^\circ$, correspondant à un Q_0 élastique de $0,83 \text{ \AA}^{-1}$. En bleu, Q en fonction du transfert d'énergie, ω . Q varie peu dans la zone quasi-élastique. Du moins cette variation ne dépasse pas l'erreur sur la mesure de Q , ΔQ . Il n'est donc généralement pas utile de transformer les données (Q, ω).	76
3.1	Schéma de principe d'un spectromètre d'absorbance UV-Visible "double-faisceau". Une lampe et un monochromateur produisent un faisceau lumineux monochromatique, dirigé alternativement, à l'aide d'un système de deux "choppers", sur un échantillon ou sur une cuve de référence, puis sur un détecteur. Le faisceau de référence permet de corriger des variations temporelles ou en longueur d'onde du faisceau lumineux incident. Le rapport I_{ech}/I_{ref} , rapport des intensités des faisceaux passant par l'échantillon et de référence, donne la transmission de l'échantillon. . . .	79
3.2	Transitions électroniques des électrons de valence mises en jeu en absorbance UV-Visible. L'absorption de photons UV, ou visibles, est souvent reliée à des transition de type $\sigma \rightarrow \pi$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$; c'est pourquoi la plupart des chromophores contiennent des doubles ou des triples liaisons.	80
3.3	Spectre d'absorbance de deux chromophores, l'Anthracène et le tryptophane. Issu de http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm . La présence de liaisons conjuguées entraîne l'apparition de multiples bandes.	80

- 3.4 Dérivée quatrième des spectres d'absorbance de la protéine de 33-kDa du photosystème II de l'épinard ("33-kDa protein from the spinach photosystem II particle") à différentes pressions. Les pics correspondent aux maxima d'absorbance des tryptophanes et tyrosines de la protéine. Figure issue de [74]. 81
- 3.5 Schéma optique d'un spectrophotomètre classique de fluorescence stationnaire, issu de http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9780387312781-c2.pdf?SGWID=0-0-45-351714-p134266323. Une lampe Xenon à arc, et un monochromateur tournant produisent un faisceau lumineux monochromatique, de longueur d'onde réglable. Ce faisceau est séparé en deux par une lame partiellement réfléchissante ; et envoyé sur l'échantillon d'une part, sur une cellule de référence, contenant un "Quantum Counter", d'autre part. La lumière émise par la cellule de référence est collectée par un PM, situé à 90°. Le signal de ce PM sert à normaliser des variations temporelles ou en longueur d'onde de l'intensité lumineuse du faisceau d'excitation. La lumière émise par l'échantillon passe par un deuxième monochromateur réglable, puis est collectée par un PM. Il est donc possible de mesurer $IF(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$. Des polariseurs permettent de mesurer $IF(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha)$, où alpha est l'angle entre les deux polariseurs. 83
- 3.6 Exemple de diagramme de Jablonski. A $t = 0$, le fluorophore est dans l'état fondamental $S_{0,j}$ (ici sur l'état $S_{0,0}$). Il absorbe un photon d'énergie $h\nu_1$, et passe donc dans un état excité $S_{i,j'}$ (ici $S_{1,5}$). Ce processus, schématisé ici par la flèche bleue, dure environ 10^{-15} . Le fluorophore peut ensuite se désexciter par conversion interne (IC), non radiative, vers un état de même i , mais de j inférieur. Ce processus, schématisé par des flèches ondulantes oranges, dure environ 10^{-12} s. Deux phénomènes différents peuvent ici avoir lieu : la phosphorescence ou la fluorescence. Pour la phosphorescence, le fluorophore peut à nouveau se désexciter de manière non radiative vers un état triplet. Ce processus, non radiatif, appelé croisement inter-système (ISC pour "inter-system crossing"), dure environ 10^{-12} s. Il est schématisé ici par une flèche ondulante jaune. Le fluorophore peut ensuite se désexciter en émettant un photon dit de phosphorescence. Ce processus, schématisé par la flèche rouge peut être extrêmement long. Il est généralement de l'ordre de la seconde, mais peut être bien plus lent dans certains cas. Le deuxième phénomène pouvant avoir lieu est la fluorescence. Il correspond à une désexcitation directe, par émission d'un photon dit de fluorescence, de l'état $S_{i,j'}$ vers l'état $S_{0,j''}$ (nous avons ici représenté un passage de l'état $S_{1,0}$ vers l'état $S_{0,0}$ mais ce n'est qu'un cas particulier). Ce processus, schématisé ici par la flèche verte dure environ 10^{-19} s. Tous les temps donnés ici ne sont que des ordres de grandeur. Ils peuvent varier significativement d'un fluorophore à un autre. 85

- 3.7 Spectres d'excitation et d'émission de la Rhodamine 123 dans le méthanol. Données issues de <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectra>. Le spectre d'émission est décalé vers le rouge par rapport au spectre d'excitation. Les photons émis ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés, à cause des désexcitations non radiatives précédant la fluorescence (voir figure 3.6). Ceci est une loi très générale en fluorescence. 86
- 3.8 Décomposition d'une onde polarisée elliptiquement (en violet) en une somme d'une onde polarisée circulaire droite (en bleu, R pour "right") et d'une onde polarisée circulaire gauche (en rouge, L pour "left"); et définition de géométrie de l'ellipticité θ . Si un échantillon absorbe différemment les ondes polarisées droites et gauches, il modifie l'ellipticité des ondes polarisées elliptiquement; d'où la correspondance entre $[\theta]$ et $\Delta\epsilon$ 88
- 3.9 Spectres dichroïques des trois principaux types de structure secondaire : hélices- α , feuillets- β , et structures désordonnées. Données issues de <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>. Le spectre des hélices- α présente un pic à 222 nm; celui des feuillets- β , à 217 nm. 89
- 4.1 Spectre DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native, en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl, en représentation "loglog" à gauche, et en représentation de Kratky ($Q^2I(Q) = f(Q)$) à droite. En vert, ajustement du modèle "dumbbell" (voir équation 2.51). Le spectre de l'apo-calmoduline native suit une loi de Guinier pour $QR_g < \sqrt{2}$, et une loi de Porod pour $QR_g > 4$. L'apo-calmoduline native est donc compacte. Les spectres présentent un léger "creux" autour de $0,1 \text{ \AA}^{-1}$, bien reproduit par l'ajustement du modèle "dumbbell". Ce creux est dû à l'interférence destructive des ondes diffusées par les deux domaines N- et C- terminaux, quasi-identiques. Les spectres DNPA obtenus correspondent bien à la structure "en haltère" donnée par la RMN en solution. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB) 95
- 4.2 À gauche : Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H₂O (en rouge) et dans D₂O (en bleu) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. À droite : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$, de l'apo-calmoduline dans H₂O (en rouge) et dans D₂O (en bleu) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à trois états. Les tyrosines sont situées exclusivement dans le domaine C-terminal; alors que le dichroïsme circulaire est, lui, sensible à la quantité de structure secondaire de toute la protéine. Il est donc logique de trouver une transition à deux états en fluorescence intrinsèque des tyrosines, et à trois états en dichroïsme circulaire. Le D₂O décale les courbes d'environ 4°C vers les hautes températures. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl; la concentration de calmoduline est de 20 μM (0,33 g/L). 96

- 4.3 Haut : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$ de l'apo-calmoduline dans H₂O en fonction de la température (en bleu). En noir, ajustement avec un modèle à trois états ; en rouge ajustement avec un modèle à deux états. Bas : résidus des deux ajustements. Il apparaît clairement que le modèle à trois états décrit mieux l'évolution en température de l'ellipticité que le modèle à deux états. Les résidus de l'ajustement du modèle à trois états ne présentent aucune variation particulière en température, signe d'un "bon" ajustement ; alors que ceux de l'ajustement du modèle à deux états présentent de fortes oscillations. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μ M (0,33 g/L). 97
- 4.4 Fraction "expérimentale" d'apo-calmoduline native en D₂O en fonction de la température, calculée en utilisant l'équation 4.2, à partir de la courbe de la figure 4.2. Ainsi corrigée des pentes d'"effet solvant", S_N et S_D , les courbes "ressemblent" à des courbes classiques de transitions à deux états. 98
- 4.5 Dérivée quatrième des spectres d'absorbance de l'apo-calmoduline dans D₂O à plusieurs températures, comprises entre 20°C and 90°C. Les dérivées quatrième exhibent une série de pics, correspondant aux longueurs d'ondes d'absorption maximum des résidus aromatiques. Entre 245 nm et 270 nm, les bandes peuvent être attribuées aux phénylalanines seules ; entre 280 nm et 290 nm, aux tyrosines exclusivement. Entre 270 nm et 280 nm, il s'agit d'une superposition de bandes des deux types de résidus aromatiques. On peut constater sur toutes les bandes, un "blue-shift" en température, généralement signe d'exposition accrue au solvant. La transition est plus marquée pour la bande des tyrosines. La présence de points isobestiques indique qu'il s'agit d'une transition à deux états. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 340 μ M (5,7 g/L) 100
- 4.6 Longueur d'onde de maximum d'absorption, λ_{max} , de la bande des tyrosines, déterminée à partir de la courbe 4.5, en fonction de la température. En bleu, pour les tyrosines de la calmoduline sous forme apo ; en vert, pour des tyrosines isolées en solution. Le point rouge correspond au retour à température ambiante de l'apo-calmoduline. En noir, ajustement d'un modèle à deux états. La transition, clairement visible sur cette courbe, et correspondant au dépliement du domaine C-terminal, se traduit donc par un "blue-shift". Après la transition, la longueur d'onde d'absorbance des tyrosines de l'apo-calmoduline devient très proche de celle de tyrosines isolées en solution. La polarité de l'environnement local des tyrosines de l'apo-calmoduline devient donc proche de celle du solvant. Il est donc vraisemblable que le domaine C-terminal de l'apo-calmoduline soit déplié, et que les tyrosines soient ainsi très exposée au solvant. 102

- 4.7 Longueurs d'onde de maximum d'absorption, λ_{max} , des bandes des phénylalanines de la calmoduline sous forme apo, déterminées à partir de la courbe 4.5, en fonction de la température. Le point rouge correspond au retour à température ambiante. Les courbes sont ajustées à l'aide d'un modèle à deux états (en noir), bien que les phénylalanines soient présentes dans les deux domaines. Les températures de demi-transition ainsi obtenues, sont intermédiaires entre celle du domaine C-terminal et celle du domaine N-terminal. 103
- 4.8 Représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$) des spectres DNPA d'une solution d'apocalmoduline à 5 g/L à plusieurs températures, comprises entre 20°C (en bleu) et 85°C (en rouge). Les droites en traits pleins sont des ajustements de Guinier, dont les pentes conduisent à des valeurs de rayon de giration. La courbe rouge incurvée est un ajustement du spectre DNPA à 85°C avec une loi de Debye. Mesures effectuées sur PAXE, LLB. Les rayons de giration sont tracés en fonction de la température sur la figure 4.9.B. Au fur et à mesure que le rayon de giration augmente, les spectres, "à petit Q", dévient de la loi de Guinier, et tendent vers la loi de Debye. L'apocalmoduline perd donc progressivement sa structure moyenne à grande échelle et adopte une conformation "de type chaîne polymère". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB) 105
- 4.9 A gauche : ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$ de d'une solution de 20 μ M d'apo-calmoduline dans D₂O en fonction de la température. A droite : rayon de giration, R_g , de l'apocalmoduline dans D₂O à 5 g/L en fonction de la température. Mesures effectuées sur PAXE, LLB. Les deux courbes sont ajustées avec le même modèle à trois états, avec les mêmes paramètres "thermodynamiques". L'évolution en température de la structure secondaire (ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$) et de la structure tertiaire (rayon de giration, R_g) est donc synchrone. Ceci signe l'absence d'états intermédiaires de type "molten globule" suffisamment stable pour affecter les courbes de transition. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. 106

- 4.10 Représentation "log-log" (à gauche) et représentation de Kratky modifiée ($Q^{2.3}.I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline à 20°C (en bleu) et à 85°C (en rouge). Le spectre de l'apo-calmoduline native suit une loi de Guinier jusqu'à $QR_g = \sqrt{2}$, et une loi de Porod pour $QR_g > 4$. L'apo-calmoduline native est donc compacte. A haute température ($T > 70^\circ\text{C}$), le spectre de l'apo-calmoduline suit une loi de Debye pour $QR_g < 3$ et une loi de puissance d'exposant 2,3 pour $QR_g > 4$ ($\frac{4}{R_g} \sim 0.13$). L'apo-calmoduline a donc perdu toute structure moyenne et adopté une conformation "de type polymère". L'exposant 2,3 est légèrement supérieur à l'exposant 2 des chaînes polymères gaussiennes. Ceci est sûrement dû à la présence de structures secondaires résiduelles à haute température. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 108

- 4.11 Représentation de Kratky modifiée ($Q^{2.3}.I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution relativement concentrée (18 g/L) d'apo-calmoduline à plusieurs températures, comprises entre 20°C (en bleu) et 77°C (en rouge). L'exposant "à grand Q " passe progressivement de 4 à 2,3 quand la température passe de 20°C à 77°C. L'apo-calmoduline passe donc d'une conformation compacte à une conformation de type "chaîne polymère", sans structure moyenne. Cette perte de structure moyenne semble concomitante de l'augmentation du rayon de giration (voir figure 4.9). Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O . Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 109

4.12 Représentation $1/I(Q) = f(Q^{2,206})$ des spectres DNPA à haute température (77°C) de solutions d'apo-calmoduline à plusieurs concentrations. En traits plein, ajustements de lois de Debye ; en pointillés, ajustements de lois de Guinier. La loi de Guinier n'est valable qu'asymptotiquement, à très petit Q . La loi de Debye, elle, est valable dans tout son domaine de validité, à savoir $QR_g < 3$ ($(3/R_g)^{2,206} \sim 0.006$). En fait, la loi de Debye semble valable au delà de son domaine de validité. Ceci est dû au fait que l'exposant à grand Q est 2,3, soit peu différent de l'exposant 2 d'une chaîne gaussienne. Le facteur de forme de l'apo-calmoduline est donc très proche de celui d'une chaîne polymère gaussienne, qui se trouve être la Loi de Debye. Ceci montre toutefois sans conteste qu'à grande échelle l'apo-calmoduline, à 77°C, a perdu sa structure moyenne et adopté une conformation de type polymère gaussien. Il faut également préciser que les rayons de giration, issus des ajustements de Guinier présentés ici sont largement biaisés (plus de 3 Å de différence avec ceux issus de la loi de Debye). En effet, pour un objet de type polymère gaussien, l'approximation de Guinier n'est valable que dans le régime de Guinier strict, soit $QR_g \ll 1$, condition insatisfaite ici. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 µM d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 110

4.13 Représentation de Zimm ($1/R_g^2 = f(C)$) du rayon de giration en fonction de la concentration, pour l'apo-calmoduline native (20°C, en bleu) et dépliée (77°C, en rouge). Les traits continus sont des ajustements linéaires, dont l'ordonnée à l'origine donne le rayon de giration à concentration nulle, i.e. le "vrai" rayon de giration. On obtient ainsi, pour l'apo-calmoduline native $R_g = 18,7 \pm 0,3$ Å, et pour l'apo-calmoduline à 77°C $R_g = 32,4 \pm 0,5$ Å. Soit une augmentation conséquente de près de 75%, correspondant à une augmentation de volume d'un facteur 5. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 µM d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 112

- 4.14 A gauche : Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H₂O (en haut) et dans D₂O (en bas) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. A droite : ellipticité (CD) à 222 nm, $[\theta]_{222}$, de l'apo-calmodulin dans H₂O (en haut) et dans D₂O (en bas) en fonction de la température. En noir, ajustements avec un modèle à trois états. Les montées en températures sont en rouge, les descentes en bleu. Il est clair que la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline est irréversible. Ceci est d'ailleurs plus flagrant en fluorescence intrinsèque. Il y a de plus un hystérésis sur toutes les courbes, en dichroïsme circulaire et en fluorescence, dans H₂O et dans D₂O. Toutes les transitions sont décalées de 3°C vers les basses températures. Cet hystérésis est un signe de non-équilibre. Il prouve également que l'irréversibilité n'est pas due à l'agrégation irréversible d'une faible fraction de protéines dépliées ; agrégation qui empêcherait le repliement des protéines concernées. Un tel mécanisme entraînerait un décalage sur l'axe des y , pas sur l'axe des x . Le fait que l'irréversibilité soit plus marquée en fluorescence qu'en dichroïsme va également à l'encontre de cette hypothèse. En effet, la fraction agrégée devant être la même en fluorescence et en dichroïsme, l'irréversibilité devrait être comparable dans les deux cas (la concentration des solutions utilisées était identique). Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μ M (0,33 g/L). 113
- 4.15 Dérivée quatrième des spectres d'absorbance d'une solution de 340 μ M (5,7 g/L) apo-calmoduline dans D₂O à 20°C (état natif, en bleu), 90°C (état déplié, en rouge) et après retour à 20°C (en noir). Le spectre "retour" est sensiblement différent du spectre "natif", notamment dans la zone des tyrosine (280 nm - 290 nm). La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline est donc irréversible. La spectroscopie d'absorbance est très sensible à l'agrégation. Il est donc peu vraisemblable que l'irréversibilité observée soit due à un phénomène d'agrégation, car elle eût été certainement visible sur les spectres d'absorbance. De plus, l'agrégation dépend très violemment de la concentration. Or, nous avons obtenu des spectres d'absorbance extrêmement similaires, avec toujours une forte irréversibilité au niveau de la zone des tyrosines, avec une solution d'apo-calmoduline à 86 g/L, chauffée à 70°C (la solution utilisée pour l'expérience sur MIBEMOL). Si il y avait eu agrégation à 5.7 g/L, l'agrégation serait devenue catastrophique à 86 g/L, et aurait interdit l'acquisition de spectres de bonne qualité. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA. 114

- 4.16 Représentation de Kratky ($Q^2 \cdot I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution diluée (5 g/L) d'apo-calmoduline native (en bleu) et d'apo-calmoduline refroidie (en vert). Lignes discontinues : modèle "dumbell". Le spectre de l'apo-calmoduline "refroidie" suit une loi de Porod (i.e. une décroissance en Q^{-4}) pour $QR_g > 4$; ainsi qu'une loi de Guinier pour $QR_g < \sqrt{2}$. L'apo-calmoduline refroidie est donc compacte. On parlera donc d'apo-calmoduline repliée. On pourra noter que le modèle "dumbell" décrit moins bien le spectre de l'apo-calmoduline repliée que celui de l'apo-calmoduline native. Les différences entre le spectre expérimental et la modèle sont cependant assez faibles : il faut garder à l'esprit que l'ordonnée est $Q^2 I(Q)$, ce qui exalte les différences à grand Q . Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 116

- 4.17 Représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$; en haut, A et B) et de Fujisawa ($\ln \frac{I}{Q} = f(Q^2)$; en bas, C et D) des spectres DNPA de l'apo-calmoduline native (à gauche, A et C) et repliée (à droite, B et D) à plusieurs concentrations (18 g/L, 10 g/L, 6 g/L et 5 g/L), et à 20°C. Les courbes à 5 g/L ont été décalées vers le bas pour plus de clarté. En traits pleins, ajustements linéaires. Les spectres de l'apo-calmoduline "repliée" présentent deux régimes linéaires en représentation de Guinier, comme ceux de l'apo-calmoduline native. L'apo-calmoduline repliée a donc également une conformation "dumbell". Les valeurs de R_g et de r_g , obtenues à partir des pentes des ajustements linéaires sont tracées en représentation de Zimm, en fonction de la concentration dans la figure 4.18. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 117

- 4.18 A et B : Représentation de Zimm ($\frac{1}{R_g^2} = f(C)$) des rayons de giration (A) et des rayons de giration des domaines isolés (B) de l'apo-calmoduline native (en bleu) et repliée (en vert), en fonction de la concentration. En traits pleins, extrapolations linéaires menant aux valeurs de ces paramètres à concentration nulle. C : Représentation de Zimm ($\frac{C}{I_0} = f(C)$) de l'intensité à l'origine (i.e. à $Q = 0$) de l'apo-calmoduline native (en bleu) et repliée (en vert), en fonction de la concentration. En traits pleins, extrapolations linéaires conduisant au rapport $\frac{C}{I_0}$ à concentration nulle. Les rayons de giration R_g et r_g de l'apo-calmoduline repliée sont supérieurs à ceux de l'apo-calmoduline native. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 4.2. Le rapport $\frac{C}{I_0}$ à concentration nulle, connaissant le volume spécifique de la protéine, ainsi que sa densité de longueur de diffusion, permet d'obtenir la masse molaire. Pour l'apo-calmoduline native, ceci donne $17,7 \pm 0,5$ kDa, contre 16,8 kDa en théorie. Pour l'apo-calmoduline "repliée", ceci donne une masse molaire de $16,4 \pm 0,8$ kDa ; soit, aux erreurs près, égale à celle de l'apo-calmoduline native. Ceci plaide encore une fois en défaveur de l'hypothèse selon laquelle l'irréversibilité observée serait due à une agrégation des protéines. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 120
- 4.19 Fluorescence intrinsèque à 305 nm (tyrosines) de l'apo-calmoduline dans H₂O en fonction de la température sur deux cycles chauffage/refroidissement. En noir, ajustements avec un modèle à deux états. En rouge : first heating ; en bleu : first cooling ; en vert : second heating ; en cyan : second cooling. Après un premier hystérésis lors du premier cycle de chauffage-refroidissement, la transition redevient réversible. Ceci pose la question suivante : "l'état natif de l'apo-calmoduline est-il métastable". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA ; la concentration de calmoduline est de 20 μ M (0,33 g/L). 121
- 4.20 Représentation de Kratky modifiée ($Q^{2.3} \cdot I(Q) = f(Q)$) des spectres DNPA d'une solution relativement concentrée (18 g/L) d'apo-calmoduline native (○), refroidie une fois (◐), refroidie deux fois (◑), et refroidie trois fois (◒). Il est clair que, bien que la dénaturation thermique de la calmoduline soit irréversible, la conformation de la calmoduline n'est plus modifiée par les cycles ultérieurs de chauffage-refroidissement. Comme pour l'expérience de fluorescence de la figure 4.19, ceci ouvre la question suivant "l'état natif de l'apo-calmoduline est-il métastable ?". Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. Les mesures ont été effectuées en cellule Hellma, sur le spectromètre PAXE (LLB). 122

- 4.21 Représentation de Guinier de l'intensité élastique (calculée comme $\int_{|\hbar\omega| \leq 1 \text{ meV}} I_{inc}(Q, \omega) d\omega \propto e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle}$) d'une solution concentrée d'apo-calmodulin à trois températures : \bullet : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins, ajustements linéaires conduisant aux valeurs de déplacements carrés moyens $\langle u^2 \rangle$. Les valeurs de $\langle u^2 \rangle$ ainsi obtenues sont rassemblées dans le tableau 4.3. On peut constater que ces courbes sont bien linéaires, notamment autour de $1,9 \text{ \AA}^{-1}$ ($3,6 \text{ \AA}^{-2}$). Ceci valide la qualité de la soustraction du signal du solvant. En effet, celui-ci présente un pic très prononcé pour cette valeur de Q (voir insert présentant le logarithme de l'intensité élastique du solvant, à 288 K, en fonction de Q^2), et atteint le quadruple de l'intensité élastique diffusée par la protéine. Toute erreur, même minime, dans la soustraction du signal de solvant se traduirait donc par un "creux" ou une "bosse" dans cette région. Un autre "bon" point concernant ces données est que l'intensité élastique (extrapolée) à $Q = 0$ est indépendante de la température. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 125
- 4.22 Spectres quasi-élastiques d'une solution concentrée d'apo-calmoduline pour deux valeurs de Q (1 \AA^{-1} et 2 \AA^{-1}), et à deux températures (15°C et 70°C, ou 288 K et 343 K). En traits pleins : ajustement du modèle complet. En traits discontinus : lorentziennes décrivant les mouvements internes. En pointillés : lorentzienne décrivant la diffusion de translation. On constate au premier coup d'oeil que, pendant que l'intensité de la lorentzienne de mouvements internes, $\mathcal{A}_{L_{int}}$, augmente, l'intensité de la lorentzienne de diffusion, $\mathcal{A}_{L_{diff}}$, diminue avec Q (EISF) et avec la température (augmentation, en énergie et en amplitude, de la dynamique avec la température, sous l'effet "du kT " et du dépliement). Ceci est conforme à ce attendu. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 126
- 4.23 EISF de l'apo-calmodulin en fonction de Q pour plusieurs températures : \bullet : 15°C. \circ : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins, ajustement de l'expression de l'équation 2.108. Les distributions (lognormales) de rayon de sphère correspondantes sont représentées dans l'insert. La moyenne de cette distribution augmente avec la température; mais la valeur "la plus probable", elle, diminue avec la température. De plus, la variance de la distribution augmente considérablement. Les résultats de ces ajustements sont rassemblés dans le tableau 4.3. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 128

- 4.24 Largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, Γ_{int} , en fonction de Q^2 pour plusieurs températures : \circ : 15°C. \bullet : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins : "ajustements" d'une fonction constante dans la région $0 < Q < \frac{\pi}{\langle a \rangle}$ conduisant au coefficient de diffusion D_{sph} (voir équation 2.102). Le coefficient de diffusion D_{sph} augmente avec la température. On peut toutefois noter que pour les trois températures, le rayon moyen de sphère, $\langle a \rangle$, est compris entre 1,48 et 1,58. D'après l'équation 2.102, Γ_{int} doit être constant pour $Q < \pi/a$. En ne considérant que les valeurs moyennes du rayon de sphère, $\langle a \rangle$, Γ_{int} devrait donc être constant pour $Q^2 < 4$ (au moins), et ne devrait commencer à augmenter qu'à l'extrémité de la gamme en Q accessible dans cette expérience ; et ce pour les trois températures. Or, si Γ_{int} est bien constant à 15°C, elle augmente significativement au delà de $Q = 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ à 70°C. Ceci implique donc qu'à haute température, certains atomes diffusent dans des sphères de grand rayon, sans que la valeur moyenne des rayons soit très affectée. Ceci est totalement en accord avec l'augmentation de la polydispersité rapportée ci-avant ; et donc avec le fait qu'à haute température, la distribution lognormale des rayons de sphère prenne des valeurs non nulles pour de grandes valeurs de rayon. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 129
- 4.25 Largeur de la lorentzienne décrivant la diffusion de translation globale de l'apo-calmoduline, Γ_{diff} , en fonction de Q^2 pour plusieurs températures : \circ : 15°C. \bullet : 50°C. \circ : 70°C. En traits pleins : ajustements linéaires conduisant au coefficient de diffusion de translation D_t . Le coefficient de diffusion de translation D_t augmente avec la température, ce qui assez logique. Cependant, si ce coefficient de diffusion suit bien la loi de Stokes-Einstein dans l'état natif ; ce n'est plus le cas à haute température. Ceci n'est guère surprenant car, si l'hypothèse de découplage des mouvements globaux et internes, à la base du modèle de l'équation 2.100, est assez bien justifiée pour des protéines compactes ; elle l'est un peu moins pour des objets de type polymère (objets hautement flexibles, et dont on ne peut pas vraiment considérer qu'ils diffusent comme des objets "rigides"). La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D_2O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 130

- 4.26 Représentation schématique du "mécanisme" hypothétique proposé ci-avant. En bleu et rouge, les rayons de sphère explorés par les trois "populations" de protons, dans l'état natif et déplié respectivement. En noir les proportions de protons immobiles et les distributions lognormales des rayons de sphère correspondantes. La courbe noire représente donc le modèle "ajusté" dans les deux situations. A : Dans l'état natif, les deux premières population apparaissent comme immobiles (dans le modèle, elles sont représentées par le rectangle noir), la troisième population apparaît mobile (dans le modèle, elle est représentée par la distribution lognormale en noir). B : La protéine se déplie, et le confinement des chaînes latérales diminue. Les rayons explorés par les différentes populations de protons augmentent, et sont maintenant indiqués en rouge (le déplacement est matérialisé par les flèches en dégradé de couleur). La troisième population, sûrement des protons appartenant au squelette peptidique des structures secondaires résiduelles (représentée par la petite "bosse" à très petits rayons) apparaît toujours immobile. La première population, déjà mobile dans l'état natif, explore des rayons plus importants (elle est représentée par la "bosse" entre 2 et 3 Å, choix purement arbitraire). Cependant, la deuxième population, immobile dans l'état natif, apparaît maintenant mobile, mais explore des rayons inférieurs à ceux explorés par la première population dans l'état natif (elle est représentée par la "bosse" entre 0.3 et 1 Å, choix toujours arbitraire). Le modèle utilisé ne considère qu'une seule distribution de protons mobiles. Ainsi, les deux populations maintenant mobiles et distinctes, ne sont "ajustées" que par une seule distribution lognormale. La distribution "ajustée" a donc une valeur moyenne légèrement plus élevée que celle de l'état natif ; mais une valeur de rayon "le plus probable" inférieure. Et surtout, la variance de cette distribution (qui donne l'indice de polydispersité I_p) est considérablement plus élevée que dans l'état natif. 132
- 4.27 A. Densité d'états vibrationnels, $G(\omega) \equiv g(\omega)$, de l'apo-calmoduline à 15°C (en bleu) et 70°C (en rouge) (288 K et 343 K). B. Densité d'états du tampon D₂O à 288K, en vue de comparaison. On peut remarquer que la bande à 50 meV du tampon semble bien soustraite sur les spectres de la figure A. Les densités d'états ont été calculées avec le programme de Jean-Marc Zanotti (QENSH), conformément à l'équation 2.112. La bande à 30 meV (240 cm⁻¹) semble correspondre à la bande de torsion des méthyles. Elle très amortie dans l'état natif ; mais apparaît nettement dans l'état déplié. Ceci corrobore donc la diminution du confinement des chaînes latérales observé auparavant. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80 mM KCl et 500 μM d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline était de 86 g/L. Les mesures ont été effectuées en cellule aluminium cylindrique, sur le spectromètre MIBEMOL (LLB). 135

- 5.1 Diagramme de phase (T,P), pour une protéine se dénaturant selon un mécanisme "à deux états", natif (en bleu) et dénaturé (en rouge). Figure issue de [51]. Les chemins de dénaturation thermique et de dénaturation sous pression sont représentés par les flèches rouges. Si le modèle "à deux états" s'applique, le diagramme de phase doit être elliptique, et les chemins de dénaturation en température et sous pression doivent être identiques. 138
- 5.2 Spectres de fluorescence intrinsèque normalisés (par l'intégrale) des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. Les spectres des deux formes de calmoduline ne sont pas isomorphes. L'environnement local des tyrosines diffère donc entre les deux formes de calmoduline. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O; la concentration de calmoduline est de 100 μ M (1,65 g/L). La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de CaCl₂. 140
- 5.3 Spectres DNPA, à 10 g/L, en représentation de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$ à gauche (A)) et de Kratky ($Q^2 I = f(Q)$ à droite, (B)) des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline native. La représentation de Kratky indique clairement que les deux formes sont compactes (loi de Porod "à grand Q", i.e. décroissance en Q^{-4}), mais ont des surfaces spécifiques différentes (donnée par la "hauteur" du Q^{-4} , i.e. par le préfacteur du Q^{-4}). Les deux formes de calmoduline ont des rayons de giration, R_g (donnés par les pentes "à petit Q" en représentation de Guinier), mais également des rayons de giration des domaines isolés, r_g (donnés par les pentes "à grand Q" en représentation de Guinier), différents. Les valeurs de rayon de giration sont reportées dans le tableau 5.1. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL).. 141

- 5.4 Spectres de fluorescence intrinsèque des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de la calmoduline pour plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 6800 bar. La fluorescence intrinsèque des deux formes de calmoduline diminue avec la pression. La diminution est plus marquée pour la forme holo ; mais la fluorescence de la forme holo est plus forte que celle de la forme apo, dans l'état natif. La fluorescence des tyrosines des formes apo et holo deviennent comparables à haute pression, ce qui est logique si les deux formes sont dépliées à ces pressions. Il semble que l'on puisse distinguer un léger "red-shift" pour la forme apo, et un très léger "blue-shift" pour la forme holo. Bien que ces décalages soient trop faibles pour être exploités, on peut garder cette asymétrie de comportement à l'esprit ; elle apparaîtra plus clairement par la suite. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline est de 100 μ M (1,65 g/L). La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression de Gaston Hui Bon Hoa, présenté dans l'annexe B.2. 142
- 5.5 Logarithme des constantes d'équilibre pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline en fonction de la pression. En noir, ajustements linéaires. La pente de ces droites donne la différence de volume, ou volume d'activation, ΔV ; leur intersection avec la droite $\ln K = 0$ donne la pression de demi-dénaturation. Les deux formes de calmoduline ont des pressions de demi-dénaturation très proches, d'environ 3000 bar. Elles ont cependant des volumes d'activation différant d'un facteur 2 (voir tableau 5.2). Les valeurs de constante d'équilibre sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.4. 144
- 5.6 Variations absolues (à gauche) et relatives (à droite) de l'intensité de fluorescence ($\int IF(\lambda, P)d\lambda$) en fonction de la pression, pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. Les flèches dans la légende indiquent les montées et descentes en pression. En noir, modèle "à deux états". Le dénaturation sous pression de la forme holo semble réversible ; pas celle de la forme apo. Les valeurs d'intensité intégrée de fluorescence sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.4. 144

- 5.7 Intensité de fluorescence de l'ANS, en présence des formes apo (à gauche) et holo (à droite) de calmoduline. En noir, ajustements de modèles "à trois états". Pour les deux formes, les courbes présentent un extremum, autour de 3000 bar. Ce comportement non monotone de la fluorescence sous pression est incompatible avec une dénaturation "à deux états", que laissaient supposer les expériences de fluorescence intrinsèque sous pression (voir figures 5.5 et 5.6). On peut également constater des comportements opposés pour les deux formes de calmoduline : diminution puis augmentation de la fluorescence pour la forme apo, et augmentation puis diminution pour la forme holo. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O ; la concentration de calmoduline est de 30 μ M (0,5 g/L), celle d'ANS de 200 μ M. La forme holo a été obtenue par ajout de 2 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression de Gaston Hui Bon Hoa, présenté dans l'annexe B.2. 146
- 5.8 Représentation de Kratky ($Q^2I = f(Q)$) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (à gauche) et holo (à droite) à plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 2500 bar. En traits pleins, lois limites de Guinier (à petit Q) et de Porod (à grand Q). Ces formes limites, respectant les conditions d'autocohérence, indiquent que les deux formes de calmoduline restent compactes quelle que soit la valeur de pression, jusqu'à 2500 bar. Les états intermédiaires vus en fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline (voir figure 5.7) sont donc compacts. Les deux flèches en dégradé de couleur matérialisent le déplacement du pic "à grand Q " (à petit Q , on n'a pas un pic, mais un épaulement), pour les deux formes. Ce pic "à grand Q ", correspond donc à de "petites" échelles. La position de ce pic est donc reliée à la taille des domaines. Avec la pression, ce pic se décale vers les petites valeurs de Q pour la forme apo, et vers les grandes valeurs de Q pour la forme holo. Sous pression, la taille des domaines augmente donc pour la forme apo ; elle diminue pour la forme holo. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL).. 147

- 5.9 Représentations de Guinier ($\ln I = f(Q^2)$, en haut) et de Fujisawa ($\ln I/Q = f(Q^2)$, en bas) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (à gauche) et holo (à droite) à plusieurs pressions, comprises entre 1 bar et 2500 bar. En traits pleins, ajustements linéaires. Les spectres des deux formes de calmoduline présentent deux régimes linéaires en représentation de Guinier, quelle que soit la valeur de pression, jusqu'à 2500 bar. Les deux formes de calmoduline conservent donc une structure "dumbell" sous pression. Ceci implique que les états intermédiaires vus en fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline (voir figure 5.7) ont, comme les formes natives, une structure "dumbell". Cette structure "dumbell" est confirmée par les régimes linéaires en représentation de Fujisawa. On retrouve également le comportement opposé des deux formes de calmoduline concernant le rayon de giration des domaines isolés, r_g , sous pression (r_g est donné par la pente du régime linéaire "à grand Q"), visible en représentation de Kratky 5.8. La pente du régime "à petit Q" en représentation de Guinier, elle, augmente avec la pression pour les deux formes. Le rayon de giration des deux formes de calmoduline augmente donc sous pression. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL).. 148
- 5.10 Distance interdomaine, d , (A) et rayon de giration des domaines isolés, r_g , (B) en fonction de la pression pour les formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline. En pointillés, guides pour les yeux. Pour les deux formes de calmoduline la distance interdomaine augmente avec la pression. Par contre, concernant le rayon de gyration des domaines isolés, les deux formes de calmoduline ont un comportement opposé : augmentation pour la forme apo, et diminution pour la forme holo. Les valeurs de d et r_g sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.9. 150
- 5.11 Volume spécifique apparent à 10 g/L des formes apo (en bleu) et holo (en rouge) de la calmoduline en fonction de la pression. En pointillés, guides pour les yeux : "ajustements" compressibilité. La compressibilité semble diminuer avec la pression. Les états intermédiaires sous pression, dont le maximum de peuplement est atteint autour de 3000 bar, doivent donc avoir une compressibilité plus faible que celle des états natifs correspondants. Les valeurs de v_p sont issues de l'analyse des courbes de la figure 5.9. 151

- 5.12 Représentation de Kratky ($Q^2I = f(Q)$) des spectres DNPA de solutions de calmoduline à 10 g/L sous forme apo (A) et holo (B) à 1 bar (en bleu), 2500 bar (en rouge), et après retour à pression ambiante (en noir). En traits pleins, lois limites de Guinier (à petit Q) et de Porod (à grand Q). Les spectres des deux formes de calmoduline après retour à pression ambiante, en noir, se superposent parfaitement aux spectres de ces mêmes formes de calmoduline native, à pression ambiante (en bleu). L'effet de la pression, jusqu'à 2500 bar, est totalement réversible. Les solutions de calmoduline ont été préparées en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O. La forme holo a été obtenue par ajout de 8 mM de CaCl₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule pression cylindrique en niobium, présentée dans l'annexe B.3, sur le spectromètre D22 (ILL). 152
- 5.13 Spectres quasi-élastiques d'une solution concentrée d'apo-calmoduline pour deux valeurs de Q , 1 \AA^{-1} (A et B) et 1,5 \AA^{-1} (C et D), et pour les deux valeurs extrêmes de pression (1 bar et 6000 bar). En traits pleins : ajustement du modèle complet. En traits discontinus : lorentziennes décrivant les mouvements internes. En pointillés : lorentzienne décrivant la diffusion de translation. Les spectres sont soustraits du signal du solvant. Mesures effectuées sur IN5 (ILL). La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression présenté dans l'annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL). 154
- 5.14 Spectres quasi-élastiques intégrés (en Q) d'une solution concentrée d'apo-calmoduline, $S(\omega) = \int S(Q, \omega) dQ$, pour les deux valeurs extrêmes de pression : 1 bar (en bleu) et 6000 bar (en rouge), et après retour à pression ambiante (en cyan). Les spectres sont normalisés par l'intensité à $\omega = 0$. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression présenté dans l'annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL). 155
- 5.15 A : Largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, Γ_{int} , en fonction de Q^2 , pour deux pressions : 1 bar (\circ) et 4000 bar (\odot). B : Valeur moyenne de la largeur de la lorentzienne décrivant les mouvements internes de l'apo-calmoduline, $\langle \Gamma_{int} \rangle$ en fonction de la pression. La solution de calmoduline a été préparée en tampon tris 50 mM pH=7.5 avec 80mM KCl et 500 μ M d'EDTA, en D₂O; la concentration de calmoduline est de 86 g/L. Les mesures ont été réalisées à l'aide du dispositif pression présenté dans l'annexe B.8, sur le spectromètre IN5 (ILL). 156
- 6.1 Structure cristallographique des chaînes α et β de la C-phycoyanine. En rouge, les chromophores, liés covalamment aux cystéines de la protéine, et enchâssés dans les chaîne α et β 162

6.2	Niveaux d'architecture de la C-PC. Les chaînes α et β sont représentées en bleu et en cyan respectivement; les chromophores sont en rouge. Les chaînes α et β s'associent pour former le monomère de C-PC, noté $\alpha\beta$. Trois de ces monomères peuvent s'associer pour former un trimère, en forme de tore, noté $(\alpha\beta)_3$. Deux de ces trimères peuvent s'associer, "en s'empilant", pour former un hexamère, noté $(\alpha\beta)_6$. In vivo, la C-PC est présente dans les phycobilisomes sous forme d'un empilement de deux hexamères (voir figure 6.3).	163
6.3	Structure du phycobilisome, "unité collectrice d'énergie lumineuse" des cyanobactéries. 3x2 hexamères d'allo-phycoyanine en constituent le coeur. De ce coeur partent des antennes, constituées de deux hexamères de phycoyanine, prolongés par deux hexamères de phycoerythrine.	164
6.4	Images de microscopie électronique de phycobilisomes. On peut, sur ces images, distinguer parfaitement les différentes parties du phycobillisome, représentées sur le schéma de la figure 6.3.	164
6.5	Schéma des transferts de fluorescence dans les phycobilisomes. La lumière est absorbée par toutes les protéines photosynthétiques du phycobilisome. De plus les protéines sont "rangées", de l'extrémité des antennes vers le coeur, par ordre croissant de longueur d'onde d'absorbance. L'énergie absorbée par les protéines des antennes est ainsi transférée directement (de manière non radiative), de proche en proche, vers le coeur du phycobilisome. Celui-ci concentre ainsi toute l'énergie lumineuse collectée par le phycobillisome. In vivo, cette énergie est finalement transférée aux photosystèmes I et II, où elle servira à l'hydrolyse de l'eau. In vitro, dans le cas de phycobilisomes isolés, elle est évacuée par fluorescence.	165
7.1	A et B : Titration de solutions de C-PC trimérique à 4 μM par GdmSCN (A) et GdmHCl (B). En bleu, absorbance; en rouge, fluorescence. Les traits continus noir représentent des ajustements (fluorescence et absorbance sont ajustées en même temps) avec un modèle à 4 états. C et D : populations des 4 états, données par les ajustements susdits. Les ajustements du modèle à 4 états peuvent ne pas paraître très "bons", mais le fait que ce modèle puisse décrire simultanément les courbes de fluorescence et d'absorbance atteste de leur qualité. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.	168
7.2	A et B : Spectres d'absorbance de solutions de C-PC à 6 μM à différentes concentrations de GdmSCN (A) et GdmHCl (B). C : Spectres d'absorbance de solutions de C-PC à 6 μM à différentes fractions d'éthanol. Dans tous le cas, on constate un "blue-shift" (de 618 nm vers 612 nm), accompagné d'une légère diminution de l'absorbance. Ceci est en relativement bon accord avec ce donné par Glazer et al. [106] pour la transition $(\alpha_N\beta_N)_3 \xrightleftharpoons{K} (\alpha_N\beta_N)$. La première transition correspondrait donc à la dissociation des trimères. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.	170

- 7.3 Spectres DNPA de solutions de C-PC à 200 μM , native (en bleu), et en présence de 2,8 M de GdmSCN (en orange foncé), de 6 M de GdmHCl (en orange clair) et de 6 M d'urée (en rouge). Les courbes ont été translattées pour plus de clarté. Le spectre de la C-PC native suit une loi de Porod pour $QR_g > 4$, et une loi de Guinier por $QR_g < 2$, donnant un rayon de giration, R_g , de $41,3 \pm 1 \text{ \AA}$. Cette valeur correspond au rayon de giration de la C-PC hexamérique, et non trimérique. Ce qui n'a rien d'étonnant au vu de la concentration élevée utilisée en DNPA. En présence de 2,8 M de GdmSCN ou de 6 M d'urée, le spectre de la C-PC à suit une loi de puissance pour $QR_g > 4$, avec un exposant compris entre 1,7 et 2 (il n'est pas possible de discriminer entre ces deux exposants). Dans ces conditions, la C-PC est donc dépliée. En présence de 6 M de GdmHCl, le spectre de la C-PC suit également une loi de puissance "à grand Q", avec un exposant compris entre 1,7 et 2 ; mais la remontée de l'intensité à petit Q indique que la C-PC est agrégée. La dernière transition correspond donc au dépliement de la C-PC. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 171
- 7.4 Superposition de plusieurs titrations de solutions de C-PC 4 μM par différentes solutions de GdmSCN, partant de points différents. Les courbes obtenues ne sont pas superposables. Ainsi, l'état de la C-PC ne dépend pas uniquement de la concentration de dénaturant ; mais également de l'histoire de l'échantillon, ou du "chemin de dénaturation" suivi. Ceci est un signe de non-équilibre. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 172
- 7.5 Spectre d'absorbance de la C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction du temps pour trois doses d'urée : 6 M (A), 7 M (B) et 8 M (C). L'absorbance de la C-PC ne dépend pas uniquement de la concentration en dénaturant ; elle dépend également du temps. La dénaturation de la C-PC n'est pas à l'équilibre sur les temps de l'expérimentation humaine (temps de l'ordre de la dizaine de minutes ou de l'heure, ou même plus). Le temps de relaxation dépend de la dose d'urée, il ne s'agit donc pas d'une dégradation de la protéine, mais bien de transitions avec des k_{on} et des k_{off} "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 174
- 7.6 Spectre d'absorbance de la C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction du temps pour trois températures : 50°C (A), 70°C (B) et 80°C (C). L'absorbance de la C-PC ne dépend pas uniquement de la température ; elle dépend également du temps. La dénaturation de la C-PC, sous l'effet de la température comme des dénaturants chimiques, n'est pas à l'équilibre sur les temps de l'expérimentation humaine (temps de l'ordre de la dizaine de minutes ou de l'heure, ou même plus). Le temps de relaxation dépend de la dose d'urée, il ne s'agit donc pas d'une dégradation de la protéine, mais bien de transitions avec des k_{on} et des k_{off} "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine. 174

- 7.7 Cinétiques d'évolution de l'absorbance à 620 nm de solutions de C-PC trimérique (à 4 μM) pour trois températures : 50°C (A), 70°C (B) et 80°C (C). A une température donnée, l'absorbance de la C-PC décroît selon des cinétiques multiexponentielles. Comme l'indiquait la figure 7.6, les temps de relaxation dépendent de la température. Les k_{on} et des k_{off} des transitions de dénaturation de la C-PC sont "lents", comparables au temps de l'expérimentation humaine. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 175
- 7.8 Spectres d'absorbance d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) à plusieurs températures, comprises entre 25°C et 85°C. Les spectres ont été obtenus en imposant une rampe constante de 1°C/min. On retrouve le même comportement qu'en dénaturation chimique : "blue shift" initial, diminution de l'absorbance jusqu'à atteindre un spectre très large, peu intense, avec deux "bosses", à 600 nm et 680 nm. On peut toutefois noter une certaine agrégation à haute température, signalée par la remontée de la ligne de base à courte longueur d'onde. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 176
- 7.9 A : Absorbances à trois longueurs d'onde (620 nm, 640 nm et 650 nm) d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction de la température, entre 25°C et 85°C (rampe constante de 1°C/min). B : Rapports desdites absorbances en fonction de la température. Au vu des courbes à longueur d'onde fixe (A), on pourrait croire à une transition "à deux états". Cependant, les courbes aux différentes longueurs d'onde sont décalées, signe d'états intermédiaires. Les rapports d'absorbance à différentes longueurs d'onde font clairement apparaître 3 transitions, repérées par les flèches noires. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 177
- 7.10 Ellipticités à 222 nm (en bleu) et à 595 nm (en rouge) d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μM) en fonction de la température, pour une vitesse de chauffe de 1°C/min. L'ellipticité à 222 nm est reliée à la quantité de structures secondaires, soit à la quantité d'hélices- α pour la C-PC. L'ellipticité à 595 nm est reliée à l'asymétrie de l'environnement local des chromophores, et dépend du degré d'association de la C-PC. La remontée du signal entre 55°C et 75°C peut être attribuée à la dissociation de la C-PC ; la descente de ce signal après 75°C est, elle, associée au dépliage de la C-PC, et s'accompagne d'une diminution de l'ellipticité à 222 nm. On peut noter que l'ellipticité à 222 nm ne diminue qu'après que la C-PC se soit dissociée, ce qui conforte l'hypothèse de mécanisme proposée dans l'équation 7.4. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 178

- 7.11 Fluorescence à 670 nm ($\lambda_{ex} = 620$ nm) d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μ M) en fonction de la concentration en urée, pour une température donnée (38°C) et une vitesse d'ajout donnée ($\langle \frac{dC}{dt} \rangle = 417 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$). Comme pour la dénaturation thermique, on retrouve 3 transitions, signalées par les flèches noires. Les mécanismes de dénaturation sous l'effet de la température et sous l'effet de dénaturants chimiques semblent identiques. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 179
- 7.12 A : Spectre d'absorbance d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μ M) à 70°C en fonction du temps. B : Absorbance à deux longueurs d'onde : 620 nm et 400 nm (turbidité). L'absorbance à 620 nm est principalement reliée à l'état de l'environnement des chromophores de la C-PC. "L'absorbance" à 400 nm est une mesure de turbidité, est donc reliée à l'agrégation de la C-PC. On constate une diminution de la bande d'absorbance à 620 nm, signe de la dissociation et du dépliement de la C-PC ; ainsi que l'apparition et l'augmentation d'une ligne de base hyperbolique, signe d'agrégation. Cette agrégation est fortement accrue par l'ajout de DTT, permettant la formation de ponts disulfures interprotéines. La figure B montre clairement que l'agrégation n'explose (flèche noire la plus à droite) qu'après que l'absorbance à 620 nm ait atteint un plateau autour de 0.4 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (le flèche noire la plus à gauche repère la dernière transition, correspondant au dépliement des chaînes α et β). La C-PC ne s'agrège donc qu'une fois les trois premières transitions finies. Ceci plaide à nouveau pour le mécanisme séquentiel proposé dans l'équation 7.4. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 180
- 7.13 A : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de C-PC trimérique (à 4 μ M) en fonction de la concentration en urée, à plusieurs vitesses moyennes d'augmentation de la concentration en dénaturant $\langle \frac{dC}{dt} \rangle$, et pour une température de 38°C. B : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de C-PC trimérique (à 4 μ M) en fonction de la concentration en urée, à plusieurs températures, et pour une vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant $\langle \frac{dC}{dt} \rangle$ de 400 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. Dans les deux cas, la concentration de la solution d'urée injectée est de 8 M. Les transitions se décalent vers les basses concentrations d'urée quand la température augmente, ce qui n'a rien de surprenant (Arrhénius) ; mais également quand la vitesse d'injection diminue, ce qui est un signe très net de non-équilibre. Les concentrations de transition visibles sur ces figures ne sont pas des concentrations de demi-dénaturation, mais des concentrations de relaxation. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 181

- 7.14 Concentration (de dénaturant) de relaxation de la deuxième transition en fonction du logarithme de la vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant. Selon l'équation 7.9, la concentration de relaxation doit varier comme le logarithme de la vitesse d'injection, ce qui semble le cas ici. La pente donne une valeur de différence de potentiel chimique d'activation, m_{off} , raisonnable, mais impossible à comparer avec des valeurs de la littérature. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 183
- 7.15 A : Intensité de fluorescence normalisée ($\frac{IF(C)}{IF(C=0)}$) de solutions de C-PC à plusieurs concentrations, comprises entre 4 μ M et 0,18 nM, en fonction de la concentration en urée ; à 38°C et pour une vitesse moyenne d'augmentation de la concentration en dénaturant $\left\langle \frac{dC}{dt} \right\rangle$ de 400 μ M.s⁻¹. Dans les deux cas, la concentration de la solution d'urée injectée est de 8 M. B : Proportions de monomères (en bleu) et de trimères (en rouge) en fonction de la concentration de C-PC, d'après la constante de Saito [111]. Les points correspondent aux concentrations de C-PC de la figure A. Les courbes se décalent vers les basses concentrations avec la dilution, signe que le mécanisme de dénaturation de la C-PC fait bien intervenir des dissociations. Cependant, ce décalage est en "retard" sur la diminution du degré d'association prévue par la constante d'équilibre de Saito et al. Ceci est, encore une fois, signe de non-équilibre : il faut un certain temps au système pour relaxer de la perturbation de dilution imposée. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 184
- 7.16 Ellipticité à 595 nm d'une solution de C-PC trimérique (à 4 μ M) en fonction de la température, pour trois vitesses de chauffe : 1°C/min (en rouge), 0,5°C/min (en orange) et 0,25°C/min (en bleu). Comme pour la dénaturation chimique (voir figure 7.13.A), les courbes de transition se décalent vers les basses températures quand la vitesse de chauffe diminue. Les températures de transition visibles sur ces figures ne sont pas des températures de demi-dénaturation, mais des températures de relaxation. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 186
- 7.17 Température en fonction du temps lors de l'expérience de la figure 7.9. La vitesse de chauffe lors de cette expérience était presque parfaitement constante. La rampe de température était bien contrôlée. 186
- 7.18 Absorbance à 620 nm (en bleu) et fluorescence à 640 nm (en rouge) de la C-PC (4 μ M), en fonction de la concentration en urée, et pour plusieurs temps, de 5 min à 28 h (du plus clair au plus foncé), lors d'une expérience "à temps constant". Les courbes de transition se décalent vers les basses concentrations avec le temps, comme attendu pour une dénaturation hors équilibre. Il doit être possible d'ajuster ces courbes avec un modèle du type de celui présenté dans l'équation 7.10, mais le minimum du χ^2 est très délicat à trouver, et nous n'avons pas pu à l'heure actuelle produire un ajustement satisfaisant. Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7. 189

7.19	A : Absorbance à 620 nm (en bleu) et fluorescence à 640 nm (en rouge) de la C-PC (4 μM), en fonction de la concentration en urée, et pour plusieurs temps, de 5 min à 44 h (du plus clair au plus foncé), lors d'une expérience "à temps constant". B : Efficacité de fluorescence, soit le rapport $\frac{I_F}{\epsilon}$. Il est clair, surtout au vu des courbes d'efficacité de fluorescence (avec une forte remontée à concentrations intermédiaires de GdmSCN) que ces courbes ne peuvent correspondre qu'à un modèle à 4 états au moins. Les courbes de transition se décalent vers les basses concentrations avec le temps, comme attendu pour une dénaturation hors équilibre. Il doit être possible d'ajuster ces courbes avec un modèle du type de celui présenté dans l'équation 7.10, mais le minimum du χ^2 est très délicat à trouver, et nous n'avons pas pu à l'heure actuelle produire un ajustement satisfaisant. On peut noter que les courbes d'absorbance deviennent bruitées à temps long. Ceci est dû à la formation de petites bulles, n'affectant pas la fluorescence, plus "robuste" optiquement (voir partie 3.2.3). Les solutions de CPC ont été préparées en tampon phosphate 10 mM pH=7.	191
B.1	Cellule pression pour spectroscopies optiques, conçue et dessinée par Gaston Hui Bon Hoa.	251
B.2	Plan d'une cellule cylindrique	254
B.3	Plan de la cellule "pression" DNPA à fenêtres amovibles.	256
B.4	Plan du séparateur de pression	257
B.5	Canne pression pour cryostat	258
B.6	Schéma de la cellule "pression" pour temps de vol de neutrons	259

Annexe A

Matériels et méthodes expérimentales

A.1 Les échantillons de calmoduline

A.1.1 Expression et purification de la calmoduline

La calmoduline a été exprimée et purifiée par Lilianne Assairi et Yves Blouquit, de l'institut Curie Orsay. L'ADNc de la calmoduline humaine a été amplifié par PCR et inséré dans le vecteur pET24a (Novagen) (entre les sites de restriction de NdeI et XhoI). Le plasmide résultant a été introduit dans la souche BL21(DE3)/pDIA17 (E. Coli) pour surexprimer la calmoduline humaine. Les bactéries recombinantes ont été cultivées dans un extrait de levure (tryptone) supplémenté avec de la kanamycine (antibiotique) et du chloramphénicol jusqu'à atteindre une densité optique de 1.5 à 600 nm. Ensuite, la surexpression a été induite par de l'isopropyl-D-thiogalactopyranoside (concentration finale 1 mM) pendant 3 h à 37 °C. La purification a été assurée par trois étapes de chromatographie, utilisant les colonnes DEAE-TSK, phenyl-TSK, et G25 [121].

A.1.2 Choix des conditions

Les solutions de calmoduline sont préparées en tampon tris 50 mM à pH (ou pD) 7.5 avec 80mM de KCl et 500 μ M d'EDTA ; ainsi que du $CaCl_2$ pour la forme calcique. Les conditions de pH et de force ionique ont été choisies pour se rapprocher des conditions physiologiques. Le choix du tampon tris est dicté par le fait que le pK de ce tampon varie peu avec la pression [122], et qu'il est proche du pH désiré ($pK_{tris} = 8.06$).

A.1.3 Protocole de préparation

La préparation des échantillons est effectuée en chambre froide, afin de ne pas dégrader la protéine. La première étape consiste à solubiliser la protéine lyophilisée dans du tampon (en H₂O ou en D₂O) à une concentration au moins supérieure de 20% à la concentration finale désirée (lors des étapes suivantes, la concentration peut diminuer légèrement ; et il est plus facile de diluer une solution que de la concentrer). Il faut ensuite éliminer tout le calcium potentiellement présent

dans la solution ; ainsi que, dans les cas des solutions en D₂O, tous les protons labiles. Pour cela, la solution est dialysée successivement dans trois bains de tampon, d'un volume 50 à 100 fois supérieur au volume de la solution, avec des concentrations d'EDTA décroissantes : 10 mM, 2 mM puis 500 μ M. Les solutions d'holo-calmoduline sont également dialysées dans de l'EDTA. Cela peut paraître étrange, mais il y a deux raisons à cela. Sachant que la calmoduline peut également fixer des ions magnésium (avec toutefois une affinité plus faible que pour le calcium), cela permet d'éliminer toute trace éventuelle de magnésium et d'obtenir la forme la plus pure possible. Cela permet également d'obtenir des échantillons parfaitement identiques pour les formes apo et holo. De plus, la présence d'EDTA n'empêche pas de connaître précisément la concentration de calcium libre dans la solution. Il est en effet connu que l'EDTA chélate le calcium avec une affinité au moins 4 ordres de grandeur supérieure à celle de la calmoduline pour le calcium ($K_{CaM} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_{EDTA} = 5.10^{10} \text{ M}^{-1}$), et une stoechiométrie de 1 :1 quel que soit le pH et la force ionique (dans des gammes raisonnables) [123]. La concentration après dialyse est mesurée par absorbance UV à 280 nm. Elle est ensuite ajustée à la concentration désirée par dilution dans le tampon de dialyse.

A.2 Conditions expérimentales

A.2.1 Les expériences de fluorescence intrinsèque de l'apo-calmoduline en fonction de la température

Les expériences de fluorescence en température ont été effectuées avec des cellules Hellma[®] de 1 cm de chemin optique, et de 4 mm de largeur. Ces cellules sont en effet les mieux adaptées. Les épaisseurs de quartz considérées (1 mm pour l'excitation, 3 mm pour l'émission) ont une transmission proche de 1 dans l'UV-proche. Le volume de l'échantillon reste raisonnable ($\sim 800 \mu\text{L}$). Enfin, le chemin optique d'1 cm permet de collecter le maximum de lumière d'excitation. Ces bonnes conditions expérimentales, conduisant à un bon rapport signal/bruit, permettent d'utiliser des concentrations relativement faibles en calmoduline. La concentration des échantillons était donc de 20 μM (0,33 g/L).

La régulation de la température était assurée par un bain Huber réglé à 20°C, et un bain Peltier permettant de faire varier la température entre 0°C et 100°C. Nous nous sommes cependant limités à une gamme de température allant de 15°C à 85°C. En effet, au dessous de 15°C, la condensation de l'eau à la surface de la cellule perturbe les mesures. De plus, au delà de 85°C, l'évaporation de l'échantillon peut commencer à poser quelques problèmes ; les cellules utilisées n'étant pas complètement étanches. Les transitions en fluorescence étant terminées à 70°C, aller au delà de 85°C n'apporte rien.

Les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre de fluorescence JASCO FP777. Les fentes d'excitation et d'émission ont été toutes deux réglées à 3 nm. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 280 nm, ce qui correspond à peu près au maximum d'absorption des tyrosines

($\lambda_{max} = 282.5$ nm pour des tyrosines en solution dans D₂O à 20°C, voir figure 4.6). Des spectres complets entre 285 nm et 400 nm ont été enregistrés à 15°C et 85°C pour s'assurer de la qualité des échantillons, et pour déterminer les longueurs d'onde de maximum de fluorescence. La longueur d'onde de maximum de fluorescence est de 306 nm à 15°C, et de 307 nm à 85°C. Du fait du faible glissement spectral, nous n'avons pas effectué de spectres complets pour chaque température. Nous nous sommes contentés de mesurer la fluorescence à 305 nm tous les 2°C entre 15°C et 85°C, puis entre 85°C et 15°C, en H₂O et en D₂O.

A.2.2 Les expériences de dichroïsme circulaire de l'apo-calmoduline en fonction de la température

Les expériences de dichroïsme circulaire en UV lointain ont été effectuées avec des cellules Hellma[®] de 0,1 cm de chemin optique. En effet, dans cette gamme de longueur d'onde (180 nm - 250 nm), l'absorption du tampon est loin d'être négligeable. Pour maximiser le rapport signal/bruit, il convient donc d'utiliser la concentration la plus élevée possible. Cependant, si la densité optique de l'échantillon est trop élevée, l'intensité lumineuse traversant l'échantillon devient trop faible pour être mesurée de manière précise, et les différences d'absorption $\Delta\epsilon$ deviennent fantaisistes. Ainsi il convient également d'utiliser un chemin optique faible. Une concentration de 0,3 g/L - 0,4 g/L, et un chemin optique de 0.1 cm est un bon compromis. Nous avons donc choisi une concentration en calmoduline de 20 μ M (0,33 g/L).

Les mesures ont été réalisées sur un spectropolarimètre Jasco J-715, sous un flux constant d'azote, pour limiter l'absorption parasite de l'oxygène, ainsi que pour limiter la dégradation des optiques. Le flux constant d'azote, prévenant toute condensation à la surface des cellules, a permis de descendre jusqu'à 10°C (Le D₂O gelant à 4°C, nous nous sommes abstenus de descendre plus bas). La régulation de la température était assurée par un bain Huber réglé à 20°C, et un bain Peltier permettant de faire varier la température par rampe constante entre 0°C et 100°C. Nous nous sommes limités à 90°C pour éviter l'ébullition des solutions.

Des spectres complets entre 185 nm et 250 nm ont été mesurés à 10°C et à 90°C pour s'assurer de la qualité des échantillons et des mesures, notamment autour de 222 nm. La calmoduline étant une protéine majoritairement en hélices- α (entre 0% et 3% de feuillets- β , entre 53% et 64% d'hélices- α , et entre 36% et 44% de boucles ou structures désordonnées, selon la forme de calmoduline, apo ou holo), on peut considérer que l'ellipticité à 222 nm, $[\theta]_{222}$, est reliée à la quantité d'hélices- α , et donc de structures secondaires de la protéine. La dénaturation thermique de l'apo-calmoduline a donc été suivie en mesurant l'ellipticité à 222 nm en fonction de la température (entre 10°C et 90°C), avec une rampe en température constante de 1°C/min.

A.2.3 Les expériences d'absorbance en UV proche de l'apo-calmoduline en fonction de la température

Les expériences d'absorbance UV de l'apo-calmoduline ont été effectuées avec des cellules Hellma[®] de 1 cm de chemin optique. Pour obtenir des spectres suffisamment propres pour être dérivés quatre fois, nous avons travaillé à une densité optique de 1 à 20°C ; ce qui correspond à une concentration de 340 μM ou de 5,7 g/L. La régulation de la température était assurée par un bain Huber. Pour éviter la condensation d'eau à la surface de la cellule ou l'ébullition de la solution, nous nous sommes limités à une gamme de température allant de 20°C à 90°C.

Des spectres d'absorption d'une solution d'apo-calmoduline en D₂O ont été enregistrés, sur un spectrophotomètre d'absorption Cary-100, avec une définition de 0,1 nm, ainsi qu'un temps d'accumulation de 1 s par point, tous les 5°C entre 20°C et 90°C, puis après retour à 20°C. Une correction 0%-100% a été effectuée, comme indiqué dans la partie 3.1.

A.2.4 Les expériences DNPA en fonction de la température sur des solutions d'apo-calmoduline

Les expériences de DNPA sur des solutions d'apo-calmoduline en fonction de la température ont été effectuées en D₂O, pour maximiser le contraste, et minimiser l'absorption et le bruit de fond incohérent. Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre PAXE (LLB), à des longueurs d'onde allant de 5 Å à 6 Å, et des distances échantillon-détecteur allant de 1 m à 5 m.

Les cellules utilisées étaient des cellules Hellma[®] de 5 mm de chemin optique. La transmission des échantillons dans ces conditions est comprise entre 0,7 et 0,65 selon la concentration en protéine ; ce qui est raisonnable quant aux diffusions multiples (surtout compte tenu du fait que les transmissions des échantillons sont très proches de celles des témoins). L'utilisation de cellules de 5 mm permet d'obtenir un signal suffisant pour travailler à basse concentration (de 5 g/L à 18 g/L).

Les temps de comptage étaient compris entre 1 h et 4 h selon la configuration du spectromètre et la concentration en protéine. Le regroupement des données a été effectué à l'aide du programme REGISO. Les corrections et prétraitements ont été effectués à l'aide du programme PASIDUR.PRO, comme indiqué dans la partie 2.2.2.

La régulation de la température était assurée par un bain Huber. Pour éviter la condensation d'eau à la surface de la cellule ou l'ébullition de la solution, nous nous sommes limités à une gamme de température allant de 15°C à 85°C.

A.2.5 Les expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol en fonction de la température sur des solutions d'apo-calmoduline

Les expériences de temps de vol en température ont été effectuées en D_2O , pour maximiser la transmission de l'échantillon, et minimiser le signal du solvant. Les mesures ont été réalisées sur MIBEMOL (LLB), à une longueur d'onde de 5 Å et une résolution de 180 μeV (FWHM).

Les cellules utilisées étaient des cellules cylindriques en aluminium, avec une épaisseur d'échantillon de 1 mm (différence des diamètres interne et externe). Le remplissage de la cellule a été vérifié par neutronographie. La cellule a ensuite été placée dans un cryloop, au bout d'une canne, pour assurer la régulation en température. Le cryloop a été balayé sous helium 3 fois à chaque changement d'échantillon, puis laissé avec une pression d'hélium résiduelle de 200 mbar.

La concentration de la solution était de 86 g/L. Des spectres ont été enregistrés à 15°C, 50°C et 70°C (nous nous sommes limités à 70°C pour éviter toute agrégation de la solution, étant donné la concentration très élevée), avec un temps de comptage d'environ 24 h par spectre. Le vanadium et la cellule vide ont été mesurés 12 h chacun. Une mesure rapide du cryostat vide a été réalisée pendant un changement d'échantillon pour vérifier que sa diffusion était négligeable.

Les traitements et l'analyse des données ont été réalisés à l'aide des programmes [LAMP](#) [124] et [Qens_Fit](#) [125] comme indiqué dans la partie 2.3. Pour le calcul des densités d'états, nous avons utilisé le programme de Jean-Marc Zanotti : [QENSH](#).

A.2.6 Les expériences de fluorescence intrinsèque de la calmoduline sous pression

Les expériences de fluorescence intrinsèque de la calmoduline ont été effectuées à l'hôpital du Kremlin-Bicêtre, dans l'unité INSERM U473, avec la cellule de Gaston Hui-Bon-Hoa (présentée dans la partie B.2), et un spectrophotomètre de fluorescence SLM-8000. Cette cellule ayant des fenêtres de faible diamètre, 6 mm, le trajet optique de l'échantillon est de 5 mm (un trajet optique supérieur serait inutile, la lumière émise en dehors de la zone de 6 mm centrée sur la fenêtre de sortie n'étant pas collectée). Le compartiment échantillon est en fait une cellule Hellma[©] de 5 mm x 5 mm x 10 mm (10 mm de hauteur), et contient donc 250 μL .

Étant donné le faible volume d'échantillon ainsi que l'épaisseur conséquente de saphir (2 x 10 mm) et de pentane (2 x 10 mm) traversée par les faisceaux incident et émis, le rapport signal/bruit est moins bon que pour les mesures en cellule Hellma[©]. La concentration des échantillons choisie est donc plus élevée : 100 μM .

Pour mieux discerner les artefacts de mesure dus à l'utilisation d'une cellule pression, des spectres complets d'émission ont été enregistrés entre 294 nm et 450 nm, avec une définition de 2

nm, et une longueur d'onde d'excitation de 280 nm. Les fentes d'excitation et d'émission étaient toutes deux réglées à 1 nm. Une correction de la fluorescence du tampon a été effectuée. Le temps de mesure des spectres étant long, les échantillons ont été "bullés" dans l'argon afin d'éviter toute réaction photochimique. La cellule a été thermostatée à 25°C, et des spectres ont été mesurés tous les 250 bar entre 1 bar et 6750 bar. La mesure a été répétée trois fois pour vérifier la reproductibilité.

A.2.7 Les expériences de fluorescence de l'ANS en présence de calmoduline sous pression

Les mesures de fluorescence de l'ANS en présence d'ANS sous pression ont été réalisées avec la même cellule pression et le même spectrofluorimètre que pour la fluorescence intrinsèque de la calmoduline sous pression. La longueur d'onde d'excitation était de 370 nm. Des spectres complets, avec une définition de 2 nm, ont été enregistrés entre 380 nm et 700 nm. Les fentes d'excitation et d'émission étaient toutes deux réglées à 1 nm.

La concentration en calmoduline choisie était de 30 μM . La concentration d'ANS était de 200 μM . Pour vérifier que les résultats obtenus n'étaient pas dus à des effets d'affinité, des expériences ont été effectuées à une concentration en ANS de 400 μM , et en substituant le bis-ANS à l'ANS. Une correction de la fluorescence du tampon a été effectuée. Le temps de mesure des spectres étant long, les échantillons ont été "bullés" dans l'argon, afin d'éviter toute réaction photochimique. La cellule a été thermostatée à 25°C, et des spectres ont été mesurés tous les 250 bar entre 1 bar et 6750 bar.

A.2.8 Les expériences de DNPA sous pression

Les expériences de DNPA sur des solutions de calmoduline sous pression ont été effectuées en D_2O pour maximiser le contraste, et minimiser l'absorption et le bruit de fond incohérent. Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre D22 (ILL) à une longueur d'onde de 5,5 Å, et une distance échantillon-détecteur de 2,8 m, détecteur décentré. Ceci a permis de couvrir toute la gamme en Q avec une seule configuration. Les temps de comptage étaient de 20 min par spectre.

La cellule utilisée était une cellule DNPA cylindrique en Nb (voir B.5). La cellule était fixée sur un support réglable, avec un diaphragme de 5mm intégré, centré sur la cellule.

Le regroupement des données a été effectué à l'aide du programme GRASP. Les corrections et prétraitements ont été effectués à l'aide du programme PASIDUR.PRO, comme indiqué dans la partie 2.2.2. Le témoin a été mesuré à toutes les pressions, pour corriger de la variation de densité (et donc de section efficace de diffusion) du solvant, ainsi que des éventuelles modifications du spectre de diffusion de la cellule, dues aux déformations élastiques de la cellule.

A.2.9 Les expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons par temps de vol sous pression

Les expériences de temps de vol sous pression ont été effectuées en D₂O, pour maximiser la transmission de l'échantillon, et minimiser le signal du solvant. Les mesures ont été réalisées sur IN5 (ILL), à une longueur d'onde de 5,5 Å et une résolution de 180 μeV (FWHM).

La cellule utilisée était la cellule décrite dans la partie B.8. La cellule a été placée au bout d'une canne pression, dans un cryostat orange, à 300 K. Le puits du cryostat a été balayé sous hélium 3 fois à chaque changement d'échantillon, puis laissé avec une pression d'hélium résiduelle de 100 mbar.

La concentration de la solution était de 65 g/L. Des spectres ont été enregistrés tous les 1000 bar, de 1 bar à 6000 bar, avec un temps de comptage d'environ 5 h par spectre. Deux échantillons de Vanadium ont été mesurés. Le premier, dans la cellule pression, pour déterminer la résolution ; le second a été mesuré nu, pour corriger de l'efficacité des détecteurs. Une mesure rapide du cryostat vide a été réalisée pendant un changement d'échantillon pour vérifier que sa diffusion était négligeable.

Les traitements et l'analyse des données ont été réalisés à l'aide des programmes [LAMP](#) [124] et [Qens_Fit](#) [125] comme indiqué dans la partie 2.3. Les densités d'états n'ont pas été calculées, le signal de la cellule vide dans la zone inélastique étant très élevé.

Annexe B

Les environnements "pression"

La pression est un paramètre intéressant pour étudier la stabilité des protéines. Elle permet en effet de sonder les propriétés d'hydratation des protéines, et plus particulièrement l'influence des interactions protéines-solvant sur la conformation et la stabilité des protéines [126]. Toutefois, la pression est un paramètre difficile à appliquer d'un point de vue technique, et les environnements "pression" sont loin d'être aussi courants et standardisés que ne le sont ceux pour la température. De plus, les différentes techniques de diffusion neutroniques et de spectroscopies optiques imposent de très fortes contraintes sur le volume et la géométrie des cellules échantillon ; ainsi que sur le choix des matériaux. Or ce sont ces mêmes paramètres qui déterminent complètement la tenue en pression d'une cellule. Ces contraintes varient très fortement d'une technique à l'autre, il est quasiment impossible de réaliser un environnement pression optimisé pour plusieurs techniques. Il faut penser, concevoir, et réaliser une cellule différente pour chaque technique utilisée.

Il sera uniquement question dans cette partie du domaine des moyennes pressions. Plus précisément, il sera question de pressions allant de 1 bar à 7000 bar.

B.1 Contraintes liées à la pression, et types de cellules

De manière très schématique, la résistance d'une cellule est déterminée par 4 facteurs :

1. La présence de défauts dans le matériau constituant la cellule ; ainsi que l'état de surface de la cellule. Tous les défauts et rugosités sont autant de points de départ de rupture. C'est le paramètre le plus difficile à contrôler, et qui fait souvent échec à toutes les tentatives de prédiction de pression maximale soutenable par une cellule. Ceci rend nécessaire les tests de résistance des cellules. Les calculs de résistance de cellules ne doivent être pris que comme des indications.
2. La résistance à la corrosion du matériau utilisé. Le phénomène de corrosion sous contrainte peut entraîner une destruction très rapide de la cellule si elle est constituée de matériaux oxydables. La pression accélère en effet considérablement la corrosion des matériaux oxydables

sur de grandes profondeurs, et fragilise très rapidement la structure de ces matériaux.

3. La résistance élastique du matériau utilisé. Celle-ci est généralement mesurée par le producteur du matériau.
4. Le rapport entre la surface exposée à la pression et l'épaisseur de la cellule. Plus ce rapport est important, plus la cellule résiste à des pressions élevées. Toutefois, au delà d'une certaine limite, il ne sert plus à rien d'augmenter ce rapport, la résistance de la cellule étant dictée par l'état de surface et les défauts.

Dans les cas des techniques faisant intervenir des faisceaux de grandes dimensions et nécessitant des ouvertures angulaires élevées (par exemple, la diffusion quasi-élastique ou inélastique de neutrons avec des surfaces de faisceau de l'ordre de 10 cm^2 , et des ouvertures angulaires allant jusqu'à 150°), la géométrie cylindrique est très souvent la plus adaptée pour les cellules "pression". En effet, elle minimise le rapport surface sur volume de l'échantillon, et maximise donc l'intensité du signal mesuré (généralement fonction croissante du volume de l'échantillon) pour une pression maximale donnée. De plus, les cellules cylindriques sont les plus faciles à usiner, et leur étanchéité est la plus simple à assurer.

Dans le cas de techniques faisant intervenir des faisceaux de taille plus modeste et des ouvertures angulaires plus faibles, mais nécessitant toutefois des échantillons de volume conséquent ($\sim 1 \text{ mL}$), on pourra préférer des cellules à fenêtres. Ces cellules sont constituées d'un corps épais en matériau résistant, comme des aciers inoxydables ; et de fenêtres d'épaisseur raisonnable, en un matériau adapté à la technique en question. Ce type de cellule est plus résistant, plus durable, plus modulable ; mais aussi plus cher, plus difficile et plus long à usiner, et les systèmes d'étanchéité sont plus complexes que pour les cellules cylindriques.

Enfin, pour les techniques ne nécessitant que de très faibles volumes d'échantillon ($< 100 \mu\text{L}$), il existe un dernier type de cellules : les cellules à enclume. Il ne sera pas question de ce type de cellules ici.

B.2 Absorbance et fluorescence UV-visible

Les spectroscopies d'absorbance et de fluorescence dans l'UV-visible sont les techniques les moins incompatibles avec la pression. Au niveau de la géométrie, les tailles de faisceau utilisées sont faibles ($\phi \sim 1 \text{ mm}$), et ces deux techniques ne nécessitent pas d'ouvertures angulaires élevées. Il est donc possible d'utiliser des cellules à fenêtres. Au niveau des matériaux, il existe des matériaux très transparents à la lumière UV-visible (comme le diamant ou le saphir) ayant des propriétés mécaniques correctes. Combien de bonheur, ces matériaux peuvent absorber légèrement la lumière, mais ils ne la diffusent pas. Il est donc possible d'utiliser de grandes épaisseurs de

fenêtres ($e > 1$ cm).

Pour ces expériences, nous avons utilisé une cellule pression développée par Gaston Hui Bon Hoa, dont le schéma est donné figure B.1. Cette cellule comporte quatre fenêtres en saphir, d'un diamètre utile de 6 mm et d'une épaisseur de 10 mm, disposées à angle droit. Elle permet donc de mesurer à la fois l'absorbance et la fluorescence d'un échantillon sous pression. Le volume de l'échantillon est de $250 \mu\text{L}$. Il est donc plus faible que celui des cellules Hellma[®], utilisées classiquement en fluorescence ou en absorbance à pression ambiante (1 mL). Il est cependant tout à fait suffisant pour effectuer de bonnes mesures, pour peu que l'on utilise des échantillons légèrement plus concentrés que ceux utilisés à pression ambiante.

D'un point de vue pratique, le liquide utilisé pour transmettre la pression est le pentane. Son diagramme de phase permet en effet de l'utiliser sans problème jusqu'à plus de 7000 bar, et il possède l'avantage de ne pas absorber la lumière UV-visible. La presse utilisée est une presse à piston motorisé, permettant d'atteindre des pressions de 7000 bar. La cellule comprend un circuit hydraulique et des chambres de refroidissement. Elle est donc thermostatée par un bain Huber.

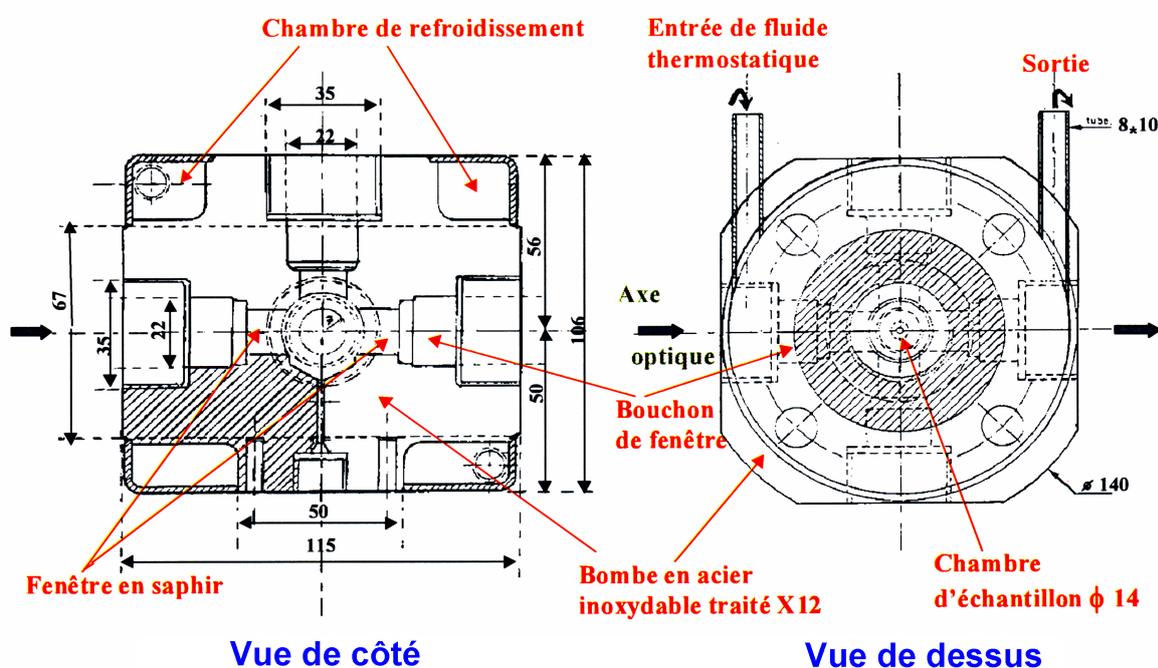


FIG. B.1 – Cellule pression pour spectroscopies optiques, conçue et dessinée par Gaston Hui Bon Hoa.

B.3 La diffusion de neutrons aux petits angles

En DNPA, les faisceaux sont nettement plus grands ($\phi \sim 5$ mm), mais leur taille reste raisonnable. Pour atteindre des valeurs de Q de 0.4 \AA^{-1} , une ouverture angulaire de 10° est nécessaire. Les volumes d'échantillons utilisés dans le cas de solutions de protéines en D_2O sont de quelques centaines de microlitres (typiquement $\sim 300 \mu\text{L}$). Il est donc possible de réaliser des cellules à fenêtres ; bien que l'on soit aux limites en termes de surfaces exposées à la pression pour ce type de cellules. Cependant, la première difficulté à résoudre est de trouver des matériaux inoxydables, ayant de bonnes propriétés mécaniques, ainsi que des transmissions correctes, et surtout diffusant peu les neutrons (aux petits angles). N'étant pas fixés au départ sur les matériaux à utiliser, nous avons commencé par utiliser des cellules cylindriques, les plus rapides à usiner. Une fois les matériaux déterminés, nous avons développé une cellule "pression" à fenêtres.

B.4 Les matériaux

Le $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$

Un matériau couramment utilisé en diffusion de neutrons est l'alliage de titane-zirconium "à b nul". La longueur de diffusion cohérente du titane est $b_{Ti}^{coh} = -3,438$ fm. Celle du zirconium est de $b_{Zr}^{coh} = 7,16$ fm. Un alliage composé de 68% (molaire, soit 53% massique) de titane, et de 32% (47% massique) de zirconium a donc une longueur de diffusion cohérente moyenne nulle. Cela pourrait donc sembler un matériau idéal pour la diffusion de neutrons aux petits angles. Il a cependant quelques inconvénients. Premièrement, il a une section efficace d'absorption élevée : $\sigma_{Ti_{0,68}Zr_{0,32}}^{abs} = 4,33$ barn. Ceci n'est pas rhédibitoire, l'absorption de la cellule se corrigeant relativement facilement (voir partie 2.2.2), mais cela n'est pas idéal. Deuxième inconvénient, il a une section efficace de diffusion relativement importante : $\sigma_{Ti_{0,68}Zr_{0,32}}^{inc} = 1,96$ barn. Bien qu'il soit toujours possible de corriger des diffusions multiples incohérentes de la cellule (voir également partie 2.2.2) ; ces procédures de corrections, qui font appel à des simulations de Monte-Carlo, sont lourdes, et ne sont pas des procédures exactes.

Le dernier inconvénient, par contre, est plus sérieux. Bien que l'alliage ait une longueur de diffusion cohérente nulle, il existe une forte diffusion cohérente aux petits angles. En effet, l'alliage n'est pas un monocristal, mais est constitué de microcristallites. Le mélange titane-zirconium n'est donc pas homogène sur des distances supérieures à/ou de l'ordre de la taille de ces microcristallites. Or, c'est précisément ces distances qui sont sondées en DNPA. En deçà de $Q = 0,1 \text{ \AA}^{-1}$, l'intensité diffusée par le $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$ augmente comme une loi de puissance. En deçà de $Q = 0,05 \text{ \AA}^{-1}$, l'intensité diffusée par la cellule devient comparable à celle diffusée par nos échantillons ; empêchant par là même toute soustraction correcte du signal de la cellule vide au signal de l'échantillon dans la cellule. Les cellules $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$ permettent donc de réaliser des mesures en DNPA pour $Q > 0,07 \text{ \AA}^{-1}$, et ainsi d'étudier les conformations sous pression de petites protéines comme le BPTI. Des

mesures ont été réalisées avec une cellule cylindrique en $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$ sur SANS-II au Paul Scherrer Institut (PSI) sur des solutions de BPTI à 10 g/L à des pressions allant jusqu'à 7000 bar. Pour étudier des protéines plus grosses, comme la calmoduline, il a été nécessaire de trouver d'autres matériaux.

Le niobium (Nb)

Le niobium est un matériau très usité en diffusion de neutrons. Il est cependant principalement utilisé pour des fenêtres de fours en tant que métal réfractaire. D'un point de vue neutronique, c'est un matériau essentiellement cohérent : $\sigma_{Nb}^{inc} = 0,0024$ barn, $4\pi (b_N^{coh})^2 = 6,253$ barn. Sa section efficace d'absorption n'est pas négligeable, mais est plus faible que celle du $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$: $\sigma_{Nb}^{abs} = 1,15$ barn, et ce pour une densité environ 40% supérieure. Une paroi de 10 mm d'épaisseur de niobium a ainsi une transmission d'environ 80% à 6 Å. Au delà de $Q = 5 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ le spectre est plat, à un niveau inférieur à celui d'une cellule Hellma[©]. En deçà, l'intensité diffusée remonte mais reste inférieure à celle diffusée par une cellule Hellma[©] pour $Q > 2 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. Une cellule en niobium permet donc d'effectuer des mesures très propres sur des solutions diluées de protéines jusqu'à $Q > 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ au moins.

Le niobium est un métal relativement mou. Il est donc difficile à usiner. De plus, les cellules DNPA cylindriques en niobium ne peuvent pas soutenir de pressions supérieures à 3000 bar. Il a cependant de très bonnes propriétés neutroniques, et il est très résistant à la corrosion. De plus, sa plasticité permet d'utiliser des systèmes d'étanchéité simples. Le niobium est donc très bien adapté à la réalisation de cellules pressions pour des mesures de DNPA sur des solutions diluées de protéines à basse pression (jusqu'à 2800-3000 bar).

L'alliage d'aluminium 2017A

Pour pouvoir dépasser 3000 bar, nous nous sommes tournés vers un alliage d'aluminium, appelé 2017A. Cet alliage d'aluminium, a une très bonne transmission ($\sim 0,96$ pour 5 mm d'épaisseur, à 6 Å), meilleure que celle du Nb, mais il diffuse plus aux petits angles. Toutefois, cette diffusion reste raisonnable, et, la diffusion étant essentiellement cohérente, elle décroît très rapidement avec Q et devient vite négligeable. Ce matériau permet donc de travailler assez proprement dans la gamme en Q nous intéressant ($Q > 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$). D'après les premiers tests effectués, ce matériau permet d'atteindre 4500 bar avec la cellule à fenêtres (voir partie B.6). Dernier avantage : ce matériau est plus facile à usiner que le Nb.

L'alliage d'aluminium 7049A

Pour pouvoir approcher de 7000 bar, nous nous sommes tournés vers l'alliage 7049A, utilisé pour la cellule TOF (voir partie B.8). Cet alliage a une bonne transmission ($\sim 0,94$ pour 5 mm), mais diffuse beaucoup aux petits angles. La diffusion étant essentiellement cohérente, elle devient

toutefois négligeable à grand Q . Ceci devrait permettre d'effectuer des mesures correctes à grand Q ($Q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$), et ainsi permettre d'obtenir une information fiable sur la nature compacte ou dépliée de protéines de taille comparable à celle de la calmoduline. Les valeurs de rayons de giration, elles, seront plus sujettes à caution.

B.5 Les cellules DNPA cylindriques

Les premières cellules DNPA que nous avons réalisées étaient des cellules cylindriques, en Nb pour les basses pressions (jusqu'à 2500 bar), et en $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$ pour les hautes pressions (jusqu'à 7000 bar). Ce type de cellule est en effet le plus rapide à usiner. Ces deux cellules ont un raccord "cône/cône" en haut pour être raccordées au séparateur de pression (voir partie B.7), et un bouchon Bridgman dans la partie inférieure pour assurer l'étanchéité, tout en ménageant un accès à l'intérieur de la cellule, permettant de la nettoyer et d'insérer le piston de séparation. Les cellules en Nb et en $Ti_{0,68}Zr_{0,32}$ ont, respectivement, une transmission à 6 \AA de 0,78 et 0,38. Le volume de l'échantillon est d'environ $300 \mu\text{L}$ dans les deux cas.

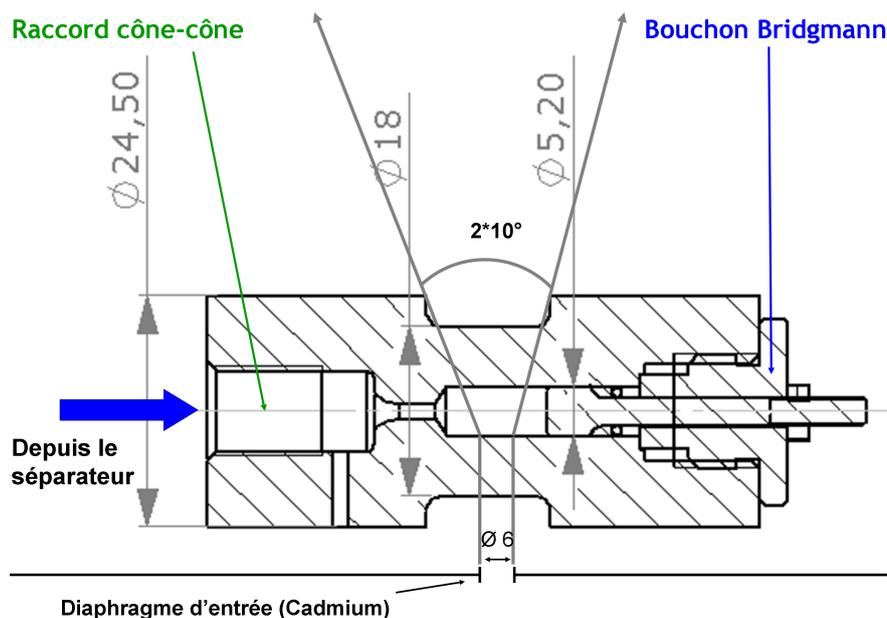


FIG. B.2 – Plan d'une cellule cylindrique

B.6 La cellule DNPA à fenêtres amovibles

Une fois trouvés de bons matériaux, nous avons développé une cellule DNPA à fenêtres amovibles et à corps en Marval x12. Le premier avantage de cette cellule est que le corps étant en Marval x12, matériau inoxydable et extrêmement résistant, elle est donc réutilisable quasiment à l'infini dans un domaine de pression allant de 1 bar à 7000 bar. Seules les fenêtres, peu chères

(moins de 100 euros pièce pour les fenêtres métalliques) et rapides à usiner, doivent être changées régulièrement. Le deuxième avantage, et non des moindres, est que cette cellule est à géométrie plane, la mieux adaptée à la DNPA (voir partie 2.2.2). Le dernier avantage est que les fenêtres de cette cellule sont amovibles, et qu'il est donc possible d'adapter le matériau et l'épaisseur des fenêtres à l'expérience réalisée. Par exemple fenêtres en Nb pour expériences à grand Q (de 10^{-2} \AA^{-1} à $0,4 \text{ \AA}^{-1}$) et à basse pression (jusqu'à 3000 bar), fenêtres en alliage d'aluminium pour expériences à grand Q et à pressions plus élevées (jusqu'à 6000 bar), fenêtres fines (qqz mm) en saphir pour expériences à petit Q (pas de limite) et très basse pression (~ 500 bar), etc...

Cette cellule DNPA à fenêtres étant "définitive", nous avons prévu un système de fixation simple, un système intégré de support de diaphragmes amovibles, ainsi qu'un circuit hydraulique intégré pour régulation en température de 15°C à 140°C avec un bain Huber. Il est possible de réguler à des températures bien plus basses en utilisant le système hydraulique. Il doit être possible de descendre jusqu'à -80°C avec un bain Huber ; mais il faudrait placer la cellule dans une enceinte sous vide, pour limiter les échanges thermiques, et surtout pour éviter la condensation d'eau légère sur les fenêtres. Cette cellule, dont le plan est donné figure B.3, possède deux liaisons "cône/cône", pour pouvoir purger et nettoyer rapidement la cellule. Ces deux liaisons permettent de relier la cellule à une presse ou à un séparateur de pression, mais également d'adapter un capteur de pression en sortie de la deuxième liaison "cône/cône", au cas où le système générateur de pression ne disposerait pas de capteur pression intégré. Pour finir, ces deux liaisons peuvent permettre d'intégrer la cellule dans un circuit de pression fermé à circulation continue. La zone échantillon est en cône tronqué, avec une ouverture de 10° pour minimiser le volume mort. Le volume de la zone échantillon est ainsi de $120 \mu\text{L}$, pour une épaisseur de 4 mm, et sachant que le diamètre maximum du faisceau incident est de 5.5 mm. Il faut rajouter à ce volume celui des connexions d'entrée et de sortie, ce qui porte le tout à environ $200 \mu\text{L}$. Un second avantage de la forme conique de la zone échantillon est d'éviter toute réflexion des neutrons, les angles de réflexion des neutrons étant de quelques degrés maximum.

B.7 Le séparateur de pression

Dans les expériences "pression", la pression est appliquée à l'aide d'une presse hydraulique manuelle. La presse est remplie d'un liquide dit "transmetteur de pression", qui peut être de l'eau lourde ou légère pour travailler à température ambiante, de l'huile de silicone ou des liquides fluorés pour travailler à basse ou très basse température. Dans tous les cas, il convient d'isoler ce liquide de l'échantillon avec un piston de séparation. Une solution consiste à inclure ce piston dans la cellule. Cependant, dans le cas de la DNPA, les hauteurs utiles d'échantillon sont généralement inférieures à 10 mm. Inclure un piston de séparation obligerait donc à doubler la hauteur de la cellule, soit à doubler la surface de la cellule. Très logiquement, ceci doublerait donc la force totale encaissée par la cellule, et diminuerait donc d'autant sa résistance. De plus en DNPA les chan-

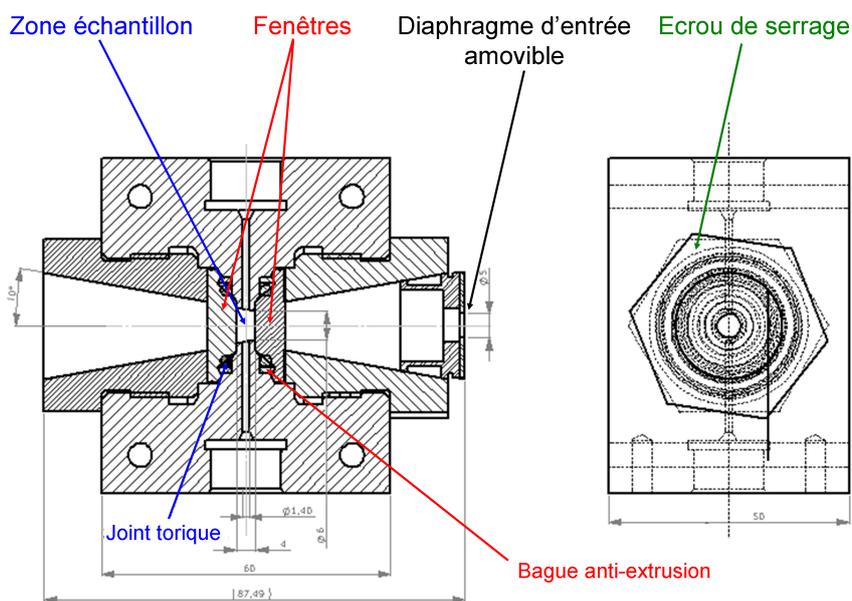


FIG. B.3 – Plan de la cellule "pression" DNPA à fenêtres amovibles.

gements d'échantillons sont fréquents. Devoir extraire puis remonter un piston de séparation à chaque changement d'échantillon augmenterait donc considérablement les temps de changements d'échantillon, déjà longs (de 3/4 d'heure à 1 heure).

Il a donc été décidé de réaliser un "séparateur de pression", pièce avec deux compartiments séparés par un piston mobile en bronze agrémenté de deux joints toriques. Ce séparateur de pression, situé hors du faisceau, est réalisé en Marval x12, matériau inoxydable et extrêmement résistant. Il est donc réutilisable quasiment à l'infini dans un domaine de pression allant de 1 bar à 7000 bar. Il possède deux liaisons "cône/cône", très faciles à monter et à démonter, pour le relier à la presse et à la cellule DNPA. Il possède en outre un bouchon Bridgmann à une extrémité pour permettre l'insertion du piston de séparation. Le piston de séparation retrouvant sa position initiale après chaque utilisation, il n'est pas nécessaire de démonter le piston à chaque changement d'échantillon. Un plan du séparateur est donné figure [B.4](#)

B.8 La diffusion quasi-élastique de neutrons

En diffusion quasi-élastique de neutrons, les faisceaux sont très grands (25 mm x 50 mm pour MIBEMOL par exemple), et les ouvertures angulaires requises sont très élevées (147° pour MIBEMOL). Il est donc exclu d'utiliser des cellules à fenêtres. De plus, la géométrie cylindrique étant la plus adaptée à la diffusion quasi-élastique de neutrons (car elle minimise les problèmes d'auto-écrantage, voir partie [2.3.2](#)), nous avons réalisé une cellule cylindrique avec un insert cylindrique afin de limiter les diffusions multiples, et d'obtenir la géométrie décrite dans la partie [2.3.2](#).

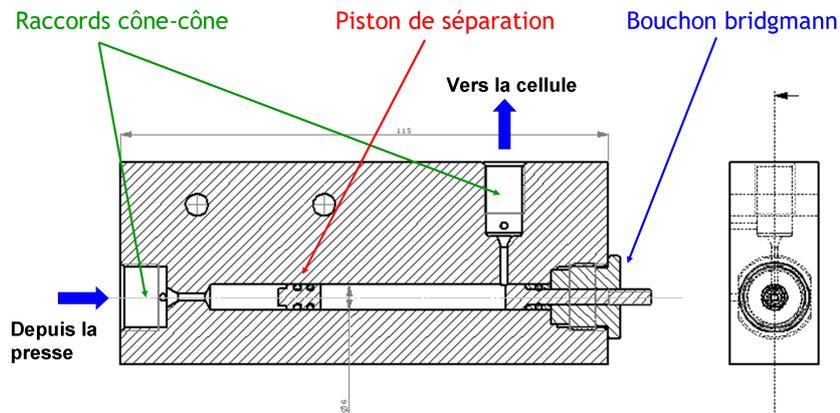


FIG. B.4 – Plan du séparateur de pression

Le matériau choisi pour cette cellule est un alliage d'aluminium, de référence 7049A. Ce matériau a en effet une bonne transmission (la transmission de la cellule est de 75% à 6 Å). Il diffuse davantage aux petits angles que l'autre alliage d'aluminium retenu pour la cellule DNPA (2017A) ; mais il diffuse très peu dans la gamme en Q des expériences de temps de vol. De plus, il est plus résistant que l'alliage 2017A. Compte tenu de la grande surface de la cellule "temps de vol" ($S > 1500 \text{ mm}^2$), le choix de l'alliage le plus résistant était nécessaire pour pouvoir atteindre 7000 bar. Les alliages d'aluminium n'étant pas inoxydables, la cellule a été anodisée afin de créer une couche superficielle d'oxyde protectrice.

Il est très important pour les études de dynamique de contrôler très précisément la température (la dynamique est proportionnelle à kT). La cellule est donc placée dans un cryostat. Elle est donc placée au bout d'une canne pression (voir figure B.5), qui ressemble fort à une canne classique pour cryostat ; à la seule différence qu'un capillaire pression passe au centre du tube central de la canne. Ce capillaire est centré par deux bagues situées en amont et en aval de la canne. La cellule est fixée directement sur le capillaire de la canne pression au moyen d'un raccord cône-cône. Le capillaire est relié au générateur de pression par son autre extrémité. Ce dispositif permet d'assurer un bon centrage de la cellule, et d'ajuster correctement la hauteur de la cellule par rapport au faisceau. Cependant, le liquide sous pression passant à proximité de la "source froide" du cryostat, il a été nécessaire d'inclure un dispositif de chauffage du capillaire pression afin d'éviter que le liquide sous pression ne gèle dans le capillaire.

Afin de pouvoir atteindre 7000 bar, le diamètre retenu pour la cellule est de 8 mm. Un insert cylindrique de 6 mm de diamètre et de 52 mm de haut délimite la partie de l'échantillon sous le faisceau. Pour limiter la quantité d'échantillon utilisée (le capillaire étant relativement long, il contient un volume non négligeable, de l'ordre du millilitre), et éviter qu'il ne soit dénaturé en passant dans le capillaire chaud (la température du capillaire est moins bien contrôlée que celle de la cellule), nous n'avons pas utilisé de séparateur en amont du capillaire (comme pour les



FIG. B.5 – Canne pression pour cryostat

expériences DNPA) ; mais nous avons choisi d'inclure un piston de séparation directement dans la cellule. La hauteur utile de l'échantillon étant déjà élevée (50 mm), l'ajout du piston de séparation n'a pas considérablement augmenté la hauteur de la cellule. Un schéma de la cellule est présenté dans la figure B.6.

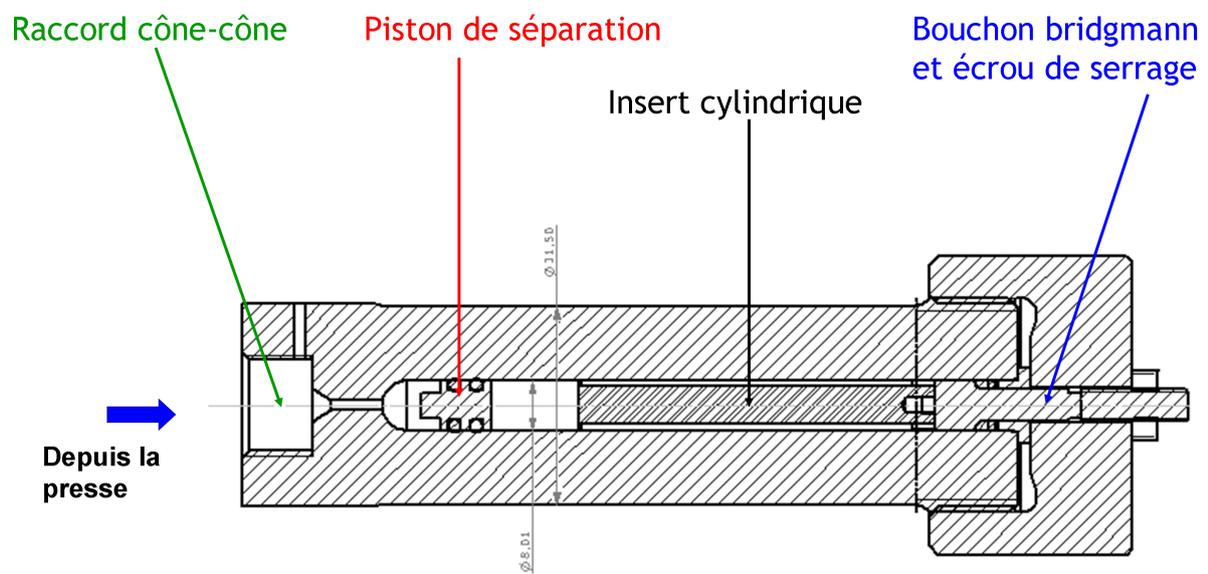


FIG. B.6 – Schéma de la cellule "pression" pour temps de vol de neutrons

Annexe C

Liste (non exhaustive) des notations et abréviations

C.1 Neutrons

- *coh* : pour cohérent
- *inc* : pour incohérent
- λ : longueur d'onde du neutron, généralement exprimée en Å
- \vec{k}, k : vecteur d'onde, pendant "ondulatoire" de l'impulsion ; $\vec{k} = \vec{p}/\hbar$
- b : longueur de diffusion, généralement exprimée en fermi (fm), 1 fm = 10^{-15} m
- σ : section efficace, généralement exprimée en barn, 1 barn = 10^{-28} m²
- θ : demi-angle de diffusion
- \vec{Q}, Q : vecteur de diffusion, variation de vecteur d'onde au cours de la diffusion ; $\vec{Q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$; généralement exprimé en Å⁻¹
- ω : énergie échangée par le neutron au cours de la diffusion, généralement exprimée en meV ; 1 meV = $1,60217646 \cdot 10^{-22}$ J
- T : transmission d'un échantillon

C.1.1 DNPA

- DNPA : diffusion de neutrons aux petits angles
- ρ : densité de longueur de diffusion cohérente, généralement exprimée en cm⁻²
- I : intensité, correspondant à la section efficace de diffusion cohérente par unité de volume, $\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}$, généralement exprimée en cm⁻¹
- $P(Q)$: facteur de forme, fonction liée à la forme de la particule
- $S(Q)$: facteur de structure, fonction liée aux corrélations de position des particules
- K : contraste, terme lié à la différence de longueur de diffusion entre la particule et le solvant, et déterminant l'intensité diffusée ($I \propto K^2$), généralement exprimé en cm/g
- R_g : rayon de giration

- π : pression osmotique
- χ : compressibilité osmotique
- A_2 : deuxième coefficient du viriel
- v_p : volume spécifique (d'une particule); généralement exprimé en cm^3/g : différence de volume d'une solution induite par l'ajout d'un gramme de particule; ne s'identifie pas au volume occupé par la particule

C.1.2 QENS

- QENS : diffusion quasi-élastique de neutrons, pour "*Quasi elastic neutron scattering*"
- τ : temps de vol du neutron
- $S(Q, \omega)$: facteur de structure dynamique
- $I(Q, t)$: fonction intermédiaire de diffusion, transformée de Fourier (temporelle) inverse de $S(Q, \omega)$
- $G(r, t)$ ($G_s(r, t)$) : fonctions de corrélation (et d'autocorrélation, s pour "*self*") de van Hove, transformée de Fourier (spatiale) inverse de $I(Q, t)$ (de $I_{inc}(Q, t)$)
- $R(\omega)$: résolution expérimentale en énergie
- $\langle u^2 \rangle$: déplacement quadratique moyen ou déplacement carré moyen, généralement exprimé en Å^2
- \mathcal{L} : lorentzienne
- Γ : largeur d'une Lorentzienne, généralement exprimée en meV
- D : coefficient de diffusion, généralement de translation, r pour la diffusion de rotation, int ou sph pour la "diffusion interne"
- $A(Q)$: EISF, pour "*elastic incoherent structure factor*", fonction liée à la géométrie de mouvements confinés, "pendant quasi-élastique" du facteur de forme
- p : fraction de protons immobiles

C.2 Optique

- UV : ultra-violet
- λ : longueur d'onde des photons, généralement en nm pour les photons UV ou visibles

C.2.1 fluorescence

- IF : intensité de fluorescence
- ex et em (par exemple dans λ_{ex} , λ_{em}) : respectivement excitation et émission. Lumière d'excitation : lumière incidente sur l'échantillon. Lumière d'émission : lumière fluorescée par l'échantillon.
- PM : photomultiplicateur

C.2.2 absorbance UV-visible

- DO : densité optique
- ϵ (ou ϵ_M) : coefficient d'extinction molaire, en $M^{-1}.cm^{-1}$
- λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximale

C.2.3 dichroïsme circulaire

- CD : dichroïsme circulaire (pour "circular dichroism")
- $[\theta]$: ellipticité, en généralement exprimée en mdeg ; abusivement notée ϵ dans certains cas

C.3 thermodynamique

- ΔX : Différence de X entre l'état 1 et 2
- G : énergie libre de Gibbs
- H : enthalpie
- S : entropie
- V : volume du système ; s'apparente à v_p , volume spécifique de la particule, et non pas à v , volume occupé par la particule
- C_p : chaleur spécifique, $C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_P$
- β : compressibilité, $\beta = \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T$
- $X_0 (T_0, P_0)$: valeur de X au point de référence arbitraire à partir duquel a été intégrée l'expression différentielle de l'énergie libre ($d\Delta G = \Delta V dP - \Delta S dT$)
- K : constante d'équilibre
- k : vitesse de la réaction ; pour un équilibre, on note k_{of} et k_{on} ou k_i et k_{-i} les deux réactions inverses
- $T_m, C_m, P_m, P_{1/2}, P_{50\%}$: température, concentration de dénaturant, ou pression de demi transition ; température, concentration de dénaturant, ou pression pour laquelle les populations des états 1 et 2 sont égales
- f_x : population de l'état x

C.4 chimie - biochimie

- CaM : calmoduline
- apo-CaM et holo-CaM : formes apo et holo de la calmoduline, soit calmoduline respectivement en absence de Ca^{2+} et saturée en Ca^{2+}
- C-PC : C-phycoyanine
- EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique ("*ethylenediamine-tetraacetic acid*"), chélateur des ions calcium (Ca^{2+}) et autres divalents (Mg^{2+} par exemple)

- ANS : 8-Anilino-1-naphtalènesulfonate ("*8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid*"), sonde hydrophobe fluorescente. A une forte fluorescence en milieu apolaire ; une fluorescence négligeable en milieu polaire, et notamment aqueux
- GdmHCl : (hydro-)chlorure de guanidinium, dénaturant chimique (produit extrêmement nocif, se fixant notamment sur la moelle osseuse)
- GdmSCN : thiocyanate de guanidinium, dénaturant chimique (produit extrêmement nocif, alliant les effets du guanidinium et du cyanure ; mortel à faible dose)

Résumé / Abstract

Structure et dynamique de l'état natif et des états dénaturés par la chaleur et la pression de la calmoduline. Une étude par diffusion de neutrons et spectroscopies optiques.

Ce travail de thèse porte sur l'étude de la dénaturation thermique et sous pression de la calmoduline, une petite (16 kDa) calci-protéine soluble, monomérique, et "majoritairement a", excellent système modèle pour les études de dépliement/repliement. Cette protéine existe sous deux formes, apo et holo, selon qu'elle a ou non fixé des ions calcium. La comparaison des chemins de dépliement par la chaleur et par la pression montre sans ambiguïté que le dépliement des deux formes de calmoduline ne peut pas être correctement décrit par un simple modèle "à deux états" Natif \rightleftharpoons Déplié. Les stabilités issues des expériences sous pression et en température sont largement différentes, ce qui indique la présence d'états intermédiaires. Bien que le chemin de dénaturation thermique ne semble pas faire intervenir d'état intermédiaire de type "molten-globule", fréquemment rencontré en dénaturation de protéines, le chemin de dénaturation sous pression fait intervenir un état intermédiaire compact, dont le maximum de peuplement se situe autour de 3000 bar. Le comportement sous pression des deux formes de calmoduline est par ailleurs asymétrique : les domaines de la forme holo se contractent sous pression, ceux de la forme apo se dilatent. La conformation de l'état final de la dénaturation thermique de la forme apo s'apparente à celle d'une chaîne polymère Gaussienne, avec, toutefois, des structures secondaires résiduelles. Sa dynamique semble plus hétérogène que celle de l'état natif ; suggérant ainsi l'idée que la dynamique des atomes d'une protéine est dans une plus large part déterminée par leur distance au squelette peptidique que par leur exposition au solvant. Il est à noter que la dénaturation thermique de l'apo-calmoduline s'est avérée fortement irréversible. Dans une dernière partie, ce travail de thèse présente l'étude de la dénaturation d'un système plus complexe, oligomérique, la C-phycoyanine, protéine photosynthétique des cyanobactéries. Cette protéine se dénature selon un mécanisme hors-équilibre à l'échelle de l'expérimentation classique, à plusieurs états, avec dissociation des oligomères dans un premier temps, et dépliement des monomères dissociés dans un deuxième temps.

Mots clés : Calmoduline, C-phycoyanine, dépliement, pression, température, conformation, dynamique, neutrons, DNPA, QENS.

Structure and dynamics of native, thermal and pressure denatured states of calmodulin. Neutron scattering and optical spectroscopy studies.

This thesis work is concerned with the study of thermal and pressure denaturation of calmodulin, a small (16 kDa), monomeric, soluble, and "mainly a" calci-protein. This protein, that is an excellent model system for unfolding/folding studies, exists in two forms : the holo and the apo forms, depending on the presence or the absence of calcium ions. The comparison of thermal and pressure unfolding pathways shows clearly that the unfolding of both calmodulin forms cannot be correctly described using a "two-state" model (Native \rightleftharpoons Unfolded). The stabilities given by pressure unfolding experiments and by thermal unfolding ones are largely different, signing the presence of intermediate states. Even if thermal unfolding pathway does not exhibit "molten-globule" intermediate state, classically encountered in protein unfolding pathways, pressure unfolding pathways of both calmodulin forms contain compact intermediate state, with a maximum population around 3000 bar. Up to this pressure, the pressure behaviours of the two calmodulin forms are asymmetric : the domains of the holo form are compacted under pressure, while those of the apo form are dilated. The conformation of the final state of thermal unfolding of apo-calmodulin is similar to that of a Gaussian chain, with some residual secondary structures. Its dynamics looks more heterogeneous than that of the native state, suggesting that the distance of atom to protein backbone plays a more important role than the solvent exposure to the residue. An important finding is that the thermal unfolding of apo-calmodulin is irreversible. The last part of this thesis deals with the unfolding of a more complex oligomeric system : the C-phycoyanin photosynthetic protein. The unfolding pathway of this protein contains several steps, including firstly the oligomer dissociation, and secondly the unfolding of the dissociated monomer. This unfolding mechanism is out of equilibrium at the time-scale of classical experimentation.

Key words : Calmodulin, C-phycoyanin, unfolding, pressure, temperature, dynamics, neutrons, SANS, QENS.