



HAL
open science

Étude des événements cinétiques initiaux du repliement de l'apomyoglobine.

Sébastien Weisbuch

► **To cite this version:**

Sébastien Weisbuch. Étude des événements cinétiques initiaux du repliement de l'apomyoglobine.. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00178851

HAL Id: tel-00178851

<https://theses.hal.science/tel-00178851>

Submitted on 12 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de l'Université Joseph Fourier-GRENOBLE I

UFR de Biologie

Pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

De l'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sébastien WEISBUCH

Le 7 janvier 2005

**Etude des évènements cinétiques initiaux du repliement de
l'apomyoglobine**

Directeurs de recherche :

M. Marc JAMIN

Soutenue le 7 janvier 2005 devant le jury composé de :

J M Frère, Rapporteur

A Chaffotte, Rapporteur

Y Dupont, Examineur

M Jamin, Examineur

C Ebel, Examineur

« Faites confiance à votre instinct.
Il vaut mieux que les erreurs soient les vôtres, plutôt que
celles de quelqu'un d'autre. »

[Billy Wilder]

« Les deux mots les plus brefs et les plus anciens, oui et
non, sont ceux qui exigent le plus de réflexion. »

[Pythagore]

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mes parents et ma famille.

Je tiens également à remercier chaleureusement Florent Guillain pour m'avoir accueilli et conseillé au sein du laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire.

Remerciement également à Yves Dupont pour ses discussions efficaces, sa réactivité et tous les conseils qu'il m'a prodigués.

Mon plus grand MERCI à Marc Jamin. Merci beaucoup Marc pour tout ce que tu m'as chaleureusement enseigné durant ces années et les bons moments partagés.

Ma chance ne s'arrête pas là et je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire BMC, avec qui il est si agréable de travailler et discuter, et plus particulièrement les membres de l'équipe « folding, DCP » : notamment Charlotte (pour sa douceur, son humour...), Nathalia (pétillante et chantante...) qui ont traversé la thèse sur le même bateau que moi ; Greg (pour ses qualités humaines...), Vincent (pour son choix de B&B, parmi d'autres qualités !) ; à ceux-ci s'ajoutent Serge, Mohamed, Michel et David et également ceux arrivés plus récemment qui m'ont vu seulement branché à l'ordinateur (LN, Jérémy, Béa, Caro, Clément...)!

Une personne clé dans le laboratoire se doit d'être remercié pour ses qualités humaines, son efficacité, son écoute et sa très grande gentillesse : Michelle Rondot, sans qui rien ne serait pareil.

Remerciement à mes associés, messieurs Pasqual, Bouzidi et Draïdi (et leurs moitiés) et à toute l'équipe ImmunID : Marielle, Fatena, Anne, Solène et Ingrid. Remerciement également à travers ImmunID, à tous nos partenaires dans cette aventure. Et merci à la Recherche, qui dans toutes ses composantes (notamment le Doctorat !), est le terreau de cette Aventure.

Bien sur, mes remerciements vont à mes amis, parce que l'amitié c'est les couleurs de la vie.

A ma plus belle expérience,
qui se reconnaîtra.

Avant propos

La Recherche a comme particularité d'apporter plus de questions à chaque nouvelle réponse. C'est en cela que repose son intérêt et sa difficulté.

Au cours de ma thèse, je l'ai expérimentée plusieurs fois : que ce soit en étant directement liée à mon travail de recherche, ou pour les étudiants auprès desquels j'ai eu la chance (était-elle partagée ?!) d'enseigner, ou lors de différentes expériences avec plus ou moins de micro-gravité ou encore pour mes responsabilités dans les associations de jeunes chercheurs...

Cela implique de développer ses connaissances dans ces divers domaines. Avec l'organisation et la rigueur que l'on acquiert progressivement en fonction des problèmes rencontrés (l'expérience...), la corrélation entre les expériences et les connaissances permet de mettre en place une méthode expérimentale. Lorsque l'on a la méthode, cela implique que l'on sache quels outils sont à notre disposition. C'est à partir de là que l'on peut élaborer des stratégies, et décider dans quelle direction (et comment) prospecter...

Bien sur, mon exemple n'est que prétexte pour cette discussion : je n'ai en effet pas l'organisation, la rigueur ou encore la méthode parfaite. Mais le travail de recherche nécessite une perpétuelle amélioration et remise en question de ces qualités. Si je n'ai pas acquis la méthode ou la connaissance universelle, j'ai pu au cours de ma thèse, identifier ce mouvement perpétuel qui permet une pratique de la science en tant qu'action, interrogation, investigation, expérimentation, et construction collective...

Avec un peu de recul, il est clair que la thèse n'est pas une fin en soit : elle n'est que le début d'une prise de conscience (de connaissance, de méthodologie, etc.). J'ai la sensation que la thèse permet de caresser un domaine scientifique et que cet effleurement m'a permis de prendre quelques informations que j'emporte avec moi en bagages. C'est un peu frustrant, parce que c'est à posteriori que l'on commence à mieux appréhender ce bout d'univers scientifique. Mais, avec l'expérience, la prochaine caresse devrait être encore plus douce.

Impliqué dans un projet en Biotechnologie, l'objectif est de développer une technologie de suivi de la réponse immunitaire (immunomonitoring) avec des techniques de biologie moléculaire. Mes compétences initiales sont déjà mises à l'épreuve pour des développements dans les domaines de la μ fluidique et de la bioanalyse (La mode est à la miniaturisation : c'est mignon et moins cher, en théorie). Au-delà de l'ambition scientifique et technique, l'ambition commerciale du projet va également mettre largement à contribution l'ensemble des compétences que l'expérience de thèse m'aura apporté.

Voilà pour la nouvelle caresse.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE.....10

1.1 NATURE ET SIGNIFICATION DU REPLIEMENT DES PROTEINES.10

1.1.0 PREAMBULE..... 10

1.1.1 LE PROBLEME DU REPLIEMENT DES PROTEINES..... 11

QUELLE PROBLEMATIQUE ?.....11

Et *IN VIVO* ?11

UN PRINCIPE D'AUTOASSEMBLAGE A PARTIR DE LA SEULE SEQUENCE EN ACIDES AMINES.12

LEVINTHAL ET SON PARADOXE13

1.1.2 COMMENT MODELISER LE PROBLEME ET TENTER DE LE RESOUDRE ?..... 14

DES MODELES POUR RESOUDRE LE PARADOXE DE LEVINTHAL14

LES VUES CLASSIQUE ET MODERNE.....16

1.1.3 LES PROPRIETES DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE AU COUR DE LA REACTION DE REPLIEMENT. 19

1.1.3.0 PREAMBULE19

1.1.3.1 PROPRIETES DE L'ETAT DEPLIE « PELOTE STATISTIQUE ».....21

1.1.3.2 PROPRIETES DE L'ETAT PARTIELLEMENT DEPLIE.25

1.1.3.3 PROPRIETES DE L'ETAT NATIF.....25

1.1.3.4 L'ETAT DE TRANSITION27

1.1.4 LE MOLTEN GLOBULE SUR LE CHEMIN DU REPLIEMENT 30

1.1.4.1 L'ETAT MOLTEN GLOBULE.....30

1.1.4.2 « MOLTEN GLOBULE » A L'EQUILIBRE32

1.1.4.3 OBSERVATION DE L'ETAT MG A L'EQUILIBRE.....33

1.1.4.4 L'ETAT « MOLTEN GLOBULE » COMME INTERMEDIAIRE CINETIQUE.....34

1.1.4.5 STRUCTURE DE L'ETAT « MOLTEN GLOBULE » CINETIQUE ET A L'EQUILIBRE DE PROTEINES GLOBULAIRES.....35

1.1.4.6 ROLE DE L'ETAT « MOLTEN GLOBULE » DANS LE REPLIEMENT DES PROTEINES35

1.1.4.7 LE REPLIEMENT, UN PROCESSUS EN DEUX ETAPES.....37

1.1.4.8 ROLES BIOLOGIQUES DES ETATS INTERMEDIAIRES.38

CHAPERONNE38

AMYLOÏDOGENESE39

ETATS NON NATIFS PROCHES DE MEMBRANES BIOLOGIQUES.....40

1.1.5 EVENEMENTS INITIAUX DU REPLIEMENT DES PROTEINES 41

1.1.5.1 INTRODUCTION41

1.1.5.2 OBTENTION DES ETATS DENATURES42

1.1.5.3 TECHNIQUES BIOPHYSIQUES UTILISEES POUR ETUDIER LE REPLIEMENT DES PROTEINES.....43

1.1.5.4 LES METHODES DE MELANGE RAPIDE.....45

METHODES DE CONTINUOUS FLOW :46

METHODES DE STOPPED-FLOW :47

METHODES DE QUENCHED FLOW :47

1.1.5.5 SIGNIFICATION DES EVENEMENTS PRECOCES DE REPLIEMENT47

LA « BURST PHASE »47

EVENEMENTS PRECOCES :48

LIMITES49

1.1.6 STRATEGIES DE STABILISATION DES PROTEINES : OSMOLYTES, ENCOMBREMENT MOLECULAIRE... 49

1.1.6.1 L'EFFET OSMOPHOBIQUE : UNE FORCE THERMODYNAMIQUE POUR LE REPLIEMENT DES PROTEINES (BOLEN AND BASKAKOV 2001), (BOLEN 2004).....50

1.1.6.2 STRATEGIES « ENTROPIQUES » POUR LA STABILISATION DES PROTEINES :51

1.1.6.3 UNE STRATEGIE ENTROPIQUE : L'ENCOMBREMENT MOLECULAIRE.52

1.2 LE PROCESSUS DE REPLIEMENT DE L'APOMYOGLOBINE 54

1.2.1 INTRODUCTION	54
1.2.2 LA FORME NATIVE DE L'APOMb	55
1.2.3 LA FORME DEPLIEE DE L'APOMb	57
1.2.4 LE PROCESSUS DE REPLIEMENT DE L'APOMb	58
FORMATION DE I DANS DES CONDITIONS NATIVES.....	60
L'INTERMEDIAIRE A PH 4 COMME MODELE DE I	61
LES INTERMEDIAIRES IA ET IB	64
INTERMEDIAIRES SUR OU EN DEHORS DU CHEMIN ?	65
FORMATION DE N.....	67
1.2.5 LE PROCESSUS DE DEPLIEMENT DE L'APOMb	68

CHAPITRE 2. RESULTATS & DISCUSSION..... 70

2.1. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE D'APPAREIL DE MELANGE ULTRA RAPIDE 70

2.1.1 PREAMBULE :..... 70

2.1.2 RESULTATS PRELIMINAIRES DE FREEZE QUENCHING 71

2.1.2.1 MATERIEL ET METHODES..... 72

MATERIEL BIOLOGIQUE.....72

CONGELATION ET SPECTROSCOPIE RPE.....73

SPECTROSCOPIE D'ABSORBANCE ET STOPPED-FLOW.....73

ANALYSE DES RESULTATS.....73

2.1.2.2 LA REACTION DE LIAISON DE L'AZIDE SUR LA MYOGLOBINE COMME REACTION MODELES

POUR TESTER LE TEMPS MORT : 73

INTRODUCTION.....73

RESULTAT ET DISCUSSION75

CHOIX DES CONDITIONS POUR LA REACTION TEMOIN DE FIXATION DE L'AZIDE A LA MYOGLOBINE.....75

STRATEGIES POUR OPTIMISER LA RESOLUTION EN TEMPS DU PROCESSUS DE FREEZE QUENCHING :78

RESULTATS DE « FREEZE QUENCHING » DE LA REACTION DE LA METMYOGLOBINE AVEC L'AZIDE.....78

PARAMETRES A MAITRISER POUR OPTIMISER L'APPAREIL DE FREEZE QUENCHING :82

2.1.2.3 CYTO C, UN MODELE POUR SUIVRE LE REPLIEMENT D'UNE PROTEINE : MISE AU POINT INITIALE (PAR FREEZE-QUENCH & RPE)..... 84

DESCRIPTION DU MODELE.....85

RESULTATS PRELIMINAIRES85

2.1.3 RESULTATS DE STOPPED-FLOW ULTRA-RAPIDE..... 89

MISE AU POINT ET CARACTERISATION DU TEMPS MORT.....89

MATERIEL ET METHODES :89

RESULTATS ET DISCUSSION :90

1- DETERMINATION DES CONDITIONS LIMITES D'UTILISATION DE LA MICROCUVE.....90

2-DETERMINATION DU TEMPS MORT DU NOUVEAU MELANGEUR CONÇU AVEC DES VOLUMES REDUITS.....91

3 -MISE AU POINT DES MESURES CINETIQUES PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE ET TESTS.....96

2.2 UTILISATION D'APPAREIL DE MELANGE ULTRA RAPIDE POUR L'ETUDE DES CINETIQUES DE REPLIEMENT DE L'INTERMEDIAIRE DE L'APOMB..... 97

CINETIQUES SUBMILLISECONDES COOPERATIVES DE L'INTERMEDIAIRE A PH 4 DE L'APOMYOGLOBINE	97
2.2.1 RÉSUMÉ.....	97
2.2.2 INTRODUCTION.....	98
2.2.3 MATERIALS AND METHODS	100
<i>PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION.....</i>	100
<i>CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY</i>	101
<i>STOPPED-FLOW MEASUREMENTS</i>	101
<i>FIT TO A TWO-STATE MODEL.....</i>	101
<i>MODELING THE PH DEPENDENCE OF THE RATE CONSTANTS</i>	102
2.2.4 RESULTS.....	103
<i>A SUBMILLISECOND STOPPED-FLOW APPARATUS.....</i>	103
<i>FOLDING AND UNFOLDING KINETICS OF IA AT PH 4.2</i>	105
<i>FOLDING AND UNFOLDING KINETICS OF IA AT PH 4.2</i>	106
<i>PROTEIN CONCENTRATION DEPENDENCE OF THE FOLDING KINETICS OF IA</i>	110
<i>TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE FOLDING KINETICS OF IA</i>	110
FOLDING OF N UNDER NATIVE CONDITIONS.....	111
2.2.4 DISCUSSION	112
<i>FOLDING PATHWAY OF APOMb</i>	112
COOPERATIVITY IN APOMb FOLDING PROCESS.....	113
WHY IS THE FORMATION OF IA SO SLOW AT PH 4 ?	116
2.2.6 REFERENCES.....	118

2.3 OSMOLYTES ET ENCOMBRANTS MOLECULAIRES. EFFETS SUR LES EQUILIBRES ET LES CINETIQUES DE REPLIEMENT DE L'APOMYOGLOBIN ET DU CYTOCHROME C 122

<i>MATERIEL ET METHODES.....</i>	122
2.3.1 INFLUENCE D'OSMOLYTE SUR L'APOMYOGLOBINE DE CHEVAL ET DE CACHALOT	124
<i>INTRODUCTION.....</i>	124
<i>RESULTATS</i>	128
<i>DISCUSSION.....</i>	141
2.3.2 EFFET DE L'ENCOMBREMENT MOLECULAIRE SUR LE REPLIEMENT DU CYT C.....	146
<i>INTRODUCTION.....</i>	146
<i>RESULTAT.....</i>	147
<i>DISCUSSION.....</i>	148
2.3.3 CONCLUSION : CROWDING AND OSMOLYTES	150
DU CODE GENETIQUE AU CODE « PROTEIQUE » : AUX LIMITES DE L'EVOLUTION MOLECULAIRE	150
ET IN VIVO?	150
DETERMINISME DU REPLIEMENT, OU IL EST QUESTION DE L'UTILITE DE SE DEPLIER.....	151
UN DEFI : DECRYPTER LE CODE DE REPLIEMENT ET COMPRENDRE SON EVOLUTION.....	152

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERPECTIVES.....153

CHAPITRE 4. BIBLIOGRAPHIE.....156

Abbréviations :

ADN	Acide desoxyribonucléique
ANS	8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid
ApoMb	apomyoglobine
ARN	Acide ribonucléique
°C	Degré Celsius (=degré Kelvin – 273.15)
Ca	Calcium
CD	Circular dichroïsm
cyto C	cytochrome C
Da	Dalton, g.mol ⁻¹
Echange	H/D échange hydrogène / deutérium
GuHCl	Chlorure de Guanidine
HPLC	high performance liquid chromatography
I	état Intermediaire
k _{obs}	constante de vitesse observée
MG	état de globule fondu (« Molten Globule »)
mol	6.0221x10 ²³
N	état Natif (replié)
Nata	N-acetyl tryptophan amide
NaN ₃	Azide
NBS	N-Bromosuccinimide
nm	nanomètre (10 ⁻⁹ m)
NMR	Résonnance magnétique nucléaire
NOE	nuclear Overhauser effect
metMb	metmyoglobine
mM	millimolaire (10 ⁻³ moles/ Litre)
pH	-logarithme(mole/litre en ion H ⁺)
PPII	polyproline II
R	constante des gaz, molaire (8.3145 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
Rg	rayon de giration
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RPE	Résonnance paramagnétique électronique
SAXS	diffusion de rayons X aux petits angles (small angle X ray scattering)
TFA	Acide TriFluoroacétique
TMAO	oxide de triméthyle amine.
Trp	Tryptophane
TS	état de transition (Transition State)
T-Jump	Saut de température
U	état déplié (Unfolded)
UV	Ultra Violet
VIS	Visible
µL	microlitre (10 ⁻⁶ L)
µm	micromètre (10 ⁻⁶ m)
µM	micromolaire (10 ⁻⁶ moles/ Litre)

Chapitre 1. Introduction générale

1.1 Nature et signification du repliement des protéines.

1.1.0 Préambule.

Pourquoi est-il important de comprendre et de prédire le processus de repliement des protéines ?

La connaissance des principes physico-chimiques dirigeant l'apparition de l'état natif selon un processus spontané d'auto-assemblage complètera notre compréhension des processus inscrits dans le dogme central de la biologie moléculaire et cellulaire qui décrit le passage de l'ADN vers la protéine et sa fonction, en passant par la transcription de l'ADN et la traduction de l'ARN. Caractériser les forces qui stabilisent une protéine au cours de son repliement permettra de mieux décrire et comprendre ces processus fondamentaux. D'autre part, mieux comprendre les mécanismes du repliement d'une protéine permettrait de prédire la structure 3D à partir de la seule séquence en acides aminés. Cela réduirait grandement le processus souvent laborieux de détermination de la structure à partir de cristaux ou par RMN. La résolution du « problème du repliement » ouvrirait également la porte à de nombreuses applications biotechnologiques et biomédicales: conception *ab-initio* de « protéines médicaments », bio-senseurs, compréhension et découverte de solutions pour les maladies associées à un mauvais repliement en améliorant et réparant des protéines non fonctionnelles (la mucoviscidose ((Hagmann 1999)), la maladie des os de verre (Baum and Brodsky 1999), divers cancers ((Bullock, Henckel et al. 1997)), les amyloïdoses (maladie d'Alzheimer, maladie de Creutzfeld-Jakob, diabète de type II, maladie de Parkinson...((Baum and Brodsky 1999)) (voir également ((Dobson 2004))).

Le code décrivant l'information génétique étant maintenant connu, un autre grand pas dans la compréhension du monde vivant serait le décryptage du code du repliement, codé dans la séquence en acides aminés.

1.1.1 Le problème du repliement des protéines.

Un polypeptide néo-synthétisé doit être capable de trouver rapidement le chemin vers sa structure tridimensionnelle finale parmi de nombreuses voies alternatives. Découvrir comment cela s'effectue est un grand challenge de la biologie structurale moderne.

Quelle problématique ?

Les protéines sont impliquées virtuellement dans tous les processus biologiques des systèmes vivants et ont la nécessité d'être repliées « vite et bien ». Elles sont synthétisées par les ribosomes sous la forme de chaînes linéaires comportant typiquement des centaines d'acides aminés placés dans un ordre qui est défini par la séquence codante de l'ADN génomique.

Le séquençage du génome humain a permis d'évaluer un catalogue des gènes humains codent pour environ 40 000 séquences de protéines différentes (Science, Vol 291 2001, J. Craig Venter). Pour devenir fonctionnelles, chacune de ces protéines doit se replier dans une structure tridimensionnelle unique et spécifique qui détermine sa fonction dans l'organisme. Chacune d'elles acquiert une structure qui peut être classée parmi environ un millier de familles de structure différentes ((Chothia 1992), (Holm and Sander 1996)). En plus d'être spécifique, un tel processus doit également être rapide, c'est-à-dire conforme aux nécessités de l'organisme en terme de vitesse de synthèse et de biodisponibilité. Aussi, chez *Escherichia coli* (*E.coli*) la vitesse de synthèse *in vivo* peut être aussi rapide que 20 résidus par seconde et les cellules bactériennes peuvent se diviser en moins de 30 minutes. La problématique du repliement des protéines est donc de déterminer quels sont les facteurs permettant à une protéine de se replier « vite et bien ».

Et *in vivo* ?

Les chaperonnes et d'autres molécules (isomérases, ...) sont associées aux évènements de repliement intracellulaire mais sont aussi associées aux processus de localisation et de contrôle de fonctionnalité permettant à une protéine donnée de fonctionner correctement au bon moment et au bon endroit ((Pelham 1999)).

A l'échelle de la cellule, le repliement d'une protéine prend place dans un environnement complexe, largement encombré par de nombreuses molécules. Dans le cytoplasme des

bactéries, par exemple, la concentration macromoléculaire avoisine les 350 mg/mL (Ellis 1997). Pour comparaison, c'est l'ordre de grandeur de la concentration en protéine dans un cristal préparé pour la résolution de sa structure par diffraction des rayons X. Pour permettre au repliement de s'effectuer dans de telles conditions cellulaires, un grand nombre de protéines ont pour fonction d'accompagner le repliement d'autres protéines ((Goodsell 1991)). Ces protéines d'accompagnement ont pour fonction d'éviter l'agrégation de la protéine en cours de son repliement ou encore d'accélérer certaines étapes de ce processus qui serait plus lent dans le milieu cellulaire. On peut citer parmi ces protéines « catalyseurs » du repliement, les isomérases de prolines qui catalysent l'isomérisation cis/trans des prolines ou les isomérases de ponts disulfures qui accélèrent la formation et le réarrangement des ponts disulfures.

(voir chapitre : 1.1.5.3 Une stratégie entropique : l'encombrement moléculaire, 1.1.4.8 Rôle des états intermédiaires / rôle biologique)

Un principe d'autoassemblage à partir de la seule séquence en acides aminés.

L'information fondamentale de la structure d'une protéine est comprise dans la séquence en acides aminés de cette protéine : c'est « le principe d'auto-assemblage spontané » du repliement des protéines.

Malgré le nombre de molécules connues pour être impliquées dans le processus de repliement *in vivo*, beaucoup de protéines dénaturées en laboratoire se replient spontanément, dans leur forme native, lorsque les conditions dénaturantes sont éliminées et cela sans l'addition d'aucune autre espèce moléculaire additionnelle ((Anfinsen 1973)).

La molécule de ribonucléase A, formée de 124 résidus d'acides aminés, se prête facilement à une étude structurale. Anfinsen et ses collaborateurs ont montré l'importance de la séquence en acides aminés dans la détermination de la conformation native de la ribonucléase. Ainsi le traitement de la ribonucléase native avec de l'urée en présence de β -mercaptoéthanol, provoque un dépliement complet de la molécule. Dans ce processus de dénaturation, les quatre ponts disulfures formés par les 8 cystéines de la ribonucléase A sont réduits. Ce dépliement et le clivage des liaisons S-S provoquent une perte complète de l'activité enzymatique. En revanche, quand l'urée et l'agent réducteur sont lentement éliminés de la solution, l'activité de la ribonucléase réapparaît progressivement, ce qui indique que, même

après dénaturation, la chaîne polypeptidique de la ribonucléase contient encore l'information nécessaire pour revenir à la structure tertiaire catalytiquement active.

Ainsi, dès 1962, la preuve était faite que la séquence des résidus, déterminée par le code génétique détermine à son tour la structure des protéines. Les huit cystéines (S-H) se réoxydent grâce à l'oxygène atmosphérique et rétablissent ainsi les quatre ponts disulfures initiaux. Bien qu'un calcul de probabilités montre que les huit cystéines d'une seule chaîne polypeptidique peuvent former 105 combinaisons différentes, seule la combinaison présente dans la molécule de ribonucléase A native est formée.

Ces expériences de renaturation ont par la suite été étendues à d'autres protéines, et il est maintenant généralement accepté que la séquence en acides aminés détermine la structure tertiaire spécifique des protéines. Dans un certain nombre de cas, il existe une compétition, comme cela peut être le cas dans la cellule, entre l'agrégation intermoléculaire et le repliement intramoléculaire. Toutefois, les expériences d'Anfinsen démontrent que la structure finale et le mécanisme de repliement des protéines sont dictés par la seule séquence en acides aminés. Les chaperonnes, qui sont nécessaires pour le bon repliement de certaines protéines, ont un rôle facilitateur mais ne dirigent pas la réaction de repliement.

Levinthal et son paradoxe

Un autre principe du repliement établi par Anfinsen est que « l'état natif correspond à la structure caractérisé par l'énergie libre la plus basse dans des conditions données ». La question clé est de déterminer alors comment une chaîne peptidique trouve, dans un temps raisonnable, sa structure de plus faible énergie libre parmi l'ensemble des diverses conformations possibles. Les études cherchant à résoudre cette question ont conduit à l'énoncé du paradoxe de Levinthal.

Le processus de repliement d'une protéine est réellement remarquable si nous considérons l'ensemble astronomique de conformations accessibles à une chaîne polypeptidique. L'exemple classique est celui d'une petite protéine formée d'une centaine de résidus d'acides aminés. En considérant que chaque résidu peut adopter seulement deux conformères différents indépendamment de la conformation du reste de la chaîne, une telle protéine peut adopter près de 10^{30} conformations différentes. En considérant que le temps minimum de passage d'une conformation à une autre est de 10^{-13} secondes (temps qui correspond au mouvement de vibration des liaisons atomiques, en accord avec les lois de la physique) la

recherche systématique de la structure ayant la plus basse énergie (parmi toutes les conformations possibles) prendrait 10^{18} ans, c'est-à-dire un temps plus long que l'âge de notre univers ((Dobson and Karplus 1999)). Notre existence même témoigne que les protéines achèvent leurs repliement sur des temps plus courts et expérimentalement, il a été démontré que le repliement des protéines se déroule sur des temps allant de quelques dizaines de microsecondes à quelques secondes, voir quelques heures pour les protéines les plus lentes. Le paradoxe a été pour la première fois énoncé par Levinthal en 1968. Depuis ce temps, la résolution du *paradoxe de Levinthal* domine la réflexion concernant le repliement des protéines.

Deux biais majeurs peuvent offrir des solutions à ce paradoxe : (a) l'existence d'intermédiaires donnant une direction à la réaction (idée de chemin de repliement), (b) l'existence préalable d'une structure résiduelle dans la forme dépliée réduisant ainsi le nombre de choix conformationnels possibles (*développé dans le chapitre : 1.1.3.1 Propriétés de l'état déplié « pelote statistique »*).

1.1.2 Comment modéliser le problème et tenter de le résoudre ?

Des modèles pour résoudre le paradoxe de Levinthal

Beaucoup de suggestions ont été faites pour expliquer le mécanisme du repliement des protéines. Les idées les plus précoces étaient largement basées sur le principe qu'il existait des chemins spécifiques pour le repliement, et qu'en dirigeant les molécules vers ces chemins, la chaîne polypeptidique pouvait atteindre sa structure native sans nécessairement la chercher dans l'ensemble de l'espace conformationnel ((Levinthal 1968)). La découverte expérimentale de la formation des intermédiaires durant le repliement de certaines protéines a été prise comme support à cette idée (Udgaonkar & Baldwin 1988). Après d'intenses débats sur la nature des événements conduisant au repliement des protéines, de nombreuses théories ont émergé, incluant le modèle hiérarchique du « framework » et le modèle de l'effondrement hydrophobe (« hydrophobic collapse ») ([tableau 1](#)).

Une suggestion particulièrement intéressante est que le repliement n'implique pas seulement un chemin mais que les différents éléments de structure peuvent être assemblés de différentes manières pour ne donner qu'un seul résultat final ((Harrison 1985)).

Ces différentes théories ont permis d'expliquer raisonnablement certaines données expérimentales mais aucune d'entre elles ne semble offrir une description claire des principes qui dirigent le repliement ni même apporter une réponse au paradoxe de Levinthal.

<i>model</i>	<i>description</i>	<i>mecanisme</i>
Framework (Kim, Baldwin Ann. Review biochem 51, 459 (1982))	Formation locale rapide de la structure secondaire qui fonctionne comme un échaffaudage, suivi par l'acquisition de la structure tertiaire.	Diffusion - collision (Karplus Weaver Nature 1976, 404): implique généralement la formation de structure secondaire, suivi par la diffusion, la collision puis la coalescence de ces éléments de structure secondaire pour former la structure tertiaire.
	combinaison des deux modèles : passe d'un modèle à l'autre en changeant la stabilité relative de la structure tertiaire ou secondaire (Daggett, Fersht, Trends inBiochem Sc 18 2003).	Nucléation (Wetlaufer PNAS, 1973 , 697) : un noyau est formé lentement suivi par la propagation rapide de la structuration de la protéine.
Collapse hydrophobe (Ptitsyn J Prot Chem 1987 273)	Formation globale d'un globule hydrophobe non spécifique	Collapse hydrophobe : l'étape initiale implique un collapse hydrophobe : l'acquisition de la structure secondaire et les interactions correctes qui permettent la compaction de la protéine sont formées dans un volume confiné.

Tableau 1

Des modèles pour résoudre le paradoxe de Levinthal : il a été envisagé que les protéines puissent se replier par des chemins au moyen de mécanismes évitant de tester l'ensemble des conformations possibles ((Daggett and Fersht 2003)).

De réels progrès ont été faits récemment dans l'élaboration d'un mécanisme universel et fondamental décrivant le processus par lequel une protéine acquiert sa structure native. Ces progrès ont été rendus possibles par des avancées dans le développement de techniques de biophysique couplées à de l'ingénierie des protéines. Ils découlent également d'avancées majeures par des approches théoriques qui, en simulant le repliement de façon simplifiés, permettent de modéliser les réactions ((Dobson and Karplus 1999; Fetrow, Giammona et al. 2002)).

Les vues classique et moderne.

A l'heure actuelle, deux approches sont proposées pour résoudre le paradoxe de Levinthal:

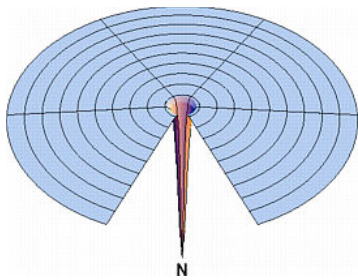
- Une vue « classique » (« old view ») suggère que l'existence d'intermédiaires partiellement repliés serait essentielle pour résoudre le problème du repliement en définissant un chemin préférentiel de repliement ((Baldwin 1997))

- Une vue plus récente (« new view ») suggère que le problème du repliement peut être résolu si des molécules dépliées recherchent l'état natif dans un paysage énergétique en « entonnoir » : « *landscape picture like a funnel* ».

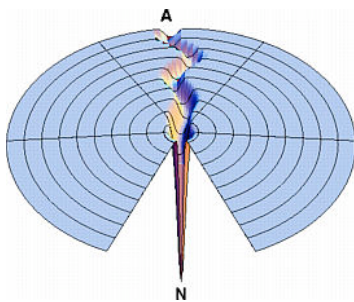
La première solution, qui reprend les hypothèses citées précédemment, propose qu'il y ait des chemins préférentiels pour le repliement, avec la possibilité pour les protéines de passer à travers des états partiellement structurés qui peuvent être transitoires ou stables avec une population bien définie. Dans le plus simple des cas, le mécanisme de repliement est ainsi envisagé comme étant similaire à une réaction linéaire. Si les étapes sont suffisamment spécifiques, seule une petite région de l'espace conformationnel sera explorée et le paradoxe de Levinthal sera alors levé. Cette conception est confortée par la mise en évidence d'intermédiaires partiellement repliés, qui peuvent se former au cours du repliement et sous certaines conditions de dénaturation. Mais de récentes études expérimentales donnent une description plus complexe du repliement, avec la mise en évidence de chemins de repliement parallèles.

La seconde solution (la nouvelle vue), combine l'approche théorique et l'approche expérimentale en décrivant le repliement des protéines en terme d'ensembles statistiques ((Dobson and Karplus 1999) (Fetrow, Giammona et al. 2002)). La mécanique statistique prédit que les états macroscopiques, dénaturés et intermédiaires, sont des distributions ou des ensembles de diverses conformations. Dans cette nouvelle conception, le repliement est défini par Dill comme “ *a parallel flow process of an ensemble of chain molecules ; folding is seen as more like trickle of water down mountainsides of complex shapes, and less like flow through a single gallery* ” ((Dill and Chan 1997)). En d'autres termes, le repliement peut être décrit comme une série de transitions entre des états d'énergie de plus en plus basse, guidant la protéine par un effet d'entonnoir vers l'état conformationnel de plus basse énergie : la conformation native. La chaîne polypeptidique n'explore alors qu'une fraction des états accessibles. Dans cette représentation, les états de transition sont représentés par des « bosses » et les états intermédiaires correspondent à des « creux » nécessitant soit que la

chaîne polypeptidique « revienne en arrière », soit qu'elle se replie en suivant une trajectoire parallèle.

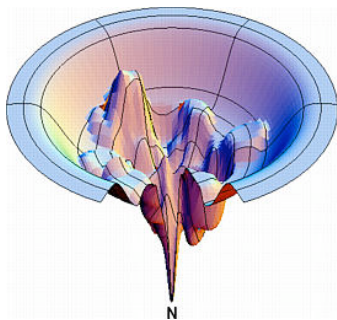


Le « terrain de golf » de Levinthal.
N est la conformation Native. La chaîne polypeptidique recherche de façon aléatoire N. Son repliement sera « plus long que l'âge de l'univers ».



L'« ancienne vue » : la solution du chemin de repliement pour éviter la recherche au hasard.

Un chemin doit diriger la réaction de la conformation dénaturée A jusqu'à la conformation native N. La recherche conformationnelle est donc plus dirigée et le repliement est plus rapide.



La « nouvelle vue » : l'hypothèse de rejoindre le minimum énergétique en un minimum de temps est possible et ce quelque soit le point de départ.

L'énergie de surface est « rugueuse » avec des pièges cinétiques et des barrières d'énergie. Dans cette représentation, le repliement peut inclure plusieurs états intermédiaires et plusieurs chemins.

Figure 0 : Une « nouvelle vue » du repliement des protéines complète l'idée des chemins de repliement avec la notion élargie de paysage énergétique et d'entonnoir de repliement”.

Cette représentation du repliement permet de voir que le nombre de conformations accessibles pour une séquence donnée devient progressivement plus faible et le nombre de contacts natifs augmente durant le repliement. L'axe vertical représente l'enthalpie. Chaque conformation est représentée par un point sur le paysage. Les deux axes horizontaux représentent les multiples degrés de liberté de la chaîne polypeptidique.

“Levinthal to pathways to funnels” Ken A. Dill and Hue Sun Chan *Nature Structural Biology*, January 1997 volume 4 no. 1

Dans cette nouvelle vue, l'existence d'intermédiaires n'est pas indispensable aux protéines dépliées pour trouver l'état natif. L'existence d'intermédiaires est plutôt un résultat de la rugosité de l'espace conformationnel. La vue classique est largement appuyée par les études expérimentales, effectuées dans la dernière décennie, pour lesquelles des intermédiaires sont souvent décrits ((Kim and Baldwin 1990), (Jamin and Baldwin 1998), (Tsui, Garcia et al. 1999)). Quoiqu'il en soit, les protéines étudiées dans ces cas sont relativement grandes (>120 acides aminés). Des études plus récentes sur des petites protéines à un domaine, d'une taille de 100 acides aminés ou moins, montrent qu'aucun intermédiaire n'est détectable par les expériences cinétiques de repliement ((Jackson 1998; Ivankov and Finkelstein 2001)) ((Krantz, Mayne et al. 2002)). Depuis lors, l'évidence de la vue classique est beaucoup discutée ((Daggett and Fersht 2003) ; (Bai 2003)).

Les preuves classiquement admises pour caractériser la présence d'intermédiaires sur le chemin de repliement reposent sur 3 critères : (a) l'intermédiaire se forme suffisamment rapidement pour être sur le chemin de repliement, (b) il réagit (ou se convertit) suffisamment rapidement pour être sur le chemin et (c) il peut être isolé et caractérisé. Bien qu'il y ait beaucoup de preuves d'intermédiaires ((Mayor, Guydosh et al. 2003), (Sanchez and Kiefhaber 2003), (Capaldi, Shastry et al. 2001), (Travaglini-Allocatelli, Gianni et al. 2003)), la nature même des intermédiaires de repliement rend difficile leur caractérisation et rend également difficile de montrer si ils sont ou non sur le chemin de repliement. Per Jemth et al. ont relevé le défi en effectuant des expériences permettant de montrer sans ambiguïtés, qu'un intermédiaire productif est présent sur le chemin de repliement d'une protéine de petite taille (71 résidus) formant trois hélices alpha et une hélice 3_{10} . Cet intermédiaire a été également détecté par des expériences de dynamique moléculaire indépendantes ((Jemth, Gianni et al. 2004)). Des simulations *in silico* ont également montré l'existence d'intermédiaires cachés ; le repliement d'une protéine de 46 résidus (protéine «3 helix bundle») a été simulé et un mécanisme de repliement à trois états passant par un intermédiaire a été déterminé ((Berriz and Shakhnovich 2001)).

(Voir également le chapitre « repliement de l'apomyoglobine » pour un exemple d'intermédiaire caractérisé sur le chemin de repliement pour une protéine de taille supérieure à 100 acides aminés (Jamin and Baldwin 1998), (Tsui, Garcia et al. 1999))

La modélisation du mode de repliement global des protéines, comme nous venons de le voir, n'est pas évidente mais se précise au cours du temps en prenant en compte l'ensemble des

informations provenant de calculs théoriques et d'expérimentation. C'est en ajustant et en complétant les modèles historiques en fonction de ces résultats que semble émerger progressivement une meilleure réponse aux impératifs de sélectivité de la structure finale liée à une rapidité de l'exécution du repliement.

Alors qu'émerge progressivement une vision plus globale du mode de repliement des protéines *in vitro*, la compréhension de ces phénomènes physico-chimiques transposée au sein de la cellule est une problématique importante qui est de plus en plus considérée. Mais avant cela, un certain nombre de points sont à élucider : quels sont les phénomènes limitant la cinétique de repliement ; quel est précisément l'importance des intermédiaires de repliement... Pour permettre cela, de nouvelles techniques doivent être mises au point pour permettre d'examiner cet événement très rapides qui ont lieu sur des échelles de temps allant de la picoseconde à la microseconde.

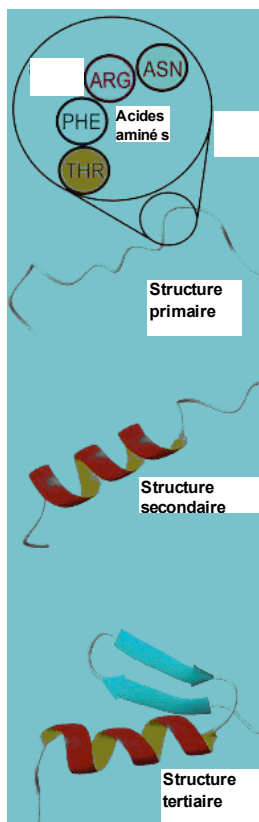


Figure 0

Représentation des structures hiérarchiques d'une protéine.

1.1.3 Les propriétés de la chaîne polypeptidique au cours de la réaction de repliement.

1.1.3.0 Préambule

Les techniques de cristallographie et de RMN ont permis de déterminer la structure de nombreuses protéines et de décrire les propriétés caractéristiques de l'état natif. La structure générale d'une protéine est déterminée par une hiérarchie d'unités structurales partiellement indépendantes. Ce sont ces éléments structuraux qui se forment au cours de la réaction de repliement.

La *structure primaire* est le niveau d'organisation structurale le plus élémentaire et correspond à la séquence en acides aminés. Le second niveau hiérarchique correspond aux *structures secondaires* correspondant à un enchaînement répétitif de liaisons peptidiques possédant des couples d'angles particuliers (angles phi et psi) et des liaisons hydrogènes particulières ((Ramachandran 1968)). Ces structures comprennent essentiellement les hélices alpha et les feuillets bêta. Elles sont connectées entre elles par des boucles situées essentiellement à la surface des protéines où les contraintes stériques sont minimales. La *structure tertiaire* correspond à l'organisation

tridimensionnelle, biologiquement active, ou native de la protéine. D'une façon générale la forme globulaire des protéines est optimisée de façon à enfouir les résidus hydrophobes et à exposer les résidus polaires. Enfin, un dernier niveau hiérarchique correspond à la *structure quaternaire* qui résulte de l'assemblage de plusieurs chaînes identiques ou non. Ce sont essentiellement les événements conduisant à l'agencement des structures I, II et III qui sont abordés dans ce document.

La caractérisation du processus de repliement des protéines est compliquée par une variété de facteurs, l'un d'eux est certainement la différence marginale de d'énergie qui sépare l'état natif des états dénaturés: de l'ordre de 1 à 15 kcal/mol.

En effet, la conformation d'une protéine globulaire résulte d'un équilibre entre diverses forces d'interaction qui favorisent les formes repliées (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, interactions de van der Waals, interactions ioniques) et l'entropie conformationnelle de la chaîne polypeptidique qui s'oppose au repliement ((Chan and Dill 1990)). Les interactions hydrophobes considérées comme le « moteur du repliement » ne sont pas la seule contribution (Dill 1990; Dill 1990). Les différents types d'interactions qui définissent la topologie native des protéines peuvent se regrouper en deux grandes classes : interactions locales et interactions non locales. Une caractéristique très importante du repliement est le rapprochement, dans la structure native tridimensionnelle, des résidus éloignés dans la structure primaire. Les interactions locales, hydrophobes ou polaires, sont celles qui interviennent entre résidus proches dans la séquence. Elles jouent un rôle dans la prédisposition des différents segments de la chaîne polypeptidique à former une structure secondaire. Les interactions non locales sont celles qui interviennent entre résidus éloignés dans la séquence. Elles peuvent être d'origine hydrophobe ou polaire et favoriser par exemple, la formation du cœur hydrophobe (Kaya and Chan 2003).

Avant de considérer la réaction de repliement dans son ensemble et pour bien comprendre les événements s'effectuant au cours du repliement, il est important de décrire les états finaux et initiaux de la réaction de repliement ainsi que les états partiellement repliés.

1.1.3.1 Propriétés de l'état déplié « pelote statistique »

Le cas extrême d'un état déplié d'une protéine est connu sous le nom de « pelote statistique » ((Dill and Shortle 1991; Shortle 1996; Smith, Fiebig et al. 1996)).

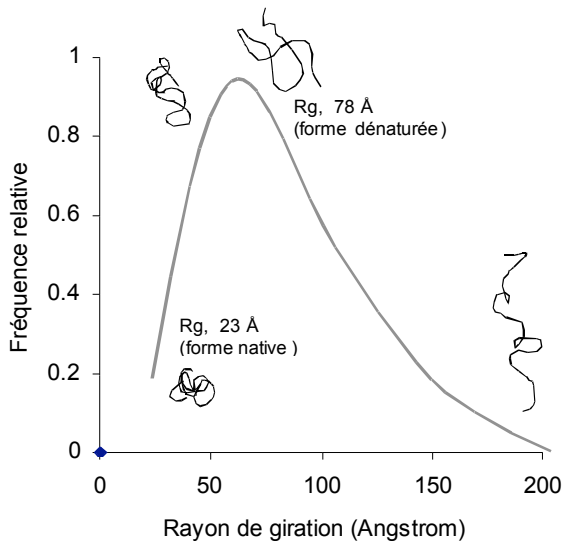


Figure 0

Distribution du rayon de giration (Rg) calculé pour un modèle de polypeptide en « pelote statistique » de 300 résidus.

Les structures représentatives sont représentées pour différentes valeurs de Rg. Les valeurs moyennes pour l'état dénaturé et pour l'état natif sont représentées. Le schéma représente le fait que l'ensemble des conformères en pelote statistique contient à la fois des états extrêmement compacts et très étendus. ((Smith, Fiebig et al. 1996))

Un tel état peut être défini comme un état où chaque liaison de la protéine a la même liberté de rotation et où il n'y a pas d'interaction non aléatoire entre les différentes chaînes latérales de la protéine. Ces considérations mènent à la conclusion que l'état « pelote statistique » d'un polypeptide consiste en un vaste ensemble de conformations. Ces conformations peuvent être très étendues pour les unes et extrêmement compactes pour les autres ((Smith, Fiebig et al. 1996)) (figure 3).

Si l'on considère simplement la chaîne polypeptidique principale, ce désordre peut être décrit en terme de diagramme de Ramachandran. La conformation de chaque acide aminé est définie par deux angles de torsion (phi et psi). Les angles de torsion correspondant aux hélices alpha et feuillets bêta représentent deux régions de basse énergie sur le diagramme de Ramachandran.

En considérant, en première approximation, que les populations d'hélices alpha et de brins bêta sont équivalentes et sont les seules régions de l'espace conformationnel significativement occupées, la probabilité qu'une région donnée de 5 acides aminés dans la séquence soit une hélice alpha ou un brin bêta est de 0.5^5 ou 0.03 ((Smith, Fiebig et al. 1996)).

En d'autres termes, dans une « pelote statistique », chaque région de la séquence peut devenir une hélice ou un brin pour près de 3% du temps en moyenne. Il a été d'autre part établi que la

propension relative d'occuper les différentes régions de l'espace conformationnel est fortement reliée à la distribution en acides aminés entre les différentes régions de la structure secondaire de la protéine native ((Serrano 1995))

C'est Charles Tanford et ses collaborateurs qui dès 1968 ((Tanford 1968)) ont décrit qu'une protéine dépliée était une chaîne aléatoire peu structurée. Aujourd'hui, de nouveaux éléments complètent cette idée et semblent indiquer l'existence d'éléments initiateurs du processus de repliement présent dans l'état « pelote statistique » ((Dill and Shortle 1991; Shortle 1996; Smith, Fiebig et al. 1996)). C'est une possibilité qui offre des éléments de réponse au paradoxe de Levinthal en diminuant le nombre de conformations possibles. Voici quelques éléments décrivant le nouvel intérêt apporté à l'étude de la forme dépliée :

(a) Regroupements hydrophobes dans des protéines dénaturées par l'urée :

Dans le lysozyme de poulet sous sa forme réduite et dépliée, six regroupements hydrophobes sont détectés par RMN (en suivant la vitesse de relaxation transverse des groupements amides de la chaîne polypeptidique). Des études de mutagenèse ont révélé que les six regroupements hydrophobes forment un réseau connecté par des interactions de forme coopérative ((Klein-Seetharaman, Oikawa et al. 2002)). Quoi qu'il en soit le rôle de guide de la réaction de repliement n'est généralement pas donné aux regroupements hydrophobes.

(b) Etude des protéines dénaturées dans l'eau :

La description du repliement des petites protéines à deux états (Natif ou Dénaturé) suppose l'existence de seulement deux formes à l'équilibre, la forme dénaturée et la forme native. Cette restriction est appliquée à la fois pour les protéines en présence de dénaturant (6M de chlorure de guanidine et 8 M d'urée) et pour celles en présence d'eau. Aujourd'hui il est connu que les structures secondaires sont souvent stables dans l'eau. D'autre part, les simulations du processus de repliement qui offrent de nombreuses informations pertinentes, s'effectuent *in silico* avec de l'eau, et sans agent dénaturant. Il est donc devenu important d'étudier les structures des protéines dénaturées dans l'eau. L'état dénaturé dans l'eau est maintenant communément représenté comme un embryon d'intermédiaire de repliement.

(c) Rigidité de la chaîne polypeptidique de l'état « pelote statistique ».

Une attention particulière a été apportée par Flory ((Flory and Schimmel 1967)) pour tenter de comprendre le degré de rigidité de la chaîne polypeptidique dénaturée en utilisant des polypeptides de synthèse et en effectuant des mesures dans différents solvants. La rigidité de la chaîne polypeptidique dépend d'une forte interaction dipôle-

dipôle entre les groupes peptides NH et CO de la chaîne principale. Dans une unité peptidique, les dipôles des peptides NH et CO sont antiparallèles dans une conformation en feuillet bêta étendu mais parallèles dans une conformation en hélice plus compacte ((Avbelj and Moult 1995)). Par conséquent, pour une structuration de quelques résidus, trop faibles pour former une hélice alpha stabilisée par des liaisons hydrogène peptidiques, l'interaction dipôle-dipôle favorise fortement la conformation bêta par rapport à la conformation alpha. La mesure de rigidité de la chaîne pour des protéines dénaturées est effectuée en présence de dénaturant fort, comme 8M d'urée ou 6M de chlorure de guanidine. Dans ces conditions les liaisons « hydrogène » sont faibles et les hélices peptidiques sont dépliées ((Smith and Scholtz 1996)), et la présence d'hélice alpha ou de boucles bêta n'est pas possible. Des travaux plus récents en accord avec les données de Tanford, ont produit un modèle phénoménologique simple basé sur l'effet d'exclusion de volume qui est fonction de la longueur de la chaîne ((Zhou, 2002)). D'autre part, la dimension réelle (*i.e.*, le rayon de giration) de protéines dépliées peut maintenant être mesurée directement par la diffusion aux petits angles de rayons X ou de neutrons, mais ces mesures de diffusion effectuées dans de l'urée ou du chlorure de guanidine concentrée conduit à un faible contraste ((Wilkins, Grimshaw et al. 1999)).

(d) Conformation préférentielles du squelette peptidique.

Le concept de conformation préférentielle du squelette peptidique dans des protéines dénaturées commença à être pris au sérieux lorsque la conformation de la polyproline II a été trouvée majoritairement dans les boucles des protéines ((Adzhubei and Sternberg 1993)). La structure polyproline II est une hélice 3_{10} avec un squelette formé par des angles dièdre $\phi = -75^\circ$ et $\psi = 145^\circ$. Elle connaît un grand intérêt du fait de son rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques ((Chellgren and Creamer 2004)). Elle a également une signification potentielle dans les états dénaturés des protéines ((Rucker and Creamer 2002)). A l'observation de cette structure dans les parties non structurées des boucles de protéine native, s'ajoute le fait que l'hélice polyproline II donne un spectre de dichroïsme circulaire très similaire à celui d'une protéine dépliée. Ce sont ces arguments qui ont été utilisés comme base pour l'hypothèse que les protéines dépliées possèdent une grande quantité d'hélice polyproline II (PPII). Une explication plausible est que le squelette peptidique favorise la conformation PPII pour optimiser les interactions favorables avec le solvant. Ce que suggèrent fortement ces résultats, c'est que les protéines dépliées possèdent des structures de type PPII ce qui signifie que

l'ensemble de conformations dénaturées est significativement plus petit que ce qui est communément admis.

Les approches théoriques et expérimentales convergent maintenant vers une conformation polyproline II pour décrire le squelette ayant la structure la plus stable pour de petits peptides alanines dans l'eau.

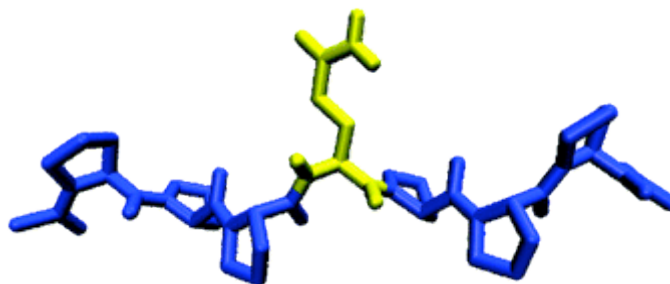


Figure 0 : Représentation de la conformation polyproline II pour une séquence d'acide aminé.

La conclusion générale est qu'une protéine dans cet état est extrêmement hétérogène en terme de conformation, tant d'un point de vue global qu'au niveau local, au delà de la propension qu'à une chaîne « pelote statistique » à présenter des éléments de structure pouvant être, ou non, retrouvés dans la structure native. Cependant, l'ensemble conformationnel semble restreint par la présence d'éléments structuraux dans les formes en « pelote statistique », ce qui offre des pistes de réponse au paradoxe décrit par Levinthal.

Il devient pour cela important de déterminer les différences d'énergie entre les conformations PPII et d'autres conformations possibles du squelette peptidique et de déterminer de quelle façon la composition en acides aminés et la séquence affecte la conformation du squelette peptidique dans les formes en « pelote statistique ».

1.1.3.2 Propriétés de l'état partiellement déplié.

Il existe des états dénaturés plus compacts nommés « molten globule » ou globule fondu (Uversky, 2002 #30; Ptitsyn, 1995 #34; Ptitsyn, 1995 #35). Le processus de repliement implique que chaque molécule devienne compacte et que chacune de ses liaisons soit stabilisée avec des angles de torsion correspondant à ceux de l'état natif. Une question extrêmement importante de ce point de vue est de déterminer s'il existe un couplage entre les propriétés globales et locales de la chaîne polypeptidique. Des indices, indiquant que les propriétés locales et globales de la chaîne polypeptidique sont couplées, viennent du fait que dans des conditions faiblement dénaturantes, il est possible d'obtenir des ensembles dénaturés beaucoup plus compacts. Cela résulte de la conséquence de la différence entre les termes entropiques et enthalpiques qui caractérisent la structure des protéines en général. Si l'avantage énergétique résultant d'un enfouissement des groupes hydrophobes dépasse l'énergie nécessaire à la réduction de l'ensemble configurationnel (terme entropique), la distribution des conformères dans l'état dénaturé sera biaisée vers des structures plus compactes.

L'état le plus extrême de ces états dénaturés compacts est communément appelé « Molten Globule » (Ptitsyn, 1995 #31; Dobson, 1994 #32; Goto, 1993 #33 ; Arai, 2000 #36} décrit dans les chapitres suivants). Ils se forment pour de nombreuses protéines dans des conditions moyennement dénaturantes et ont un rayon hydrodynamique proche de celui de l'état natif. Ils n'ont cependant pas d'agencement de leurs chaînes latérales équivalent à celui de la structure native. Ces espèces suscitent encore de nombreuses discussions : assistent-elles la protéine pour trouver sa structure correcte ou sont elles des pièges qui inhibent le processus du repliement ((Roder and Colon 1997))(Sanchez and Kiefhaber 2003)) ((Khan, Chuang et al. 2003)) ?

1.1.3.3 Propriétés de l'état natif

Les caractéristiques des états natifs sont très distinctes de celles des états dénaturés. La structure est très compacte et la proportion d'espace occupé par les atomes est de l'ordre de 75%. Par comparaison, l'espace occupé dans le verre est de l'ordre de 65% et celui occupé dans un cristal de molécule organique est de l'ordre de 74%. La majorité des liaisons

peptidiques sont fixées dans une conformation spécifique, comme le sont la majorité des résidus des chaînes latérales enfouies à l'intérieur de la protéine. La fluctuation des angles de torsion est cependant plus grande que dans la plupart des cristaux de petites molécules. Les angles de torsion des structures natives fluctuent avec des amplitudes typiques de l'ordre de 30° et sur des temps de l'ordre de la pico seconde. Contrairement aux chaînes latérales des résidus internes, approximativement 50% des résidus de surface sont largement désordonnés ((Tanford 1968)). Il semble qu'un empilage spécifique et très confiné soit essentiel pour garder les chaînes latérales dans leur état conformationnel bien défini. La structure native finale est acquise seulement lorsque toutes ces interactions sont formées à la fois entre et à l'intérieur des domaines de la protéine. Cela intervient dans une étape finale du repliement qui est coopérative, lorsque toutes les chaînes latérales prennent leur conformation spécifique et que les molécules d'eau sont exclues du cœur de la protéine ((Cheung, Garcia et al. 2002)).

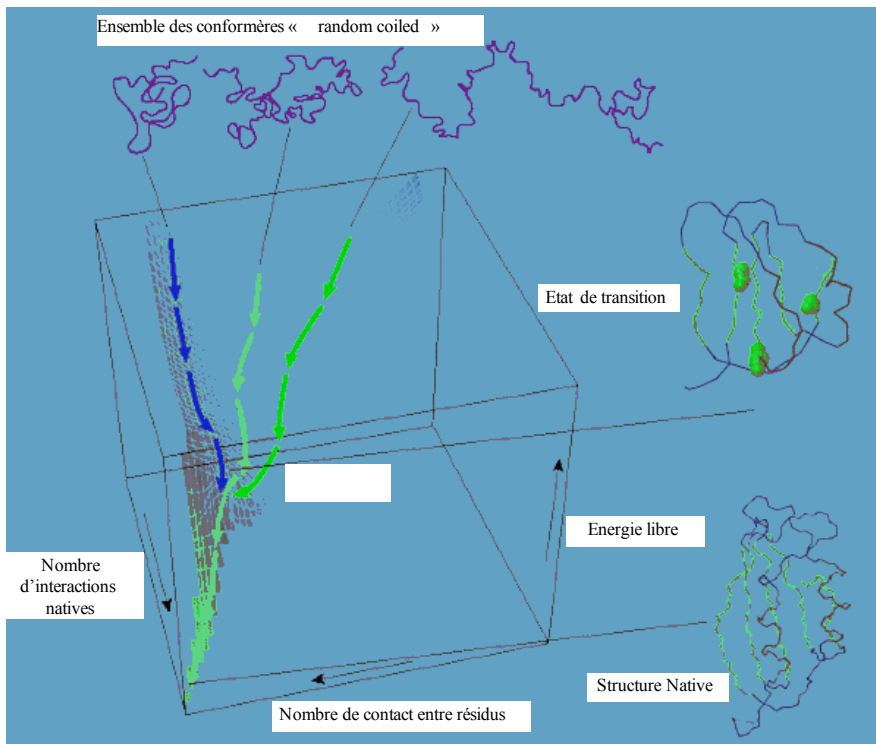


Figure 1 : Un paysage énergétique schématique pour le repliement des protéines.

La surface provient d'une simulation de repliement d'un modèle extrêmement simplifié d'une petite protéine. La région critique sur une surface de ce type est le point correspondant à l'état de transition, la barrière que toutes les molécules doivent franchir si elles sont sur la voie du repliement. L'état de transition a été calculé en utilisant une simulation informatique contenant les données expérimentales du repliement de l'acylphosphatase. Les sphères jaunes représentent les trois « résidus clés » dans la structure : lorsque ces résidus ont formé leurs contacts de type natif, la topologie globale de la forme native est établie ((Dinner, Sali et al. 2000); (Dobson 2003)).

1.1.3.4 L'état de transition

Comme nous venons de le décrire, la réaction de repliement s'effectue par une réduction progressive du nombre de conformations de la chaîne polypeptidique en passant de façon spécifique par des états de plus en plus structurés (figure 5).

Alors qu'il serait simple de décrire les événements définissant la réaction de repliement en terme de structure discrète devenant progressivement de plus en plus ordonnée durant la réaction, le fait est qu'il n'est pas question d'entités discrètes. Nous avons à la place des états qui correspondent à des ensembles de conformations différentes ayant des propriétés similaires (figure 6). Dans les cas les plus simples où l'état natif est en équilibre thermodynamique avec l'état non replié de la protéine, le processus peut être décrit par un modèle à deux états ((Fersht 1997), (Jackson 1998)). Dans ce modèle, représenté figure 6, la réaction est une transition du premier ordre dans laquelle les deux états en équilibre sont

séparés par une barrière énergétique correspondant à l'état de transition. Ce modèle est à

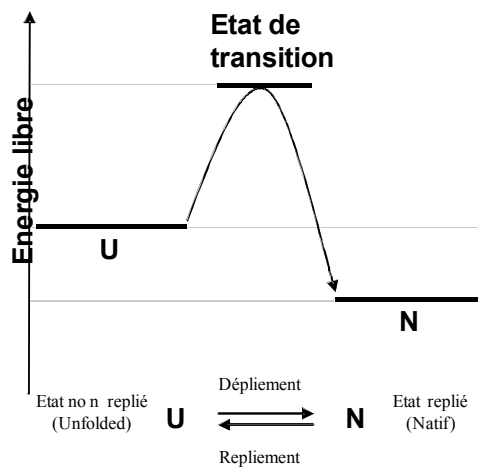


Figure 1 :

Schéma représentant la réaction de repliement à deux états, dans laquelle l'état non replié est en équilibre thermodynamique avec l'état replié. Ces deux états sont séparés par une barrière d'énergie correspondant à l'état de transition.

mettre en relation directe avec le modèle de paysage énergétique et correspond à une coupe dans ce paysage.

L'état de transition du repliement et dépliement d'une protéine peut être assimilé à celui d'une réaction chimique simple, avec quelques modifications. **Premièrement**, à la différence des liaisons covalentes qui vont apparaître ou disparaître dans l'état de transition d'une réaction chimique, ce sont des interactions de faible énergie qui vont apparaître ou disparaître lors de la formation de l'état de transition des réactions de repliement-dépliement.

Deuxièmement, il peut y avoir plusieurs barrières d'énergie le long d'un unique chemin de

repliement (Cela signifie qu'il y a des intermédiaires et donc que la réaction n'est plus à deux états contrairement à celle présentée [figure 6](#)). Si une barrière d'activation est plus grande que toutes les autres, cette étape de la réaction sera alors cinétiquement limitante et, par convention, sera considérée comme l'état de transition de la réaction globale.

Troisièmement, l'entropie a un rôle fondamental en tant que force principale dirigeant la réaction de repliement. Le délicat équilibre entre l'enthalpie et l'entropie fait que l'état replié d'une protéine, stable dans certaines conditions, est instable dans d'autres.

Pour résumer, l'état de transition correspond à la barrière d'énergie qui sépare l'état non replié de l'état replié. Dans l'état de transition, les interactions qui favorisent le repliement, atteignent un seuil critique qui permet de compenser la perte d'entropie associée à la formation des structures natives.

Une cartographie plus précise du processus de repliement peut être obtenue en étudiant systématiquement les conséquences énergétiques de mutations de la protéine. Cette méthode, nommée « protein engineering method » ou analyse de la valeur Phi, permet d'apporter des informations pertinentes sur l'état de transition en évaluant les effets des mutations à la fois par des études cinétiques et par des études à l'équilibre. La valeur du facteur Phi mesure un rapport des différences d'énergies calculés entre la protéine mutée et la protéine sauvage

(figure 7). Une telle méthodologie qui renseigne sur la structure de l'état de transition peut être également appliquée aux états intermédiaires apparaissant au cours du repliement.

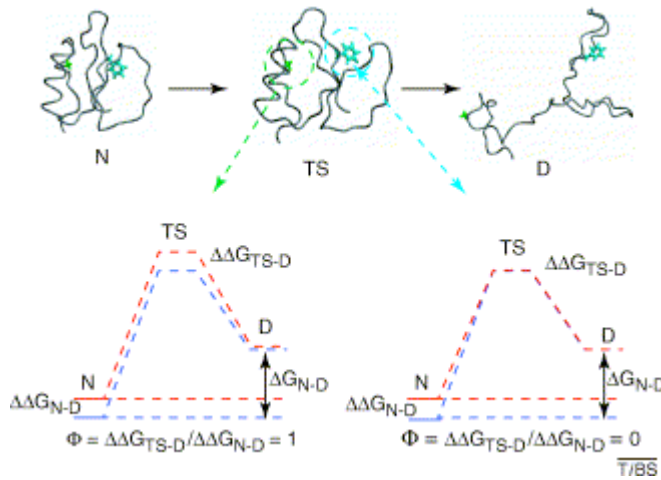


Figure 1 : Analyse de la valeur Phi pour une caractérisation de la transition et de l'état intermédiaire.

Si dans l'état de transition de dépliement, la structure de la protéine au site de mutation est la même que dans l'état natif (vert) : la protéine est insensible à l'effet de la mutation jusqu'après l'état de transition et l'état de transition est déstabilisé par exactement la même valeur que l'état natif. Dans ce cas, $\Delta\Delta G_{TS-D} = \Delta\Delta G_{N-D}$, et $\Phi = 1$ (vert). Ce site de mutation a une structure « native like » dans l'état de transition. Au contraire, une valeur phi de 0 indique que la structure de l'état de transition au site de mutation est la même que dans l'état dénaturé (cyan).

Abréviations: D, état dénaturé; I, état intermédiaire; TS, état de transition; N, état natif
(in (Daggett and Fersht 2003))

Le chapitre suivant concerne la description de l'importance de ces intermédiaires dans le repliement.

1.1.4 Le Molten Globule sur le chemin du repliement

1.1.4.1 L'état Molten Globule.

Le processus de repliement de la plupart des protéines, possédant plus d'une centaine d'acides aminés, présente des cinétiques multiphasiques, indiquant l'existence d'états intermédiaires au cours de leur repliement ((Roder and Colon 1997)). Il se pose alors le problème de déterminer les facteurs qui conduisent à la formation de ces intermédiaires.

En comparant les protéines qui se replient avec ou sans la formation d'intermédiaires, on remarque que ni la complexité topologique, ni les vitesses de repliement, ni la complexité de l'état de transition ne permettent vraiment de les différencier. Comme il en a été fait mention précédemment, il semblerait que le seul paramètre qui distingue ces deux classes de protéines soit la longueur de la chaîne polypeptidique. On observe que la formation d'intermédiaires est associée aux protéines ayant plus de 100 résidus.

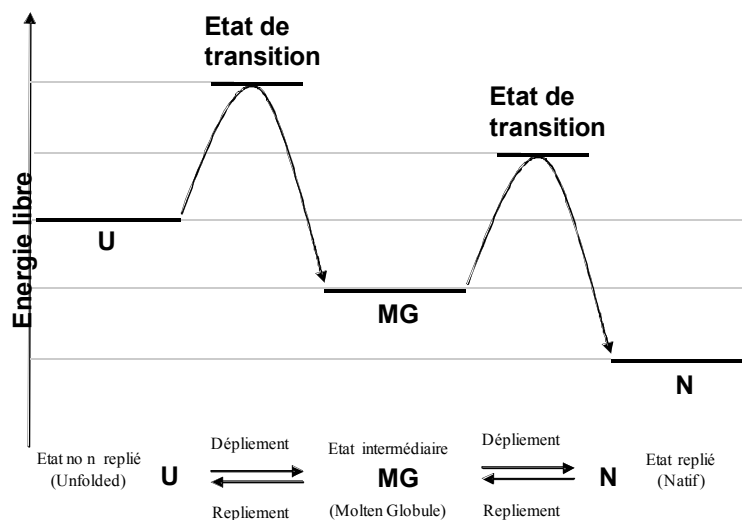


Figure 1 : Schéma représentant la réaction de repliement à trois états, dans laquelle l'état non replié est en équilibre thermodynamique avec l'état intermédiaire « molten globule » et l'état replié. L'état « molten globule » correspond à un minimum énergétique sur le « chemin de repliement ». Chaque état est séparé par une barrière d'énergie correspondant à un état de transition.

Dans les dix dernières années, différentes techniques expérimentales, incluant le dichroïsme circulaire couplé à la méthode de « stopped-flow », l'échange hydrogène/deutérium pulsé, la diffusion des rayons X au petit angle et les approches par mutagenèse dirigée ont permis des avancées remarquables dans la caractérisation structurale des états « molten globule » en permettant de les observer aussi bien durant les cinétiques de repliement de protéines

globulaires qu'à l'équilibre, dans des conditions moyennement dénaturantes ((Kataoka and Goto 1996),(Dyson and Wright 1996),(Marmorino, Lehti et al. 1998),(Arai, Ikura et al. 1998),(Eliezer, Yao et al. 1998),(Dalby, Oliveberg et al. 1998),(Song, Bai et al. 1998),(Song, Bai et al. 1998)) (*dans les chapitres suivants ces techniques seront explicitées et détaillées*). Ces avancées ont permis la description plus détaillée de l'état « molten globule » de différentes protéines.

En ce qui concerne de savoir si le « molten globule » est vraiment un intermédiaire essentiel dans le repliement des protéines, la réponse n'est pas encore complète. Des études théoriques, utilisant des modèles simples de protéines, ont permis l'émergence d'un nouveau concept du repliement, le paysage énergétique ou entonnoir de repliement, qui précise le concept classique d'un chemin spécifique de repliement (voir chapitre précédent). Les études théoriques ont suggéré que les « molten globules » observés expérimentalement ne seraient pas spécifiques mais appartiendraient à un grand nombre d'espèces mal repliées, piégées cinétiquement. Pour appuyer cette hypothèse, il a été montré que les cinétiques de repliement de différentes petites protéines globulaires s'effectuaient sans l'accumulation d'intermédiaires de repliement ((Fersht 1997),(Jackson 1998)). Déterminer si l'état « molten globule » est un intermédiaire significatif pour diriger ou non la réaction de repliement reste donc une question ouverte ((Bai 2003; Daggett and Fersht 2003)18) (*figure 8*).

Au delà de ces prédictions théoriques, les études effectuées sur de nombreuses protéines globulaires *in vitro*, ont démontré que l'état « molten globule » a des spécificités structurales naissantes indiquant clairement que c'est un intermédiaire de repliement spécifique. La présence d'un unique chemin n'est pas un pré-requis pour un repliement efficace, mais ce concept de chemin de repliement décrit bien, en première estimation, la réaction de repliement et cela pour beaucoup de protéines globulaires naturelles.

Des expérimentations récentes ont aussi montré que des états non natifs, incluant les « molten globules », sont importants pour différents phénomènes cellulaires tel que l'action de chaperonnes ((Randall and Hardy 1995; Hartl 1996; Fenton and Horwich 1997; Bukau and Horwich 1998; Fink 1999)), la formation de fibre amyloïde dans des cellules ((Fink 1998; Kelly 1998; Lansbury 1999)), et de protéines en contact avec les membranes biologiques((Cramer, Heymann et al. 1995; Schatz and Dobberstein 1996)).

Les chapitres suivants vont permettre de préciser l'importance des intermédiaires dans le repliement en décrivant les états intermédiaires obtenus à l'équilibre, les états intermédiaires cinétiques, et en donnant des informations sur le rôle de ces intermédiaires.

1.1.4.2 « Molten globule » à l'équilibre

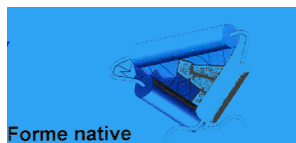
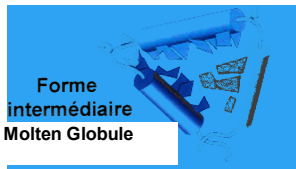
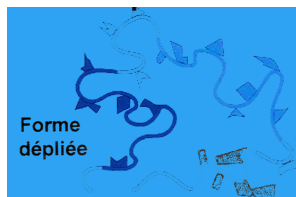


Figure 1 :

L'état « molten globule » : un état globulaire compact avec une topologie tertiaire sans agencement natif des chaînes latérales.

L'état « molten globule » est une conformation intermédiaire trouvée chez de nombreuses protéines globulaires à l'équilibre dans des conditions moyennement dénaturantes. Dans des expériences classiques, l'état « molten globule » a été caractérisé par des spectres de dichroïsme circulaire (CD) qui permettent de suivre la structure secondaire ou tertiaire, par des techniques hydrodynamiques qui déterminent la taille de la protéine ((Ptitsyn 1995), (Uversky and Ptitsyn 1994), (Gast, Damaschun et al. 1994)) et par la fixation de sondes hydrophobes (ANS) permettant la détection de l'accessibilité au solvant ((Semisotnov, Rodionova et al. 1991)). Ces études ont permis de déterminer les caractéristiques structurales de l'intermédiaire « molten globule » observé pour de nombreuses protéines ((Kuwajima 1989), (Ptitsyn 1995), (Arai and Kuwajima 2000)).

- a - Présence d'un contenu substantiel en structures secondaires.
- b- Absence de la plupart des structures tertiaires spécifiques, associée à une faible compaction des chaînes latérales.
- c- Protéine faiblement compacte avec un rayon seulement 10 - 30% plus grand que celui de l'état natif.
- d- Présence d'un cœur hydrophobe légèrement « relâché »

augmentant la surface hydrophobe accessible au solvant.

Pour résumer : l'état «molten globule» est un état compact globulaire avec une structure «fondante» des chaînes latérales: *i.e.* une topologie tertiaire sans l'agencement natif des chaînes latérales (figure 9).

Durant les 10 dernières années, de nouvelles techniques expérimentales : RMN couplée à l'échange d'hydrogène/deutérium ((Baldwin 1995)), RMN NOE ((Dalby, Oliveberg et al. 1998; Eliezer, Yao et al. 1998)), diffraction des rayons x aux petits angles ((Arai, Ikura et al. 1998; Dalby, Oliveberg et al. 1998)) ont été utilisées pour caractériser plus précisément les états « molten globule » de différentes protéines globulaires. L'utilisation de telles techniques a permis d'aller jusqu'à décrire la structure au niveau du résidu d'acide aminé. Ces études ont montré que la structure de l'état « molten globule » est moins homogène que ce qui avait été décrit jusqu'alors. Une portion de la structure est plus organisée (native like) et une autre

partie peut être moins organisée. Le concept classique du « molten globule » avec peu ou pas de structures tertiaires reste souvent confirmé, mais il ne s'agit pas là d'une nécessité universelle.

1.1.4.3 Observation de l'état MG à l'équilibre

La stabilité des protéines natives est fonction de variables externes telles le pH, la température, la force ionique et la composition en solvant, résultant de leur capacité à casser les différents types de liaison responsables de la stabilité intrinsèque des protéines. Ainsi, l'analyse quantitative du rôle de chacune de ces variables dans la formation de la structure d'une protéine est un pré requis dans la description des forces qui sont responsables de sa stabilité conformationnelle. Pour de telles études, une méthode simple implique de suivre les changements conformationnels dus aux perturbations de la protéine par différents agents tel l'acide, le chlorure de guanidine, l'urée et la température.

Fink et ses co-auteurs ont classé, pour différentes protéines, les différents types de dénaturation par l'acide ((Fink, Calciano et al. 1994), [tableau 2](#)). Certaines protéines, classées dans la classe II, sont transformées directement, par acidification, en état « molten globule ».

Obtention de "molten globule" par dénaturation par acidification.		
	Classe I	Classe II
Acide	oui	oui
Anions ou Sucres	oui	non
Exemples	apomyoglobine (Goto 1990, Griko 1998), cytochrome c (Goto 1990), béta lactamase (Vanhove 1998)	Alpha-lactalbumine (Kuwajima 1989, 1996), Lysozyme liée au Ca²⁺ (Morozova-Roche 1997), Anhydrase carbonique (Ptitsyn 1995, Svensson), hormone de croissance bovine (Holzman 1990).

Tableau 2 :

Classement par type de dénaturation par acidification conduisant à la formation d'un état « molten globule » pour différentes protéines globulaires.

D'autres protéines, classées en classe I et dépliées à un pH acide sont repliées dans une conformation caractéristique d'état « molten globule » lors de l'addition d'anion stabilisant ou de sucre neutre. La liaison de l'anion diminue la répulsion électrostatique dans la protéine et stabilise la structure « molten globule » à bas pH, alors que les sucres semblent exercer leur effet stabilisant par un mécanisme différent ((Davis-Searles, Morar et al. 1998)).

L'état « molten globule » est aussi observé à des concentrations modérées de dénaturant fort (urée ou chlorure de guanidine) et les protéines de classes II présentées ci-dessus peuvent parfois présenter cet état pour des conditions de pH neutre ou faiblement acide. De faibles concentrations en alcool ou fluoroalcool permettent la formation de l'état molten globule. De plus grandes concentrations en alcool conduisent généralement à une conformation très riche en hélices α (Hirota, Mizuno et al. 1998). Des sels inorganiques, dénaturants, comme le perchlorate de sodium, ainsi que des acides tel l'acide trichloracétique, induisent la formation d'états partiellement dépliés, similaires à celui du « molten globule ».

Dans certaines protéines, l'état « molten globule » est repéré lors de la dénaturation thermique de la protéine pour lesquelles le dépliement à partir de la forme « molten globule » est coopératif ((Potekhin and Pfeil 1989; Carra, Anderson et al. 1994; Griko, Freire et al. 1995; Koshiya, Hayashi et al. 1999)). D'autres conditions moyennement dénaturantes pouvant conduire à la formation d'états intermédiaires sont : les hautes pressions ((Vidugiris and Royer 1998)), le dépliement partiel par l'élimination d'un ligand fortement lié à la protéine ((Uversky, Kutysenko et al. 1996)). Les modifications chimiques, la mutagénèse dirigée ou

l'élimination de liaisons covalentes dans une protéine naturelle, vont souvent conduire également à des conformations partiellement dépliées ((Creighton and Ewbank 1994; Uversky, Kutysenko et al. 1996)).

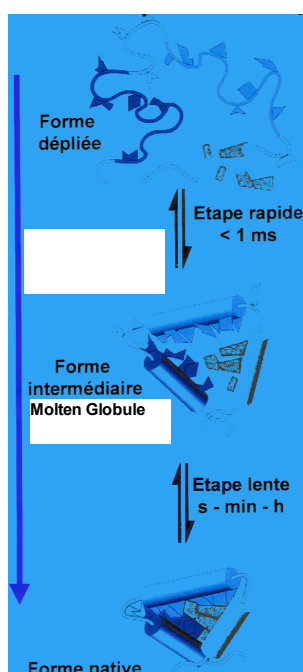


Figure 1 : Formation rapide de l'état « molten globule » cinétique.

1.1.4.4 L'état « molten globule » comme intermédiaire cinétique.

Différentes techniques expérimentales, incluant la spectroscopie cinétique de dichroïsme circulaire ((Ku wajima 1989)), le marquage pulsé d'échange d'hydrogène combiné à de la résonance magnétique nucléaire bi dimensionnelle ((Baldwin 1997)) et la diffraction aux petits angles par rayons X en flux arrêté (stopped-flow SAXS) ((Semisotnov, Kihara et al. 1996; Arai, Ikura et al. 1998)) ont été utilisées pour détecter et caractériser des intermédiaires de repliement pour un grand nombre de protéines globulaires. Ces études ont permis de décrire

de grandes similarités entre les états « molten globule » observés à l'équilibre et les intermédiaires cinétiques de repliement. (Figure 10). Pour beaucoup de protéines, l'état

« molten globule » est formé en quelques millisecondes comme intermédiaire de phase explosive (burst phase) Quoiqu'il en soit, l'état « molten globule » à l'équilibre correspond à l'intermédiaire de repliement tardif, généralement plus structuré que l'intermédiaire de la phase explosive, qui lui, correspond souvent à la forme « molten globule » structurée à l'équilibre par addition d'anion.

Apparemment, il y a une diversité concernant l'instant où l'intermédiaire « molten globule » va s'accumuler sur le chemin de repliement, ce qui est analogue à la diversité de l'état « molten globule » à l'équilibre qui dépend de la protéine et des conditions expérimentales. Quand l'accumulation prend place à une étape tardive du repliement, il y a une plus grande structuration que pour un intermédiaire précoce et cela semble correspondre à l'état « molten globule » structuré observé à l'équilibre.

1.1.4.5 Structure de l'état « molten globule » cinétique et à l'équilibre de protéines globulaires.

Des études récentes par échange d'hydrogène en RMN en SAXS et par ingénierie des protéines ont révélé la structure détaillée caractéristique de l'état « molten globule » pour différentes protéines globulaires telles que l'alpha-lactalbumine, le lysozyme, l'apomyoglobine et le cytochrome C ((Peng and Kim 1994; Kataoka and Goto 1996; Kay and Baldwin 1996; Morozova-Roche, Arico-Muendel et al. 1997; Marmorino, Lehti et al. 1998; Song, Bai et al. 1998)).

Le cas de l'apomyoglobine est développé précisément dans les chapitres suivants.

1.1.4.6 Rôle de l'état « molten globule » dans le repliement des protéines

La question qui se pose est de savoir quel rôle a un intermédiaire comme l'espèce « molten globule » dans le processus de repliement. Dans les modèles actuels, les scénarios proposés pour rendre compte du rôle de ces

intermédiaires s'articulent autour de trois hypothèses, schématisées par des équilibres chimiques entre l'état non replié U, un intermédiaire I et l'état natif N :

1 - Intermédiaire sur le chemin de repliement $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$

2 - Intermédiaire « piège » cinétique $I \rightleftharpoons U \rightleftharpoons N$

3- Repliement à trajectoires multiples

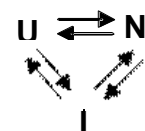


Schéma 0

Dans le premier cas, l'intermédiaire est une étape obligatoire du repliement, nécessitant que toutes les molécules passent par cette étape pour se replier. Dans le deuxième cas, l'intermédiaire est un piège cinétique et doit se déstructurer pour conduire au repliement productif de la protéine. Le troisième cas propose un concept supplémentaire qui est celui de l'existence de trajectoires multiples dans le repliement. Dans ce modèle, la chaîne polypeptidique peut emprunter des trajectoires très différentes pour se replier, certaines d'entre elles comportant la formation d'états intermédiaires, d'autres pas.

Il est important de clarifier ce qui est à l'origine des pièges cinétiques dans le repliement des protéines. L'hypothèse de piège cinétique provient d'études théoriques de simulations (qui prédisent que de tels événements se produisent rapidement ((Gutin, Abkevich et al. 1995)). Des pièges cinétiques sont en effet observés expérimentalement mais correspondent à des réactions intrinsèquement lentes qui sont associées au processus de repliement. L'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidyl-prolyle, en est un exemple bien connu, qui est souvent plus lent que la réaction de repliement ((Kim and Baldwin 1990)). Une protéine avec un isomère proline incorrect se replie souvent jusqu'à un intermédiaire qui a déjà une certaine propension de structure « native-like », l'isomérisation de la proline s'effectue ainsi après la formation de l'intermédiaire ((Kim and Baldwin 1990), (Balbach, Steegborn et al. 1999)). Cet intermédiaire, ayant le mauvais isomère de la Proline, est essentiellement différent de l'espèce mal repliée prédite par les simulations théoriques. Un autre exemple concerne le repliement du cytochrome C où la réaction d'échange de ligand entre l'hème et les ligands (histidine, groupe amine N terminal, et la méthionine 80) sont cinétiquement associés avec la réaction de repliement ((Elove, Bhuyan et al. 1994; Hammack, Godbole et al. 1998)). L'étape d'échange du ligand conduit à l'accumulation de l'état « molten globule » durant la réaction de repliement.

Ces intermédiaires, malgré tout très liés aux intermédiaires de repliement, sont parfois mal interprétés comme exemple d'espèce mal repliées prédites par les études théoriques.

Des preuves pour des intermédiaires, sur le chemin de repliement, ont été déterminées pour différentes protéines. L'observation d'un temps de latence (lag time) au début de la réaction, correspondant à l'accumulation de l'intermédiaire, indique clairement que celui-ci est productif sur le chemin de repliement. ((Ikai and Tanford 1971), (Heidary, Gross et al. 1997), (Walkenhorst, Green et al. 1997), (Maki, Ikura et al. 1999)). Chez l'apomyoglobine, deux intermédiaires transitoires, Ia et Ib, s'accumulent durant le repliement à partir de l'état déplié. L'analyse cinétique, par des expériences de repliement et dépliement interrompus, est

conforme à un chemin de repliement linéaire où les deux intermédiaires sont productifs, sur le chemin de repliement ((Jamin and Baldwin 1998)).

Les cinétiques de quelques protéines globulaires ont été étudiées avec attention. Dans la plupart de ces cas, une structure proche de celle de l'état natif est maintenue durant les dernières étapes de repliement ((Raschke and Marqusee 1997), (Tsui, Garcia et al. 1999), (Nolting, Golbik et al. 1997; Laurents, Bruix et al. 1998)).

Par conséquent, il en est conclu que l'état « molten globule » est vraisemblablement un intermédiaire productif présent sur le chemin de repliement.

1.1.4.7 Le repliement, un processus en deux étapes.

A partir de ce que nous savons sur l'état « molten globule » et ses relations avec le repliement des protéines, il est raisonnable de diviser le processus de repliement en deux étapes (Kuwanjima and Arai 2000):

Etape 1 : formation de l'état « molten globule » à partir de l'état totalement déplié,

Etape 2 : formation de l'état natif à partir de l'état « molten globule ».

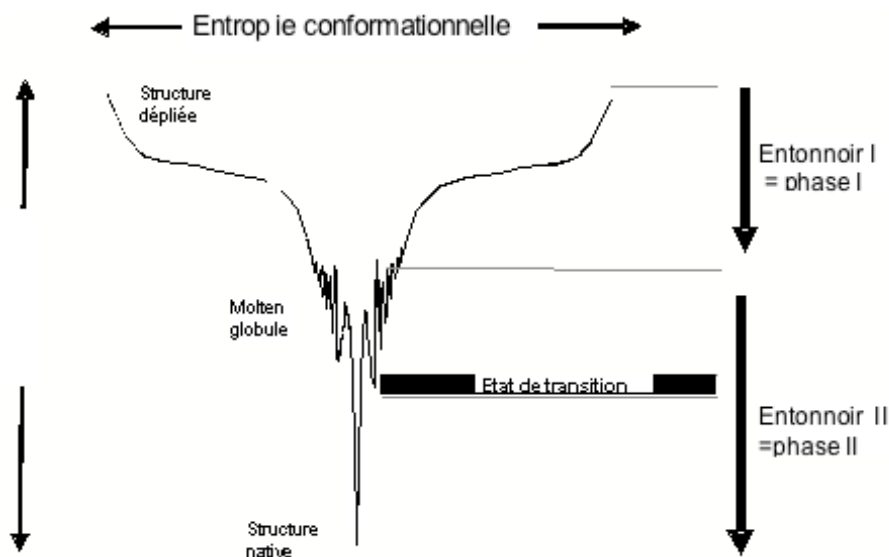


Figure 1 : Représentation du repliement hiérarchique en deux étapes.

La barrière énergétique est plus entropique dans l'entonnoir I, le paysage énergétique est plus « rugueux » dans l'entonnoir II.

Au cours de l'étape I, les molécules protéiques forment des structures secondaires proches de celles de l'état natif, une forme compacte avec aucun emballage spécifique des chaînes

latérales. Elles acquièrent ainsi une structure grossière de la protéine native. Les interactions locales qui déterminent la préférence pour une structure secondaire, et les interactions non hydrophobes qui déterminent le repliement global et la forme compacte sont très importantes à cette étape. Dans l'étape II, l'emballage spécifique des chaînes latérales est organisé et les contacts spécifiques de type Van der Waals sont dominants.

Replacer ces deux étapes dans le concept d'entonnoir énergétique implique la présence de deux entonnoirs énergétiques successifs distincts (figure 11). La différence structurelle et énergétique entre ces deux étapes conduit à des entonnoirs énergétiques de formes différentes : la compaction de la protéine lors de la phase I résulte en une grande diminution de l'entropie conformationnelle. Les multiples interactions d'emballage tertiaire spécifique, s'effectuant au cours de la seconde étape, sont par nature enthalpique, et comme elles ne sont pas toujours « native -like », une interaction précédemment formée peut souvent être cassée pour s'impliquer dans un ensemble d'interactions plus stables, par la suite dans la phase II. C'est pourquoi il doit y avoir un ensemble de barrières enthalpiques le long de l'entonnoir II (figure 11).

1.1.4.8 Rôles biologiques des états intermédiaires.

Il existe aujourd'hui des preuves claires que les états non natifs tout comme l'état natif sont impliqués dans les réactions régissant la vie de la cellule. Les conformations reconnues par les chaperonnes moléculaires ne sont pas natives ((Randall and Hardy 1995) (Fink 1999)) et des conformations partiellement repliées sont vraisemblablement reliées aux amyloïdoses ((Kelly 1998) (Fink 1998) (Lansbury 1999)). Les protéines précurseurs qui ont une séquence signal de translocation sont partiellement repliées dans leur état permettant cette translocation à travers la membrane biologique ((Cramer, Heymann et al. 1995; Schatz and Dobberstein 1996)). Parce que moins stable thermodynamiquement que l'état natif, l'état « molten globule » doit être interprété comme un état dénaturé dans les conditions physiologiques. Il est plus que probable que les états non natifs présents transitoirement dans la cellule incluent l'état « molten globule ». Le rôle des états non natifs dans les phénomènes cellulaires est progressivement mieux compris.

Chaperonne

Le repliement des protéines *in vivo* est assisté par une série de protéines incluant les chaperonnes moléculaires. La nécessité d'un tel chaperonnage des protéines résulte de la

différence d'environnement entre les réactions de repliement *in vivo* et *in vitro*. Parmi différentes chaperonnes, GroEL, la chaperonne d'*E. Coli* est la plus caractérisée physico-chimiquement ((Fenton and Horwich 1997)).

Des études préalables sur le repliement de protéines, réalisé par cette chaperonne, ont montré que GroEL reconnaît l'état « molten globule » ((Hayer-Hartl, Ewbank et al. 1994)). A présent, il apparaît que GroEL peut se fixer à différents types d'états non natifs, s'étalant d'espèces non repliées jusqu'aux « molten globule » et aux intermédiaires finaux de repliement, même pour des intermédiaires de repliement de structure quaternaire de protéines multimériques ((Chuang, Wynn et al. 1999; Clark and Frieden 1999)). Un tel spectre de spécificité pour la protéine cible est compatible avec des interactions hydrophobes non spécifiques comme force principale de liaison entre la chaperonne et sa protéine cible. D'autres chaperonnes moléculaires pour lesquelles les propriétés structurales de la protéine cible liée ont bien été caractérisées, incluent DnaK, SecB, et l'alpha-cristaline ((Bukau and Horwich 1998), (Shtilerman, Lorimer et al. 1999)).

Amyloïdogénèse

Bon nombre de maladies humaines, incluant la maladie d'Alzheimer, le diabète de type II, l'amyloïdose systémique primaire et secondaire, et les encéphalopathies spongiformes (maladie de Creutzfeldt-Jakob) sont associées au dépôt extracellulaire d'agrégats protéiques insolubles nommés fibrilles amyloïdes ((Harper and Lansbury 1997; Fink 1998; Kelly 1998)). Il a été suggéré qu'il y avait un fort lien de causalité entre la formation des fibrilles et l'apparition des symptômes pathologiques. D'autre part, les fibrilles amyloïdes formées au cours de différentes pathologies concernant des protéines différentes et présentant des séquences en acides aminées différentes, adoptent toutes des structures en feuillet bêta croisé, dans lesquelles le brin bêta individuel est orienté perpendiculairement à l'axe long de la fibre. C'est pourquoi l'hypothèse d'un mécanisme commun de formation des fibrilles a été retenue. Bien qu'un tel mécanisme n'ait pas encore été démontré, un mécanisme de polymérisation dépendant d'une nucléation s'accorde avec les cinétiques de fibrillation de certains modèles protéiques *in vitro*. ((Harper and Lansbury 1997)). Quoiqu'il en soit, des études récentes ont aussi démontré que la formation d'intermédiaires conformationnels amyloïdes, qui se situent de l'intermédiaire monomérique jusqu'à l'intermédiaire protofibrille (structure quaternaire), est une étape importante dans la formation de fibres amyloïdes ((Hornemann and Glockshuber 1998; Kelly 1998; Lansbury 1999)). Des études sur le lysozyme ont montré que des mutations, responsables d'une amyloïdose autosomale récessive chez l'humain, pouvaient être

à l'origine de formes intermédiaires « molten globule », ce qui suggère que ce type d'intermédiaire est important pour la conversion de la forme soluble à la formation de fibrilles.

Des conditions partiellement dénaturantes apparaissent en général nécessaires à l'apparition d'amyloïdose. Des états amyloïdogènes partiellement dénaturés s'approchant de l'état « molten globule » ont aussi été rapportés pour d'autres protéines ((Kelly 1998), (Hornemann and Glockshuber 1998), (Fandrich, Forge et al. 2003)).

Etats non natifs proches de membranes biologiques

Les protéines destinées aux compartiments intra-cellulaires de cellules eucaryotes, comme les protéines exportées dans l'espace périplasmique des cellules bactériennes, commencent leur synthèse dans le cytosol et sont ensuite ciblées vers leur compartiment par des séquences « signal » présentes dans la chaîne polypeptidique néo-synthétisée ((Schatz and Dobberstein 1996)). La question de savoir comment les protéines peuvent se déplacer à travers la bicouche phospholipidique hydrophobe a été une question importante. Il est maintenant démontré que les protéines en translocation sont normalement totalement dépliées et passent à travers un canal transmembranaire composé de protéines membranaires ((Schatz and Dobberstein 1996), (Schwartz, Huang et al. 1999)). La protéine précurseur à l'entrée de ces canaux membranaires est, quoi qu'il en soit, partiellement dépliée et probablement dans un état proche du « molten globule » avant la translocation ((Bychkova, Dujsekina et al. 1996),(Koshiba, Hayashi et al. 1999),(Bychkova, Pain et al. 1988)).

Il y a d'autres exemples de l'importance de l'état « molten globule » dans les systèmes membranaires. Des expériences ont montré que des formes de l'alpha lactalbumine ainsi que d'autres protéines globulaires associées à la membrane, présentent les caractéristiques d'un état « molten globule » qui induirait la fusion au niveau des vésicules phospholipidiques ((Banuelos and Muga 1996)).

Il a été montré récemment que l'état « molten globule » de l'alpha-lactalbumine a une activité anti-tumorale en induisant l'apoptose dans les cellules tumorales. Ce phénomène proviendrait certainement de la conséquence d'une liaison spécifique de l'état « molten globule » à la membrane ((Svensson, Sabharwal et al. 1999)). L'insertion membranaire du domaine de la colicine, qui permet de former des ports, et la translocation du domaine catalytique de la toxine diphtérique à bas pH sont accompagnées par une transition conformationnelle de la forme soluble vers une forme liée à la membrane qui est caractéristique de l'état « molten globule » ((Cramer, Heymann et al. 1995), (Ren, Kachel et al. 1999), (Bertini, Turano et al.

2004)). Ces études montrent que l'état « molten globule » est souvent observé près de membranes biologiques et qu'il joue un rôle important dans l'insertion et la translocation de protéines. Parce que les surfaces hydrophobes sont exposées, les interactions hydrophobes doivent stabiliser le « molten globule » près de la membrane. Une diminution du pH local, causé par un potentiel électrique négatif sur la surface de la membrane, et une diminution locale de la constante diélectrique près de la membrane, peuvent également contribuer à la stabilisation de l'état « molten globule » ((Bychkova, Dujsekina et al. 1996)).

1.1.5 Événements initiaux du repliement des protéines

1.1.5.1 Introduction

La difficulté pour estimer les étapes de repliement est liée de façon intime avec le fait que les protéines ont évolué vers un repliement quasi unique, correspondant à une région très restreinte de l'espace conformationnel. En effet, la rupture partielle de la structure native est énergétiquement défavorable et conduit le plus souvent à une transition de dépliage hautement coopérative (tout ou rien). Pour comprendre comment chaque élément d'un ensemble de molécules protéiques largement dénaturées peut se convertir rapidement en une structure native compacte (et inversement), il est essentiel d'obtenir des informations expérimentales sur la nature des événements cinétiques. Pour réaliser cela, une stratégie est de déplier les protéines par des concentrations élevées de dénaturants chimiques et de diluer la solution rapidement pour réduire la concentration de dénaturant jusqu'à un niveau où l'état natif est thermo-dynamiquement favorisé (*Ce type de stratégie sera décrite dans la première partie de ce chapitre*). Ces stratégies sont nécessaires pour suivre les changements structuraux qui prennent place lorsque la protéine se replie, mais comportent certaines difficultés qui leur sont inhérentes. Les protéines dépliées par des dénaturants chimiques ont approximativement un état de type « pelote statistique ». Dans un échantillon typique, il y a approximativement 10^{18} molécules, un nombre bien inférieur au nombre de conformations accessibles, même pour une protéine de petite taille. Pour décrire la réaction de façon correcte, nous devons décrire les changements structuraux dans un échantillon où toutes les molécules sont susceptibles d'avoir une conformation différente jusqu'à la dernière étape de la réaction! De plus, nous devons réaliser cela dans des temps courts, de la milliseconde à la seconde (alors que ce sont des

jours ou des semaines qui sont normalement nécessaires pour déterminer la structure d'une seule protéine native).

C'est pour pallier ces difficultés qu'il est important de disposer du plus grand nombre possible de techniques et de méthodologies afin d'obtenir différentes vues sur la réaction de repliement des protéines. Les techniques de fluorescence peuvent mesurer l'extinction de fluorescence en fonction de la distance. Le dichroïsme circulaire, l'absorption infrarouge et la diffusion Raman UV peuvent fournir des informations sur la structure secondaire, alors que l'absorption et la diffusion Raman visible peuvent suivre l'influence de la liaison de groupes prosthétiques ou d'autres événements influençant leur environnement. La RMN donne une indication sur l'échelle de temps impliquée dans la fluctuation des résidus individuels. Depuis 1993 ((Jones, Henry et al. 1993)), de telles techniques de détection ont été utilisées en combinaison avec des méthodes permettant l'accès aux premières millisecondes de la réaction. Des aspects du repliement des protéines, jusque alors inaccessibles, sont examinés en détail. *La seconde partie de ce chapitre va décrire ces méthodes qui permettent d'effectuer à la fois une initiation rapide de la réaction et de suivre ensuite aussi rapidement que possible la cinétique de repliement.*

1.1.5.2 Obtention des états dénaturés

Il est nécessaire de distinguer deux éléments indispensables pour les expériences permettant de suivre les événements initiaux du repliement : (1) la nécessité d'un déclenchement rapide de la réaction avec un temps mort minimum et (2) la nécessité de disposer de techniques permettant de suivre la dynamique de la réaction avec un échantillonnage compatible avec la vitesse de la réaction.

Le temps mort correspond au temps de perturbation de l'état natif nécessaire, suffisant pour initier la réaction de façon homogène. Ces modèles expérimentaux de l'état dénaturé peuvent être obtenus de façons très différentes : par variation de la température, du pH et par addition d'agents chimiques dénaturants.

L'augmentation de la température d'une solution protéique augmente l'énergie de vibration et de rotation des molécules. Au-delà d'une certaine amplitude, ces mouvements changent profondément l'équilibre entre les différentes interactions faibles qui donnent sa stabilité à la conformation globulaire de la protéine.

La variation de pH, en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales de la protéine, déstructure les paires ioniques et rompt certaines liaisons hydrogène. En général, les protéines

se déplie pour des valeurs de pH inférieures à 5 et supérieures à 10 (Creighton 1993, [tableau 2 1.1.4.3 « Observation de l'état MG à l'équilibre »](#)).

L'urée et le chlorure de guanidinium sont les dénaturants chimiques les plus utilisés et les mieux décrits. Les effets directs de ces dénaturants chimiques sur les protéines ne sont paradoxalement pas bien connus. Ces dénaturants chimiques ont la potentialité de former plusieurs liaisons hydrogènes avec la chaîne peptidique, cassant ainsi les liaisons hydrogène des protéines et déstabilisant les structures secondaires. Ils ont tendance à augmenter la solubilité des protéines et à interagir de préférence avec les surfaces, polaires ou non, de la protéine d'une façon plus favorable que l'eau. Ces dénaturants modifient aussi la nature du solvant en formant un réseau de liaisons hydrogène de structures différentes de celui formé par les liaisons hydrogènes de l'eau. Le problème le plus important est la difficulté de mesurer les constantes de liaison quand la concentration de la protéine est de 10^{-4} M et celle du dénaturant est de 4 M ((Schellman and Gassner 1996)). Il est clair que le dénaturant interagit directement avec la protéine et qu'à très haute concentration, une modification substantielle de la structure du solvant est certaine ((Breslow and Guo 1990)). Différents modèles ont été développés pour expliquer comment le dénaturant déplie une protéine. On peut supposer que l'agent chimique, en migrant à l'intérieur de la molécule, peut former des liaisons hydrogène avec les atomes du squelette ou seulement diminuer les effets hydrophobes ((Wetlaufer and Lovrien 1964)) ((Dunbar, Yennawar et al. 1997)). L'urée ou la guanidine semblent également avoir pour effet d'augmenter la stabilité énergétique et structurelle de certaines protéines, pour de faibles concentrations, inférieures à celles provoquant la dénaturation ((Bhuyan 2002)).

1.1.5.3 Techniques biophysiques utilisées pour étudier le repliement des protéines

Plusieurs techniques développées pour caractériser l'état natif à l'équilibre sont à l'heure actuelle adaptées pour la caractérisation structurale et thermodynamique des états de transition qui apparaissent pendant le repliement.

Durant les dernières années, il y a eu de considérables progrès dans la compréhension des événements élémentaires de dynamiques conformationnelles durant les étapes initiales de repliement des protéines ((Eaton, Munoz et al. 1997; Callender, Dyer et al. 1998; Roder and Shastry 1999)). Ces avancées ont été rendues possibles par le développement d'outils expérimentaux tels des méthodes d'initiation de la réaction par saut de température induit par un laser et des méthodes par déclenchement optique ((Jones, Henry et al. 1993; Ballew,

Sabelko et al. 1996; Pascher, Chesick et al. 1996; Williams, Causgrove et al. 1996; Gilmanshin, Dyer et al. 1997; Munoz, Thompson et al. 1997; Thompson, Eaton et al. 1997; Sabelko, Ervin et al. 1999)) permettant de suivre la réaction avec une résolution temporelle et structurale accrue. Des méthodes de mélange rapide, qui ont été longtemps la source principale des informations concernant les cinétiques de repliement, ont connu une renaissance due aux avancées récentes dans la fabrication des mélangeurs et des méthodes de détection. ((Chan, Hu et al. 1997; Takahashi, Yeh et al. 1997; Shastry, Luck et al. 1998; Shastry and Roder 1998; Pollack, Tate et al. 1999)). La combinaison des expériences de quenched flow (flux bloqué) en échange d'hydrogène couplées à de la RMN ((Roder and Wuthrich 1986; Roder, Elove et al. 1988; Udgaonkar and Baldwin 1988)) et à de la spectroscopie de masse ((Miranker, Robinson et al. 1993)) reste importante pour la caractérisation des conformations partiellement structurées. De nouveaux protocoles pour mesurer le facteur de protection des liaisons amides sur des temps courts de repliement ont été particulièrement intéressants pour caractériser des intermédiaires précoces de repliement qui sont peu stables ((Gladwin and Evans 1996; Sauder and Roder 1998)). Ces études se sont largement centrées sur des protéines modèles, comme le cytochrome C, le lysozyme ou la myoglobine. L'exemple de la myoglobine est plus particulièrement développé dans ce document, ainsi que l'illustration du développement de nouvelles améliorations méthodologiques permettant de mieux décrire les événements initiaux du repliement de cette protéine.

Voici, résumées dans le [tableau](#) suivant, certaines techniques qui ont été utilisées au cours des dernières années pour caractériser le repliement des protéines ((Plaxco and Dobson 1996)), (Fetrow, Giammona et al. 2002))

Propriétés	Technique	Mesure	Résolution en temps
Condensation du cœur hydrophobe	Fluorescence	orientation et environnement des tryptophanes	<1ms
	Absorbance UV	orientation et environnement des tyrosines et tryptophanes	ms
	Fluorescence de l'AnilinoNaphtalène Sulfonate	Détection des surfaces hydrophobes exposées	ms
	Atténuation de Fluorescence	Enfouissement des tryptophanes	ms
Dimension moléculaire	Anisotropie de fluorescence	Mobilité des tryptophanes	ms
	Diffusion aux petits angles (neutrons & rayons X)	Rayon de giration, longueur de la chaîne	<100ms
	Diffusion quasi-élastique de la lumière	Rayon hydrodynamique	1s
Structure secondaire et liaison hydrogène	Dichroïsme circulaire UV lointain (170 - 250 nm)	Conformation du squelette moyennée sur la séquence	ms
	Marquage RMN pulsée	Séquence spécifique de la formation des amides stables et des liaisons hydrogène, détection d'intermédiaires transitoires	5 - 10 ms
	Marquage spectrométrie de masse pulsée	Formation de liaisons hydrogène, détection d'intermédiaires transitoires	5 - 10ms
	Spectroscopie infrarouge	Formation de structures secondaires, détection d'intermédiaires transitoires	1s
Structure tertiaire et structure native	Activité biologique	Intégrité du site actif, formation de l'état natif	ms - s
	Repliement interrompu	Vitesse de dépliement des intermédiaires	10 ms
	CD UV proche (250 - 300nm)	Formation des contacts aromatiques et formation de liaison disulfure	ms
	RMN	Formation de contacts spécifiques de la structure tertiaire	1s

Tableau 3 : Techniques utilisées pour l'étude du repliement des protéines.

1.1.5.4 Les méthodes de mélange rapide

Les approches de prédilection pour initier le repliement et le dépliement de protéines reposent sur un mélange en mode turbulent permettant une modification rapide des conditions de solvant (concentration de dénaturant, pH, etc.). Les méthodes de mélange rapide permettent l'utilisation d'un grand nombre de conditions de solutions et de méthodes de détection. La capacité de modifier drastiquement les caractéristiques de la solution est particulièrement importante pour détecter des espèces marginales du repliement de protéines. Il y a trois méthodes principales de mélange rapide : la méthode de stopped-flow (flux arrêté), celle de continuous flow (flux continu), et celle de quenched flow (flux arrêté par congélation) (figure 12). Les deux premières sont généralement limitées à la détection optique, alors que les expériences de quenched flow ou le freeze-quenched (flux bloqué par congélation) peuvent être couplées à différentes autres techniques analytiques, comme la RMN, la

résonance paramagnétique des électrons (RPE), la spectroscopie de masse à ionisation par électrospray (ESMS), etc... La combinaison des méthodes de quenched-flow avec des échanges deutérium/hydrogène (H/D) et une analyse RMN a été particulièrement importante pour l'étude du repliement des protéines parce qu'elle offre à la fois une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde et une résolution structurelle à l'échelle du résidu d'acide aminé ((Roder and Wuthrich 1986; Roder, Elove et al. 1988; Udgaonkar and Baldwin 1988)).

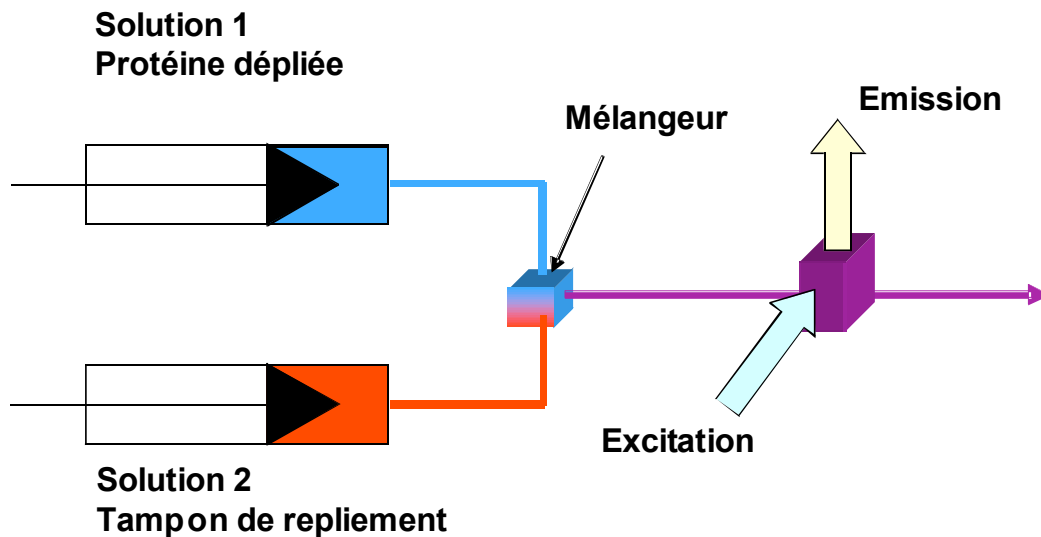


Figure 1 : Appareil conventionnel de mélange rapide :

Le mélange du contenu de chaque seringues change quasi instantanément les propriétés du solvant, la chaîne polypeptidique va progressivement prendre sa configuration la plus stable ; l'émission de fluorescence va varier en fonction de l'enfoncement des tryptophanes : la protéine se replie.

Méthodes de continuous flow :

Cette méthode est historiquement la plus ancienne. Elle permet de mélanger deux solutions de façon continue sans stopper le flux résultant ((Chance 1964)). Les mesures se font plus ou moins loin de la sortie du mélangeur le long du flux non interrompu. Plus la mesure effectuée est proche du mélangeur, plus l'évènement observé est précoce. Les mesures ne nécessitent ainsi pas d'échantillonnage rapide, ce qui permet alors l'utilisation de méthodes de détection peu sensibles comme la résonance Raman ((Takahashi, Yeh et al. 1997), (Takahashi, Ching et al. 1995)) ou la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ((Udgaonkar and Baldwin 1988; Pollack, Tate et al. 1999)). L'efficacité de la méthode peut être optimisée en utilisant un ensemble de détecteurs placés le long du flux permettant alors d'enregistrer le signal simultanément en plusieurs points de la réaction. Shastry et al. ((Shastry and Roder 1998)) ont

complété cette idée en plaçant un détecteur plus sensible de type « coupled charge device » (CCD) et en combinant un mélangeur capillaire, similaire à ceux décrits par Regenfuss ((Regenfuss, Clegg et al.)) : un temps mort de 45 μ s a été ainsi obtenu. Malgré cet avantage, la méthode de flux continu présente l'inconvénient de nécessiter une grande quantité d'échantillon et à un domaine de temps limité (de l'ordre de 0,1 à 1 ms).

Méthodes de stopped-flow :

Les expériences de stopped-flow impliquent typiquement des observations en temps réel au moyen d'appareils optiques comme la fluorescence intrinsèque ou extrinsèque, l'absorbance, le dichroïsme circulaire, ce qui permet de donner l'accès à une large gamme d'évènements cinétiques allant de la milliseconde à la minute ((Eftink and Shastry 1997)). La capacité d'effectuer plus d'une réaction en série est un autre aspect intéressant de cette méthode. La résolution en temps des appareils disponibles commercialement est déterminée non seulement par l'efficacité du mélange (temps de mélange intrinsèque), mais aussi par le volume mort entre le mélangeur et le point d'observation, le temps d'arrêt du flux, et les artéfacts liés à la méthode (inertie de la colonne de liquide, vibrations, cavitations, etc.).

Méthodes de quenched flow :

Des appareils commerciaux « quenched flow » peuvent effectuer 2 ou 3 mélanges de façon séquentielle en utilisant soit un flux continu ou un flux arrêté pour lesquels le mélange de la réaction intermédiaire est stocké dans une boucle. Le délai le plus court entre deux mélanges est typiquement de l'ordre de quelques millisecondes. Bökenkamp et al. ((Bökenkamp and Mayo 1998)) ont récemment mis au point un appareil de « quenched-flow » avec une résolution temporelle de l'ordre de 100 μ s entre deux tirs, en utilisant des méthodes de microfabrication. Une série de mixers a été réalisée par gravure de canaux de 200 μ m de diamètre dans des puces de silicone formant un mélangeur en T connecté par des lignes de délais de longueur variable.

1.1.5.5 Signification des évènements précoces de repliement

La « Burst phase »

Une observation fréquente dans les mesures de « stopped-flow » utilisant le dichroïsme circulaire ou la fluorescence, est que l'amplitude cinétiquement observable ne prend pas en compte la différence totale du signal optique entre le signal de l'état initial et celui de l'état final. Cette phase nommée phase explosive ou « burst phase » a pour explication la plus simple qu'il existe au moins une phase cinétique additionnelle avec une constante de temps comparable à, ou plus courte que, le temps mort de l'instrument, indiquant l'accumulation rapide d'intermédiaire cinétique.

Evènements précoces :

Pour un nombre grandissant de protéines, incluant le barstar ((Nolting, Golbik et al. 1995), (Nolting, Golbik et al. 1997)), le cytochrome C ((Chan, Hu et al. 1997),(Shastry and Roder 1998)), le domaine B1 de la protéine G ((Park, Shastry et al. 1999)), l'ubiquitine, la phosphoglycérate kinase, ou l'apomyoglobine, des observations directes de la cinétique dans des temps inférieurs à la milliseconde ont révélé que des évènements importants se déroulent avant l'étape cinétique limitante dans la formation de la structure native. Ces évènements impliquent à la fois la formation de structures secondaires et tertiaires. Bien qu'il reste beaucoup à apprendre sur les rôles structurants et cinétiques de ces évènements précoces, il y a peu de doute quant à leur implication importante dans la réaction de repliement. Alors que certaines protéines peuvent atteindre leur état natif dans une seule transition coopérative, deux ou plusieurs étapes distinctes peuvent être définies pour beaucoup d'autres. Ceci même en l'absence d'étape lente résultant d'évènement connexe tel que la liaison de l'hème ou l'isomérisation de la liaison peptidique. Les observations sont en accord avec le mécanisme initialement proposé par Khorasanizadeh et al. ((Khorasanizadeh, Peters et al. 1996)) ((Capaldi, Shastry et al. 2001)), qui correspond à un mécanisme de repliement minimum à trois états pour lequel une condensation de la chaîne en un intermédiaire « empaqueté » faiblement par quelques éléments de structure de type native, précède et facilite l'acquisition de la structure native, fermement empaqueté (*cf. chapitre « molten globule »*).

Limites

L'étude du repliement des protéines est un domaine de recherche pour lequel il existe aujourd'hui un réel besoin d'explorer le domaine de temps allant de la μs à la ms et pour lequel il est donc important d'améliorer la résolution en temps des instruments de cinétique rapide. En plus de savoir que d'importants événements structuraux s'effectuent dans une échelle de temps inférieur à la milliseconde, des travaux récents effectués par les équipes de William Eaton et de James Hofrichter suggèrent que la constante de vitesse maximale de repliement d'une protéine ne peut pas être plus grande que $1\mu\text{s}^{-1}$, correspondant à la vitesse maximale de compaction d'une chaîne peptidique ((Hagen, Hofrichter et al. 1996)) En effet, la plupart des études expérimentales et théoriques, effectuées pour de simples protéines à un domaine, conduisent à des évaluations très proches d'environ $N/100\mu\text{s}$ (N = nombre d'acides aminés) avec des vitesses plus grandes pour la formation des hélices alpha que pour les structures en brins bêta ((Kubelka, Hofrichter et al. 2004)). Ces premières études expérimentales sur des repliements ultra rapides de protéines et peptides offrent les premières informations directement corrélées aux simulations de dynamique moléculaire sur des gammes de temps qui se superposent directement (Early events in protein folding Fersht et Ferguson, 2003). Ces premières études permettent de fournir un premier "banc d'essai" pour affiner les paramètres de simulations. Les expérimentations, et donc les gammes de temps accessibles pour l'étude de protéines plus complexes, doivent ainsi augmenter leur efficacité et leur sensibilité pour permettre d'accroître la cohérence et la fiabilité des outils de prédiction *in silico*.

1.1.6 Stratégies de stabilisation des protéines : osmolytes, encombrement moléculaire...

La stabilité d'une protéine est déterminée par la différence d'énergie libre entre l'état replié, natif et les états dépliés. Alors que les états dépliés sont favorisés par l'entropie de la chaîne peptidique, la formation de l'état natif sera favorisé par toute modification qui réduirait l'entropie de la forme dépliée. Différentes stratégies peuvent donc être utilisées, soit en modifiant la séquence de la protéine, soit en modifiant la composition de la solution pour augmenter la stabilité de l'état replié: (a) Réduction de la longueur des boucles. (b) Formation de liaisons covalentes interchaînes dans le cas de protéines dimériques ou multimériques. (c)

Cyclisation du squelette. (d) Formation de chaîne (« catenation »). (e) Confinement spatial. (f) Encombrement moléculaire. (g) Effet osmophobique.

1.1.6.1 L'effet osmophobique : une force thermodynamique pour le repliement des protéines (Bolen and Baskakov 2001), (Bolen 2004).

Cela fait plus de 40 ans que Kauzmann a décrit les forces thermodynamiques qui définissent le repliement et la stabilité des protéines. Ces forces incluent l'entropie conformationnelle, les liaisons hydrogènes, les liaisons électrostatiques, les liaisons de van der Waals et les interactions hydrophobes ((Kauzmann 1956)). Alors que l'implication de ces forces a été mise en évidence par des études réalisées dans des solutions aqueuses diluées, le milieu physiologique de repliement des protéines *in vivo* est souvent plus complexe et plus concentré. Les osmolytes organiques intracellulaires sont produits par certains organismes adaptés à un environnement hostile. Ces osmolytes protègent les macromolécules intracellulaires contre la dénaturation due au stress de l'environnement ((Yancey, Clark et al.

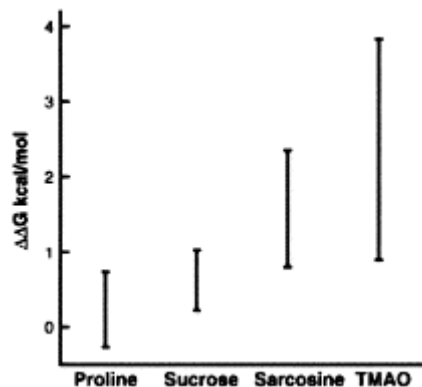


Figure 1 : Augmentation de la stabilité d'une protéine, la carboxyaminate ribonucléase T1 (TCAM) native en présence de différent osmolyte à une concentration de 1M.

Les barres verticales représentent la gamme dans laquelle la stabilité de la protéine est augmentée en présence de 1M en osmolyte.

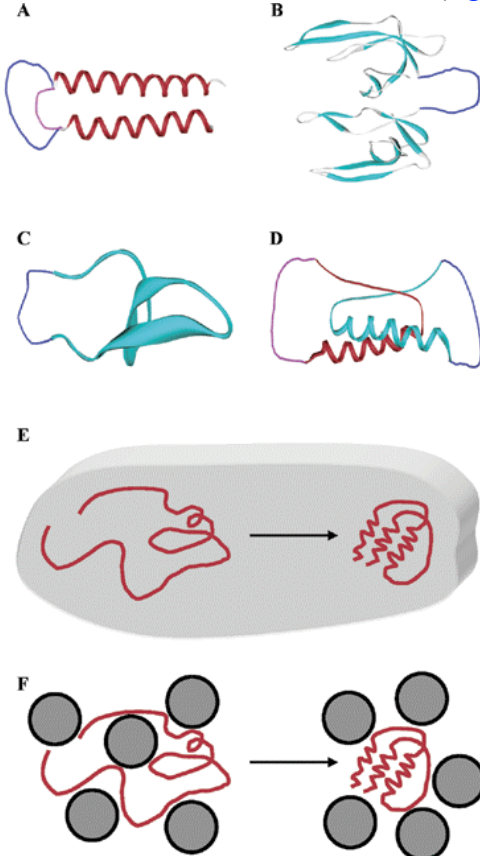
(Bolen and Baskakov 2001);[T.P. Creamer, R. Srinivasan and G.D. Rose, Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility. *Biochemistry* **36** (1997), pp. 2832–2835]

1982; Somero 1986). Lors de la sélection d'osmolytes organiques comme stabilisateurs de protéine, il apparaît que les osmolytes sont sélectionnés pour leurs interactions défavorables avec le squelette peptidique : cette force thermodynamique « solvo-phobique » est appelée l'effet « osmo-phobique » ((Liu and Bolen 1995)). Parce que le squelette peptidique est bien exposé au solvant dans l'état dénaturé, l'effet osmophobique augmente préférentiellement l'énergie libre de l'état dénaturé, déplaçant l'équilibre en faveur de l'état natif ((Qu, Bolen et al. 1998)). La [figure 13](#) présente l'influence de différents osmolytes sur la stabilité d'une protéine. L'extraordinaire capacité des osmolytes à replier les protéines dans leur structure native, que ce soit *in vitro* ou dans des cultures de cellules, suggère que le mécanisme

impliqué ne modifie pas sérieusement les forces communément impliquées dans le repliement ((Welch and Brown 1996; Brown, Hong-Brown et al. 1997; Scatena, Brown et al. 2001)).

1.1.6.2 Stratégies « entropiques » pour la stabilisation des protéines :

La plupart des discussions sur la stabilité des protéines se sont concentrées sur les interactions spécifiques (i.e. liaison hydrogène, compaction et enfouissement des groupes non polaires). Quoi qu'il en soit, il est maintenant reconnu que l'entropie de la chaîne peptidique peut être significativement perturbée par des changements dans la longueur des boucles (figure 14 A, (Ladurner and Fersht 1997; Nagi and Regan 1997; Viguera and Serrano 1997; Wallon, Kryger et al. 1997; Grantcharova, Riddle et al. 2000) et par le confinement spatial et l'encombrement moléculaire de la protéine (figure 14 E & F (van den Berg, Ellis et al. 1999; Minton 2000; Eggers and Valentine 2001; Qu and Bolen 2002; Sasahara, McPhie et al. 2003). Il est également intéressant de regarder les modifications de la chaîne polypeptidique des protéines qui est classiquement linéaire. Un certain nombre de protéines qui se replient seulement sous forme de dimères ont été étudiées sous forme de variant mono chaîne obtenus par liaison covalente des deux monomères (figure 14 B (Liang, Sandberg et al. 1993), (Robinson and



Sauer 1996; Jana, Hazbun et al. 1998; Moran, Schneider et al. 1999)). Des protéines circulaires obtenues en connectant les parties N et C terminales par un linker peptidique ont parfois été trouvés dans la nature (figure 14 C (Goldenberg and Creighton 1984), (Deechongkit and Kelly 2002; Trabi and Craik 2002)). Plus récemment, des protéines enchaînées, consistant en deux chaînes circulaires liées ont été produites ou découvertes (figure 14 D (Wikoff, Liljas et al. 2000; Blankenship and Dawson 2003)). Des analyses théoriques démontrent l'importance de prendre en compte les conséquences de ces phénomènes sur l'état replié comme sur l'état déplié, et fournissent les premiers éléments pour les futures études sur ces stratégies de stabilisation ((Zhou 2004)).

Figure 1 : Différentes stratégies pour la stabilisation de protéines.

Changement de la longueur de boucle (A) ; liaison covalente de protéines dimériques (B), cyclisation du squelette peptidique (C) ; « enchaînement » (D) ; confinement (E) crowding (F). Les boucles ou les liaisons sont représentées en bleu et en violet. La boîte grisée en (E) représente le confinement, et les sphères foncées représentent l'encombrement moléculaire. ((Zhou 2004)).

1.1.6.3 Une stratégie entropique : l'encombrement moléculaire.

La connaissance détaillée des vitesses, des équilibres et des mécanismes des réactions de repliement a été traditionnellement acquise par des expériences effectuées dans des conditions

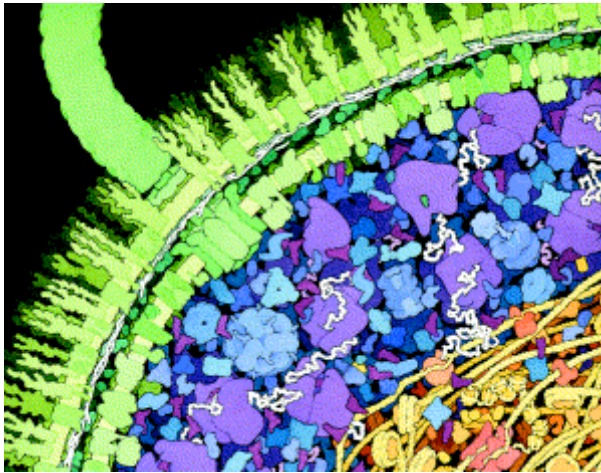


Figure 1 : Représentation approximative du nombre, de la forme et de la densité des macromolécules empaquées à l'intérieur d'une cellule d'E. coli.

Les petites molécules ne sont pas représentées.
[M. Hoppert and F. Mayer , *Prokaryotes. Am. Sci.* 87 (1999), pp. 518–525].

de solution très faiblement concentrées (moins d'un mg/mL de protéine totale). Par contre, les réactions biochimiques dans les systèmes vivants prennent place dans des milieux contenant de beaucoup plus grandes concentrations (50-400mg/mL) de macromolécules (Zimmerman and Trach 1991). Parce qu'aucune espèce macromoléculaire ne peut être présente à de fortes concentrations, mais que toutes les espèces ensemble occupent une fraction significative du volume du milieu, un tel milieu est considéré comme « encombré » et/ou « confiné » ((Minton 1992)) plutôt que « concentré », qui est un terme qui dépendra de la solubilité et /ou de la structure (Figure 15). Dans de tels milieux, les interactions non spécifiques entre les macromolécules contribuent de façon significative à l'énergie libre totale de celui-ci. Il a été montré que de hautes concentrations de macromolécules « bruit de fond », qui ne participent pas directement à la réaction testée, induisent des changements d'un ordre de grandeur ou plus sur les vitesses et les équilibres de plusieurs réactions testées, notamment des réactions de repliement de protéines ((Hatters, Minton et al. 2002; Silow and Oliveberg 2003)). L'encombrement moléculaire est plus précisément appelé effet du volume d'exclusion. En d'autres termes, l'encombrement moléculaire décrit le fait que la concentration totale des macromolécules dans la cellule est si élevée qu'une proportion significative du volume est occupée physiquement, et indisponible pour d'autres molécules.

L'effet de l'encombrement sur la vitesse de repliement va dépendre du degré d'encombrement et peut être affecté par deux mécanismes différents. Pour de faibles concentrations d'agent encombrant, la vitesse va être augmentée de façon relative à la stabilisation de la protéine.

Pour de plus fortes concentrations, la vitesse diminue drastiquement, résultant de l'augmentation de la viscosité du milieu et donc de la diminution de la diffusion intramoléculaire ((Plaxco and Baker 1998; Silow and Oliveberg 2003)).

L'effet de volume d'exclusion dans un milieu physiologique a certainement une influence, qu'il sera nécessaire de préciser, pour transposer fidèlement les informations de repliement décrites *in vitro* dans la situation de repliement *in vivo*. L'encombrement moléculaire peut expliquer pourquoi il existe des chaperonnes malgré la capacité de beaucoup de protéines à s'assembler de manière autonome. L'idée de « cage d'Anfinsen » décrit un repliement rendu possible *in vivo* grâce à l'aide des chaperonnes utilisées comme outils de séquestration, prévenant ou évitant des réactions non productives (aggrégation...). Dans un tel modèle, le repliement se déroule ainsi dans la cellule de la même façon que dans le tube à essai ((Ellis 2003)).

1.2 Le processus de repliement de l'apomyoglobine

1.2.1 Introduction

Le repliement de l'apomyoglobine, une protéine globulaire, est caractérisé par des intermédiaires qui peuvent être observés à la fois de façon transitoire, comme intermédiaire cinétique ou à l'équilibre près de pH4. La caractérisation précise de ces intermédiaires comme des espèces présentes sur le chemin de repliement constituerait un élément important dans le débat concernant la meilleure modélisation du repliement (*cf. introduction générale*).

Bien que des avancées majeures aient été faites dans l'élucidation des mécanismes cinétiques de repliement de plusieurs protéines, la compréhension détaillée des événements moléculaires s'effectuant durant le repliement restent limités. De façon générale, le processus général de repliement consiste en une compaction progressive de la chaîne polypeptidique accompagné par la formation et la stabilisation de structures secondaires et tertiaires. Malgré cette conceptualisation globale du processus de repliement, peu de choses sont connues concernant les premières étapes de repliement, et en particulier ce qui permet la formation et la stabilisation d'intermédiaires. La caractérisation structurale détaillée est extrêmement difficile pour les intermédiaires formés durant le repliement des protéines. Cela est dû à l'extrême rapidité et à la nature hautement coopérative des transitions de repliement. L'étude d'état partiellement replié de protéines dans des conditions d'équilibre est une approche alternative pour caractériser les événements structuraux et dynamiques impliqués dans le repliement.

L'apoMyoglobine est une protéine particulièrement intéressante pour l'élucidation détaillée des événements moléculaires lors du repliement d'une protéine. L'apoMyoglobine présente des cinétiques de repliement relativement simples avec des intermédiaires de repliement bien définis et sans complication d'interprétation associées à des isomérisation *cis-trans* des prolines et à des formations de pont disulfure. L'intérêt de l'apoMyoglobine réside également dans la possibilité d'obtenir la protéine sous différentes formes partiellement repliées compatibles avec des analyses par RMN et d'autres méthodes spectroscopiques. En effet, L'apoMyoglobine forme un intermédiaire « molten globule » à l'équilibre, très similaire en structure à un intermédiaire formé durant le repliement cinétique.

L'apoMyoglobine (apoMb) fait partie des modèles pour lesquels des informations détaillées sont disponibles pour les formes natives jusqu'aux formes dénaturées, en passant par les intermédiaires sur le chemin de repliement ((Kendrew 1963)).

(a) La structure tridimensionnelle à haute résolution de l'apoMb native n'est pas disponible mais la structure de la myoglobine (Mb) a été la première structure tri dimensionnelle déterminée pour une protéine et cela au moyen de la cristallographie aux rayons X. La structure déterminée pour l'apoMb native, après élimination du groupement hémique, a une structure similaire à celle de la myoglobine ((Lecomte, Sukits et al. 1999), (Eliezer and Wright 1996)).

(b) Bien que les formes dépliées de protéines soient moins bien appréhendé du fait de l'hétérogénéité structurale et l'inexistence d'activité biologique, des formes dépliées par l'acide et par l'urée ont été caractérisées récemment par des expérience de spectroscopie RMN ((Eliezer, Yao et al. 1998)-(Schwarzinger, Wright et al. 2002)) et par marquage de spin, également par RMN ((Lietzow, Jamin et al. 2002)).

(c) L'apoMb est utilisée comme modèle d'étude du repliement depuis plus de trente ans à la fois pour les études théoriques et pour les études expérimentales.

L'apoMb se replie et se déplie de façon réversible dans diverses conditions, mais sa caractéristique principale est sa capacité à former un ensemble de formes stables partiellement structurées possédant différents degrés de compaction et de structuration, lesquelles sont similaires à ceux détectés de façon transitoires durant les réactions de repliement et dépliement. A l'équilibre, dans de faibles concentrations de sel aux alentours de pH 6, l'apoMb est sous sa forme native, et se replie en milieu acide dans un processus à deux étape, qui forme un intermédiaire partiellement structuré pour un pH proche de 4 et une forme dépliée pour un pH proche de 2 ((Griko, Privalov et al. 1988), (Hughson, Wright et al. 1990), (Barrick and Baldwin 1993)). L'intermédiaire à pH 4 est appelé intermédiaire molten globule (I). L'addition d'anions stabilisant pour de bas pH conduit à une forme supplémentaire partiellement repliée ((Goto, Takahashi et al. 1990), (Loh, Kay et al. 1995), (Gilmanshin, Gulotta et al. 2001)). L'étude et la caractérisation des intermédiaires à l'équilibre donnent des informations pertinentes sur la structure, la stabilité et les mécanismes de formation des formes cinétiques correspondantes.

1.2.2 La forme native de l'apoMb

Pour des pH proches et en dessous de 6, l'apoMb adopte une conformation native. Cette conformation est plus étendue que celle de la Mb et a également une moindre hélicité, est moins stable et a une capacité calorifique plus élevée que la Mb ce qui indique une plus

grande exposition à l'eau des groupes hydrophobes ((Griko, Privalov et al. 1988), (Gast, Damaschun et al. 1994), (Kataoka, Nishii et al. 1995), (Griko and Privalov 1994)). Quoi qu'il en soit, malgré ces différences, la dispersion des déplacements chimiques dans le spectre RMN ((Eliezer and Wright 1996), (Loh, Kay et al. 1995)), la calorimétrie, le dichroïsme circulaire dans l'UV proche ((Gast, Damaschun et al. 1994), (Nishii, Kataoka et al. 1994)), et la fluorescence des tryptophanes ((Jamin and Baldwin 1998)) décrivent un empilement dense à l'intérieur de la protéine, typique d'une protéine native. La plupart des hydrogènes amide du squelette protéique sont protégés de l'échange hydrogène/deutérium de la même façon que pour la Mb. Une analyse détaillée par spectroscopie RMN montre que l'apoMb conserve la rigidité et la structure tertiaire de la Mb excepté pour la boucle EF, l'hélice F, la boucle FG et le début de l'hélice G qui subissent des fluctuations conformationnelles sur des temps de la microseconde à la milliseconde (Figure 16) ((Lecomte, Sukits et al. 1999), (Eliezer and Wright 1996)).

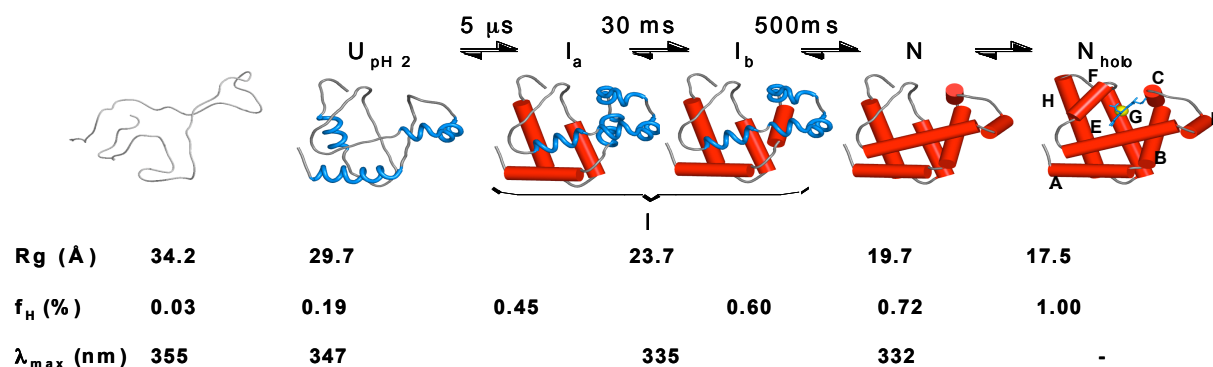


Figure 2 : Le chemin de repliement de l'Apomyoglobine.

Différentes formes de la protéine détectées comme intermédiaire durant les cinétiques de repliement/dépliement, ou comme des intermédiaires stables à l'équilibre sont disposés dans une série linéaire qui suit leur ordre d'apparition durant le processus de repliement correspondant à une acquisition progressive en terme de structure et de compaction. Le diagramme montre la localisation de la structure secondaire dans les différentes formes. Pour la myoglobine, cette localisation est basée sur la structure cristalline et pour les autres formes, celle-ci est basée sur des expériences d'échange H/D ((Hughson, Wright et al. 1990), (Jennings and Wright 1993)) et des données obtenues par spectroscopie de RMN ((Eliezer and Wright 1996), (Eliezer, Yao et al. 1998), (Eliezer, Chung et al. 2000; Yao, Chung et al. 2001), (Schwarzinger, Wright et al. 2002)). Les cylindres rouges représentent la localisation des hélices stables alors que les repliements en forme d'hélice bleue représente la localisation des hélices instables et fluctuantes.

1.2.3 La forme dépliée de l'apoMb

Selon différentes preuves, incluant le dichroïsme circulaire dans l'ultra violet proche, la fluorescence des tryptophanes et la diffusion aux petits angles des rayons X, l'apoMb à pH 2, dans de faibles conditions de sel est sous une forme dépliée et étendue ((Kataoka, Nishii et al. 1995), (Nishii, Kataoka et al. 1994), (Jamin and Baldwin 1998)). Des parties de structures d'hélices sont cependant présentes dans les régions de la protéine correspondant aux hélices A et H de la Mb ainsi que dans la région comprenant l'hélice D et le début de l'hélice E ((Eliezer, Yao et al. 1998), (Eliezer, Chung et al. 2000), (Yao, Chung et al. 2001)). Il a été estimé, par des méthodes de relaxation suivie par RMN, des restrictions de mouvement sur des temps de la picoseconde à la nanoseconde pour les parties Net C terminales correspondants aux hélices A, B, G et H de la Mb alors que la région centrale est plus flexible ((Yao, Chung et al. 2001)). La réduction de flexibilité dans ces régions est corrélée avec la persistance d'interactions à moyenne et longue portée entre les hélices A et H, comme cela a été montré par des expériences de marquage de spins suivies par RMN ((Lietzow, Jamin et al. 2002)). Un marquage de spin par un groupement nitroxy introduit dans l'hélice A a permis d'observer une dispersion des résonances assignées à des résidus de l'hélice A, mais également dans l'hélice H et d'autre part, un marquage de spin introduit dans l'hélice H disperse les résonances des résidus à la fois dans l'hélice A et dans l'hélice H. A contrario, les mouvements dans la région centrale de la protéine ne sont pas contraints et un marquage de spin introduit dans l'hélice E ne permet d'observer que la dispersion des résidus voisins au marquage. L'apoMb à pH 2 est donc largement dépliée et est un bon modèle pour décrire un intermédiaire précoce dans le processus de repliement ou la conformation d'une protéine dépliée dans des conditions natives.

Une forme plus largement dépliée est obtenue dans 8M d'urée à pH 2.3 dans laquelle la structure secondaire est totalement perdue. Mais même dans ces conditions, l'apoMb est incomplètement dépliée. La restriction des mouvements du squelette peptidique indique la persistance de regroupement hydrophobe ((Schwarzinger, Wright et al. 2002)) et les expériences de RMN par marquage de spin révèlent la persistance de contacts de longue distance entre les segments formant les hélices H et G dans la Mb ((Lietzow, Jamin et al. 2002)).

1.2.4 Le processus de repliement de l'apoMb

Récemment, le processus de repliement de l'apoMb a été caractérisé intensivement que se soit dans des études à l'équilibre ou lors d'étude cinétiques. Lorsque la fluorescence des Trp est suivie avec un temps mort de 1ms, les cinétiques de repliement de l'apoMb de cachalot à pH 6.0, 5°C, débutant de la forme dépliée U à pH2.2, montrent une phase explosive (burst phase, voir chapitre 1.1.4.5 « Signification des évènements précoces de repliement ») pour laquelle l'intensité de fluorescence augmente, suivie par trois phases cinétiques mesurables durant lesquelles l'intensité de fluorescence décroît avec respectivement des constantes de vitesse de 26 ms, 450ms, 5300ms (figure 17, ((Jamin and Baldwin 1998))). La phase explosive est assignée à la formation d'un intermédiaire partiellement repliée, I. La phase rapide mesurable est assignée à la conversion entre deux formes de I, nommés Ia et Ib. La seconde phase mesurable est assignée à la conversion de Ib en N et la phase lente à la conversion de formes transitoirement agrégés en la forme native, N ((Jamin and Baldwin 1998)). Les cinétiques de repliement suivie par d'autres sondes spectroscopiques dans des conditions natives similaires présentent des phases cinétiques avec des constantes de temps comparables (tableau 4) ((Jennings and Wright 1993), (Tsui, Garcia et al. 1999), (Ha and Loh 1998), (Uzawa, Akiyama et al. 2004), (Haruta and Kitagawa 2002), (Ballew, Sabelko et al. 1996), (Ballew, Sabelko et al. 1996)) et fournissent une vision détaillée du processus de repliement de l'apoMb en accord avec un modèle linéaire de repliement séquentiel (U Ia Ib N).

Deux difficultés émergent quoi qu'il arrive lorsque l'on essaye de comparer des données provenant de différentes études. (a) Les conditions expérimentales ne sont pas strictement identiques ; les constantes de temps des différentes étapes cinétiques et la stabilité relative des différentes formes de la protéine varient avec le pH, la température, l'absence ou la présence d'anions stabilisants et la présence ou l'absence de quantité résiduelle de dénaturant. (b) l'apoMb de deux espèces, la cachalot et le cheval, sont utilisés alternativement et bien que le

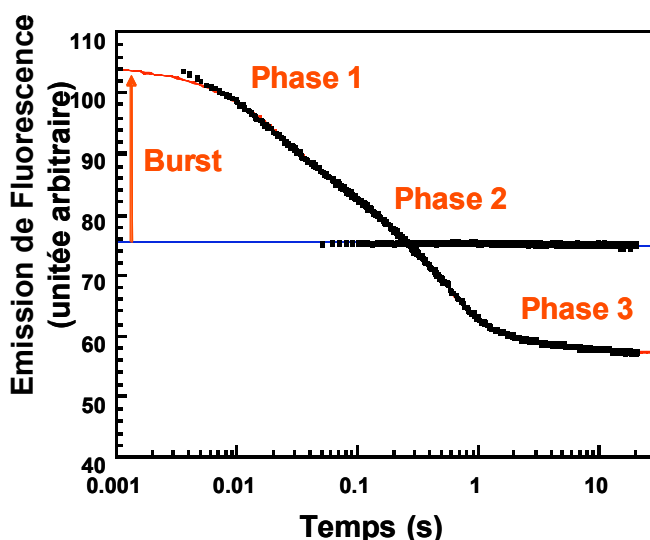


Figure 2 : Cinétique de repliement à pH 6.0 à partir de la forme acide dépliée (U, pH 2.2).

La courbe la plus basse montre la fluorescence de la forme dépliée et la courbe supérieure présente la cinétique après un saut de pH jusqu'à pH6.0. La diminution de fluorescence observée est ajustée à une équation à trois exponentielles permettant de déterminer des constantes de temps de 26 ms, 450 ms et 5300 ms. (Jamin and Baldwin 1998)

comportement de repliement et dépliement de ces deux protéines soit qualitativement similaire, il diffère quantitativement ((Haruta and Kitagawa 2002), (Chi and Asher 1999), Jamin & Ramos, résultats non publiés).

Tableau 4 : Comparaison montrant des constantes de temps pour les Cinétiques de repliement suivie par différentes sondes spectroscopiques dans des conditions natives similaires.

Probe ¹	Trigger ²	Spec. ³	τ (s)	τ (s)	τ (s)	τ (s)	Experimental conditions			References
			U \rightleftharpoons Ia (ms)	Ia \rightleftharpoons Ib (ms)	Ib \rightleftharpoons N (ms)	Ag \rightleftharpoons N (ms)	Temp. (°C)	Init. cond.	Final cond.	
CD H/D NMR	SF QF	SW SW	< 5	NS	940	NS	5	pH 6 4M urea	pH 6 0.8M urea	Jennings & Wright, 1993
			< 6	NS	~ 900	NS				
H/D MS	QF	SW	< 6	NS	1380	NS	5	pH 6.5 6M urea	pH 6.0 0.8M urea	Tsui & Wright, 1999
W Fluo	SF	SW	< 1	51 (12%) ⁶	450 (82%) ⁶	4200 (6%) ⁶	5	pH 4.2 0.8M urea	pH 6 0.8M urea	Données M Jamin
W Fluo	SF	SW	< 1	26 (36%) ⁶	450 (57%) ⁶	5300 (7%) ⁶	5	pH 2.2	pH 6.0	Jamin & Baldwin, 1998
CD	SF	SW	< 1	29	263	-	5	pH 2.2	pH 6.9	Données M Jamin
W Fluo	SF	SW	< 2	31	150	NS	4	pH 2.6	pH 9.8	Ha & Loh, 1998
TD Ex	QF	SW	< 6	45	90	NS				
W Fluo	SF	SW	< 1	8 (25%) ⁶	28 (68%) ⁶	600 (7%) ⁶	20	pH 2.2	pH 6.0	Données M Jamin
RR	CF	H	< 0.2	3	> 40	NS	20	pH 2.2	pH 5.6	Haruta & Kitagawa, 2002
CD	CF	H	< 0.2	5	49	NS	26	pH 2.2	pH 6.0	Uzawa & Fujisawa, 2004
SAXS	CF	H	< 0.2	NS	56	NS				
IR	LTJ	H	-	-	0.3	-	60	pH 5.3 45 °C	pH 5.3 60 °C	Kitahara & Wright, 2002
W Fluo	LTJ	H	0.005	-	-	-	10	pH 5.2 -7 °C	pH 5.2 10 °C	Ballew & Gruebele, 1996

NS = non observé

¹ W Fluo = Trp fluorescence, CD = dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, SAXS = diffraction des rayons X aux petits angles, RR = spectroscopie de résonance Raman, H/D NMR = expérience d'échange pulsé d'hydrogène/ deutérium couplé avec la détection par spectroscopie de RMN, H/D MS = expérience d'échange pulsé d'hydrogène/ deutérium couplé avec une détection par spectrométrie de masse, TD Ex = expérience d'échange pulsé de thiol-disulfure, IR = spectroscopie infrarouge.

² SF = flux arrêté, CF = flux continue, QF = flux éteint (« quenché »), LTJ = saut de température induit par un laser.

³ H = apoMb de cheval, SW = apoMb de cachalot.

⁴ Une phase additionnelle a été mesurée par spectroscopie de résonance Raman avec une constante de temps de 0.4ms à 20°C, cela n'avait pas été observé par d'autres sondes.

⁵ Données non publiés.

⁶ Amplitude relative de phase cinétique.

Formation de I dans des conditions natives

Même avec les méthodes les plus rapides de mélange, (temps morts entre 100 μ s et 6ms), les cinétiques de repliement dans les conditions natives, commençant de la forme dénaturée par l'acide ou de la forme dénaturée par l'urée, se déroulent avec la formation d'un intermédiaire partiellement replié durant le temps de mélange (tableau 4, (Jamin and Baldwin 1998), (Jennings and Wright 1993), (Tsui, Garcia et al. 1999), (Ha and Loh 1998), (Uzawa, Akiyama et al. 2004), (Haruta and Kitagawa 2002)). Cependant, au cours d'une expérience de saut de température induit par laser, à partir d'une forme dépliée par le froid ((Sabelko, Erwin et al. 1998)), la mesure d'un changement rapide de la fluorescence avec une constante de temps de 0.005ms (à 10°C) est assigné à la formation de I dans des conditions natives ((Ballew, Sabelko et al. 1996),(Ballew, Sabelko et al. 1996)), et aucune phase lente n'est détectée jusqu'à 0.5ms. D'autre part, l'analyse des changements dans la phase explosive, dans les expériences de mélange rapide, donne des informations sur l'intermédiaire précoce et montre que le repliement de I implique une compaction importante de la chaîne polypeptidique avec une réduction du rayon de giration de 29.7Å (U_{pH2}) à 23.7Å ((Uzawa, Akiyama et al. 2004)), la formation de 45-60% de la structure en hélice de la Mb ((Jennings and Wright 1993), (Uzawa, Akiyama et al. 2004), (Haruta and Kitagawa 2002), (Nishimura, Dyson et al. 2002)) et l'enfouissement des résidus tryptophanes dans un cœur hydrophobe ((Jamin and Baldwin 1998)). L'acquisition rapide de la protection contre les échanges H/D ((Jennings and Wright 1993), (Tsui, Garcia et al. 1999), (Nishimura, Dyson et al. 2002)) indiquent que des liaisons hydrogène stables sont présentes dans les hélices A, G, et H tout comme dans la partie C-terminale de l'hélice B ((Jennings and Wright 1993)) et un protocole d'échange optimisé qui permet la correction pour les échanges s'effectuant durant la poussée à haut pH, a révélé que des liaisons hydrogène ayant une stabilité marginale sont présentes également dans les hélices B et E ((Nishimura, Dyson et al. 2002)). Les hélices B, G et H forment un ensemble compact (« A(B)GH core » ou noyau A(B)GH) stabilisé par des contacts hydrophobes natifs démontrés par l'acquisition rapide d'une protection contre le marquage chimique dans des expériences d'échange pulsé de thiol-dissulfures avec des mutants contenant des résidus cystéines au niveau des interfaces GH et BG ((Ha and Loh 1998)) et par des expériences d'échange H/D avec des mutants dans lesquelles des groupements hydrophobes encombrants sont remplacés par des alanines dans l'hélice B ((Nishimura, Wright et al. 2003)).

L'intermédiaire à pH 4 comme modèle de I

L'intermédiaire à l'équilibre à pH4, I, partage plusieurs propriétés structurales avec l'intermédiaire cinétique de la phase explosive (burst phase) et ainsi sa caractérisation structurale et thermodynamique donne directement des informations sur le premier intermédiaire cinétique connu lors du repliement de N. I à pH4 a des propriétés caractéristiques d'intermédiaires molten globule : il est compact, avec un rayon de giration de 23.5 Å à 20°C ((Gast, Damaschun et al. 1994)) similaire à celui de l'intermédiaire cinétique précoce I ((Uzawa, Akiyama et al. 2004)), il contient d'autre part près de 60% de proportion de la structure en hélice de la Mb ((Griko, Privalov et al. 1988), (Hughson, Wright et al. 1990), (Barrick and Baldwin 1993), (Nishii, Kataoka et al. 1994), (Uzawa, Akiyama et al. 2004)), il a ses tryptophanes dans un environnement similaire ((Jamin and Baldwin 1998), (Jamin and Baldwin 1996)), mais en particulier il partage avec l'intermédiaire cinétique précoce, le même profil de protection contre l'échange H/D et donc le même noyau A(B)GH stable ((Hughson, Wright et al. 1990), (Jennings and Wright 1993)). Une caractérisation détaillée de I à pH4 par spectroscopie RMN montre que c'est un ensemble de conformations avec un noyau A(B)GH stable pour lequel les fluctuations de la région centrale sont liées par des interactions hydrophobe ((Eliezer, Yao et al. 1998), (Eliezer, Chung et al. 2000)). Dans le noyau A(B)GH, le mouvement du squelette est restreint et les hélices « native-like » sont formées mais ces hélices sont plus mobiles, et donc moins structurées à leurs extrémités ((Eliezer, Yao et al. 1998),(Eliezer, Chung et al. 2000)). A en juger de la faible dispersion des déplacements chimiques des spectres RMN, les chaînes latérales ne sont pas bien empaquées ((Eliezer, Yao et al. 1998), (Loh, Kay et al. 1995)), bien que certains contacts hydrophobes inter-hélice dans le noyau A(B)GH soient spécifique ((Kay and Baldwin 1996), (Kay, Ramos et al. 1999)).

Dans la partie central de la protéine, le squelette reste plus flexible et les hélices commencent à se former dans des emplacement natifs ou non natifs, mais sont moins stables que celles formant le noyau ((Eliezer, Yao et al. 1998), (Eliezer, Chung et al. 2000)) et ne sont pas protégés dans le expériences d'échange H/D ((Hughson, Wright et al. 1990)). Quelques unes de ces hélices faiblement stables dans la forme I, sont recrutées dans le noyau structuré au moyen de mutations uniques ((Nishimura, Wright et al. 2003), (Garcia, Nishimura et al. 2000)) ou par addition d'anion stabilisant ((Loh, Kay et al. 1995)).

Les études cinétiques proches de pH4 apportent aussi des informations sur le mécanisme selon lequel l'intermédiaire I se replie. Si la formation de I est trop rapide pour être observée

par les méthodes de mélange rapide à pH6, les cinétiques de repliement et dépliement de I sont mesurables par fluorescence après un saut de concentration d'urée à pH 4.2 (Figure 18 a,b) ou après un saut de pH au dessous de pH 3.4 ((Jamin and Baldwin 1996), (Jamin, Yeh et al. 1999)).

Entre pH 3.0 et 3.4, les constantes de temps de repliement en partant de U à pH 2.2, décroissent énormément avec l'augmentation du pH et deviennent trop rapides pour être mesurées au dessus de pH 3.4 (triangles inversés dans la figure 2a de ((Jamin, Yeh et al. 1999))), ce qui est en accord avec les constantes de temps de 0.26ms obtenues à pH 4.2, 5°C, en extrapolant les données mesurées effectuées dans la transition d'urée jusqu'à 0 M (Figure 18 c) ((Jamin and Baldwin 1996)) (une constante de temps de 0.046ms est trouvé de façon similaire à 20°C ((Jamin, Yeh et al. 1999))) et avec la constante de temps de 0.005 ms mesurée pour la formation de I à pH6.0 ((Ballew, Sabelko et al. 1996), (Ballew, Sabelko et al. 1996)). Cette variation importante de la constante de temps de repliement avec le pH est corrélée, à l'augmentation de stabilité de I avec le pH due à la réduction de la charge nette positive de la protéine, en accord avec le mécanisme de la charge nette ((Kay and Baldwin 1998), (Ramos, Kay et al. 1999)). A pH4.2, les cinétiques dans la transition d'urée montrent un comportement typique d'un processus coopératif à deux états ((Jamin and Baldwin 1996)) : la réaction de repliement/dépliement s'effectue dans une unique phase cinétique (figure 18 a,b) la constante de temps montre une dépendance simple vis-à-vis de l'urée (figure 18 c) et les paramètres ΔG_{H_2O} et la valeur m, provenant des données cinétiques est similaire à celles déduites de la transition de dépliement à l'équilibre. Les cinétiques à pH 4.2 sont compliquées par la présence de deux formes de l'intermédiaire, Ia et Ib (décrits plus bas), mais Ib se convertit en Ia en présence de quantité modérée d'urée et au dessus de 1M d'urée le processus de repliement/dépliement observé est celui de Ia ((Jamin and Baldwin 1998), (Jamin, Yeh et al. 1999)).

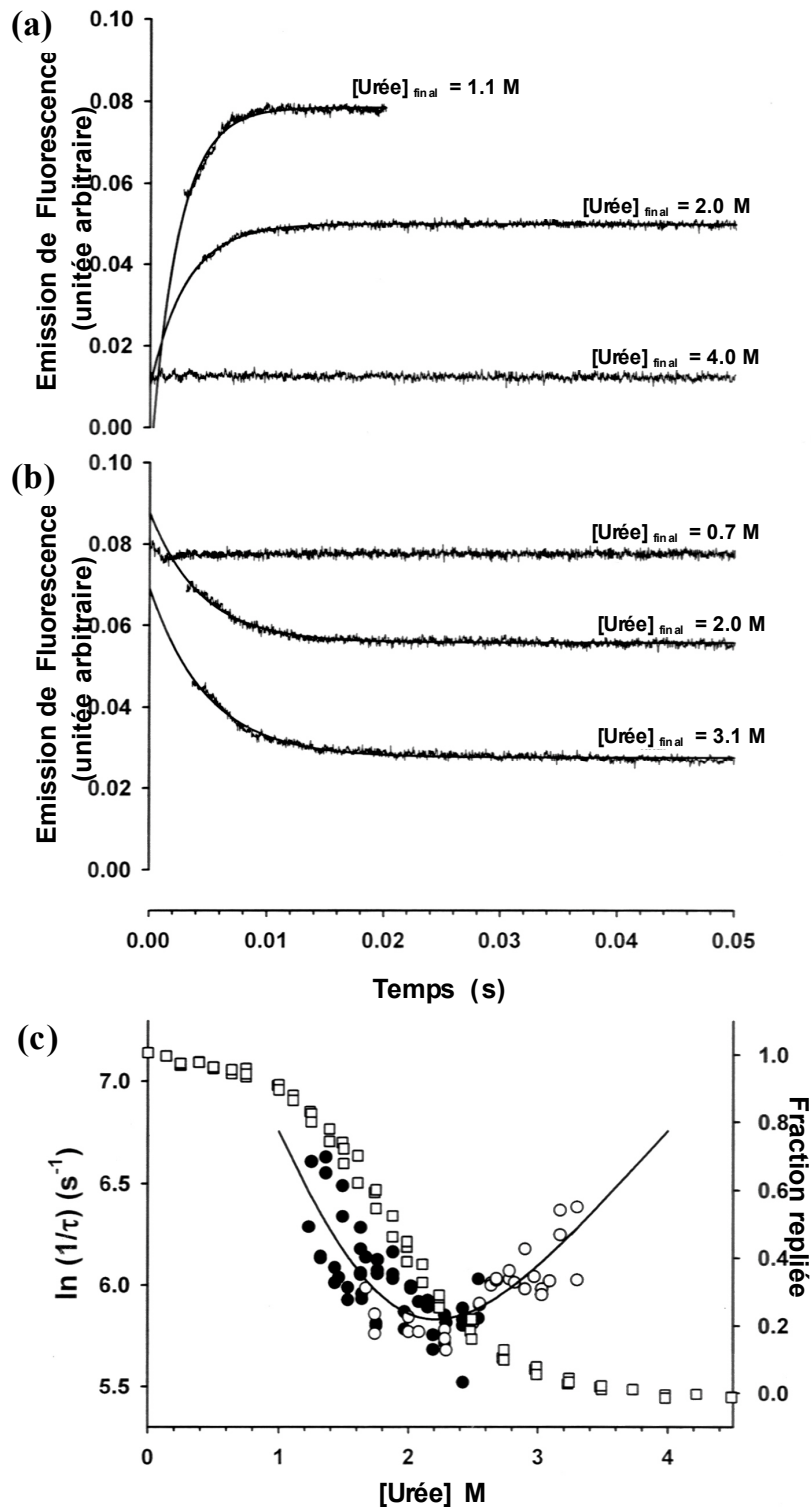


Figure 2 : Cinétiques de repliement et dépliement à deux états de Ia à pH 4.2.

Cinétiques de repliement (a) et de dépliement (b) mesurées par un appareil de stopped-flow en suivant la fluorescence des tryptophanes dans la transition de dépliement provoquée par l'urée. Les conditions initiales sont I à pH 4.2 en présence de 0.7M d'urée pour les expériences de dépliement ou U à pH 4.2 en présence de 4M d'urée pour les expériences de repliement. La concentration finale en urée est indiquée sur la figure pour chaque courbe. (c) tracé du log de $(1/\tau)$ contre $[Urée]$. Les cercles pleins représentent les constantes de temps des expériences de repliement, les cercles vides représentent les constantes des expériences de dépliement. Les carrés vides montrent les valeurs finales de fluorescence des cinétiques, cela reproduit la transition de dépliement à l'équilibre. (Jamin & Baldwin, 1996, NSB 3, 613-618)

D'autres tests confirment le comportement coopératif de Ia même si aucun changement enthalpique n'accompagne le dépliement induit par la chaleur ((Griko and Privalov 1994)) ou par l'acide ((Jamin, Antalík et al. 2000)). Premièrement, les transitions de dépliement par l'urée à l'équilibre à pH 4.2 sont superposées lorsqu'elles sont mesurées par CD dans l'ultra violet lointain, sonde de la structure secondaire et la fluorescence des tryptophanes, une sonde de la structure tertiaire ((Kay and Baldwin 1996), (Jamin and Baldwin 1996)). Deuxièmement, l'introduction de glycines ou de résidus proline au milieu des hélices A ou G affecte la stabilité globale et la structure de I ((Luo, Kay et al. 1997)), comme attendu pour un système coopératif. Malgré l'hétérogénéité de I, sa formation requiert un processus concerté certainement parce qu'une stabilité minimale doit être atteinte afin de maintenir la structure naissante.

Une expérience de saut de température initié par laser a été également utilisée pour mesurer les cinétiques de repliement/dépliement d'une autre forme de l'apoMb, nommée l'état E ((Gilmanshin, Gulotta et al. 2001), (Gilmanshin, Callender et al. 1998)) (pH3, faible concentration de sel), dans le milieu de sa transition de dépliement induite par la chaleur. Une phase cinétique unique a été observée par spectroscopie infra rouge avec une constante de temps de 0.014ms à 60°C alors que par spectroscopie de fluorescence des tryptophanes deux phases sont observées avec une constante de temps respectivement de 0.014ms et 0.059ms ((Gilmanshin, Callender et al. 1998), (Gulotta, Gilmanshin et al. 2001)). La phase rapide semble indiquer un évènement coopératif et il est plausible que cela corresponde à la fusion du noyau A (B) GH.

Les intermédiaires Ia et Ib

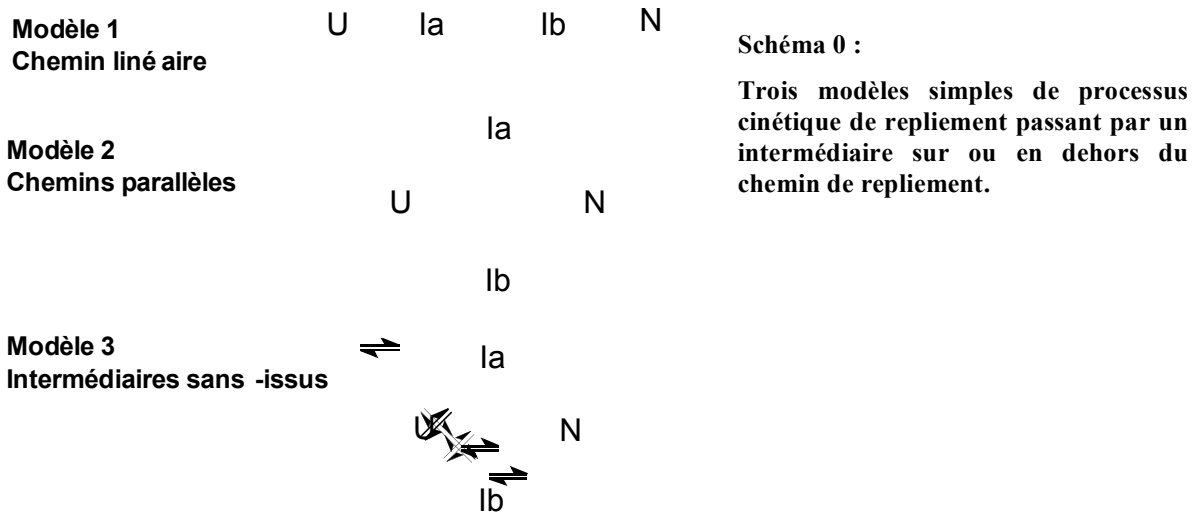
Les formes cinétique et les formes à l'équilibre de I sont hétérogènes par nature consistant en un ensemble de conformations, mais en plus, deux différentes populations de l'intermédiaire, Ia et Ib, séparées par une barrière cinétique considérable, sont visibles par fluorescence ((Jamin and Baldwin 1998)). Ces deux formes sont observables à l'équilibre entre pH 3.2 et 4.2, où la cinétique de leur conversion est observable par des expériences de saut de pH par flux arrêté (stopped-flow) ((Jamin and Baldwin 1998)). Ib est plus structuré que Ia et le rapport [Ib]/[Ia] est sensible au pH, à la présence d'urée et à la présence d'anions stabilisateurs. La conversion de Ia en Ib est aussi observable par fluorescence des tryptophanes durant le repliement de la forme N de l'apoMb de cachalot à pH 6.0, 5°C et s'effectue avec une constante de temps d'environ 26ms ((Jamin and Baldwin 1998)) (tableau

1). Plus récemment, une phase cinétique avec une constante de temps similaire a été observée au cours du repliement de la forme N de l'apoMb de cheval suivit par CD dans l'ultra violet lointain ((Uzawa, Akiyama et al. 2004)) et par spectroscopie de résonance Raman ((Haruta and Kitagawa 2002)). Dans des expériences de sauts de pH en partant de la forme U à pH2, l'intermédiaire formé durant le temps de mélange contient près de 45% de la structure en hélice de la Mb, puis se convertit en une seconde forme qui contient près de 60% de la structure en hélice de la forme N. Des cinétiques biphasiques sont aussi observés par stopped-flow CD avec l'apoMb de cachalot si la réaction est initiée par un saut de pH partant de U à pH2.2 (tableau 4). A contrario, la conversion de Ia/Ib n'est pas observé pour des expériences de saut d'urée par CD en stopped-flow à pH6.0 ((Jennings and Wright 1993), (Nishimura, Wright et al. 2003), (Garcia, Nishimura et al. 2000)). Cette anomalie est certainement explicable par la sensibilité de Ib à la présence d'urée. Dans les cinétiques suivies par fluorescence des tryptophanes l'amplitude relative de la réaction Ia/Ib, en présence de 0.8 M d'urée, est réduite à 12% en comparaison avec 36% en présence de dénaturant (tableau 1). La conversion Ia/Ib n'implique pas de variation mesurable du rayon de giration ((Uzawa, Akiyama et al. 2004)) mais des expériences d'échange pulsé de thiol/disulfures indiquent que l'empaquetage des chaînes latérales de l'interface B se déroule dans la même échelle de temps ((Ha and Loh 1998)) et suggère que la formation de Ib correspond au renforcement de la structure hélicale présente dans Ia et correspond également à l'incorporation de l'hélice B dans la structure du noyau A(B)GH. Des expériences d'échange H/D ont indiqué que la seconde moitié de l'hélice B se protège contre l'échange plus rapidement que la formation de N ((Jennings and Wright 1993)) et à l'équilibre à pH4.0, l'addition de 20 mM d'acide trifluoroacétique stabilise l'intermédiaire contre la dénaturation par l'urée et augmente la protection de l'hélice B contre les échange H/D ((Loh, Kay et al. 1995)).

Intermédiaires sur ou en dehors du chemin ?

Une question difficile à répondre dans la problématique du repliement des protéines est de savoir si un intermédiaire partiellement replié représente un intermédiaire obligatoire, qui guide le repliement ou si cet intermédiaire représente seulement un accident de parcours sur la route vers la structure native qui va ralentir le processus (*voir chapitre 1.1.4.6 « Rôle de l'état « molten globule » dans le repliement des protéines »*). L'origine de cette difficulté est cinétique. Dans la plupart des conditions, l'intermédiaire s'équilibre beaucoup plus rapidement avec la forme dépliée qu'il ne se convertit en la forme native. Il est ainsi difficile de distinguer entre des

intermédiaires sur et en dehors du chemin de repliement. Les formes intermédiaires habitées



de l'apoMb contiennent essentiellement des structures « native like » ((Eliezer and Wright 1996), (Eliezer, Yao et al. 1998), (Jennings and Wright 1993), (Nishimura, Wright et al. 2003)). Ces structures intermédiaires peuvent être ordonnées en fonction de la compaction qui est progressivement acquise (Schéma 2, (Eliezer and Wright 1996), (Kataoka, Nishii et al. 1995), (Jennings and Wright 1993), (Nishimura, Wright et al. 2003), (Kitahara, Yamada et al. 2002)). Ceci suggère que ces intermédiaires sont sur le chemin (Schéma 2, modèle 1) et les meilleurs arguments pour « I sur le chemin de repliement » de la forme native de l'apoMb provient de 2 études ((Jamin and Baldwin 1998), (Tsui, Garcia et al. 1999)) qui n'excluent pas des modèles complexes mais excluent certainement d'autres modèles simples pour lesquels N est formé par des chemins parallèles plus lents ou plus rapides (Schéma, modèle 2), ou encore, le modèle « sans issu » (Schéma, modèle 3).

Une expérience de repliement de double saut interrompu par stopped-flow, qui utilise les cinétiques de dépliement comme sonde, montre que Ib se forme rapidement à partir de Ia et se convertit lentement vers N ((Jamin and Baldwin 1998)). La disparition de Ib est concomitante avec l'apparition de N, indiquant que N se forme selon un unique chemin, et invalide ainsi un modèle avec des chemins parallèles (Schéma, modèle 2). Une expérience similaire de dépliement interrompu utilisant les cinétiques de repliement comme sonde, montre que Ib s'accumule plus rapidement que Ia et l'observation des variations du rapport $[Ia]/[Ib]$ au cours du temps ne peut pas être expliqué par un modèle où Ia et Ib sont tous les deux en dehors du chemin (modèle 3). Des conclusions similaires ont été obtenues en suivant le repliement de N à pH 5.6 par échange H/D en spectrométrie de masse ((Tsui, Garcia et al. 1999)). Dans les temps les plus courts (6ms), une espèce unique est observable pour laquelle la modification de

masse observée correspond à celle attendue pour I. A ce temps précoce, il n'y a pas d'indication pour la présence de forme dépliée résiduelle, ou de forme native, éliminant le modèle de chemins parallèles (modèle 2) et, pour des temps plus longs l'augmentation de N est accompagnée par une décroissance proportionnelle de I, éliminant le modèle complexe « sans issue » (modèle 3).

Formation de N

La dernière étape du processus de repliement, durant laquelle l'apoMb acquiert sa forme native, est observée par CD dans l'ultra violet lointain ((Jennings and Wright 1993), (Uzawa, Akiyama et al. 2004), (Nishimura, Wright et al. 2003)), diffusion des rayons X aux petits angles ((Uzawa, Akiyama et al. 2004)), expériences d'échange H/D ((Jennings and Wright 1993), (Tsui, Garcia et al. 1999)), et par échange pulsé de thiol-disulfure ((Ha and Loh 1998)). Des expériences de repliement par simple ou double saut en stopped-flow suivi par fluorescence des tryptophanes indiquent que N apparaît en deux phases cinétiques distinctes ((Jamin and Baldwin 1998)). La phase rapide avec une constante de temps 450ms à 5°C, est assignée à la formation de N à partir de Ib monomérique, et la phase lente avec une constante de temps de 5300 ms à 5°C, est assignée à la formation de N à partir d'une espèce transitoirement agrégée en dehors du chemin de repliement, parce que l'amplitude relative de la phase rapide diminue lorsque la concentration en protéine augmente, alors que l'amplitude de la phase lente augmente ((Jamin and Baldwin 1998)).

La réaction de conversion entre Ib et N s'effectue dans une gamme de pH pour laquelle les résidus histidines sont les groupes titrateurs majoritaires. De nombreux résidus histidines ont une faible valeur de pKa dans l'apoMb native ((Cocco, Kao et al. 1992), (Geierstanger, Jamin et al. 1998)). Parmi ces résidus, l'histidine 24 qui est sous sa forme neutre dans l'apoMb native, a un pKa anormalement bas, en dessous de 3.5 ((Geierstanger, Jamin et al. 1998)). Dans N, l'histidine 24 est complètement enfouie et forme une liaison hydrogène entre sa chaîne latérale et la chaîne latérale de l'histidine 119, formant un lien fort entre les hélices B et G. La protonation de l'histidine 24 ne peut pas s'effectuer dans N et n'intervient seulement que lorsque N se délie en I pour un pH proche de 4. L'analyse de la dépendance en pH des cinétiques de l'inter-conversion entre Ib et N montre que la valeur du pKa de l'histidine 24 dans l'état de transition et dans I est proche de celui de composés modèles ((Jamin, Geierstanger et al. 2001)) et montre ainsi que la liaison hydrogène avec l'histidine 119 n'est

pas formés durant l'état de transition. La protonation de l'histidine 24 n'est ainsi pas une barrière pour le repliement de I vers N, mais favorise le dépliement de N par l'acide.

1.2.5 Le processus de dépliement de l'apoMb

Les cinétiques de dépliement sont usuellement monophasiques et sont informatives seulement sur la nature de la haute barrière énergétique séparant N des formes partiellement ou totalement dépliées. Cependant, le dépliement de l'apoMb à faible pH s'effectue par une accumulation transitoire d'intermédiaires partiellement repliés, comme cela a été mesuré par fluorescence des tryptophane avec la méthode stopped-flow ((Jamin, Yeh et al. 1999)). Le spectre d'émission de ces intermédiaires de dépliement ressemble à celui de l'intermédiaire de la phase explosive (burst phase) observé durant les expériences de repliement et à celui de l'intermédiaire « molten globule » à pH4. L'accumulation de I durant la réaction de dépliement à bas pH résulte du changement de la vitesse de l'étape limitante et suggère que le repliement et le dépliement suivent une route similaire. Ceci supporte le modèle linéaire U Ia Ib N et le caractère obligatoire de I. La formation de I durant le processus de repliement est également supportée par une simulation récente de dynamique moléculaire du processus de dépliement par l'acide de l'apoMb à température ambiante ((Onufriev, Case et al. 2003)) pour laquelle il est montré que le dépliement à un pH acide s'effectue en passant par un intermédiaire avec un noyau A(B)GH préservé similaire à l'intermédiaire cinétique observé expérimentalement.

Un intermédiaire de dépliement est également observé dans les cinétiques de dépliement thermique de N, mesurée à 60°C par de la spectroscopie infra rouge résolue en temps après un saut de température induit par un laser ((Gilmanshin, Dyer et al. 1997)). N se déplie en deux processus séparés : une disparition rapide des hélices solvatées et une disparition plus lente d'hélices natives. La phase rapide se reporte à la formation d'un intermédiaire de dépliement qui n'est pas observé durant les expériences de repliement certainement parce qu'il est localisé sur la face N de l'étape cinétique limitante ou parce qu'il n'est pas suffisamment habité à basse température.

Chapitre 2. RESULTATS & DISCUSSION

2.1. Développement méthodologique d'appareil de mélange ultra rapide

2.1.1 *Préambule :*

Les progrès dans la compréhension des aspects dynamiques du repliement des protéines sont reliés à un continu développement de méthodes permettant d'obtenir des informations structurales plus détaillées sur les conformations transitoires qui apparaissent très tôt au cours de la réaction de repliement. Des avancées dans les méthodes de mélange rapide et dans d'autres méthodes spectroscopiques résolues en temps ont rendu possible l'exploration de certaines de ces étapes les plus précoces du repliement.

Les marqueurs spectroscopiques qui sont suivis peuvent subir des changements significatifs durant les quelques millisecondes nécessaires pour déclencher la réaction de repliement ce qui a pour conséquence qu'ils ne peuvent pas être résolus en utilisant des méthodes conventionnelles. Ainsi, le développement d'outils méthodologiques expérimentaux pour suivre le repliement avec une meilleure résolution temporelle a été rendu nécessaire. En effet, certaines protéines atteignent leur état natif en moins de quelques millisecondes. Les événements conformationnels de repliement les plus précoces s'effectuent dans la microseconde ou moins (comme la formation de segments d'hélice isolée, les turns et les beta hairpins). La dynamique de ces étapes élémentaires offre une limite inférieure pour les temps de repliement. Quoiqu'il en soit, même pour le repliement de petites protéines, les échelles de temps nécessaires sont bien supérieures à ces temps limites. Ainsi, une problématique importante dans le repliement des protéines concerne la compréhension de la relation, entre (i) les propriétés dynamiques des événements conformationnels élémentaires et (ii) la barrière cinétique limitant la vitesse du repliement. Cela est lié au problème de la compréhension du rôle des structures trouvées préférentiellement dans les fragments de peptides ou dans les protéines dénaturées pour la définition de la structure de l'état natif.

Pour rendre les événements de repliement les plus précoces accessibles expérimentalement, nous avons besoin de moyens permettant d'initier le processus dans des échelles de temps

plus courtes que l'évènement structurelle nous intéressant. Puisque les conformations partiellement structurées ne sont pas stables dans les conditions extrêmes nécessaires à la dénaturation de la structure native, il est nécessaire de sauter rapidement des conditions totalement dénaturantes vers des conditions fortement stabilisantes. Un premier challenge est donc de déclencher le plus rapidement possible la réaction. Un autre challenge est de trouver des méthodes de détection suffisamment rapides et informatives sur la structure.

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent deux méthodes de mélange rapide, le freeze-quenching, qui consiste à bloquer la réaction à différents temps par congélation rapide et le stopped-flow (flux arrêté) qui permet quant à lui de suivre la réaction en temps réel. L'objectif étant d'utiliser ces méthodes pour observer des réactions de repliement avec une résolution en temps inférieure à la milliseconde.

2.1.2 Résultats préliminaires de Freeze quenching

Introduction.

Les méthodes les plus communes pour initier le repliement de protéines reposent sur un mélange turbulent permettant un changement rapide des conditions de solvant (concentration de dénaturant, pH, ...). Les méthodes de mélange rapide offrent une grande variété de conditions de solutions et de méthodes de détection, ce qui est la principale raison de leur popularité. Les trois méthodes principales sont le stopped-flow, le flux continu, et le quenched flow (*voir chapitre «1.1.5.4 méthodes de mélange rapide»*). Les deux premières méthodes sont généralement limitées à la détection optique alors que les expériences de Quenched flow ou de freeze-quench peuvent être couplées avec beaucoup d'autres techniques analytiques telles que la résonance magnétique du noyau (RMN, suit l'état de spin du noyau), la résonance paramagnétique des électrons (RPE, suit l'état de spin des électrons), la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray, etc...

(Remarque : la combinaison de méthodes quenched flow et l'échange H/D suivie par RMN a été particulièrement importante pour l'étude du repliement des protéines. En effet, une telle méthode offre à la fois une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde et une résolution structurelle au niveau du résidu)

En général, la technique de mélange et d'échantillonnage de « freeze quench » peut être décrite en trois phases. A la première étape, la réaction chimique est déclenché par un

mélange rapide des réactifs. La réaction se déroule durant la seconde étape, lorsque l'échantillon est transporté du mélangeur vers le milieu de congélation. Lors de la troisième étape, l'échantillon est brusquement congelé et la réaction est capturée dans un état intermédiaire.

Après ces trois étapes de mélange et d'échantillonnage, l'étape de mesure du signal peut être effectuée sur l'échantillon congelé. La mesure du signal RPE est particulièrement bien adaptée puisqu'elle s'effectue sur un échantillon congelé et permet de suivre l'état de spin des électrons célibataires que l'on peut retrouver au sein des centres métalliques des protéines. Il est donc possible de suivre par RPE les variations tels que la fixation de ligand sur les centres métalliques de protéines en bloquant la réaction à différents temps par Freeze quenching. Le temps mort caractéristique des appareils de freeze-quench commerciaux est de l'ordre de 5 ms.

Les résultats présentés ici concernent une étude préliminaire pour d'une part, (i) tester le temps mort d'un prototype de freeze quench submilliseconde et d'autre part, (ii) utiliser cet appareil pour suivre une réaction de repliement en bloquant cette réaction par congélation.

Pour tester l'appareil de freeze quench, la réaction de liaison de l'azide (NaN_3) à la myoglobine (metMb) a été choisie (2.1.2.2 La réaction de liaison de l'azide sur la myoglobine comme réaction modèles pour tester le temps mort). La réaction de repliement modèle testé concerne le cytochrome C (cyto C) (2.1.2.3 le cyto C, un modèle pour suivre le repliement d'une protéine : mise au point initiale (par freeze quench & RPE)).

2.1.2.1 Matériel et méthodes

Matériel biologique

L'isopentane est fourni par la société SDS, l'azote liquide par la société Air Liquide.

La metmyoglobine de cœur de cheval et le cytochrome C proviennent de la société Sigma Aldrich et ont été utilisés sans étapes supplémentaires de purification.

La concentration de la solution mère de metmyoglobine, dans 25 à 50mM phosphate pH4.5 à 7.5, a été déterminée spectrophotométriquement par absorbance avec : $\epsilon_{\text{Mb}} = 0.363 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 560 nm comme indiqué par Douglas et collaborateurs. Toutes les solutions sont filtrées sur un filtre 0.2 μm .

La concentration de la solution de cyto C mère a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant un coefficient d'extinction de $1.06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 409 nm (Babul et Stellwagen, 1972) dans un tampon phosphate 50mM.

L'azide provient de Sigma Aldrich. Tous les autres réactifs chimiques proviennent de Sigma.

La concentration du chlorure de guanidinium a été déterminée par mesure de l'indice de réfraction (Pace, 1986).

Les composants des réactions ont été dilués dans les concentrations et les pH indiqués dans les légendes des figures. Les solutions d'azide ont été obtenues en utilisant une solution mère concentrée, en utilisant une balance de précision, puis diluée en cascade.

Toutes les solutions ont été préparées le jour de leur utilisation.

Congélation et Spectroscopie RPE

La réaction est bloquée par congélation dans de l'isopentane refroidi dans un dewar de 0.5L dans lequel circule de l'azote liquide. Le mélange réactionnel est projeté dans un réceptacle conique sur lequel est placé un tube RPE, le tout plongé dans l'isopentane. L'échantillon congelé au niveau du cône est ensuite poussé dans le tube placé sous le réceptacle conique. Le tube RPE est placé dans la cavité de mesure RPE, d'un spectromètre Bruker refroidi par un flux d'hélium.

Les spectres RPE ont été obtenus dans les fréquences de la bande X (approx. 9.5GHz). Les conditions expérimentales utilisées étaient 10K, 0.25mW, 9.45GHz pour la fréquence des micro-ondes, 100kHz en modulation de fréquence et 10G en modulation d'amplitude.

Spectroscopie d'absorbance et stopped-flow

Les spectres d'absorbances ont été collectés sur spectrophotomètre UV/visible.

Les tracés cinétiques ont été effectués sur un stopped-flow biologic SFM-400, en mode absorbance (505 et 570nm), dans une cuvette d'observation de type FC-15. Toutes les expériences ont été effectuées à température ambiante, 22°C.

Analyse des résultats

Les cinétiques de stopped-flow correspondant à la moyenne de 5 à 10 tirs, ont été ajustées à une équation exponentielle avec le logiciel BioKine.

L'évaluation du degré d'avancement de la réaction bloqué par FQ EPR a été évalué comme indiqués dans le texte.

2.1.2.2 La réaction de liaison de l'azide sur la myoglobine comme réaction modèle pour tester le temps mort :

Introduction

Les critères de choix de la réaction de référence sont :

- 1- la réaction doit être de pseudo premier ordre ;
- 2- la réaction doit se dérouler sur des temps suffisamment courts pour permettre de caractériser la réaction dans des temps inférieurs à la milliseconde (temps de demi vie de l'ordre de la milliseconde).

L'objectif est de choisir les conditions de la réaction témoin nécessaire à l'obtention des traces cinétiques par absorbance. Ces conditions de mesure témoin, effectuées sur un stopped-flow, correspondent à celles attendues et sont mesurées ensuite par freeze quenched et RPE.

La liaison de l'azide (N_3^{-1}) à la metmyoglobine de cœur de cheval (metMbFe $^{3+}$) a été utilisée pour caractériser les propriétés de mélange et de blocage par congélation. Ce choix de réaction nous permet d'analyser par RPE l'état d'avancement de la réaction. Les échantillons congelés peuvent être analysés également par absorbance optique.

La myoglobine possède un site de liaison réversible de l'oxygène à l'atome de fer héminique (schéma 3).

Le cofacteur héminique comprend un atome de fer coplanaire (atome ferreux de Fe 2^+ bivalent avec 6 liaisons de coordinations) coordonnés à 4 atomes d'azote de l'anneau porphyrinique tétrapyrolique et lié également à l'azote imidazole de 2 résidus histidines perpendiculaires au plan de l'hème. Une de ces liaisons à l'histidine est covalente (Histidine proximale), alors que la seconde histidine, proche de la sixième coordination du métal (histidine distale) permet à la molécule d'oxygène de s'intercaler et forme une liaison hydrogène avec l'oxygène. L'oxygène se fixe à la forme Fe (II) de la protéine (forme désoxyMb) (a, schéma). La forme metMb (forme Fe (III)) (b, c schéma 3) fixe à une grande variété de ligands exogènes comprenant l'azide, le fluor, le cyanure qui remplacent l'oxygène.

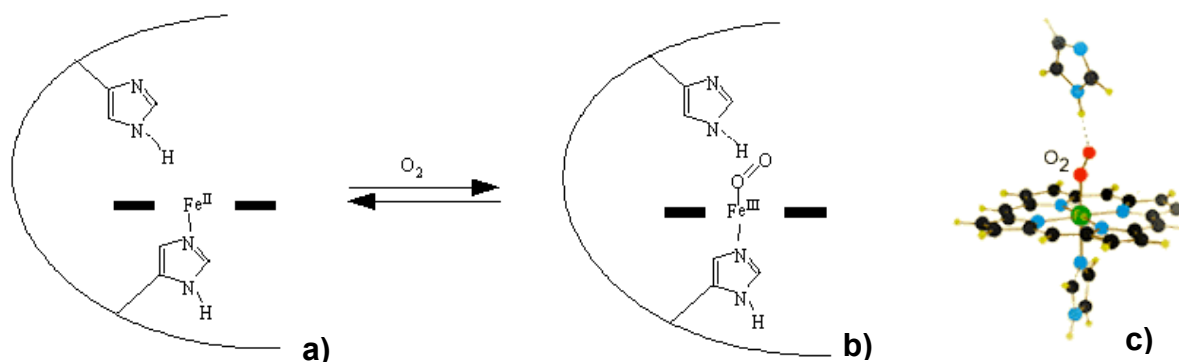


Schéma 0 : Liaison de l'oxygène à la forme désoxy myoglobine, au niveau du fer héminique.

a) Forme desoxyMb (Fe II). b) Forme MetMb (Fe III). c) représentation « ball & stick » de la forme MetMb. Sont représentés : la poche héminique, les histidines proximal (bas) et distal (haut) ; le noyau tétrapyrolique (traits pleins gras), les liaisons covalentes (traits pleins) et hydrogènes (traits pointillés).

Ici, c'est la réaction avec l'azide qui est suivie et qui permet la formation d'une espèce bas spin stable du métal de la protéine (forme ferrique : Fe(III)).

L'essentiel à retenir des éléments présentés ci-dessus est que : la réaction de liaison de l'azide sur la myoglobine est une réaction répondant aux critères énoncés ci-dessus : (1) simple d'analyse et (2) réaction rapide qu'il est possible de suivre par RPE.

Résultat et discussion

Choix des conditions pour la réaction témoin de fixation de l'azide à la myoglobine.

Dans un premier temps nous avons testé la réaction à différents pH et déterminé les conditions pour lesquelles la réaction est suffisamment rapide pour permettre l'étude sur des temps inférieurs à la milliseconde.

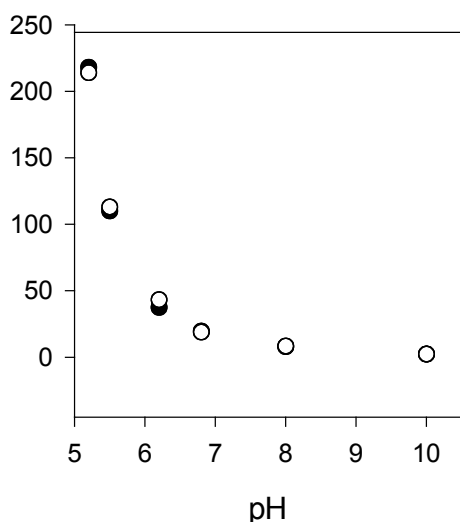


Figure 2 : Variation de la vitesse apparente de liaison de l'azide à la metmyoglobine en fonction du pH :

Vitesse apparente de la variation de l'absorbance à 505 nm (ronds pleins) et 570 nm (ronds vides) lors de la liaison de l'azide à la metmyoglobine. La réaction est déclenchée lors d'un mélange 1:1 par stopped-flow. Conditions finales: 45 μ M de metmyoglobine ; 3 mM NaN₃. Tampon : 2mM citrate/acide citrique, 30mM NaCl.

Remarque : L'analyse des cinétiques mesurées à 505nm et 570 donne des vitesses apparentes identiques montrant que les variations du spectre d'absorbance résultent d'un seul et même phénomène.

La vitesse de liaison de l'azide est connue pour augmenter à faible pH ((Douglas E. 1965)) (Figure 19). A pH 5, la réaction est suffisamment rapide mais la protéine a tendance à s'agréger. Nous avons testé différentes conditions de tampon et varié les conditions de préparation de la solution de protéine.

A pH<5, la réaction de liaison de l'azide à la metmyoglobine est biphasique. La préparation de l'échantillon est d'autre part rendue difficile du fait de phénomène d'agrégation selon les conditions choisies. En effet, le tampon citrate (50mM) conduit à l'agrégation de la solution de protéine (pour des concentrations de 100-500 μ M) alors que le tampon phosphate (50mM) permet de conserver 12 h l'échantillon à pH 5 sans agrégation, une diminution à 25mM de tampon phosphate permet d'augmenter ce délai jusqu'à 24 h. A pH inférieur à 5 (pH 4.2) et

pour des concentrations de tampon identiques, la metmyoglobine est soluble, de même à $\text{pH} > 6$.

Pour notre analyse, nous avons choisi le $\text{pH} 7$ où la metmyoglobine est stable à température ambiante. De plus, à $\text{pH} 7$, la réaction est monophasique et ne comporte pas d'agrégation (Figure 20). A 24 heures, la faible diminution du signal ($< 10\%$) d'absorbance de la forme liée peut être attribuée à une faible agrégation (figure 20, lignes pointillés). La vitesse, plus lente, de la réaction à $\text{pH} 7$ par rapport aux $\text{pH} 4$ ou 5 peut être augmentée en variant la

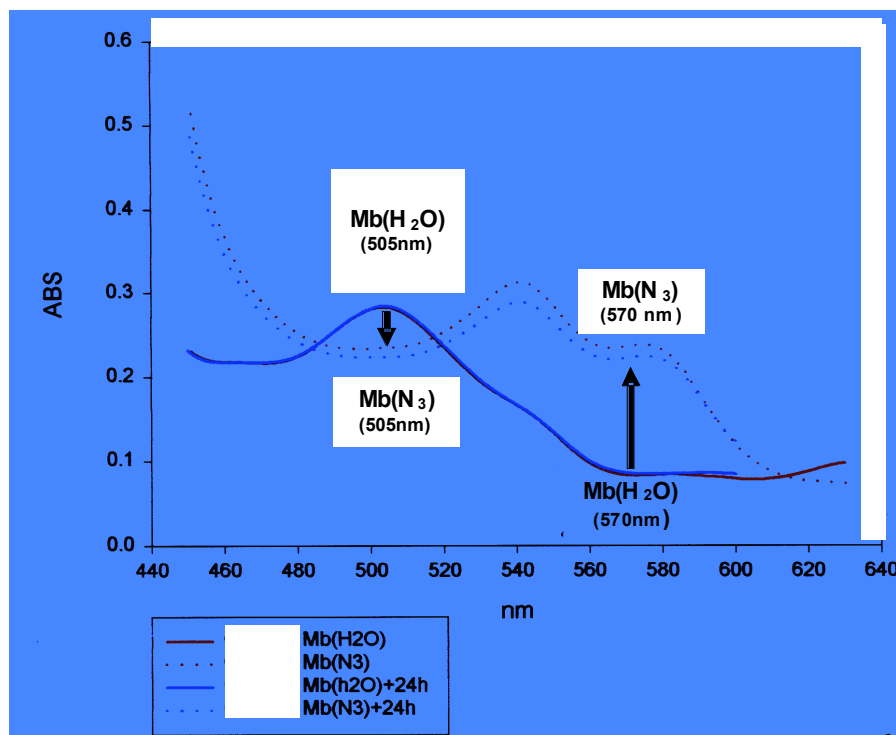


Figure 2 : Spectre d'absorbance de la metmyoglobine de cheval avec et sans azide à $\text{pH} 7$.

Les lignes pleines correspondent à la forme metmyoglobine ($\text{Mb Fe}^{3+} - \text{H}_2\text{O}$, $500\mu\text{M}$). Les lignes pointillées correspondent à la forme metmyoglobine liée à l'azide ($[\text{azide}] = 200\text{mM}$). Les lignes rouges correspondent aux spectres enregistrés juste après la préparation. Les spectres enregistrés, après 24 heures et à partir des mêmes échantillons, sont en bleu (l'azide seul absorbe à 660 nm (non montré)). Les flèches noires représentent l'amplitude et le sens de la variation d'absorbance suivis lors des mesures cinétiques par absorbance.

concentration d'azide. Pour caractériser la réaction entre MbFe^{3+} et N_3^{1-} , nous avons effectué une analyse cinétique dans un appareil de stopped-flow.

Dans notre cas, il n'est pas utile de suivre le détail du mécanisme de la réaction ((Giacometti, Da Ros et al. 1975; Cherepanov and De Vries 2004)) et un traitement semi-empirique du mécanisme reste suffisant.

Le choix s'est donc porté sur les conditions de pH proche de 7 ($\text{pH} 7,3$) (Figure 19 et 21). La méthode spectroscopique de choix étant la résonance paramagnétique électronique, la

concentration de metmyoglobine nécessaire pour avoir un signal suffisant est de $500\mu\text{M}$. La réaction « étalon » sélectionnée est un mélange 1 :1 pour des concentrations finales de $500\mu\text{M}$ de myoglobine et 200 mM d'azide dans un tampon phosphate 25mM , pH 7,3. La vitesse apparente de la cinétique mono exponentielle mesurée dans ces conditions est de 395 s^{-1} (voir figure 23).

A

B

2D Graph 5

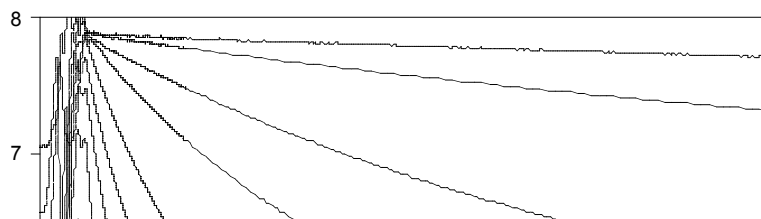


Figure 3 : Variation de la vitesse de liaison de l'azide à la metmyoglobine en fonction de la concentration d'azide.

A : Traces cinétiques d'absorbance à 570nm , pH 7.3 ($50\mu\text{M}$ metMb final, concentration en azide de haut en bas : $5\mu\text{M}$; $32\mu\text{M}$; $250\mu\text{M}$; $500\mu\text{M}$; $940\mu\text{M}$; $2,5\text{ mM}$; $3,75\text{mM}$; $12,5\text{MM}$; 25mM ; $37,5\text{ mM}$; 50mM).

B : Variation de la vitesse apparente calculée, en fonction de la concentration en Azide ; cercles pleins (●) à pH 4,5 (traces cinétiques non montrés, conditions identiques) et cercles vides (○) à pH 7.3 (traces cinétiques présentées en A).

Remarques : 1 -L'augmentation d'absorbance à 570 nm due à la fixation de l'azide se traduit par une diminution du signal (volts). 2 -L'analyse des cinétiques mesurées à 505nm donne des vitesses apparentes identiques montrant que les variations du spectre d'absorbance résultent d'un seul et même phénomène.

Stratégies pour optimiser la résolution en temps du processus de freeze quenching :

Ci -dessous sont décrites brièvement les problématiques auxquelles se confrontent les études de type « freeze quenching » :

- 1 : minimiser le temps de mélange
- 2 : minimiser le temps de transport de l'échantillon,
- 3 : augmenter la vitesse de l'échange thermique durant la fixation par congélation.

Pour répondre à ces exigences, les tests effectués au cours de ce travail sont les suivants :

- 1 : diminution de la taille du mélangeur,
- 2 : augmentation des conditions de poussées des liquides,
- 3 : réalisation de plusieurs tests concernant la taille des gouttes projetées dans le liquide de cryofixation ainsi que sur l'opportunité d'utiliser un cryofixateur solide (plaque métallique refroidie).

Résultats de « Freeze quenching » de la réaction de la metmyoglobine avec l'azide.

Les résultats obtenus par stopped-flow en suivant l'absorbance dans des conditions proches de celles utilisées par l'appareil de freeze quench (conditions de fluide équivalentes : système de poussée, flux identiques...) ont permis de choisir les conditions de réactions idéales pour l'étude préliminaire de la réaction azide / metmyoglobine par « freeze quench » et RPE. La réaction de 1mM de metmyoglobine additionné à 200mM d'azide à pH 7.2 (500 μ M metMb final, 100mMazide final) se déroule dans des temps suffisamment courts pour tester le freeze quench dans des temps inférieurs à la milliseconde. La méthode suivie consiste à fixer les conditions de la réaction pour ensuite moduler le réglage du freeze quench afin de bloquer la réaction à différents temps pour reconstituer le « film » de la réaction à partir des différentes « images » bloquées par congélation. L'objectif est de compléter la courbe mesurée par absorbance ; en effet une partie de la réaction (30%) peut être suivie par stopped-flow mais le reste de la réaction se passe durant le temps mort de l'appareil de mélange rapide, estimé à 3 ms dans les conditions de tirs utilisées.

Dans un premier temps, un spectre RPE des conditions initiales et finales a été effectué à l'équilibre. Dans un second temps, pour les mêmes conditions, des mesures par RPE ont été effectuées après avoir effectué la congélation des mélanges effectuées par « freeze quenching » (figure 22). Ceci a permis de vérifier le bon fonctionnement du freeze quench, notamment le système de nettoyage de la fluidique de l'appareil. La figure 22 représente les spectres bruts des bandes X de RPE à 18 K. Les échantillons ont été obtenus après congélation dans un bain d'isopentane refroidi (à 120K). Un système permet de récupérer

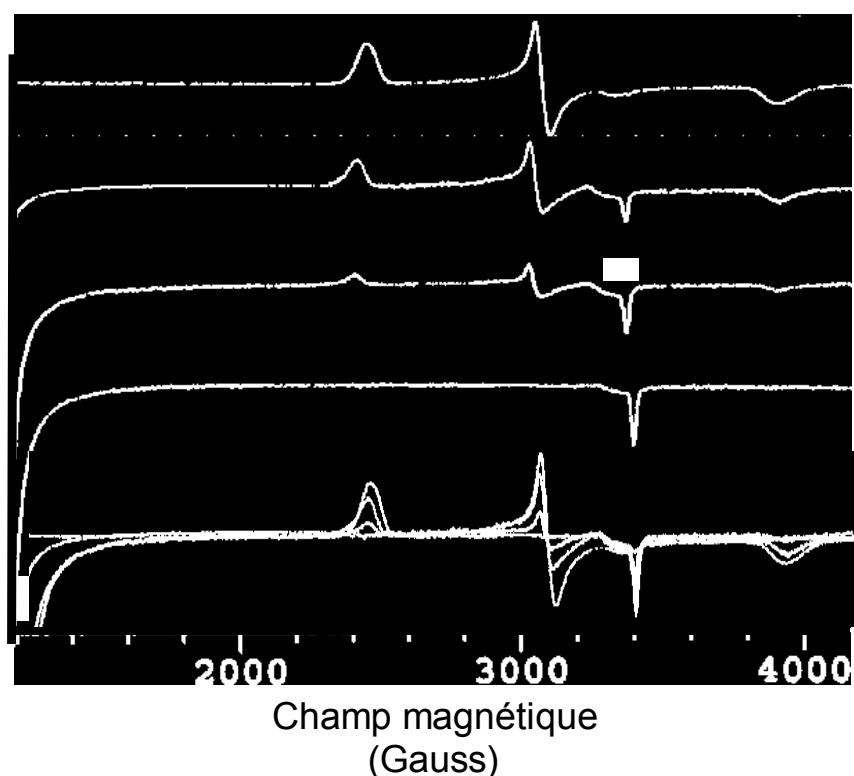


Figure 4 : Réaction de fixation de l'azide par la metMb bloquée par Freeze quenching : données brutes de RPE. Conditions finales: 500 μ M Mb (A, B, C, D) ; 200mM N₃ (A, B, C).

1 - **A et D** sont respectivement les conditions finale et initiale. A est le spectre de la réaction totale (congélation après 1 s). D correspond au spectre de la metMb seul.

B et C sont les spectres de RPE enregistrés après blocage de la réaction par congélation dans des conditions similaires (température du milieu de congélation -70 °K, distance au mélangeur 70mm).

2 – superpositions des spectres A, B, C, D.

l'échantillon congelé et de le placer dans un tube en quartz pour l'analyse RPE, et cela sans briser la chaîne du froid. Les spectres présentés figure 22 correspondent à 0mM, 100mM d'azide et 100mM d'azide congelé après 1 s pour obtenir le spectre final de la réaction.

Le spectre final de la réaction correspond au spectre **A de la figure 22** pour lequel l'azide (N³⁻) a complexé l'ensemble des molécules de metmyoglobine. Ce spectre est caractéristique des

espèces bas spin des protéines hémiques ((Maurus, Bogumil et al. 1998)) similaire aux spectres enregistrés précédemment pour des complexes azide myoglobine de cheval et de cachalot ((Bogumil, Hunter et al. 1994),(Sono and Dawson 1982))

Après estimation du degré d'avancement de la réaction (figure 22 spectre B et C) par rapport aux états final et initial (figure 22 spectre A et D), il est possible d'estimer, en suivant la variation des différents pics de RPE, que la réaction a été bloquée à 23% et 65 % de l'amplitude totale de la réaction.

Cela correspond à des temps de 0.7ms à 2.66 ms, estimés en utilisant l'équation (1) de la forme intégrale de la loi des vitesses de premier ordre ou $[A]_0 = 100\%$ et $[A]_t = 23$ et 65% .

$$(1) \ln([A]_t / [A]_0) = -kt$$

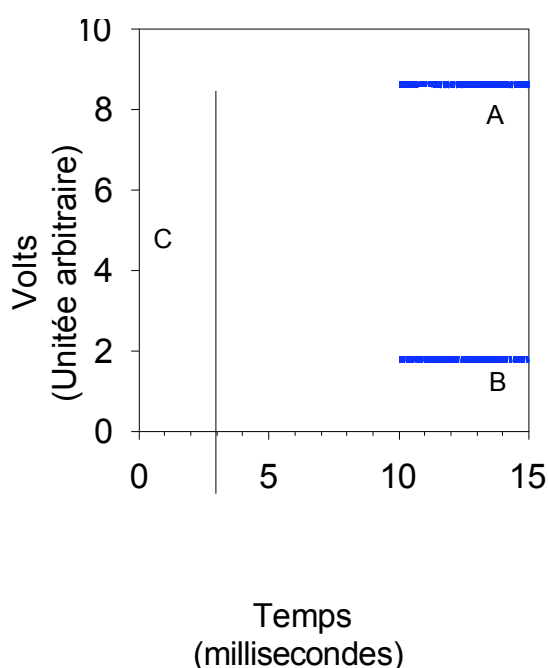


Figure 4 a : Cinétique de référence de la réaction de fixation de l'azide sur la metmyoglobine suivi par stopped-flow en mode absorption.

Le temps mort de la réaction de référence, effectuée par stopped-flow, est de 3 milliseconde. Le début de l'enregistrement de la cinétique s'effectue après ces trois millisecondes (trait verticale, temps = 3 ms).

Les tracés **A** et **B** (traits bleus épais) correspondent à des mesures de cinétique avec 500 μM Mb final; 25mM phosphate ; pH 7,3 ; 20°C. Flux : 12mL.s⁻¹. Mélange 1 : 1.

Le tracé **A** correspond à la réaction en absence d'azide, permettant de déterminer la valeur d'absorbance au temps 0 : aucune modification d'absorbance n'est mesurée. Le tracé **B** correspond à la cinétique mesurée lors de la fixation de 100mM NaN₃ final : durant le temps mort, l'appareil ne permet pas de suivre la réaction (temps de 0 à 3 ms) ; après 3 ms, la cinétique est observable par absorbance : la cinétique est mesurée.

La **courbe C** (rouge) correspond à l'ajustement des valeurs expérimentales (tracé B, temps = 3 à 15 ms) à une fonction monoexponentielle (logiciel Biokine). La vitesse apparente calculée est de 395 s⁻¹. La courbe théorique est extrapolé au temps 0.

.01 vs Col 1
1.42 vs Col 1

Les figure 23a représente la cinétique de la réaction de référence mesurée par stopped-flow avec un temps mort de 3 millisecondes, correspondant à la réaction de l'azide avec la metMb

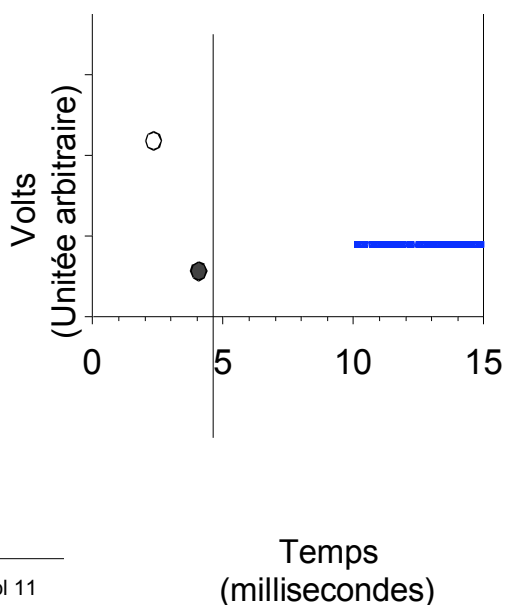


Figure 23 b : Cinétique témoin de la réaction de fixation de l'azide sur la metmyoglobine suivie par stopped flow en mode absorption.

Correspondance avec les mesures effectuées par freeze quench en mode RPE.

Les cercles (○ ; ●) correspondent à l'estimation du temps auquel la réaction a pu être bloqué par congélation mesurée par RPE présentés figure 22. (Voir texte pour les détails)

vs Col 11
vs Col 13
vs Col 17

suivie par freeze quench (500 μ M Mb final et 100 mM Azide final). Cette cinétique de référence (tracé B, figure 23a) a une constante de vitesse apparente mesurée de l'ordre de 400 s⁻¹. Le tracé A correspond à la mesure d'absorbance de la metMb en absence d'azide. Cette valeur mesurée correspond à la valeur d'absorbance initiale de la réaction de fixation d'azide. Sur la figure, le tracé de la cinétique de la réaction témoin (tracé B, figure 23a) montre que la majeure partie de la réaction s'effectue durant les trois millisecondes correspondant au temps mort estimé de l'appareil de stopped-flow utilisé ici. L'ajustement des valeurs expérimentales à une courbe monoexponentiel permet de tracer la courbe théorique (courbe C, figure 23a) qui permet d'extrapoler la courbe jusqu'au temps 0.

En première estimation, cette courbe théorique déterminé par stopped-flow correspond à la cinétique suivie par freeze-quench. Les temps mesurés des cinétiques bloquée par freeze quench (figure 22, lignes B et C) sont reportés sur la figure 23 b. Le cercle vide correspond à la mesure C (figure 22, ligne C) et le cercle plein à la mesure B (figure 22, ligne B). L'emplacement des cercles a été déterminé en fonction de l'amplitude relative du signal (ici en volts). 100% correspond au signal de la courbe 2 ($t \gg 1s$) et 0% à celui de la courbe 1 ($t \gg 1s$).

Finalement, les temps calculés (0.7 et 2.66 ms) montrent que l'objectif de tester l'appareil de freeze-quench dans des temps inférieurs à la milliseconde est atteint. Cependant, il est difficile de reproduire de tels résultats. En effet, les spectres B et C (figure 22) résultent de deux réactions distinctes effectuées dans des conditions identiques. En plus de ce défaut de reproductibilité, même si des temps inférieurs à la milliseconde semblent être atteints, il est

difficile de montrer que les conditions de la réaction de stopped-flow sont strictement identiques à celles effectuées par « freeze quench ». Ces considérations sont discutées dans le paragraphe suivant.

Paramètres à maîtriser pour optimiser l'appareil de freeze quenching :

En général, le « freeze-quenching » est un processus en trois étapes (initiation de la réaction, temps de la réaction, arrêt de la réaction) qui offre une opportunité unique pour ; (a) initier et synchroniser la réaction suivie par un mélange rapide de ses composants, (b) varier le temps de réaction en bloquant la réaction dans le milieu cryogénique après différents intervalles de temps, (c) capturer des intermédiaires transitoires en congelant soudainement le mélange réactionnel. Le blocage d'une réaction par congélation permet également de stocker les échantillons congelés sur une très grande période, et leur structure peut être analysée par différentes techniques spectroscopiques. Le succès de la méthode dépend de deux paramètres clés : il est essentiel (a) de varier le temps de réaction dans un grand spectre temporel (μs - ms - s) pour permettre de regarder l'ensemble de la réaction étudiée, et (b) de minimiser la dilution temporelle des intermédiaires cinétiques transitoires observés. Pour répondre à ces exigences, il est nécessaire que le processus de mélange/congélation soit au moins d'un ordre de grandeur plus rapide que l'évènement que l'on souhaite suivre. Dans ces conditions, il y aura une chance d'observer les différentes étapes de la réaction et de reconstituer ainsi « le film » décrivant le phénomène observé. Ainsi pour éviter la « dilution » des intermédiaires conformationnels, le mélange et la cryofixation de l'échantillon doit s'effectuer en 1-10 μs , alors que le temps mort du transport de l'échantillon ne doit pas excéder 10-100 μs .

Lors du mélange, deux paramètres déterminent la résolution temporelle : (a) le flux et (b) le volume présent dans le mélangeur. Dans les appareils de freeze quenched conventionnels (Ballou, 1978), (Brenner, Murray et al. 1989), (Moodie, Mitchell et al. 1990)) le temps de mélange est relativement long (de l'ordre de la milliseconde) même pour de grandes vitesses de flux (environ 1ml/s-1), du fait d'un relativement grand volume de mélange (>1 μL).

La vitesse du transport de l'échantillon est déterminée par deux paramètres critiques : (a) le flux linéaire ainsi que la pression dans le système, et (b) la distance entre le mélangeur et l'aire d'échantillonnage. Le problème technique réside dans le fait que si le flux est augmenté, la pression augmente aussi. Donc, la construction du mélangeur et le mode de propulsion des liquides dans le mixer doivent résister à de telles pressions.

La qualité de la congélation est également cruciale et est dépendante de deux paramètres : la vitesse du jet et le diamètre du jet. L'objectif étant de congeler l'eau sous sa forme amorphe solide (vitrification de l'échantillon). Il a été montré que la dispersion d'un jet rapide (environ 200 m s^{-1}) d'un faible diamètre ($10\text{-}20\mu\text{m}$) dans un milieu de congélation liquide (isopentane à 120 K) résulte en une vitesse de congélation de $3 \cdot 10^6 \text{-} 10^7 \text{ s}^{-1}$ ((Cherepanov and De Vries 2004)) qui permet l'obtention directe d'eau solide amorphe.

D'autre part, la diminution de la distance entre le mélangeur et le milieu de congélation permet une amélioration complémentaire du temps mort du freeze quenching. Une distance trop courte (i.e $< 2\text{cm}$) conduit à une congélation inhomogène due à une perturbation excessive effectuée sur le milieu de congélation (« splashing »), au risque de refroidir, voire même de congeler le mélange au niveau du mixer. Plus la taille des gouttes constituant le spray sera importante, plus le temps de congélation des gouttes sera grand. Il est important également que le spray soit le plus homogène. D'où l'idée de diminuer au maximum la taille du jet, obtenir ainsi une congélation directe du jet, et diminuer la résistance à l'air dans le trajet du flux après mélange. Une autre idée est d'utiliser un milieu solide refroidi à la place d'un liquide de cryofixation. Il est également important que le milieu de congélation soit le plus hydrophile possible (pouvoir « mouillant ») et permette une congélation la plus rapide possible (voir ci-dessus). Dans ce travail nous avons utilisé comme milieu de congélation l'isopentane (refroidi par l'azote liquide). Le milieu de congélation (120K) doit permettre de directement vitrifier l'échantillon en passant outre la phase liquide-glace ((E Mayer 1982)). En terme de structure, l'eau liquide amorphe résulte d'une congélation vitrifiant l'échantillon qui vers 130K subit une transition lente réversible liquide-liquide qui forme un état métastable supercongelé de l'eau liquide normale. Cet état cristallise lorsqu'il est « chauffé » au dessus de 160K ((Cherepanov and De Vries 2004)).

Nous avons testé ces différents paramètres et la plupart étaient fixés mais non maîtrisés lors des expérimentations présentées ci-dessus. Pour ces raisons, il est difficile de s'assurer que les réactions observées se sont bien effectuées dans des échelles de temps proche de la milliseconde.

Des travaux de Tanaka et al ((Tanaka, Matsuura et al. 2003)) rapportent également le développement d'appareils de Freeze quenching ultra rapide. Ils utilisent également la réaction metMb-azide comme réaction référence pour calibrer l'appareil de congélation rapide. Ils ne tiennent pas compte du pH de la réaction utilisée dans leur test, ni de la

température et de l'effet de fortes concentrations d'azide. Toutes ces variables sont plus ou moins sensibles et peuvent conduire à une surévaluation de la vitesse des réactions observées résultant en une diminution apparente de l'âge de l'échantillon « freeze quenché ». Dans notre approche, ces biais ne sont pas tous écartés, mais l'approche visant à utiliser une réaction mesurée d'abord par stopped-flow permet de mieux évaluer la réaction réellement « freeze quenchée ».

Ces mêmes résultats de Tanaka et collaborateurs, sont également discutés par Cherepanov et De Vries qui rapportent le développement d'une nouvelle technologie d'échantillonnage et de micromélange ultra-rapide. Ce travail récent remarquable démontre que l'appareil mis au point a un temps mort estimé de $137 \pm 18 \mu\text{s}$ et présente comme nouvelles caractéristiques notamment une pression élevée d'utilisation (jusqu'à 400bar), un mélangeur avec un volume de l'ordre du nano litre ((Cherepanov and De Vries 2004) ; {Ballou, 1978 #8}).

2.1.2.3 cyto C, un modèle pour suivre le repliement d'une protéine : mise au point initiale (par freeze-quench & RPE).

La réaction de liaison de l'azide à la metmyoglobine a montré qu'il était possible de bloquer celle-ci sur des temps de l'ordre de la milliseconde et même inférieur. Il a été possible de bloquer cette réaction chimique. Mais que se passe-t-il pour une réaction de repliement d'une protéine, qui implique seulement des fluctuations dynamiques intramoléculaires sans modification résultant de la fixation de ligand ou de l'action de substrat extramoléculaire ? En effet, les techniques conventionnelles de freeze quenching (FQ) rapide sont largement employées pour suivre les mécanismes de catalyse et la réactivité de centres métalliques dans les systèmes biologiques ((Ivancich, Jouve et al. 1997), (Bandarian, Poyner et al. 1999), (Dubois, Caspar et al. 2003)). Aucun exemple n'est décrit dans la littérature de repliement de protéine bloquée dans une conformation transitoire par FQ.

Le cytochrome C, largement étudié, est une protéine modèle dans les études de repliement de protéines. Dans son repliement par le pH, cette protéine hémique va passer par différentes conformations dépendantes du mode de liaison de l'hème à la protéine. Comme il est possible de suivre ce type de changement par RPE, nous avons choisi cette protéine comme modèle pour suivre le repliement par FQ/RPE. Nous avons testé à l'équilibre la variation de signal à la fois par absorbance et par RPE en fonction du pH.

Ci-dessous sont décrites très brièvement les caractéristiques de repliement du cyto C, ainsi que les résultats préliminaire sur cette protéine utilisée comme modèle pour suivre le repliement par FQ/RPE.

Description du modèle.

Le cytochrome c de cœur de cheval est l'une des protéines pour laquelle le chemin de repliement a été élucidé avec le plus de détails ((Bai, Sosnick et al. 1995), (Yeh and Rousseau 1999)). C'est une petite protéine à un domaine de 104 acides aminés, et qui présente un cœur hydrophobe avec une groupe héminique covalamment attaché à la cystéine 14 et la cystéine 17. L'atome métallique au centre de l'hème a deux ligands : l'His 18 et la Met 80. Le dépliement du cytochrome c (cyto C) déstabilise la coordination de la Met 80. La liaison avec l'histidine 18, d'autre part, reste intact dans des conditions modérées de dépliement cela étant dû à la liaison thioether proche de l'hème. Les études cinétiques ont montré que le repliement du cyto C à pH neutre est complexe et hétérogène ((Elove, Bhuyan et al. 1994), (schéma 4)). Une phase non résolue a été observée durant les deux premières millisecondes et est suivie par une phase cinétique rapide de 80 s⁻¹ accompagnée par une phase lente de 1.8 s⁻¹. L'hétérogénéité du repliement du cyto C est partiellement attribué à la liaison non native d'histidine (His 26 et/ou His 33) à l'hème, ainsi la phase cinétique lente peut être diminuée notamment en baissant le pH, ce qui semble protoner les His 26 et/ou His 33 ((Bai, Sosnick et al. 1995)) ((Elove, Bhuyan et al. 1994)). A pH neutre et à pH élevé, le mauvais repliement dû à la coordination de l'histidine 33 ((Colon, Wakem et al. 1997)) à l'hème résulte en une réaction lente de repliement qui implique une population hétérogène. Par contre, dans des conditions défavorisant la coordination de l'His 33 (pH < 5) la structure native est atteinte en quelques millisecondes. Il est ainsi évident que des états mal coordonnées jouent un rôle critique dans les dynamiques de repliement du cyto C, et cela reste un dilemme de comprendre exactement comment ils interfèrent avec la formation de la structure native. (Voir également l'introduction de (DeWeerd, Grigoryants et al. 2001) pour les caractéristiques main principales du processus de repliement du cyto C.)

Résultats préliminaires

Les résultats ci-dessous concernent les primo-résultats permettant de mettre au point cette approche. Les expériences proprement dites de freeze duench n'ont pas encore été effectuées.

Pour cette étude, il était nécessaire de trouver dans un premier temps des conditions à l'équilibre permettant de passer par un intermédiaire. L'objectif étant par la suite de caractériser cet intermédiaire cinétique et de l'identifier par freeze quenching pour faire la preuve du concept selon lequel il est possible de suivre le processus de repliement par freeze quenching.

Comme il a été expliqué ci-dessus, différents états de coordination de l'hème sont observés lors du repliement du cyto C. Il est possible de suivre ce phénomène en diluant une solution de cyto C de 4.4 M de Gdn-HCl (pH4.7) à 0.7M. Lors de ce changement de concentration la

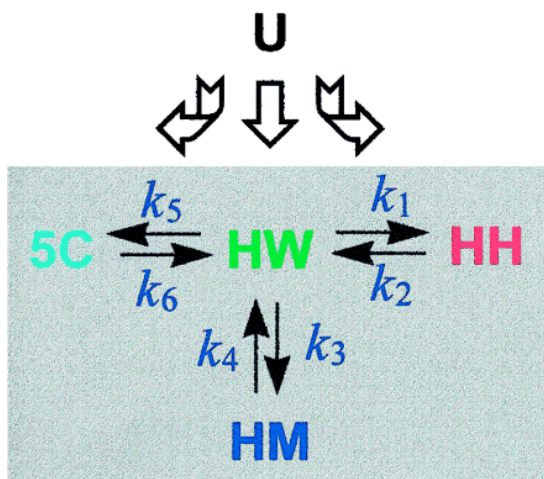


Schéma 0 : chemin productif et non productif du repliement du cytc.

Le chemin de repliement productif du cytochrome c passe par un intermédiaire HW obligatoire dans lequel l'hème est coordonné par une molécule d'eau du solvant et par un ligand natif, l'His 18, avant la formation de la forme repliée HM avec les coordinations native à l'hème des His 18 et 80.

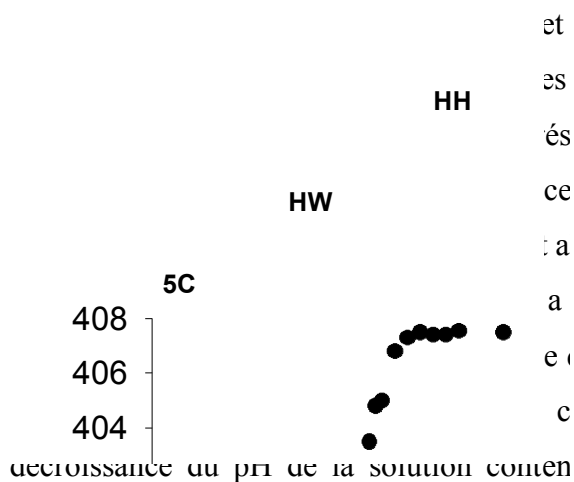
Deux intermédiaires qui ne sont pas sur le chemin de repliement, un état coordonné 5 fois (5C) et un état bis-histidine (HH), ont été également identifiés au cours de la réaction de repliement. ((Yeh and Rousseau 1999))

dilution du dénaturant induit le repliement du cyto C ((Takahashi, Yeh et al. 1997)). Pour obtenir des informations qualitatives et quantitatives par FQ RPE sur les différents états de coordination hème-ligand, il a été nécessaire de mesurer le spectre RPE de ces différentes formes à l'équilibre. Takahashi et al ont décrit une variation du spectre optique du cyto C déplié en présence de 4.4M Gdn-HCl qui présente deux transitions induites par le pH pour des pKa de l'ordre de 5.2 et 3.6 ((Takahashi, Yeh et al. 1997), (Colon, Wakem et al. 1997)).

Les auteurs, en utilisant les résonances Raman à l'équilibre dans ces conditions ont pu attribuer ces deux transitions à la conversion des différentes formes de coordinations (schéma 4) observée lors des cinétiques. A haut pH la forme dominante a été attribuée à la forme coordonnée à deux histidines (HH). Pour la forme HH, les deux ligands à l'hème sont l'His 18 native qui reste intacte au cours du dépliement du fait de la liaison thioether proche de l'hème, et une mauvaise liaison de l'histidine 26 ou de l'histidine 33. Une espèce haut spin hexacoordinée, dominante à pH intermédiaire, est assignée à la forme eau-Histidine avec comme ligands axiaux l'eau et l'His 18 (HW). L'espèce dominante à bas pH a 5 coordinations

haut spin (5C) avec seulement un seul

ligand axial, l'His 18. La forme native



et
es
és
Figure 4 : Observation à l'équilibre de deux transitions induites par le pH pour le déplacement de l'absorbance maximum de la bande de Soret de la forme dénaturée du cyto C (4.4 M de GuHCl).

ce A ces deux transitions, sont attribués trois états, 5C, HW et HH qui sont respectivement coordonnées : 5 fois, 2 fois
la (eau et histidine), et 2 fois (à 2 histidines). La
a concentration de cyto C est de 5µM. Le pH a été ajusté
e en ajoutant quelques microlitres d'HCl et en mélangeant
c les formes acides et basiques du tampon phosphate. Les expériences ont été effectuées à 20°C, 50mM phosphate.

l'augmentation du pH de la solution conten

conduit à un déplacement du maximum de la bande d'absorption de Soret de 407 nm à 398 nm, ce qui est cohérent avec la perte du ligand à champ fort couplée avec la protonation des azotes des chaînes latérales ((Colon, Wakem et al. 1997)). Le maximum de l'absorbance de la bande de Soret (lambda max) a été reportée sur le graphique en fonction du pH pour obtenir la courbe ajustée à une analyse non linéaire au moindre carrés par l'équation : $\lambda_{max}(pH) = [\lambda_{max}(pH 7) - \lambda_{max}(pH 4)] / [10 \exp n(pH-pK_a) + 1] + \lambda_{max}(pH 4)$ où n est le nombre de protons impliqués dans la transition (n = 1.4 in ref ((Colon, Wakem et al. 1997))) et pKa est le pH au milieu de la transition. Idem pour la transition entre pH 2 et 4.

La figure 25 présente les spectres RPE obtenus à l'équilibre pour ces différentes espèces. HH, HW, 5C ont des signatures différentes, et la contribution de chaque espèce pourra être identifiée individuellement sur les spectres obtenus par FQ - RPE dans des mesures cinétiques.

Ces résultats sont les pré-requis en amont d'une étude démontrant les potentialités du FQ EPR pour l'étude de repliement de protéines.

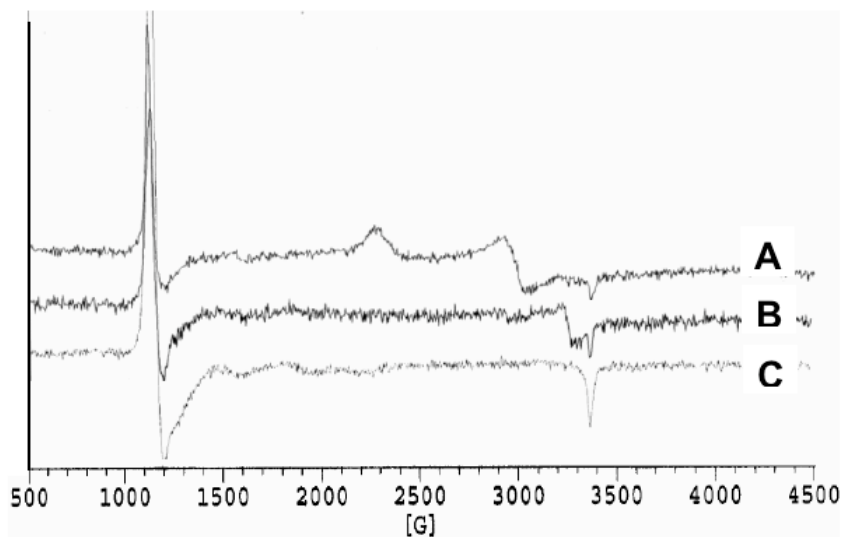


Figure 4 : spectre RPE du cyto C dénaturée (4.4M GdNCl) en fonction du pH, 50mM phosphate.
A : pH6.5, forme HH ; B : pH 4.7, forme HW ; C : pH 2.5 forme 5C. Voir texte pour les détails.

2.1.3 Résultats de Stopped-flow ultra-rapide.

Mise au point et caractérisation du temps mort.

Comme cela a été développé dans l'introduction de ce chapitre, les appareils de stopped-flow communs ont un temps mort de l'ordre de la milliseconde en mode fluorescence et un temps mort de l'ordre de 5 ms en mode dichroïsme circulaire (DC). Des mélanges plus rapides, qui permettent une diminution de ce temps mort, nécessitent de plus fortes turbulences dans la chambre de mélange. En diminuant la longueur des tubes et en augmentant la vitesse du flux, il est possible de diminuer le temps mort.

Dans cette optique, Regenfuss et al ((Regenfuss and Clegg 1987)), puis Shastry et al. ((Shastry, Luck et al. 1998)), ont utilisé des mélangeurs dits « balls mixers » qui réduisent le temps de mélange. Cela consiste en une bille de très petite taille placée au niveau du mélangeur qui induit un mélange intense provoqué par le liquide affluent sur la sphère.

Materiel et methodes :

Les mesures ont été effectuées en utilisant un appareil SFM 400 (BioLogic, Claix, France) équipé d'une microcuve de trajet optique de 0.8mm avec un volume de l'ordre du microlitre. Une tête d'observation et un mélangeur spécifique à cette cuve ont été utilisés. L'excitation a été fixée à 288 nm ou 225 nm pour les expériences en mode fluorescence et dichroïsme circulaire respectivement. Un filtre optique à 305nm en mode fluorescence permettait d'éliminer la lumière d'excitation diffusée. L'efficacité du mélange et du temps mort ont été mesurées en utilisant la réaction bi-moléculaire d'extinction de fluorescence du NATA par le NBS.

La réaction a été mesurée en utilisant 10mM de tampon phosphate de sodium, pH 7 à 20°C. La concentration finale de NATA était 5µM et les cinétiques ont été mesurées pour des concentrations de NBS de 0 à 10mM.

Différentes concentrations d'urée et différentes conditions de flux et de mélange ont été testées pour déterminer les conditions limites de bon fonctionnement du stopped-flow.

Les tracés cinétiques ont été ajustés à une équation monoexponentiel avec le logiciel fournit par BioLogic. Le temps mort de l'appareil a été déterminé en portant sur un graphique le rapport des vitesses en fonction du logarithme des amplitudes relatives, comme précisé dans l'équation (1) où t_0 est le temps mort et k la constante de vitesse apparente. La variation de l'intensité de fluorescence entre les conditions initiales et finales de la réaction correspond à la valeur de ΔF_{Tot} . ΔF_{Obs} correspond à la variation de fluorescence observé lorsque la cinétique de la réaction est déclenché par stopped flow.

$$\ln(\Delta F_{Tot} / \Delta F_{Obs}) = t_0 \cdot k \quad (1)$$

Les expériences de stopped-flow en mode CD ont été mises au point avec le même appareil en utilisant les mêmes réglages. Un système ajustable a été utilisé pour permettre les corrections du signal dues à des contraintes appliquées sur les parois en quartz de la cuve. Le contrôle de ces réglages a été effectué avec du glucuronolactone, ceci afin de calibrer le signal CD. Le bon réglage de l'appareil est finalement vérifié en suivant le repliement du Lysozyme 50 μ M, pH5.5, 25mM phosphate, par un saut de GuHCl de 8 à 0.8M.

Résultats et discussion :

Ici, le stopped-flow utilise un mélangeur basé sur la technologie « ball mixer » qui permet d'obtenir des mélange turbulent et cela dans les conditions les plus stringentes. Cela permet de travailler dans des conditions de haute dilution (jusqu'à 1 : 100), de flux élevé (de 1 à 20 mL/s), et de mélanger des solutions très visqueuses contre de l'eau (>2000 centipoises ou 2 pascal.sec) Ce qui est également important, c'est de jouer sur la distance entre le mélangeur et la cuvette d'observation : cette distance induit un délai durant lequel la réaction qui a été provoquée ne peut être suivie. La microcuve utilisée ici a un volume variant de 1 à 5 μ L selon le point d'observation. Les expériences suivantes ont été effectuées au niveau de la position médiane pour 4 μ L. Le trajet optique de la cuvette est de 0.8 mm ; 3 fenêtres d'observation permettent de l'utiliser en dichroïsme circulaire et/ou en fluorescence (voir figure 27). Pour effectuer les mesures de fluorescence et de dichroïsme circulaire, nous avons utilisé l'appareil MOS 450 (BioLogic) présenté figure 28.

Avant d'effectuer des mesures de repliement de l'apoMb (voir chapitre suivant), il a été nécessaire de :

- 1– déterminer les conditions limites d'utilisation de la microcuve (conditions de flux limite, effet de la viscosité ...),
- 2 – mesurer le temps mort de l'appareil en mode fluorescence,
- 3 – valider la méthode de calibration et de correction en mode DC, suivre la réaction test de repliement du Lysozyme.

1- Détermination des conditions limites d'utilisation de la microcuve.

Pour tester et déterminer les conditions limites d'utilisation du stopped-flow configuré avec la microcuve μ FC8, différents types de tests ont été effectués en utilisant une réaction cinétique monophasique impliquant le Nacétyl tryptophane amide (NATA) et le N Brommosuccinimide (NBS).

La titrage par fluorescence de ces molécules montre que 1 mol de NBS réagit avec 1 mol de NATA ((Peterman 1979)). Lorsque le NATA dans un tampon phosphate à pH7 à 23°C, avec une force ionique de 0.01M, est mélangé par stopped-flow avec un excès molaire (de l'ordre de 10 fois) dans le même tampon, l'intensité de fluorescence du NATA diminue exponentiellement jusqu'à un niveau zéro d'intensité. La vitesse d'extinction de fluorescence augmente de façon proportionnelle à la concentration de NBS et les cinétiques observées sont strictement de premier ordre.

Cette réaction a été, dans un premier temps, utilisée pour tester les conditions d'utilisation du stopped-flow. Le flux limite appliqué à chaque seringue, la viscosité relative limite des solutions à mélanger, ou encore le volume minimum nécessaire sont autant de paramètres qu'il faut déterminer pour connaître avec précision les conditions pour lesquelles la qualité du mélange est adéquate et reproductible. Une grande reproductibilité des cinétiques mesurées dépend de la qualité de l'arrêt du flux (et donc du début de la mesure de la cinétique) et de la qualité de la stabilité du signal (blocage du flux sans fuite). L'efficacité du mélange est estimée en suivant l'intensité de fluorescence lorsque le liquide s'écoule dans la cellule d'observation avant le stop. Dans notre expérience, le temps de flux avant le stop ("flux continu") est de 10ms (dans la [figure 26](#)). Dans le panneau A, le temps zéro se réfère au temps pour lequel le flux de liquide est arrêté : la période de flux qui précède le stop apparaît donc comme un temps négatif). La [figure 26](#) montre que durant ce temps, l'émission de fluorescence augmente et atteint un plateau après 5 ms, indiquant que le mélange est complet. Dans des conditions stringentes d'utilisation, des mesures stables et reproductibles sont possibles pour un flux maximum de 17mL/sec, et pour un volume minimum de 180µL pour des mélanges de solutions sans variation de viscosité. Pour les mélanges de solutions de viscosité différentes, le flux maximum est de 15mL/s pour un volume min de 200µL. Plus le flux est élevé, plus le temps mort est court. Cependant, les flux de 17 et 15 mL/s sont les limites au delà desquelles le système de blocage de l'arrêt du flux (Hard stop) ne résiste pas à la surpression induite. Cela produit un phénomène de fuite, après quelques dizaines de millisecondes, qui provoque une forte déviation du signal.

2-Détermination du temps mort du nouveau mélangeur conçu avec des volumes réduits.

Le temps mort a été estimé à 400 µs en utilisant la réaction d'extinction de fluorescence du NATA par le NBS, à la fois en mode CD et en mode fluorescence. Les traces cinétiques à

partir du temps zéro sont bien ajustées par une équation mono exponentielle, et extrapolées jusqu'à la valeur initiale de fluorescence de 400 μ s avant le temps zéro.

Le temps mort est déterminé à partir du tracé de $\ln(\Delta F_{\text{Tot}} / \Delta F_{\text{Obs}})$ versus k ((Hiromi 1979)) où ΔF_{Tot} , le changement total de fluorescence, est calculé pour chaque courbe comme la différence entre l'intensité de fluorescence du NATA et l'intensité de fluorescence à la fin des cinétiques ; ΔF_{Obs} est l'amplitude de fluorescence de chaque courbe mesurée à partir du temps 0. Le tracé est linéaire et sa pente donne directement un temps mort de 406 ± 6 μ s pour le mélangeur. Les conditions de tirs, testées à 13 mL/sec, sont compatibles avec les conditions nécessaires pour effectuer des mélanges de solution de viscosité variable (i.e lors de la dilution d'une protéine dépliée dans l'urée).

Bien que le mixer n'offre pas une très grande amélioration en mode fluorescence dans ces conditions, cela permet une amélioration de 10 fois en mode CD puisque les cinétiques de CD peuvent être mesurées avec les mêmes paramètres et la même chambre de mélange, et donc le même temps mort.

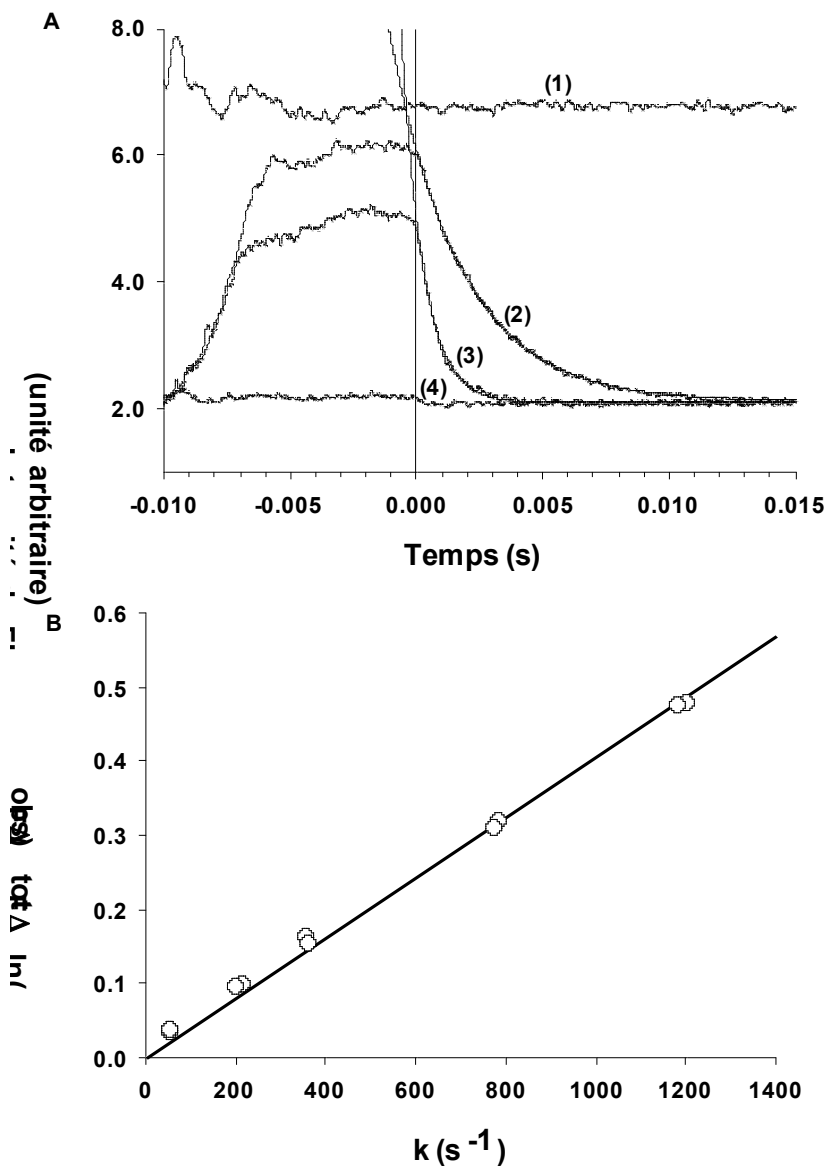


Figure 5 : Tests du stopped-flow submilliseconde.

(A) Réaction bimoléculaire test. La cinétique de la réaction entre le NATA, à une concentration finale de $5\mu\text{M}$, et de NBS à différentes concentrations : 0 mM (courbe 1), 3 mM (courbe 2), 6 mM (courbe 3) et 10mM (courbe 4). Conditions : NATA et NBS sont mélangés dans un rapport 1 : 1, dans 10 mM de tampon phosphate pH7, 20°C . L'excitation était à 295 nm et un filtre à 325 nm a été utilisé pour l'émission. Les courbes 2 et 3 sont ajustés à une équation monoexponentielle.

(B) Tracé de $\ln(\Delta F_{tot}/\Delta F_{obs})$ versus k . ΔF_{tot} représente la différence au temps 0 entre la courbe 1 et la courbe 4 dans la figure 1A. La pente de ce graphique décrit un temps mort de $400\mu\text{s}$.

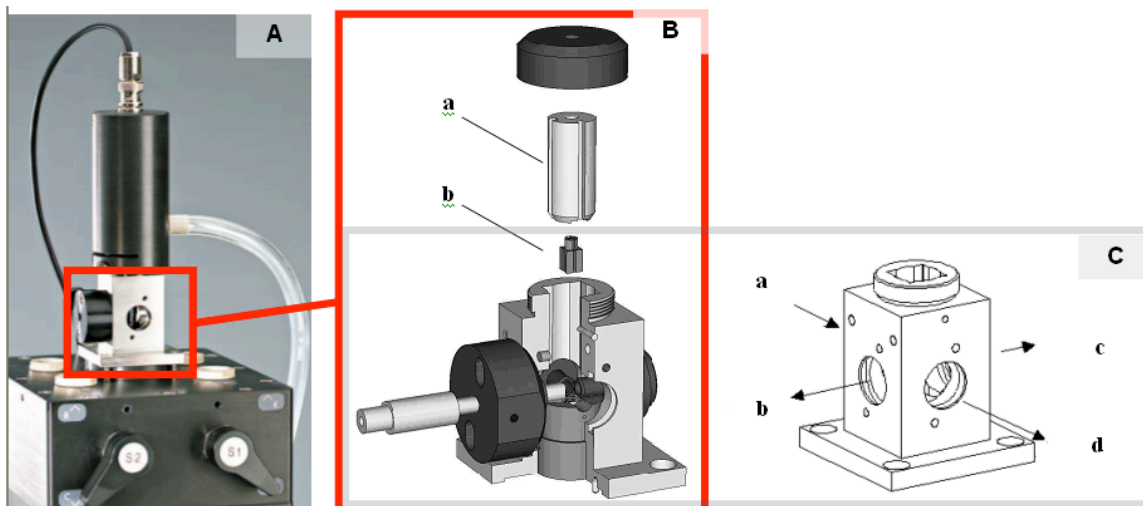


Figure 5 :

A- Appareil de stopped-flow SFM 400 BioLogic. 4 seringues dirigées par des moteurs pas à pas permettent d'effectuer des mélanges complexes. La poussée de chaque seringue est contrôlée indépendamment par les moteurs pas à pas (6400 pas par tour, permettant une sensibilité de 30 à 200 nanolitres par pas effectué, selon la seringue utilisée).

B – Vue éclatée de la tête d'observation. a) porte cuvette, b) cuvette d'observation en quartz, une partie importante dans les appareils de stopped-flow. Les meilleurs temps morts sont obtenus avec la cuvette μ FC8 (voir texte) ; mais son faible trajet optique réduit le signal de dichroïsme circulaire observé. Volume = 1 à 3 μ l selon le point d'observation. Trajet optique : 0.8mm.

C – Tête optique : interface entre le stopped-flow et le spectromètre. Composée de 4 ports optiques pour différentes connections : a) illumination, b) et c) à 90° pour les mesures de la lumière de fluorescence, d'anisotropie de fluorescence ou de diffusion, d) à 180° de la source de lumière pour l'absorbance et les mesures de dichroïsme circulaire. (BioLogic, Claix, France).

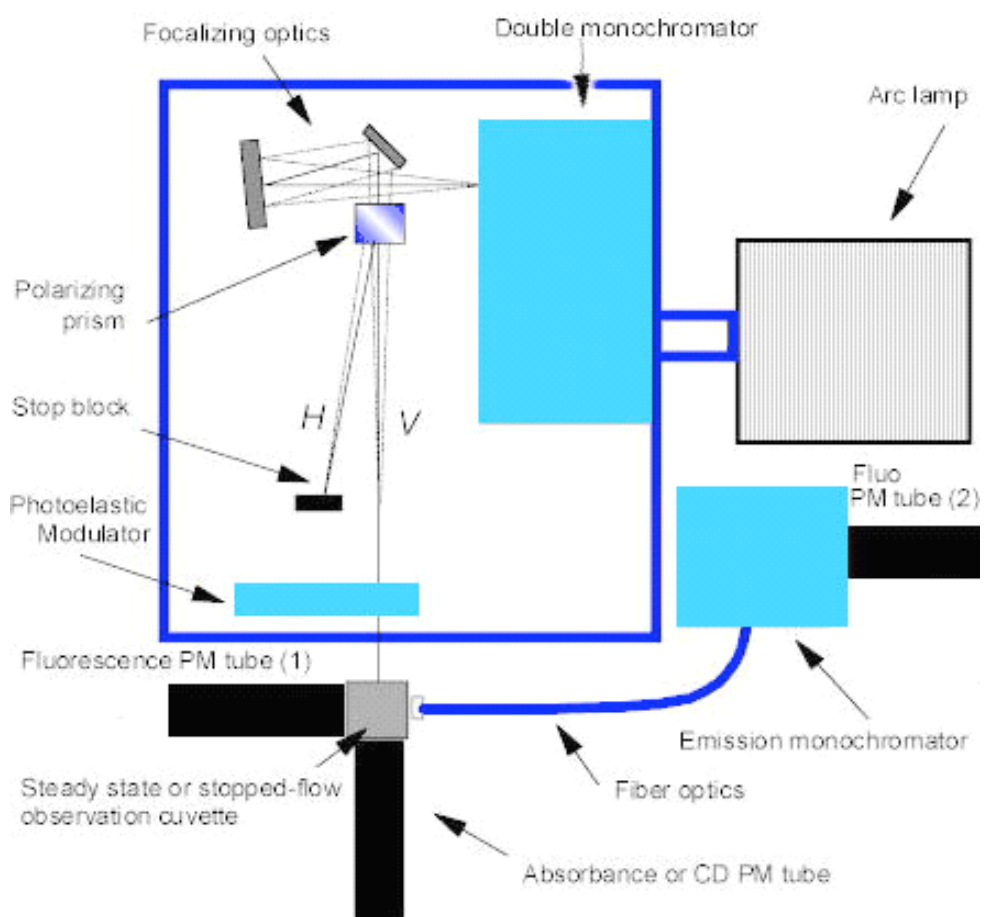
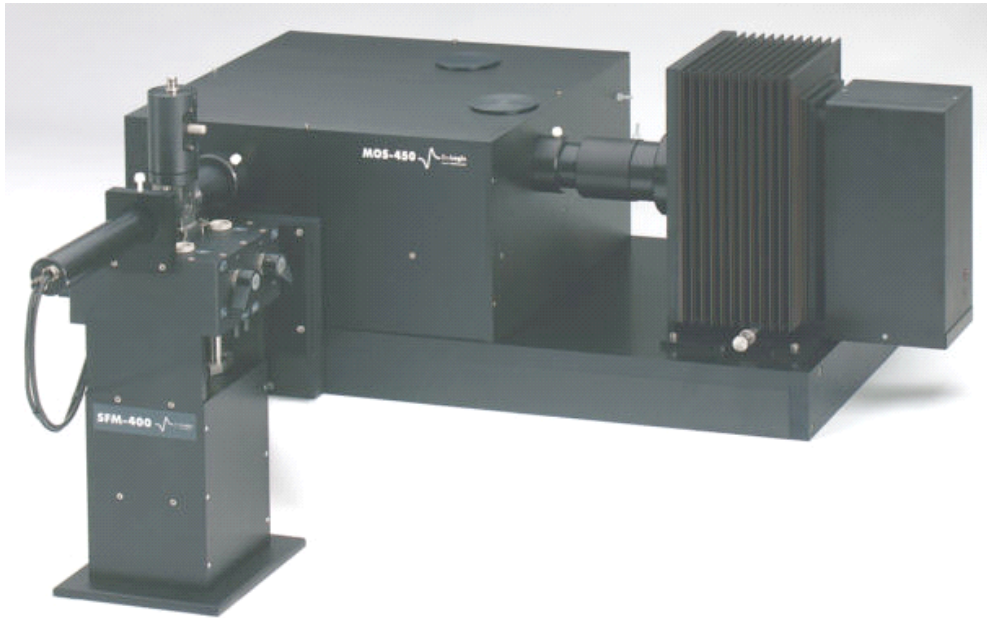


Figure 5 : Appareil spectrométrique MOS 450 et stopped-flow SFM 400 de BioLogic.

Le spectromètre permet d'illuminer la cuve en sélectionnant les longueurs d'onde dans le spectre UV/visible et le mode de polarisation de la lumière. (BioLogic, Claix, France).

3 -Mise au point des mesures cinétiques par dichroïsme circulaire et tests.

L'appareil de stopped-flow doit être calibré avant toute mesure de CD. Le trajet optique, à travers la micro-cuve comprend 0.8mm de trajet optique dans la solution étudiée et 4 mm dans le quartz de la cuve. Lorsque la cuve est placée dans la tête d'observation, elle subit des pressions verticales suffisantes pour entraîner une modification du signal de dichroïsme circulaire (signal de dichroïsme linéaire). Pour corriger cet effet, une lame de quartz est placée sur le trajet optique en amont de la micro cuve et une molette permet d'y exercer une pression horizontale contrecarrant la pression verticale subie par la cuve en induisant un signal de dichroïsme linéaire perpendiculaire. Le signal CD du glucuronolactone est utilisé pour s'assurer de l'efficacité de la correction. Pour une concentration de 2 mg par mL de glucuronolactone, un signal de CD de 100 millidegrés est attendu et vérifie le bon réglage du stopped-flow submilliseconde en mode CD.

La mesure simultanée de spectre de fluorescence avec ceux de CD a été testée en suivant la réaction de repliement du Lysozyme. Le repliement du lysozyme présente des cinétiques biphasiques typiques qu'il est possible de suivre en fluorescence et par CD dans le même temps.

2.2 Utilisation d'un appareil de mélange ultra rapide pour l'Etude des cinétiques de repliement de l'intermédiaire de l'apoMb.

Cinétiques submillisecons coopératives de l'intermédiaire à pH 4 de l'apomyoglobine

2.2.1 Résumé

Pour de petites protéines possédant un domaine, la formation de la conformation native (N) s'effectue généralement lors d'un processus extrêmement coopératif, à partir d'une forme complètement dépliée (U) ou d'une forme intermédiaire partiellement repliée (I). Ce processus peut être décrit par un modèle à deux états. Quoiqu'il en soit, il reste à clarifier quand cette coopérativité intervient durant la réaction de repliement et si les intermédiaires de repliement sont également formés lors d'un processus hautement coopératif. La caractérisation de la formation de ces intermédiaires est difficile parce que les cinétiques de ces étapes précoces sont généralement trop rapides pour être mesurées. Ici, nous montrons que chaque étape précédemment identifiée, conduisant l'apomyoglobine (apoMb) de sa forme dépliée à sa forme native (soit les réactions $U \rightleftharpoons I_a$, $I_a \rightleftharpoons I_b$, et $I_b \rightleftharpoons N$), présente les caractéristiques typiques d'une réaction à deux états. Premièrement, les cinétiques de repliement et de dépliement de la réaction la plus précoce $U \rightleftharpoons I_a$ sont mesurables à pH 4.2 lors de transition de dépliement par l'urée^{1,2}, et nous montrons ici que les cinétiques submilliseconde mesurées par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, une sonde de la structure secondaire, sont similaires à celles mesurées par fluorescence des Trp, une sonde de la structure tertiaire. Ces résultats confirment que le repliement de l'intermédiaire le plus précoce, I_a , s'effectue au cours d'un processus hautement coopératif, durant lequel l'effondrement (collapse) de la chaîne polypeptidique et de la formation de la structure secondaire s'effectuent de façon concomitante. Deuxièmement, les réactions $I_a \rightleftharpoons I_b$ et $I_b \rightleftharpoons N$ sont mesurées durant le repliement de N à un haut pH, à partir de l'ensemble déplié par l'acide (U). Dans ces conditions, la formation de I_a s'effectue durant le temps de mélange du

stopped-flow submilliseconde, et les étapes suivantes montrent des cinétiques similaires par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain et par fluorescence des Trp, ce qui indique que ces deux étapes terminant le processus de repliement de l'apoMb ont lieu lors de réactions à deux états, hautement coopératives.

Ci-après sont retranscrits les résultats résumés ci-dessus, soumis à publication.

Cooperative submillisecond folding kinetics of the pH 4 intermediate of apomyoglobin

Sebastien Weisbuch, Francine Gérard, Marielle Padeloup,

Jérémy Cappadoro, Yves Dupont and Marc Jamin*

[§]Université Joseph Fourier

BMC/DRDC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Marc.Jamin@cea.fr

* Corresponding author

Keywords: Myoglobin, folding kinetics, molten globule, stopped-flow

2.2.2 Introduction

Many small, globular proteins fold by forming partly structured intermediates in the earliest times of their folding process. The mechanisms by which these early intermediates fold from an unfolded ensemble remain poorly understood, essentially because these reactions are too fast to be seen even with the fastest mixers available. With some proteins, including apomyoglobin, similar partially folded forms are observed at equilibrium under partially destabilizing conditions. Equilibrium characterization of these stable intermediates is easier and directly informs on the properties and behaviors of the more relevant kinetic intermediates. However, equilibrium studies provide information neither about the mechanism of the reaction nor about the properties of the transition state. Gaining this information relies on kinetic studies.

Apomyoglobin (apoMb) is particularly interesting to investigate the role of folding intermediates and the mechanism of their formation because this protein populates equilibrium intermediates near pH 4.0 under low salt conditions that resemble kinetic

intermediates observed when the protein refolds to its native conformation at pH 6.0²⁻⁴. In native conditions, all available data indicate that the native form N appears with a rate constant of about 2.5 s⁻¹ at 5°C^{2,3}, but at least two different intermediates have been identified that form on very different time scales along this process. A prominent folding intermediate, named here I_a, forms during the dead-time of the fastest continuous flow mixing devices (< 200 μs)^{2-3,5-7}. I_a has molten globule structural features, and hydrogen/deuterium (H/D) exchange experiments revealed that it contains a structured core formed by the A, H and G helices of Mb as well as by a part of B helix. The central part is more loosely-packed and contains fluctuating D and E helices^{3,5}. A second intermediate, named I_b, forms more slowly with a rate constant of 35 s⁻¹ at 5°C. I_b was first identified by stopped-flow Trp fluorescence (2), but its occurrence was since confirmed by other probes⁵⁻⁷. Both intermediates, I_a and I_b, coexist near pH 4.0, in an equilibrium that depends on pH, the presence or absence of denaturant, and the presence or absence of stabilizing anions (2). Detailed structural characterization of the equilibrium mixture of I_a and I_b by NMR spectroscopy and by H/D exchange experiments reveals a very similar structural organization to that of the dead-time intermediate at pH 6, with a stable and compact A(B)GH core and a central part containing fluctuating native and non-native helices⁹⁻¹⁰.

Although at pH 6 the formation of I_a is too fast to be seen, it was shown recently that folding and unfolding kinetics of I_a can be measured by stopped-flow Trp fluorescence within its urea-induced unfolding transition at pH 4.2^{1,11}. When monitored by Trp fluorescence, refolding and unfolding kinetics of the U[↔]I_a reaction follow exponential time courses of increasing and decreasing fluorescence intensity, respectively, in agreement with equilibrium fluorescence values¹. Unfolding kinetics at pH 4.2, however, deviate from a two-state model because of the presence of I_b and of aggregated forms of I. At pH 4.2, I_b is less stable than I_a and converts into I_a in the presence of moderate concentrations of urea². The unfolding transition observed above 1M urea is that of I_a, but unfolding of I_b in this urea range gives rise to a burst phase in the unfolding kinetics^{1,11}. A second source of deviation from a strict two-state model comes from the presence of multimeric species that give rise to a second slow decreasing phase in unfolding kinetics^{1,11}. Besides these complications, the data are in agreement with predictions for a cooperative two-state U[↔]I_a reaction^{12,13}. The plot of the apparent rate constant for folding, and also of the fast apparent rate constant for unfolding, as a function of urea concentration, exhibits a chevron shape. Even more importantly, the

$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ and m values obtained from the $U \rightleftharpoons I_a$ equilibrium transition are similar to those derived from kinetic data^{1,11}.

Additional evidence confirming that the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction is highly cooperative would be to compare the kinetics monitored by Trp fluorescence and by far-UV CD and to find out whether secondary structure formation is concomitant with protein collapse. To perform this test, we use here a newly designed stopped-flow mixer and microcuvette assembly that operates with a dead-time of 400 μs and monitor the folding and unfolding kinetics of I_a at pH 4.2 both by Trp fluorescence and by far-UV CD at 225 nm. We also extend the test to the other steps of the formation of native apoMb and measure refolding kinetics of N under native conditions by far-UV CD and Trp fluorescence.

2.2.3 Materials and Methods

Urea, glucuronolactone, N-acetyl-tryptophanamide, N-bromo-succinimide and lysozyme were purchased from Sigma. Concentration of urea solutions was determined from refractive index measurements⁴⁸. All experiments were performed in 2 mM citrate buffer containing 30 mM NaCl.

Protein expression and purification.

Horse myoglobin was purchased from Sigma and apoMb was prepared by acid-acetone precipitation⁴⁹. Sperm whale apoMb was produced by heterologous expression in *Escherichia coli*. The synthetic gene for sperm whale myoglobin⁵⁰ was cloned between NdeI and BamHI sites in a pET17b expression vector (Novagen) of *E. coli*. The sequence of the cloned gene was verified by DNA sequencing. Protein was expressed in *E. coli* strain BL21 pLysS and purified according to the procedure described by Jennings *et al.*⁵¹. Briefly, freshly transformed *E. coli* cells were grown in LB medium. Production was induced by addition of 1mM IPTG when O.D. at 600 nm reached 0.8. Cells were harvested 4h after induction and were suspended in a lysis buffer (50 mM Tris buffer, 100 mM NaCl, EDTA, pH 8.0). Crude extract was prepared by adding lysozyme and DNase. ApoMb was solubilized from the pellet by iterative extractions with a 0.1% trifluoroacetic solution. Fractions containing apoMb were identified by SDS PAGE and loaded on a radial-compression reversed-phase HPLC column (Delta-Pak C4, 15 μm , Waters) equilibrated in 0.1% TFA - 25% acetonitrile and operating at 12 mL/min. The protein was eluted by a 25 to 60% acetonitrile linear gradient over 30 minutes. Collected fractions containing apoMb were pooled and lyophilized.

Protein solutions were prepared in distilled water, filtered and dialyzed extensively against distilled water before use. Protein concentration was determined by absorbance in 6.0 M GdmCl (20 mM Na phosphate, pH 6.5) as described (52), using $\epsilon_{280\text{ nm}} = 15200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{288\text{ nm}} = 10800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Circular dichroism spectroscopy

Equilibrium folding and unfolding CD experiments were performed with a Jasco J810 spectropolarimeter using a thermostated 1cm quartz cell. Fluorescence spectra were recorded on the same samples with a Jasco FP 6500 fluorimeter (data not shown).

Stopped-flow measurements

Stopped-flow measurements were made by using a SFM-4 stopped-flow instrument (BioLogic, Claix, France). The excitation was set at 225 nm and an optical cut-off filter (50 % transmittance at 305 nm) was used to detect fluorescence emission. The pathlength of the cell was 0.8 mm. Stopped-flow CD experiments at pH 4.2 were performed with the same apparatus using the same observation chamber and settings. A quartz blade was used to allow for corrections of the signal due to constraints of the quartz walls of the observation cell. Control experiments were performed with glucuronolactone to calibrate the CD signal and with lysozyme. Refolding of lysozyme exhibited typical measurable biphasic kinetics with an overshoot of CD signal corresponding to the formation of an intermediate.

Mixing efficiency and dead-time were measured by using the bimolecular quenching of N-acetyl-tryptophanamide (NATA) fluorescence by N-bromo-succinamide (NBS)¹⁴. The reaction was measured in 10mM sodium phosphate pH 7 at 20°C. Final NATA concentration was 5µM, and kinetics were measured for NBS concentrations ranging from 0 to 10mM. Kinetic traces were fitted to a one-exponential equation with the software provided by Bio-Logic. The dead-time of the apparatus was determined from a plot of $\ln(\Delta F_{\text{Tot}} / \Delta F_{\text{Obs}})$ versus k according to equation 1¹⁵, where t_0 is the dead-time and k is the apparent rate constant:

$$\ln(\Delta F_{\text{Tot}} / \Delta F_{\text{Obs}}) = t_0 \cdot k \quad (1)$$

Stopped-flow CD experiments at pH values ranging from 6.0 to 11 were performed at 5°C with a DX.17 MV ASVD stopped-flow instrument from Applied Photophysics. The ellipticity was measured at 225 nm with slit widths set at 2 mm. The unfolded protein at pH 2.2 was diluted in a 1:10 ratio into the refolding buffer. Final protein concentration was 10 µM, and the kinetic traces show averages of 15 individual measurements. Similar data have been obtained with the Bio-Logic SFM-4 stopped-flow instrument equipped with the submillisecond mixer.

Fit to a two-state model

The equilibrium unfolding transition curves have been fitted to equation 2 derived for a two-state model using the procedure described by Santoro & Bolen⁵³:

$$CD = \frac{(CD_U + b_U[\text{urea}]) + (CD_{Ia} + b_{Ia}[\text{urea}]) \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^\circ}{RT} - \frac{m[\text{Urea}]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^\circ}{RT} - \frac{m[\text{Urea}]}{RT}\right)} \quad (2)$$

where CD_U and CD_{I_a} are the CD values at 222 nm of U and I_a , and b_U and b_{I_a} are the slopes of the linear baselines for the variation of the CD signal of U and I_a with urea concentration, respectively.

Equations derived for a two-state $U \rightleftharpoons I_a$ model have also been used for analyzing the curve of $1/\tau$ versus urea molarity. In a two-state model, the relaxation time is given by the sum of the forward and backward rate constants¹²:

$$\frac{1}{\tau} = k_{12} + k_{21} \quad (3)$$

The rate constants for folding (k_{12}) and unfolding (k_{21}) are expressed as functions of urea molarity using the standard relations¹². The apparent rate constant is fitted to the following equation:

$$\frac{1}{\tau} = k_{12(H_2O)} \cdot \exp\left(\frac{m_{12}[Urea]}{RT}\right) + k_{21(H_2O)} \cdot \exp\left(\frac{m_{21}[Urea]}{RT}\right) \quad (4)$$

where $k_{12(H_2O)}$ and $k_{21(H_2O)}$ are the rate constants for folding and unfolding at 0 M urea, respectively, and the coefficients m_{12} and m_{21} describe the linear dependences of these microscopic rates on urea molarity. Folding and unfolding rate constants in the absence of urea are related to the equilibrium standard free-energy change between U and I_a by the following equation:

$$\Delta G_{H_2O}^\circ = -RT \ln\left(\frac{k_{21(H_2O)}}{k_{12(H_2O)}}\right) \quad (5)$$

and kinetic m -values are related to the equilibrium m -value by the following equation:

$$m = m_{12} - m_{21}. \quad (6)$$

Folding and unfolding rate constants in the absence of urea, $k_{12(H_2O)}$ and $k_{21(H_2O)}$, and kinetic m -values, m_{12} and m_{21} , were determined by a combined fit of the equilibrium urea-induced unfolding transition monitored by CD and of the plot of $\ln k$ versus [Urea] (Figures 3 and 4) to equation 2 and 4, respectively, using SIGMAPLOT (Jandel, San Rafael, CA).

Modeling the pH dependence of the rate constants

The rate constants for folding (k_{12}) and unfolding (k_{21}) are expressed as functions of pH by assuming that the proton binding sites are independent, using the following equations:

$$k_{12} = k_{12}^{\text{ref}} \frac{\prod_i [1 + 10(\text{p}K_{\text{ai}}^\ddagger - \text{pH})]}{\prod_i [1 + 10(\text{p}K_{\text{ai}}^U - \text{pH})]} \quad (7)$$

$$k_{21} = k_{21}^{\text{ref}} \frac{\prod_i [1 + 10(\text{p}K_{\text{ai}}^\ddagger - \text{pH})]}{\prod_i [1 + 10(\text{p}K_{\text{ai}}^{I_a} - \text{pH})]} \quad (8)$$

$$K = \frac{k_{21}^{\text{ref}}}{k_{12}^{\text{ref}}} \quad (9)$$

where k_{12}^{ref} and k_{21}^{ref} are the reference rate constants for the $U \rightarrow I_a$ and $I_a \rightarrow U$ reactions at high pH, respectively, K is the folding equilibrium constant at high pH, and the pK_{ai} values refer to residues i in the U , I_a and I^{\ddagger} forms. Simulations were performed with SIGMAPLOT (Jandel, San Rafael, CA).

2.2.4 Results

A submillisecond stopped-flow apparatus

Conventional stopped-flow instruments have dead-times of the order of 1 ms in the fluorescence detection mode and of the order of 5 ms in the circular dichroism (CD) mode. Here, we use a newly designed micro-mixer and micro-cuvette with reduced volumes (Bio-Logic, Claix, France) that operates with a dead-time of about 400 μs in both fluorescence and CD modes. In the fluorescence mode, optimal settings of the instrument bring the dead-time down to 250 μs . These performances were obtained by reducing the mixer and cuvette volumes whereas keeping the solution flow rate as fast as possible. The cuvette has a light path of 0.8 mm and a volume of 4 μL . The maximum flow rate attainable with the SFM-400 system is 18 to 20 mL s^{-1} . However, transient mechanical stress due to pressure changes on the cuvette quartz wall produces a dynamic linear dichroism artifact that prevents measurements in CD mode at such high flow rate values. By using glucuronolactone and measuring the CD signal at 225 nm we found that a maximum flow rate of 10 to 12 mL/s is usable in CD experiments. Static linear dichroism was also observed that originates from the vertical strain exerted by the cuvette mount. This linear dichroism signal was compensated by inserting a quartz blade before the observation cuvette that was set under an adjustable static strain oriented at right angle from that exerted by the flow. The strain on the blade was adjusted by measuring the static CD value of a calibrated solution of glucuronolactone at 225 nm.

The efficiency of mixing and the dead-time of the apparatus are estimated by using a fluorescence quenching reaction between N-acetyl-L-Tryptophanamide (NATA) and sodium bromide¹⁴. Mixing efficiency is estimated by monitoring fluorescence intensity when the liquid flows through the observation cell before the stop (Figure 1A). In our experiment, the

optical signal was recorded during the flow for 10 ms before the stop, and time zero refers to the time at which liquid flow stops. Thus the flowing period preceding the stop appears as negative time. Figure 1A shows that, during this time, fluorescence emission increases and reaches a plateau 5 ms before the stop, indicating that mixing is complete. The kinetic traces from time zero are well fitted by a single exponential equation and extrapolate to the initial fluorescence about 400 μ s before time 0. The dead-time is determined from a plot of $\ln(\Delta F_{\text{Tot}} / \Delta F_{\text{Obs}})$ versus k^{15} , where ΔF_{Tot} , the total fluorescence change, is calculated for each curve as the difference between the fluorescence intensity of NATA and the fluorescence intensity at the end of the kinetics, and ΔF_{Obs} is the fluorescence amplitude of each kinetic curve measured from time 0. The plot is linear, and its slope directly yields a dead-time of $406 \pm 6 \mu$ s for the mixer. Whereas in these conditions this mixer provides a two times improvement of the dead-time in fluorescence mode, as compared with classical mixer and cuvette, it provides a ten times improvement in CD mode since CD kinetics can be measured with the same mixing chamber and settings and thus with the same dead-time.

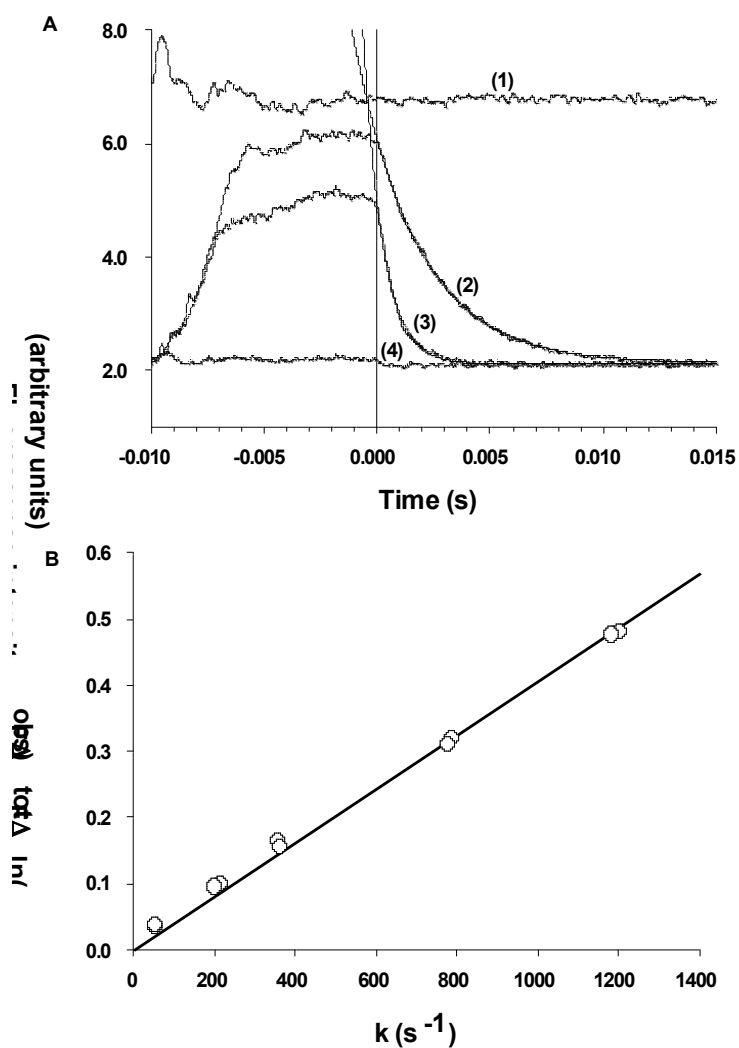


Figure 1. Tests of the submillisecond stopped-flow.

(A) Bimolecular test reaction. Kinetics of the reaction between NATA at a final concentration at 5 μM and NBS at varying concentration: 0 (curve 1), 3mM (curve 2), 6 mM (curve 3) and 10 mM (curve 4). Conditions: NATA and NBS are mixed in 1:1 ratio in 10 mM phosphate buffer pH 7, 20°C. The excitation was at 295 nm and a cut-off filter at 325 nm was used for the emission. Curves 2 and 3 are fitted with a single exponential equation. **(B)** Plot of $\ln(\Delta F_{tot}/\Delta F_{obs})$ versus k . ΔF_{tot} is the difference at time 0 between curve 1 and curve 4 in Figure 1A. The slope of this graph provides a dead time value of 400 μs .

Folding and unfolding kinetics of Ia at pH 4.2

The refolding and unfolding kinetics of apoMb I_a are measured here inside its urea-induced unfolding transition (above 1M urea) both by Trp fluorescence and by far-UV CD at 225 nm. In the native protein, Trp fluorescence is usually considered as a probe of tertiary structure, but strictly it reports on the burial of Trp residues in a non-polar environment. Upon formation of a folding intermediate from an unfolded ensemble, Trp fluorescence more likely reports on the collapse of the polypeptide chain, leading to the burial of Trp side chains inside the hydrophobic core of the intermediate. Both horse and sperm whale apoMb have two Trp residues located in A helix, and both Trp residues become buried in the A(B)GH core in the folding intermediate. The changes in Trp fluorescence upon formation of I_a are thus used here as a probe of chain collapse, whereas changes in far-UV CD are used as a probe of secondary structure formation.

Figure 2 shows typical folding and unfolding kinetics for horse and sperm whale apomyoglobin. At equilibrium, I_a has a higher fluorescence intensity and a lower ellipticity at 225 nm than U. Accordingly, in refolding kinetics, fluorescence intensity increases and molar ellipticity at 225nm decreases in single exponential time courses (Figure 2 A,B). No significant change occurs during the mixing time, and up to 90% of the reaction is observed. At the same final urea concentration, similar values of the observed rate constant are found for kinetics monitored either by Trp fluorescence or by far-UV CD. In unfolding kinetics, fluorescence intensity decreases and molar ellipticity at 225 nm increases. The same complications are observed here as previously^{1,11}. The burst phase in Trp fluorescence, assigned to the conversion of I_b into I_a, is clearly visible in Figure 2C and E. By far-UV circular dichroism, the signal-to-noise ratio is too small to reveal the presence of a corresponding burst phase. If, however, it occurs during the mixing time, the I_b → I_a reaction involves only a small variation in CD signal, in agreement with observations by Uzawa et al.⁵. With both probes two kinetic phases are measurable. The fast phase observed by Trp fluorescence was previously assigned to the U → I_a reaction, and the slow phase, which is detected as a baseline change on time scale used in Figure 2, to the presence of aggregated species in the initial conditions¹. For the fast phase, similar rate constants are obtained with both probes.

At pH 4.2, horse apoMb is slightly less stable than sperm whale apoMb and it unfolds at lower urea concentrations as shown when equilibrium urea-induced unfolding transitions are monitored by far-UV CD (Figure 3 and Table 1). As previously observed¹, final values in

the kinetic experiments monitored by Trp fluorescence and far-UV CD reproduce the equilibrium unfolding transitions (data not shown). For both horse and sperm whale apoMb, a single chevron plot is obtained when the apparent rate constant for the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction is plotted as a function of urea concentration (Figure 4). Figure 4A shows the data for sperm whale apoMb and Figure 4B shows the data for horse apoMb. For sperm whale apoMb (Figure 4A), the data obtained in this study are in perfect agreement with previous kinetic data obtained by measuring Trp fluorescence with a stopped-flow apparatus operating with a dead-time of 1 ms (small circles in Figure 4A show data taken from Jamin & Baldwin, 1996). The lowest apparent rate constant occurs at a urea concentration close, but not equal to, the equilibrium midpoint². According to the difference in stability between the two proteins, the midpoint of the chevron plot occurs at a lower urea concentration for horse apoMb than for sperm whale apoMb. The rate constants for folding (k_{12}) and unfolding (k_{21}) and their dependences on urea concentration (kinetic m values, m_{12} and m_{21}) have been obtained in a combined fitting procedure of the equilibrium constant and of the apparent rate constant (Table 1). Within the urea-induced transition, horse apoMb folds and unfolds faster than sperm whale apoMb, and the difference in thermodynamic stability is mainly due to an increase of the unfolding rate.

Table 1. Parameters of the urea -induced unfolding transition at pH 4.2

Parameters	Sperm whale	Horse
$k_{12(H_2O)}(s^{-1})$	3900	4500
$k_{21(H_2O)}(s^{-1})$	48	235
m_{12} (cal/mol/M)	- 900	- 900
m_{21} (cal/mol/M)	400	400
$\Delta G_{(H_2O)}$ (equilibrium & kinetic) (cal/mol)	2400	1600
m (equilibrium & kinetic) (cal/mol/M)	- 1300	-1300

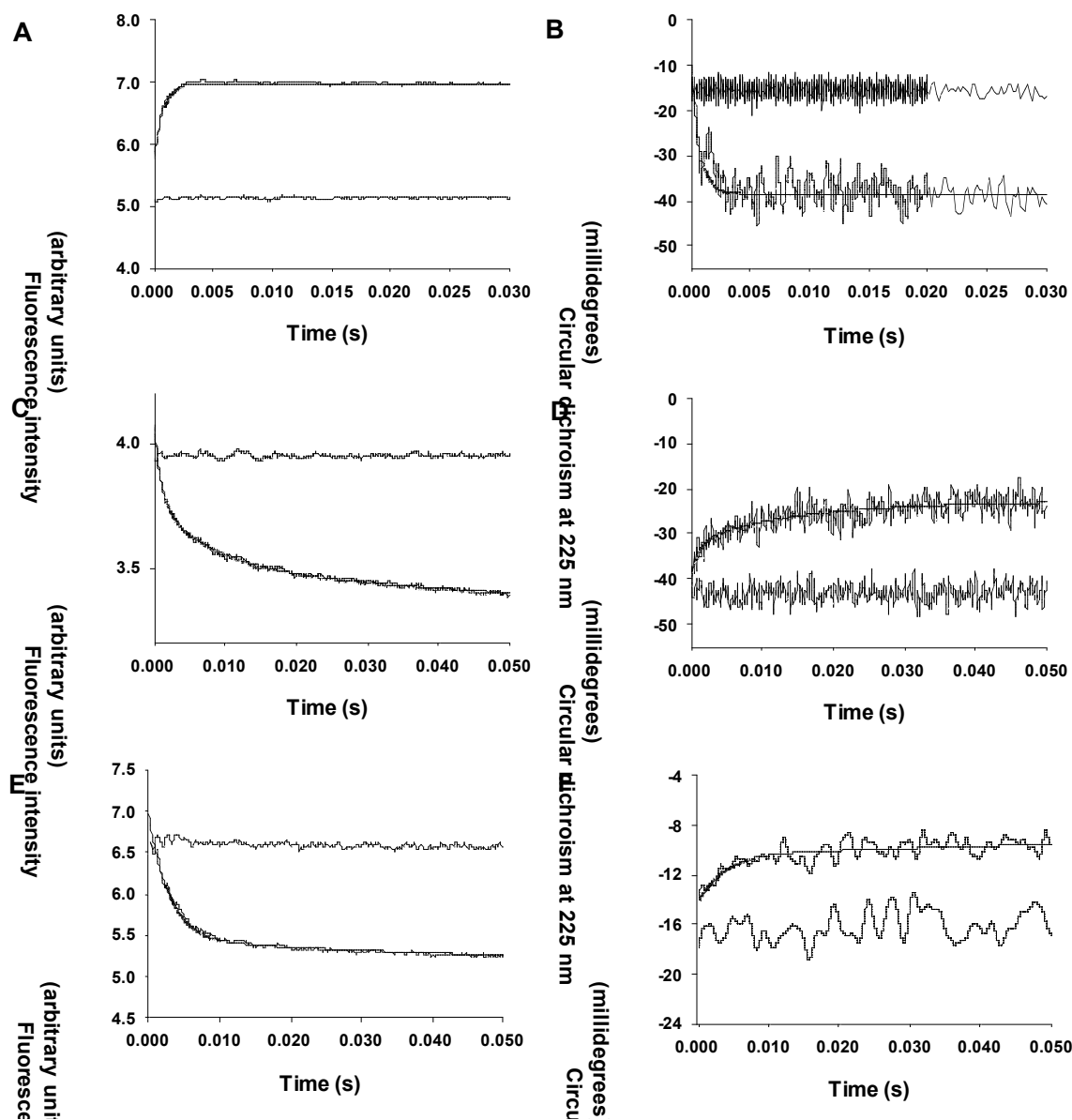


Figure 2. Urea-induced refolding and unfolding kinetics of the pH 4 intermediate measured by Trp fluorescence (A, C, E) and by far-UV CD (B, D, F) for horse (A-D) and sperm whale (E-F) apomyoglobin. The starting material for refolding experiments is U at pH 4.2 in 4M urea and for unfolding it is I at pH 4.2 in 0M urea. The final urea concentration is 1.1M (A,B) or 1.9M urea (C-F). Stopped-flow fluorescence was monitored with an excitation at 225 nm and a cut-off filter at 305 nm for the emission. Stopped-flow CD was monitored at 225 nm. Fluorescence kinetics shows an average of three shots, whereas CD kinetics show averages of about 20 shots. Kinetics are fitted to a single exponential equation for refolding and to a two exponential equation for unfolding. Conditions: 2 mM Na citrate, 30 mM NaCl, pH 4.2, 5°C; final protein concentration is: 50 μ M (A,B), 100 μ M (C,D) or 24 μ M (E,F).

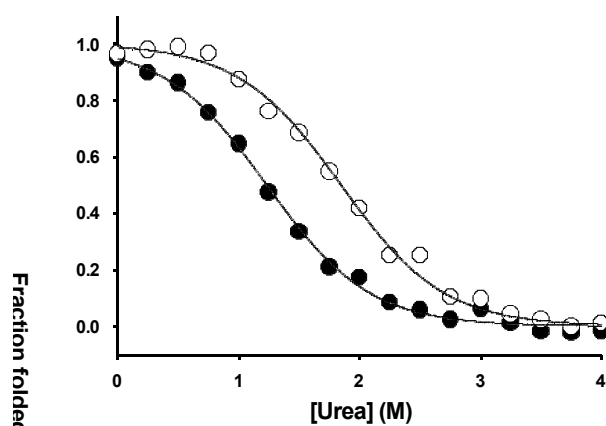


Figure 3. Equilibrium urea-induced unfolding transition for horse (●) and sperm whale (○). Urea-induced unfolding transition was monitored by far-UV CD at 222 nm. The lines are drawn using equation and the parameters shown in Table 1. Conditions: 2 mM Na citrate, 30 mM NaCl, pH 4.2, 5°C; final protein concentration is between 1 and 5 μ M

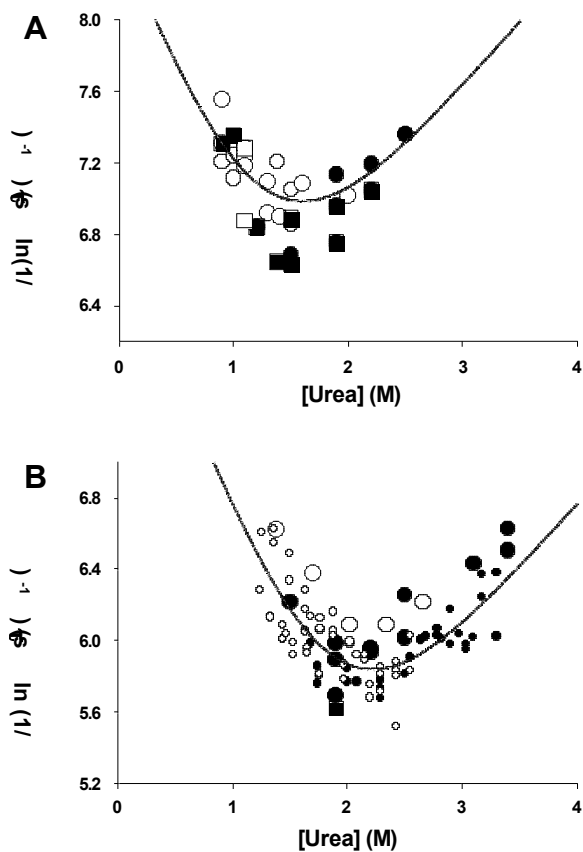


Figure 4. Apparent rate constants ($1/\tau$) versus [Urea] for refolding from 4M urea and for unfolding from 0M urea.

(A) Horse apomyoglobin. (B). Sperm whale apomyoglobin. The open symbols are for the refolding kinetics and the close symbols are for unfolding kinetics. The circles are for kinetics measured by Trp fluorescence and the squares are for kinetics measured by far-UV CD. The small open and closed circles in Figure 4B show data taken from Jamin & Baldwin, 1996 that were measured by stopped-flow fluorescence in identical conditions. The lines are drawn using equation (3) and the parameters shown in Table 1.

Protein concentration dependence of the folding kinetics of Ia

Refolding kinetics for sperm whale apoMb at pH 4.2 were measured by stopped-flow Trp fluorescence at varying final protein concentrations, ranging from 1 to 10 μM (data not shown). A solution of unfolded apoMb in 4M urea was diluted 3 times in a refolding buffer at a final urea concentration of 1.9M. Each kinetic curve could be fitted to a one-exponential equation. The rate constant is similar for each protein concentration and matches that measured, at the same final urea concentration, at higher protein concentrations (Figure 2). The amplitude of the kinetic curves exhibits a linear dependence on protein concentration. These results indicate that, in these conditions, the folding kinetics of the pH 4 intermediate of apoMb are not complicated by an aggregation process

Temperature dependence of the folding kinetics of Ia

Refolding kinetics for sperm whale apoMb at pH 4.2 were measured by stopped-flow Trp fluorescence at two different final urea concentrations and at various temperatures, ranging from 5 to 15°C. Folding kinetics at the same final urea concentration had been obtained previously at 20°C by continuous-flow Trp fluorescence¹¹. Figure 5 shows the Arrhenius plots of these rate constants. Activation energies of 23.6 ± 0.4 kcal/mol and 22.3 ± 1.3 kcal/mol are obtained at final urea concentrations of 1.5M and 1.8M, respectively, indicating that the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction involves a high energy barrier.

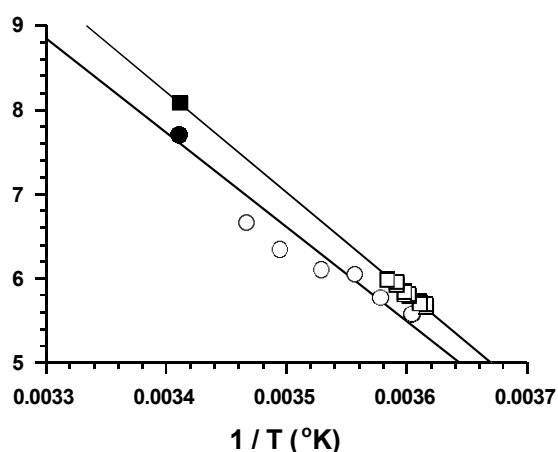


Figure 5. Arrhenius plots for the apparent time constant of the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction for sperm whale apoMb. Refolding kinetics were measured at two different final urea concentrations and at different temperatures by stopped-flow fluorescence: (○) [urea] = 1.5M, (□) [urea] = 1.8M. Kinetics were fitted to a one-exponential equation and the plot shows the logarithm of the apparent rate constant ($1/\tau$) as a function $1/T$. The closed symbols show the apparent rate constant for unfolding obtained at 20°C at the same final urea concentrations, using a continuous-flow fluorescence apparatus (data taken from Jamin et al., 1999 (11)).

Folding of N under native conditions

Refolding kinetics of N, starting from U at pH 2.2, were measured here at various final pH values ranging from pH 6.0 to pH 11.0, both by Trp fluorescence and by far-UV CD at 225nm. At pH 6.0, Trp fluorescence clearly shows a burst phase, corresponding to the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction, and three measurable exponential phases, corresponding to the previously assigned $I_a \rightleftharpoons I_b$, $I_b \rightleftharpoons N$, and $I_{agg} \rightleftharpoons N$ reactions². At higher pH values, similar kinetics are found by Trp fluorescence with similar rate constants for each of the three measurable phases (data not shown). By far-UV CD, a major kinetic phase is detected whose rate constant matches exactly that measured by Trp fluorescence for the $I_b \rightleftharpoons N$ reaction. At pH 6.0, the $I_a \rightleftharpoons I_b$ reaction is not clearly detectable by far-UV CD but, when refolding kinetics are monitored at pH 11.0, a fast phase corresponding to the $I_a \rightleftharpoons I_b$ reaction seen by fluorescence is also apparent in the kinetics monitored by far-UV CD (Figure 6A). The kinetic trace by far-UV CD is better fitted with a two-exponential equation than with a one-exponential equation (Figure 6B-D), and the rate constants for the two phases match those measured by Trp fluorescence. These results suggest that the $I_a \rightleftharpoons I_b$ reaction also gives rise to a change in CD signal, but one which is more difficult to detect because of the lower signal-to-noise ratio in CD than in the fluorescence signal. The slowest phase corresponding to the formation of N from an aggregated fraction of I is also less clearly observed in the kinetics monitored by far-UV CD.

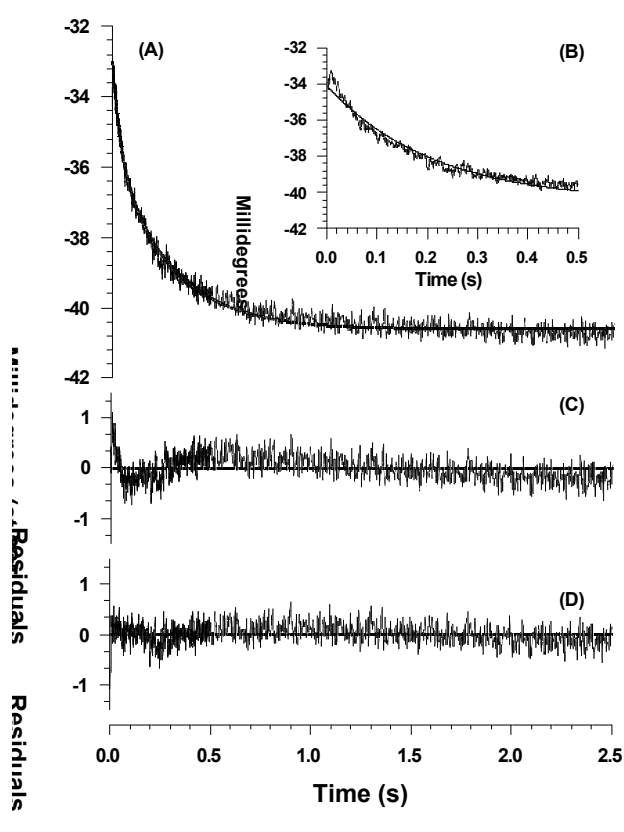


Figure 6. Refolding kinetics at pH 11 measured by far-UV CD.

(A) Refolding kinetics following a pH jump from pH 2.2 to pH 11.0. The line has been drawn by using a two-exponential equation and the following parameters: $A_1 = 2.60 \pm 0.06$ millidegrees, $A_2 = 5.05 \pm 0.03$ millidegrees, $k_1 = 25.0 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 3.55 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ and $CD_{\text{final}} = -40.60 \pm 0.03$ millidegrees. (B) The insert shows the same data with a line fitted to a single exponential equation. (C) Residuals for fitting to a single exponential equation. (D) Residuals for fitting to a two-exponential equation. Conditions: 2 mM Na citrate, 30 mM NaCl, 5°C; final protein concentration is: 10 μM

2.2.4 Discussion

Folding pathway of apoMb

The folding process of apoMb has been extensively characterized in both equilibrium and kinetic studies^{16,17}. Similar intermediates are found both as stable species at equilibrium near pH 4 and as transient species during refolding kinetics at pH 6^{3,4}. Both forms are compact, with a radius of gyration of the order of 23 Å^{5,18}. They contain a hydrophobic core in which both Trp residues are buried and they contain between 45 and 60 % of the helical Mb structure³⁻⁵, but they lack the tight packing of side-chains^{7,19}. However, both equilibrium and kinetic intermediates are heterogeneous in nature and consist of ensembles of conformations. In addition, two different intermediate forms, I_a and I_b, separated by a sizable kinetic barrier, have been identified by Trp fluorescence². With sperm whale apoMb, both forms are observed at equilibrium between pH 3.2 and 4.2, where the kinetics of their conversion are observable in stopped-flow pH jump experiments². I_b is more structured than I_a, and the [I_b]/[I_a] ratio is sensitive to pH, to the presence of urea, and to the presence of stabilizing anions. The conversion of I_a into I_b is also observable by Trp fluorescence during the folding of sperm whale N at pH 6.0 and at higher pH, where it occurs with a rate constant of about 35 s⁻¹ at 5°C². Here, we show that the I_a ↔ I_b reaction is also observed by far-UV CD at pH 11.0 and that, in these conditions, the I_a ↔ I_b reaction exhibits concomitant changes in Trp fluorescence and far-UV CD, indicating that the reaction follows a two-state model.

The existence of a second intermediate was already suggested in the original pulse labeling H/D exchange experiments where residues in the B helix were found to acquire protection against H/D exchange more slowly than those forming the AGH core, but more rapidly than those forming the rest of the protein³. These pulse labeling experiments were performed in the presence of 0.8 M urea, and I_b is sensitive to the presence of urea. In the presence of 0.8 M urea, the relative amplitude of the I_a ↔ I_b reaction in refolding kinetics monitored by Trp fluorescence at pH 6.0 is reduced as compared to that measured in the absence of denaturant (data not shown). More recent H/D exchange experiments confirm the heterogeneous nature of the burst phase intermediate by revealing the presence of labile secondary structures in B helix, at the junction between D and E helices, and inside E helix⁸. In more recent studies, the occurrence of the I_a ↔ I_b reaction in the refolding process of N has been detected by different probes⁵⁻⁷. A kinetic phase with a rate constant similar to that of the I_a ↔ I_b reaction measured by Trp fluorescence was measured when folding of native horse

apoMb was monitored with a submillisecond continuous-flow apparatus by far-UV CD⁵ and by resonance Raman spectroscopy⁶ in pH-jump experiments, starting from U at pH 2. Whereas the $I_a \rightleftharpoons I_b$ reaction was not detected in kinetics monitored by SAXS⁵, pulsed thiol-disulfide exchange experiments, carried out with sperm whale apoMb variants, indicate that side chain packing at the BG interface occurs on the same time scale⁷. These data suggest that formation of I_b involves the strengthening of the helical structure already present in I_a and the incorporation of the B helix in the structured core. This hypothesis is supported by the observations that some of the marginally stable helices present in the intermediate are recruited in the structured core upon single mutation^{20,21} or by addition of a stabilizing anion¹⁹.

Two major arguments point towards a linear $U \rightleftharpoons I_a \rightleftharpoons I_b \rightleftharpoons N$ model where I_a and I_b are compulsory on-pathway intermediates. First, all observed intermediate forms of apoMb contain essentially native-like structure³⁻¹⁰ and can be arranged in a series where structure and compaction are progressively acquired¹⁷. A recent study of pressure denaturation also revealed a similar series²². Second, two kinetic studies provide supporting evidence for the linear model and exclude simple models either where N is formed by parallel fast and slow pathways or where I is a dead-end complex^{2,23}.

ApoMb from two species are commonly used in folding studies, those from sperm whale and horse. They have usually been used in different conditions, and no formal comparison of their folding process has been done. Here, we found that both proteins follow a similar folding mechanism at pH 4.2 and at pH 6.0, even if a more thorough comparison is necessary. At pH 4.2, refolding and unfolding rate constants in the absence of denaturant are higher for horse apoMb than for sperm whale apoMb, and these kinetic parameters are in agreement with the equilibrium experiments and the lower stability of the horse protein.

Cooperativity in apoMb folding process

Cooperativity in proteins arises because stabilizing interactions cooperate to stabilize the structure and provide an overall stabilizing effect larger than the sum of each individual contribution²⁴. Practically, a highly cooperative folding behavior means that no intermediate is detected during a folding/unfolding transition and this transition can be described by a simple two-state model in which the initial and final states are separated by a unique free energy barrier. Although the type of interaction and the mechanism by which stabilizing interactions cooperate remain unknown, native conformations bear hallmarks of highly cooperative structures. Many proteins fold through folding intermediates, which more strictly

consist of ensembles of collapsed and fluctuating conformations. Whether the formation of these intermediates from the unfolded ensemble is highly cooperative or not is still extensively debated. Although polymer chemistry predicts that chain collapse should be a non-cooperative process, proteins are complex heteropolymers, and different results suggest that protein collapse²⁵ and intermediate formation can be highly cooperative.

Because of the similarities between the pH 4 intermediate and the early kinetic intermediate detected at pH 6, the former one has been used to characterize the mechanism of formation of I_a under native conditions. Different tests have been applied for determining whether the formation of apoMb pH 4 intermediate from the unfolded ensemble is highly cooperative. A major test for cooperativity is the calorimetric test: in a two-state process, the enthalpy change measured by calorimetry should be equivalent to the effective van't Hoff enthalpy change calculated from the equilibrium thermal unfolding transition^{12,26}. Although the apoMb pH 4 intermediate exhibits a broad but measurable thermal unfolding transition, no significant enthalpy change is detected either by differential scanning calorimetry upon thermal unfolding²⁷ or by isothermal titration calorimetry at 20°C upon acid unfolding²⁸. The failure of the calorimetric test can result from the presence of more than two species in the mixture²⁹, and, at pH 4.2, apoMb exists in at least two different forms, I_a and I_b, in addition to the unfolded form U (see above). At pH 2.2, where apoMb forms a similar intermediate in the presence of anions, a small but measurable excess of heat is released upon thermal unfolding³⁰.

On the other hand, several other tests, including the kinetic experiments described here, conversely support a highly cooperative mechanism for the formation of I_a. First, urea-induced equilibrium unfolding transitions measured at pH 4.2 by far-UV CD and by Trp fluorescence can be superimposed^{1,31}. Second, the introduction by site-directed mutagenesis of a glycine or of a proline residue in the middle of A or G helix affects the overall stability and the structure of the intermediate³², as expected for a highly cooperative system. Third, a kinetic test, that is more sensitive to the presence of intermediates than equilibrium measurements¹³, has confirmed the two-state behavior of the U \rightleftharpoons I_a reaction above 1M urea^{1,11}. Data reported here reinforce the conclusions from these earlier studies by showing that the collapse of the polypeptide chain and the formation of secondary structure occur concomitantly, in similar single exponential kinetics. In its urea-unfolded form, apoMb is expanded and devoid of almost any secondary structure, and thus formation of I_a at pH 4.2 from the urea-induced unfolded ensemble involves the collapse of the polypeptide chain, the formation of α -helices, and the packing of these helices into the A(B)GH core. These data

confirm that the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction is highly cooperative and that U and I_a are two distinct forms of apoMb, separated by a large free-energy barrier. The large temperature dependence of the apparent rate for refolding of I_a also supports the presence of a large energy barrier separating U and I_a and the two-state character of the reaction. If simple exponential kinetics can be observed with multiple-state systems^{33,34}, the existence of a large free-energy barrier and the observation of similar kinetics by far-UV CD and by Trp fluorescence are more difficult to explain with a gradual model than with a two-state model.

Other recent studies also indicate that protein collapse is barrier-limited, gives rise to single-exponential kinetics, and exhibits Arrhenius temperature dependence. Using a laser T-jump apparatus, Hagen and Eaton monitored the collapse of cytochrome C and found that these kinetics display typical features of a two-state process²⁵ with an activation energy of the order of 28 kJ mol⁻¹. With lysozyme, a prominent folding intermediate is formed during the dead-time of stopped-flow mixers. Application of the superposition test to curves where burst phase changes in Trp fluorescence and in far-UV CD are plotted against final GdmCl concentrations reveals that the collapse of lysozyme is also a cooperative process³⁵. With α -lactalbumin, formation of the A state appears non-cooperative according to various relevant tests³⁶⁻³⁸, but a variant, lacking all 4 disulfide bridges, exhibits a more cooperative behavior as judged by the superposition test of equilibrium unfolding curves^{39,40}. With apoMb, the cooperativity can also be modulated by mutations or by the addition of anions^{32,41}. It has been proposed that cooperativity is linked to stability³², and it is likely that formation of I_a requires a concerted process because a minimal stability must be reached in order to maintain the nascent structure. It should also be noted that, for small proteins, collapse and formation of native secondary and tertiary structures occur concomitantly⁴². Some of these small proteins form their native structure faster than apoMb forms its folding intermediate at pH 4⁴³. ApoMb A(B)GH core corresponds to a subdomain of Mb and could therefore behaves as a small protein except that the final tight packing of side-chain does not occur in this reaction. The question of why native conformation is not reached in this process remains open.

It should also be noted that unfolding kinetics of a low pH form of apoMb, named E, also exhibits features of a cooperative two-state process, since one of the two kinetics phases detected by infrared absorbance (IR) spectroscopy, also gives rise to a change in Trp fluorescence^{44,45}. The second phase seen by IR spectroscopy is not detected by Trp fluorescence.

Why is the formation of I_a so slow at pH 4 ?

Recent studies have been carried out to estimate the upper limit of folding rate. Although it is still debated which theory should be used to predict folding rates, it seems that a consensus between experiments and theoretical predictions for the maximum rate constant attainable for an overall collapse and folding reaction is given by $\frac{1}{\tau} = \frac{10^8}{N} \text{ s}^{-1}$, where N is the number of residues of the protein⁴³. This estimate would set a limit at 670,000 s⁻¹ for apomyoglobin folding reaction. In our studies, the formation of the first stable intermediate, containing secondary structure and hydrophobic packing, occurs much more slowly, with a rate constant of 4000 s⁻¹ at pH 4.2. In a previous study, we proposed that the formation of I_a from U can also be observed by Trp fluorescence in pH jump experiments, and that, at pH below 3.5, this time constant can be as low as 300 s⁻¹¹¹. Above pH 3.5, the reaction becomes too fast to be measured even with our rapid mixing stopped-flow or with a rapid mixing continuous-flow^{5-6,11}. Starting from a cold-denatured unfolded ensemble and using a laser T-jump experiment and Trp fluorescence as a probe, Gruebele and coworkers measured a kinetic phase at pH 6.0 with a time constant of 5 μs (200,000 s⁻¹), which they assigned to the formation of the first intermediate⁴⁶. If we assume that they monitor the formation of I_a, the rate of formation of this intermediate at pH 6 would approach the speed limit for a protein the size of apomyoglobin.

Why would the rate decrease at lower pH? Decreasing the pH reduces the stability of the intermediate, very likely because of the build up of a net positive charge on the protein⁴⁷. Because it is more favorable to have multiple positive charges on an expanded form of the protein (U) than on a compact one (I_a), electrostatic repulsions lead to the progressive destabilization of I_a when the pH is decreased. If the transition state for the U \rightleftharpoons I_a reaction has a compaction level close to that of I_a, it is likely that its stability is also reduced when the pH is decreased, and thus that the time constant for folding increases.

A simple model is used here to predict the pH dependence of the apparent rate constant for the U \rightarrow I_a reaction. The A(B)GH core of apoMb contains 13 acidic groups. If we assume that these groups have model compound pK_a in U (a pK_a = 4.1 is taken as an average between Glu and Asp pK_a values), a lower pK_a in I_a (pK_a = 3.6) because of charge repulsion, and an intermediate pK_a in the transition state closer to that of I_a than to that of U (pK_a = 3.8), and, if we assume that the apparent rate of U \rightarrow I_a reaction at pH 9 is 200,000 s⁻¹ according to Ballew

*et al*⁴⁶, then the model predicts a large increase of the apparent rate constant with pH in fair agreement with available data (Figure 7). Although the choice of pKa values is arbitrary, this simulation provides a rationale for the variation of the rate constant with pH.

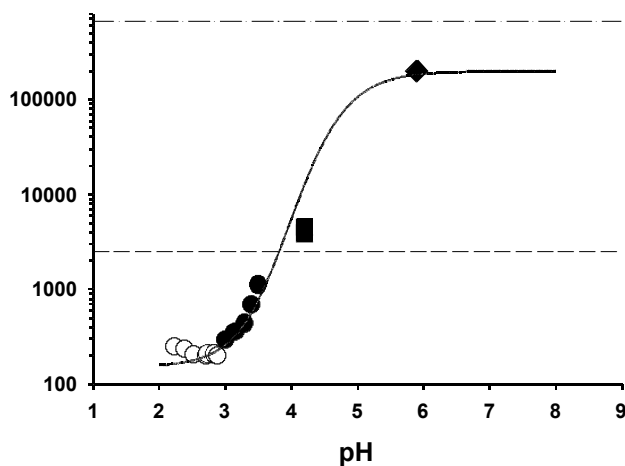


Figure 7. pH dependence of the time constant for the $U \rightleftharpoons Ia$ reaction.

Folding and unfolding kinetics for spermwhale apoMb at 4.5°C were induced by pH-jump, starting from pH 2.2 for refolding or from pH 6.0 for unfolding. The symbols show the apparent rate constant for folding (●) and for unfolding (○). The filled squares (■) show the apparent rate for refolding at pH 4.2 and 4.5°C obtained by extrapolating data within the urea-induced unfolding transition for both spermwhale and horse apoMb. The apparent rate at pH 6.0 (◆) is that measured by Ballew et al.⁴⁶ for horse apoMb at 10°C. The line shows a prediction of the apparent rate constant for the $U \rightleftharpoons Ia$ reaction, calculated using a simple model where acidic groups in the A(B)GH core have model compound pKa values in U and special pKa values in Ia and in the transition state between U and Ia. The reference apparent rate at high pH is set to 200,000 s⁻¹ according to published data⁴⁶.

2.2.6 References

- (1) Jamin M. and Baldwin R. L. (1996). Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. *Nature Struct. Biology*, **3**, 613-618.
- (2) Jamin M. and Baldwin R. L. (1998). Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.*, **276**, 491-504.
- (3) Jennings P. A. and Wright P. E. (1993). Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science*, **262**, 892-896.
- (4) Hughson F. M., Wright P. E. and Baldwin R. L. (1990). Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science*, **249**, 1544-1548.
- (5) Uzawa T., Akiyama S., Kimura T., Takahashi S., Ishimori K., Morishima I. and Fujisawa T. (2004). Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 1171-1176.
- (6) Haruta N. and Kitagawa T. (2002). Time-resolved UV resonance Raman investigation of protein folding using a rapid mixer: characterization of kinetic folding intermediates of apomyoglobin. *Biochemistry*, **41**, 6595-6604.
- (7) Ha J. H. and Loh S. N. (1998). Changes in side chain packing during apomyoglobin folding characterized by pulsed thiol-disulfide exchange. *Nature Struct. Biology*, **5**, 730-737.
- (8) Nishimura C., Dyson H. J. and Wright P. E. (2002). The apomyoglobin folding pathway revisited: structural heterogeneity in the kinetic burst phase intermediate. *J. Mol. Biol.*, **322**, 483-489.
- (9) Eliezer D., Yao J., Dyson H. J. and Wright P. E. (1998). Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. *Nature Struct. Biology*, **5**, 148-155.
- (10) Eliezer D., Chung J., Dyson H. J. and Wright P. E. (2000). Native and non-native secondary structure and dynamics in the pH 4 intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry*, **39**, 2894-2901.
- (11) Jamin M., Yeh S. R., Rousseau D. L. and Baldwin R. L. (1999). Submillisecond unfolding kinetics of apomyoglobin and its pH 4 intermediate. *J. Mol. Biol.*, **292**, 731-740.
- (12) Tanford C. (1970). Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Prot. Chem.*, **24**, 2-95.
- (13) Jackson S. E. and Fersht A. R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry*, **30**, 10428-10435.
- (14) Peterman B. F. (1979). Measurement of the dead time of a fluorescence stopped-flow instrument. *Anal. Biochem.*, **93**, 442-444.

- (15) Hiromi K. (1979). *Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory & Practice*. John Wiley & Sons, New York.
- (16) Wright P. E. and Baldwin R. L. (2000). Case study 1: The folding process of apomyoglobin. In *Mechanisms of protein folding* (Pain R. H. ed.), pp. 309-329, Oxford University Press, Oxford, UK.
- (17) Jamin M. (2004). Apomyoglobin folding process. *Prot. Peptide. Lett.* (in press)
- (18) Kataoka M., Nishii I., Fujisawa T., Ueki T., Tokunaga F. and Goto Y. (1995). Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.*, **249**, 215-228.
- (19) Loh S. N., Kay M. S. and Baldwin R. L. (1995). Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 5446-5450.
- (20) Garcia C., Nishimura C., Cavagnero S., Dyson H. J. and Wright P. E. (2000). Changes in the apomyoglobin folding pathway caused by mutation of the distal histidine residue. *Biochemistry*, **39**, 11227-11237.
- (21) Kiefhaber T. and Baldwin R. L. (1995). Intrinsic stability of individual alpha helices modulates structure and stability of the apomyoglobin molten globule form. *J. Mol. Biol.*, **252**, 122-132.
- (22) Kitahara R., Yamada H., Akasaka K. and Wright P. E. (2002). High pressure NMR reveals that apomyoglobin is an equilibrium mixture from the native to the unfolded. *J. Mol. Biol.*, **320**, 311-319.
- (23) Tsui V., Garcia C., Cavagnero S., Siuzdak G., Dyson H. J. and Wright P. E. (1999). Quench-flow experiments combined with mass spectrometry show apomyoglobin folds through an obligatory intermediate. *Protein. Sci.*, **8**, 45-49.
- (24) Creighton T. E. (1995). Protein folding. An unfolding story. *Curr. Biol.*, **5**, 353-356.
- (25) Hagen S. J. and Eaton W. A. (2000). Two-state expansion and collapse of a polypeptide. *J. Mol. Biol.*, **301**, 1019-1027.
- (26) Privalov P. L. (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **33**, 167-241.
- (27) Griko Y. V. and Privalov P. L. (1994). Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding. *J. Mol. Biol.*, **235**, 1318-1325.
- (28) Jamin M., Antalik M., Loh S. N., Bolen D. W. and Baldwin R. L. (2000). The unfolding enthalpy of the pH 4 molten globule of apomyoglobin measured by isothermal titration calorimetry. *Protein. Sci.*, **9**, 1340-1346.

- (29) Freire E. (1995). Thermodynamics of partly folded intermediates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 141-165.
- (30) Nishii I., Kataoka M., Tokunaga F. and Goto Y. (1994). Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding. *Biochemistry*, **33**, 4903-4909.
- (31) Kay M. S. and Baldwin R. L. (1996). Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate. *Nature Struct. Biology*, **3**, 439-445.
- (32) Luo Y., Kay M. S. and Baldwin R. L. (1997). Cooperativity of folding of the apomyoglobin pH 4 intermediate studied by glycine and proline mutations. *Nature Struct. Biology*, **4**, 925-930.
- (33) Tsong T. Y. and Baldwin R. L. (1972). A sequential model of nucleation-dependent protein folding: kinetic studies of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.*, **63**, 453-469.
- (34) Parker M. J. and Marqusee S. (2000). A statistical appraisal of native state hydrogen exchange data: evidence for a burst phase continuum? *J. Mol. Biol.*, **300**, 1361-1375.
- (35) Bachmann A., Segel D. and Kiefhaber T. (2002). Test for cooperativity in the early kinetic intermediate in lysozyme folding. *Biophys. Chem.*, **96**, 141-151.
- (36) Xie D., Bhakuni V. & Freire, E. (1991). Calorimetric determination of the energetics of the molten globule intermediate in protein folding: apo-alpha-lactalbumin. *Biochemistry*, **30**, 10673-10678.
- (37) Schulman B. A. & Kim, P. S. (1996). Proline scanning mutagenesis of a molten globule reveals non-cooperative formation of a protein's overall topology. *Nature Struct. Biology*, **3**, 682-687.
- (38) Schulman B. A., Kim P. S., Dobson C. M. & Redfield, C. A residue-specific NMR view of the non-cooperative unfolding of a molten globule. (1997). *Nature Struct. Biology*, **4**, 630-634.
- (39) Redfield C., Schulman B. A., Milhollen M. A., Kim P. S. & Dobson C. M. (1999). α -lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds. *Nature Struct. Biology*, **6**, 948-952.
- (40) Luo Y & Baldwin R.L. (1999). The 28-111 disulfide bond constrains the alpha-lactalbumin molten globule and weakens its cooperativity of folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 11283-11287.
- (41) Kay M. S., Ramos C. H. and Baldwin R. L. (1999). Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2007-2012.
- (42) Plaxco K. W., Millett I. S., Segel D. J., Doniach S. and Baker D. (1999). Chain collapse can occur concomitantly with the rate-limiting step in protein folding. *Nature Struct. Biology*, **6**, 554-556

- (43) Kubelka J., Hofrichter J. and Eaton W. A. (2004). The protein folding 'speed limit'. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 76-88.
- (44) Gilmanshin R., Callender R. H. and Dyer R. B. (1998). The core of apomyoglobin E-form folds at the diffusion limit. *Nature Struct. Biology*, **5**, 363-365.
- (45) Gulotta M., Gilmanshin R., Buscher T. C., Callender R. H. and Dyer R. B. (2001). Core formation in apomyoglobin: probing the upper reaches of the folding energy landscape. *Biochemistry*, **40**, 5137-5143.
- (46) Ballew R. M., Sabelko J. and Gruebele M. (1996). Direct observation of fast protein folding: the initial collapse of apomyoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5759-5764.
- (47) Kay M. S. and Baldwin R. L. (1998). Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate. *Biochemistry*, **37**, 7859-7868.
- (48) Pace, C.N., Shirley, B.A. & Thompson, J.A. (1989). Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: a practical approach* (Creighton, T.E., ed.), pp. 311-330, IRL Press, Oxford, UK.
- (49) Fanelli A. R., Antonini E. and Caputo A. (1958). Studies on the structure of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 608-615.
- (50) Springer B. A. and Sligar S. G. (1987). High-level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 8961-8965.
- (51) Jennings P. A., Stone M. J. and Wright P. E. (1995). Overexpression of myoglobin and assignment of its amide, C alpha and C beta resonances. *J. Biomol. NMR*, **6**, 271-276.
- (52) Edelhoch H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**, 1948-1954.
- (53) Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, **27**, 8063-8068.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Buzz Baldwin for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Emergence program (Région Rhône-Alpes)

2.3 Osmolytes et encombrants moléculaires. Effets sur les équilibres et les cinétiques de repliement de l'apomyoglobine et du cytochrome C

Matériel et méthodes

Matériel moléculaire :

L'urée, le TMAO, le sucrose et la sarcosine proviennent de Sigma. Les concentrations d'urée ont été vérifiées à partir de mesure d'indice de réfraction (Pace, C.N., Shirley, B.A. & Thompson, J.A. (1989) in Protein Structure: a practical approach (Creighton, T.E., ed.) IRL Press, Oxford, UK, 311-330)

Toutes les expériences ont été effectuées dans 2 mM de tampon citrate contenant 30mM de NaCl.

La Myoglobine de cheval est fourni par Sigma et l'apoMyoglobine a été préparée par précipitation dans l'acétone glaciale (Springer, B. A., & Sligar, S. G. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 8961-8965.) L'apoMb de cachalot a été préparée par expression hétérologue dans *Escherichia coli*, comme indiqué précédemment (Weisbuch (2004)). Les solutions de protéines ont été préparées dans de l'eau distillée, filtrées et dialysées contre de l'eau distillée avant toute utilisation. Les concentrations de protéines ont été déterminées par absorbance dans 6.0 M de GdmCl (20 mM Na phosphate, pH 6.5) comme décrit précédemment (Edelhoch, H. (1967) Biochemistry 6, 1948-1954) en utilisant $\epsilon_{280\text{ nm}} = 15200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ et $\epsilon_{288\text{ nm}} = 10800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Le cytochrome C provient de la société Sigma Aldrich et a été utilisé sans étapes supplémentaires de purification.

La concentration de la solution de cyto C stock a été déterminée spectrophotométriquement (Babul et Stellwagen, 1972) dans un tampon phosphate 50mM.

Etudes à l'équilibre

Les mesures de Fluorescence et de dichroïsme circulaire ont été effectuées dans des cuves en quartz de 1 centimètre, ou 1 millimètre (pour le dichroïsme circulaire du TMAO 1 M), sur les mêmes échantillons préparés dans la journée. L'ensemble des mesures a été collecté sous forme de spectre, corrigé du spectre du tampon sans protéine (contenant des concentrations variables d'osmolytes, ou d'urée). La concentration de protéine utilisée était typiquement de 1-2 μM (50 μM pour les expériences de CD dans l'UV proche).

Les mesures de fluorescences ont été effectuées sur un spectrofluoromètre FP-6500 de la société Jasco. L'excitation était fixée à 288 nm, chaque spectre était une moyenne de 3 spectres enregistrés entre 280 et 400 nm. La protéine était excitée à 288 nm

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un spectropolarimètre J-810 de la société Jasco. Chaque spectre était une moyenne de 3 spectres enregistrés entre 200 et 250 nm (CD dans l'UV lointain) et 250

et 350 nm (CD dans l'UV proche). Une largeur de bande de 1 nm, avec un temps de réponse de 1s, et une vitesse de scan de 50 à 100 nm/min, ont été utilisées.

Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur un spectrophotomètre U-3010 de la société Hitachi.

Etudes cinétiques

ApoMb

Les mesures cinétiques ont été effectuées sur un appareil MOS 450, couplé à un SFM 400 de la société BioLogic (claix, France) équipée pour des études sub-milliseconde. La longueur d'onde d'excitation était fixé à 225 nm avec un filtre optique (50% de transmittance à 305 nm) pour la fluorescence. Les vitesses apparentes ont été déterminées en utilisant le logiciel BioKine fournit par BioLogic.

La concentration de protéine durant le repliement était de l'ordre de 10 à 20 μ M. Dans toutes les expériences, une cuvette μ FC-08 avec un trajet optique de 0.8mm a été utilisée, le flux total était de 12mL/sec, et le temps mort de l'instrument était de 400 μ s. Pour les expériences de repliement et dépliement entre I et N, des sauts de pH ont été effectués entre pH 4.2 et pH 6 (le sucrose était présent dans le tampon de repliement et de dépliement). Pour les expériences de dépliement et de repliement entre U et I par l'urée : les expériences de repliement de l'apoMb ont été effectué à partir d'apoMb dépliée dans 4.5 M Urée, en présence de concentration variable en sucrose ; les expériences de dépliement ont été effectuées à partir d'apoMb dans 0 M urée, en présence de concentrations variables en sucrose. Les solutions étaient préparées pour effectuer le mélange suivant : 1 volume de protéine pour 5 volumes de tampon de repliement ou dépliement dans des gammes de concentration en urée de 0 à 4.5M final.

Cyto C

L'expérience de repliement correspond à un saut de GdmCl de 4.5 à 0.8M, suivi par fluorescence (excitation 280nm), avec un SFM 400 de la société BioLogic (claix, France). Tampon 50mM phosphate, 20 μ M cyto C.

Analyse des données ajustée à un modèle à 2 ou 3 états

Les courbes de transition à l'équilibre ont été ajustées à l'équation 2, (décrite dans la partie « coopérative submilliseconde folding kinetics of pH 4 intermediate of apoMb »), comme proposé par Santoro et Bolen.

2.3.1 Influence d'osmolyte sur l'apomyoglobine de cheval et de cachalot

Introduction

La myoglobine, l'un des membres les plus représentatifs de la famille des globines a été étudiée intensément (pour une revue récente, voir Wright et Baldwin 2000). Les études de la stabilité et du chemin de repliement de la myoglobine ont été réalisées en utilisant la myoglobine de deux espèces : celle de cheval ((Goto and Fink 1994); (Gilmanshin, Dyer et al. 1997), ...) et celle de cachalot ((Barrick and Baldwin 1993) ; (Jennings and Wright 1993); (Brunori, Vallone et al. 2000); ...). La première est disponible commercialement et la seconde est produite par surexpression chez E. coli à partir d'un gène synthétique ((Springer and Sligar 1987)). Les formes apo de ces deux protéines se replient de manière similaire et les résultats obtenus avec l'une des protéines sont souvent étendus à l'autre protéine, même si aucune comparaison systématique n'a été entreprise.

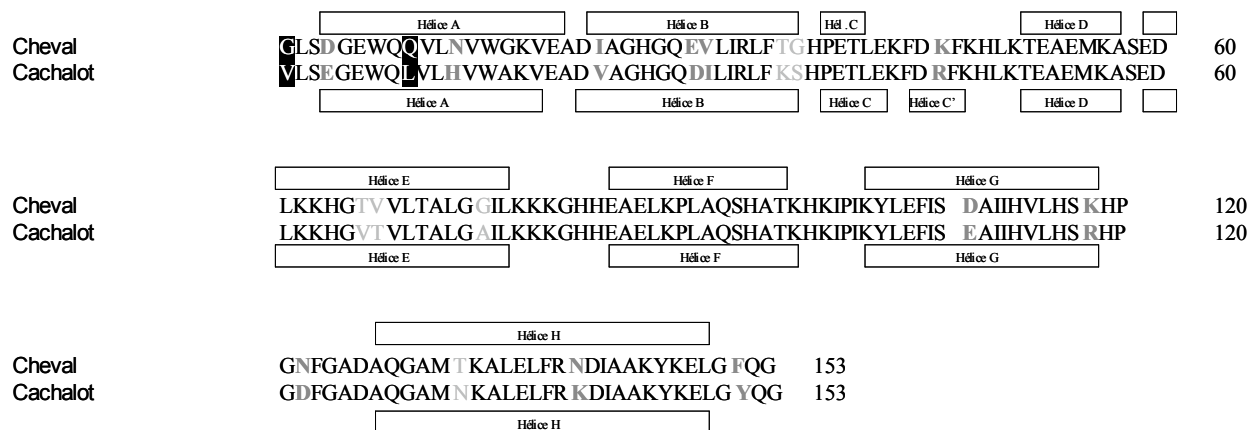


Figure 5 : Alignement de la séquence protéique des apoMyoglobines de Cheval et de Cachalot : analyse de la forte conservation des résidus. Les hélices, représentées à partir de données de RMN et de cristallographie aux rayons X, indiquent un fort degré de similarité structurelle. (entrée PDB : 1SWM pour la Mb de cachalot ; 1AZI pour la Mb de cheval)

WGK	conservation stricte
WGK	substitution conservatrice
WGK	substitution semi -conservatrice
WGK	substitution non conservatrice

Malgré une grande similarité de séquence et de structure (figure 29) , les deux protéines ont une stabilité thermodynamique différente (CIH Ramos, communication personnelle). A pH 6.0, la myoglobine de cachalot est 2 kcal/mol plus stable que celle de cheval.

Les osmolytes sont de petits solutés utilisés par de nombreux organismes extrémophiles (halophiles, thermophiles...) pour maintenir le volume cellulaire. Les osmolytes connus sont des acides aminés et dérivés, des polyols et des sucres, des méthylamines et l'urée. A la différence des ions salins, la plupart sont compatibles avec les macromolécules (i.e. ne perturbent pas les macromolécules). De plus, certains osmolytes stabilisent les macromolécules et s'opposent à l'action de certains dénaturants (par exemple : les méthylamines s'opposent à l'action de l'urée). Les osmolytes stabilisent les formes repliées en augmentant le potentiel chimique des formes dépliées (Timasheff, Galinski, Bolen). Ces propriétés ont permis d'envisager des utilisations en médecine et en biotechnologie, notamment pour « sauver » des protéines mal repliées dans la fibrose kystique et dans les maladies à Prion ((Welch and Brown 1996)). Deux classes d'osmolytes sont reconnues : (1) les osmolytes compatibles (« compatible osmolytes ») pour ceux qui stabilisent les protéines *in vitro* sans perturber de façon significative la fonction ((Wang, Robertson et al. 1995)); (2) les osmolytes s'opposant à l'action destabilisante d'autres molécules (counteracting osmolytes) pour ceux, comme l'oxyde de triméthylamine (TMAO), qui protègent les protéines contre des fortes concentrations d'agents chaotropiques tel que l'urée (Yancey PH 1979 Biochem J. 317-323), (Baskakov, Wang et al. 1998)).

Quasiment toutes les études traitant des effets des osmolytes sur la stabilité des protéines ont démontré que ces agents chimiques favorisent fortement la conformation native ((Yancey, Clark et al. 1982; Arakawa and Timasheff 1985; Timasheff 1993)). Un osmolyte augmente le potentiel chimique d'une protéine par des interactions faibles ((Schellman 1990)). Les interactions non favorables de l'osmolyte avec le squelette peptidique excluent préférentiellement l'osmolyte de l'interface protéine-eau, ce phénomène étant dominant sur toutes les interactions favorables entre l'osmolyte et les chaînes latérales des acides aminés de la protéine ((Liu and Bolen 1995), (Wang and Bolen 1997)). Les osmolytes peuvent aussi induire le repliement de protéines qui, dans d'autres conditions, sont dépliées ((Baskakov, Wang et al. 1998; Uversky, Li et al. 2001)). Ainsi, les osmolytes peuvent non seulement stabiliser les protéines, mais aussi stabiliser celles les plus structurées dans un ensemble de molécules protéiques désordonnées. Le sucrose, ou saccharose, est un hydrate de carbone qui fait partie de ces petits composés sélectionnés par les organismes pour pallier à des conditions extrêmes de solvation. Le sucrose est également bien connu pour être un stabilisateur potentiel des protéines dans leur état natif. Ces caractéristiques ont été attribuées, au départ, à la capacité du sucrose à remplacer ou compléter la couche d'hydratation des protéines

((Carpenter and Crowe 1989)). Plus récemment, les analyses thermodynamiques de Timasheff et al ((Timasheff 1993): (Lin and Timasheff 1996)) suggèrent plutôt que le sucrose augmente la tension à l'interface protéine-solvant et, est ainsi exclu préférentiellement du domaine protéique, ce qui est caractéristique des osmolytes.

Il est surprenant que peu de choses soient connues concernant la possibilité qu'ont les osmolytes d'affecter les événements de repliement pour lequel des intermédiaires faiblement structurés sont progressivement transformés dans des formes structurées et stables. Les osmolytes peuvent, éventuellement, non seulement perturber la transition entre intermédiaires de stabilité différente ((Russo, Rosgen et al. 2003) (Pradeep and Udgaonkar 2004)), mais également perturber l'équilibre entre les différentes éléments structurées faisant partie d'un ensemble de protéines dans un état intermédiaire ((Sridevi, Lakshmikanth et al. 2004)).

L'étude de l'effet de tels osmolytes sur le repliement de protéines est devenue importante. Des études récentes sur des réactions de repliement sub-milliseconde de plusieurs protéines (la barstar ((Shastry and Udgaonkar 1995)), la ribonucléase A ((Houry, Rothwarf et al. 1996), (Houry and Scheraga 1996)), le lysozyme ((Morgan, Miranker et al. 1998)), le cytochrome c et l'apomyoglobine ((Nishimura, Dyson et al. 2002))), suggèrent que ces intermédiaires précoces sont structurellement hétérogènes. Cette hétérogénéité s'est manifestée par 2 ou 3 formes coexistantes ((Shastry and Udgaonkar 1995; Houry, Rothwarf et al. 1996; Houry and Scheraga 1996; Georgescu, Li et al. 1998; Morgan, Miranker et al. 1998; Akiyama, Takahashi et al. 2000; Nishimura, Dyson et al. 2002; Pradeep and Udgaonkar 2002)). Puisque l'hétérogénéité structurelle est attendue comme une conséquence de la possibilité de plusieurs chemins de repliement, ces résultats suggèrent que seulement peu de chemins ((Dill and Chan 1997; Dinner, Sali et al. 2000)) sont disponibles pour le repliement et dépliement, comme cela est montré par les expériences de repliement et dépliement sur plusieurs protéines ((Shastry and Udgaonkar 1995) , (Wright, Lindorff-Larsen et al. 2003)).

Il y a un grand intérêt à déterminer si les chemins de repliement prédominants, en présence d'osmolytes, sont équivalents à ceux observés en leur absence. En effet, cela montrerait que le chemin de repliement utilisé dans la cellule dépend des conditions intracellulaire.

L'action d'osmolytes, notamment celle du sucrose, a été observée dans le cas de l'intermédiaire I des apomyoglobines de cheval et de cachalot. Cet intermédiaire comporte deux formes Ia et Ib qui coexistent à pH4,2. Le comportement thermodynamique de la protéine en présence d'osmolyte est discuté ici. L'utilisation de l'appareil de mélange « stopped-flow » ultra rapide a permis de suivre l'effet de cet osmolyte sur les cinétiques de l'apoMb.

D'autres observations sont rapportés ici, concernant l'influence d'agent d'encombrement moléculaire sur le repliement d'une protéine modèle, le cyt C.

Résultats

Transition de dépliement par l'urée, à l'équilibre, de l'intermédiaire à pH 4.2 de l'apoMyoglobine, en l'absence et en présence d'osmolytes (1M TMAO, 1M sucrose, 1M sarcosine).

La figure 30 compare les transitions de dépliement par l'urée à l'équilibre, de l'intermédiaire I (pH 4.2) de l'apoMb en présence ou absence d'osmolyte. La sonde de structure suivie est la

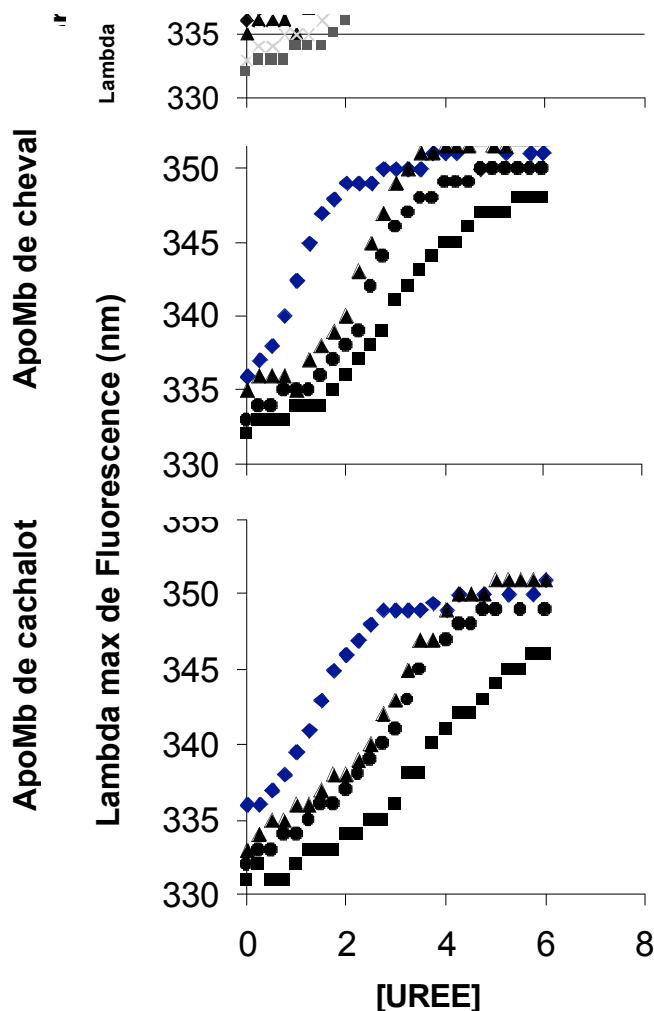


Figure 5

: Expériences de dépliement à l'équilibre ; Dépliement à l'équilibre par l'urée de l'apoMb de cheval (haut) et de cachalot (bas) dans 30mM NaCl, 2mM Citrate, pH 4.2. Le signal est suivi par le lambda max de fluorescence (excitation à 288nm), en absence d'osmolyte (losange \blacklozenge) et en présence de 1M de sarcosine (triangle \blacktriangle), de sucrose (cercle \bullet), et de TMAO (carré \blacksquare).

position du maximum d'émission de fluorescence intrinsèque de la protéine (excitation à 288nm). La figure 30 compare également le comportement de l'apoMb de cheval avec celui de l'apoMb de cachalot. Pour tous les osmolytes (1M sarcosine, 1M sucrose, 1M TMAO), le point de demi-transition de dépliement, C_m , augmente en présence de l'osmolyte. La figure montre que l'effet de l'osmolyte à une concentration de 1 M, sur le dépliement de l'apoMb induit par l'urée, déplace, dans tous les cas, la transition de dépliement vers une concentration

supérieure en dénaturant (i.e. urée). Sur cette base, le TMAO est l'osmolyte qui a l'effet protecteur le plus important, et la sarcosine celui qui a l'effet le moins important. Ces résultats obtenus pour les dépliements par l'urée, en présence d'osmolyte, ont été également suivis par CD, dans l'UV lointain (résultats non présentés), utilisé comme sonde de structure secondaire.

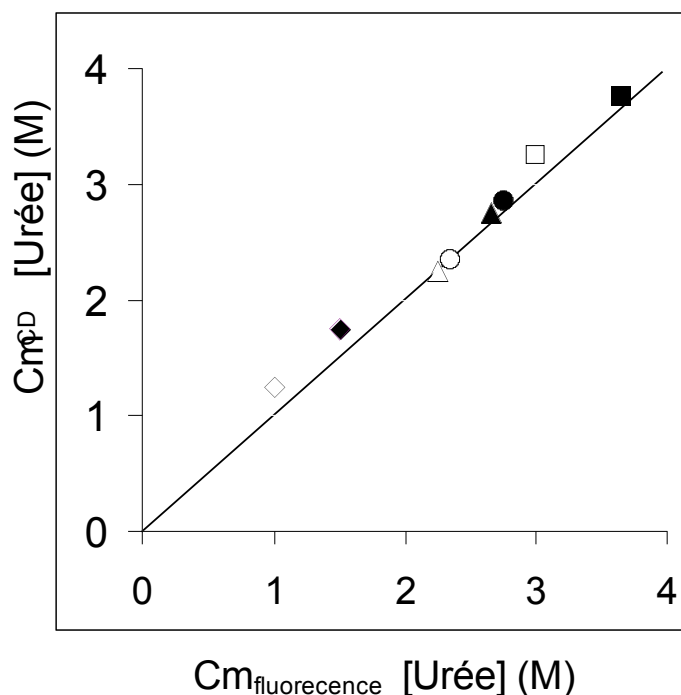


Figure 5

Rapport des valeurs C_m observés par fluorescence et par CD, pour l'apoMb de cheval (symboles vides) et pour l'apoMb de cachalot (symboles pleins). La valeur C_m est déterminé en absence d'osmolyte (losange ◇, ◆) et en présence de 1M : de sarcosine (triangle △, ▲), de sucrose (cercle ○, ●), et de TMAO (carré □, ■).

Les données ont été ajustées à l'équation 2 en supposant que le processus de dépliement obéit à un mécanisme à deux états. En l'absence d'osmolyte, les valeurs obtenues pour l'énergie libre de dépliement, ΔG_{UI} , et pour la sensibilité de cette énergie libre de dépliement à l'urée, m_{UN} , sont similaires aux valeurs rapportées précédemment (figure 3 chapitre « Cooperative submillisecond folding kinetics of the pH 4 intermediate of apomyoglobin. »).

La figure 31 montre le rapport des valeurs C_m obtenus lors de cette analyse. Le rapport des valeurs C_m est obtenu à partir des mesures de CD ($C_{m_{CD}}$) contre les valeurs C_m obtenus à partir des mesures de fluorescence ($C_{m_{Fluorescence}}$). Les points reportés sur la figure 31 s'alignent sur une droite de pente = 1. Cela suggère que les transitions sont coopératives : les deux sondes de structure utilisés se comportent de façon similaires, et la présence d'osmolyte ne modifie pas qualitativement la transition de dépliement induite par l'urée.

La figure 32 présente la superposition des données de fluorescence (λ max) et de dichroïsme circulaire (à 222nm), transformées en fraction molaire. Ces couples de données sont relativement bien ajustés à la courbe calculée pour un modèle à deux états, à partir de l'équation 2. Pour chaque osmolyte, la fraction dépliée f_U , calculée à partir des deux sondes de structure, sont superposables, ce qui indique une perte simultanée de structure tertiaire et

secondaire, et appuie l'hypothèse d'une transition entre deux états, qui est toujours valable même en présence de 1M de chacun des osmolytes (figure 3, chapitre « Cooperative submillisecond folding kinetics of the pH 4 intermediate of apomyoglobin. »). Les figure 31 et 32 montrent également que la différence de stabilité observée précédemment entre l'apoMb de cheval et de cachalot en absence d'osmolyte est conservée en présence d'osmolyte, ce qui indique que, dans ces conditions, les osmolytes ont un effet similaire sur les deux protéines.

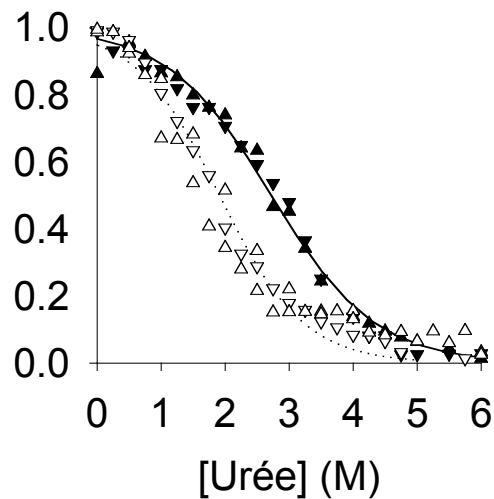


Figure 5 : Expériences de dépliement à l'équilibre montrant la fraction repliée en fonction de la concentration en urée.

Dépliement, à l'équilibre, de l'apoMb de cheval (**symboles vides**) et pour l'apoMb de cachalot (**symboles pleins**) dans 30mM NaCl, 2 mM Citrate, à pH 4.2 en présence de 1M sucrose, suivi par fluorescence (λ_{max} ∇ , \blacktriangledown) et dichroïsme circulaire (à 222nm \triangle , \blacktriangle). Les lignes correspondent à l'ajustement de ces jeux de données pour un modèle de transition à deux états.

Effet du sucrose sur la structure secondaire et tertiaire des formes à pH 2, 4 et 6 des apoMb de cheval et cachalot.

Pour en savoir plus de l'effet des osmolytes sur la structuration de l'apoMb, nous avons étudié l'effet du sucrose sur différents états de la protéine. Nous avons utilisé le CD dans l'UV lointain et proche pour obtenir respectivement des informations sur les structures secondaires et tertiaires, ainsi que la spectroscopie de fluorescence des Trp. Nous avons étudié l'effet du sucrose sur la structure de la forme native à pH 6, sur la forme complètement dépliée à pH 2.2, et sur la forme intermédiaire de type molten globule à pH 4.2 (5°C, 2mM citrate, 30mM NaCl). Pour l'apoMb de cheval, nous avons également étudié l'effet sur la forme holo à pH 6. La [figure 33](#) montre l'effet de 1 et 2 M sucrose sur le spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain pour l'apoMb de cheval ([figure 33 a, b, c, d](#)) et pour celle de cachalot ([figure 33](#)

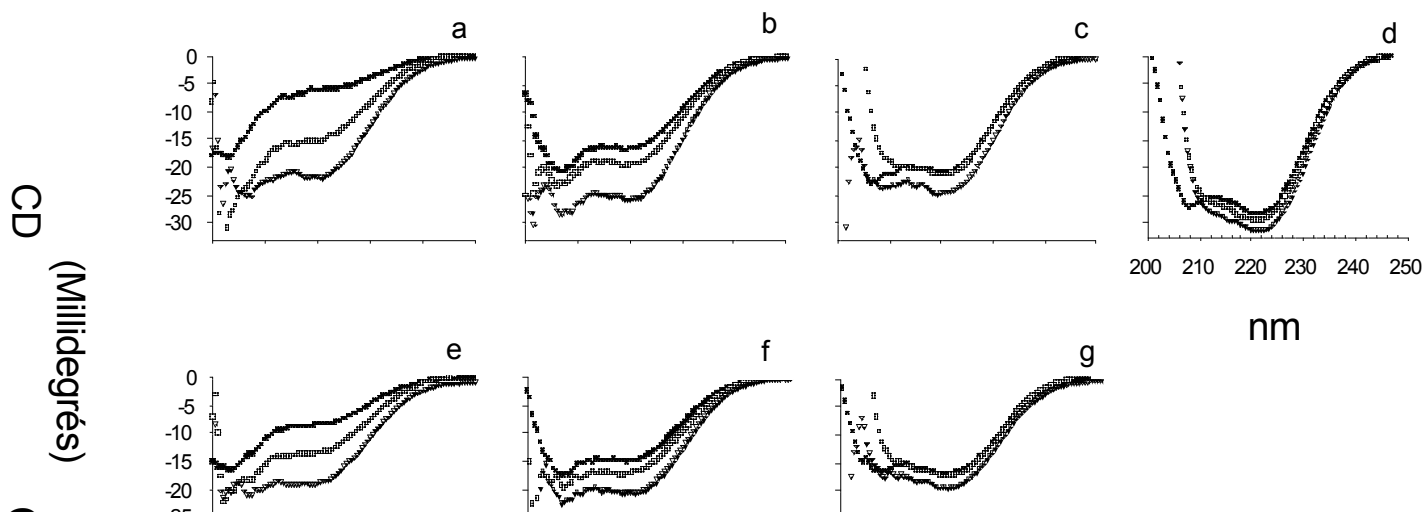


Figure 5 : Variation des spectres de dichroïsme circulaire de Mb (apoMb de cachalot, apoMb et holoMb de cheval) pour différentes concentrations de sucrose (0, 1 et 2 M) et à pH 2.2, 4.2 et 6.

Les graphiques **a,b,c,d**, correspondent aux mesures effectuées sur la Mb de cheval (**a,b,c**, forme apo et **d**, forme holo). Les graphiques **e,f,g** correspondent aux mesures effectuées sur l'apoMb de cachalot. Les différentes conditions de pH correspondent aux graphiques **a,e** pour pH 2.2 (forme partiellement dépliée); **b,f** pour pH 4.2 (forme molten globule à l'équilibre) ; **c, g et d** pour pH 6 (forme native). Les cercles pleins (●), correspondent aux mesures effectuées sans sucrose. Les cercles vides (○), correspondent aux mesures effectuées dans 1M de sucrose. Les triangles (▼), correspondent aux mesures effectuées dans 2M de sucrose. Les conditions sont 1µM apoMb ; pH 2.2, 4.2 et 6 ; 5°C, 2mM citrate, 30mM NaCl.

e, f, g). Les spectres de la forme dépliée par l'acide, à pH 2 (figure 33 a, e) ainsi que la forme intermédiaire à pH 4.2 (b,f) sont très largement modifiés par l'ajout de sucrose. L'ajout du sucrose augmente le signal de dichroïsme circulaire et modifie la forme du spectre à pH 2 qui, pour 1 et 2 M de sucrose, présente des maxima à 208 nm et 222 nm, caractéristique d'une structure riche en hélices α . La forme du spectre à pH 4 et 6 n'est pas modifiée, et restent caractéristiques d'une structure secondaire en hélice alpha. Cependant l'augmentation de signal de dichroïsme circulaire à pH 4, due à la présence de sucrose dépasse la valeur de dichroïsme circulaire de la forme native à pH 6 en absence de sucrose.

Sur la figure 34 sont rapportées les valeurs de CD à 222 nm et de lambda max de fluorescence (excitation à 288nm) mesurées à l'équilibre.

Pour une concentration de 2 M en sucrose, la protéine à pH 2 et à pH 4 (correspondant respectivement aux formes dénaturées par l'acide et à I₁ en absence de sucrose) acquière un

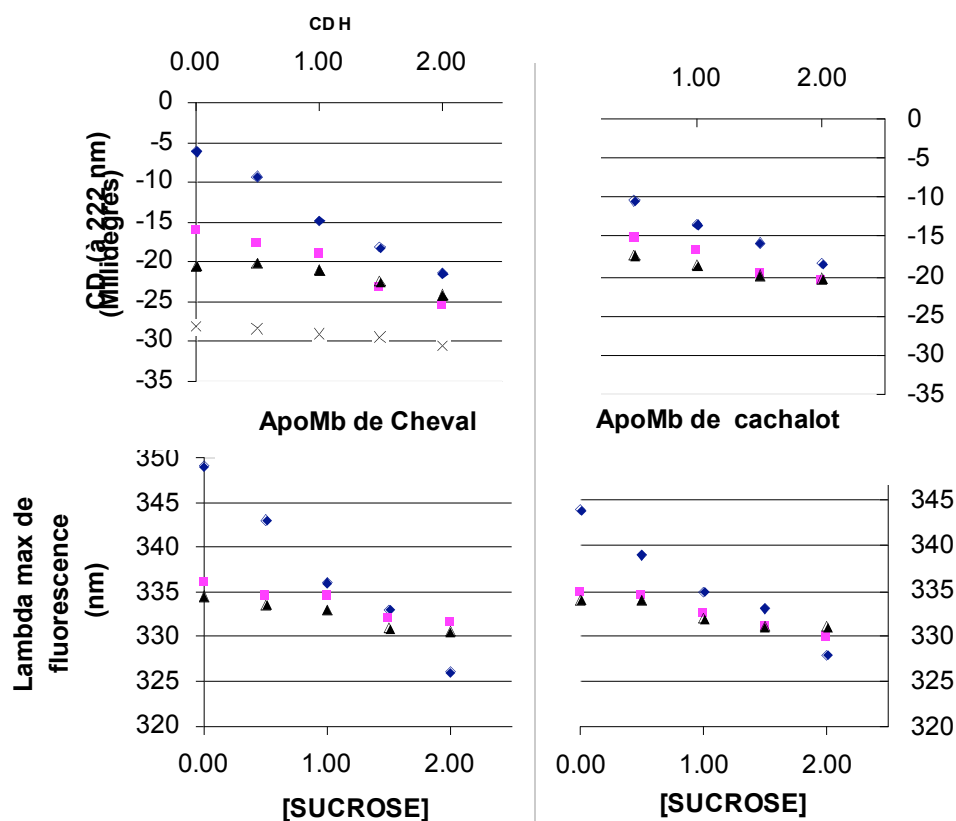


Figure 5: Effet du sucrose sur la structure secondaire et la compacité sur les formes à pH 2, 4 et 6 de l'apoMb cheval (à gauche) et de cachalot (à droite).

Le signal de dichroïsme circulaire à 222 nm est reporté (en haut), ainsi que le lambda max de fluorescence (excitation à 288 nm) (en bas) pour pH 2.2 (◆), pH 4.2 (■), pH 6 (▲).

Le signal de dichroïsme circulaire à 222nm de l'holoMb de cheval à pH 6 est également reporté (X). Les conditions sont 1uM apoMb : 5°C. 2mM citrate. 30mM NaCl.

contenu en hélice α comparable à celui de la protéine à pH 6 (forme native, en absence de sucrose), mais qui reste toutefois inférieure au niveau atteint dans l'holoMb. La position du maximum d'émission des Trp, caractéristique de l'accessibilité au solvant de ces résidus est également comparable pour les 3 formes de la protéine. Concernant la forme native à pH6 de l'holoMb de cheval, représentée par des croix [sur la figure 34](#), une relativement faible augmentation de structuration secondaire est observée. L'influence du sucrose, sur l'absorbance de la bande de Soret de cette même protéine dans les mêmes conditions, ne présente pas de variation significative de la valeur d'absorbance ni de la valeur du lambda max de la bande de Soret (λ_{max} 408 nm).

Afin de déterminer si à pH 2.2, et à pH 4.2, la protéine acquière une structure tertiaire comparable à celle de la forme native, nous avons mesuré les spectres CD dans l'UV proche. [La figure 35](#) montre les spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche, (sonde de la structure tertiaire). En absence de sucrose, les spectres, de l'intermédiaire I (pH4.2) et de la forme native à pH 6 sont bien différenciables, comme cela a été précédemment montré (résultats personnels M Jamin, (Gast, Damaschun et al. 1994); (Nishii, Kataoka et al. 1994)), avec, à 290nm, un minimum à pH 6 et un maximum à pH 4.2 ([figure 35 a](#)). La présence de sucrose à 2M ([cercle blanc figure 35 b,c](#)), conduit à une augmentation du signal, mais la présence de l'osmolyte ne modifie pas la forme du spectre de la protéine, à pH 4.2 ([figure 35 b](#)). La même constatation est faite à pH 6 ([figure c](#)), ce qui indique que le sucrose augmente la compacité et la structuration de la protéine, quelque soit son état structurel initial. Par contre, à pH 4.2, la structuration en hélice α observé par CD dans l'UV lointain et la compaction observée par fluorescence des Trp ([figure 33 et figure 35](#)), ne correspond pas pour autant à la formation de la structure native.

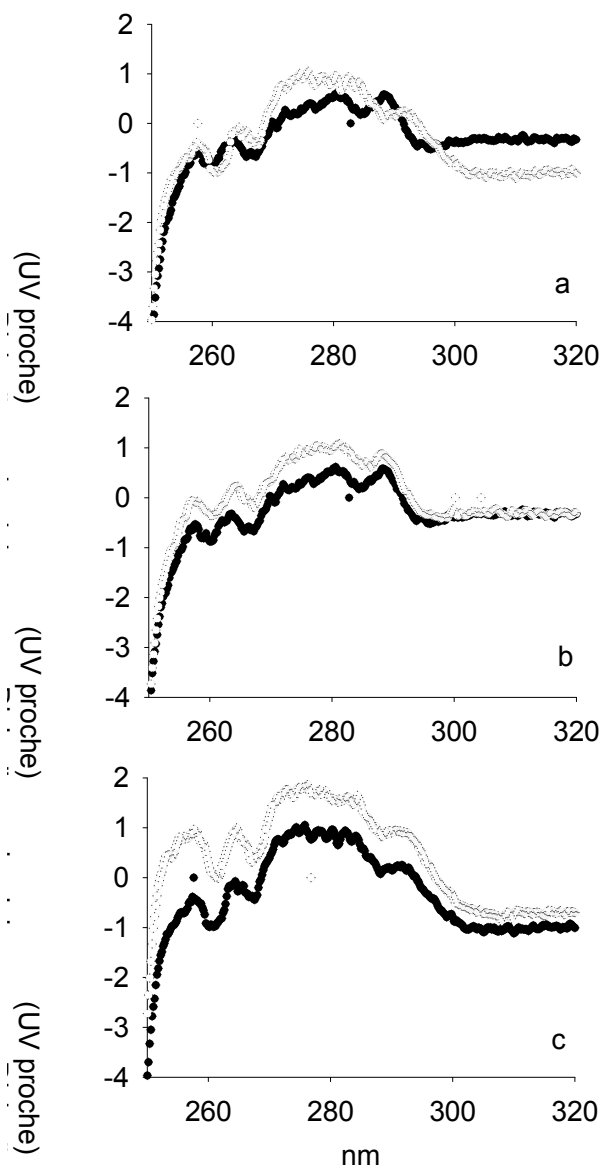


Figure 6 : Influence du sucrose sur le dichroïsme circulaire dans l'UV proche pour les formes I (pH4.2) et N (pH6).

a : Cercle blanc : pH 6 ; Cercle noir : pH4

b : pH 4

c : pH 6

b, c : cercle blanc = 2 M sucrose ; cercles noirs = 0 M sucrose.

Les conditions sont 50µM apoMb ; 5°C, 2mM

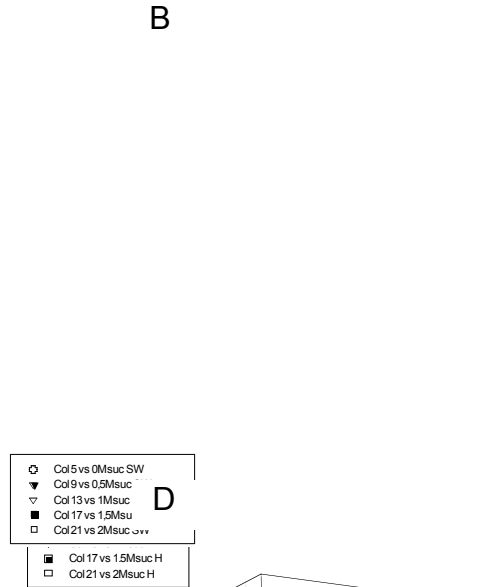
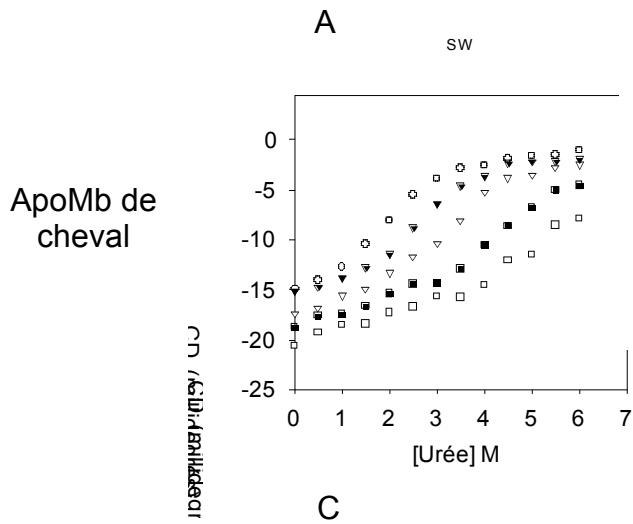
Dépendance des paramètres thermodynamiques du dépliement par l'urée, à l'équilibre, de l'intermédiaire à pH 4.2 de l'apoMb, en fonction de la concentration en sucrose.

Pour quantifier l'effet des osmolyte sur la stabilité de l'intermédiaire I de l'apoMb, nous avons mesuré la transition de dépliement par l'urée, par fluorescence et dichroïsme circulaire dans l'UV lointain en présence de différentes concentrations d'osmolyte, allant de 0 à 2M. Pour l'ensemble des conditions testées, on observe une cohérence des résultats avec ceux mesurés lors du repliement forcé par le sucrose dans 2 M d'urée (cercles pleins [figure 36 B, D, F, H](#)). Ces courbes, pour lesquelles l'apoMb, dans 2 M d'urée, retrouve progressivement de la structure lorsque la concentration en sucrose est augmentée (de 0 à 2M), suivent une variation linéaire pour l'apoMb de cachalot (cercles pleins, D et H), alors que celles de l'apoMb de cheval présente une forme nettement sigmoïde (cercles pleins B, F). En effet, une observation détaillée des courbes de dénaturation par l'urée montre des différences de comportement entre les deux apoMb en fonction de la concentration en sucrose.

En présence de 2 molaire sucrose, la courbe de dénaturation par l'urée de l'apoMb de cheval présente deux transitions visibles par CD ([figure 36 A, carrés vides](#)). Cette particularité est peu discernable pour l'apoMb de cachalot, qui semble suivre un modèle simple à deux états. La [figure 37](#) montre les paramètres déterminés en ajustant les données observés pour l'apoMb de cachalot à l'équation décrivant une transition simple entre deux états. La variation de ces paramètres indique que le comportement de l'apoMb de cachalot est plus complexe. En effet, la valeur m décroît en présence de concentration croissante de sucrose. Cette valeur est reliée à la différence de surface accessible au solvant entre l'état dépliée et l'état replié (Schellman, 1978 ; Shortle, 1995). Dans le cas le plus simple on s'attend à ce que l'effet du sucrose soit proportionnel à sa concentration et l'effet relatif de celui-ci est identique sur les formes dépliées et natives (I dans notre cas). La valeur de m reste donc constante. Dans un cas plus complexe, on peut prédire que puisque le sucrose favorise les états compacts, on peut s'attendre éventuellement à une augmentation de la valeur de m en fonction de la concentration en sucrose. Ici ce n'est pas le cas : la valeur m diminue. Une explication possible est que la protéine suit une transition à trois états ([Soulages JL, Biophysical Journal Vol 75, 1998, 484-492](#)).

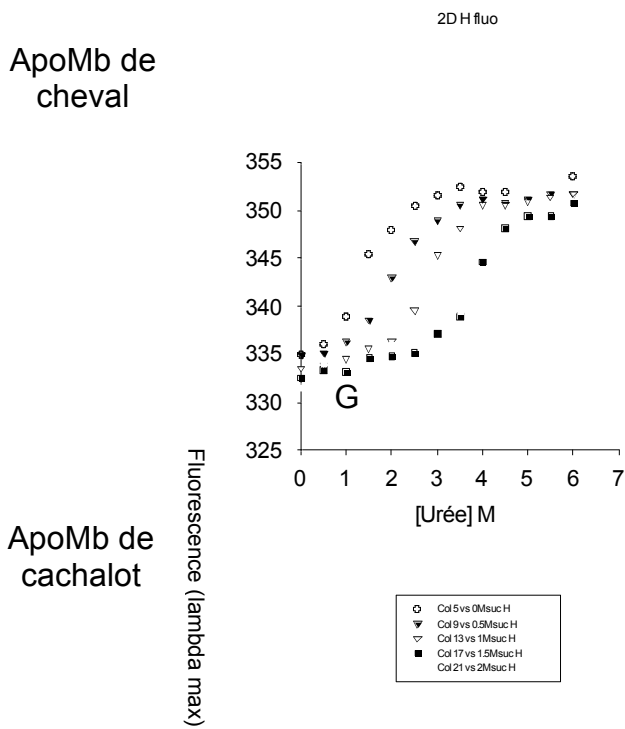
Les données de dépliement par l'urée en fonction du sucrose pour l'apoMb de cheval ont permis de tester un modèle à trois états. La [figure 38](#) montre les données m et ΔG déterminés

à partir de ce modèle.



ApoMb de cachalot

E



ApoMb de cachalot

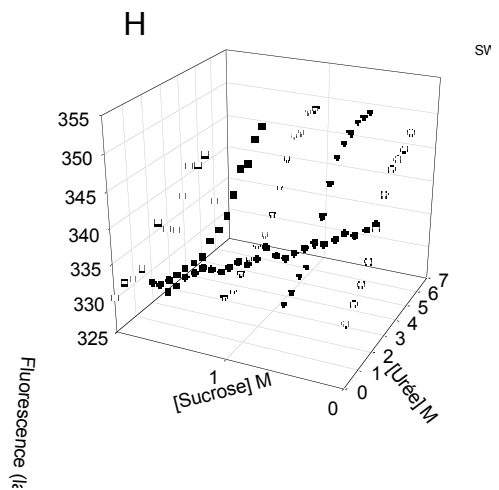


Figure 36 : Influence du sucrose (0 (○), 0.5 (▼), 1 (Δ), 1.5 (■), 2 (□) M) sur la dénaturation, par l'urée, de l'intermédiaire I à pH 4.2, pour les apoMb de cheval et de cachalot, suivie par dichroïsme circulaire (à 222 nm) et par fluorescence (lambda max d'émission pour une excitation à 288nm).

Les graphiques de gauche (A, C, E, G) représentent l'influence du sucrose, sur la dénaturation par l'urée, suivie par CD à 222nm (A, C) et par fluorescence (lambda max) (E, G), et cela pour les apoMb de cheval (A, E) et de cachalot (C, G).

Les graphiques de droite (B, D, F, H) sont une représentation en trois dimensions des graphiques de gauche, sur lesquels ont été ajoutés des courbes de dépendance à la concentration en sucrose, dans 2M d'urée, (●). Conditions : 1μM apoMb, 2 mM citrate, 30mM NaCl.

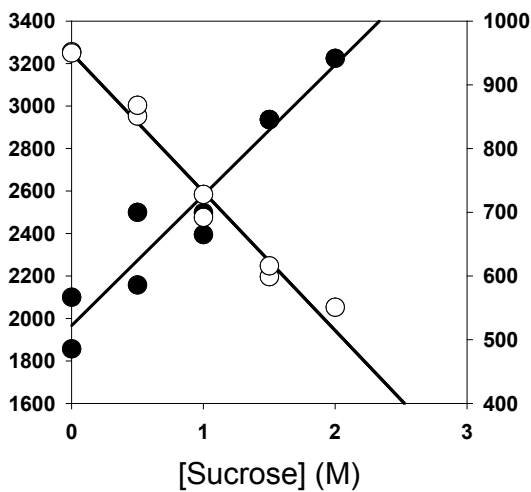


Figure 37 : Variation des paramètres m et ΔG en fonction de la concentration en sucrose, après ajustement des données de dépliement par l'urée de l'apoMb de cachalot à un modèle à deux états.

Les cercles pleins (●) correspondent aux ΔG obtenues.

Les cercles vides (○) correspondent aux valeurs m.

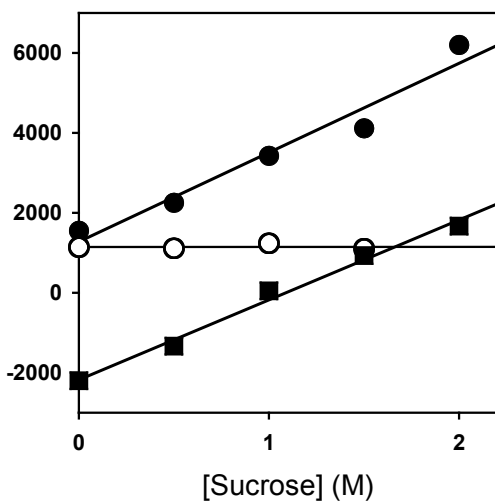


Figure 38 : Variation des paramètres m et ΔG en fonction de la concentration en sucrose, après ajustement des données de dépliement par l'urée de l'apoMb de cheval à un modèle à trois états.

Les cercles pleins (●) correspondent aux ΔG obtenues.

Les cercles vides (○) correspondent aux valeurs m obtenues pour la seconde transition, la valeur de m pour la première transition ayant été fixée pour la modélisation.

Effet du sucrose sur les cinétiques de repliement et dépliement de la forme intermédiaire I de l'apoMb en fonction de la concentration en urée.

Puisque le sucrose a un effet marqué sur l'équilibre entre les formes intermédiaires et la forme dépliée, nous avons étudié les cinétiques de dépliement et de repliement à pH 4.2 induite par saut de la concentration d'urée. En effet, une modification de la constante d'équilibre, peut s'expliquer par la modification de l'une des deux constantes de vitesse ou des deux à la fois. Ces données fournissent une information supplémentaire sur la structure de l'état de transition de la réaction et notamment sur sa ressemblance avec l'état U ou l'état I.

La [figure 39](#) présente l'influence du sucrose sur les vitesses apparentes déterminées à partir des cinétiques de repliement et dépliement de la forme I en présence d'urée. A pH 4.2, dans la zone de transition, le sucrose affecte uniquement la vitesse de dépliement de la protéine. La vitesse de dépliement est largement affectée.

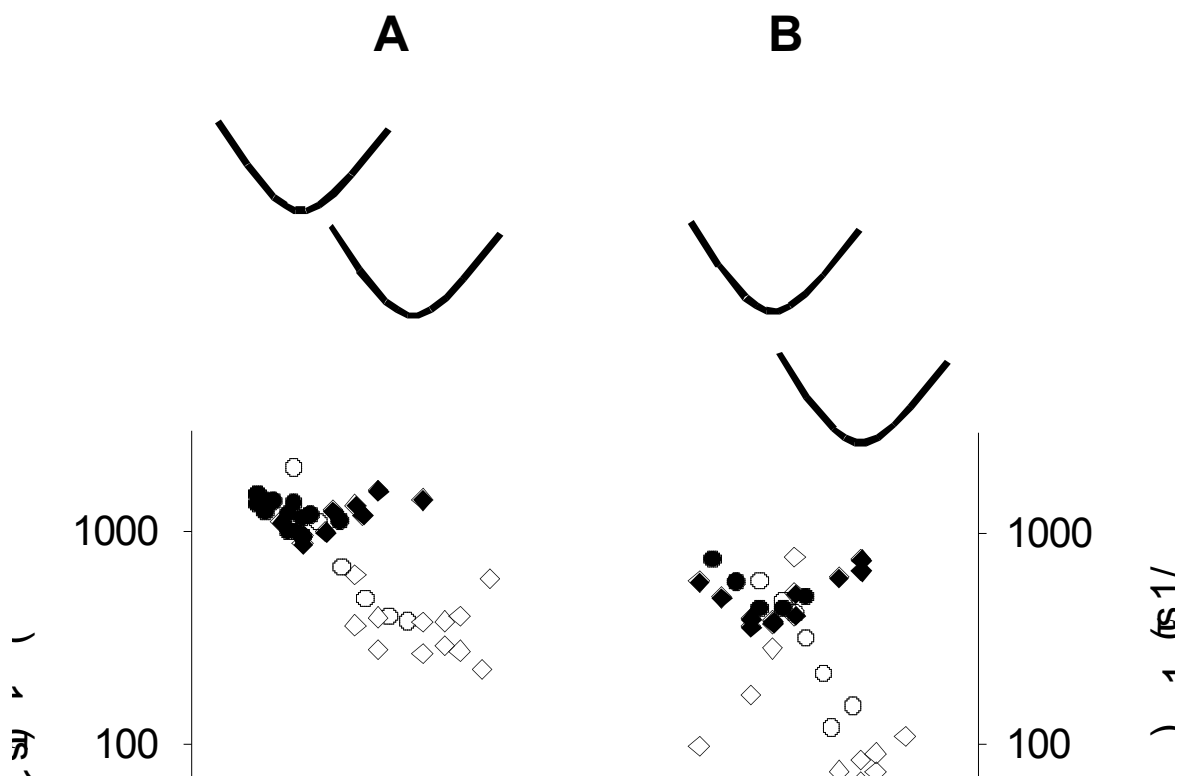


Figure 39 : Influence du sucrose sur la transition (repliement et dépliement) induit par l'urée à pH 4.2.

(A) apoMyoglobine de cheval, (B) apomyoglobine de cachalot. Les symboles pleins (◆,●) correspondent aux vitesses apparentes en absence de sucrose ; les symboles vides (◇,○) correspondent aux vitesses apparentes en présence de 1M sucrose. Les constantes de vitesse apparente ($1/\tau$) versus [urée] : pour le repliement à partir de 4.5 M en urée (●, ○) et pour le dépliement à partir de 0M urée (◆, ◇). Les lignes sont tracées de façon arbitraire.

Conditions : 2mM Na citrate/acide citrique, 30mM NaCl, pH 4.2, 5°C, concentration finale en protéine 15 à 20 μM. Dilution 1/2 par le stopped-flow en configuration sub-milliseconde.

L'influence du sucrose sur les cinétiques de dépliement et repliement entre les formes I et N n'est observable que dans le dépliement de N vers I. La [figure 40](#) présente les constantes de vitesse mesurées en ajustant les cinétiques observées à une équation tri – exponentielle pour le repliement et à une équation mono-exponentielle pour les cinétiques de dépliement.

Les constantes de vitesse de dépliement (symboles vides) résultent de deux séries de tests indépendants qui montrent la bonne reproductibilité des résultats obtenus. Les résultats, présentés [figure 40](#), correspondent à ceux obtenus avec l'apoMb de cheval et sont similaires à ceux obtenus pour la protéine de cachalot (résultats non montrés).

Le repliement de I vers N comporte trois phases cinétiques (description table 1, (Jamin and Baldwin 1998)) qui ont été décrites comme correspondant à la formation de Ib à partir de Ia, puis à la formation de N pour les deux premières phases. La troisième, beaucoup plus lente et de faible amplitude, correspond à la formation d'une espèce oligomérique (dimère). Ces trois phases ne semblent pas affectées par la présence de sucrose. Sur la [figure 40](#), c'est la phase correspondant à la formation de N à partir de Ib qui est représentée (symboles pleins). Par contre, le dépliement de N vers I est fortement influencé par la présence de sucrose : sa vitesse, avec 1 M sucrose est près de 4 fois plus lente qu'en son absence.

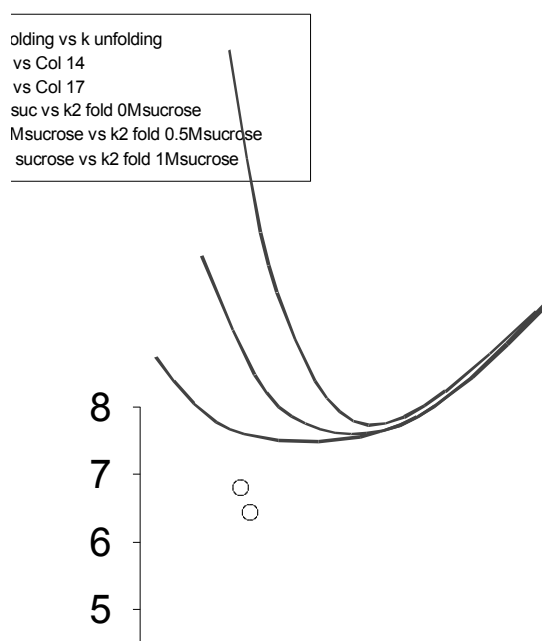


Figure 40 : Influence du sucrose, sur les vitesses de repliement et dépliement entre I et N, mesurée lors de saut de pH.

Les symboles pleins correspondent aux cinétiques de repliement, et les symboles vides aux cinétiques de dépliement pour 0 (●, ○), 0.5 (■, □) et 1 M sucrose (▲, △). Les courbes sont arbitraires.
Conditions : 10 μ M ApoMb H, 2 mM citrate, 30mM NaCl. Dilution 1 / 1 par stopped-flow.

Discussion

Effets de différents osmolytes sur la courbe de dénaturation par l'urée de l'intermédiaire I, à pH 4.2

La transition de dépliement de l'intermédiaire à pH 4 par l'urée, à l'équilibre, des apoMb de cheval et de cachalot peut être, en première approximation, décrite par un modèle simple à deux états. Les tests de dénaturation par l'urée, présentés [figures 31](#) et [32](#), montrent que l'équilibre de dénaturation correspond à une dénaturation apparente suivant un modèle à deux états, et cela en présence de chacun des osmolytes considérés ici. Nous avons utilisé au moins un osmolyte pour deux des trois classes existantes d'osmolytes naturels : les polyols (représentés par le sucrose), les méthyl amines (représentés par la sarcosine et le TMAO). La troisième classe d'osmolytes correspond à certains acides aminés (i.e. la proline) et n'est pas représentée ici. A différents degrés, tous les osmolytes étudiés protègent l'intermédiaire I de l'effet déstabilisant de l'urée, comme cela pouvait être attendu. En effet, plusieurs études publiées précédemment montrent de tels effets sur la dénaturation des protéine par l'urée (([Yancey and Somero 1979](#)) ; ([Santoro, Liu et al. 1992](#))). Bien que dans notre cas, l'effet des osmolytes est testé sur un molten globule, l'efficacité de ces osmolytes sur la dénaturation de l'intermédiaire I, suit le même ordre que celui précédemment observé pour des protéines natives. L'efficacité de l'effet des osmolytes dans leur protection contre l'urée correspond à celui calculé en utilisant des données de transfert d'énergie de Gibbs (([Wang 1997, Biochemistry, 36](#), ([Wang and Bolen 1997](#)); ([Bolen and Baskakov 2001](#))).

En considérant que l'osmolyte qui permet de décaler le plus fortement la valeur de C_m est celui qui est le plus efficace pour protéger de la dénaturation, le classement est donc le suivant : TMAO >> sucrose > sarcosine pour une concentration 1 M de chacun de ces osmolytes. En d'autres termes, ce classement correspond à la capacité à forcer la protéine sous sa forme intermédiaire à se replier vers une forme plus structurée et donc plus difficile à dénaturer.

Le TMAO et la sarcosine, dans l'adaptivité en biologie, ont pour rôle de stabiliser les protéines contre les stress dénaturants résultant de concentrations d'urée intracellulaires élevées (([Yancey, Clark et al. 1982](#))). Les polyols comme le sucrose, semblent être sélectionnés comme osmolytes chez les organismes qui sont adaptés à vivre à des

températures extrêmes. Il est possible qu'ils aient été sélectionnés pour leur capacité à stabiliser les protéines dans des conditions extrêmes de températures ((Yancey, Clark et al. 1982)). Ainsi, les capacités relatives de ces osmolytes à forcer les protéines à se replier semblent être cohérentes avec leurs rôles fonctionnels.

La différence de stabilité entre l'apoMb de cheval et de cachalot correspond à celle observée précédemment en absence d'osmolyte. La tendance est conservée en présence d'osmolyte, et les deux protéines sont influencées de façon similaire par les osmolytes testés, ce qui correspond à ce qui est attendu. En effet, les études effectuées sur les apoMyoglobines de cheval et de cachalot montrent globalement que ces deux protéines, malgré une différence quantitative en terme de stabilité, ont un comportement qualitatif global très similaire.

En résumé, les apoMb de cheval et de cachalot ont un comportement similaire lors de la dénaturation par l'urée, en présence ou absence de différents osmolytes. En première approximation, il semble que l'action contre agissante des osmolytes, face à la dénaturation par l'urée, soit cohérente avec un modèle simple à deux états.

Effet du sucre sur les formes U, I et N (pH 2.2, 4.2, 6) de l'apoMb.

L'effet du sucre sur les structures secondaires et tertiaires des états partiellement dépliés, molten globule et natif (respectivement à pH 2, 4.2, 6 et à 5°C, 2mM citrate, 30mM NaCl), a été examiné par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain et proche et par fluorescence. La structure de la protéine en présence de l'hème, à pH 6, a été également sondée par absorbance pour suivre la bande de Soret et par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain. Trois conclusions résultent [des figures 33, 34, 35](#) présentant ces résultats :

1 – Le CD nous montre que le sucre augmente la stabilité secondaire. Il est observé un signal caractéristique d'hélice alpha pour la protéine étudiée. La variation du lambda max de fluorescence informe sur la compaction de la protéine puisque la fluorescence informe sur l'environnement des tryptophanes, plus ou moins enfouis dans la structure. L'influence du sucre sur ces deux sondes de structure est commune et indique une augmentation de la compacité de la protéine.

2 – L'effet d'un osmolyte, le sucre, sur les états partiellement dépliés (pH 2) et molten globule (pH 4.2), augmente très fortement la stabilité de ces états en permettant de rendre favorable la formation de structure et la compaction de la protéine.

3 – Les spectres de CD dans l'UV proche, sondant la structure tertiaire, subissent également l'influence de l'osmolyte mais montrent que la compaction observée à pH 4.2 ne conduit pas

à la stabilisation de la protéine sous sa forme native, bien que les signaux de CD et de fluorescence à pH 4.2 et pH 2.2 sont similaires à ceux mesurés à pH 6.

Le sucrose agit comme stabilisateur de la structure secondaire, mais ne permet pas la mise en place de la structure tertiaire présente dans la forme native.

Effet du sucrose sur l'intermédiaire I, à l'équilibre.

On pourrait s'attendre à ce que l'action stabilisante du sucrose sur l'intermédiaire conduise à une structuration de type native identique à celle obtenue à pH6. L'effet du sucrose, sur la population de structures hétérogènes présente dans cette forme intermédiaire, semble cependant favoriser l'émergence d'une population homogène majoritaire avec une forte structuration secondaire de type hélice alpha ne correspondant pas à la forme native. Il semblerait que l'effet du sucrose sur l'intermédiaire I soit plus complexe que ce qui a été supposé précédemment. (La transition de dépliement par l'urée, à l'équilibre, de l'intermédiaire I à pH 4 des apoMb de cheval et de cachalot a été, en première approximation, décrite par un modèle simple à deux états) Le jeu de données de dénaturation par l'urée présenté [figure 36](#) a permis de faire l'hypothèse d'un modèle plus complexe décrit ci-dessous. Quel est l'effet du sucrose sur les populations Ia et Ib, précédemment décrites ? Il est possible que l'effet du sucrose conduise à une forte stabilisation de l'une d'entre elles.

Il est apparent que I consiste en un mélange hétérogène d'au moins deux formes différentes (Ia, Ib), plus ou moins structurées, et qu'en absence d'osmolytes, les formes les moins structurées sont thermodynamiquement favorisées. La capacité du sucrose ou du TMAO à perturber l'équilibre existant entre les différentes formes intermédiaires suggère que les différents composants structurels, en absence d'osmolyte, diffèrent par leur surface préférentiellement hydratée, exposée au solvant. En présence d'osmolyte, lorsque les interactions hydrophobes sont accrues du fait de l'effet d'exclusion préférentielle, les éléments les plus structurés parmi la population d'Intermédiaire sont favorisés thermodynamiquement et le degré de formation et de stabilisation de la structure devient dépendant de l'osmolyte présent.

Il semble que dans le cas présent, la stabilité relative entre les intermédiaires Ia et Ib soit modifiée par l'osmolyte. Le modèle s'ajustant le mieux aux données expérimentales indique que l'ensemble partiellement dénaturé à pH 4.2, significativement peuplé par Ia et Ib, subit deux transitions lors de la dénaturation par l'urée. Ces transitions, sont difficilement séparables en absence de sucrose. La présence d'osmolyte, ici du sucrose, permet d'observer

clairement deux transitions lors des dénaturations, notamment pour l'apoMb de cheval dans 2 M de sucrose (carrés vides, figure 36 A).

Les paramètres thermodynamiques déterminés ne collent pas à une description simple d'un modèle à deux états pour l'apoMb de cachalot. La variation du paramètre m pour l'apoMb de cachalot, permet en effet de faire l'hypothèse d'un comportement plus complexe (figure 37). La difficulté pour modéliser les valeurs expérimentales à un modèle à trois états, réside dans le fait que si il y a deux transitions, elles sont superposées, ce qui ne permet pas de les discréditer l'une de l'autre. Un modèle plus complexe à trois états a été testé sur l'apoMb de cheval (figure 38) qui présente deux transitions discernables. L'ensemble des données a été ajusté à un modèle à trois états, et les données thermodynamiques montrent un comportement différent pour l'apoMb de cheval et de cachalot. Pour aller plus loin dans cette analyse, il est nécessaire de compléter les jeux de données pour fixer un maximum de paramètres lors des modélisations. L'objectif étant alors de déterminer un modèle relativement simple, compatible avec l'ensemble des données. Il est en effet reconnu que l'apoMb de cheval et de cachalot ont un comportement qualitativement similaire, malgré des différences quantitatives. Il est fort probable que pour ces deux protéines, l'effet de l'osmolyte soit équivalent et permette de stabiliser une population qui n'est pas majoritaire en son absence.

Effet du sucrose sur les cinétiques de repliement ou dépliement à partir de la forme I, pH 4.2 de l'apoMb.

La figure 39 présente l'influence du sucrose sur les vitesses apparentes déterminées à partir des cinétiques de repliement et dépliement de la forme I en présence d'urée. A pH 4.2, dans la zone de transition, le sucrose affecte uniquement la vitesse de dépliement de la protéine. La vitesse de repliement n'est pas affectée. Ces résultats indiquent que le sucrose déstabilise de manière relative la forme U et l'état de transition de la réaction $U \rightleftharpoons I_a$, par rapport à la forme I_a . L'état de transition de la réaction a le même comportement vis-à-vis du sucrose que la forme U, indiquant qu'il est exclu de la même manière du solvant.

Si l'exclusion du solvant est attribuée à une interaction défavorable de la liaison peptidique avec la solution d'osmolyte (Bolen), l'état de transition de la réaction $U \rightleftharpoons I_a$ se caractérise par une exposition des liaisons peptidiques comparable à celle de la forme U. Si l'exclusion du solvant est due à un effet stérique, l'état de transition occupe un volume comparable à celui de la forme U. L'étape limitante ne correspondrait donc pas à une compaction de la chaîne peptidique.

Le même comportement est observé pour les deux protéines, indiquant encore une fois que l'apoMb de cheval et celle de cachalot suivent un processus commun de repliement.

La [figure 40](#) montre l'influence du sucrose sur les cinétiques de repliement et dépliement entre I et N. L'influence du sucrose est effective sur le dépliement de N vers la forme intermédiaire. Ces résultats nous donnent des informations sur la nature de l'état de transition présent entre I et N. La vitesse de dénaturation étant affectée, une explication simple est celle d'une stabilisation relative par le sucrose de N, supérieure à la stabilisation relative sur I et sur l'état de transition (TS), ces dernières étant identiques. On peut donc déduire que les comportements de I et TS sont proches, mêmes si la barrière d'énergie est élevée. L'état de transition est certainement plus proches de la forme I que de la forme N. Cette observation s'ajoute à deux précédentes observations concernant : 1- l'effet de sels sur la transition $I \rightleftharpoons N$ (variation des vitesses en fonction de la concentration en NaCl) et, 2- l'observation de l'effet de la nature des chaînes latérales (par mutation). Ces deux précédentes observations concluaient également pour un état de transition ayant une sensibilité à ces variations, électrostatiques et mutationnelles, proches de celles de l'intermédiaire I.

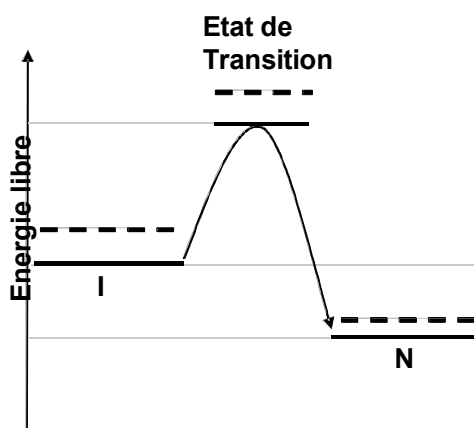


Figure 41 : Représentation de la réaction de repliement à deux états dans laquelle l'état non replié est en équilibre thermodynamique avec l'état replié.

Ces deux états sont séparés par une barrière d'énergie correspondant à l'état de transition. Les traits pointillés représentent les niveaux d'énergie de I, TS et N, en présence de sucrose ; les stabilisations relatives de I et TS sont équivalentes et inférieures la stabilisation relative de N.

Implication de la capacité des osmolytes à modifier la structure, effet sur la forme N.

Les osmolytes modifient la thermodynamique de la stabilité conformationnelle des protéines en déplaçant l'équilibre entre l'état natif et l'état dénaturé et en faveur de l'état natif. La modification du signal CD lointain et de fluorescence de la forme native (pH 6), en présence

de sucrose, indique que le sucrose déplace l'ensemble de l'état natif vers des espèces plus ordonnées et plus compactes. En effet, parce que le spectre CD dans l'UV lointain d'une protéine provient d'abord de l'arrangement spatial des groupe amides, une faible augmentation de l'ellipticité molaire implique que l'ensemble de l'état natif est déplacé vers des espèces favorisées avec une augmentation d'ordre de la structure secondaire ((Sreerama and Woody 1993)). Cela a été observé par Kim et collaborateurs (Kim, Jones et al. 2003) qui ont montré que l'ajout de sucrose à la forme native de différentes protéines diminue la vitesse d'échange d'hydrogènes. Ces résultats indiquent que la présence de sucrose déplace l'équilibre conformationnel vers les espèces protéiques les plus compactes dans les états natifs, ce qui peut être expliqué par l'exclusion préférentielle du sucrose par la surface de la protéine.

2.3.2 Effet de l'encombrement moléculaire sur le repliement du cyto C et de l'apoMb

Introduction

Dans plusieurs études, des agents viscosogènes appelés « agents d'encombrement moléculaire », comme le polyéthylène glycol, peuvent avoir des effets divers sur la réaction de repliement d'une protéine. Pour des concentrations faibles ou modérées par contre, le comportement attendu est une augmentation de la vitesse de repliement des protéines. D'autre part, pour des concentrations plus élevées, les vitesses de repliement sont, en théorie, grandement ralenties, cela étant explicable par l'effet de la forte viscosité du solvant. Ainsi, dans ces conditions, l'effet de la friction du solvant apparaîtrait plus important que celui de la friction interne ((Plaxco and Baker 1998)).

C'est ce phénomène à deux régimes, dépendant de la concentration, qui a été observé pour le cyto C.

L'effet de l'encombrement sur la vitesse de repliement est donc complexe et dépend de façon cruciale de la nature de la réaction et de la concentration d'agent d'encombrement. Dans le cas de repliement des protéines, l'augmentation de la vitesse de repliement, pour de faibles concentrations d'agent d'encombrement, peut être assimilée à l'exclusion du solvant de l'interface protéine-eau, favorisant la structuration native de la protéine. Cela correspond à l'effet décrit pour les osmolytes et peut, dans certains cas, en favorisant

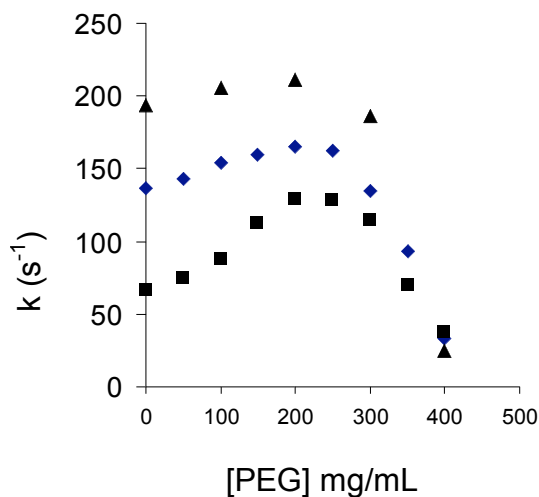


Figure 42 : Effet de l'encombrement moléculaire sur les cinétiques de repliement du cyto C.

Le repliement est suivi par fluorescence (excitation à 280 nm, filtre à 305 nm). Avant repliement, le cyto C est déplié avec 4.2 M de chlorure de guanidine. Le repliement a lieu à pH 5 (◆) et à pH 7 (■,▲), en absence (■) ou en présence de 0.2M d'Imidazole à pH 7 (▲).

Conditions : tampon 50mM phosphate, 20µM cyto C, 0,7 M de chlorure de guanidine final.

thermodynamiquement la forme native, augmenter la vitesse de formation de celle-ci, à partir d'une forme dépliée.

Pour les plus fortes concentrations d'agent encombrant, l'effet d'encombrement rend la diffusion intramoléculaire plus difficile et affecte la vitesse de repliement qui diminue fortement.

Résultat

Le repliement du cyto C comporte normalement trois phases cinétiques : n'est représentée [figure 42](#) que la phase cinétique rapide. Lors de l'addition d'une concentration croissante de PEG 8000, les constantes de vitesse observées augmentent jusqu'à un maximum à environ 200mg/mL de PEG 8000 et diminuent fortement ensuite ([figure 42](#)). La variation de concentration en protéine n'affecte pas ce phénomène, ce qui semble exclure un possible effet d'agrégation (résultats non montrés). D'autre part, l'utilisation d'un autre encombrant moléculaire, le Ficoll 70, conduit à des effets similaires. Ce phénomène est observé, [figure 42](#), pour des cinétiques effectuées à pH 5 et ne rencontrant pas de mauvaises coordinations d'histidine ((Yeh and Rousseau 1999)). A pH 7, les cinétiques sont plus lentes du fait de coordinations non natives possibles ((Yeh and Rousseau 1999)). A ce pH (pH 7) en présence d'imidazole les mauvais appariements d'histidines peuvent être évités et des vitesses de repliement, supérieures à celles mesurées à pH 7, peuvent être obtenues.

Il apparaît, à travers la forme en cloche du tracé des vitesses apparentes de repliement en fonction de la concentration en PEG 8000, que celui-ci affecte le mécanisme de repliement par au moins deux mécanismes différents : pour un mécanisme, il exerce une influence subtile

qui augmente la vitesse de la constante de repliement; un autre mécanisme structurellement plus important réduit celle-ci.

Une expérience identique a été effectuée pour le repliement entre I et N pour l'apoMb. Les premiers résultats montraient également un effet d'augmentation de la vitesse pour de faibles concentrations en PEG, les plus fortes concentrations en PEG ne conduisant pas à un effet de diminution de vitesse aussi évident que pour le cyto C.

Discussion

De faibles concentrations d'agent d'encombrement moléculaire augmentent la vitesse de repliement en augmentant la stabilité de la protéine.

En solution, les alcools comme le polyethylene glycol (PEG) interagissent avec le réseau de liaisons hydrogènes de l'eau et forment des liaisons hydrogènes internes ((Silow and Oliveberg 2003)). Ces interactions favorables avec l'eau sembleraient être les principales responsables de l'effet protéine-stabilisant de ces composés : les agents d'encombrement moléculaire vont contribuer à réduire la surface des protéines accessibles au solvant, les interactions préférentielles avec l'eau étant plus fortes que celles avec la protéine ((Timasheff 1993)), (Gekko and Timasheff 1981)). En effet, cela va augmenter l'énergie de contact entre les résidus et favoriser les conformations compactes comme la forme native. En accord avec ce raisonnement, la stabilité du cyto C présente une augmentation approximativement linéaire avec l'augmentation de la concentration de PEG 8000. La constante de vitesse de repliement augmente lors d'une faible addition de PEG 8000 : la barrière d'énergie libre de repliement s'abaisse, et l'état de transition sur le chemin de repliement est stabilisé par rapport à la forme dépliée. Ce qui est certainement un effet direct strictement équivalent à celui rencontré pour de faibles concentrations en osmolytes.

De fortes concentrations en PEG diminuent la vitesse de repliement.

Le second effet, le plus important du PEG, est le ralentissement des cinétiques de repliement observé au delà de 200 mg/mL de PEG. Après un maximum à 200 mg/mL de PEG, le tracé des vitesses apparentes de repliement en fonction de la concentration en PEG 8000 présente une forte diminution (figure 42). Plaxco et Baker ont observé une diminution similaire pour

une autre protéine, la protéine L, et ont attribué cet effet à un « changement dans le mécanisme de repliement ». Ils ont ainsi exclu une analyse de l'effet de la viscosité intermoléculaire. Dans le cas de CI2, décrit par Silow & Oliveberg ((Silow and Oliveberg 2003)), il est possible de faire d'autres déductions. Plusieurs agents d'encombrement moléculaire et de différentes viscosités ont été utilisés et ne modifient pas le profil en cloche observé. Il ne semble donc pas avoir de corrélation avec la viscosité macroscopique. La viscosité jouerait donc un rôle mineur dans le cas de CI2, la diminution de la vitesse de repliement étant, dans ce cas, due à des changements structurelles ou dynamiques de la protéine. L'agent d'encombrement moléculaire produirait donc l'effondrement de la pelote statistique, ce qui aurait pour effet d'allonger le temps de reconfiguration de la chaîne polypeptidique avant que celle-ci ne se contracte progressivement vers la forme repliée. Ici, dans le cas du cyto C, une telle hypothèse n'est pas à écarter. Cependant, il est surprenant de constater que le PEG 8000, à concentrations élevées (400mg/ml), fait converger les vitesses de repliement à pH5, pH7, ou à pH7 en présence de 0.2M d'imidazole, alors que les chemins de repliement ne sont pas les mêmes à pH 7 et pH 5. Il est possible que la viscosité soit telle que, quelque soit le chemin de repliement, le facteur limitant soit uniquement la viscosité du milieu. Ces premières approches peuvent être intéressantes à compléter, notamment en utilisant différents osmolytes et agents d'encombrement moléculaire pour des études cinétiques de repliement et dépliement et en étudiant précisément l'effet de chacun d'eux sur la protéine à l'équilibre, dans l'état déplié et dans l'état natif. Cela permettrait de savoir si de fortes concentrations en viscosogènes influencent le repliement en modifiant les caractéristiques structurales et dynamiques du cyto C, ou si au contraire, c'est un effet de diffusion limitée qui est responsable de ces observations.

2.3.3 Conclusion : Encombrement et osmolytes

Du code génétique au code « protéique » : aux limites de l'évolution moléculaire.

L'intérieur d'une cellule est un environnement extraordinairement complexe dans lequel les protéines et les macromolécules sont présentes à des concentrations de 300 à 400 mg/mL. C'est pourquoi il est important d'étudier l'effet de molécules solvatant les protéines en condition de stress osmotique pour le cas des osmolytes, ainsi que les effets de forte concentration de molécules qui peuvent influencer le repliement. Certains aspects de ces problématiques ont été illustrés ici et semblent montrer que l'effet osmophobique ou l'encombrement moléculaire sont généralement des facteurs favorisant le repliement. Cependant, selon leur nature ou les conditions de repliement, ils peuvent conduire à stabiliser des formes agrégées de protéines ou encore obliger l'intervention de chaperonnes pour permettre le bon repliement d'une protéine. Il est maintenant connu que, dans les cellules des organismes vivants, il y a un grand nombre de facteurs auxiliaires qui assistent le processus de repliement, en incluant les catalyseurs de repliement et les chaperonnes moléculaires. Ces facteurs servent à rendre possible le bon repliement des chaînes polypeptidiques dans un milieu complexe et encombré, mais ne déterminent pas leur structure native ; celle-ci est complètement codée par la séquence en acides aminés seule. C'est pourquoi savoir comment les protéines trouvent leur état natif unique, simplement à partir de ces informations contenues dans leur séquence, est au cœur de la biologie moléculaire.

Et in vivo?

Les propriétés physicochimiques décrites pour le repliement *in vitro* sont, a priori, transposables aux modes de repliement *in vivo*. Cependant, le contexte cellulaire représente un ensemble de contraintes dont l'incidence n'est pas sans conséquence sur la spontanéité du phénomène. Il est fort probable que les événements non productifs (mauvais repliement, agrégation...) observés *in vitro* soient corrigés *in vivo* par des systèmes spécialisés de réparation ou d'aide au repliement. De la même façon, les processus de repliement décrits comme réversibles *in vitro* et autodéterminés par la séquence en acides aminés seule, peuvent dans certains cas être beaucoup plus complexes dans les conditions *in vivo*. Les protéines et les molécules impliquées dans ces processus d'aide au « bon repliement » interviennent pour

accélérer certaines étapes importantes, contourner des pièges cinétiques (oxydation, réduction, isomérisation de Prolines), ou éliminer et prévenir l'accumulation de protéines toxiques dans leur forme mal repliée par exemple.

Il y a des observations *in vitro* et *in vivo* qui montrent que les systèmes de chaperonnes améliorent l'efficacité de repliement, notamment pour des protéines sensibles à l'agrégation. Ces cages moléculaires ont également l'avantage d'augmenter la vitesse de repliement de certaines protéines ((Ellis 2001)). La forte concentration dans une cellule, c'est-à-dire l'encombrement moléculaire, a une forte conséquence énergétique sur la plupart des fonctions cellulaires ((Ellis 2001; Hall and Minton 2003)). L'encombrement favorise les réactions qui conduisent à la compaction, comme le repliement de protéines, et à la formation d'agrégats comme dans le cas des plaques amyloïdes. Des découvertes récentes appuient la conclusion que, par de tels mécanismes, les chaperonnes augmentent les vitesse et la qualité du repliement dans certains cas. Le terme de « cage d'Anfinsen » a été proposé par RJ Ellis pour résumer l'idée que la fameuse chaperonne GroEL augmentait le taux de repliement en encapsulant chaque chaîne protéique partiellement repliée dans sa structure oligomérique. La protéine peut ainsi continuer à se replier, comme dans l'expérience classique et pionnière d'Anfinsen de renaturation de protéine. Il reste à résoudre beaucoup de problèmes. Il est également vraisemblable que les différents polypeptides, dont le repliement est aidé par des chaperonnes, ne s'effectuent alors pas par les mêmes chemins. Quoiqu'il en soit, cette idée de « cage d'Anfinsen » est plaisante pour les expérimentateurs étudiant la physicochimie du repliement des protéines *in vitro*. En effet, cela implique que les protéines se replient en suivant les mêmes règles dans les cellules qu'au fond des tubes à essais. RJ Ellis rapporte des propos de C Dobson (revisiting the anfinsen cage) qui fait remarquer que, puisque le repliement des protéines n'est pas aléatoire et suit certains chemins, il est peu probable qu'il s'agisse de mécanismes très différents impliqués dans la cellule.

Déterminisme du repliement, où il est question de l'utilité de se déplier...

Pour la cellule, la bonne gestion du repliement peut également être de déplier une protéine inutile ou néfaste à la cellule. En effet, le repliement et le dépliement sont les voies ultimes de génération ou d'abolition de l'activité cellulaire. Le dépliement est également l'élément normal dans la voie de la dégradation régulée des protéines ((Matouschek and Glick 2001; Matouschek 2003)). Il est de plus en plus apparent que certains événements dans la cellule, comme la translocation à travers la membrane, peuvent nécessiter que les protéines

soient dans des états dépliés ou partiellement repliés. Des processus apparemment aussi différents que le « trafficking », la sécrétion, la réponse immunitaire et la régulation du cycle cellulaire sont en fait aujourd'hui reconnus comme directement dépendant du repliement et du dépliement ((Radford and Dobson 1999)). Il n'est alors pas surprenant que des échecs pour un repliement correct, ou pour rester correctement replié, vont donner lieu à des mauvais fonctionnements des systèmes vivants et donc conduire à des maladies. De ce fait, il est devenu de plus en plus évident qu'un grand nombre de maladies humaines sont associées à des aberrations du processus de repliement ((Thomas, Qu et al. 1995)) ((Dobson 2004)).

Un défi : Décrypter le code de repliement et comprendre son évolution.

Aujourd'hui, l'impact social de ces maladies génétiques et sporadiques, causées par le mauvais repliement de protéines, est énorme. Ces maladies incluent des maladies neurodégénératives touchant les personnes les plus âgées comme Alzheimer ou Parkinson, ou des maladies dévastatrices dès l'enfance comme la fibrose kystique. Ces résultats de mauvais comportements de protéines peuvent être la conséquence d'événements d'agrégation qui y sont fréquemment associés. Les protéines ont évolué pour se replier de façon efficace et rester solubles, en dépit de leur tendance à s'agréger. C'est le résultat de la sélection naturelle de séquences qui ont co-évolué dans l'environnement dans lequel elles agissent. Avec ces maladies, nous apercevons les limites actuelles de notre niveau d'évolution moléculaire. Pour ces raisons, beaucoup de travaux s'orientent vers une meilleure définition des phénomènes conduisant au mauvais repliement ou à l'agrégation, pour nous permettre d'avoir un contrôle sur notre évolution moléculaire et de trouver les moyens de répondre à ces limitations.

Alors que nous allons toujours plus loin dans notre connaissance des mécanismes de repliement des protéines, et de la façon dont cela est optimisé et régulé au sein de l'environnement cellulaire, nous devons être capables de répondre avec de plus en plus de conviction à la question plus large qui est de savoir comment l'évolution a permis, même aux systèmes biologiques les plus complexes, de s'auto-assembler avec une fidélité aussi impressionnante. Une telle connaissance représenterait un pas très significatif dans la compréhension, au niveau moléculaire, de l'une des caractéristiques les plus fascinantes et fondamentales de la vie elle-même.

Chapitre 3. Conclusions et perspectives

Pour rendre expérimentalement accessible les étapes les plus précoces du repliement, il est nécessaire d'initier le processus sur une échelle de temps plus courte que le plus rapide des événements structuraux que l'on souhaite suivre. Parmi de nombreuses avancées techniques récentes, les méthodes de mélange ultra rapide, en conjonction avec des méthodes de détection de plus en plus performantes, permettent des avancées intéressantes dans la compréhension des événements structuraux les plus précoces lors du repliement de protéines. Deux techniques de mélange rapide sont étudiées ici : le freeze-quench et le stopped-flow, toutes deux basées sur un mélange rapide et contrôlé de deux solutions. Ce qui différencie ces deux techniques, c'est la méthode permettant de suivre la réaction une fois que celle-ci est déclenchée, après le blocage par congélation de la réaction pour la première, et l'arrêt du mélange pour le suivi de cette même réaction pour la seconde.

Au cours de ce travail, il a été testé la possibilité d'utiliser un appareil de freeze-quench pour bloquer et suivre une réaction chimique dans des temps inférieurs à la milliseconde. En premier résultat, cette hypothèse a été validée. La faible reproductibilité des résultats n'a pas permis d'appliquer cette méthode au repliement d'une protéine modèle, le cytochrome C. La faible reproductibilité résulte de la difficulté à maîtriser différentes variables : la qualité du jet après le mélange, la mouillabilité et la température du liquide de congélation ou encore la taille des gouttes congelées.

Le second appareil que nous avons utilisé est un stopped-flow équipé d'une cuve et d'une configuration fluide permettant de diminuer le temps mort de ce type de mélangeur et d'obtenir ainsi des temps morts inférieurs à la milliseconde (de l'ordre de 400 μ s). En couplant ce stopped-flow à un appareil de dichroïsme circulaire, le temps mort des cinétiques suivies par cette sonde spectroscopique a pu être amélioré d'un facteur 10.

Beaucoup de petites protéines globulaires se replient en formant des intermédiaires partiellement structurés dans les temps les plus précoces de leur processus de repliement. Le mécanisme, par lequel ces intermédiaires se replient à partir de l'ensemble dénaturé, n'est pas très bien connu, essentiellement parce que ces réactions se déroulent sur des temps inférieurs à la milliseconde. Avec certaines protéines, des formes partiellement dépliées identiques peuvent être observées à l'équilibre dans des conditions partiellement dénaturées et lors d'expériences cinétiques. La caractérisation à l'équilibre de ces intermédiaires stables est plus aisée et permet de directement informer sur les propriétés et le comportement de ces intermédiaires rencontrés lors des études cinétiques.

L'apoMyoglobine (apoMb) est une protéine particulièrement intéressante pour l'élucidation détaillée des événements moléculaires lors du repliement d'une protéine. L'apomyoglobine présente des cinétiques de repliement relativement simples avec des intermédiaires de repliement bien définis. L'apoMb se replie et se déplie de façon réversible dans diverses conditions, mais sa caractéristique principale est sa capacité à former un ensemble de formes stables partiellement structurées. Ces formes possèdent différents degrés de compaction et de structuration, lesquelles sont similaires à celles détectées de façon transitoires durant les réactions de repliement et dépliement. Le stopped-flow submilliseconde a été utilisé pour montrer que chaque étape précédemment identifiée, conduisant l'apoMb de sa forme dépliée à sa forme native (soit les réactions $U \rightleftharpoons I_a$, $I_a \rightleftharpoons I_b$, et $I_b \rightleftharpoons N$), présente les caractéristiques typiques d'une réaction à deux états. Les cinétiques submillisecondes mesurées par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, une sonde de la structure secondaire, sont similaires à celles mesurées par fluorescence des Trp, une sonde de la structure tertiaire. Cette étude permet de montrer que la formation rapide de l'intermédiaire I suit une transition hautement coopérative qui précède une seconde transition coopérative conduisant à la formation de N à partir de la forme I de l'apoMb.

Nous avons étudié l'effet d'osmolytes sur les cinétiques et la stabilité à l'équilibre des formes U, I et N de l'apoMb. Les effets observés ont permis de préciser la description de ces formes U, I et N. Les osmolytes, présents dans certains organismes adaptés à un environnement hostile, ont pour principal effet de stabiliser les protéines sous leur forme native en interagissant de façon défavorable avec le squelette peptidique. Cet effet (effet osmophobique) a été observé pour le TMAO, la sarcosine et le sucrose. Le sucrose modifie l'équilibre de la stabilité relative de la population Intermédiaire majoritaire I_a . L'augmentation de structure de I, à pH4 et en présence de sucrose, ne conduit pas à la formation de structure tertiaire nécessaire à la formation de la forme native. Il est possible que I_b ou une autre population intermédiaire soit favorisée dans ces conditions. Cependant, les études à l'équilibre ne permettent pas d'obtenir des informations sur les mécanismes ni sur les propriétés de l'état de transition. Obtenir ces informations nécessitent d'effectuer des études cinétiques. Des études cinétiques en présence de sucrose ont permis d'observer le comportement de la réactions $U \rightleftharpoons I_a$. Ces résultats indiquent que le sucrose déstabilise de manière relative la forme U et l'état de transition de la réaction $U \rightleftharpoons I_a$, par rapport à la forme I_a . L'étape limitante ne correspondrait donc pas à une compaction de la chaîne peptidique. Dans les mêmes

conditions, l'étude de la transition $I_b \rightleftharpoons N$ permet d'observer que l'état de transition présente des caractéristiques proches de l'intermédiaire.

Les effets osmophobiques ou d'encombrement moléculaire sur les intermédiaires de repliement sont encore très peu documentés. Ils peuvent avoir un intérêt, à la fois comme méthode complémentaire de mesure de la stabilité de protéines, et comme modèle de la complexité rencontrée lors du repliement *in vivo*.

Chapitre 4. BIBLIOGRAPHIE

A

- Adzhubei, A. A. and M. J. Sternberg (1993). "Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins." J Mol Biol **229**(2): 472-93.
- Akiyama, S., S. Takahashi, et al. (2000). "Stepwise formation of alpha-helices during cytochrome c folding." Nat Struct Biol **7**(6): 514-20.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**: 223.
- Arai, M., T. Ikura, et al. (1998). "Kinetic refolding of beta-lactoglobulin. Studies by synchrotron X-ray scattering, and circular dichroism, absorption and fluorescence spectroscopy." J Mol Biol **275**(1): 149-62.
- Arai, M. and K. Kuwajima (2000). "Role of the molten globule state in protein folding." Adv Protein Chem **53**: 209-82.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff (1985). "The stabilization of proteins by osmolytes." Biophys J **47**(3): 411-4.
- Avbelj, F. and J. Moult (1995). "Role of electrostatic screening in determining protein main chain conformational preferences." Biochemistry **34**(3): 755-64.

B

- Babul, J. and E. Stellwagen (1971). "The existence of heme-protein coordinate-covalent bonds in denaturing solvents." Biopolymers **10**(11): 2359-61.
- Bai, Y. (2003). "Hidden intermediates and levinthal paradox in the folding of small proteins." Biochem Biophys Res Commun **305**(4): 785-8.
- Bai, Y., T. R. Sosnick, et al. (1995). "Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange." Science **269**(5221): 192-7.
- Balbach, J., C. Steegborn, et al. (1999). "A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D and 2D real-time NMR spectroscopy." J Mol Biol **285**(2): 829-42.
- Baldwin, R. (1997). "The problem was to find the problem." Protein Sci. **6**((9)): 2031-4.
- Baldwin, R. L. (1995). "The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view." J Biomol NMR **5**(2): 103-9.
- Ballew, R. M., J. Sabelko, et al. (1996). "Direct observation of fast protein folding: the initial collapse of apomyoglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5759-64.
- Ballew, R. M., J. Sabelko, et al. (1996). "Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events." Nat Struct Biol **3**(11): 923-6.
- Bandarian, V., R. R. Poyner, et al. (1999). "Hydrogen atom exchange between 5'-deoxyadenosine and hydroxyethylhydrazine during the single turnover inactivation of ethanolamine ammonia-lyase." Biochemistry **38**(38): 12403-7.
- Banuelos, S. and A. Muga (1996). "Structural requirements for the association of native and partially folded conformations of alpha-lactalbumin with model membranes." Biochemistry **35**(13): 3892-8.
- Barrick, D. and R. L. Baldwin (1993). "Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding." Biochemistry **32**(14): 3790-6.
- Baskakov, I., A. Wang, et al. (1998). "Trimethylamine-N-oxide counteracts urea effects on rabbit muscle lactate dehydrogenase function: a test of the counteraction hypothesis." Biophys J **74**(5): 2666-73.
- Baum, J. and B. Brodsky (1999). "Folding of peptide models of collagen and misfolding in disease." Curr Opin Struct Biol **9**(1): 122-8.

- Berriz, G. F. and E. I. Shakhnovich (2001). "Characterization of the folding kinetics of a three-helix bundle protein via a minimalist Langevin model." J Mol Biol **310**(3): 673-85.
- Bertini, I., P. Turano, et al. (2004). "Cytochrome c and SDS: a molten globule protein with altered axial ligation." J Mol Biol **336**(2): 489-96.
- Bhuyan, A. K. (2002). "Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride." Biochemistry **41**(45): 13386-94.
- Blankenship, J. W. and P. E. Dawson (2003). "Thermodynamics of a designed protein catenane." J Mol Biol **327**(2): 537-48.
- Bogumil, R., C. L. Hunter, et al. (1994). "FTIR analysis of the interaction of azide with horse heart myoglobin variants." Biochemistry **33**(24): 7600-8.
- Bökenkamp, D. and S. L. Mayo (1998). "Microfabricated silicon mixers for submillisecond quench-flow analysis." Anal. Chem **70**: 232.
- Bolen, D. W. (2004). "Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization." Methods **34**(3): 312-22.
- Bolen, D. W. and I. V. Baskakov (2001). "The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding." J Mol Biol **310**(5): 955-63.
- Brems, D. N. and E. Stellwagen (1983). "Manipulation of the observed kinetic phases in the refolding of denatured ferricytochromes c." J Biol Chem **258**(6): 3655-60.
- Brenner, M. C., C. J. Murray, et al. (1989). "Rapid freeze- and chemical-quench studies of dopamine beta-monooxygenase: comparison of pre-steady-state and steady-state parameters." Biochemistry **28**(11): 4656-64.
- Breslow, R. and T. Guo (1990). "Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 167-9.
- Brown, C. R., L. Q. Hong-Brown, et al. (1997). "Correcting temperature-sensitive protein folding defects." J Clin Invest **99**(6): 1432-44.
- Brunori, M., B. Vallone, et al. (2000). "The role of cavities in protein dynamics: crystal structure of a photolytic intermediate of a mutant myoglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2058-63.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-66.
- Bullock, A. N., J. Henckel, et al. (1997). "Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14338-42.
- Bychkova, V. E., A. E. Dujsekina, et al. (1996). "Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface." Biochemistry **35**(19): 6058-63.
- Bychkova, V. E., R. H. Pain, et al. (1988). "The 'molten globule' state is involved in the translocation of proteins across membranes?" FEBS Lett **238**(2): 231-4.

C

- Callender, R. H., R. B. Dyer, et al. (1998). "Fast events in protein folding: the time evolution of primary processes." Annu Rev Phys Chem **49**: 173-202.
- Capaldi, A. P., M. C. Shastry, et al. (2001). "Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate." Nat Struct Biol **8**(1): 68-72.
- Carpenter, J. F. and J. H. Crowe (1989). "An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins." Biochemistry **28**(9): 3916-22.
- Carra, J. H., E. A. Anderson, et al. (1994). "Thermodynamics of staphylococcal nuclease denaturation. II. The A-state." Protein Sci **3**(6): 952-9.

- Chan, C. K., Y. Hu, et al. (1997). "Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1779-84.
- Chan, H. S. and K. A. Dill (1990). "Origins of structure in globular proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6388-92.
- Chance, B. (1964). "Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry." Academic Press, New York.
- Chellgren, B. W. and T. P. Creamer (2004). "Short Sequences of Non-Proline Residues Can Adopt the Polyproline II Helical Conformation." Biochemistry **43**(19): 5864-9.
- Cherepanov, A. V. and S. De Vries (2004). "Microsecond freeze-hyperquenching: development of a new ultrafast micro-mixing and sampling technology and application to enzyme catalysis." Biochim Biophys Acta **1656**(1): 1-31.
- Cheung, M. S., A. E. Garcia, et al. (2002). "Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 685-90.
- Chi, Z. and S. A. Asher (1999). "Ultraviolet resonance Raman examination of horse apomyoglobin acid unfolding intermediates." Biochemistry **38**(26): 8196-203.
- Chothia, C. (1992). "Proteins. One thousand families for the molecular biologist." Nature **357**(6379): 543-4.
- Chuang, J. L., R. M. Wynn, et al. (1999). "GroEL/GroES-dependent reconstitution of alpha2 beta2 tetramers of human mitochondrial branched chain alpha-ketoacid decarboxylase. Obligatory interaction of chaperonins with an alpha beta dimeric intermediate." J Biol Chem **274**(15): 10395-404.
- Clark, A. C. and C. Frieden (1999). "The chaperonin GroEL binds to late-folding non-native conformations present in native Escherichia coli and murine dihydrofolate reductases." J Mol Biol **285**(4): 1777-88.
- Cocco, M. J., Y. H. Kao, et al. (1992). "Structural comparison of apomyoglobin and metaquomyoglobin: pH titration of histidines by NMR spectroscopy." Biochemistry **31**(28): 6481-91.
- Colon, W., L. P. Wakem, et al. (1997). "Identification of the predominant non-native histidine ligand in unfolded cytochrome c." Biochemistry **36**(41): 12535-41.
- Cramer, W. A., J. B. Heymann, et al. (1995). "Structure-function of the channel-forming colicins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **24**: 611-41.
- Creighton, T. E. and J. J. Ewbank (1994). "Disulfide-rearranged molten globule state of alpha-lactalbumin." Biochemistry **33**(6): 1534-8.

D

- Daggett, V. and A. R. Fersht (2003). "Is there a unifying mechanism for protein folding?" Trends Biochem Sci **28**(1): 18-25.
- Dalby, P. A., M. Oliveberg, et al. (1998). "Folding intermediates of wild-type and mutants of barnase. I. Use of phi-value analysis and m-values to probe the cooperative nature of the folding pre-equilibrium." J Mol Biol **276**(3): 625-46.
- Davis-Searles, P. R., A. S. Morar, et al. (1998). "Sugar-induced molten-globule model." Biochemistry **37**(48): 17048-53.
- Deechongkit, S. and J. W. Kelly (2002). "The effect of backbone cyclization on the thermodynamics of beta-sheet unfolding: stability optimization of the PIN WW domain." J Am Chem Soc **124**(18): 4980-6.
- DeWeerd, K., V. Grigoryants, et al. (2001). "EPR-detected folding kinetics of externally located cysteine-directed spin-labeled mutants of iso-1-cytochrome c." Biochemistry **40**(51): 15846-55.
- Dill, K. A. (1990). "Dominant forces in protein folding." Biochemistry **29**(31): 7133-55.

- Dill, K. A. (1990). "The meaning of hydrophobicity." *Science* **250**(4978): 297-8.
- Dill, K. A. and H. S. Chan (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nat Struct Biol* **4**(1): 10-9.
- Dill, K. A. and D. Shortle (1991). "Denatured states of proteins." *Annu Rev Biochem* **60**: 795-825.
- Dinner, A. R., A. Sali, et al. (2000). "Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment." *Trends Biochem Sci* **25**(7): 331-9.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." *Nature* **426**(6968): 884-90.
- Dobson, C. M. (2004). "Principles of protein folding, misfolding and aggregation." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 3-16.
- Dobson, C. M. and M. Karplus (1999). "The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment." *Curr Opin Struct Biol* **9**(1): 92-101.
- Douglas E., A. E. A. (1965). "Temperature Jump Studies of Sperm Whale Metmyoglobin." *The Journal of Biological Chemistry* **240**(11): 4312-4315.
- Dubois, L., R. Caspar, et al. (2003). "Binuclear manganese compounds of potential biological significance. Part 2. Mechanistic study of hydrogen peroxide disproportionation by dimanganese complexes: the two oxygen atoms of the peroxide end up in a dioxo intermediate." *Inorg Chem* **42**(16): 4817-27.
- Dunbar, J., H. P. Yennawar, et al. (1997). "The effect of denaturants on protein structure." *Protein Sci* **6**(8): 1727-33.
- Dyson, H. J. and P. E. Wright (1996). "Insights into protein folding from NMR." *Annu Rev Phys Chem* **47**: 369-95.

E

- E Mayer, P. B. (1982). *Nature* **298**: 715-178.
- Eaton, W. A., V. Munoz, et al. (1997). "Submillisecond kinetics of protein folding." *Curr Opin Struct Biol* **7**(1): 10-4.
- Eftink, M. R. and M. C. Shastry (1997). "Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions." *Methods Enzymol* **278**: 258-86.
- Eggers, D. K. and J. S. Valentine (2001). "Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins." *J Mol Biol* **314**(4): 911-22.
- Eliezer, D., J. Chung, et al. (2000). "Native and non-native secondary structure and dynamics in the pH 4 intermediate of apomyoglobin." *Biochemistry* **39**(11): 2894-901.
- Eliezer, D. and P. E. Wright (1996). "Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR." *J Mol Biol* **263**(4): 531-8.
- Eliezer, D., J. Yao, et al. (1998). "Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding." *Nat Struct Biol* **5**(2): 148-55.
- Ellis, R. J. (1997). "Molecular chaperones: avoiding the crowd." *Curr Biol* **7**(9): R531-3.
- Ellis, R. J. (2001). "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated." *Trends Biochem Sci* **26**(10): 597-604.
- Ellis, R. J. (2001). "Molecular chaperones: inside and outside the Anfinsen cage." *Curr Biol* **11**(24): R1038-40.
- Ellis, R. J. (2003). "Protein folding: importance of the Anfinsen cage." *Curr Biol* **13**(22): R881-3.
- Elove, G. A., A. K. Bhuyan, et al. (1994). "Kinetic mechanism of cytochrome c folding: involvement of the heme and its ligands." *Biochemistry* **33**(22): 6925-35.

F

- Fandrigh, M., V. Forge, et al. (2003). "Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15463-8.
- Fenton, W. A. and A. L. Horwich (1997). "GroEL-mediated protein folding." Protein Sci **6**(4): 743-60.
- Fersht, A. R. (1997). "Nucleation mechanisms in protein folding." Curr Opin Struct Biol **7**(1): 3-9.
- Fetrow, J. S., A. Giammona, et al. (2002). "The protein folding problem: a biophysical enigma." Curr Pharm Biotechnol **3**(4): 329-47.
- Fink, A. L. (1998). "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." Fold Des **3**(1): R9-23.
- Fink, A. L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." Physiol Rev **79**(2): 425-49.
- Fink, A. L., L. J. Calciano, et al. (1994). "Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states." Biochemistry **33**(41): 12504-11.
- Flory, P. J. and P. R. Schimmel (1967). "Dipole moments in relation to configuration of polypeptide chains." J Am Chem Soc **89**(26): 6807-13.

G

- Garcia, C., C. Nishimura, et al. (2000). "Changes in the apomyoglobin folding pathway caused by mutation of the distal histidine residue." Biochemistry **39**(37): 11227-37.
- Gast, K., H. Damaschun, et al. (1994). "Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediate." Eur Biophys J **23**(4): 297-305.
- Geierstanger, B., M. Jamin, et al. (1998). "Protonation behavior of histidine 24 and histidine 119 in forming the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin." Biochemistry **37**(12): 4254-65.
- Gekko, K. and S. N. Timasheff (1981). "Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures." Biochemistry **20**(16): 4667-76.
- Georgescu, R. E., J. H. Li, et al. (1998). "Proline isomerization-independent accumulation of an early intermediate and heterogeneity of the folding pathways of a mixed alpha/beta protein, Escherichia coli thioredoxin." Biochemistry **37**(28): 10286-97.
- Giacometti, G. M., A. Da Ros, et al. (1975). "Equilibrium and kinetics of the reaction of Aplysia myoglobin with azide." Biochemistry **14**(8): 1584-8.
- Gilmanshin, R., R. H. Callender, et al. (1998). "The core of apomyoglobin E-form folds at the diffusion limit." Nat Struct Biol **5**(5): 363-5.
- Gilmanshin, R., R. B. Dyer, et al. (1997). "Structural heterogeneity of the various forms of apomyoglobin: implications for protein folding." Protein Sci **6**(10): 2134-42.
- Gilmanshin, R., M. Gulotta, et al. (2001). "Structures of apomyoglobin's various acid-destabilized forms." Biochemistry **40**(17): 5127-36.
- Gladwin, S. T. and P. A. Evans (1996). "Structure of very early protein folding intermediates: new insights through a variant of hydrogen exchange labelling." Fold Des **1**(6): 407-17.
- Goldenberg, D. P. and T. E. Creighton (1984). "Folding pathway of a circular form of bovine pancreatic trypsin inhibitor." J Mol Biol **179**(3): 527-45.
- Goodsell, D. S. (1991). "Inside a living cell." Trends Biochem Sci **16**(6): 203-6.
- Goto, Y. and A. L. Fink (1994). "Acid-induced folding of heme proteins." Methods Enzymol **232**: 3-15.
- Goto, Y., N. Takahashi, et al. (1990). "Mechanism of acid-induced folding of proteins." Biochemistry **29**(14): 3480-8.
- Grantcharova, V. P., D. S. Riddle, et al. (2000). "Long-range order in the src SH3 folding transition state." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7084-9.

- Griko, Y. V., E. Freire, et al. (1995). "The unfolding thermodynamics of c-type lysozymes: a calorimetric study of the heat denaturation of equine lysozyme." J Mol Biol **252**(4): 447-59.
- Griko, Y. V. and P. L. Privalov (1994). "Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding." J Mol Biol **235**(4): 1318-25.
- Griko, Y. V., P. L. Privalov, et al. (1988). "Thermodynamic study of the apomyoglobin structure." J Mol Biol **202**(1): 127-38.
- Gulotta, M., R. Gilmanshin, et al. (2001). "Core formation in apomyoglobin: probing the upper reaches of the folding energy landscape." Biochemistry **40**(17): 5137-43.
- Gutin, A. M., V. I. Abkevich, et al. (1995). "Is burst hydrophobic collapse necessary for protein folding?" Biochemistry **34**(9): 3066-76.

H

- Ha, J. H. and S. N. Loh (1998). "Changes in side chain packing during apomyoglobin folding characterized by pulsed thiol-disulfide exchange." Nat Struct Biol **5**(8): 730-7.
- Hagen, S. J., J. Hofrichter, et al. (1996). "Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11615-7.
- Hagmann, M. (1999). "New insights into cystic fibrosis ion channel." Science **286**(5439): 388-9.
- Hall, D. and A. P. Minton (2003). "Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges." Biochim Biophys Acta **1649**(2): 127-39.
- Hammack, B., S. Godbole, et al. (1998). "Cytochrome c folding traps are not due solely to histidine-heme ligation: direct demonstration of a role for N-terminal amino group-heme ligation." J Mol Biol **275**(5): 719-24.
- Harper, J. D. and P. T. Lansbury, Jr. (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." Annu Rev Biochem **66**: 385-407.
- Harrison (1985). "Is there a single pathway for folding of polypeptide chain?" Proc. Natl Acad. Sci. **82**: 4028.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-9.
- Haruta, N. and T. Kitagawa (2002). "Time-resolved UV resonance Raman investigation of protein folding using a rapid mixer: characterization of kinetic folding intermediates of apomyoglobin." Biochemistry **41**(21): 6595-604.
- Hatters, D. M., A. P. Minton, et al. (2002). "Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II." J Biol Chem **277**(10): 7824-30.
- Hayer-Hartl, M. K., J. J. Ewbank, et al. (1994). "Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin." Embo J **13**(13): 3192-202.
- Heidary, D. K., L. A. Gross, et al. (1997). "Evidence for an obligatory intermediate in the folding of interleukin-1 beta." Nat Struct Biol **4**(9): 725-31.
- Hiromi, K. (1979). "Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory & Practice." John Wiley & Sons, New York.
- Hirota, N., K. Mizuno, et al. (1998). "Group additive contributions to the alcohol-induced alpha-helix formation of melittin: implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins." J Mol Biol **275**(2): 365-78.
- Holm, L. and C. Sander (1996). "Mapping the protein universe." Science **273**(5275): 595-603.

- Hornemann, S. and R. Glockshuber (1998). "A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6010-4.
- Houry, W. A., D. M. Rothwarf, et al. (1996). "Circular dichroism evidence for the presence of burst-phase intermediates on the conformational folding pathway of ribonuclease A." Biochemistry **35**(31): 10125-33.
- Houry, W. A. and H. A. Scheraga (1996). "Structure of a hydrophobically collapsed intermediate on the conformational folding pathway of ribonuclease A probed by hydrogen-deuterium exchange." Biochemistry **35**(36): 11734-46.
- Hughson, F. M., P. E. Wright, et al. (1990). "Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate." Science **249**(4976): 1544-8.

I

- Ikai, A., W. W. Fish, et al. (1973). "Kinetics of unfolding and refolding of proteins. II. Results for cytochrome c." J Mol Biol **73**(2): 165-84.
- Ikai, A. and C. Tanford (1971). "Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins." Nature **230**(5289): 100-2.
- Ivancich, A., H. M. Jouve, et al. (1997). "EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates." Biochemistry **36**(31): 9356-64.
- Ivankov, D. N. and A. V. Finkelstein (2001). "Theoretical study of a landscape of protein folding-unfolding pathways. Folding rates at midtransition." Biochemistry **40**(33): 9957-61.

J

- Jackson, S. E. (1998). "How do small single-domain proteins fold?" Fold Des **3**(4): R81-91.
- Jamin, M. (2004). "Apomyoglobin folding process." Prot. Peptide. Lett. **In press**.
- Jamin, M., M. Antalik, et al. (2000). "The unfolding enthalpy of the pH 4 molten globule of apomyoglobin measured by isothermal titration calorimetry." Protein Sci **9**(7): 1340-6.
- Jamin, M. and R. L. Baldwin (1996). "Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin." Nat Struct Biol **3**(7): 613-8.
- Jamin, M. and R. L. Baldwin (1998). "Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin." J Mol Biol **276**(2): 491-504.
- Jamin, M., B. Geierstanger, et al. (2001). "The pKa of His-24 in the folding transition state of apomyoglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6127-31.
- Jamin, M., S. R. Yeh, et al. (1999). "Submillisecond unfolding kinetics of apomyoglobin and its pH 4 intermediate." J Mol Biol **292**(3): 731-40.
- Jana, R., T. R. Hazbun, et al. (1998). "Single-chain lambda Cro repressors confirm high intrinsic dimer-DNA affinity." Biochemistry **37**(18): 6446-55.
- Jemth, P., S. Gianni, et al. (2004). "Demonstration of a low-energy on-pathway intermediate in a fast-folding protein by kinetics, protein engineering, and simulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6450-5.
- Jennings, P. A. and P. E. Wright (1993). "Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin." Science **262**(5135): 892-6.
- Jones, C. M., E. R. Henry, et al. (1993). "Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11860-4.

K

- Kataoka, M. and Y. Goto (1996). "X-ray solution scattering studies of protein folding." Fold Des **1**(5): R107-14.

- Kataoka, M., I. Nishii, et al. (1995). "Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering." J Mol Biol **249**(1): 215-28.
- Kauzmann, W. (1956). "Structural factors in protein denaturation." J Cell Physiol **47**(Suppl 1): 113-31.
- Kay, M. S. and R. L. Baldwin (1996). "Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate." Nat Struct Biol **3**(5): 439-45.
- Kay, M. S. and R. L. Baldwin (1998). "Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate." Biochemistry **37**(21): 7859-68.
- Kay, M. S., C. H. Ramos, et al. (1999). "Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2007-12.
- Kaya, H. and H. S. Chan (2003). "Solvation effects and driving forces for protein thermodynamic and kinetic cooperativity: how adequate is native-centric topological modeling?" J Mol Biol **326**(3): 911-31.
- Kelly, J. W. (1998). "The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways." Curr Opin Struct Biol **8**(1): 101-6.
- Kendrew, J. C. (1963). "Myoglobin and the structure of proteins." Science **139**: 1259-66.
- Khan, F., J. I. Chuang, et al. (2003). "The kinetic pathway of folding of barnase." J Mol Biol **333**(1): 169-86.
- Khorasanizadeh, S., I. D. Peters, et al. (1996). "Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues." Nat Struct Biol **3**(2): 193-205.
- Kim, P. S. and R. L. Baldwin (1990). "Intermediates in the folding reactions of small proteins." Annu Rev Biochem **59**: 631-60.
- Kim, Y. S., L. S. Jones, et al. (2003). "Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins." Protein Sci **12**(6): 1252-61.
- Kitahara, R., H. Yamada, et al. (2002). "High pressure NMR reveals that apomyoglobin is an equilibrium mixture from the native to the unfolded." J Mol Biol **320**(2): 311-9.
- Klein-Seetharaman, J., M. Oikawa, et al. (2002). "Long-range interactions within a nonnative protein." Science **295**(5560): 1719-22.
- Koshiha, T., T. Hayashi, et al. (1999). "Expression of a synthetic gene encoding canine milk lysozyme in Escherichia coli and characterization of the expressed protein." Protein Eng **12**(5): 429-35.
- Krantz, B. A., L. Mayne, et al. (2002). "Fast and slow intermediate accumulation and the initial barrier mechanism in protein folding." J Mol Biol **324**(2): 359-71.
- Kubelka, J., J. Hofrichter, et al. (2004). "The protein folding 'speed limit'." Curr Opin Struct Biol **14**(1): 76-88.
- Kuwajima, K. (1989). "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure." Proteins **6**(2): 87-103.
- Kuwajima, K. and M. Arai (2000). The molten globule state : the physical picture and biological significance. Frontiers in molecular biology, Oxford university press: 138-173.
- L**
- Ladurner, A. G. and A. R. Fersht (1997). "Glutamine, alanine or glycine repeats inserted into the loop of a protein have minimal effects on stability and folding rates." J Mol Biol **273**(1): 330-7.
- Lansbury, P. T., Jr. (1999). "Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3342-4.

- Laurents, D. V., M. Bruix, et al. (1998). "A pulse-chase-competition experiment to determine if a folding intermediate is on or off-pathway: application to ribonuclease A." J Mol Biol **283**(3): 669-78.
- Lecomte, J. T., S. F. Sukits, et al. (1999). "Conformational properties of native sperm whale apomyoglobin in solution." Protein Sci **8**(7): 1484-91.
- Levinthal, C. (1968). "Are there pathways for protein folding?" Journal of chime. Phys. **65**: 44.
- Liang, H., W. S. Sandberg, et al. (1993). "Genetic fusion of subunits of a dimeric protein substantially enhances its stability and rate of folding." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7010-4.
- Lietzow, M. A., M. Jamin, et al. (2002). "Mapping long-range contacts in a highly unfolded protein." J Mol Biol **322**(4): 655-62.
- Lin, T. Y. and S. N. Timasheff (1996). "On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins." Protein Sci **5**(2): 372-81.
- Liu, Y. and D. W. Bolen (1995). "The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes." Biochemistry **34**(39): 12884-91.
- Loh, S. N., M. S. Kay, et al. (1995). "Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5446-50.
- Luo, Y., M. S. Kay, et al. (1997). "Cooperativity of folding of the apomyoglobin pH 4 intermediate studied by glycine and proline mutations." Nat Struct Biol **4**(11): 925-30.

M

- Maki, K., T. Ikura, et al. (1999). "Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease." Biochemistry **38**(7): 2213-23.
- Marmorino, J. L., M. Lehti, et al. (1998). "Native tertiary structure in an A-state." J Mol Biol **275**(2): 379-88.
- Matouschek, A. (2003). "Protein unfolding--an important process in vivo?" Curr Opin Struct Biol **13**(1): 98-109.
- Matouschek, A. and B. S. Glick (2001). "Barreling through the outer membrane." Nat Struct Biol **8**(4): 284-6.
- Maurus, R., R. Bogumil, et al. (1998). "Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and the His-64-->Thr variant." Biochem J **332** (Pt 1): 67-74.
- Mayor, U., N. R. Guydosh, et al. (2003). "The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds." Nature **421**(6925): 863-7.
- Minton, A. P. (1992). "Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity." Biophys J **63**(4): 1090-100.
- Minton, A. P. (2000). "Effect of a concentrated "inert" macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaotropes: a statistical-thermodynamic model." Biophys J **78**(1): 101-9.
- Miranker, A., C. V. Robinson, et al. (1993). "Detection of transient protein folding populations by mass spectrometry." Science **262**(5135): 896-900.
- Moodie, A. D., R. H. Mitchell, et al. (1990). "A gas-flow cryostat for use in freeze-quench studies: design and application to discontinuous pre-steady-state spectral analyses." Anal Biochem **189**(1): 103-6.
- Moran, L. B., J. P. Schneider, et al. (1999). "Transition state heterogeneity in GCN4 coiled coil folding studied by using multisite mutations and crosslinking." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10699-704.

- Morgan, C. J., A. Miranker, et al. (1998). "Characterization of collapsed states in the early stages of the refolding of hen lysozyme." Biochemistry **37**(23): 8473-80.
- Morozova-Roche, L. A., C. C. Arico-Muendel, et al. (1997). "Structural characterisation and comparison of the native and A-states of equine lysozyme." J Mol Biol **268**(5): 903-21.
- Munoz, V., P. A. Thompson, et al. (1997). "Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation." Nature **390**(6656): 196-9.

N

- Nagi, A. D. and L. Regan (1997). "An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein." Fold Des **2**(1): 67-75.
- Nishii, I., M. Kataoka, et al. (1994). "Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding." Biochemistry **33**(16): 4903-9.
- Nishimura, C., H. J. Dyson, et al. (2002). "The apomyoglobin folding pathway revisited: structural heterogeneity in the kinetic burst phase intermediate." J Mol Biol **322**(3): 483-9.
- Nishimura, C., P. E. Wright, et al. (2003). "Role of the B helix in early folding events in apomyoglobin: evidence from site-directed mutagenesis for native-like long range interactions." J Mol Biol **334**(2): 293-307.
- Nolting, B., R. Golbik, et al. (1995). "Submillisecond events in protein folding." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10668-72.
- Nolting, B., R. Golbik, et al. (1997). "The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 826-30.

O

- Onufriev, A., D. A. Case, et al. (2003). "Structural details, pathways, and energetics of unfolding apomyoglobin." J Mol Biol **325**(3): 555-67.

P

- Park, S. H., M. C. Shastry, et al. (1999). "Folding dynamics of the B1 domain of protein G explored by ultrarapid mixing." Nat Struct Biol **6**(10): 943-7.
- Pascher, T., J. P. Chesick, et al. (1996). "Protein folding triggered by electron transfer." Science **271**(5255): 1558-60.
- Pelham, H. R. (1999). "The Croonian Lecture 1999. Intracellular membrane traffic: getting proteins sorted." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1388): 1471-8.
- Peng, Z. Y. and P. S. Kim (1994). "A protein dissection study of a molten globule." Biochemistry **33**(8): 2136-41.
- Peterman, B. F. (1979). "Measurement of the Dead Time of a Fluorescence Stopped-Flow Instrument." Analytical Biochemistry **93**: 442-444.
- Plaxco, K. W. and D. Baker (1998). "Limited internal friction in the rate-limiting step of a two-state protein folding reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13591-6.
- Plaxco, K. W. and C. M. Dobson (1996). "Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding." Curr Opin Struct Biol **6**(5): 630-6.
- Pollack, L., M. W. Tate, et al. (1999). "Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small-angle x-ray scattering." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10115-7.
- Potekhin, S. and W. Pfeil (1989). "Microcalorimetric studies of conformational transitions of ferricytochrome c in acidic solution." Biophys Chem **34**(1): 55-62.
- Pradeep, L. and J. B. Udgaonkar (2002). "Differential salt-induced stabilization of structure in the initial folding intermediate ensemble of barstar." J Mol Biol **324**(2): 331-47.

- Pradeep, L. and J. B. Udgaonkar (2004). "Osmolytes induce structure in an early intermediate on the folding pathway of barstar." J Biol Chem **279**(39): 40303-13.
- Ptitsyn, O. B. (1995). "Molten globule and protein folding." Adv Protein Chem **47**: 83-229.

Q

- Qu, Y., C. L. Bolen, et al. (1998). "Osmolyte-driven contraction of a random coil protein." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9268-73.
- Qu, Y. and D. W. Bolen (2002). "Efficacy of macromolecular crowding in forcing proteins to fold." Biophys Chem **101-102**: 155-65.

R

- Radford, S. E. and C. M. Dobson (1999). "From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding." Cell **97**(3): 291-8.
- Ramachandran, G. N. S. (1968). "Conformation of polypeptides and proteins." Advance in Protein Chemistry. **23**: 283-438.
- Ramos, C. H., M. S. Kay, et al. (1999). "Putative interhelix ion pairs involved in the stability of myoglobin." Biochemistry **38**(30): 9783-90.
- Randall, L. L. and S. J. Hardy (1995). "High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding." Trends Biochem Sci **20**(2): 65-9.
- Raschke, T. M. and S. Marqusee (1997). "The kinetic folding intermediate of ribonuclease H resembles the acid molten globule and partially unfolded molecules detected under native conditions." Nat Struct Biol **4**(4): 298-304.
- Regenfuss, P. and R. M. Clegg (1987). "Diffusion-controlled association of a dye, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid, to a protein, bovine serum albumin, using a fast-flow microsecond mixer and stopped-flow." Biophys Chem **26**(1): 83-9.
- Regenfuss, P., R. M. Clegg, et al. "mixing liquids in microseconds." rev. Sci. Instrum. **56**: 283.
- Ren, J., K. Kachel, et al. (1999). "Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation." Science **284**(5416): 955-7.
- Robinson, C. R. and R. T. Sauer (1996). "Equilibrium stability and sub-millisecond refolding of a designed single-chain Arc repressor." Biochemistry **35**(44): 13878-84.
- Roder, H. and W. Colon (1997). "Kinetic role of early intermediates in protein folding." Curr Opin Struct Biol **7**(1): 15-28.
- Roder, H., G. A. Elove, et al. (1988). "Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR." Nature **335**(6192): 700-4.
- Roder, H. and M. R. Shastry (1999). "Methods for exploring early events in protein folding." Curr Opin Struct Biol **9**(5): 620-6.
- Roder, H. and K. Wuthrich (1986). "Protein folding kinetics by combined use of rapid mixing techniques and NMR observation of individual amide protons." Proteins **1**(1): 34-42.
- Rucker, A. L. and T. P. Creamer (2002). "Polyproline II helical structure in protein unfolded states: lysine peptides revisited." Protein Sci **11**(4): 980-5.
- Russo, A. T., J. Rosgen, et al. (2003). "Osmolyte effects on kinetics of FKBP12 C22A folding coupled with prolyl isomerization." J Mol Biol **330**(4): 851-66.

S

- Sabelko, J., J. Ervin, et al. (1999). "Observation of strange kinetics in protein folding." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6031-6.
- Sabelko, J., J. Erwin, et al. (1998). J. Chem. Phys. **B 102**: 1806-1819.
- Sanchez, I. E. and T. Kiefhaber (2003). "Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding." J Mol Biol **325**(2): 367-76.

- Santoro, M. M., Y. Liu, et al. (1992). "Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes." *Biochemistry* **31**(23): 5278-83.
- Sasahara, K., P. McPhie, et al. (2003). "Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding." *J Mol Biol* **326**(4): 1227-37.
- Sauder, J. M. and H. Roder (1998). "Amide protection in an early folding intermediate of cytochrome c." *Fold Des* **3**(4): 293-301.
- Scatena, L. F., M. G. Brown, et al. (2001). "Water at hydrophobic surfaces: weak hydrogen bonding and strong orientation effects." *Science* **292**(5518): 908-12.
- Schatz, G. and B. Dobberstein (1996). "Common principles of protein translocation across membranes." *Science* **271**(5255): 1519-26.
- Schellman, J. A. (1990). "A simple model for solvation in mixed solvents. Applications to the stabilization and destabilization of macromolecular structures." *Biophys Chem* **37**(1-3): 121-40.
- Schellman, J. A. and N. C. Gassner (1996). "The enthalpy of transfer of unfolded proteins into solutions of urea and guanidinium chloride." *Biophys Chem* **59**(3): 259-75.
- Schwartz, M. P., S. Huang, et al. (1999). "The structure of precursor proteins during import into mitochondria." *J Biol Chem* **274**(18): 12759-64.
- Schwarzinger, S., P. E. Wright, et al. (2002). "Molecular hinges in protein folding: the urea-denatured state of apomyoglobin." *Biochemistry* **41**(42): 12681-6.
- Semisotnov, G. V., H. Kihara, et al. (1996). "Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering." *J Mol Biol* **262**(4): 559-74.
- Semisotnov, G. V., N. A. Rodionova, et al. (1991). "Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe." *Biopolymers* **31**(1): 119-28.
- Serrano, L. (1995). "Comparison between the phi distribution of the amino acids in the protein database and NMR data indicates that amino acids have various phi propensities in the random coil conformation." *J Mol Biol* **254**(2): 322-33.
- Shastry, M. C., S. D. Luck, et al. (1998). "A continuous-flow capillary mixing method to monitor reactions on the microsecond time scale." *Biophys J* **74**(5): 2714-21.
- Shastry, M. C. and H. Roder (1998). "Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale." *Nat Struct Biol* **5**(5): 385-92.
- Shastry, M. C. and J. B. Udgaonkar (1995). "The folding mechanism of barstar: evidence for multiple pathways and multiple intermediates." *J Mol Biol* **247**(5): 1013-27.
- Shortle, D. (1996). "The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability." *Faseb J* **10**(1): 27-34.
- Shtilerman, M., G. H. Lorimer, et al. (1999). "Chaperonin function: folding by forced unfolding." *Science* **284**(5415): 822-5.
- Silow, M. and M. Oliveberg (2003). "High concentrations of viscosogens decrease the protein folding rate constant by prematurely collapsing the coil." *J Mol Biol* **326**(1): 263-71.
- Smith, J. S. and J. M. Scholtz (1996). "Guanidine hydrochloride unfolding of peptide helices: separation of denaturant and salt effects." *Biochemistry* **35**(22): 7292-7.
- Smith, L. J., K. M. Fiebig, et al. (1996). "The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins." *Fold Des* **1**(5): R95-106.
- Somero, G. N. (1986). "Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function." *Am J Physiol* **251**(2 Pt 2): R197-213.
- Song, J., P. Bai, et al. (1998). "Contribution of individual residues to formation of the native-like tertiary topology in the alpha-lactalbumin molten globule." *J Mol Biol* **280**(1): 167-74.

- Sono, M. and J. H. Dawson (1982). "Formation of low spin complexes of ferric cytochrome P-450-CAM with anionic ligands. Spin state and ligand affinity comparison to myoglobin." J Biol Chem **257**(10): 5496-502.
- Springer, B. A. and S. G. Sligar (1987). "High level expression of sperm whale myoglobine in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**: 8961-8965.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (1993). "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism." Anal Biochem **209**(1): 32-44.
- Sridevi, K., G. S. Lakshmikanth, et al. (2004). "Increasing stability reduces conformational heterogeneity in a protein folding intermediate ensemble." J Mol Biol **337**(3): 699-711.
- Svensson, M., H. Sabharwal, et al. (1999). "Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells." J Biol Chem **274**(10): 6388-96.

T

- Takahashi, S., Y. C. Ching, et al. (1995). "Microsecond generation of oxygen-bound cytochrome c oxidase by rapid solution mixing." J Biol Chem **270**(15): 8405-7.
- Takahashi, S., S. R. Yeh, et al. (1997). "Folding of cytochrome c initiated by submillisecond mixing." Nat Struct Biol **4**(1): 44-50.
- Tanaka, M., K. Matsuura, et al. (2003). "Activation of hydrogen peroxide in horseradish peroxidase occurs within approximately 200 micro s observed by a new freeze-quench device." Biophys J **84**(3): 1998-2004.
- Tanford, C. (1968). "Protein denaturation." Adv Protein Chem **23**: 121-282.
- Thomas, P. J., B. H. Qu, et al. (1995). "Defective protein folding as a basis of human disease." Trends Biochem Sci **20**(11): 456-9.
- Thompson, P. A., W. A. Eaton, et al. (1997). "Laser temperature jump study of the helix \rightleftharpoons coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a 'kinetic zipper' model." Biochemistry **36**(30): 9200-10.
- Timasheff, S. N. (1993). "The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?" Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 67-97.
- Trabi, M. and D. J. Craik (2002). "Circular proteins--no end in sight." Trends Biochem Sci **27**(3): 132-8.
- Travaglini-Allocatelli, C., S. Gianni, et al. (2003). "Exploring the cytochrome c folding mechanism: cytochrome c552 from thermus thermophilus folds through an on-pathway intermediate." J Biol Chem **278**(42): 41136-40.
- Tsui, V., C. Garcia, et al. (1999). "Quench-flow experiments combined with mass spectrometry show apomyoglobin folds through an obligatory intermediate." Protein Sci **8**(1): 45-9.

U

- Udgaonkar, J. B. and R. L. Baldwin (1988). "NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A." Nature **335**(6192): 694-9.
- Uversky, V. N., V. P. Kutysenko, et al. (1996). "Circularly permuted dihydrofolate reductase possesses all the properties of the molten globule state, but can resume functional tertiary structure by interaction with its ligands." Protein Sci **5**(9): 1844-51.
- Uversky, V. N., J. Li, et al. (2001). "Trimethylamine-N-oxide-induced folding of alpha-synuclein." FEBS Lett **509**(1): 31-5.
- Uversky, V. N. and O. B. Ptitsyn (1994). ""Partly folded" state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature." Biochemistry **33**(10): 2782-91.

Uzawa, T., S. Akiyama, et al. (2004). "Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1171-6.

V

Van den Berg, B., R. J. Ellis, et al. (1999). "Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation." Embo J **18**(24): 6927-33.

Vidugiris, G. J. and C. A. Royer (1998). "Determination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule, and unfolded states." Biophys J **75**(1): 463-70.

Viguera, A. R. and L. Serrano (1997). "Loop length, intramolecular diffusion and protein folding." Nat Struct Biol **4**(11): 939-46.

W

Walkenhorst, W. F., S. M. Green, et al. (1997). "Kinetic evidence for folding and unfolding intermediates in staphylococcal nuclease." Biochemistry **36**(19): 5795-805.

Wallon, G., G. Kryger, et al. (1997). "Crystal structures of Escherichia coli and Salmonella typhimurium 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from Thermus thermophilus." J Mol Biol **266**(5): 1016-31.

Wang, A. and D. W. Bolen (1997). "A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation." Biochemistry **36**(30): 9101-8.

Wang, A., A. D. Robertson, et al. (1995). "Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A." Biochemistry **34**(46): 15096-104.

Welch, W. J. and C. R. Brown (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperones **1**(2): 109-15.

Wetlaufer, D. B. and R. Lovrien (1964). "Induction of Reversible Structural Changes in Proteins by Nonpolar Substances." J Biol Chem **239**: 596-603.

Wikoff, W. R., L. Liljas, et al. (2000). "Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid." Science **289**(5487): 2129-33.

Wilkins, D. K., S. B. Grimshaw, et al. (1999). "Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques." Biochemistry **38**(50): 16424-31.

Williams, S., T. P. Causgrove, et al. (1996). "Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide." Biochemistry **35**(3): 691-7.

Wright, C. F., K. Lindorff-Larsen, et al. (2003). "Parallel protein-unfolding pathways revealed and mapped." Nat Struct Biol **10**(8): 658-62.

Y

Yancey, P. H., M. E. Clark, et al. (1982). "Living with water stress: evolution of osmolyte systems." Science **217**(4566): 1214-22.

Yancey, P. H. and G. N. Somero (1979). "Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes." Biochem J **183**(2): 317-23.

Yao, J., J. Chung, et al. (2001). "NMR structural and dynamic characterization of the acid-unfolded state of apomyoglobin provides insights into the early events in protein folding." Biochemistry **40**(12): 3561-71.

Yeh, S. R. and D. L. Rousseau (1999). "Ligand exchange during unfolding of cytochrome c." J Biol Chem **274**(25): 17853-9.

Z

- Zhou, H. X. (2002). "A Gaussian-chain model for treating residual charge-charge interactions in the unfolded state of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3569-74.
- Zhou, H. X. (2004). "Loops, linkages, rings, catenanes, cages, and crowders: entropy-based strategies for stabilizing proteins." Acc Chem Res **37**(2): 123-30.
- Zhou, H. X. (2004). "Polymer models of protein stability, folding, and interactions." Biochemistry **43**(8): 2141-54.
- Zimmerman, S. B. and S. O. Trach (1991). "Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli." J Mol Biol **222**(3): 599-620.

RESUME :

Un polypeptide néosynthétisé est capable de trouver rapidement le chemin vers sa structure tridimensionnelle finale, en passant par des intermédiaires partiellement structurés. L'acquisition d'information sur le rôle et l'importance de ces intermédiaires est rendue difficile parce qu'ils se forment très rapidement pendant la réaction de repliement et que cette période de temps n'est pas accessible aux appareils de mélange usuels.

L'objet de cette thèse était de caractériser les événements cinétiques initiaux du repliement des protéines, notamment de l'apomyoglobine (apoMb), en utilisant des appareils de mélange ultra-rapide. Un appareil de type stopped-flow équipé d'une micro-cuve a permis de diminuer le temps mort de ce type de mélangeur. Une réaction bimoléculaire (NATA et NBS), a permis d'évaluer le temps mort à $400 \pm 10 \mu\text{s}$, dans un mode d'utilisation permettant de suivre simultanément le signal de fluorescence et le signal de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain. L'apoMb est une protéine particulièrement intéressante pour l'étude des événements précoces du repliement des protéines. Le stopped-flow ultra rapide, a permis de suivre des cinétiques (k jusqu'à 1500 s^{-1}) et montré que chaque étape précédemment identifiée, conduisant l'apoMb de sa forme dépliée à sa forme native (soit les réactions $U \rightleftharpoons I_a$, $I_a \rightleftharpoons I_b$, et $I_b \rightleftharpoons N$), présente les caractéristiques typiques d'une réaction à deux états, hautement coopérative.

Nous avons étudié l'effet d'osmolytes sur les cinétiques et sur la stabilité à l'équilibre des formes U, I et N de l'apoMb. Des études cinétiques en présence de sucrose ont permis d'observer le comportement de la réaction $U \rightleftharpoons I_a$. Ces résultats indiquent que le sucrose déstabilise de manière relative la forme U et l'état de transition de la réaction $U \rightleftharpoons I_a$, par rapport à la forme I_a . L'étape limitante ne correspondrait donc pas à une compaction de la chaîne peptidique. Dans les mêmes conditions, l'étude de la transition $I_b \rightleftharpoons N$ permet d'observer que l'état de transition présente des caractéristiques proches de I_b . Ces résultats, décrivant l'effet osmophobique sur l'intermédiaire I, ainsi que des résultats préliminaires de l'effet d'encombrement moléculaire sur le repliement du cytochrome C, sont discutés dans ce mémoire.

TITLE : Study of initial kinetic events of apomyoglobin folding.

ABSTRACT :

A neo-synthesized polypeptide is able to find its specific pathway upon several accessible ways to its final three-dimensional structure by passing through partially structured intermediate in a very short time. Collecting data in order to improve our knowledge on this intermediate is crucial, but it's necessary to improve mixing apparatus to be able to record the protein fast events of folding.

The purpose of these thesis was to follow fast protein folding events, in particular apomyoglobin (apoMb), by using ultra fast mixing apparatus. A stopped-flow apparatus with a customized micro-cuve, decreases the mixing time. A bimolecular reaction (Nata & NBS) was used to determine a $400 \pm 10 \mu\text{s}$ dead time, in fluorescence and far UV circular dichroism modes. ApoMb is a particularly interesting protein for the study of early protein folding events. The ultra-fast stopped-flow allowed us to follow rapid kinetics (k up to 1500 s^{-1}). The data show that each previously identified steps leading unfolded apoMb to its native conformation, namely the $U \rightleftharpoons I_a$, the $I_a \rightleftharpoons I_b$ and the $I_b \rightleftharpoons N$ reactions, exhibits a two-state highly cooperative behaviour.

We studied the effects of osmolytes on the kinetics and on the equilibrium stability of U, I and N forms of apoMb. Fast kinetic studies in the presence of sucrose, allow to show the behaviour of the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction. These results show that sucrose destabilizes, the U form and the transition state of the $U \rightleftharpoons I_a$ reaction relative to the I_a form. The rate limiting step appears to precede compaction of the peptidic chain. In the same conditions the $I_b \rightleftharpoons N$ transition shows transition state characteristics close to those of the I_b state. These results, showing the osmophobic effect on the I intermediate, and also preliminary studies about molecular crowding on cytochrom C, are discussed in these manuscript.

Discipline : protein folding.

Key words : myoglobin, cytochrom C, fast folding kinetics, intermediates, molten globule, stopped-flow, freeze-quench, circular dichroism, fluorescence, osmolytes, sucrose, molecular crowding.

Intitulé et adresse du laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire dirigé par Florent GUILLAIN

CEA-Grenoble / DRDC / BMC 17, rue des Martyrs 38054 GRENOBLE CEDEX 9