



HAL
open science

Dynamique des protéines et de la couche d'hydratation étudiée par diffusion de neutrons et méthodes biophysiques complémentaires

Francois-Xavier Gallat

► **To cite this version:**

Francois-Xavier Gallat. Dynamique des protéines et de la couche d'hydratation étudiée par diffusion de neutrons et méthodes biophysiques complémentaires. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENY061 . tel-00758647

HAL Id: tel-00758647

<https://theses.hal.science/tel-00758647>

Submitted on 29 Nov 2012

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Francois-Xavier GALLAT

Thèse dirigée par **Martin WEIK** et
codirigée par **Joe ZACCAI**

préparée au sein de l'**Institut Laue-Langevin** et de l'**Institut de
Biologie Structurale**
dans l'**École Doctorale de Physique**

Dynamique des protéines et de la couche d'hydratation, par diffusion de neutrons et autres méthodes biophysiques

Thèse soutenue publiquement le **14 décembre 2011**,
devant le jury composé de :

M. Marc JAMIN

Professeur de l'université Joseph Fourier, Grenoble (Rapporteur)

M. Doug TOBIAS

Professeur de l'université de Californie-Irvine, Etats-Unis (Membre)

M. Paù BERNARDO

Chargé de recherche à l'université de Montpellier 2, Montpellier
(Rapporteur)

Mlle. Kathleen WOOD

Chargé de recherche à l'organisme australien des sciences nucléaires et
technologiques, Australie (Membre)

M. Joe ZACCAI

Directeur de recherche à l'Insitut Laue-Langevin, Grenoble (Membre)

M. Martin WEIK

Diecteur de recherche à l'Insitut de Biologie Structurale, Grenoble
(Membre)



Remerciements

Ce travail a été effectué en grande partie à l’Institut Laue-Langevin (ILL), au groupe Time-Of-Flight (TOF), sous la responsabilité d’Helmut Schober, au laboratoire de deutération de l’ILL (DLAB) sous la responsabilité de Michael Haertlein et Trevor Forsyth. Cette étude a de même été menée à l’Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (IBS), dans l’équipe Dynamop sous la responsabilité de Martin Weik. Je remercie ces personnes pour m’avoir accueilli dans ces différentes structures.

Je remercie Kathleen Wood, Marc Jamin, Antonio Cupane, Douglas Tobias, Pau Bernadó, Giuseppe Zaccai et Martin Weik pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Mes plus profonds remerciements vont à Martin Weik, Giuseppe Zaccai et Kathleen Wood, pour m’avoir suivi pendant cette thèse. Martin et Giuseppe, pour avoir été mes directeurs de thèse. Kathleen pour m’avoir initié et accompagné dans les expériences de diffusion neutronique avec beaucoup d’attention.

Le hasard a voulu que je rencontre Martin sur une ligne de lumière de l’ESRF, Giuseppe à l’UVHCI pour un stage en biochimie et diffusion de neutrons aux petits angles. Nos brèves rencontres à l’ESRF et l’UVHCI n’auraient pas dû avoir de suite jusqu’à ce que je reçoive par courrier électronique (français oblige) leur proposition de thèse sur les protéines intrinsèquement désordonnées. Trois excellentes années ont ensuite passé, en leur compagnie, de Chicago à Düsseldorf, en passant par Munich et terminant à Grenoble. Je tiens à remercier chaleureusement Martin pour son implication dans ce projet, à travers les collaborations qu’il a développé, ses combats sans fin et héroïques contre les tracasseries administratives, pour son attention envers moi, à la fois dans le cadre de ce projet mais aussi pour la suite de mon parcours professionnel. Un grand merci à Giuseppe, pour m’avoir donné l’occasion de découvrir la biochimie et la diffusion de neutrons, deux domaines dans lesquels j’ai pris beaucoup de plaisir à travailler, pour sa présence et ses conseils, à la fois pour la thèse et pour l’avenir.

Que Martine Moulin, du DLAB, qui m’a initié aux subtilités, aux plaisirs de la biochimie et de la purification de protéines, à la fermentation et à la deutération des protéines soit assurée de tout mes remerciements. La majeure partie de ces travaux a été rendue possible grâce à elle. Toute mon amitié va aussi à Marion Jasnin, pour son aide précieuse à propos du traitement des données de diffusion quasi-élastiques de neutrons, sa gentillesse et son attention en réponse à mes multiples questions durant sa présence à l’ILL.

Une grosse partie de mes remerciements vont à Jérôme Combet, mon collègue de bureau, pour nos nombreuses discussions sur la diffusion de neutrons (et autres sujets moins scientifiques) et ses

conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mathilde Lethier et Jacques-Philippe Colletier, de l'équipe Dynamop et Frank Gabel de l'équipe Elma. Mathilde Lethier pour avoir travaillé avec moi dans la bonne humeur au DLAB. Frank Gabel et Jacques-Philippe Colletier pour les nombreuses discussions scientifiques qui furent d'un grand soutien dans l'interprétation des résultats.

Il m'est agréable de devoir remercier Valérie Laux, du DLAB. Ses prises de positions (très souvent) à contre courant des miennes, sa bonne humeur au quotidien et nos nombreuses disputes sur la sécurité dans les laboratoires de biochimie resteront d'excellents souvenirs de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe du DLAB, en particulier Marie-Thérèse Dauvergne, pour ses multiples et délicates attentions, (pots de pâte à tartiner dont il convient de ne pas citer le nom mais tout le monde aura deviner laquelle, verveine bio, coups de marteau sonore divers et variés, carreaux de chocolat, croissanteries pour remotiver les troupes et légumes du jardin), Jean-Baptiste Artero, Manuel Blanc, Maxime Cuypers et Mélina Haupt, pour les nombreux cafés de 10h et les discussions de biochimie.

Je transmets mon amitié à toute l'équipe de l'ancien Laboratoire de Biophysique Moléculaire (LBM), en particulier Eugénie Carletti et Mylène Ferruit. Peu de temps passé avec eux mais une gentillesse des plus appréciée.

Un petit clin d'oeil à mes colocataires Perrine et Alexis qui m'ont récupéré en début de troisième année de thèse et supporté au quotidien, au moment où les choses deviennent un peu difficiles. Toutes mon amitié leur est acquise, ainsi que ma part dans nos (trop) nombreuses pastilles de lave-vaisselle.

La bande des futurs docteurs (et valeurs ajoutées), Justin, Christophe et Tifaine (almost "Just Married"), Ghislain et Christelle, Pierre, Mathias et Flora, Camille et Thomas. Pour certains, six ans dans le même bateau, de l'école d'ingénieurs à la fin de la thèse, pour d'autres moins longtemps mais toujours des excellents moments, des week-end pleins de sports, suivis de repas bien arrosés (et pas que d'eau), d'escalade, de ski de fond, d'alpinisme, de séances de cinéma et de musique. La science est par beaucoup de cotés un métier des plus intéressants, stimulants et variés, il n'en reste pas moins difficile par d'autres, en particulier en début de carrière. Tous mes voeux vous accompagnent donc pour la suite, à la fois professionnelle et personnelle (une répartition géographique variée et des pays exotiques pour les différents "post docs" est cependant souhaitée, point de chute oblige).

A mes parents, Dominique et Jean-Philippe. Que dire de plus que ce que l'on pense très fort mais que l'on ne dit pas souvent, à savoir combien on apprécie leur soutien et l'affection sans faille qu'ils nous apportent dans toutes les étapes importantes de la vie. Un grand merci du fond du coeur pour votre compréhension, pour la curiosité que vous avez su faire naître chez moi pour tout ce qui nous entoure.

Les derniers remerciements et non des moindres, à ma soeur Mathilde, à qui revient la meilleure place dans ces remerciements. Puisse sa crainte de ne pas y apparaître se dissiper et ne rester que le bonheur de l'avoir parfois loin des yeux (Bordeaux, Soudan, République Démocratique du Congo, Provence) mais jamais loin du coeur.

Table des matières

1	Dynamique des protéines. Protéines intrinsèquement désordonnées	3
1.1	Couche d'hydratation et paysage énergétique conformationnel des protéines	4
	Sous-états conformationnels d'une protéine	4
	Amplitudes et temps caractéristiques	5
	Couche d'hydratation	5
1.2	Couplage dynamique couche d'hydratation - macromolécules et fonctions biologiques	6
	Transition dynamique	6
	Influence du solvant sur les transitions dynamiques	7
	Conclusion sur l'hydratation	9
1.3	Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs)	10
1.3.1	Définition et fonctions associées	11
	Classification des IDPs	11
	Fonctions associées	13
1.3.2	Caractérisations biophysiques et biochimiques	14
	Cristallographie par rayons X	14
	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	14
	Caractérisation biochimiques	15
	Diffusion dynamique de lumière (DLS) et chromatographie par exclu- sion de taille	15
	Dichroïsme circulaire (CD)	15
1.3.3	IDPs, dynamique et hydratation	15
	Dynamique des protéines désordonnées	15
	Dynamique des couches d'hydratation dans les conformations désor- données	17
2	Diffusion de Neutrons et application à la dynamique des protéines	19
2.1	Diffusion de neutrons	20
2.1.1	Diffusions <i>cohérente</i> et <i>incohérente</i>	20
2.1.2	Deutération de protéines et hydratation des protéines	22
2.2	Diffusions <i>élastique</i> , <i>quasi-élastique</i> et <i>inélastique</i>	23
2.2.1	Diffusion élastique	24
	Déplacements carrés moyens (MSDs)	24
	Constante de force apparente	26
2.2.2	Diffusion quasi-élastique	26
	Analyse théorique d'un spectre de diffusion	27

	Expression du facteur de structure dynamique diffusif	28
	Expression finale de la section efficace dynamique	29
	Limite de l'approche	29
	Facteur de structure élastique incohérent (EISF)	29
2.2.3	Procédure de traitements des spectres quasi-élastiques	29
2.3	Instruments de diffusion de neutrons	30
2.3.1	Spectromètre à rétro-diffusion	30
	Résolution d'un spectromètre à rétro-diffusion	31
	Spectromètres utilisés	31
2.3.2	Spectromètre à temps de vol	32
	Résolution d'un spectromètre à temps de vol	32
	Spectromètre utilisé	32
2.4	Relation entre diffusion élastique et quasi-élastique de neutrons	33
3	Dynamique des protéines désordonnées par diffusion élastique de neutrons. Couplage avec l'eau d'hydratation	38
3.1	Dynamique des IDP et de leur eaux d'hydratation	48
3.1.1	Problématiques et motivations	48
3.1.2	Systèmes biologiques : les protéines Tau et MBP	48
	La protéine Tau	48
	La Maltose Binding Protein (MBP)	49
3.1.3	Biochimie de la protéine Tau et culture de bactéries par fermentation	50
	Biologie moléculaire	50
	Milieu minimum et adaptation des bactéries	50
	Croissance de bactéries en milieu minimum	51
	Test d'expression	51
	Culture des bactéries par fermentation	52
	Purification de la protéine Tau	53
	Diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine Tau	56
3.1.4	Préparation et caractérisation des échantillons pour la diffusion de neutrons	56
	Hydratation des échantillons	56
	Caractérisation de l'hydratation des échantillons sur IN16	57
	Hydratation des échantillons HTau et DTau	58
	Caractérisation de l'hydratation des échantillons sur D16	58
3.1.5	Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de Tau	60
	Collecte des données	60
	Traitements des données	60
3.1.6	Résultats et discussion	60
3.2	Dynamique des protéines dépliées par mutations en conditions natives	70
3.2.1	Problématiques et motivations	70
3.2.2	Système biologique : la MBP dépliée par mutations ou MBP0	70
3.2.3	Diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine MBP0	71
3.2.4	Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons	72
3.2.5	Caractérisation de la MBP0 en solution par chromatographie d'exclusion de taille	72
3.2.6	Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de MBP0	75
	Collecte des données	75

	Traitement des données	75
3.2.7	Résultats et discussion	76
3.3	Conclusion	78
4	Dynamique de la couche d'hydratation des protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées, par diffusion quasi-élastique de neutrons et spectroscopie Terahertz	80
4.1	Problématiques et motivations	81
4.2	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de Tau et de MBP	82
	Collecte des données	82
	Traitement des données	82
4.2.1	Résultats et discussion	83
4.3	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à résolution intermédiaire ($20 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de Tau et de MBP	89
	Collecte des données	89
	Traitement des données	89
4.3.1	Résultats et discussion	90
4.4	Spectroscopie d'absorption terahertz des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP	93
	Influence de la nature de la macromolécule biologique	94
4.4.1	Résultats et discussion	95
4.5	Conclusion sur la dynamique fine de l'eau d'hydratation	96
5	Dynamique d'un hybride protéine-polymère par diffusion élastique de neutrons en absence de solvant	99
5.1	Problématiques et motivations	105
5.2	Système biologique : la myoglobine	105
5.3	Biochimie de la myoglobine deutérée	107
	Biologie moléculaire	107
	Purification de la myoglobine	107
5.4	Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons	108
5.5	Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons d'hybrides	108
	Collecte des données	108
	Traitement des données	109
5.5.1	Résultats et discussion	109
5.6	Conclusion	111
6	Dynamique des IDPs par diffusions élastique et quasi-élastique de neutrons	113
6.1	Problématiques et motivations	114
6.2	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de Tau et de MBP	114
	Collecte des données	114
	Traitement des données	114
6.2.1	Résultats et discussion	115
6.3	Mesure de diffusion incohérente élastique à basse résolution ($80 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de Tau et de RNase	120
	Collecte des données	121

	Traitement des données	121
6.3.1	Résultats et discussion	122
6.4	Conclusion	123
7	Dynamique des groupements méthyles par diffusion élastique de neutrons	125
7.1	Problématiques et motivations	130
7.2	Système biologique : la calbindine	130
7.3	Marquage spécifique de la protéine calbindine	131
7.3.1	Production de la calbindine avec marquages isotopiques	131
	Marquage avec les méthyles hydrogénés	131
	Marquage avec les lysines hydrogénés dans les protéines deutérées	133
7.3.2	Purification de la calbindine	133
	Vérification du marquage isotopique	134
7.4	Préparation des échantillons de poudre de protéines pour la diffusion de neutrons	135
7.5	Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de calbindine marquée	137
	Collecte des données	137
	Traitement des données	137
7.5.1	Résultats et discussion	137
7.6	Conclusion	140
8	Conclusion générale et perspectives	143
	Bibliographie	147
A	Comparaisons des paramètres physico-chimiques et biochimiques des différents échantillons	156
A.1	Comparaison des systèmes	156
B	Récapitulatif des caractéristiques des échantillons	159
B.1	Récapitulatif des échantillons	159
B.2	Calcul des sections efficaces de diffusion	160
C	Mesures complémentaires de diffusion incohérente élastique de neutrons	162
C.1	Reproductibilité des mesures	162
C.1.1	Résultats de deux mesures de diffusion incohérente élastiques sur la protéine Tau	162
C.2	Comparaison des instruments IN16 et SPHERES pour des mesures de diffusion incohérente élastique	163
C.2.1	Résultats obtenus avec l'échantillon DTau	163
C.2.2	Résultats obtenus avec l'échantillon HMBP _{soluble}	164
C.3	Influence du poids moléculaire sur la dynamique de la protéine	166
C.3.1	Résultats obtenus avec les échantillons de protéine MBP, RNase et myoglobine	166
D	Analyse de la qualité des fits des spectres quasi-élastiques	167
D.1	Résultats de l'approche par deux lorentziennes	167

Avant Propos

Qu'elle soit sous forme liquide, solide, ou gazeuse, l'eau s'est avérée être un des deux seuls composés qui diffère thermodynamiquement des autres corps purs (volume de la glace supérieur à celui de l'eau liquide). Ces comportements atypiques en font un élément des plus singuliers et pourtant ubiquitaire dans le développement de la vie animale et végétale. La présence de la vie est elle-même liée à la coexistence des trois phases de l'eau. La notion d'eau en biologie a donc toujours été considérée comme cruciale et son étude reste encore à l'heure actuelle un sujet sensible. Controverses non résolues et certitudes se côtoient, en particulier sur l'influence de l'eau dans la dynamique des systèmes biologiques. L'eau, comme *élément rigidifiant*, en jouant le rôle de médiateur dans le repliement des protéines et qui prend en charge les groupements hydrophiles et permettant à ceux hydrophobes de se rassembler en un coeur isolé du solvant. Mais aussi l'eau comme *élément source de flexibilité*, en interagissant avec les éléments de surface d'une protéine.

L'eau joue donc un rôle bien plus subtil et ambigu qu'il n'y paraît. Cette diversité de dynamique et de comportements thermodynamiques viendra de plus s'enrichir avec la variété de macromolécules biologiques et de la nature de l'interaction que ces dernières auront avec l'eau. Cela a ouvert la voie à un grand nombre d'études en biophysiques sur les systèmes tels que l'eau dans différentes bactéries (halophiles, mésophiles, thermophiles et psychrophiles), ou encore autour de protéines, membranaires ou globulaires mais aussi d'acides nucléiques. Récemment, l'attention s'est portée sur la classe des protéines désordonnées, et sur l'étude de leur dynamique. Ces protéines ne possèdent que peu de structures résiduelles et il a été supposé que cette absence d'élément rigidifiant devait avoir un impact sur la dynamique à l'échelle de l'atome. Cette classe de protéines vient s'ajouter à la liste des nombreux systèmes biologiques dont il reste encore à caractériser la dynamique. Ce travail se propose d'explorer cette thématique, chez les protéines globulaires et désordonnées, et d'approfondir la relation que l'eau entretient avec ces macromolécules biologiques.

Ce travail sur la dynamique des protéines, en particulier désordonnées et globulaires, a été initié par Arthur Laganowski, David Eisenberg (Université de Californie, Los Angeles), Jacques-Philippe Colletier (Institut de Biologie Structurale), Martine Moulin et Michael Haertlein (ILL/DLAB) pour l'aspect biochimie. Il fait suite aux travaux menés par Giuseppe Zaccai (Institut Laue-Langevin), Martin Weik (Institut de Biologie Structurale) et Kathleen Wood (ANSTO) sur l'étude de la dynamique par diffusion incohérente de neutrons des protéines, globulaires et membranaires, et de la relation que celles-ci entretiennent avec l'eau.

INTRODUCTION

Dynamique des protéines. Protéines intrinsèquement désordonnées

Sommaire

1.1	Couche d'hydratation et paysage énergétique conformationnel des protéines	4
1.2	Couplage dynamique couche d'hydratation - macromolécules et fonctions biologiques	6
1.3	Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs)	10
1.3.1	Définition et fonctions associées	11
1.3.2	Caractérisations biophysiques et biochimiques	14
1.3.3	IDPs, dynamique et hydratation	15

DANS CE PREMIER chapitre sont présentés quelques aspects de la dynamique des protéines et de leur eau d'hydratation, couche d'eau indispensable à la fonction biologique. Les différents mouvements présents dans une protéine seront présentés. Nous verrons aussi que ces derniers sont influencés, voire même générés par la présence d'une couche d'hydratation dynamique. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation de la classe des protéines dites, intrinsèquement désordonnées. Cette nouvelle classe, dont l'intérêt porté par la communauté biologique est croissant, présente certaines particularités qui amènent de nouveaux éclairages sur le fonctionnement de la cellule. Une brève introduction de leurs caractéristiques et de leur fonction sera faite.

1.1 Couche d'hydratation et paysage énergétique conformationnel des protéines

Le règne animal et végétal a toujours déployé des trésors de sélection afin de survivre et de prospérer dans de vastes gammes de conditions, jusqu'à des températures extrêmes de froid et de chaud, des concentrations de sel très élevées, des pH extrêmement acides ou alcalins, des doses de radiation énormes et des pressions pouvant aller jusqu'à des centaines d'atmosphères (1). Ces évolutions se font par une adaptation constante du génome face à l'environnement, qui résulte en une modification dynamique du milieu intracellulaire. Des travaux réalisés sur différentes bactéries (psychrophiles, mésophiles et thermophiles) ayant chacune des exigences physiologiques particulières ont permis de mettre en évidence cette variabilité dynamique au niveau moléculaire (2). En mesurant¹ les amplitudes moyennes des mouvements des composants (ADN, ARN, lipides, polysaccharides) pour chacune des bactéries, Tehei et collaborateurs ont pu mettre en évidence un lien entre thermo-adaptation et dynamique interne : une diminution de rigidité est associée à une température physiologique basse, de manière à garder une amplitude moyenne des mouvements constante. En revanche, une augmentation de la rigidité dans le cas des thermophiles a permis de maintenir la stabilité à des températures élevées, tout en fournissant la flexibilité requise. Une révélation importante de cette publication réside dans l'amplitude moyenne à chaque température physiologique (obtenue par extrapolation des données) s'est avérée être constante à quelques dixièmes d'Ångström près ; c'est la notion *d'état équivalent* pour la fonction biologique. Cette modulation de la dynamique à travers le règne du vivant montre l'importance que cette dernière prend dans le contexte de la fonction biologique de ces systèmes.

La dynamique à l'échelle moléculaire revêt donc une grande importance à l'échelle de la cellule. Nous distinguons deux classes principales d'effets sur la dynamique moléculaire d'une protéine, la séquence en acide aminés et l'environnement. On pourrait affirmer que la couche d'hydratation représente le lien entre ces deux classes d'effets. La portée de cette thèse est d'explorer les aspects dynamiques de ce lien pour plusieurs systèmes d'intérêt biologique.

Sous-états conformationnels d'une protéine Frauenfelder et collaborateurs ont introduit la notion de *sous-états conformationnels* à partir d'une analyse de la cinétique de la religation du monoxyde de carbone après photo-dissociation par flash laser dans la myoglobine (3, 4). L'existence d'une hétérogénéité de dynamique² au sein de la protéine, même à 80 K ont amené les auteurs à supposer l'existence d'un ensemble d'états de basses énergies, appelés *sous-états conformationnels*, séparés chacun par des barrières énergétiques de faible amplitude. L'ensemble de ces sous-états forme le *paysage énergétique conformationnel* d'une protéine et les différentes conformations associées sont le reflet de la grande variété dans les mouvements des chaînes latérales et de leurs interactions mutuelles.

1. Par diffusion incohérente de neutrons

2. Par analyse des facteurs de Debye-Waller obtenus pour chaque atome par cristallographie de protéines aux rayons-X

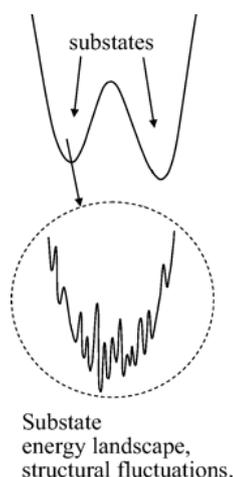


FIGURE 1.1 – Paysage énergétique simplifié d’une protéine proposé par (5). Les différents minima locaux représentent les sous-états conformationnels. Des analyses fines ont suggéré que chacun de ces minima était lui-même scindé en plusieurs minima dans un paysage hiérarchique.

Amplitudes et temps caractéristiques Les études spectroscopiques et théoriques de dynamique moléculaire des protéines ont établi les échelles de longueur et de temps des différents mouvements, résumés dans le tableau 1.1

Mouvements	Amplitude (Å)	Log ₁₀ du temps carac. (s)
Vibration atomique	0.01 à 0.1	-14 à -13
Rotation des chaînes latérales	0.5 à 1	-12 à -10
Libration de groupes enfouis	0.5	-11 à -9
Déplacements relatifs de domaines	1 à 5	-11 à -7
Rotation des chaînes latérales enfouies	5	-4 à 0
Transition allostérique	1 à 5	-5 à 0
Dénaturation locale	5 à 10	-5 à +1

TABLE 1.1 – Mouvements (amplitudes et temps caractéristiques) présents dans une protéine. Extrait de (6)

Couche d’hydratation Des mesures de dynamique (en particulier par diffusion de neutrons) sur des poudres montrent cependant qu’une protéine déshydratée ne permet pas de rendre compte de cette grande diversité de mouvement. Des déplacements carrés moyens linéaires sont observés sur une large gamme de température (20-300 K) (7, 8) et la fonction biologique est absente. Si par contre, une couche d’eau par protéine, au minimum, est ajoutée au système, une dynamique supplémentaire s’ajoute et permet de reformer un paysage énergétique plus complexe et finalement de retrouver une fonction biologique (9). Il apparaît donc que la couche d’hydratation autour des macromolécules biologiques est d’une grande importance pour leur activité, probablement par effet dynamique. Cette couche d’hydratation a été mise en évidence par diffusion aux petits angles de neutrons et de rayons-X (10). En jouant sur le contraste solvant deutéré-hydrogéné, il est possible de faire apparaître une couche d’eau autour de la protéine, de l’ordre de 10% plus dense que l’eau libre (10) et qui présente la caractéristique de rester dynamique même à basses températures. Des mesures de spectroscopie

THz (11) montrent qu'en solution, les mouvements collectifs de l'eau sont affectés jusqu'à 10 Å au delà de la protéine, 10 Å dans lesquels les propriétés dynamiques de l'eau diffèrent sensiblement de l'eau libre. Ces deux mesures sont complémentaires, l'une mesurant une densité locale, l'autre une excitation qui n'influe pas de manière significative sur la densité. Intéressons nous plus en détail aux rôles de cette couche d'hydratation.

Wolfgang Doster, dans (12), rappelle que "la couche d'hydratation agit comme un lubrifiant qui module les barrières du paysage énergétique", reformulant l'idée initialement proposé par (13) que les mouvements rapides (ps-ns) agissent comme un lubrifiant pour les mouvements conformationnels (ms) associés à l'activité biologique.

"The large number of conformational substates is essential; proteins cannot function without this reservoir of entropy, which resides mainly in the hydration shell."

Hans Frauenfelder et collaborateurs (14)

En jouant le rôle de réservoir d'entropie, l'eau d'hydratation interagit avec les acides aminés de surface, leur donnant accès à des dynamiques supplémentaires. Ces dernières viendront enrichir le paysage énergétique, et former les sous états conformationnels de faibles énergies.

L'eau, en plus de son rôle d'agent lubrifiant, est aussi impliquée de manière beaucoup plus directe dans la fonction des protéines (15, 16), autre que celui de réservoir d'entropie. Rodriguez et collaborateurs (17) montrent que l'eau d'hydratation peut jouer un rôle de modulateur de l'activité enzymatique, à travers le réseau de liaisons hydrogènes. Des molécules d'eau peuvent aussi jouer par exemple un rôle de transporteur d'électrons entre deux acides aminés (18), un rôle de coordinateur de cofacteurs métalliques (19). On la retrouve dans des protéines anti-gel (AFP ou *Anti-Freeze Protein*), où l'eau d'hydratation d'une des surfaces de la protéine s'ordonne, de manière à promouvoir la nucléation de la glace sur cette face et ainsi permettre l'attachement de la protéine sur de la glace. L'eau des autres faces, elle, adopte une configuration désordonnée, empêchant la formation de la glace. La protéine couvre donc ainsi une couche de glace, tout en empêchant celle-ci de croître (20). Terminons avec l'exemple des fibres amyloïdes, par l'intermédiaire d'un réseau de liaison hydrogène entre l'eau d'hydratation et des résidus souvent impliqués dans l'agrégation (21). A notre connaissance, une seule étude a montré la fonction biologique d'une enzyme *in near-anhydrous conditions* (22).

Le rôle de l'eau ne se limite donc pas simplement à une modulation de la dynamique d'une macromolécule biologique. La grande diversité de fonctions biologiques possibles se reflète dans les multiples rôles que peut finalement jouer l'eau et cette dernière prend toute son importance à la lumière du contexte cellulaire auquel elle est associée.

1.2 Couplage dynamique couche d'hydratation - macromolécules et fonctions biologiques

Transition dynamique Malgré le fait que la plupart des processus biologiques s'effectuent dans des gammes de températures restreintes, la dynamique des protéines a été étudiée en fonction de la température, allant de 10 à 400 K, pour explorer ses bases physiques. En effet, dynamique et température sont intimement liées. Des modifications notables de la dynamique moyenne ont été observées en fonction de la température. A basse température (<200 K) et même en présence d'hydratation, la plupart des systèmes étudiés voient leur activité fortement diminuée, voire absente. Cela est corrélé avec une dynamique harmonique. La protéine semble être piégée dans un des minima locaux et ne peut pas passer dans un autre minimum. A des températures ciblées, en particulier ~200-230 K,

apparaissent un ou des processus supplémentaires qui rendent le système plus "dynamique". Cet effet a été décrit comme une *transition dynamique*, bien que le concept d'une transition de phase soit controversé (23). Ces «transitions dynamiques» ont été observées par différents moyens, dans un premier temps par spectroscopie Mössbauer sur l'atome de fer (^{57}Fe) de l'hème de la myoglobine (24), puis par diffusion incohérente de neutrons (7), et plus récemment par spectroscopie diélectrique (25). Il faut noter que les temps caractéristiques échantillonnés de ces différentes méthodes sont très différents, plaidant en faveur d'une transition entre états d'énergie libre différente. La vision alternative serait un ralentissement des mouvements par vitrification en baissant la température, dans quel cas l'émergence des processus supplémentaires apparaîtrait à différentes températures en fonction des temps caractéristiques de la mesure et les énergies d'activation de ces processus. Les systèmes biologiques étant hétérogènes, les deux effets sont observés. Par exemple, dans une étude par diffusion de neutrons sensibles aux temps caractéristique de 1 ns, on observe les processus de rotation des groupements méthyles à environ 100 K. Cependant, avec un spectromètre sensible à 0.1 ns, la dynamique à 100 K apparaît harmonique et cette «transition» est absente. Ces «transitions» ont été mises en évidence (en particulier par diffusion incohérente de neutrons) dans la plupart des classes biologiques présentes dans les cellules : les protéines globulaires (26–30), les protéines membranaires (8, 31–33), les acides nucléiques (34, 35) et les sucres (36).

L'importance de la dynamique sur l'activité des protéines a donc amené à étudier les protéines autour de ces températures pour corréler ou non cette transition avec l'apparition d'une fonction biologique. Différentes protéines (ribonuclease A, myoglobine et bactériorhodopsine) ont en effet montré l'apparition concomitante d'une fonction biologique et d'une transition dynamique (8, 37, 38). Il existe cependant quelques contre-exemples, sur des systèmes qui exhibent une activité à basses températures (<220 K) (39, 40), bien que le nombre d'exemples reste limité (une fois de plus, la grande diversité du protéome réaffirme les aspects spécifiques de la dynamique dans la fonction biologique et montre le caractère unique de chaque système étudié). Récemment, la transition a également été observée dans des mélanges hydratés d'acides aminés (en absence de liaisons polypeptidiques) et abolie par déshydratation (41). Le comportement est semblable à celui observé dans les protéines natives, ce qui a mené les auteurs à conclure que la transition dynamique est une propriété du mélange colloïdal des chaînes latérales et donc ne contribue pas directement à la conformation ou à la fonction de la protéine native. Cette observation confirme que ce n'est pas l'existence ou non de cette transition qui est importante mais les aspects spécifiques de la relation dynamique-fonction dans les conditions physiologiques.

Influence du solvant sur les transitions dynamiques La forte dépendance de la dynamique d'une macromolécule biologique envers le solvant a généré un grand nombre d'études, en particulier sur la composition du solvant pour expliciter son influence.

- o L'étude de la composition du solvant sur la dynamique de la myoglobine de cheval (hMb) a montré que le premier influençait la dynamique de la seconde (42). Les auteurs ont étudié deux mélanges myoglobine/sucrose et myoglobine/glycérol, chacun présentant des viscosités sensiblement différentes ($\eta_{75\% \text{ glycerol/eau}}=1.5 \times 10^4 \text{ P}$, $\eta_{80\% \text{ sucrose/eau}}=6.4 \times 10^{11} \text{ P}$, $\eta_{\text{eau}}=1 \times 10^{-2} \text{ P}$, à température équivalente). La température d'apparition d'une fraction libre du monoxyde de carbone (après photolyse) ainsi qu'une augmentation des mouvements se corrélaient avec la température de transition vitreuse du mélange.

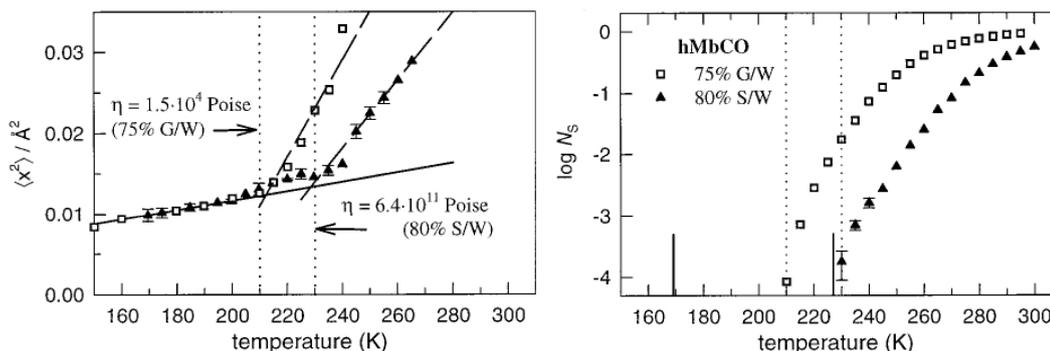


FIGURE 1.2 – Figure de gauche : Déplacements carrés moyens des deux mélanges en fonction de la température. Lignes brisées : température de transition vitreuse du solvant. Figure de droite : Fraction libre du monoxyde de carbone après photolyse. Lignes brisées : température de transition vitreuse du solvant. Extrait de (42)

- Des études similaires par diffusion incohérente de neutrons sur le lysozyme de poule ont montré que la température de transition d'un mélange lysozyme/glycérol possédait une température de transition de l'ordre de 270 K (43), proche de celle obtenue pour du glycérol pur (280-300 K) (44).
- Des simulations de dynamique moléculaire sur la couche d'hydratation de protéines ont permis de montrer que l'apparition de la transition était fortement couplée à l'apparition de mouvements de diffusion translationnelle dans la couche d'hydratation et que si cette dernière était maintenue fixe (absence de translation dans la couche d'hydratation), la transition dans la protéine disparaissait. Inversement, si la température de la protéine était gardée constante à 300 K, une transition apparaissait chez cette dernière lorsque le solvant atteignait 200 K (45, 46).

L'ensemble de ces observations ont laissé penser que le couplage entre le solvant et la macromolécule biologique ne se faisait que de manière unilatérale, du solvant à la macromolécule biologique. Une relation de *maître (solvant)-esclave (protéine)* semblait se dégager dans laquelle la dynamique de l'eau régissait celle de la protéine.

Cette approche doit être cependant relativisée, aux vues de la grande diversité de macromolécules biologiques qui composent les cellules. Les études mentionnées précédemment se focalisent sur un type de macromolécules en particulier, les protéines solubles. Cependant, d'autres classes de protéines ont permis d'affiner cette vision.

On peut mettre en évidence deux possibilités supplémentaires :

- Une relation bilatérale entre l'eau et sa macromolécule biologique.
- Une indépendance de la macromolécule par rapport au solvant.

Relation bilatérale Le caractère unilatéral du couplage semble ne pas s'étendre à tout les macromolécules biologiques. Récemment, une étude par diffusion quasi-élastique de neutrons et de relaxation diélectrique sur la dynamique interne des acides ribonucléiques de transfert (tARN), de l'acide désoxyribonucléique (ADN), du lysozyme et de leur eau d'hydratation associée a montré que la nature biologique de la macromolécule mesurée avait une influence non négligeable sur la dyna-

mique de la couche d'hydratation (35). Une dynamique ralentie de la macromolécule s'accompagnait systématiquement d'un ralentissement de la dynamique de l'eau. Cette interdépendance mettait en évidence un couplage bilatéral dans le couple macromolécule/eau d'hydratation.

Indépendance du couplage dynamique eau d'hydratation-protéine Certains macromolécules affichent par contre une relative indépendance par rapport au solvant : par diffusion incohérente de neutrons, Wood et collaborateurs (26, 31) ont mis en évidence le fait que le couplage protéine-solvant dépendait fortement de la nature biologique de l'échantillon. Pour une protéine globulaire (MBP), il a été observé que les transitions dans le solvant et dans la protéine coïncidaient et apparaissaient vers 220 K. A l'inverse, dans le cas de la membrane pourpre de *Haloarcula salinarum*, la protéine (bactériorhodopsine), accompagnée des lipides montraient une transition à 250 K qui ne coïncident pas avec celle du solvant (220 K). Il a donc été supposé que dans le cas des protéines membranaires, la dynamique de la protéine n'était pas contrôlée par le solvant (31) mais par les lipides (47, 48). La figure 1.3 ci-dessous résume ce paragraphe.

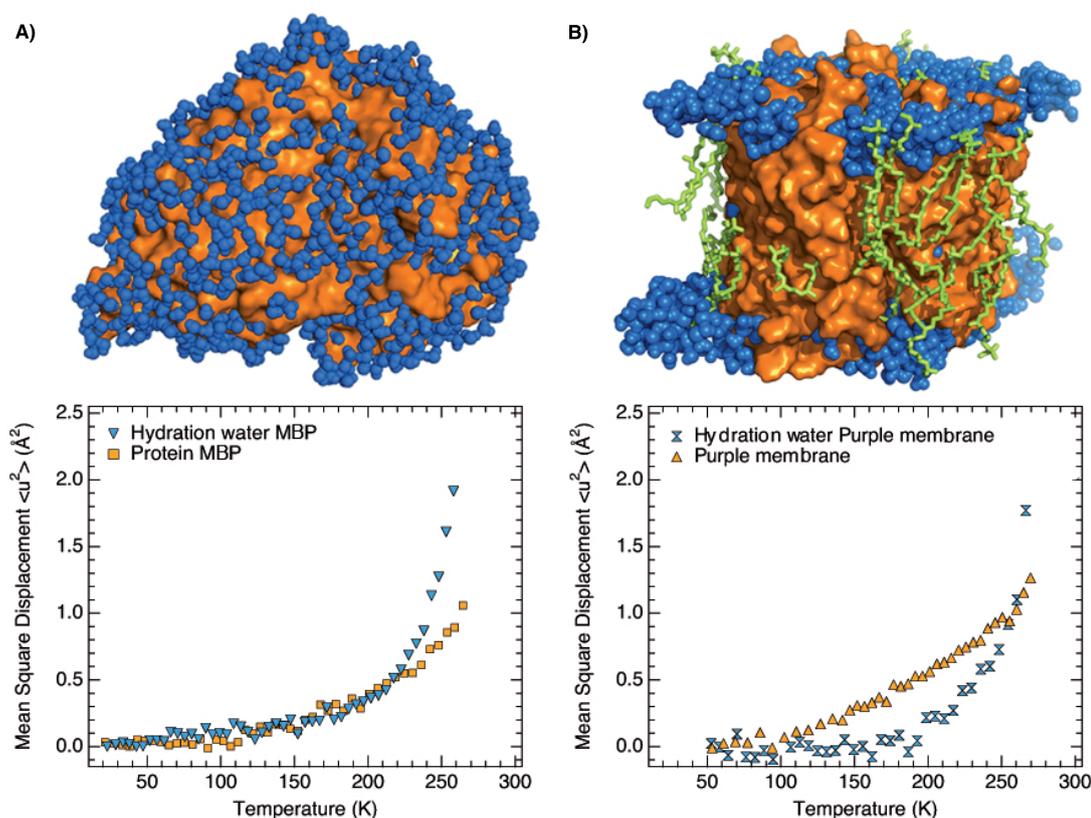


FIGURE 1.3 – A) Figure supérieure : structure de la protéine MBP, avec 922 molécules d'eau (situation de monocouche). Figure inférieure : MSDs de la protéine MBP (carré orange) et de sa couche d'hydratation (triangle inversé bleu). Reproduction de la figure 3.7.B. B) Figure supérieure : structure de la membrane pourpre (extraite de (49)), avec la bactériorhodopsine (orange), une monocouche d'eau (boules bleues) et ses lipides environnants (vert). Figure inférieure : MSDs de la membrane pourpre (triangle orange) et de sa couche d'hydratation (sablier bleu). Les mesures des échantillons de protéine MBP et de son eau d'hydratation sont issues de (26). Les mesures de la protéine BR sont issues de (31)

Conclusion sur l'hydratation La structure et la dynamique d'une protéine définissent sa fonction biologique. Elles sont fortement associées à l'environnement, notamment l'eau d'hydratation dont la présence est essentielle. Dans le tableau qui suit (tableau 1.2), nous avons porté les coefficients de diffusion mesuré pour l'hydratation de différents systèmes par diffusion de neutrons

Contexte		D ($\times 10^{-5}$ cm ² .s ⁻¹)	τ (ps)	τ_{rot} (ps)	
Solvant	Eau pure 253 K (50) QENS 100 μ eV	0.43	22.7	1.8	
	Eau pure 285 K (50) QENS 100 μ eV	1.6	1.66		
	Eau pure 298 K (51) QENS 28 et 96 μ eV	2.3	1.1	1.1	
	Surfaces hydrophiles	Vycor ⁵ 298 K(52) QENS 28 et 96 μ eV	2.61	5.7	1.03
		Protéines	C-Phycocyanine 298 K (52) QENS 28 et 96 μ eV	1.20	6.6
	Cellules		<i>Escherichia coli</i> 301 K (53) QENS 17 μ eV	2.39	2.16
<i>Escherichia coli</i> 301 K (53) QENS 90 μ eV		2.94	2.28	1.54	
<i>Haloarcula marismortui</i> ⁶ 290 K (54) QENS 90 μ eV		1.29	6.12		
<i>Haloarcula marismortui</i> 300 K (54) QENS 0.9 μ eV		0.00098	243		

TABLE 1.2 – Paramètres de la dynamique de l'eau dans différents contextes biologiques et environnements. En italique, les résolutions des instruments de diffusion de neutrons utilisés. D : coefficient de diffusion. τ : temps de résidence. τ_{rot} : temps de corrélation de rotation.

1.3 Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs)

Emil Fisher (prix Nobel 1902) a été le premier à énoncer un principe de la "clef-serrure" dans une interaction enzyme-substrat, principe qui supposait une structure unique de l'enzyme, adaptée au substrat. Le repliement d'une enzyme, et donc sa structure prenait alors toute son importance. Une enzyme ne variant en premier lieu d'une autre que par sa séquence primaire d'acides aminés, il a donc été supposé que séquence et fonction étaient intimement liées. En 1961, Anfinsen conforta cette ap-

4. Mesure de conductance sur H₂¹⁸O

5. Le Vycor est un matériau comparable au quartz. Il est composé à 96% de silice et 4% d'anhydride borique. Il est utilisé en diffusion de neutrons comme système hautement hydrophile.

6. *Haloarcula marismortui* est une archaea extrémophile, présente dans la Mer Morte. Elle prospère dans des concentrations de sels allant jusqu'à 4M NaCl

proche, grâce à ses travaux sur le repliement de la ribonucléase A. En montrant qu'une ribonucléase A exposée à des conditions dénaturantes (8 M urée) et réductrices (présence de β -mercaptoethanol dans le tampon) pouvait reprendre sa structure native une fois la protéine dialysée contre un tampon physiologique, Anfinsen prouvait que "toute l'information nécessaire à l'acquisition de la structure native d'une protéine, dans un environnement donné, est contenue dans sa séquence". Séquence primaire, structure native et fonction se trouvaient alors n'être que le reflet d'un seul et même aspect d'une enzyme. La grande diversité de structures obtenues, alliée à leur dynamique a montré premièrement que la conformation du substrat pouvait se moduler afin de s'adapter à son enzyme cible. Il a été aussi montré que la protéine était capable d'affiner l'interaction avec le substrat, en modifiant légèrement sa structure, une fois celui-ci partiellement lié (*induced fit*). Dernièrement, des modifications à plus grandes échelles sont possibles, en particulier des modifications *allostériques* de l'enzyme, pour permettre l'interaction. Tout ces possibilités ont montré que le paradigme sur la relation structure-fonction devait être étendu.

Il faudra attendre les années 90 pour voir apparaître des systèmes biologiques qui vont permettre d'aller au delà de la vision de Fisher. Un des premiers exemples porta sur la morphogenèse des flagelles de bactéries (55). Plaxco et Gross montrèrent que le facteur de régulation de la croissance du flagelle (FlgM) devait être "déplié" (un critère rigoureux n'étant pas encore évoqué à cette époque), pour des raisons d'encombrement stérique : une forme "repliée" de de FlgM (taille caractéristique de l'ordre de 3 nm) ne pouvait être exportée à travers le flagelle (2.5 nm de diamètre).

Ces protéines "désordonnées" n'ont cependant connu un véritable intérêt que depuis les années 2000, date à partir de laquelle la communauté biologique s'est rendue compte de l'importance de cette nouvelle classe. Le facteur de transcription p53, la composante non amyloïde de la protéine APP (amyloïde precursor protein), les caséines ou encore les protéines de liaisons aux microtubules (Tau et MAP2) ont été montrées comme appartenant à la famille des protéines dites *intrinsèquement désordonnées* ou *IDPs*.

1.3.1 Définition et fonctions associées

A l'heure actuelle, on prend comme définition d'une IDP comme étant une protéine possédant dans sa séquence primaire une ou plusieurs régions de plus de 40 acides aminés consécutifs qui ne génèrent pas de structures secondaires particulières (hélices α ou feuilletts β). Ces séquences non structurées sont souvent caractérisées par une complexité assez faible (répétition d'acides aminés), par la faible occurrence d'acides aminés hydrophobes de grosse taille (valine, leucine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane et tyrosine) qui formeraient le coeur d'une protéine globulaire soluble. Cette faible proportion d'acides aminés hydrophobes est contrebalancée par la présence accrue d'acides aminés polaires et chargés (acide glutamique, sérine, proline, glutamine, lysine et glycine).

Classification des IDPs La famille des protéines désordonnées peut se décomposer en quatre sous-familles (56, 57), qui ne sont ni plus ni moins que les intermédiaires de repliement des protéines globulaires, auxquels se rajoute une fonction biologique :

- La chaîne complètement déstructurée (*random coil* ou *chaîne gaussienne*), dont la définition ne peut se faire que grâce à un ensemble conformationnel moyen. L'existence transitoire de structures secondaires est possible mais le taux d'occupation de ces états est faible.
- Le globule pré-fondu, plus connu sous le nom de *pre-molten globule*, qui se caractérise par l'existence de structures secondaires indépendantes les unes des autres, séparées par de longues chaînes déstructurées.

- Le globule fondu ou *molten globule*, caractérisé par l'existence de domaines repliés, eux même séparés par ces longues chaînes.
- Une conformation essentiellement repliée, avec la présence d'une ou plusieurs chaînes isolées non structurées.

Chacune de ces conformations peut soit rester dans son état natif, soit se replier lors de la liaison avec son ou ses ligands potentiels. La figure 1.4 ci-dessous résume les différentes conformations possibles

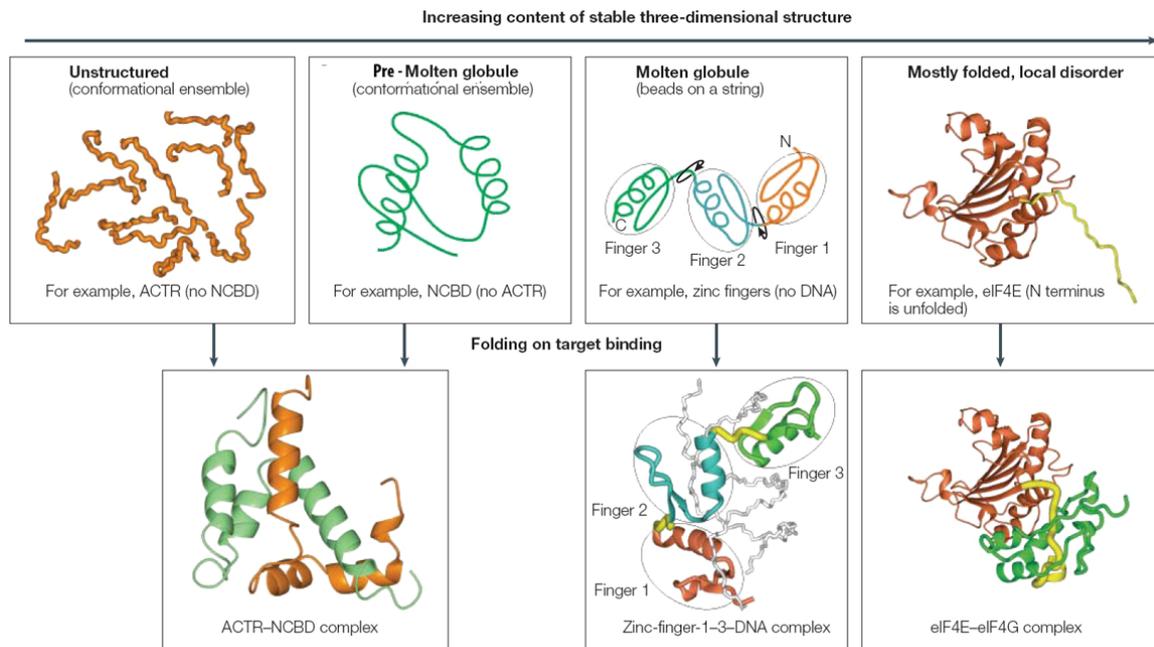


FIGURE 1.4 – Classification des protéines désordonnées avec l'exemple de ACTR (activator for thyroid hormone and retinoid receptors), NCBD (nuclear receptor co-activator binding domain), zinc fingers protein (protéine à doigts de zinc) et eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E). Extrait de (56).

Occurrence et niveaux d'expression chez les organismes biologiques On estime que :

- 5% des protéines d'*Escherichia coli*
- 6-8% des protéines issues d'Archea
- 25-30% des protéines issues d'organismes eukaryotes

sont intrinsèquement désordonnées (57). On estime la proportion de protéines complètement désordonnées à 12% chez les eukaryotes. Une part non négligeable du protéome est donc composé de protéines intrinsèquement désordonnées. Cette relative abondance doit être cependant finement régulée pour éviter une accumulation trop importante de protéines désordonnées. Il a en effet été montré que les protéines nativement désordonnées montraient une propension à agréger sous forme de fibres amyloïdes ou d'agrégats, qui peuvent à terme se révéler létales pour la cellule. Un contrôle est donc mis en place par la cellule pour limiter le taux de protéines désordonnées (58). Cette régulation semble se faire à la fois sur le taux d'expression, plus faible comparé à des protéines

repliées impliquées dans les mêmes voies de métabolisme ou de signalisation, et sur le temps de demi-vie. Le taux d'expression peut être régulé par l'activation de la voie métabolique dite de la *réponse de la protéine dépliée* (UPR). Cette voie permet à la fois de réguler le taux d'expression de ces protéines, par dégradation accentuée d'ARN messager mais aussi par activation de facteurs de transcription impliqué dans la diminution du stress cellulaire. Le temps de demi-vie de ces protéines semble lui être corrélé à la présence accrue de séquences signales impliquées dans la dégradation.

Fonctions associées Les protéines désordonnées ont de larges interfaces intermoléculaires, que l'on peut définir comme la surface nécessaire à la fonction biologique. Pour des protéines monomériques ayant des interfaces équivalentes, le volume devrait être augmenté d'un facteur 2, voire 3. Cette augmentation aurait des répercussions sur l'encombrement cellulaire, qui se traduirait par une augmentation de la taille de la cellule d'environ 15 à 30% (59). Ainsi, les protéines désordonnées fournissent une solution simple pour avoir de larges interfaces moléculaires et de petits génomes, tout en gardant une grande variété d'interactions entre les protéines. Ces interactions peuvent générer les fonctions suivantes (non exhaustive) (60) :

Transducteurs de signaux Le caractère désordonné de certaines protéines est utilisé par une grande variété de kinases. Les sites de phosphorylation étant *de facto* plus accessibles, de nombreuses IDPs sont classées dans la catégorie des *phosphoprotéines*, impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires. On peut citer la protéine pro-apoptotique p53 et la protéine Tau.

Réservoir d'entropie et chaperonnes Dans certaines situations, deux protéines d'un complexe biologique ont besoin d'être séparées pour être fonctionnelles. Cette condition peut être réalisée à l'aide d'IDPs possédant des longues zones désordonnées, situées dans les domaines N- et C-terminaux. Ces zones permettent par exclusion entropique un espacement suffisant entre deux macromolécules. Les domaines de projections (domaines non liés aux microtubules) des protéines MAP2 et Tau rentrent dans cette catégorie, afin de séparer les microtubules des uns des autres. L'aspect "réservoir d'entropie" se retrouve aussi dans la fonction chaperonne de certaines IDPs. Une protéine mal repliée P sera reconnue par une IDP_{chap} , qui se liera de manière non spécifique à la protéine. Le caractère fortement hydrophile de l'IDP, combiné au caractère flexible de cette dernière (exclusion entropique) garantit la solubilité de la protéine mal repliée. S'ensuit un transfert entropique entre IDP_{chap} et P , de manière à ce que la partie mal repliée de P explore un plus large paysage énergétique conformationnel, jusqu'à atteindre son minimum énergétique.

Le tableau ci-dessous présente quelques IDPs, leur(s) partenaires et leur(s) fonction

	Protéine/ Domaine	Partenaire/ Cible	Fonction/ Action
Chaines entropiques	MAP2 (domaine de projection)	Tubuline	Espacement dans l'architecture des microtubules
	Titine (domaine PEVK)	Disque Z	Force contractile passive dans les muscles
Enzymes	Sécurine (domaine de projection)	Separase	Inhibition de la séparation des chromosomes
	Stathmin	Tubuline	Désassemblage des microtubules
Chélatans	Caséines	Phosphate calcium	Inhibition de la précipitation des protéines du lait
Assembleurs	Protéine salivaire riche en proline	Tannin	Neutralisation des composés polyphénoliques
	MAP2 (domaine de liaison)	Tubuline	Polymérisation des microtubules
Transducteurs de signaux	CREB (domaine d'activation)	Facteurs associés à la TATA-box	Assemblage du Complexe de transcription
	MAP2 (domaine de liaison)	Protéines Kinases	Régulation par phosphorylation
	CREB (domaine d'activation)	Protéines Kinases	Régulation par phosphorylation

TABLE 1.3 – Protéines intrinsèquement désordonnées et leur(s) partenaire(s) associé(s). Extrait de (60)

1.3.2 Caractérisations biophysiques et biochimiques

Du fait de n'avoir qu'un repliement partiel, les IDPs présentent des caractéristiques biophysiques qui diffèrent sensiblement des protéines globulaires.

Cristallographie par rayons X Le caractère désordonné de tout ou partie de certaines protéines pose problème quant à l'obtention de cristaux de protéines (absence de contacts ordonnés inter-protéines). Si la protéine cristallise, les parties les plus flexibles, souvent caractéristiques du dépliement de la protéine ne généreront pas de densité électronique, soit suffisante pour s'assurer de l'unicité, soit pas du tout.

Résonance magnétique nucléaire (RMN) Contrairement à la cristallographie, la RMN est parfaitement adaptée pour des mesures structurales et dynamiques des protéines désordonnées car elle ne requiert pas d'états cristallins. Le caractère désordonné de la protéine ne génère pas une grande dispersion des pics de résonance (répartition sur 4-5 ppm de la dispersion du signal du proton pour

une protéine globulaire et 1-2 ppm pour une protéine désordonnée). L'information dynamique des zones flexibles se retrouve dans les mesures de T1, T2, RDC (*Residual Dipolar Coupling*) et nOe. La revue (61), ainsi que les études (62, 63) illustre l'information qui peut être extraite lors de mesures de couplages dipolaires résiduels.

Caractérisation biochimiques Une tendance plus marquée chez les IDPs à la dégradation protéolytique a été observée (tout du moins *in vitro* (64)), confirmant de manière indirecte le caractère flexible de la protéine. Une migration anormale sur gel SDS-PAGE, ainsi que des températures de dénaturation plus hautes sont aussi des indicateurs de la nature désordonnée de la protéine.

Diffusion dynamique de lumière (DLS) et chromatographie par exclusion de taille Une chromatographie par exclusion de taille permettra de mettre en évidence le caractère déplié d'une protéine, par son retard à l'élution comparé à une protéine globulaire de même poids moléculaire. Un pic d'élution bien plus large est aussi un indice d'une grande variété de conformations de la protéine en solution. Par DLS, le rayon hydrodynamique peut être extrait, en mesurant le coefficient de diffusion. Empiriquement, il a été montré que les rayons hydrodynamiques des protéines natives globulaires $R_{H,N}$ et complètement désordonnées :

$$R_{H,N} \sim 0.75 \times (M_W)^{0.33} \quad (1.1)$$

$$R_{H,U} \sim 0.19 \times (M_W)^{0.54} \quad (1.2)$$

avec M_W le poids moléculaire. Un écart à ces lois traduit une dénaturation plus ou moins partielle de la protéine.

Dichroïsme circulaire (CD) En réalisant un spectre CD entre 190 et 250 nm, il est possible de déterminer la composition en hélices α , en feuillets β et en boucle désordonnées, par déconvolution du signal. Les protéines totalement désordonnées seront caractérisées par un pic d'ellipticité, vers 220 nm et un minimum vers 195 nm.

1.3.3 IDPs, dynamique et hydratation

Dynamique des protéines désordonnées On peut distinguer deux familles concernant les études sur les protéines désordonnées : non physiologiques et intrinsèquement

Dynamique des protéines artificiellement désordonnées par diffusion de neutrons

La dynamique des protéines artificiellement désordonnées a largement été étudiée, en particulier par diffusion incohérente de neutrons :

Il convient de citer les travaux de Russo et collaborateurs (65), qui traitent de la dynamique par diffusion de neutrons (MIBEMOL, LLB, résolution 96 μeV) d'une protéine essentiellement composée de feuillets β , la neocarzinostatine. Les auteurs ont étudié l'évolution de la dynamique interne en fonction de la température (20 °C à 71 °C). Ils ont observé en particulier qu'à 20 °C (conformation native), seuls 33% des protons étaient vus "mobiles" par le spectromètre, valeur proche de la proportion de protons mobiles observée dans les chaînes latérales d'une chaîne gaussienne. A plus hautes températures, la proportion se rapproche de 100%. Cette augmentation est justifiée par l'arrivée de nouveaux protons dans la fenêtre du spectromètre, protons qui étaient avant impliqués dans des feuillets β et donc moins flexibles que ceux des chaînes latérales. Cependant, ils observèrent que

le rayon moyen de diffusion dans une sphère de l'atome d'hydrogène avait tendance à baisser avec l'augmentation de la température. Ils justifèrent cet effet en supposant que tous les protons supplémentaires observés au dessus de 20 °C sont ceux des feuillets β , et qu'ils n'ont qu'une amplitude moyenne restreinte, tout du moins plus faible que celle des protons des chaînes latérales. Ils font donc en moyenne baisser le rayon moyen par rapport à celui mesuré à 20 °C, qui impliquait seulement des protons des chaînes latérales.

Conclusion de l'étude (65) : Les auteurs concluent à une augmentation de la population des protons mobiles et des rayons de diffusion plus faibles lors du dépliement de la protéine.

A cette étude s'ajoute celle de Fitter et collaborateurs (66), qui travaillèrent sur la dynamique interne de deux membres de la famille des α -amylases, une forme mésophile et une seconde thermophile. Ces deux protéines ont été mesurées par diffusion de neutrons (NEAT, HBZ, résolution 94 μeV) dans différents états conformationnels (natif ou dénaturé par ajout de 1 M chlorure de guanidinium). Les auteurs ont montré, en analysant les facteurs de structure incohérents (reflet de l'extension moyenne du mouvement de l'atome d'hydrogène dans la protéine) que :

- L'état replié semblait diminuer l'amplitude du mouvement par rapport à un échantillon désordonné, et ce pour les deux formes (à 30 °C).
- A l'état natif, la forme thermophile montre une extension des mouvements plus importante par rapport à la forme mésophile, contrairement à ce qui a été observé par Tehei et collaborateurs (2) sur des bactéries mésophiles et thermophiles.
- L'état désordonné des formes mésophiles et thermophiles n'avait que de faibles différences dans leurs amplitudes des mouvements (à 30 °C).

Conclusion de l'étude (66) : Dynamique modifiée lors du dépliement, en particulier au niveau des amplitudes des mouvements. Le caractère désordonné augmente l'amplitude de ces derniers, par rapport à la forme repliée. La forme thermophile possède des mouvements de plus grande amplitude par rapport à la mésophile.

Cette étude a été suivie par les travaux de Fitter (67) toujours sur l' α -amylase, dans des conditions dépliées et à hautes températures. L'augmentation du rayon de diffusion concomitante avec le dépliement a de même été observée dans (68, 69), en particulier avec la dynamique de l' α -lactalbumine bovine. Cette dernière présente la particularité d'avoir plusieurs formes conformationnelles, dont le globule fondu. Cette conformation exhibe des longueurs de corrélation plus faibles (6.9 Å) que la forme native (18 Å), ainsi que des rayons de diffusion plus grands (5.4 Å contre 4.1 Å). Receveur et collaborateurs (70) arrivent à des conclusions similaires.

Conclusion des études (67–70) : Ici encore, des amplitudes des mouvements et populations plus importantes dans l'état désordonné sont observés.

La plus récente étude à notre connaissance (juillet 2011) sur la dynamique des protéines dépliées concerne un lysozyme de poule étudié, sous sa forme native et désordonné par dénaturation thermique (71). Les auteurs montrent que les déplacements carrés moyens des deux états de la protéines, à une résolution de 4 μeV font apparaître la transition dynamique à 220 K. Ils observent de plus que les déplacements carrés moyens coïncident sur toute la gamme de températures (30-300 K).

Conclusion de l'étude (71) : Les auteurs concluent que la présence de la transition n'est pas une caractéristique des macromolécules biologiquement actives, puisque que même une protéine

dénaturée la met en évidence.

Dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées par diffusion de neutrons

Cependant, peu d'études ont été effectuées concernant la dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées par diffusion de neutrons. Il faudra attendre 2009 avec une étude réalisée par Gaspar et collaborateurs (72) sur des protéines du lait, les caséines α , β et κ . Par diffusion quasi-élastique incohérente de neutrons, les auteurs ont mis en évidence des disparités de dynamiques entre les protéines globulaires (lysozyme, concanavilin A et myoglobine) et nativement désordonnées (caséines α , β et κ). En particulier, il a été observé que le mouvement hydrodynamique (diffusion global) des caséines était ralenti comparé aux protéines de référence, confirmant leur caractère désordonné. La dynamique interne extraite des spectres quasi-élastiques (TOFTOF, FRM2, résolution 60 μeV) n'a pas montré de différences significatives entre les deux familles (mouvements avec une dynamique moyenne de l'ordre de 4.5 ps pour toutes les protéines étudiées). Cependant, les amplitudes associées à ces mouvements et les populations de protons mobiles se sont révélées être fortement dépendantes de l'état de repliement de la protéine. Des mouvements de plus grandes amplitudes, ainsi que des fractions de protons mobiles plus importantes sont observés chez les caséines, comparés aux trois protéines de référence.

Conclusion de l'étude (72) : Les auteurs montrent que les amplitudes des mouvements dans les protéines intrinsèquement désordonnées sont plus importantes. Ils montrent de plus que la proportion d'atomes vus mobiles par le spectromètre est plus importante chez les caséines, par rapport aux protéines repliées. A noter que la procédure de fit utilisée n'a pas donné d'informations en terme de temps de corrélation associés à ces mouvements.

A cette étude s'est ajouté en 2010 des travaux, menés par Nakagawa et collaborateurs (73) sur une staphylocoque nuclease (SNase), qui possède la propriété de n'avoir qu'une structure tertiaire partielle lorsque les treize derniers acides aminés sont retirés de la séquence complète. Ici encore, par diffusion élastique de neutrons (IN10, ILL, résolution 1 μeV ; IN13, ILL, résolution 10 μeV ; HER, JAEA, résolution 100 μeV et GP-TAS, JAEA, résolution 1meV), les auteurs étudient l'influence de l'état de repliement d'une protéine sur sa dynamique interne. Il en ressort deux modifications dynamiques, une à 140 K, indépendante de l'état d'hydratation de l'échantillon et une autre à 220-250 K, absente avec des échantillons secs. Les auteurs montrent qu'avec des échantillons hydratés avec une monocouche d'eau, les amplitudes des mouvements ne diffèrent que peu. A l'inverse, les échantillons secs montrent des MSDs qui dépendent de l'état de repliement : des amplitudes plus faibles sont mesurées avec la protéine complète dans la gamme 140-200 K.

Conclusion de l'étude (73) : Ils concluent sur une augmentation de la résilience d'une protéine lors du processus de repliement, avec des échantillons secs. Les déplacements carrés moyens au dessus de la transition à 220 K ne font pas apparaître de différences notables pour les deux formes de la protéine hydratée.

Dynamique des couches d'hydratation dans les conformations désordonnées La couche d'hydratation des protéines désordonnées a été étudiée par RMN, en particulier avec les travaux de Bokor et collaborateurs (74) sur trois protéines intrinsèquement désordonnées, MAP2c (microtubule-associated-protein 2c), ERD10 (early responsive to dehydration 10), CSD1 (calpastatin) et une protéine globulaire de référence, la BSA (bovine serum albumine). A travers cette étude, les auteurs montrent par RMN du solide que les protéines désordonnées peuvent lier jusqu'à 30% d'eau en plus qu'une protéine globulaire (la notion d'eau liée ici s'entend comme ayant des temps de relaxation accessible à la résolution temporelle du spectromètre). Cette même eau présente des énergies d'ac-

tivation de l'ordre de 50% plus élevée que celle des protéines repliées.

La dynamique de l'eau autour de l' α -lactalbumine, avec les travaux de Sengupta et collaborateurs (75) ont permis d'aller plus loin dans le comportement de l'eau autour des protéines natives et désordonnées. A noter que cette étude a porté sur des états de repliement caractéristiques d'un *molten globule*, qui diffère de l'état intrinsèquement désordonné. Les simulations effectuées mettent en évidence une augmentation marginale de la surface d'hydratation par rapport à la forme native. Cette solvatation, en plus d'être moins uniforme, s'accompagne d'interactions protéine-eau d'hydratation moins favorables, par rapport à la forme native. Les auteurs de Chakraborty et collaborateurs (76), à l'inverse, montrent une accélération de la dynamique autour d'une hélice α rendue désordonnée.

Diffusion de Neutrons et application à la dynamique des protéines

Sommaire

2.1	Diffusion de neutrons	20
2.1.1	Diffusions <i>cohérente</i> et <i>incohérente</i>	20
2.1.2	Deutération de protéines et hydratation des protéines	22
2.2	Diffusions <i>élastique</i>, <i>quasi-élastique</i> et <i>inélastique</i>	23
2.2.1	Diffusion élastique	24
2.2.2	Diffusion quasi-élastique	26
2.2.3	Procédure de traitements des spectres quasi-élastiques	29
2.3	Instruments de diffusion de neutrons	30
2.3.1	Spectromètre à rétro-diffusion	30
2.3.2	Spectromètre à temps de vol	32
2.4	Relation entre diffusion élastique et quasi-élastique de neutrons	33

CE CHAPITRE présente de manière succincte la diffusion de neutrons. Les notions de diffusion cohérente et incohérente seront présentées. Les notions de diffusion élastique et quasi-élastique seront ensuite introduites, de même que les différents instruments utilisés dans cette étude. Le marquage isotopique, en particulier la deutération totale ou partielle des protéines sera présentée. Cette technique est de la plus grande utilité pour l'étude spécifique de différents composants d'un complexe biologique.

2.1 Diffusion de neutrons

Toute expérience de diffusion consiste en la mesure de la quantité de particules diffusées (déviées selon une loi propre à la structure et à la dynamique de l'échantillon), à un angle donné, avec ou sans variation de leur énergie. On notera cette quantité $\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega}$, la *section efficace différentielle de diffusion*. On caractérisera une particule diffusée par son angle de diffusion 2θ , par ses vecteurs de diffusion \mathbf{k}_0 et \mathbf{k}_1 , sa variation d'énergie $\hbar\omega$ ($= \frac{\hbar^2}{2m_n}(k_1^2 - k_0^2)$ dans le cas de neutrons)¹ et par son amplitude de diffusion b , qui traduit la nature de l'interaction avec l'atome diffuseur.

Cette dernière variable, qui suit une loi linéaire en fonction du nombre d'électrons dans l'atome diffuseur dans le cas de la diffusion de rayons-X (amplitude de diffusion de la forme $n \times \mathbf{f}$ avec \mathbf{f} le facteur de Thomson et n le nombre d'électrons), dépend fortement de la nature de l'échantillon dans le cas de la diffusion de neutrons. Un effet isotopique (présence de différents isotopes d'un même élément), ainsi que des interactions entre le spin du neutron et celui de l'atome diffusant vont en effet générer une distribution de longueurs de diffusion (tableau 2.1), même pour un échantillon monoatomique. Regardons cela plus en détail.

Le spin du neutron peut prendre les valeurs $+1/2$ ou $-1/2$ et l'atome diffuseur un spin h . Chaque interaction pourra donc se faire avec :

- soit un spin total de $h+1/2$, associé à une longueur de diffusion b^+ et une probabilité $n^+ = (h+1)/(2h+1)$.
- soit un spin total de $h-1/2$, associé à une longueur de diffusion b^- et une probabilité $n^- = h/(2h+1)$.

2.1.1 Diffusions *cohérente* et *incohérente*

On peut ensuite extraire pour chaque atome dans l'échantillon (supposé pour commencer parfaitement monoatomique, i.e. pas même une hétérogénéité isotopique) :

- Une valeur moyenne des amplitudes de diffusion, notée \bar{b} . Elle représente la moyenne entre les longueurs de diffusion b^+ et b^- , pondérée par les probabilités respectives de ces états ($\bar{b} = n^+ b^+ + n^- b^-$). Chaque atome de l'échantillon de même nature aura un \bar{b} égal.
- Une partie variable qui représente l'écart à la moyenne, notée $\Delta b = (b - \bar{b})$. Cet écart traduit la fluctuation de la dépendance en spin de l'interaction spécifique neutron-atome, qui peut être différente pour deux atomes de même nature dans l'échantillon. On peut montrer que $(\Delta b)^2 = n^+ n^- (b^+ - b^-)^2$.

La présence d'un spin pour le neutron et donc de l'existence d'une partie fluctuante pour l'amplitude de diffusion est à la base des phénomènes de diffusions dites *cohérentes* et *incohérentes*. Les équations qui suivent permettent de dégager la signification de ces deux modes de diffusion.

1. En pratique, les deux variables qui seront utilisées seront la variation d'énergie $\hbar\omega$ et le transfert de quantité de mouvement noté \mathbf{Q} par rapport aux paramètres initiaux de la particule diffusée. \mathbf{Q} est une manière de quantifier l'angle de diffusion en s'affranchissant de la nature de l'instrument. Il est étroitement lié au réseau réciproque, cher à la cristallographie. Son expression exacte en fonction de l'angle de diffusion dépend de l'instrument utilisé et de l'énergie du neutron diffusé mais peut s'écrire sous la forme $|\mathbf{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$ lorsque la variation d'énergie du neutron est nulle.

On peut montrer que la section différentielle de diffusion de neutrons non polarisés pour un type d'atome dans l'échantillon s'écrit :

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = \frac{1}{2\pi \hbar} \frac{k_1}{k_0} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{i,j} \langle b_i b_j \rangle \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_j(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.1)$$

$$= \frac{1}{2\pi \hbar} \frac{k_1}{k_0} \sum_{i,j} \langle b_i b_j \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_j(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.2)$$

$$= \frac{N}{4\pi} \frac{k_1}{k_0} \sigma S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega) \quad (2.3)$$

avec $\sigma S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi \hbar N} \sum_{i,j} \int_{-\infty}^{\infty} \langle b_i b_j \rangle \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_j(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt$ le produit du *facteur de structure dynamique mesuré* $S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega)$ par la section efficace de diffusion totale σ . $\mathbf{R}_i(t)$ se réfère à la position de l'atome i au temps t , $\mathbf{Q} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_0$ au *transfert de quantité de mouvement*, ω à la variation d'énergie de la particule diffusée. La moyenne $\langle . \rangle$ dénote une moyenne d'ensemble sur toutes les trajectoires des N atomes et des spins de l'échantillon, initialement à l'équilibre thermodynamique.

Pour chaque atome i et j , on peut, comme expliqué précédemment, diviser b_i et b_j en deux parties :

$$b_i = \bar{b} + \Delta b_i \quad (2.4)$$

$$\langle b_i b_j \rangle = \bar{b}_i \bar{b}_j + \langle \Delta b_i \Delta b_j \rangle \quad (2.5)$$

$$= (\bar{b})^2 + (\bar{b}^2 - (\bar{b})^2) \delta_{i,j} \quad (2.6)$$

sachant que $\langle \Delta b_i \rangle = 0$ et que $\langle \Delta b_i \Delta b_j \rangle = 0$ si $i \neq j$

on peut réécrire (2.2) en tenant compte de (2.6)

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = \frac{1}{2\pi \hbar} \frac{k_1}{k_0} \sum_{i,j} \langle b_i b_j \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_j(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.7)$$

$$= \frac{1}{2\pi \hbar} \frac{k_1}{k_0} \sum_{i,j} (\bar{b})^2 \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_j(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.8)$$

$$+ \frac{1}{2\pi \hbar} \frac{k_1}{k_0} \sum_i (\bar{b}^2 - (\bar{b})^2) \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\mathbf{QR}_i(0)} e^{-i\mathbf{QR}_i(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \quad (2.9)$$

$$= \frac{N}{4\pi} \frac{k_1}{k_0} (\sigma_{coh} S(\mathbf{Q}, \omega)_{coh} + \sigma_{incoh} S(\mathbf{Q}, \omega)_{incoh}) \quad (2.10)$$

La section efficace différentielle de diffusion se sépare donc en deux parties :

- Une partie dite *cohérente*, qui traduit l'interaction entre une paire d'atomes i et j . La diffusion cohérente sera caractérisée par sa *section efficace de diffusion cohérente* $\sigma_{coh} = 4\pi (\bar{b})^2 = 4\pi b_{coh}^2$ et un *facteur de structure dynamique cohérent* $S(\mathbf{Q}, \omega)_{coh}$
- Une partie *incohérente*, qui représente l'interaction de chaque atome i avec lui-même. On définira donc de même la *section efficace de diffusion incohérente* $\sigma_{incoh} = 4\pi (\bar{b}^2 - (\bar{b})^2) = 4\pi b_{incoh}^2$ et un *facteur de structure dynamique incohérent* $S(\mathbf{Q}, \omega)_{incoh}$.

La somme des deux sections efficaces donne σ la *section efficace de diffusion totale*, rencontrée dans l'équation (2.2), et qui s'exprimera par $\sigma = 4\pi\bar{b}^2 = \sigma_{coh} + \sigma_{incoh}$, avec la relation

$$\sigma S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega) = \sigma_{coh} S(\mathbf{Q}, \omega)_{coh} + \sigma_{incoh} S(\mathbf{Q}, \omega)_{incoh} \quad (2.11)$$

Les équations (2.7) à (2.10) montrent de plus que la diffusion cohérente renseigne sur la dynamique collective de l'échantillon, sur la corrélation entre les positions de noyaux à différents temps. Inversement, la diffusion incohérente donne des informations sur un seul noyau à des temps différents.

On parlera de diffusion *totalelement cohérente* lorsque toutes les ondes diffusées sont capables d'interférer entre elles pour donner une onde résultante, avec pour amplitude totale $(\Sigma\bar{b})^2$. Dans le cas d'une diffusion *totalelement incohérente*, l'intensité résultante aura pour amplitude $\Sigma(\bar{b}^2 - (\bar{b})^2)$ et les ondes issues des différents atomes n'auront pas la possibilité d'interférer. Le plus souvent, un échantillon diffusera à la fois de manière cohérente et incohérente.

La généralisation à un système poly-atomique se fait en redéfinissant la moyenne \bar{b} comme une moyenne faite sur l'hétérogénéité de composition (éléments chimiques différents et leurs isotopes) et de concentration à travers l'échantillon.

Le tableau 2.1 résume les sections efficaces de diffusion et d'absorption des différents atomes présents dans une protéine.

	Z	σ_{coh} (barns) (= 10^{-24} cm ²)	σ_{incoh} (barns)	σ_{abs} (barns)	b_{coh} (pm) (= 10^{-12} m)	b_{incoh} (pm)
Atome						
H	1	1.57	80.26	0.33	-0.37	2.52
D	1	5.59	2.05	0.0005	0.67	0.4
C	6	5.55	0	0.0035	0.65	0
N	7	11.03	0.5	1.90	0.94	0.20
O	8	4.23	0	0.00019	0.58	0
P	15	3.31	0.01	0.17	0.28	0.02
S	16	0.98	0	0.53	0.51	0

TABLE 2.1 – Sections efficaces de diffusion, d'absorption et longueurs de diffusion incohérentes et cohérentes de différents atomes présents dans les protéines (1 barns= 10^{-24} cm²). Les sections efficaces d'absorption sont données pour une vitesse du neutron de 2 200 m.s⁻¹ (neutron thermalisé à 290 K, correspondant à une énergie de 25 meV). En gras : sections efficaces de diffusion incohérente de l'hydrogène et du deutérium, éléments centraux dans l'étude de la dynamique des protéines.

2.1.2 Deutération de protéines et hydratation des protéines

On peut observer aux vues du tableau 2.1 que la section efficace de diffusion incohérente de l'hydrogène (~ 80 barns) est 40 fois plus grande que celle du deutérium (~ 2 barns). Dans le cas des protéines, le signal incohérent sera en grande majorité dû à la dynamique de l'hydrogène (à peu près 50% des atomes d'une protéine sont des hydrogènes). Tous les autres atomes n'auront sur la diffusion incohérente qu'une contribution mineure. Cette différence de comportement est mise en pratique lorsque l'on veut observer de manière séparée par diffusion incohérente la dynamique d'un système biologique et son eau d'hydratation. En produisant une protéine sous sa forme hydrogénée et utilisant du D₂O comme solvant, il est possible de masquer en grande partie la contribution de ce dernier et de ne regarder que celle de la protéine. Inversement, en produisant la protéine sous sa

forme deutérée et en utilisant comme solvant de l'H₂O, il est possible de ne sonder que la dynamique de la couche d'hydratation, ou plus généralement l'eau d'un système biologique. Cette méthode a été appliquée sur des échantillons de type membranes, protéines membranaires, protéines solubles ou cellules entières. Il est de même possible de marquer spécifiquement une famille d'acides aminés particulière d'une protéine (32, 33), en utilisant une souche de bactérie auxotrophe pour l'acide aminé choisi. L'utilisation de précurseurs² partiellement hydrogénés permet de cibler la dynamique de groupements particuliers (méthyles, hèmes, ...) dans une protéine deutérée (30). L'ILL possède une plate-forme, le DLAB, des plus efficaces pour la mise en oeuvre de la deutération de systèmes biologiques, allant de la protéine à la cellule entière, des algues, en passant par le marquage spécifique de certains acides aminés et des levures. Une explication plus détaillée de la technique de deutération de protéines par fermentation de bactéries est donnée dans la section 3.1.3.

2.2 Diffusions élastique, quasi-élastique et inélastique

La diffusion de neutrons s'étudie en accumulant des spectres, chaque spectre correspondant à la distribution de variation d'énergie du neutron diffusé, à un angle de diffusion et une température donnés. Il y aura donc autant de spectres que d'angles mesurés et de températures. La collecte de tous les spectres se fait de manière simultanée à une température choisie. La température et la gamme de transfert d'énergie restent les seuls paramètres sur lesquels l'utilisateur peut intervenir.

D'un spectre de diffusion incohérente de neutrons se dégagent trois zones caractéristiques : une première zone dite *élastique*, une seconde *quasi-élastique* et une dernière dite *inélastique*. Ces trois zones reflètent la grande diversité de mouvements qui se produisent dans une macromolécule. Les interactions neutrons-macromolécules sans transfert d'énergie donneront naissance au pic *élastique* ou *intensité élastique* (pic de Dirac centré en $\hbar\omega = 0$ meV). En pratique, on ne mesure pas un pic de Dirac mais un pic plus large, dû à la *résolution* de l'instrument. L'élargissement du pic de Dirac vient du fait par exemple que l'instrument n'est pas parfait ou encore que la longueur d'onde des neutrons incidents n'est pas parfaitement monochromatique. Ces imperfections sont à la base de l'élargissement du pic élastique, donnant naissance à la résolution de l'instrument. La largeur à mi-hauteur 2Γ de la résolution donne accès aux mouvements les plus lents que le spectromètre est capable de résoudre ($\Delta t \Delta E \sim \hbar$). En pratique, la résolution est déterminée par une mesure d'un échantillon de vanadium, qui est un diffuseur parfaitement incohérent. Il est aussi possible de déterminer la résolution en mesurant l'échantillon dont on souhaite mesurer la dynamique à des températures très faibles, de l'ordre de 4 à 20 K. A ces températures, tous les atomes de l'échantillon sont considérés comme immobiles, et par la même occasion trop lents pour être résolus par le spectromètre. On aura donc une mesure de la résolution. Au fur et à mesure de l'augmentation de la température, des mouvements plus rapides que ceux définis par la résolution vont progressivement enrichir le spectre hors de la résolution. Les mouvements diffusifs de l'hydrogène vont générer des faibles transferts continus d'énergie entre l'échantillon et le neutron, transferts qui se traduisent par un élargissement *quasi-élastique* ($|\hbar\omega| < 1.5$ meV) autour du pic élastique. Aux plus hautes régions de transfert d'énergie ($|\hbar\omega| > 1.5$ meV), on trouve les pics *inélastiques*, dont les mouvements vibrationnels (phonons) sont responsables. A noter que tous ces mouvements peuvent se faire soit avec une perte ou un gain d'énergie, d'où la relative symétrie du spectre en énergie.

2. Molécule chimique située en amont de l'anabolisme d'un acide aminé, d'un cofacteur ou d'un groupement prosthétique

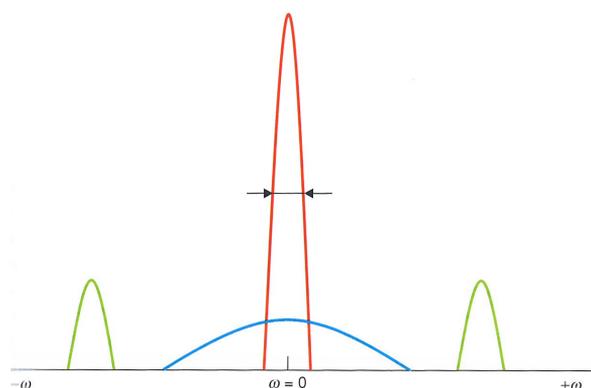


FIGURE 2.1 – Représentation simplifiée et déconvoluée d'un spectre de diffusion incohérente à un angle donné, en fonction du transfert d'énergie $\hbar\omega$ (valeurs positives : perte d'énergie pour le neutron, valeurs négatives : gain d'énergie pour le neutron). Courbe rouge : pic élastique. La résolution de l'instrument est donnée par la largeur à mi-hauteur du pic élastique (flèches noires). Courbe bleue : zone quasi-élastique. Courbes vertes : pics inélastiques. Figure extraite de (77) et modifiée.

2.2.1 Diffusion élastique

Déplacements carrés moyens (MSDs) Une mesure élastique permet d'accéder à la dynamique moyenne du système. Lors d'une augmentation progressive de la température, on assiste à l'apparition concomitante de mouvements thermiquement activés, soit vibrationnels à basses températures, soit d'une autre nature à plus hautes températures. Ces mouvements, suffisamment rapides pour le spectromètre vont générer une baisse de l'intensité élastique, reflétant une diminution des temps de corrélation des mouvements et une baisse de la population d'atomes vus comme immobiles par le spectromètre. L'information sur ces phénomènes se retrouve dans l'étude de la variation en transfert de mouvement de cette diminution d'intensité élastique.

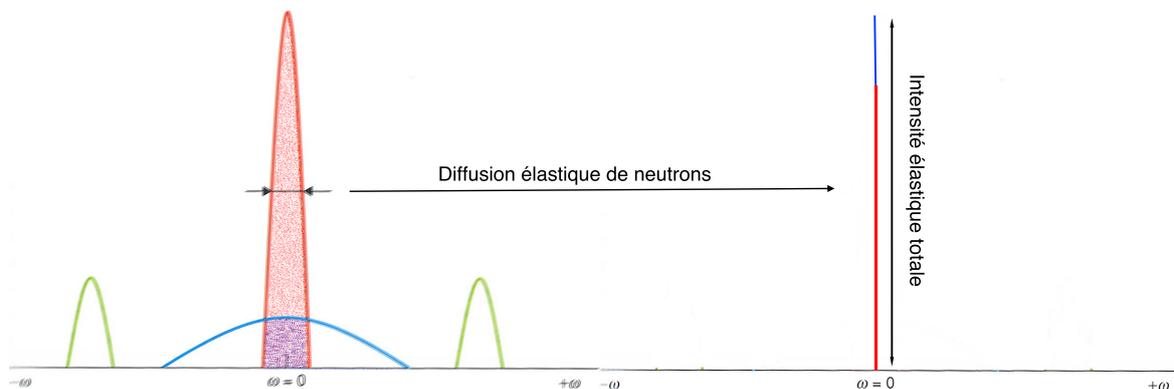


FIGURE 2.2 – Principe de la mesure de diffusion élastique. Dû à la résolution, une mesure élastique n'inclura pas seulement le pic élastique (rouge) mais aussi une partie du signal quasi-élastique (pointillés bleus). Figure extraite de (77) et modifiée.

Une mesure élastique consiste à ne mesurer que les neutrons qui ne perdent pas d'énergie lors de l'interaction avec l'échantillon. Cette configuration de l'instrument revient à mesurer le pic élastique intégré en énergie (figure 2.2, zone en pointillés rouge), ainsi que la partie non résolue du signal quasi-élastique (figure 2.2, zone en pointillés bleus). En effet, à cause de la résolution, l'instrument n'est pas capable de les discriminer. Le spectromètre fera la somme de ces contributions et fournira

à chaque angle une valeur unique d'intensité élastique.

Dans une gamme restreinte de \mathbf{Q} , on peut approximer l'intensité élastique par une loi gaussienne de la forme $e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle_{\text{apparent}, T}}$, avec $\langle u^2 \rangle_{\text{apparent}, T}$ les *Déplacements Carrés Moyens Apparents* à la température T . Les MSDs sont le reflet de l'espace accessible à l'atome, d'une distance caractéristique qu'il est capable de parcourir pendant un temps au plus court égal à celui fixé par la résolution.

En normalisant les mesures à la température T par celle effectuée à 20 K³ et en soustrayant une mesure de cellule vide ($Tr \equiv$ transmission de l'échantillon), on obtient la relation suivante sur l'intensité de l'échantillon $I_{\text{sample}}(\mathbf{Q}, \omega=0)$, à l'aide des intensités totales mesurées $I_{\text{mes}}(\mathbf{Q}, \omega=0)$ et des intensités mesurées de la cellule vide $I_{\text{vide}}(\mathbf{Q}, \omega=0)$ ⁴.

$$I_{\text{sample}}(\mathbf{Q}, \omega = 0) = \frac{I_{\text{mes}}(\mathbf{Q}, \omega = 0)_T - Tr \cdot I_{\text{vide}}(\mathbf{Q}, \omega = 0)_T}{I_{\text{mes}}(\mathbf{Q}, \omega = 0)_{T=20K} - Tr \cdot I_{\text{vide}}(\mathbf{Q}, \omega = 0)_{T=20K}} \approx e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle_{\text{app}, T} / 6} \quad (2.12)$$

Cette approximation est en théorie valable dans la mesure où la relation $Q^2 \langle u^2 \rangle < 2$ est respectée. En pratique, elle reste correcte tant que les logarithmes des intensités sont linéaires en fonction de Q^2 , et ce même si le critère précédent n'est plus respecté.

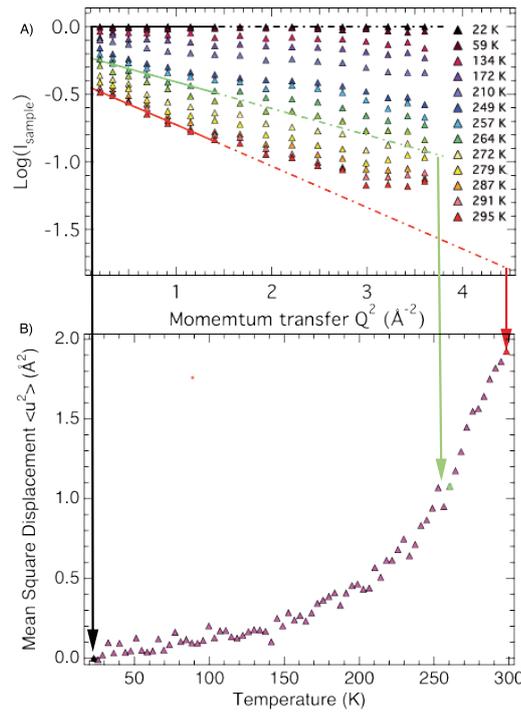


FIGURE 2.3 – Méthode d'extraction des déplacements carrés moyens à partir A) du logarithme des intensités en fonction de Q^2 . Le fit est réalisé sur la gamme la plus petite de Q^2 dans laquelle le logarithme suit une loi linéaire. Le fit est réalisé pour chaque température et B) le MSD à cette température est donné par la pente, multipliée par un facteur -6 (ou -3 selon les auteurs et les interprétations).

3. La température de 20 K est choisie car elle correspond à une quasi-absence de mouvements dans la protéine de la couche d'hydratation. Ce choix permet aussi d'avoir des temps de refroidissement raisonnables

4. Cette relation peut se retrouver par un développement en cumulants de la fonction intermédiaire de diffusion $I(\mathbf{Q}, t \rightarrow \infty) = \langle e^{i\mathbf{Q}\mathbf{R}_i(0)} e^{-i\mathbf{Q}\mathbf{R}_i(t \rightarrow \infty)} \rangle$

Cette procédure a été appliquée avec succès pour l'étude en température de la dynamique de protéines (26–30) de protéines membranaires (8, 31–33), d'acides nucléiques (34), de sucres (36), mais aussi de bactéries (2). A noter que cette méthode ne nécessite pas d'introduire un modèle particulier, ne requiert qu'une procédure de fit relativement robuste (fit linéaire), ce qui en fait une méthode de choix pour une caractérisation en température de la dynamique du système. Cependant, selon la gamme de température où l'on se situe, l'interprétation des MSDs est différente. A des températures inférieures à celle de la transition dynamique, la baisse de l'intensité élastique est simplement associée à des mouvements vibrationnels, et donc à l'agitation thermique (qui ne génère pas de signal quasi-élastique). L'assimilation MSDs et facteur de Debye-Waller sera donc pertinente. Au dessus de la transition dynamique, associée à la fois à l'apparition du signal quasi-élastique, mais aussi à des mouvements "non gaussiens", l'interprétation des MSDs devient délicate. De plus, ces mouvements sont clairement dépendant de la résolution. Cela justifie alors la dénomination de MSDs *apparents*.

Constante de force apparente Dans certaines gammes de températures (en particulier au dessus de 220-250 K, il est souvent observé un comportement linéaire des MSDs. La pente extraite sur cette plage donne accès à un paramètre l'on appelle la *constante de force apparente* $\langle k' \rangle$ (en N.m^{-1}). Cette dernière traduit le fait qu'à hautes températures, le potentiel moyen dans lequel évolue le système peut être vu comme harmonique (d'où l'appellation *apparente*) (78), bien que les potentiels vus individuellement par chaque atome ne le soit pas. Cette constante de force reflète la force moyenne qui s'applique sur un atome d'hydrogène. La détermination de cette constante de force permet d'avoir donc un ordre de grandeur de la *résilience* du système, que l'on reformule en terme de rigidité. Plus la pente est forte, plus la flexibilité moyenne du système est importante (peu résilient) et inversement. La constante de force intègre à la fois une contribution entropique ΔS et une contribution enthalpique ΔH .

On peut formaliser ce paramètre en écrivant $\langle k' \rangle$ proportionnelle à la constante de Boltzmann k_B et à la dérivée des MSDs sur la gamme de températures :

$$\langle k' \rangle = \frac{2k_B}{d\langle u^2 \rangle} \sim \frac{0.00276}{d\langle u^2 \rangle} \quad (2.13)$$

avec $\langle u^2 \rangle$ en Å^2 et T en K . Selon la résolution de l'instrument utilisé, on obtient des valeurs typiques entre 0.01-0.1 N.m^{-1} pour des échantillons de poudres hydratées et 0.1-1 N.m^{-1} pour des échantillons de poudres sèches (78).

2.2.2 Diffusion quasi-élastique

Il est de même possible de s'intéresser à la perte ou au gain d'énergie que le neutron subi après son interaction avec l'échantillon. L'étude de cette répartition en énergie couvre la branche de la diffusion *quasi-élastique*.

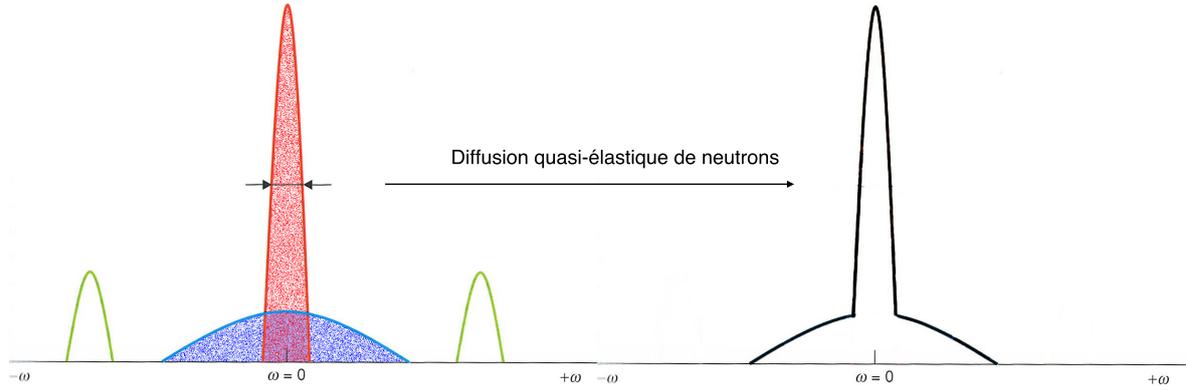


FIGURE 2.4 – Représentation simplifiée d'un spectre de diffusion quasi-élastique incohérente mesuré (figure de droite, trait noir). A chaque angle, un spectre est collecté en fonction du transfert d'énergie. Le spectre comprend le pic élastique et la zone quasi-élastique, cette fois ci résolus en énergie mais convolués. Extraite de (77) et modifiée.

Analyse théorique d'un spectre de diffusion L'intensité mesurée à un angle donné (et donc à une valeur de \mathbf{Q} donnée) sera directement proportionnelle à la section efficace différentielle de diffusion, d'où la relation :

$$I_{mes} = n_s z_s \frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} \quad (2.14)$$

$$= n_s z_s \frac{\sigma}{4\pi} \frac{k_i}{k_f} e^{-\hbar\omega/2k_B T} \underbrace{[S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes Res(\mathbf{Q}, \omega)]}_{S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega)} \quad (2.15)$$

Avec n_s la densité de diffuseurs et z_s l'épaisseur d'échantillon traversée par les neutrons. Le facteur exponentiel (égal à 1 pour de la diffusion élastique) permet de tenir compte qu'il est plus facile pour un neutron de gagner de l'énergie que d'en perdre. A noter que le facteur de structure dynamique mesuré $S_{exp}(\mathbf{Q}, \omega)$ n'est que la convolution entre un facteur de structure qui contient la "vraie" information sur les mouvements, noté ici $S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega)$ et la résolution de l'instrument, notée $Res(\mathbf{Q}, \omega)$.

Les mouvements peuvent être de deux natures : soit des mouvements vibrationnels (phonons), que l'on retrouve dans des bandes d'énergies étroites (pic inélastique), soit des processus de relaxation, caractérisés par une large gamme continue d'énergies (pic quasi-élastique). Dans l'hypothèse où les contributions vibrationnelles (\sim fs) et de relaxation (\sim ps) peuvent être considérées comme décorréllées dans le temps, $S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega)$ se simplifie en

$$S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega) = S_{vib}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes S_{relax}(\mathbf{Q}, \omega) \quad (2.16)$$

avec une première contribution vibrationnelle $S_{vib}(\mathbf{Q}, \omega)$ et une seconde issue des processus de relaxation $S_{relax}(\mathbf{Q}, \omega)$. Dans une gamme d'énergies faibles (transferts limités à la zone quasi-élastique), la contribution vibrationnelle se résume à un facteur de Debye-Waller $e^{-2W(\mathbf{Q})}$, sur lequel vient s'ajouter un bruit de fond $\mathcal{B}(Q)$. La contribution $S_{relax}(\mathbf{Q}, \omega)$ possède deux composantes, une première à énergie nulle qui traduit les mouvements trop lents pour le spectromètre et une seconde partie qui tient compte des mouvements diffusifs $S_{diff}(\mathbf{Q}, \omega)$. La relation (2.16) se simplifie donc en :

$$S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-2W(\mathbf{Q})} [A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + S_{diff}(\mathbf{Q}, \omega)] + \mathcal{B}(Q) \quad (2.17)$$

avec $A_0(\mathbf{Q})$ l'amplitude associée à la composante vue comme immobile par les spectromètre. Le terme diffusif doit ici s'entendre au sens large, à savoir un ensemble de processus, chacun caractérisé différents temps de relaxation. Le facteur $A_0(\mathbf{Q})$ et sa signification seront revus plus en détail dans le paragraphe 2.2.2.

Expression du facteur de structure dynamique diffusif On peut dégager deux types de mouvements diffusifs : les mouvements rotationnels et translationels. Dans l'hypothèse où il n'y a pas de couplage entre les différentes contributions à l'origine du processus de relaxation, on peut écrire

$$S_{diff}(\mathbf{Q}, \omega) = S_{trans}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes S_{rot}(\mathbf{Q}, \omega) \quad (2.18)$$

Diffusion translationnelle ou mouvements à longue distance La contribution des mouvements à longue distance, que l'on peut qualifier de *translationnelle* se représente par une simple lorentzienne⁵ $\mathcal{L}(\Gamma_T, \omega)$, de demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) $\Gamma_T(\mathbf{Q})$ et d'intensité $A_{1,T}(\mathbf{Q})$:

$$S_{trans}(\mathbf{Q}, \omega) = A_{1,T}(\mathbf{Q}) \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_T(\mathbf{Q})}{\omega^2 + \Gamma_T(\mathbf{Q})^2} \quad (2.19)$$

$$= A_{1,T}(\mathbf{Q}) \mathcal{L}(\Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega) \quad (2.20)$$

Diffusion rotationnelle ou mouvements confinés Contrairement à la translation, les mouvements confinés (qualifiés de rotations) sont des mouvements essentiellement localisés et le facteur de structure dynamique sera bien représenté par un développement en lorentziennes du type

$$S_{rot}(\mathbf{Q}, \omega) = j_0^2(Qr)\delta(\omega) + \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1)j_l^2(Qr) \frac{1}{\pi} \frac{l(l+1)D_R}{\omega^2 + l^2(l+1)^2D_R^2} \quad (2.21)$$

$$= j_0^2(Qr)\delta(\omega) + \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1)j_l^2(Qr)\mathcal{L}(\Gamma_{R_l}, \omega) \quad (2.22)$$

avec $j_l(Qr)$ une fonction de Bessel sphérique d'ordre l et r le rayon du volume dans lequel l'atome est confiné. A noter que les demi-largeurs à mi-hauteur Γ_{R_l} ne dépendent pas de \mathbf{Q} (pas de déplacement du centre de masse de l'atome d'hydrogène), contrairement aux mouvements à grandes distances.

En pratique, lors d'une expérience de diffusion de neutrons, on mesurera la fonction suivante (Approximations de Sears)

5. On peut voir le facteur de structure dynamique $S(\mathbf{Q}, \omega)$ comme la probabilité qu'un neutron soit diffusé avec une variation \mathbf{Q} de quantité de mouvement et une variation d'énergie $\hbar\omega$ par rapport à son état initial. Sa double transformé de Fourier inverse est donc de la forme $G(t, x)$, avec $G(t, x)$ la probabilité pour une particule d'être diffusée vers une position x après un temps t par rapport son état initial. Si la diffusion est considérée comme libre, $G(t, x)$ suivra donc une loi de diffusion du type $\frac{\partial G(t, x)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 G(t, x)}{\partial^2 x}$. Une double transformée de Fourier directe de cette équation donnera l'expression $S(\mathbf{Q}, \omega)$ sous la forme d'une lorentzienne avec une demi-largeur à mi-hauteur de la lorentzienne de la forme $\Gamma_T(\mathbf{Q}) = DQ^2$, D étant le coefficient de diffusion de l'atome d'hydrogène. Un écart à la diffusion libre modifiera l'équation de diffusion, donnant toujours une lorentzienne comme solution mais avec une dépendance en Q^2 de la demi-largeur à mi-hauteur plus complexe. Cet écart à la diffusion libre trouve son origine dans les temps de corrélation observés par les neutrons, de l'ordre de la ps. A ces résolutions temporelles, les mouvements sondés sont en fait les processus élémentaires qui forment la diffusion, et non plus la diffusion globale.

$$S_{rot}(\mathbf{Q}, \omega) = j_0^2(Qr)\delta(\omega) + 3j_1^2(Qr)\frac{1}{\pi}\frac{2D_R}{\omega^2 + 4D_R^2} \quad (2.23)$$

$$= A_{2,R}(\mathbf{Q})\delta(\omega) + A_{3,R}(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_R, \omega) \quad (2.24)$$

Expression finale de la section efficace dynamique En reprenant les expressions précédentes, on peut réécrire le facteur de structure dynamique de diffusion de la manière suivante

$$\begin{aligned} S_{dif}(\mathbf{Q}, \omega) &= [A_{1,T}(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega) \otimes (A_{2,R}(\mathbf{Q})\delta(\omega) + A_{3,R}(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_R, \omega))] \\ &= [A_1(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega) + A_2(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_R + \Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega)] \end{aligned} \quad (2.25)$$

L'expression finale de la fonction $S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega)$, en reprenant 2.25 et 2.17

$$\boxed{S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-Q^2\langle u^2 \rangle/3} [A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + A_1(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega) + A_2(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_R + \Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega)] + \mathcal{B}(\mathbf{Q})} \quad (2.26)$$

Limite de l'approche Cette approche (décomposition en mouvements translationels et rotationnels), simple à mettre en oeuvre et à interpréter, ne doit pas faire oublier que l'on ne voit finalement qu'une contribution moyenne, qui est la convolution de différents mouvements.

Cette distinction "rotation-diffusion" doit donc être considérée avec prudence. Un mouvement confiné (pas de dépendance en Q de la lorentzienne fittée) peut être observé sur des instruments qui donnent en temps normal des constantes de relaxation proches des mouvements translationels. Inversement, un mouvement de diffusion moyen peut être observé sur un spectromètre donnant accès à des temps de corrélation de l'ordre de ceux associés à une rotation.

Facteur de structure élastique incohérent (EISF) Malgré le caractère incohérent de la diffusion, il est possible de tirer des informations sur la géométrie du mouvement. Cette information se trouve à transferts d'énergies nuls, ce qui correspond au terme $A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega)$ dans l'expression de $S_{theo}(\mathbf{Q}, \omega)$. On appellera $A_0(\mathbf{Q})$ le *facteur de structure élastique incohérent* ou EISF. Il renseigne sur le nombre d'atomes considérés comme immobiles par rapport à la résolution mais aussi sur la géométrie des mouvements (rayons de confinement en particulier). Il est déterminé expérimentalement par le rapport des intensités élastiques et quasi-élastiques intégrées en énergies :

$$A_0(\mathbf{Q}) = EISF(\mathbf{Q}) = \frac{I_{elas}(\mathbf{Q})}{I_{elas}(\mathbf{Q}) + I_{quasi}(\mathbf{Q})} \quad (2.27)$$

2.2.3 Procédure de traitements des spectres quasi-élastiques

En pratique, lorsque des spectres quasi-élastiques sont collectés sur un spectromètre, ces derniers sont traités de la manière suivante :

- La mesure du pic élastique d'un échantillon de vanadium ou de l'échantillon à 20 K (spectres de *normalisation*) est intégré en énergie, angle par angle. On divise ensuite les spectres d'intérêt et ceux de la cellule vide par la valeur intégrée des spectre de normalisation, ici encore angle par angle.

- La mesure normalisée de la cellule vide est soustraite à celle normalisée de l'échantillon. Cette soustraction peut être du même type que celle de l'équation (2.12). Une procédure de soustraction plus complexe peut être mise en place, en tenant compte de l'auto-absorption de l'échantillon et de la diffusion multiple à travers la cellule. Le traitement primaire des données se termine par une conversion du facteur de diffusion dynamique effectivement mesuré (sous les formes $S(\text{angle}, \text{énergie})$ ou $S(\text{angle}, \text{temps})$) en $S(\mathbf{Q}, \omega)$.
- Une fois le traitement effectué arrive la procédure de fit. Cette dernière consiste à partir d'une fonction représentative de la dynamique de l'échantillon (dans notre cas des lorentziennes), de demi-largeur à mi-hauteur de l'ordre de deux à trois fois la résolution et d'y ajouter un pic de Dirac. Ces deux composantes sont convoluées par la mesure de la résolution (mesure à 20 K ou échantillon de vanadium) et un bruit de fond linéaire (non convolué) est ajouté pour tenir compte des effets des processus vibrationnels.
- Le programme de fit modifie ensuite les paramètres suivants : amplitude du pic de Dirac convolué, amplitude de la lorentzienne non convoluée, demi-largeur à mi-hauteur de la lorentzienne non convoluée et évalue l'accord entre les données et le fit final. Cette procédure est répétée jusqu'à obtenir un fit correct.
- Il est possible que l'accord ne soit pas parfait même après plusieurs cycles d'affinement avec la fonction choisie. Il est alors possible, soit d'ajouter une deuxième fonction de même nature (dans notre cas, deux lorentziennes qui traduisent deux population distinctes), soit de changer de fonction représentative.

2.3 Instruments de diffusion de neutrons

Comme vu dans la sous-section 2.1.1, la dynamique individuelle d'atomes dans un échantillon se reflète dans la diffusion incohérente de neutrons, qu'elle soit élastique ou quasi-élastique. Cette dernière se mesure grâce à des spectromètres dits à *temps de vol*, à *rétro-diffusion* et à *écho de spin*. Seuls les deux premiers, qui ont été utilisés dans cette thèse, seront expliqués.

2.3.1 Spectromètre à rétro-diffusion

Un spectromètre à rétro-diffusion fonctionne de la manière suivante :

- Un faisceau monochromatique d'énergie E_0 est amené sur le spectromètre. Dans le cas d'une mesure élastique, il ne subit pas de modification en énergie. Par contre, pour les mesures quasi-élastiques, le faisceau est polychromatisé à l'aide d'un miroir à effet Doppler.
- Les neutrons traversent l'échantillon et sont diffusés selon la dynamique de l'échantillon, avec une variation d'énergie et un angle donné.
- Les neutrons qui sortent avec une énergie égale à E_0 et seulement ceux-ci vont pouvoir être rétrodiffusés (diffusion à 180°) sur des analyseurs, repasser une deuxième fois dans l'échantillon et être mesurés. Afin d'éviter de mesurer des neutrons qui iraient directement dans les détecteurs sans être diffusés par l'échantillon, un système de choppers permet de filtrer les neutrons.
- En couplant un système de temps de vol du neutron entre le Doppler et le détecteur, on arrive à remonter à la perte ou au gain d'énergie du neutron après traversé de l'échantillon.

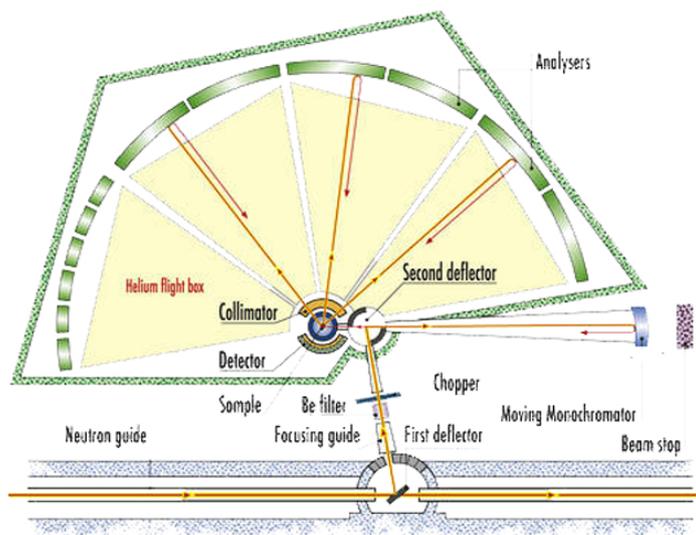


FIGURE 2.5 – Principe de fonctionnement d'un spectromètre à rétro-diffusion de type IN16 (ILL, Grenoble, (79)) ou SPHERES (FRMII, Munich).

Résolution d'un spectromètre à rétro-diffusion Grâce à la condition de rétrodiffusion des neutrons au niveau des analyseurs, les spectromètres à rétro-diffusion permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre du μeV , sur une plage de transfert d'énergies allant de quelques μeV à quelques dizaines de μeV . Cette résolution permet une mesure avec une dynamique proche de la nanoseconde (10^{-9} s). Un spectromètre à rétro-diffusion est donc adapté pour mesurer le signal issu de la diffusion lente de l'atome d'hydrogène. On mesurera le terme $A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + A_1(\mathbf{Q})\mathcal{L}(\Gamma_T(\mathbf{Q}), \omega)$.

Cette excellente résolution peut se comprendre en reprenant la loi de Bragg. En effet, la rétro-diffusion repose sur la sélection des longueurs d'ondes diffusées par l'échantillon par diffraction sur un monocristal de silicium.

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (2.28)$$

et en la dérivant, on peut montrer que la résolution est optimale en condition de rétrodiffusion ($2\theta=180^\circ$)

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \frac{\Delta d_{hkl}}{d_{hkl}} + \frac{\Delta\theta}{\tan \theta} \quad (2.29)$$

$$\left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)_{min} = \frac{\Delta d_{hkl}}{d_{hkl}} \quad (2.30)$$

Spectromètres utilisés Dans cette étude, deux spectromètres à rétrodiffusion ont été utilisés, le spectromètre IN16, à l'ILL (Grenoble) et le spectromètre SPHERES, au réacteur FRM2 (Garching, Allemagne), avec les caractéristiques suivantes

	IN16	SPHERES
Paramètres		
Longueur d'onde λ_0	6.27 Å	6.27 Å
Résolution	0.9 μeV	0.6 μeV
Temps carac.	~ 700 ps	~ 1 ns
Q_{max}	1.9 Å ⁻¹	1.9 Å ⁻¹
Gamme d'énergies la plus large	-15/+15 μeV	-30/+30 μeV

TABLE 2.2 – Longueur d'onde, temps caractéristique, gamme de transfert de quantité de mouvement et gamme d'énergie accessible pour les mesures de diffusion quasi-élastique sur les spectromètres à rétrodiffusion IN16 et SPHERES.

2.3.2 Spectromètre à temps de vol

Sur un spectromètre à temps de vol, le faisceau incident est haché (création de paquets de neutrons) et rendu monochromatique (longueur d'onde unique pour les neutrons d'un même paquet) par un système de *choppers* (disques avec des fentes). Les neutrons arrivent par paquets sur l'échantillon, chaque paquet redéfinissant un temps t_0 de référence. Le concept du temps de vol réside dans le fait que les neutrons froids (thermalisés à 20 K) ont des vitesses de l'ordre de 150 m.s⁻¹. Lorsque le neutron interagit avec l'échantillon, il augmente ou diminue sa vitesse en fonction de l'énergie qu'il a respectivement acquise ou perdue, par rapport à sa vitesse initiale. Les détecteurs placés à distance fixe de l'échantillon enregistrent, pour chaque neutron reçu, le temps qu'il a mis depuis son interaction avec l'échantillon, ce qui donne après transformation un spectre en énergie.

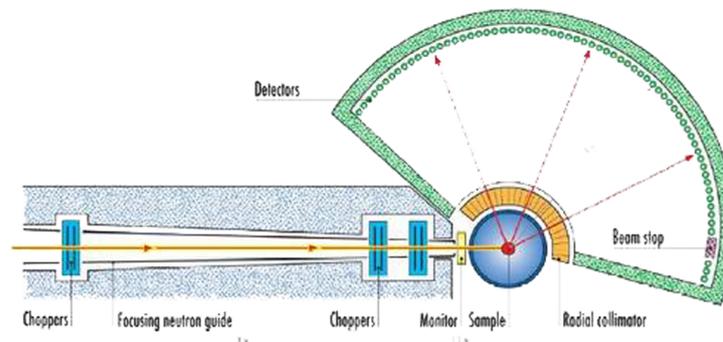


FIGURE 2.6 – Principe de fonctionnement d'un spectromètre à temps de vol de type IN4, IN5, IN6 (ILL, Grenoble) ou TOFTOF (FRM2, Munich)

Résolution d'un spectromètre à temps de vol Contrairement à un spectromètre à rétrodiffusion, les spectromètres à temps de vol travaillent avec des résolutions allant de 1 meV (neutrons thermiques) à 10⁻² meV (neutrons froids), qui correspondent à des temps caractéristiques de la pico-seconde (10⁻¹² s). Une dynamique à l'échelle de la ps est caractéristique de la rotation.

Spectromètre utilisé Dans le cadre de mesure quasiélastiques sur un spectromètre à temps de vol, IN5, à l'ILL (Grenoble) a été utilisé. Ce spectromètre présente les caractéristiques suivantes

IN5	
Paramètres	
Longueur d'onde λ_0	Variable (1.8 Å à 20 Å)
Résolution	Variable (7.5 μeV à 1 meV)
Temps carac.	Variable (1 - 100 ps)
Q_{max}	$11.48/\lambda_0 \text{ \AA}^{-1}$
Gamme d'énergie la plus large	$-\infty/+0.4 \times E_0 \text{ meV}$

TABLE 2.3 – Longueur d'onde, résolution en énergie, temps caractéristique, gamme de transfert de quantité de mouvement et gamme d'énergie accessible sur IN5.

2.4 Relation entre diffusion élastique et quasi-élastique de neutrons

Terminons ce chapitre par la relation entre les informations obtenues par diffusion élastique, qui caractérise un mouvement global et les informations des mesures quasi-élastiques, informant sur la dynamique fine de l'échantillon.

En reprenant la définition théorique de l'intensité élastique, on montre que cette dernière peut se réécrire de manière très générale en fonction d'un terme de Debye-Waller $e^{-2W(\mathbf{Q})}$, du facteur de structure incohérent, l'EISF, de la résolution instrumentale $R(\mathbf{Q}, \omega', \Delta\omega)$ et d'un ensemble de processus de relaxation $\mathcal{L}(\mathbf{Q}, \omega')$:

$$I_{\text{élastique}}(\mathbf{Q})/I_{\text{élastique}}(Q=0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{Q}, \omega') R(\mathbf{Q}, \omega', \Delta\omega) d\omega' \quad (2.31)$$

En reprenant l'expression du facteur de diffusion dynamique $S(\mathbf{Q}, \omega)$ (équation 2.17), on peut écrire que :

$$I_{\text{élastique}}(\mathbf{Q})/I_{\text{élastique}}(Q=0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{Q}, \omega') R(\mathbf{Q}, \omega', \Delta\omega) d\omega' \quad (2.32)$$

$$= e^{-2W(\mathbf{Q})} \int_{-\infty}^{\infty} [EISF(\mathbf{Q})\delta(\omega') + (1 - EISF(\mathbf{Q}))\mathcal{L}(Q, \omega')] R(Q, \omega', \Delta\omega) d\omega'$$

$$= e^{-2W(\mathbf{Q})} [EISF(\mathbf{Q}) + (1 - EISF(\mathbf{Q}))K(\Delta\omega, \mathbf{Q})] \quad (2.33)$$

avec $K(\Delta\omega, \mathbf{Q}) = \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{L}(\mathbf{Q}, \omega') R(\mathbf{Q}, \omega', \Delta\omega) d\omega'$ une correction de résolution⁶

On peut noter différents régimes :

- o A basses températures : la dynamique caractéristique du processus de relaxation reste encore plus lente que le temps associé à la résolution de l'instrument. La correction de résolution est maximale (~ 1), de même que l'EISF (~ 1). On mesure une intensité élastique de la forme $I_{\text{élastique}}(\mathbf{Q})/I_{\text{élastique}}(Q=0) \propto e^{-2W(\mathbf{Q})}$, analytiquement proche de l'intensité élastique obtenue par développement en cumulants qui donne $I_{\text{élastique}}(\mathbf{Q})/I_{\text{élastique}}(Q=0) \propto e^{-Q^2 \langle u^2 \rangle / 6}$. On peut dire que l'on mesure des MSDs vrais par diffusion élastique. A noter qu'à ces températures, l'approximation est valable sur toute la gamme de \mathbf{Q} disponible, les mouvements étant purement harmoniques.

6. Ce facteur ne dépend que de l'instrument utilisé. Dès lors que la comparaison est faite sur le même instrument, il est légitime de ne pas tenir compte de ce facteur, qui peut être arbitrairement pris à zéro.

- A hautes températures : le temps de corrélation du processus devient suffisamment faible, pour voir apparaître un signal quasi-élastique, et pour que la correction de résolution devienne négligeable. On mesure cependant un EISF plus petit que 1. On mesure au final une intensité élastique de la forme $I_{elastic}(\mathbf{Q})/I_{elastic}(Q=0) \propto e^{-2W(\mathbf{Q})} \times EISF(\mathbf{Q})$, ce qui justifie que les MSDs mesurés à ces températures soient qualifiés d'apparents (MSDs vrais modulés par un facteur de forme). Les mesures d'EISF seront d'une grande importance pour la compréhension des MSDs à hautes températures.

De plus amples détails concernant les différentes contributions qui donnent naissance aux MSDs peuvent être trouvés dans (80)

Résumé du chapitre

Les concepts présentés dans ce chapitre sont résumés dans les points suivants :

- La présence d'un spin chez le neutron est à la base des diffusions incohérentes et cohérentes.
- **La diffusion incohérente sonde le mouvement d'un atome individuel, à des gammes temporelles définies par la résolution de l'instrument.**
- La résolution de l'instrument définit les mouvements les plus lents que le spectromètre est capable de résoudre.
- L'interaction entre les atomes de l'échantillon peut se faire sans ou avec perte/gain d'énergie pour le neutron. On se placera respectivement dans le domaine de la diffusion élastique et quasi-élastique. **Les mesures élastiques renseignent sur la dynamique globale de l'échantillon alors que les mesures quasi-élastiques sondent la nature des mouvements et leur dynamique associées.**
- **Les mesures à basses résolutions sont associées à des dynamiques dans la gamme 1-10 ps** et sont accessibles par des instruments à temps de vol.
- **Les mesures à hautes résolutions sont associées à des dynamiques dans la gamme 100-1000 ps** et sont accessibles par des instruments à rétro-diffusion.

TRAVAUX EFFECTUÉS

Travaux effectués et leur contexte

Au delà du simple contexte des protéines intrinsèquement désordonnées, bien que celles-ci prennent une place majoritaire dans cette thèse, ce travail doit être perçu comme s'orientant de manière plus générale vers la dynamique des protéines et la relation qu'elles entretiennent avec l'eau d'hydratation, cette couche de solvant vitale pour la fonction biologique.

La grande variété des systèmes biologiques nous a amené à caractériser un grand nombre de ces derniers, afin d'esquisser une vue cohérente, plutôt que de cibler une macromolécule particulière. L'ensemble de ces mesures fournira, nous l'espérons, une base de réflexion pour de futures études sur ces systèmes.

En particulier, les points suivants seront développés :

- La dynamique des protéines, globulaires, intrinsèquement désordonnées et dépliées par mutation en condition natives, par diffusion incohérente élastique et quasi-élastique de neutrons.
- La dynamique des couches d'hydratation, de ces mêmes protéines, en couplant la deutération de protéine, la diffusion incohérente élastique et quasi-élastique de neutrons et la spectroscopie Terahertz.
- L'influence de la nature de la couche de solvatation sur sa dynamique, par diffusion élastique de neutrons.
- La dynamique des groupements méthyle d'une protéine, en utilisant la deutération sélective de protéines, ainsi que la diffusion élastique de neutrons.

Ces travaux font suite à ceux de Giuseppe Zaccai, Valérie Réat, Kathleen Wood et Martin Weik sur la dynamique des protéines membranaires. Ils se situent en droite ligne des travaux initiés par Kathleen Wood et Martin Weik sur le couplage entre l'eau d'hydratation et les protéines, membranaires et globulaires. Ils s'inscrivent de manière plus générale dans l'élaboration de la *carte de la dynamique cellulaire*, et de ses composants (eau intracellulaire, ribosomes, protéines, ARN, ADN,), thématique initiée par Marion Jasnin et Giuseppe Zaccai. Pour terminer, citons le contexte de l'environnement dans lequel évolue la cellule et les modifications de la dynamique qu'elle met en place pour prospérer, approche développée par Moëva Tehei.

Dynamique des protéines désordonnées par diffusion élastique de neutrons. Couplage avec l'eau d'hydratation

Sommaire

3.1	Dynamique des IDP et de leur eaux d'hydratation	48
3.1.1	Problématiques et motivations	48
3.1.2	Systèmes biologiques : les protéines Tau et MBP	48
3.1.3	Biochimie de la protéine Tau et culture de bactéries par fermentation	50
3.1.4	Préparation et caractérisation des échantillons pour la diffusion de neutrons	56
3.1.5	Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de Tau	60
3.1.6	Résultats et discussion	60
3.2	Dynamique des protéines dépliées par mutations en conditions natives	70
3.2.1	Problématiques et motivations	70
3.2.2	Système biologique : la MBP dépliée par mutations ou MBP0	70
3.2.3	Diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine MBP0	71
3.2.4	Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons	72
3.2.5	Caractérisation de la MBP0 en solution par chromatographie d'exclusion de taille	72
3.2.6	Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de MBP0	75
3.2.7	Résultats et discussion	76
3.3	Conclusion	78

CE CHAPITRE présente les résultats concernant la dynamique des protéines désordonnées et de leur couche d'hydratation par diffusion incohérente élastique de neutrons. Y est développée en particulier la relation que la couche d'hydratation d'une IDP entretient avec sa protéine, à la lumière des résultats obtenus sur les protéines globulaires et membranaires déjà publiés. Ce chapitre s'articule dans un premier temps autour des mesures de dynamique d'une IDP, Tau, et une protéine globulaire de référence, la *maltose binding protein* (MBP), pour ensuite se focaliser dans un deuxième temps sur l'analyse des mesures de diffusion élastique de neutrons sur les couches d'hydratation de

ces mêmes protéines et ainsi étudier la relation qu'une protéine et son eau entretient. Le chapitre se poursuit avec l'étude d'une protéine désordonnée cette fois-ci non native, afin de poser les jalons de la dynamique associés aux différents états des protéines (globulaire, membranaire, nativement désordonné, non native désordonnée ou encore agrégée).

Ce chapitre est en partie basé sur la publication dans *Biophysical Journal*, volume 103, Issue 1, Juillet 2012, Pages 129–136 :

Dynamical Coupling of Intrinsically Disordered Proteins and Their Hydration Water : Comparison with Folded Soluble and Membrane Proteins

F.-X. Gallat^{1,2,3,4}, A. Laganowski⁵, K. Wood⁶, F. Gabel^{1,2,3}, L. van Eijk⁴, J. Wuttke⁷, M. Moulin^{4,8}, M. Härtlein^{4,8}, D. Eisenberg⁵, J.-P. Colletier^{1,2,3}, G. Zaccai^{4,2} & M. Weik^{1,2,3,9}

¹Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie Structurale, F-38054 Grenoble, France ;
²CNRS, UMR5075, F-38027 Grenoble, France ; ³Université Joseph Fourier, F-38000, Grenoble, France ;
⁴Institut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, B.P. 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France ; ⁵Department of Energy Institute of Genomics and Proteomics, University of California, Los Angeles, CA 90095 ;
⁶Australian Institute Science and Technology Organisation, Menai NSW Australia ; ⁷Forschungszentrum Jülich, JCNS at FRM II, Lichtenbergstrasse 1, 85747 Garching, Germany ; ⁸ILL-EMBL Deuteration Laboratory, Partnership for Structural Biology, Grenoble ; ⁹ESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France.

Dynamical Coupling of Intrinsically Disordered Proteins and Their Hydration Water: Comparison with Folded Soluble and Membrane Proteins

F.-X. Gallat,^{†‡§¶} A. Laganowsky,^{††} K. Wood,^{‡‡} F. Gabel,^{†‡§} L. van Eijk,[¶] J. Wuttke,^{§§} M. Moulin,^{¶¶} M. Härtlein,^{¶¶} D. Eisenberg,^{††} J.-P. Colletier,^{†‡§} G. Zaccai,^{†‡§¶} and M. Weik^{†‡§¶¶¶}

[†]Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie Structurale, [‡]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5075, [§]Université Joseph Fourier, [¶]Institut Laue-Langevin, ^{||}Institut Laue-Langevin/European Molecular Biology Laboratory Deuteration Laboratory, Partnership for Structural Biology, and ^{**}European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France; ^{††}Department of Energy Institute of Genomics and Proteomics, University of California, Los Angeles, California; ^{‡‡}Australian Institute Science and Technology Organisation, Menai NSW, Australia; and ^{§§}Forschungszentrum Jülich, Jülich Center for Neutron Science at FRM II, Garching, Germany

ABSTRACT Hydration water is vital for various macromolecular biological activities, such as specific ligand recognition, enzyme activity, response to receptor binding, and energy transduction. Without hydration water, proteins would not fold correctly and would lack the conformational flexibility that animates their three-dimensional structures. Motions in globular, soluble proteins are thought to be governed to a certain extent by hydration-water dynamics, yet it is not known whether this relationship holds true for other protein classes in general and whether, in turn, the structural nature of a protein also influences water motions. Here, we provide insight into the coupling between hydration-water dynamics and atomic motions in intrinsically disordered proteins (IDP), a largely unexplored class of proteins that, in contrast to folded proteins, lack a well-defined three-dimensional structure. We investigated the human IDP tau, which is involved in the pathogenic processes accompanying Alzheimer disease. Combining neutron scattering and protein perdeuteration, we found similar atomic mean-square displacements over a large temperature range for the tau protein and its hydration water, indicating intimate coupling between them. This is in contrast to the behavior of folded proteins of similar molecular weight, such as the globular, soluble maltose-binding protein and the membrane protein bacteriorhodopsin, which display moderate to weak coupling, respectively. The results provide evidence that protein and hydration-water motions mutually affect and shape each other, and that there is a gradient of coupling across different protein classes that may play a functional role in macromolecular activity in a cellular context.

INTRODUCTION

Water is an integral part of protein structures, mediates macromolecular recognition, modulates ligand binding and allosteric effects, reacts in biochemical processes, and participates in electron and proton transfer (1). The formation of a productive enzyme-substrate complex, for instance, is preceded by a slowing of water motions in the protein hydration layer (2), providing strong evidence that water is indeed actively involved in macromolecular biological activity (3). Furthermore, water plays essential roles via its unusual hydrogen-bond dynamics, which contributes to the hydrophobic effect in protein folding and modulates macromolecular flexibility through formation and breaking of hydrogen bonds at the protein-water interface (4). Consequently, it has been proposed that macromolecular dynamics is controlled by hydration-water dynamics (5) not only at the macromolecule's surface but also in its interior (6). Whereas the influence of hydration water on the dynamics of folded, soluble proteins has been studied extensively (4,7,8), little is known about the coupling of hydration water in the case of

IDPs. The corollary aspect of dynamical coupling, viz., the influence of protein motions on water motions, also remains largely unstudied, mostly because of experimental difficulties in directly accessing water dynamics. Before we can draw a more general picture of protein-water dynamical coupling, we need to study different protein classes and protein effects on hydration-water dynamics. Here, we focused on the unexplored class of IDPs and directly assessed their hydration-water dynamics by studying perdeuterated proteins using elastic incoherent neutron scattering (EINS).

IDPs are, by definition, proteins that function without the requirement of a well-defined, unique three-dimensional (3D) structure in isolation (9,10). Approximately 30% of eukaryotic proteins are thought to be either fully or partially disordered (11), and it seems that evolution selected disorder to go with species complexity. IDPs fulfill specific biological roles in cells (12,13) that are often dependent on their partial folding upon interaction with a functional partner (14). This is the case for the microtubule-associated tau protein, which folds partially upon binding to tubulin. Tau has attracted considerable attention because its abnormal intracellular deposition as so-called paired-helical filaments is one of the main hallmarks of Alzheimer disease (15). Other IDPs are also prone to aggregate into amyloid fibrils, and as such are involved in many neurodegenerative diseases (e.g., the β -amyloid peptide and α -synuclein in Alzheimer

Submitted February 24, 2012, and accepted for publication May 18, 2012.

*Correspondence: weik@ibs.fr

L. van Eijk's present address is Reactor Institute Delft, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.

A. Laganowsky's present address is Department of Chemistry, Chemistry Research Laboratory, University of Oxford, Oxford, UK.

Editor: Elizabeth Rhoades.

© 2012 by the Biophysical Society
0006-3495/12/07/0001/8 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2012.05.027

BPJ 3883

disease and Parkinson disease, respectively (16)). Tau has six isoforms, ranging from 352 to 441 residues in length, that are generated through alternative splicing in the central nervous system (17). The proposed biological role of tau involves stabilization of microtubules, which is regulated through specific phosphorylation (15). If aberrant hyperphosphorylation of tau occurs, the protein's repeat domains, which have a propensity for β -sheets (18) and β -turns (19), form cross- β -structures and aggregate into paired helical filaments (20). As is generally the case for IDPs (21), tau has a large content of polar and charged residues compared with that of hydrophobic residues, which prevents the protein's hydrophobic collapse into a folded structure. As a consequence, tau likely features a much larger solvent-accessible surface compared with a globular protein of similar molecular weight. One might suspect, therefore, that the coupling of hydration-water dynamics with tau dynamics, and with IDP dynamics in general, would differ in nature and strength from that observed for a folded, globular protein. Yet, no experimental evidence directly addressing this issue has been reported.

Neutron scattering is a unique experimental method that provides direct access to molecular dynamics on a nano- to picosecond timescale and angstrom (\AA) length scale (22). The incoherent scattering of neutrons by a biological sample is largely dominated by hydrogen nuclei, whose incoherent scattering cross section is ~ 40 times larger than those of other nuclei, including deuterium, the stable isotope of hydrogen. Because hydrogen atoms are homogeneously distributed throughout a protein and located mainly in amino acid side chains ($\sim 84\%$ for tau), the mean-square displacement (MSD) extracted from EINS experiments yields information concerning averaged side-chain motions and thus provides a measure of a protein's global flexibility (23). Because the INS cross section of deuterium is much lower than that of hydrogen, one can employ specific deuteration to mask the contribution of the labeled part in a sample. Perdeuterating a protein and then hydrating it in H_2O minimizes its contribution to the INS signal, and therefore it is mostly the water dynamics that is measured, despite the limited deuterium-hydrogen exchange (7,24–26). In contrast to x-ray crystallography, which provides atomic-resolution structural information on hydration water (27), and to NMR (28) and time-resolved fluorescence spectroscopy (29), which provide site-resolved dynamical information on hydration water on the nano- to picosecond timescale, neutron scattering yields an average but model-free amplitude of nano- to picosecond water motions on the angstrom length scale. Conversely, when a natural-abundance protein is hydrated in D_2O , the protein dynamics can be directly measured by INS. To focus on hydration water in our neutron scattering experiments, we examined hydrated powders that were devoid of bulk water. A hydrated powder of a medium-sized globular, folded protein at 0.4 g water/g protein is sufficient to ensure macromolecular biological

activity (30,31) and is thought to correspond to monolayer water coverage of the protein surface (30). This level of hydration is six times lower than that of a typical animal cell containing $\sim 75\%$ water by weight (32). Previous ^{17}O magnetic relaxation dispersion experiments suggested that the dynamic perturbation factor of water in hydrated protein powders is increased 1–2 orders of magnitude compared with the free hydration layer of a protein in solution (33). Therefore, it is important to examine samples at the same hydration level if protein and hydration-water dynamics are to be compared among different classes of proteins, as was the case in this study.

Here, we employed EINS to examine powders of hydrogenated and deuterated tau, hydrated in D_2O and H_2O , respectively, to study hydration water and IDP motions separately but on the same protein. The extracted MSDs reveal a greater motional flexibility of IDP compared with globular, folded proteins in powders hydrated at the same level and more restricted water motions on the IDP surface. The comparison of MSDs across different protein classes reveals a gradient of coupling between hydration-water and protein motions, which is tightest in IDP and loosest in membrane proteins.

MATERIALS AND METHODS

Expression and purification of unlabeled and perdeuterated htau40 protein

The htau40 isoform of the tau protein was expressed in the Institut Laue-Langevin/European Molecular Biology Laboratory (ILL-EMBL) Deuteration Laboratory (Grenoble, France) as a histidine-tagged fusion protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) following protocols that will be published in detail elsewhere (A. Laganowsky, J.-P. Colletier, and D. Eisenberg., unpublished results) in its hydrogenated (H-tau) and perdeuterated (D-tau) forms. Briefly, a high-cell-density fermentation process with Enfors minimal medium (34) was used to grow bacteria to an OD_{600} of 12–14, followed by induction of protein expression by isopropyl- β -D-thio-galactoside to a final concentration of 0.5 mM. Bacteria were harvested when an OD_{600} of 20 was reached. To obtain deuterated tau, *E. coli* cells were grown in D_2O minimal medium with d_8 -glycerol (fully deuterated glycerol) as the carbon source and D_2O as solvent. The expressed protein was purified by immobilized-metal-ion-affinity chromatography on a nickel affinity column, followed by size-exclusion chromatography. For purification of both D-tau and H-tau samples, H_2O -based buffer systems were used. The crude protein extract was incubated with the nickel resin, washed three times with 10 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoethanol (BME), and 1 M, 500 mM and 250 mM sodium chloride, respectively. Protein was eluted with 250 mM imidazole, 5 mM BME, and 300 mM sodium chloride. Eluted fractions containing tau were pooled and dialyzed against 500 mM ammonium acetate and loaded on a Sephacryl S200 size-exclusion column that was previously equilibrated with the same buffer. The eluted fractions were pooled. Protein purity was assessed by 12% Tris-Tricine SDS-PAGE.

Small-angle x-ray scattering

Small-angle x-ray scattering (SAXS) experiments on H-tau (4.7 mg/ml) in H_2O , 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl were performed at 15°C in a glass capillary on the ID14-3 BioSAXS beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The sample-detector distance

was 2.6 m, yielding Q -range from 0.005 to 0.56 \AA^{-1} for an x-ray wavelength of 0.931 \AA (13.32 keV). The absence of radiation damage was verified by 10 successive exposures, each of 10 s duration. The final exposure time was 100 s for all samples and buffers. The 2D diffraction patterns were normalized to an absolute scale and azimuthally averaged to obtain the intensity profiles $I(Q)$ (see Fig. S1 in the Supporting Material) within BSxCuBE (ESRF beamline data collection software). Solvent contributions (buffer backgrounds collected before and after every protein sample) were averaged and subtracted from the corresponding protein sample using the program PRIMUS (35). The same program was used to extract the radius of gyration (R_g) in a Q -range with $Q_{\max}R_g = 1$.

Multi-angle laser light scattering

We performed size-exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering (MALLS) to assess the monodispersity, oligomerization state, and average molecular weight of the purified H-tau. For each point on the size exclusion chromatogram, the amount of light at various angles was recorded and converted directly into a molecular weight value, because the size of the particle was much lower than the wavelength. We then obtained the average molecular weight from the weight distribution across the elution peak. We used a 690 nm laser and a DAWNEOS detector (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA), and processed the data with the use of ASTRA software (Wyatt Technology). The size-exclusion chromatography column was equilibrated in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.

Electron microscopy

We verified the absence of paired helical filaments in the H-tau sample in solution before lyophilization by electron microscopy employing negative staining with uranyl acetate and 0.5 mg/ml H-tau in H_2O .

Sample preparation for EINS and neutron diffraction experiments

The tau solutions were flash-cooled in liquid nitrogen and then lyophilized. Because ammonium acetate is volatile, the samples did not contain any residual salt. The lyophilized protein powders were dried over P_2O_5 for 4 days on a $4 \times 3 \text{ cm}^2$ flat aluminum sample holder. Dolman and co-workers (36) reported that after such a procedure, lysozyme retains only four tightly bound structural water molecules. The resulting hydration level was defined as corresponding to 0 g water/g tau. Dry H-tau (149 mg) and D-tau (204 mg) powders were then rehydrated over pure D_2O and H_2O , respectively, up to a hydration level of 0.44 g D_2O /g H-tau (H-tau- D_2O sample) and 0.38 g H_2O /g D-tau (D-tau- H_2O sample); corresponding in both cases to 1040 water molecules per tau molecule as determined by weighting. Samples were then sealed by an aluminum cover (0.3 mm neutron path length) and a 1 mm indium seal. The two closed samples were used for all neutron (spectroscopy and diffraction) experiments described herein.

If we assume that all exchangeable hydrogens in the H-tau and all exchangeable deuterons in the D-tau protein (i.e., 24% of all hydrogens/deuterons in the protein) exchange, we can calculate the following contributions to the total incoherent scattering cross section of the samples:

D-tau- H_2O sample: 29% protein (8% from deuterated protein and 92% from the deuterons exchanged against hydrogens) and 71% from hydration water (H_2O)

H-tau- D_2O sample: 97% protein (99% from hydrogenated protein and 1% from the hydrogen atoms exchanged against deuterons) and 3% from hydration water (D_2O)

Similar contributions were previously calculated for hydrogenated and deuterated maltose-binding protein (MBP) powders hydrated at a level

of $\sim 0.4 \text{ g water/g protein}$ in D_2O (H-MBP- D_2O sample) and H_2O (D-MBP- H_2O sample), respectively (7).

To determine the MSD of dry tau powder, 104 mg of H-tau was placed in a $4 \times 3 \text{ cm}^2$ aluminum sample holder and dried over P_2O_5 for 4 days (H-tau-dry sample). The sample holder was then sealed with a 1 mm indium seal and closed with an aluminum cover.

Natural-abundance (hydrogenated) horse-heart myoglobin (Mb) was purchased as a lyophilized powder (Sigma, St. Louis, MO) and 125 mg were dried over P_2O_5 for 24 h on a $4 \times 3 \text{ cm}^2$ flat aluminum sample holder. The resulting hydration level was defined as corresponding to 0 g water/g Mb. The dry Mb powder was then rehydrated through the vapor phase over 100% D_2O . When a final weight corresponding to a hydration level of 0.43 g D_2O /g Mb (corresponding to 0.4 g H_2O /g hydrogenated protein or 386 water molecules) was reached, the sample (hereafter termed H-Mb- D_2O) was sealed by an aluminum cover (0.3 mm neutron path length) and a 1 mm indium seal.

EINS experiments on the IN16 spectrometer

EINS experiments were carried out on the backscattering IN16 spectrometer (37) at the ILL (Grenoble, France). The instrumental energy resolution of 0.9 \mu eV (full width at half-maximum) allowed motions faster than 1 ns to be probed. The instrument uses neutrons with a wavelength of 6.27 \AA and scattering vectors Q in the range of $0.02\text{--}1.9 \text{ \AA}^{-1}$. Each sample was inserted at room temperature into an orange ILL cryostat at 135° with respect to the incoming neutron beam. The temperature was lowered to 20 K over 2 h. Elastically scattered neutrons were then counted while the temperature was continuously increased from 20 to 300 K at a rate of 0.12 K/min for H-tau- D_2O , 0.10 K/min for D-tau- H_2O , 0.21 K/min for H-tau-dry, and 0.20 K/min for H-Mb- D_2O (elastic scans). The elastically scattered intensity of the empty cell was measured at 20, 150, and 290 K. The elastically scattered signal of the empty cell at intermediate temperatures was obtained by linear interpolation. The elastically scattered signals of the protein samples were then calculated according to the following formula:

$$I_{\text{sample},T}(Q) = \frac{I_{\text{total},T}(Q) - t * I_{\text{empty},T}(Q)}{\langle I_{\text{total},T}(Q) - t * I_{\text{empty},T}(Q) \rangle_{20-24K}} \quad (1)$$

where $I_{\text{sample},T}(Q)$ is the normalized intensity scattered from the sample at the temperature T , corrected for instrument effects and empty-cell scattering; $I_{\text{total},T}(Q)$ is the measured sample intensity; and $I_{\text{empty},T}(Q)$ is the scattered intensity from the empty cell. The brackets represent the elastic intensity averaged in the temperature window from 20 to 24 K, and t is the measured sample transmission (0.89 for H-tau- D_2O and 0.77 for D-tau- H_2O). $I_{\text{sample},T}(Q)$ is presented at selected temperatures in Fig. S2 for H-tau- D_2O (panel A) and D-tau- H_2O (panel B).

We extracted atomic MSDs ($\langle u^2 \rangle$) using the Large Array Manipulation Program of ILL from the Q dependence of the elastic intensity, which can be described in the Gaussian approximation by

$$I_{\text{sample},T}(Q) \approx \exp\left(\frac{-Q^2 \langle u^2 \rangle}{6}\right) \quad (2)$$

This expression remains valid as long as $Q^2 \langle u^2 \rangle \leq 2$. MSDs were extracted in the range of $0.19 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.13 \text{ \AA}^{-2}$ for the D-tau- H_2O sample (Fig. S2 B), and in the range of $0.19 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.32 \text{ \AA}^{-2}$ for the H-tau- D_2O (Fig. S2 A) and H-tau-dry samples. We verified that the MSD of H-tau- D_2O did not change significantly when extracted from data in a range reduced to $0.19 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.13 \text{ \AA}^{-2}$ (not shown). Published data on MBP (7) and RNase (38) were reexamined for MSD extraction in the same Q^2 -ranges as for tau (i.e., $0.19 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.13 \text{ \AA}^{-2}$ for the D-MBP- H_2O , and $0.19 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.32 \text{ \AA}^{-2}$ for H-MBP- D_2O , H-RNase- D_2O , and H-RNase-dry). MSDs were extracted in the range of $0.20 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 1.40 \text{ \AA}^{-2}$ for the H-Mb- D_2O sample.

The slope of MSD versus temperature decreased suddenly at 263 K for both D-MBP-H₂O (7) and D-tau-H₂O. Such a change in slope indicates that motions partly leave the experimental time-space window covered by the spectrometer, resulting in an apparent reduction in MSD (39). Therefore, only MSDs below 263 K were meaningful for D-MBP-H₂O (7) and D-tau-H₂O, respectively (Fig. 1 B; also see Fig. 4).

Neutron diffraction on H-tau-D₂O as a function of the hydration level

We determined the hydration threshold above which the presence of crystalline ice at 200 K indicates the presence of bulk-like water in addition to hydration water with a second H-tau-D₂O sample by making use of the neutron diffraction option on IN16 (40). The presence of hexagonal crystalline ice (I_h ; space group P6₃/mmc) was indicated by its 1 0 0 reflection at $2\theta = 107^\circ$ ($\lambda = 6.27 \text{ \AA}$). I_h was present at 0.8, 0.7, and 0.6 but not at 0.5 and 0.4 g D₂O/g H-tau.

Neutron diffraction on D-tau-H₂O to exclude the formation of paired helical filaments

We examined the same D-tau-H₂O and H-tau-D₂O samples as used for neutron spectroscopy on the D16 diffractometer at the ILL with a wavelength of 4.75 Å. The samples were placed perpendicularly to the incident neutron beam, and the diffraction pattern was measured at room temperature in a Q -range of 0.35–1.42 Å⁻¹. Cross- β -structures, such as those found in paired helical filaments of neurofibrillary tangles, are characterized by peaks at 1.33 Å⁻¹ (0.47 nm) and 0.59 Å⁻¹ (1.07 nm) (20). The absence of any such diffraction peak indicated that no neurofibrillary tangles had formed in the samples.

RESULTS

Biophysical characterization of H-tau and D-tau

The human httau40 isoform (the longest and most commonly found isoform of human tau with 441 residues; 45 kDa; UniProt entry code P10636-8 (Isoform Tau-F); referred to as tau throughout this work) was expressed and purified in its hydrogenated (H-tau) and perdeuterated (D-tau) forms. H-tau in solution was analyzed by SAXS and found to be monodisperse, with a radius of gyration of 63 Å in accor-

dance with published data (41). MALLS provided evidence for the absence of tau oligomers in the H-tau solution. Negative-staining electron microscopy on H-tau in solution showed that no fiber structures were present. For neutron scattering experiments, lyophilized powders of hydrogenated and perdeuterated tau were hydrated to a level of 0.44 g D₂O/g H-tau (H-tau-D₂O sample) and 0.38 g H₂O/g D-tau (D-tau-H₂O sample), corresponding to 0.4 g H₂O/g H-tau or 1040 water molecules per tau molecule, as determined by weighing. A neutron diffraction pattern of the hydrated D-tau-H₂O powder sample was collected at room temperature and excluded the presence of the diffraction peaks at 0.47 and 1.07 nm that are characteristic of cross- β -structures, such as in paired helical filaments (20). A neutron diffraction pattern at 200 K of the H-tau-D₂O sample also indicated the absence of crystalline ice. However, crystalline ice was present at 200 K when an H-tau-D₂O sample was hydrated to levels of $\geq 0.6 \text{ g water/g protein}$. The solvent-accessible surface area of tau was estimated to be 47,000 Å² by the protSA server (42), which employs the *Flexible-Meccano* algorithm to generate ensembles of IDP (43). This value compares with 15,000 Å² computed for folded MBP, a folded globular protein of similar molecular mass (43 kDa) to tau (45 kDa).

EINS experiments

To examine the protein and water dynamics separately, we conducted EINS experiments as a function of temperature (ranging from 20 to 300 K) on H-tau-D₂O and D-tau-H₂O powders, respectively. Atomic MSDs were extracted and compared with values based on previously reported data (7) for deuterated and hydrogenated MBP powders hydrated in H₂O and D₂O, respectively (Fig. 1).

We monitored the protein dynamics by using the temperature-dependent MSD of side-chain motions as determined for H-proteins hydrated in D₂O (Fig. 1 A). In an empirical approach based on a quasi-harmonic approximation, an

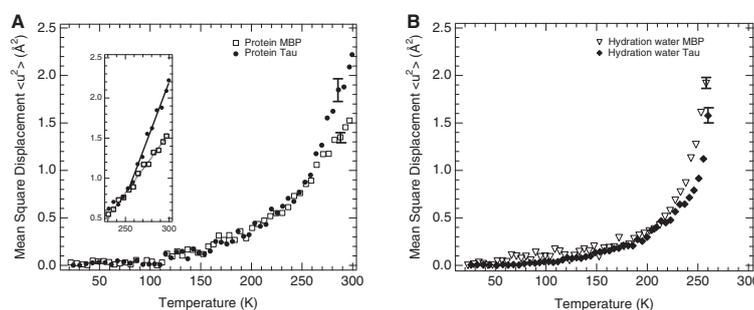


FIGURE 1 (A) MSDs of side-chain motions as a function of temperature for the IDP tau (solid circles, H-tau-D₂O) and the folded MBP (open squares, H-MBP-D₂O) as determined by neutron spectroscopy on hydrogenated protein powders hydrated in D₂O to ~0.4 g water/g protein. Effective force constants were 0.185 Nm⁻¹ (MBP) and 0.096 Nm⁻¹ (tau) as extracted from the slopes above 250 K (inset). (B) MSDs of hydration-water motions on the surfaces of tau (solid diamonds; D-tau-H₂O) and MBP (open triangles; D-MBP-H₂O) as determined on deuterated protein powders hydrated in H₂O at ~0.4 g water/g protein. The

MBP data (7) were reexamined for MSD extraction in the same Q^2 -ranges as for tau. Errors are shown for selected high-temperature data points and are smaller at lower temperatures (not shown). Data were measured on the IN16 spectrometer at the ILL, Grenoble, France.

effective force constant can be extracted from the slope of the MSD versus temperature (23). This force constant corresponds to the average structural resilience of the protein in the respective temperature range. Above 250 K, this constant is two times lower for tau than for MBP. At room temperature, MSDs are 50% larger for tau than for MBP. Interestingly, the differences in MSD between tau and MBP (Fig. 1 A) by far exceed the small differences observed between the MSDs of folded, globular proteins of different sizes, viz., MBP (387 amino acid residues; 43 kDa), Mb (153 residues; 17 kDa), and RNase (124 residues; 14 kDa), all hydrated at a level of ~ 0.4 g D₂O/g hydrogenated protein (Fig. 2). EINS experiments were also carried out on a dry tau powder (H-tau-dry sample), and the MSDs compared with that of dry RNase (38). Above 220 K, the MSDs of H-tau-dry are larger than those of a dry RNase powder (Fig. 3).

By examining the deuterated proteins hydrated in H₂O, we were able to obtain direct information about the hydration-water dynamics, because the protein signal was largely masked (see Materials and Methods section for details). Below 230 K, the hydration water of tau and MBP displayed similar MSDs (Fig. 1 B). Above 230 K, the MSDs of hydration water were smaller for tau than for MBP. The MSDs of tau and its hydration water were determined in several independent experiments and on two different neutron backscattering spectrometers (IN16 (37) at the ILL, and SPHERES (44) at the Jülich Center for Neutron Science at FRM II, Garching, Germany), both of which monitor motions on a nano- to picosecond timescale. Almost identical MSDs were obtained (see Fig. S3 and Fig. S4), indicating the accuracy with which MSD can be determined by EINS.

One can assess the degree of coupling between protein and hydration-water dynamics by comparing the tempera-

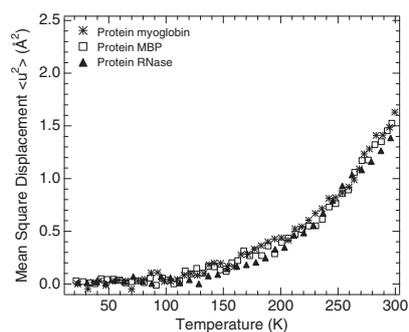


FIGURE 2 MSDs of hydrogenated powders of three folded, globular proteins of different sizes, viz., MBP (open squares; H-MBP-D₂O), RNase (solid triangles; H-RNase-D₂O), and Mb (crosses; H-Mb-D₂O), hydrated at ~ 0.4 g D₂O/g protein. Published neutron spectroscopy data for H-RNase-D₂O (38) and H-MBP-D₂O (7) as measured on IN16 were reexamined for MSD extraction in the same Q^2 -range (0.19–1.32 Å⁻²) used for the H-tau-D₂O sample.

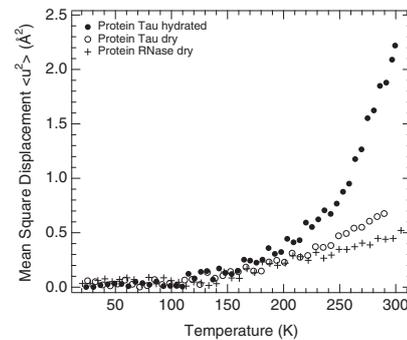


FIGURE 3 MSDs of dry tau (H-tau-dry, open circles), hydrated tau (H-tau-D₂O, solid circles), and dry RNase (H-RNase-dry, crosses) powders. Published neutron spectroscopy data for H-RNase-dry (38), obtained on IN16, were reexamined for MSD extraction in the same Q^2 -range (0.19–1.32 Å⁻²) as for the H-tau-dry sample. MSDs of H-tau-D₂O are the same as those displayed in Figs. 1 A and 4 A.

ture dependences of their MSDs (Fig. 4). For the disordered tau, the protein and water MSDs largely follow each other up to 250 K (Fig. 4 A), whereas they diverge above 220 K for the folded MBP (Fig. 4 B).

DISCUSSION

Increased side-chain flexibility of intrinsically disordered tau

At temperatures above 260 K, the MSDs of side-chain motions in the hydrated IDP tau are larger than those in the folded, globular protein MBP (Fig. 1 A). At room temperature, they differ by 50%. The associated effective force constant, which expresses the average structural resilience of the protein, is two times lower for tau than for MBP. Thus, the IDP is characterized by increased flexibility and reduced resilience compared with folded proteins of various sizes. The increased flexibility may be due to differences in the amino acid composition of IDP and folded proteins (IDPs have a large content of polar and charged residues compared with that of hydrophobic residues), because different types of amino acids display different nano- to picosecond dynamics (45). An additional or alternative explanation for increased IDP flexibility above 260 K could be increased conformational freedom of the backbone that propagates to increased side-chain flexibility in EINS experiments. Our results are in line with quasi-elastic neutron scattering experiments on hydrated powders of intrinsically disordered casein proteins, which showed that they display higher flexibility than folded proteins (46). However, hydrated powders of folded wild-type and partially unfolded mutant staphylococcal nuclease displayed similar MSDs (47), as did hydrated powders of native and denatured lysozyme (48). Interestingly, unfolded tRNA showed smaller

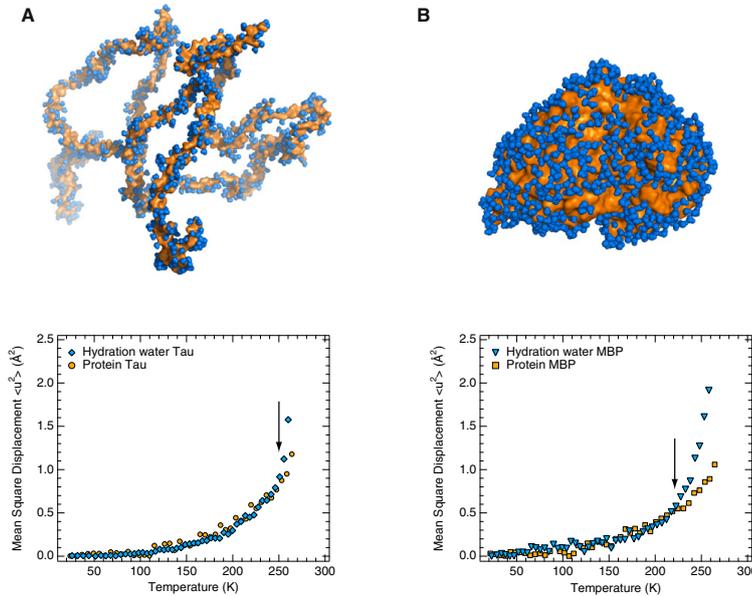


FIGURE 4 Dynamical coupling of protein dynamics with hydration-water motions for different protein classes. Temperature-dependent atomic MSDs of proteins (orange data points) are compared with those of hydration water (blue data points) and are identical to the ones shown in Fig. 1. (A) IDP tau. (B) Folded, globular MBP (7). An ensemble of 100 tau structures was generated using a coil library (58) and a structure with a calculated radius of gyration (63 Å) identical to that measured by SAXS (63 Å) was chosen for the upper half of panel A. Approximately 1000 water molecules forming the first hydration shell are shown in panel A, corresponding to the experimental hydration level of 0.4 g water/g protein. Data were obtained on the IN16 spectrometer at the ILL, Grenoble, France. Arrows indicate the temperature at which water and protein MSD diverge (250 K (A) and 220 K (B) for tau and MBP, respectively). MSDs > 260 K were omitted for the protein (tau and MBP) experiments for the sake of comparison with hydration-water MSDs (tau and MBP), which could be determined only up to 260 K (see Materials and Methods section).

MSDs than folded tRNA (49), in contrast to the opposite behavior of proteins. Even in the absence of hydration water, tau is characterized at room temperature by larger MSDs than are dry folded proteins (Fig. 3), in line with results obtained on dry powders of folded wild-type and partially unfolded mutant staphylococcal nuclease (47). Whether disordered (Fig. 1 A) or denatured, proteins thus display a much broader dynamical spectrum than do their folded counterparts (Fig. 2).

Tau adopts different partially folded conformations when it interacts with microtubules than when it interacts with biological membranes (50). The energy landscape of IDPs in general is described as being rather flat (51), which would rationalize the rapid structural adaptation to their targets or binding partners in a cellular context. The greater side-chain flexibility of tau, on the nano- to picosecond timescale, relative to the folded proteins MBP, Mb, and RNase, may reflect a rapid interconversion between the different conformational substates (structural rearrangements) that are required for tau to bind to microtubules.

Restricted hydration-water motions on the surface of IDPs

The MSDs of the hydration water of tau are smaller than those of MBP above 230 K (Fig. 1 B), indicating that the disordered nature of the tau protein surface hinders and confines water motions, in contrast to the behavior of folded

globular proteins. Most probably, the side chains of IDP interact predominantly with their surrounding aqueous environment, and not with each other. Consequently, the lower water mobility of tau can be explained by geometrical constraints imposed by side chains being involved in more interactions with hydration-water molecules in IDPs than in folded proteins. It is interesting to note, however, that crystalline ice formed at 200 K when tau powders were hydrated at levels above 0.5 g water/g tau, indicating that the first hydration layer does not seem to involve more water molecules than are found around MBP, even though the solvent-accessible surface of tau is three times larger than that of MBP.

A recent ^{17}O magnetic relaxation dispersion study of a small folded protein of 76 amino acids and its unfolded mutant in solution indicated that the rotational mobility of hydration water is greater in unfolded protein than in folded protein (52). In contrast, chemically denatured proteins have been shown to display reduced water mobility with respect to the folded state, and the hypothesis has been put forward that they are in a compact conformation that hinders water motion (53). Taken together (52,53), these results may indicate that the more compact the unfolded state of a protein is, the more its water dynamics will be perturbed. In analogy, the reduction in the hydration-water MSD of tau compared with MBP suggests that in the tau sample, water is confined, possibly by a rather compact conformation of the unfolded protein.

In agreement with the reduced MSD of tau hydration water found in this study, previous solid-state NMR relaxation experiments showed the activation energy of hydration water motions to be 50% larger for IDPs than for globular proteins (54). Intrinsic protein disorder thus shapes and modifies protein hydration, leading to hydration-water properties that differ among different classes of proteins. For example, in a study by Awile et al. (55), molecular-dynamics simulations of nudix hydrolase from *Deinococcus radiodurans* showed a lower hydration free energy for the disordered segments of the protein. Because the organism contains several IDPs that are thought to be involved in recovery after desiccation and are not present in nonextremophile homologs, the authors hypothesized that disordered regions may allow the protein to stay in intracellular patches of residual water, and suggested a new function for disordered regions, viz., to serve as hydrators (55).

Gradient of coupling with hydration-water dynamics across different protein classes

One can assess the coupling between dynamics of hydration water and proteins by comparing the temperature dependence of their respective MSDs (Fig. 4). With increasing temperature, they largely follow each other up to 250 K in the case of tau, but separate at 220 K in the case of MBP. The coupling with hydration-water dynamics is thus tighter for an IDP than for a folded, globular protein. In the case of membrane proteins, the onset of hydration-water translational motions at 200 K does not affect the nano- to picosecond dynamics of the underlying membrane, as evidenced by the temperature-dependent water and protein MSDs (24), and membrane-protein motions have been shown to be coupled to lipid rather than to water motions (56). Thus, there exists a gradient of coupling with hydration-water motions across different protein classes. The coupling decreases in strength from IDPs to globular-folded and finally membrane proteins. The slowing down of DNA dynamics compared with RNA dynamics has been suggested to be accompanied by a slowing down of water dynamics (57). A coherent picture thus emerges in which hydration water, rather than being a mere epiphenomenon, is an integral part of the biologically active protein. It is the delicately balanced give-and-take that occurs between a biological macromolecule's structural dynamics and those of its hydration water, rather than a master-slave relationship (5), that governs macromolecular function in a cellular context.

SUPPORTING MATERIAL

Experimental details on complementary experiments on the SPHERES spectrometer at FRMII, four figures and a reference are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(12\)00580-2](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(12)00580-2).

We thank Martin Field for help in the preparation of Fig. 4 A; Dan Tawfik, Israel Silman, and Colin Jackson for critical readings of the manuscript; Daphna Fenel for carrying out electron microscopy experiments; and Marc Jamin, Bruno D  m  , and Louiza Zerrad for assistance during the MALLS, D16, and ID14-3 experiments, respectively. We thank the ILL and ESRF for allocating beam time.

This work was supported by the Commissariat    l'  nergie Atomique et aux   nergies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, and Agence Nationale de la Recherche (project number ANR-11-BSV5-027 to M.W.). This work benefited from the activities of the DLAB consortium funded by the European Union under contracts HPRI-2001-50065 and RII3-CT-2003-505925, and from UK Engineering and Physical Sciences Research Council-funded activity within the ILL-EMBL Deuteration Laboratory under grants GR/R99393/01 and EP/C015452/1. The study was also supported by the European Commission under the 7th Framework Programme through the Research Infrastructures action of the Capacities Programme, contract CP-CSA_INFRA-2008-1.1.1 number 226507-NMI3. K.W. acknowledges funding from the Access to Major Research Facilities Program, supported by the Commonwealth of Australia under the International Science Linkages Program.

REFERENCES

1. Ball, P. 2008. Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108:74–108.
2. Grossman, M., B. Born, ..., M. Havenith. 2011. Correlated structural kinetics and retarded solvent dynamics at the metalloprotease active site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:1102–1108.
3. Ball, P. 2011. Biophysics: more than a bystander. *Nature.* 478:467–468.
4. Doster, W., and M. Settles. 2005. Protein-water displacement distributions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1749:173–186.
5. Fenimore, P. W., H. Frauenfelder, ..., R. D. Young. 2004. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to α - and β -fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:14408–14413.
6. Vitkup, D., D. Ringe, ..., M. Karplus. 2000. Solvent mobility and the protein 'glass' transition. *Nat. Struct. Biol.* 7:34–38.
7. Wood, K., A. Fr  lich, ..., M. Weik. 2008. Coincidence of dynamical transitions in a soluble protein and its hydration water: direct measurements by neutron scattering and MD simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 130:4586–4587.
8. Jansson, H., R. Bergman, and J. Swenson. 2011. Role of solvent for the dynamics and the glass transition of proteins. *J. Phys. Chem. B.* 115:4099–4109.
9. Dyson, H. J. 2011. Expanding the proteome: disordered and alternatively folded proteins. *Q. Rev. Biophys.* 44:467–518.
10. Chouard, T. 2011. Structural biology: breaking the protein rules. *Nature.* 471:151–153.
11. Fink, A. L. 2005. Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:35–41.
12. Dunker, A. K., I. Silman, V. N. Uversky, and J. L. Sussman. 2008. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:756–764.
13. Tompa, P. 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27:527–533.
14. Sugase, K., H. J. Dyson, and P. E. Wright. 2007. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature.* 447:1021–1025.
15. Mandelkow, E. M., and E. Mandelkow. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8:425–427.
16. Cheng, Y., T. LeGall, ..., A. K. Dunker. 2006. Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends Biotechnol.* 24:435–442.

17. Goedert, M., M. G. Spillantini, ..., R. A. Crowther. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3:519–526.
18. Mukrasch, M. D., J. Biernat, ..., M. Zweckstetter. 2005. Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions. *J. Biol. Chem.* 280:24978–24986.
19. Mukrasch, M. D., P. Markwick, ..., M. Blackledge. 2007. Highly populated turn conformations in natively unfolded tau protein identified from residual dipolar couplings and molecular simulation. *J. Am. Chem. Soc.* 129:5235–5243.
20. von Bergen, M., S. Barghorn, ..., E. Mandelkow. 2012. 2005. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to β -sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739:158–166.
21. Mao, A. H., S. L. Crick, A. Vitalis, C. L. Chicoine, and R. V. Pappu. 2010. Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:8183–8188.
22. Gabel, F., D. Bicout, ..., G. Zaccai. 2002. Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q. Rev. Biophys.* 35:327–367.
23. Zaccai, G. 2000. How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*. 288:1604–1607.
24. Wood, K., M. Plazenet, ..., M. Weik. 2007. Coupling of protein and hydration-water dynamics in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:18049–18054.
25. Doster, W., S. Busch, ..., H. Scheer. 2010. Dynamical transition of protein-hydration water. *Phys. Rev. Lett.* 104:098101.
26. Achterhold, K., A. Ostermann, ..., F. G. Parak. 2011. Dynamical properties of the hydration shell of fully deuterated myoglobin. *Phys. Rev. E.* 84:041930.
27. Badger, J., and D. L. Caspar. 1991. Water structure in cubic insulin crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:622–626.
28. Nucci, N. V., M. S. Pometun, and A. J. Wand. 2011. Site-resolved measurement of water-protein interactions by solution NMR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:245–249.
29. Zhang, L., L. Wang, ..., D. Zhong. 2007. Mapping hydration dynamics around a protein surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:18461–18466.
30. Rupley, J. A., and G. Careri. 1991. Protein hydration and function. *Adv. Protein Chem.* 41:37–172.
31. Lehnert, U., V. Réat, ..., C. Pfister. 1998. Thermal motions in bacteriorhodopsin at different hydration levels studied by neutron scattering: correlation with kinetics and light-induced conformational changes. *Biophys. J.* 75:1945–1952.
32. Clegg, J. S., and W. Drost-Hansen. 1991. On the biochemistry and cell physiology of water. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. P. Hochachka and T. P. Mommsen, editors. Elsevier, Amsterdam.
33. Mattea, C., J. Qvist, and B. Halle. 2008. Dynamics at the protein-water interface from ^{17}O spin relaxation in deeply supercooled solutions. *Biophys. J.* 95:2951–2963.
34. Artero, J. B., M. Hartlein, ..., P. Timmins. 2005. A comparison of refined X-ray structures of hydrogenated and perdeuterated rat γE -crystallin in H_2O and D_2O . *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61:1541–1549.
35. Konarev, P. V., V. V. Volkov, ..., D. I. Svergun. 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 36:1277–1282.
36. Dolman, M., P. J. Halling, ..., S. Waldron. 1997. How dry are anhydrous enzymes? Measurement of residual and buried O-18-labeled water molecules using mass spectrometry. *Biopolymers.* 41:313–321.
37. Frick, B., and M. Gonzalez. 2001. Five years operation of the second generation backscattering spectrometer IN16—a retrospective, recent developments and plans. *Physica B.* 301:8–19.
38. Wood, K., C. Caronna, ..., G. Zaccai. 2008. A benchmark for protein dynamics: ribonuclease A measured by neutron scattering in a large wavevector-energy transfer range. *Chem. Phys.* 345:305–314.
39. Gabel, F. 2005. Protein dynamics in solution and powder measured by incoherent elastic neutron scattering: the influence of Q-range and energy resolution. *Eur. Biophys. J.* 34:1–12.
40. Combet, J., B. Frick, ..., B. Guerdar. 2000. Simultaneous diffraction and inelastic scattering on the backscattering instrument IN16. *Physica B.* 283:380–385.
41. Mylonas, E., A. Hascher, ..., D. I. Svergun. 2008. Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry.* 47:10345–10353.
42. Bernado, P., M. Blackledge, and J. Sancho. 2006. Sequence-specific solvent accessibilities of protein residues in unfolded protein ensembles. *Biophys. J.* 91:4536–4543.
43. Bernado, P., L. Blanchard, ..., M. Blackledge. 2005. A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:17002–17007.
44. Wuttke, J., A. Budwig, ..., D. Richter. 2012. SPHERES, Jülich's high-flux neutron backscattering spectrometer at FRM II. *Rev. Sci. Instrum.* <http://arxiv.org/abs/1204.3415>.
45. Schiró, G., C. Caronna, ..., A. Cupane. 2010. Direct evidence of the amino acid side chain and backbone contributions to protein anharmonicity. *J. Am. Chem. Soc.* 132:1371–1376.
46. Gaspar, A. M., M. S. Appavou, S. Busch, T. Unruh, and W. Doster. 2008. Dynamics of well-folded and natively disordered proteins in solution: a time-of-flight neutron scattering study. *Eur. Biophys. J.* 37:573–582.
47. Nakagawa, H., H. Kamikubo, and M. Kataoka. 2010. Effect of conformational states on protein dynamical transition. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804:27–33.
48. Mamontov, E., H. O'Neill, and Q. Zhang. 2010. Mean-squared atomic displacements in hydrated lysozyme, native and denatured. *J. Biol. Phys.* 36:291–297.
49. Roh, J. H., M. Tyagi, ..., A. P. Sokolov. 2011. The dynamics of unfolded versus folded tRNA: the role of electrostatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 133:16406–16409.
50. Barre, P., and D. Eliezer. 2006. Folding of the repeat domain of tau upon binding to lipid surfaces. *J. Mol. Biol.* 362:312–326.
51. Choi, U. B., J. J. McCann, ..., M. E. Bowen. 2011. Beyond the random coil: stochastic conformational switching in intrinsically disordered proteins. *Structure.* 19:566–576.
52. Qvist, J., G. Ortega, ..., B. Halle. 2012. Hydration dynamics of a halophilic protein in folded and unfolded states. *J. Phys. Chem. B.* 116:3436–3444.
53. Modig, K., E. Kurian, ..., B. Halle. 2003. Water and urea interactions with the native and unfolded forms of a β -barrel protein. *Protein Sci.* 12:2768–2781.
54. Bokor, M., V. Csizmók, ..., K. Tompa. 2005. NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins. *Biophys. J.* 88:2030–2037.
55. Awile, O., A. Krisko, ..., B. Zagrovic. 2010. Intrinsically disordered regions may lower the hydration free energy in proteins: a case study of nudix hydrolase in the bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLOS Comput. Biol.* 6:e1000854.
56. Frolich, A., F. Gabel, ..., G. Zaccai. 2009. From shell to cell: neutron scattering studies of biological water dynamics and coupling to activity. *Faraday Discuss.* 141:117–130, discussion 175–207.
57. Khodadadi, S., J. H. Roh, ..., A. P. Sokolov. 2010. Dynamics of biological macromolecules: not a simple slaving by hydration water. *Biophys. J.* 98:1321–1326.
58. Jha, A. K., A. Colubri, ..., T. R. Sosnick. 2005. Statistical coil model of the unfolded state: resolving the reconciliation problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:13099–13104.

3.1 Dynamique des IDP et de leur eaux d'hydratation

3.1.1 Problématiques et motivations

On estime que les IDPs représentent à peu près 30% d'un génome eucaryote et sont d'une grande importance dans de nombreux processus, en particulier dans la transmission de signaux intracellulaires (60). Ces protéines sont de plus capables de se lier à un grand nombre de partenaires. Pour la protéine dépliée Tau, décrite dans le paragraphe 3.1.2, on compte plus de 25 partenaires possibles. Cette grande diversité d'interactions doit se refléter dans une adaptabilité de la protéine désordonnée, et par la même occasion dans sa dynamique. De plus, une protéine désordonnée diffère sensiblement de protéines globulaires, en particulier par sa composition. Une propension à avoir des acides aminés simples et polaires est observée, modifiant de manière significative la nature de la surface accessible au solvant, faisant écho à la problématique de la relation entre la protéine et son eau d'hydratation.

3.1.2 Systèmes biologiques : les protéines Tau et MBP

Afin d'esquisser une ébauche de réponse, il a été utilisé comme système intrinsèquement désordonné une protéine maintenant bien connue du monde médicale, la protéine Tau. Le point de comparaison de cette étude s'est fait dans la mesure du possible avec une protéine globulaire de poids moléculaire similaire, la *maltose binding protein* (MBP), dont la dynamique par diffusion de neutrons a été largement étudiée (26).

La protéine Tau La protéine Tau est une protéine impliquée dans la stabilisation des microtubules des neurones (81). Elle fait partie à ce titre de la famille des MAPs (microtubule associated proteins). Quasi absente des dendrites, elle se retrouve en grande majorité dans la partie distale des axones. La plus grande isoforme¹, httau40, possède 441 acides aminés (45 849 Da) et se divise en deux grandes régions : le domaine de projection (acides aminés 1 à 244), impliqué dans l'architecture du réseau de microtubules et le domaine C-terminal (acides aminés 245 à 441), qui comprend les domaines de répétition R1 à R4 impliqués dans la liaison aux microtubules. A l'intérieur des domaines de répétition R2 et R3 se trouvent deux hexapeptides, ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, qui se sont avérés être les promoteurs minimaux de l'agrégation sous formes de fibres amyloïdes (82). On recense par RMN deux hélices α et six structures β longues d'une dizaine d'acide aminés chacune, avec des taux d'occupation de ces structures de l'ordre de 20%² (83).

1. Tau possède 6 isoformes, allant de 352 à 441 acides aminés. Chacun de ces isoformes se différencie par la présence d'un ou plusieurs de ces domaines. Ils sont produits par épissage alternatif et l'expression plus forte d'un isoforme particulier est directement relié au développement neuronal

2. 18% de la protéine semble donc être structuré avec 20% de taux d'occupation pour chaque structure.

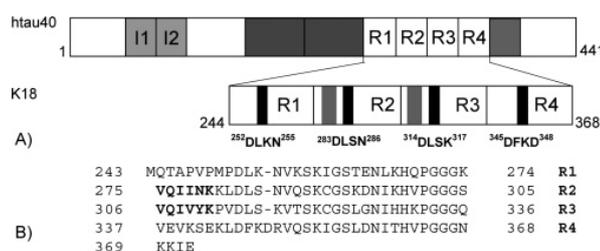


FIGURE 3.1 – A) La protéine Tau (isoforme httau40) et ses sous-domaines. I1 et I2 : domaines intermédiaires 1 et 2. Bandes grises foncées : domaines riches en prolines. R1 à R4 : domaines de répétition. A l'intérieur des domaines de répétition : bandes grises claires : hexapeptides minimaux générant des fibres amyloïdes. Bandes noires : structures " β -turn". B) Séquence des domaines de répétition (texte gras : séquences des hexapeptides). Extrait de (84)

La protéine Tau se démarque par rapport aux autres MAPs par son influence sur les microtubules. Contrairement aux protéines STOP, qui bloquent les microtubules dans une conformation stable au niveau de la partie proximale de l'axone, et des MAP, qui agissent de manière équivalente dans les dendrites, la protéine Tau permet une dynamique plus fine des microtubules. En effet, Tau est capable, en se faisant phosphoryler par de nombreuses kinases de moduler indirectement la taille des microtubules. La forme phosphorylée de Tau aura tendance à se détacher des microtubules, et inversement³. La cellule peut alors influencer l'état de phosphorylation de Tau pour jouer avec la dynamique neuronale. On distingue 80 sites potentiels de phosphorylation (45 sérines et 35 thréonines), qui sont les cibles de 24 kinases. Plus de 20% de la protéine peut être phosphorylé⁴. On peut citer par exemple GSK-3 β (glycogen synthase kinase) et CDK5 (cyclin-dependent-kinase 5), PKA (AMPc-dependent protein kinase), PKC (Ca-dependent protein kinase), ou encore CaMKII (Ca/Calmodulin-dependent protein kinase) comme kinases de Tau.

Hyperphosphorylation Dans des conditions pathologiques, il arrive que la protéine Tau se retrouve dans un état *hyperphosphorylé*. Cette hyperphosphorylation peut avoir deux conséquences :

- o Un détachement trop important au niveau des microtubules, qui amène à une déstabilisation complète du réseau de tubuline, et qui peut à terme mener à la mort neuronale.
- o Cette hyperphosphorylation peut aussi mener à l'agrégation de Tau. Il a en effet été observé chez les patients décédés de la maladie d'Alzheimer une accumulation de plaques dans les neurones, qui se sont avérées être des agrégats de protéines Tau (85). On parle alors de *PHFs* (Pair Helical Filaments), qui représentent la forme fibrillaire de Tau.

La protéine Tau est donc d'une importance primordiale, à la fois dans sa forme physiologique, en tant que régulateur de la plasticité neuronale, mais aussi sous forme pathologique.

La Maltose Binding Protein (MBP) Cette protéine périplasmique (40 707 Da), capable de lier le maltose, s'intègre dans la chaîne de transport des maltodextrines dans les cellules. Le maltose diffuse de manière passive à travers la membrane externe, à l'aide de la maltoporine LamB. Une fois dans le périplasma, et pour éviter toute rediffusion hors de la cellule, la MBP (aussi appelée MalE) lie le maltose, avec une affinité faible (avec un K_D de l'ordre du mM). Le complexe maltose-MBP est ensuite pris en charge par le complexe MalFGK₂, un transporteur *ATP Binding-Cassette* (transporteur ABC). Ce complexe membranaire permet le transport du maltose à travers la membrane

3. Les microtubules sont hautement chargés négativement, alors que Tau est globalement chargé positivement.

4. On parlera de *phosphoprotéine*.

interne. Le maltose est ensuite hydrolysé en deux unités de glucose, qui s'insère après glycolyse dans le cycle de Krebs.

Cette protéine est aussi d'un grand intérêt en biochimie. Fréquemment utilisée en fusion avec une protéine à faible solubilité, la MBP permet d'augmenter considérablement la solubilité du complexe (86). On parlera alors de *transporteur solubilisant* (solubilizing carrier). Une fois la purification terminée, la MBP peut être séparée par coupure protéolytique de la jonction MBP-protéine d'intérêt. Cette même construction peut être utilisée pour la purification. En effet, la MBP est capable de lier l'amylose. Des colonnes à amylose peuvent donc être utilisées, le complexe étant ensuite élué avec du maltose, qui lie la MBP avec plus d'affinité que l'amylose. La MBP est ensuite retirée de la construction comme précédemment.

Echantillons préparés pour la diffusion de neutrons : Afin d'étudier la dynamique des protéines désordonnées, en particulier celle de Tau, deux échantillons ont été produits, un deutéré (désigné par **DTau**), l'autre hydrogéné (**HTau**), et respectivement réhydratés en H₂O et D₂O. La comparaison s'est faite avec deux échantillons de MBP, deutéré (nommé par la suite **DMBP**) et hydrogéné (raccourci en **HMBP**). Dans le cas de comparaisons avec des échantillons secs (sans couche d'hydratation), le taux d'hydratation sera précisé et on notera les échantillons **DMBP**_{0.4}, **HMBP**_{0.4}, **DTau**_{0.4} et **HTau**_{0.4}. Les échantillons HMBP et DMBP ont été préparés et utilisés en particulier dans l'étude du couplage protéine globulaire-eau d'hydratation (26). Dans certains cas, un échantillon de RNase (**HRNase** ou **HRNase**_{0.4}) a été utilisé comme point de comparaison à la place de la MBP. Cet échantillon a été préparé pour l'étude (27).

Les échantillons HTau et DTau ont été produits par **Francois-Xavier Gallat** et **Martine Moulin** au laboratoire de deutération de l'ILL, le DLAB. Le clone, ainsi que les protocoles de purification (section 3.1.3) de la protéine ont été aimablement fournis par **Art Laganowsky**, **Jacques-Philippe Colletier** et **David Eisenberg**, de l'*université californienne de Los Angeles* (UCLA). Les échantillons HMBP et DMBP ont été produits par **Martine Moulin** au DLAB. L'échantillon de RNase a été préparé par **Katy Wood**, de l'*Australian Nuclear Science and Technology Organisation* (ANSTO), à partir de poudre commerciale.

3.1.3 Biochimie de la protéine Tau et culture de bactéries par fermentation

Cette section présente la purification de la protéine Tau et la fermentation des bactéries.

Biologie moléculaire Le gène utilisé pour la production de la protéine Tau (gène *MAPT*) est celui codant pour l'isoforme httau40, longue de 441 acides aminés. Le gène a été cloné dans un vecteur pET-28a avec une queue poly-histidine au niveau du domaine N-terminal de la protéine et une résistance kanamycine. Une souche de bactérie BL21(DE3) sous le contrôle du promoteur T7 a ensuite été transformée pour l'expression de Tau.

Milieu minimum et adaptation des bactéries Afin de réaliser la croissance des bactéries nécessaires à l'expression des protéines, sous les formes hydrogénée et deutérée, le milieu minimum Enfors a été utilisé, avec la composition suivante (tableaux 3.1 et 3.2).

	Quantité (pour 1 litre)
Milieu Enfors	
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.86 g
KH ₂ SO ₄	1.56 g
Na ₂ HPO ₄ anhydre	6.48 g
(NH ₄) ₂ -H-Citrate	0.49 g
MgSO ₄ 1M (H ₂ O/D ₂ O)	1 ml
solution minérale 1000X (H ₂ O/D ₂ O)	1 ml
Glycérol 100%	5 g
Kanamycine 10 mg/ml (H ₂ O/D ₂ O)	3 ml
H ₂ O/D ₂ O	qsp 1 litre

TABLE 3.1 – Composition du milieu minimum Enfors pour la croissance des bactéries. Le glycérol fait office de source unique de carbone. L'utilisation conjointe de D₂O et de glycérol deutérée permet d'avoir un taux de deutération proche de 100%. qsp : quantité suffisante pour.

	Concentration (g/litre)
Solution minérale	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5
FeCl ₃ .6H ₂ O	16.7
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.18
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.16
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.15
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.18
EDTA.Na ₂	20.1

TABLE 3.2 – Composition de la solution minérale 1000X. La préparation de la solution sous sa forme deutérée sera précédée d'un échange de tous les hydrogènes labiles contenus dans les poudres commerciales.

Croissance de bactéries en milieu minimum Afin d'optimiser la croissance en milieu minimum, les étapes suivantes ont été mises en pratique :

1. Croissance de bactéries sur une boîte LB-agar.
2. Inoculation d'une colonie dans un faible volume de milieu Enfors.
3. Inoculation au 1/10 de 10 ml de milieu Enfors de la culture précédente. Cette étape est réalisée deux à trois fois, voire 4 fois pour obtenir une croissance optimale en milieu minimum.
4. Inoculation au 1/10 de 150 ml de milieu Enfors de la culture précédente. Cette dernière étape permet d'obtenir la préculture nécessaire pour inoculer le fermenteur, appareil qui servira à la croissance des bactéries et à l'expression de la protéine.

Si le milieu d'expression doit être perdeutééré (milieu 100% deutéré), les passages sont effectués en premier lieu en milieu minimum hydrogénés, pour ensuite être faits en milieu deutéré.

Test d'expression Une fois l'adaptation au milieu minimum effectuée, les conditions optimales pour la production de la protéine sont explorées, en particulier temps et température d'induction. Ces conditions, déterminées à petite échelle, seront ensuite reprises pour la production à plus grande échelle.

Culture des bactéries par fermentation Arrêtons nous sur la pertinence de l'utilisation de la fermentation⁵ de bactéries pour la production de la protéine Tau. Il aurait été possible de produire les bactéries et la protéine sous leur forme deutérée en flasques de 2 litres. La mise en place d'une telle procédure aurait cependant nécessité l'utilisation d'au moins 70 litres de D₂O et de 350 g de glycérol deutéré. A raison de 300 € par litre de D₂O et 2 000 € les 50 g de glycérol deutéré, la production de la protéine deutérée avoisinerait les 30 000 €. L'utilisation de la fermentation permet de réduire drastiquement le volume de D₂O utilisé, et par la même occasion le prix de la culture (qui passe à 9 500 € pour 150 mg de protéine Tau deutérée)

La culture s'est donc faite en biofermenteur LabforsII (Infors) de 2.5 litres, inoculé par une pré-culture au 1/10. Durant toute la fermentation, le pD, stabilisé à 6.9, la pO₂ du milieu (oxygène dissous dans le milieu), avec pour valeur de consigne 30%, et la température (30 °C) sont contrôlés et régulés. La fermentation proprement dite se déroule en trois phases (figure 3.4) :

- La première est qualifiée de **Batch** : Le but de cette première phase est d'initier la croissance des bactéries. La source carbonée est le glycérol présent dans le milieu de culture.
- Une fois tout le glycérol consommé, on assiste à une acidification progressive du milieu et une augmentation brutale de la pO₂. Cette augmentation indique l'arrêt du métabolisme principale de la bactérie, faute de source de carbone majoritaire. Il devient alors nécessaire de supplémenter à intervalles réguliers le milieu en glycérol tout au long de la deuxième phase, dite de **Fed-Batch**. Cette seconde phase consiste à soutenir la croissance des bactéries et à augmenter progressivement la biomasse. La supplémentation du milieu en source de carbone se fait avec une solution Enfors avec 12% w/v de glycérol, appelée *solution de feeding*. L'intervalle entre chaque ajout de milieu et la quantité délivrée doivent être définis de manière à ne pas restreindre trop fortement la croissance bactérienne. Inversement, une quantité trop importante de nourriture ne permettra pas une production efficace de la protéine (réalisée dans la dernière phase). En parallèle de l'ajout de glycérol, il est nécessaire de faire de même avec de la soude (deutérée ou hydrogénée) pour garder le pD proche de 6.9. Le pD commence à varier sensiblement dès le début de la phase de Fed-batch (apparition des sous-produits toxiques acides) et doit donc être régulé.
- La phase d'**Induction** : une fois la densité optique (DO) ayant atteint 12-14, une induction à 0.5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) est effectuée. La fermentation se poursuit pendant un temps défini grâce aux tests d'expression. Les bactéries sont récoltées (vers des densités optiques proches de 20). On récolte en moyenne 50-70 g de pâte bactérienne pour deux litres de milieu dans le fermenteur. Par comparaison, un litre de milieu LB (Luria-Bertani) à 37 °C donne 3-4 g de pâte bactérienne. Le gel suivant montre l'expression en milieu deutéré de la protéine Tau.

5. Le terme de fermentation ici ne fait pas référence au processus classique de fermentation, qui impose des conditions anaérobies et la conversion d'une source de carbone carbonée en une source d'énergie directement utilisable par la cellule. La fermentation présentée ici reproduit ces voies métaboliques en présence d'oxygène, avec des systèmes de culture similaires.

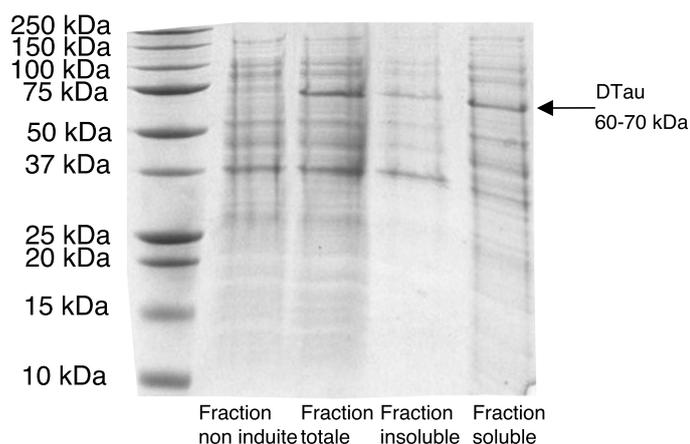


FIGURE 3.2 – Gel SDS PAGE Tris-Tricine 12% d’expression et de solubilité de la forme deutérée de Tau, produite en milieu Enfors deutéré, avec une induction des bactéries à 30 °C pendant 24 h. La pâte bactérienne est reprise dans le tampon de lyse (fraction totale). Une sonication est réalisée pour casser les bactéries. Une centrifugation est effectuée pour séparer les phases solubles (fraction soluble) et insolubles (fraction insoluble) dans le tampon choisi (ici 20 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycérol, 5 mM β -SH). Mise en évidence d’une faible fraction insoluble due à la deutération. A noter de plus une migration de la protéine vers 70 kDa (45 kDa attendus). Cet effet est relié à la charge intrinsèque plus importante d’une protéine désordonnée, qui perturbe l’interaction du SDS avec la protéine et par la même la migration.

Purification de la protéine Tau La protéine Tau a été purifiée en deux étapes selon le protocole et les tampons suivants (tableau 3.3), différents selon le caractère hydrogéné ou deutéré de la protéine :

Les cellules après culture ont été récoltées par centrifugation et reprises dans 10 ml de tampon de lyse par litre de culture. Des inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free) ont été ajoutés et incubés 30 min à 4 °C. La lyse complète des membranes a ensuite été réalisée par sonication sur glace. Une étape de centrifugation à $50\,000 \times g$ pendant 30 min permet de séparer les débris membranaires de la fraction soluble. Cette dernière a été ensuite incubée avec une résine d’affinité au nickel Ni-NTA. Trois étapes de lavage ont été réalisées avec des concentrations de NaCl de 1.5 M, 600 mM, 300 mM pour HTau et 1.5 M, 1 M, 500 mM pour DTau. L’étape d’élution s’est faite avec 250 mM d’imidazole (700 mM pour DTau). Les fractions contenant la protéine ont été mises en évidence sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine 12% et rassemblées. Les fractions directement issues de la colonne d’affinité ont été ensuite chargées sur une colonne de chromatographie d’exclusion de taille Hiloal 16/60 Superdex S200 préalablement équilibrée dans le tampon de lyophilisation. La lyophilisation consiste à congeler la solution dans l’azote liquide et sublimer la glace sous basse pressions. L’utilisation d’acétate d’ammonium permet de ne pas avoir de sels à la fin de la lyophilisation, ce dernier se transformant pendant la sublimation en ammoniac et en CO_2 .

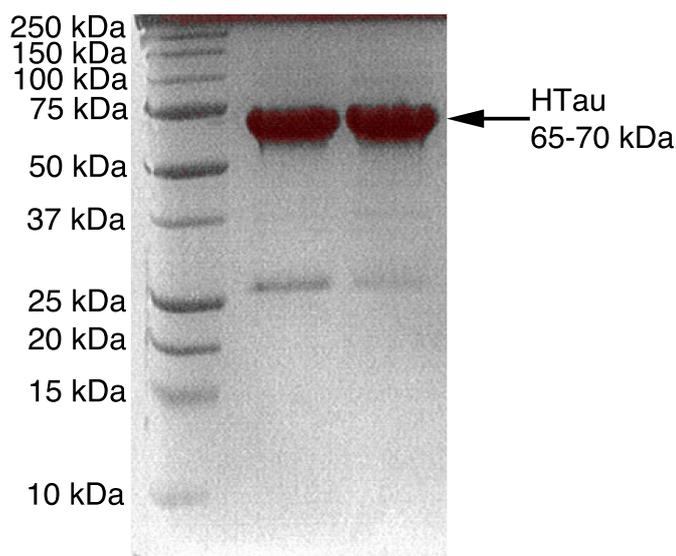


FIGURE 3.3 – Gel SDS PAGE Tris-Tricine 12% de pureté finale de la forme hydrogénée de Tau. Mise en évidence d'une migration anormale (45 kDa attendus), dûe au caractère désordonné de Tau.

		Hydrogéné	Deuté
Tampons	Lyse	500 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -Mercaptoethanol (β -SH) 5% glycérol 5 mM imidazole	500 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -SH 5% glycérol 5 mM imidazole
	Lavage(s)	1 M-600 mM-300 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -SH 5% glycérol 10 mM imidazole	1.5 M-1 M-500 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -SH 5% glycérol 10 mM imidazole
	Elution	300 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -SH 5% glycérol 250 mM imidazole	500 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 5 mM β -SH 5% glycérol 700 mM imidazole
	Exclusion de taille	0.5 M $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$	0.5 M $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$
	Lyophilisation	0.5 M $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$	0.5 M $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$

TABLE 3.3 – Composition des tampons pour la purification de htau40 en conditions deutérées et hydrogénées. les tampons sont réalisés avec de l' H_2O .

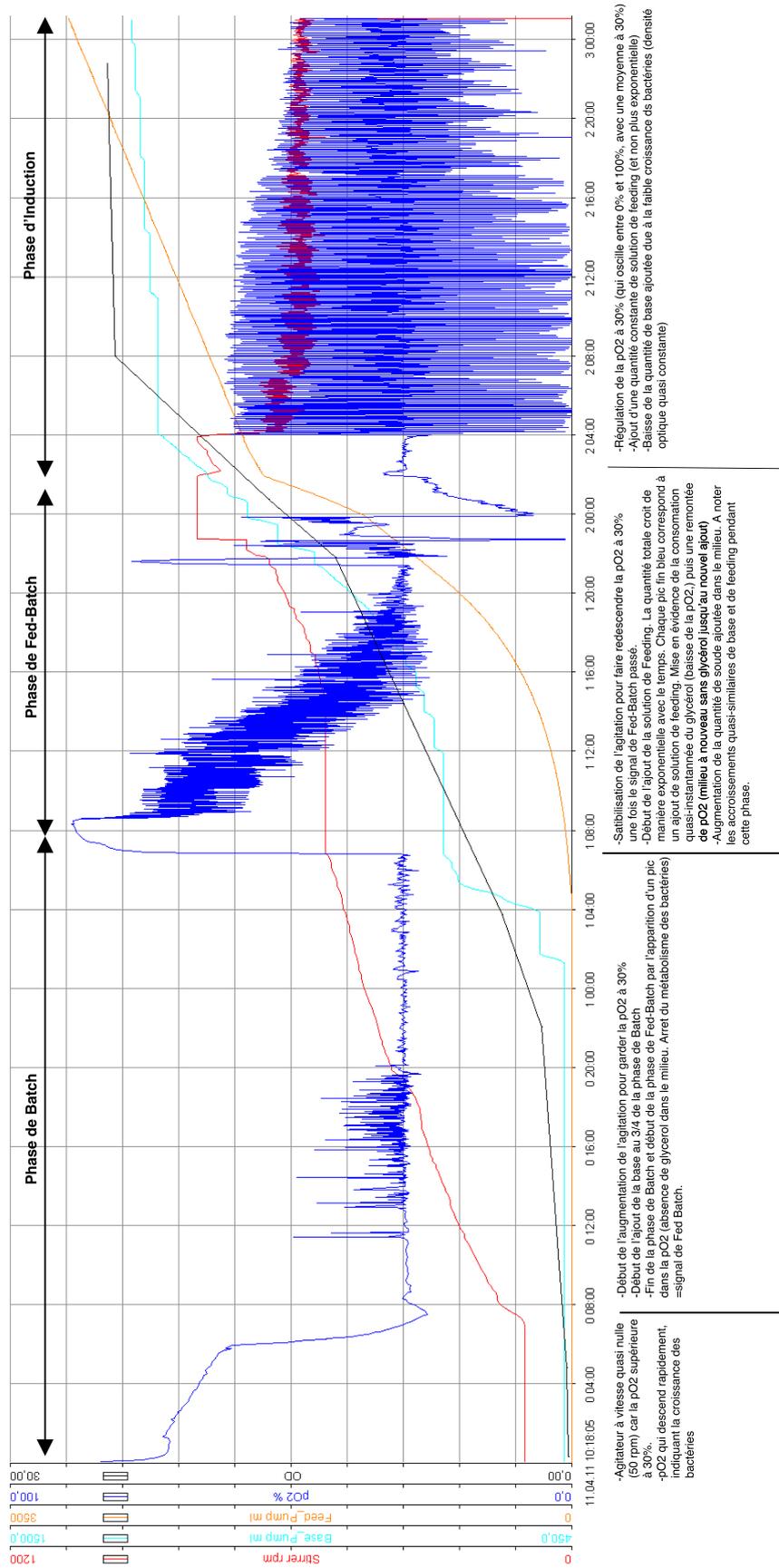


FIGURE 3.4 – Profil de fermentation typique. Mise en évidence des 3 phases de fermentations (Batch, Fed-batch et Induction) définies dans la section 3.1.3. Courbe bleu foncé : % d'oxygène dissous dans le milieu. Courbe rouge : vitesse d'agitation du milieu. Courbe bleu clair : quantité de soude ajoutée. Courbe orange : quantité de solution de feeding ajoutée. Courbe noire : densité optique mesurée.

Diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine Tau Des mesures de diffusion aux petits angles de rayons X (SAXS) sur les protéines Tau et MBP ont été effectuées à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble), sur la ligne de lumière BioSAXS ID14-3. Le tampon utilisé est le suivant : 20 mM Tris pH 8,0, NaCl 150 mM avec des concentration de protéine de 4.7 mg/ml pour Tau et 1.9 mg/ml pour la MBP. L'absence de dégâts d'irradiation a été vérifiée par 10 expositions successives de 10 s chacune. Le temps d'exposition finale était de 100 s pour tous les échantillons/tamppons. Les figures de diffraction 2D ont été normalisées avec les mesures d'une solution de BSA (bovine serum albumine) à 5 mg/ml et intégrées radialement afin d'obtenir les profils d'intensité $I(Q)$. La contribution du solvant a été de plus soustraite. Le rayon de giration a été extrait du logarithme des intensités corrigées.

Les mesures SAXS font apparaitre des rayons de giration de l'ordre de 62 Å et 24 Å pour la protéine Tau et MBP respectivement, en accord avec des mesures précédentes pour la protéine Tau (87, 88) et pour la MBP (89). La valeur du rayon de giration bien supérieure pour la protéine Tau comparée à celle obtenue pour la MBP confirme le caractère désordonné de Tau.

3.1.4 Préparation et caractérisation des échantillons pour la diffusion de neutrons

Hydratation des échantillons Dans la situation d'un échantillon de protéine deutérée, adapté à la mesure de la dynamique de la couche d'hydratation, la quantité d'eau nécessaire et suffisante à ajouter pour que le système soit biologiquement actif (situation d'*hydratation totale*) est importante. La question de la différence de structure entre les différents macromolécules biologiques est de plus intimement liée à celle de l'hydratation, les protéines membranaires ayant des surfaces accessibles au solvant plus faibles que les protéines globulaires. A contrario, une protéine désordonnée doit en théorie lier plus d'eau.

Le concept d'hydratation totale dépend cependant grandement de la technique mise en oeuvre pour mesurer, chacune d'entre elle étant sensible à une classe d'eau particulière. Suivant la définition extraite de (9), on considérera l'hydratation comme totale lorsque l'ajout supplémentaire de molécules d'eau ne fait que diluer le système. Une mesure de chaleur spécifique à 25 °C sur un système lysozyme-eau (90) montre un comportement de mélange idéal (chaleur spécifique partielle constante) lorsque l'hydratation est totale, vers un taux de l'ordre 0.38 gramme d'eau par gramme de protéine hydrogénée (0.38 g H₂O/g H-Protéine).

Il est courant en diffusion de neutrons de prendre comme définition de l'hydratation totale la quantité d'eau nécessaire et minimale à ajouter à une poudre biologique considérée comme totalement sèche⁶, avec comme critère d'hydratation totale l'absence de pics de Bragg observés par diffraction. Ces pics sont dûs à la présence de glace cristalline indicatrice de la présence d'eau non liée. Le taux d'hydratation sera définie en pratique par le rapport entre la quantité d'eau H₂O et la quantité de protéine hydrogénée. Dans le cas des protéines globulaires, un taux de 0.4 g H₂O/g H-Protéine est considéré comme nécessaire et suffisant pour former une monocouche d'eau et rendre le système biologiquement actif. En connaissant les masses moléculaires, il est possible d'en déduire un nombre de molécules d'eau par molécule de protéine. Sachant que la plupart des systèmes mesurés par diffusion de neutrons font appel au contraste hydrogène/deutérium, qui diffèrent par leur masse, une hydratation à 0.4 g D₂O/g H-Protéine donnera légèrement moins qu'une monocouche (effet

6. Une procédure utilisée pour sécher une poudre de protéine est de la sécher avec un puissant dessiccant, de type P₂O₅ pendant 3-4 jours. Des mesures réalisées par RMN (91) ont montré que quatre molécules d'eau internes restaient présentes autour d'une molécule de lysozyme, après séchage sur P₂O₅.

de masse du deutérium). Pour obtenir un taux d'hydratation de 0.4g H₂O/g H-Protéine avec un système H₂O/ D-Protéine ou D₂O/ H-Protéine, il suffit de calculer le nombre de molécules d'eau par molécule de protéine et d'adapter la masse de D₂O ou H₂O à ajouter en conséquence pour avoir le même nombre de molécules de solvant.

Caractérisation de l'hydratation des échantillons sur IN16 Pour une protéine globulaire, 0.4 g H₂O/g H-Protéine suffisent. Dans le cas des protéines désordonnées, il a été montré que la surface accessible au solvant était augmentée d'un facteur trois pour la protéine désordonnée de poids moléculaire semblable (Kathleen Wood, communication personnelle). Cela correspondrait à 1.2 g H₂O/g H-Protéine, très près de l'hydratation d'une protéine globulaire en solution (1.3 g H₂O/g H-Protéine).

Une étude sur le spectromètre IN16, équipé de détecteurs de diffraction a été réalisée pour déterminer le taux d'hydratation qui correspondrait à une unique couche d'eau autour de Tau. Un échantillon de poudre de Tau hydrogéné, réhydraté en H₂O à des taux allant de 0.8 à 0.4 g H₂O/g H-Protéine a été mesuré à 200 K sur IN16, afin de mettre en évidence un possible pic de diffraction dû à de la glace hexagonale (Ih), en particulier les réflexions (100) et (002). Le tableau 3.4 récapitule les pics de Bragg attendus en présence de glace hexagonale. Dans la gamme allant de 0.8 g H₂O/g H-Protéine à 0.6 g H₂O/g H-Protéine, les clichés de diffraction obtenus (figure 3.5) ont montré la présence du pic de diffraction (100), indiquant la présence d'eau non liée. Seuls les taux 0.4 et 0.5 g H₂O/g H-Protéine n'ont pas présenté ces pics de diffractions. Pour des raisons de comparaison avec la MBP, le taux de 0.4 g H₂O/g H-Protéine a été finalement retenu. Des mesures ultérieures à 0.5 g H₂O/g H-Protéine de déplacements carrés moyens n'ont pas montré de différences entre 0.4 g H₂O/g H-Protéine et 0.5 g H₂O/g H-Protéine. Cette observation a montré qu'une poudre, en particulier de protéines désordonnées, diffèrait sensiblement d'une solution.

	(100)	(002)	(101)
Glacé Ih			
Transfert de moment Q	1.61 Å ⁻¹	1.72 Å ⁻¹	1.82 Å ⁻¹
Angle	106.89°	118.27°	130.48°

TABLE 3.4 – Valeurs de quantité de mouvement attendues pour les pics de Bragg de la glace hexagonale et les angles associés, pour une longueur d'onde de 6.27 Å.

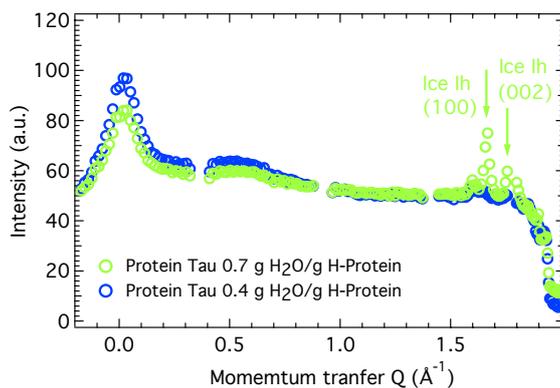


FIGURE 3.5 – Cliché de diffraction obtenus sur l'échantillon HTau à différents taux d'hydratation, 0.4 g H₂O/g H-Protéine (bleu) et 0.7 g H₂O/g H-Protéine (vert). Mise en évidence à 0.7 g H₂O/g H-Protéine de pics de Bragg (100) et (002), aux angles 106° et 118° respectivement ($\lambda=6.27$ Å), générés par de la glace Ih. IN16, ILL

Hydratation des échantillons HTau et DTau Les poudres de protéines lyophilisées ont été séchées sur P₂O₅ durant 5 et 28 jours pour HTau et DTau respectivement, sur un porte-échantillon plat en aluminium de surface 4 x 3 cm². Le niveau d'hydratation résultant a été défini comme correspondant à 0 g H₂O / g H-Protéine. Les poudres sèches de HTau (149 mg) et de DTau (204 mg) ont été ensuite réhydratées par de la vapeur de D₂O et H₂O respectivement, jusqu'à un niveau d'hydratation de 0.44 g D₂O / g HTau et 0.38 g H₂O / g DTau (correspondant à 0.4 g H₂O / g HTau ou 1040 molécules d'eau par molécule de Tau). La quantité d'eau ajoutée a été vérifiée par pesage tout au long de la procédure. Les échantillons ont ensuite été fermés par un couvercle en aluminium (0.3 mm d'épaisseur de parcours des neutrons) et un joint d'indium de 1 mm de diamètre.

Si l'on suppose que tous les hydrogènes échangeables chez HTau et tous les deutérons échangeables chez DTau ont été échangés, soit 24% des atomes ¹H ou ²H, les contributions calculées à la section efficace de diffusion incohérente des deux échantillons sont les suivantes :

- Pour l'échantillon DTau/H₂O : 29% de la protéine⁷ (69 032 barns) et 71% de l'eau d'hydratation (164 303 barns).
- Pour l'échantillon HTau/D₂O : 97% de la protéine⁸ (193 546 barns) et 3% de l'eau d'hydratation (4 194 barns).

Caractérisation de l'hydratation des échantillons sur D16 En parallèle des mesures de diffraction sur IN16, des mesures sur le diffractomètre D16 ont été réalisées, à la fois pour confirmer l'absence de glace dans des échantillons hydratés à 0.4 g H₂O/g H-Protéine, mais aussi pour vérifier l'absence de fibres de Tau (PHF) après la purification. La configuration de l'instrument est la suivante :

7. 29 % qui se répartissent en 8% venant de la protéine deutérée et 92% des deutérons échangés contre des hydrogènes.

8. 97 % qui se répartissent en 99% venant de la protéine hydrogénée, 1% des atomes d'hydrogène échangés contre des deutérons.

		D16
Paramètres		
	Longueur d'onde	4.752 Å
	Angle détecteur-échantillon	-5°/+130°
	$Q_{min}-Q_{max}$	0.01-2.5 Å ⁻¹
	Distance détecteur-échantillon	90 cm

TABLE 3.5 – Configuration utilisée pour les mesures de diffraction sur D16.

Conditions expérimentales Les mesures ont été faites dans les conditions suivantes :

- Les mesures effectuées à 300 K, sur DTau ont été réalisées afin de mettre en évidence l'absence de PHFs dans l'échantillon DTau. L'utilisation de l'échantillon deutéré DTau permet de favoriser la diffusion cohérente, et donc de mettre en évidence de possibles PHFs.
- Les mesures à 200 K sur les échantillons HTau et HMBP ont été réalisées pour mettre en évidence l'absence de glace. Une fois de plus, une possible glace de D₂O sera plus visible qu'une glace d'H₂O, d'où l'utilisation d'échantillons hydrogénés hydratés en D₂O.

Les différentes réflexions attendues soit de la glace hexagonale, soit des PHFs sont résumées dans le table 3.6

		Réflexions			Feuillets β	Steric Zipper
		(100)	(002)	(101)		
Systèmes						
Glace Ih	Q (Å ⁻¹)	1.61	1.72	1.82
	Angle (°)	75.01	81.15	86.98
PHFs	Q (Å ⁻¹)	1.31-1.33	0.48-0.57
	Angle (°)	59.39-60.39	20.92-24.90

TABLE 3.6 – Valeurs de quantité de mouvement attendus pour les pics de Bragg de la glace hexagonale, les fibres amyloïdes (92) et les angles de diffusion associés, pour une longueur d'onde de 4.752 Å.

Paramètres expérimentaux Afin de mettre en évidence ou non les réflexions du tableau 3.6, les paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures sont les suivants :

	HTau	DTau	HMBP
Paramètres			
Gamme en angle balayée	22-98°	15-65°	22-98°
Gamme de Q associée	0.50-2.00 Å ⁻¹	0.35-1.42 Å ⁻¹	0.50-2.00 Å ⁻¹
Température	200 K	300 K	200 K

TABLE 3.7 – Paramètres expérimentaux, en particulier les gammes en angles de diffusion balayées, utilisés lors des mesures de diffraction neutronique sur D16.

Résultat Les clichés de diffraction obtenus pour les échantillons HTau et DTau ne font apparaître aucune réflexion caractéristique, soit des PHFs soit de la glace hexagonale.

3.1.5 Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de Tau

Des mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à 0.9 μeV de résolution permettent de mettre en évidence des dynamiques moyennes sur l'échelle de 0.1-1 ns, à savoir des mouvements de relaxation, de diffusion des chaînes latérales ou de diffusion de l'eau autour de la protéine. Les échantillons DTau et HTau (dynamique de la couche d'hydratation et de la protéine respectivement) ont été mesurés afin d'étudier la dynamique du couple IDP/eau d'hydratation. Les échantillons DMBP et HMBP ont été mesurés et les données analysées par Kathleen Wood.

Collecte des données Les intensités élastiques des deux échantillons ont été obtenues sur le spectromètre à rétro-diffusion IN16, ILL (tableau 2.2 pour les caractéristiques de l'instrument). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. L'intensité élastique à cette température est collectée pendant une heure. Ces intensités serviront à la normalisation des intensités ultérieurement mesurées. Par la suite, une rampe continue en température, de 20 à 300 K est mise en place. En parallèle, les intensités élastiques sont collectées, chaque intensité élastique étant moyennée sur une plage de températures de 3 à 5 K. Les paramètres de collecte des données sont résumés dans le tableau 3.8.

	HTau	DTau	HMBP	DMBP
Paramètres				
Instrument			IN16	
Angle			135°	
Température			20-300 K	
Durée rampe	31 h	42 h	24 h	42 h
Vitesse rampe	$0.15 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.11 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.19 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.11 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$

TABLE 3.8 – Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de diffusion incohérente élastique sur les échantillons HTau, DTau, HMBP et DMBP. Les paramètres pour les mesures HMBP et DMBP sont issus de (26). IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

Traitement des données Le traitement des données s'est fait selon les principes développés dans le paragraphe 2.2.1, avec les paramètres présentés dans le tableau 6.5. L'extraction des MSDs s'est faite à partir des logarithmes des intensités corrigées $I_{\text{sample}}(Q)$ (normalisées à la plus basse température et cellule vide soustraite) présentés sur les figures 3.7 et 3.11.

	HTau	DTau	HMBP	DMBP
Gamme de fit	$0.19\text{-}1.32 \text{ \AA}^{-2}$	$0.19\text{-}1.13 \text{ \AA}^{-2}$	$0.19\text{-}1.32 \text{ \AA}^{-2}$	$0.19\text{-}1.13 \text{ \AA}^{-2}$

TABLE 3.9 – Gammes de fit utilisées pour l'extraction des déplacements carrés moyens issus des mesures de diffusion incohérente élastiques sur les échantillons HTau, DTau, HMBP et DMBP. Les paramètres pour les mesures HMBP et DMBP sont issus de (26). IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

3.1.6 Résultats et discussion

Dynamique des protéines Les mesures de diffusion élastique de neutrons font apparaître chez la protéine Tau des déplacements carrés moyens plus importants que ceux de la protéine MBP pour des températures supérieures à 250 K (figure 3.6). Les pentes au dessus de cette température (figure 3.6, encart et tableau 3.10) sont sensiblement différentes entre les deux protéines, la protéine

Tau donnant une constante de force apparente de l'ordre de 0.096 N.m^{-1} , comparée à celle de la protéine MBP, qui elle montre une constante de force deux fois plus grande, 0.19 N.m^{-1} . Le rapport des constantes de force met en évidence une flexibilité moyenne deux fois plus importante chez la protéine désordonnée, comparée à son analogue globulaire. Cette diminution de résilience est à mettre probablement sur le compte des fluctuations entropiques ΔS plus importantes chez la protéine Tau. Si on reprend la fonction biologique de Tau, on peut observer que cette dernière est double : liaison aux microtubules et modulation de la dynamique de ces derniers mais aussi gestion de l'espacement entre les microtubules. Cette seconde fonction est assurée par le domaine N-terminal, baptisé domaine de projection. Ce domaine joue ici le rôle de réservoir d'entropie, en interagissant avec les domaines de projections des protéines Tau voisines et créant une répulsion entropique. Le désordre à grande échelle se transmet aux mouvements de plus petites amplitudes dont les MSDs traduisent l'amplitude. L'inverse est également possible.

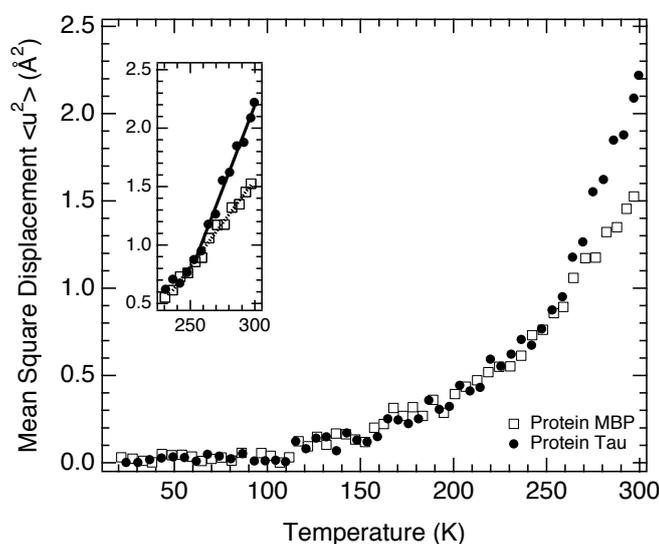


FIGURE 3.6 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur HMBP (carré ouvert) et HTau (rond plein), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.19\text{-}1.32 \text{ \AA}^{-2}$ pour HTau et HMBP. Encart : fits linéaires à hautes températures des MSDs et extraction des constantes apparentes de force. $\langle k' \rangle_{HTau} = 0.096 \text{ N.m}^{-1}$, $\langle k' \rangle_{HMBP} = 0.185 \text{ N.m}^{-1}$. Les mesures de l'échantillon HMBP sont issues de (26). IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

Les logarithmes des intensités élastiques corrigées $I_{sample}(Q)$ dont sont extraits les MSDs des protéines sont les suivants (figure 3.7) :

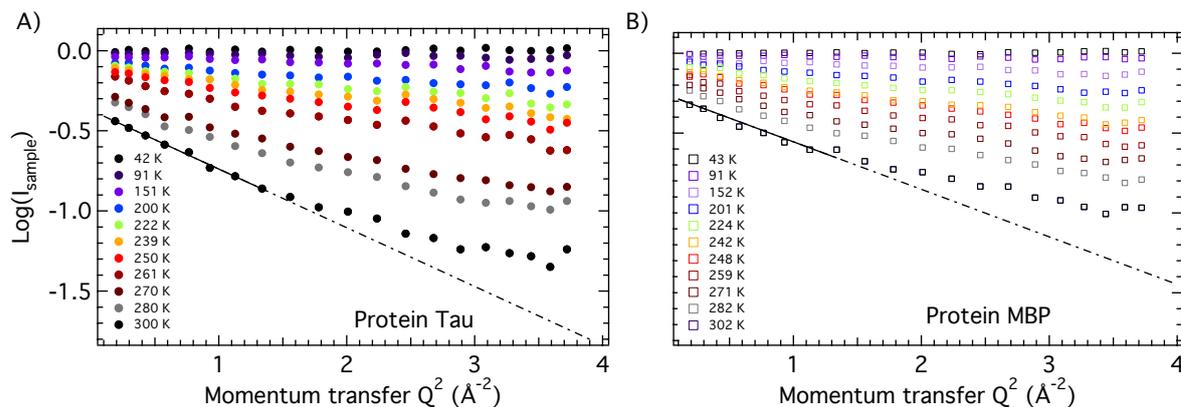


FIGURE 3.7 – Logarithme des intensités élastiques corrigées en fonction de Q^2 A) de la protéine Tau (cercles pleins) et B) de la MBP (carrés vides), de 20 à 300K. Gamme de fit : $0.19-1.32\text{\AA}^{-2}$. Les mesures de l'échantillon HMBP sont issues de (26). Les traits pleins correspondent aux fits linéaires effectués sur la gamme choisie à la plus haute température accessible. Les traits en pointillés représentent les extrapolations du fit à plus hautes valeurs de Q . IN16, ILL, résolution $0.9\ \mu\text{eV}$.

Il a été vérifié que les différences obtenues entre les deux protéines étaient significatives, en comparant les MSDs de la MBP avec ceux de deux autres protéines globulaires, la ribonucléase A (RNase A), de poids moléculaire de 13 700 et la myoglobine de cheval⁹, de poids moléculaire de 17 301. Les données pour la protéine RNase sont tirées de (27) et montrent que des protéines globulaires de poids moléculaires différents donnent des MSDs équivalents sur toute la gamme de températures mesurées (figure 3.8). La différence obtenue entre les protéines Tau, RNase A, myoglobine et la MBP peut donc être associée au caractère désordonné de la protéine et non à la simple différence de composition en acide aminés.

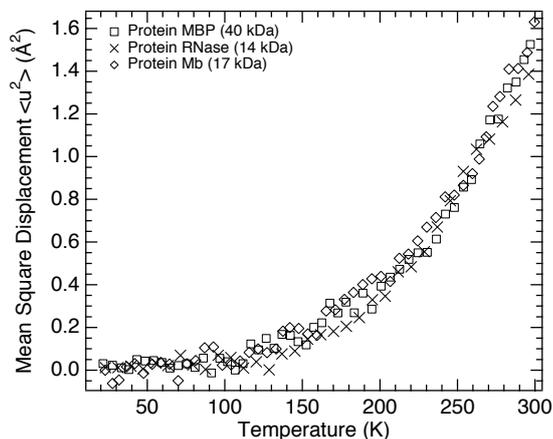


FIGURE 3.8 – Déplacements carrés moyens obtenus par une mesure de diffusion élastique sur la protéine RNase (croix), la myoglobine (diamant ouvert) et de la protéine MBP (carrés ouverts), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.19-1.31\ \text{\AA}^{-2}$ pour les trois protéines. Courbes de la MBP extraite de (26) et de (27) pour la RNase. IN16, ILL, résolution $0.9\ \mu\text{eV}$.

Des mesures de diffusion élastique sur la protéine Tau "sèche", c'est à dire à un taux d'hy-

9. Cet échantillon de myoglobine de cheval sera utilisé pour les expériences décrites dans le chapitre 5

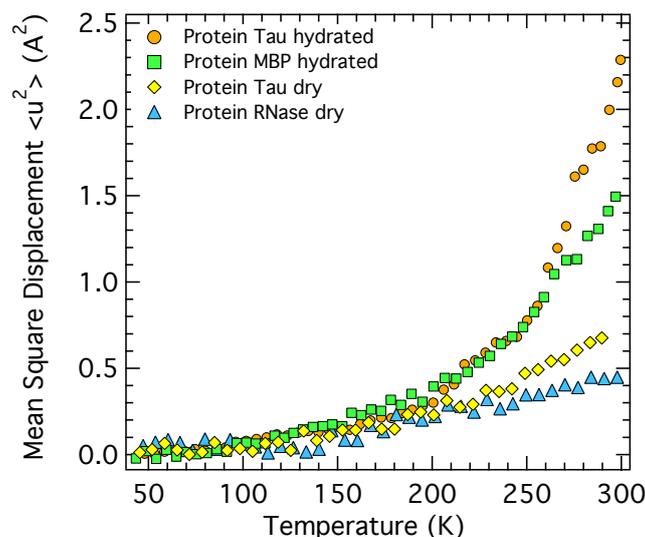


FIGURE 3.9 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesure IN16 de diffusion élastique sur HTau sec (diamant jaune), HTau 0.44 g H₂O/g H-Protéine (rond orange), HMBP 0.43 g H₂O/g H-Protéine (carré vert) et HRNase sec (triangle bleu), de 20 à 300 K. Gamme de fit : 0.19-1.32 Å⁻² pour les quatre protéines. Les mesures des protéines MBP et RNase sont respectivement issues de (26) et (27). IN16, ILL, résolution 0.9 μeV.

dratation de 0 g H₂O/g H-Protéine, présentent une inflexion vers 220 K (figure 3.9), là où son analogue globulaire¹⁰ n'en montre pas. Une flexibilité résiduelle, même à taux d'hydratation nul, semble exister dans la protéine désordonnée. A noter que l'apparition de cette transition vers 220 K est généralement typique des systèmes hydratés. Il est donc légitime de se poser la question du caractère "sec" de l'échantillon. La préparation de l'échantillon sec s'est faite en prenant une poudre de Tau et en la séchant sous P₂O₅ (un puissant dessiccant) pendant quatre jours. Cette procédure, caractérisée dans (91), permet de ne laisser que quatre molécules d'eau cristallographiques autour d'une molécule de lysozyme. Il est donc peu probable qu'il reste suffisamment d'eau autour de Tau pour avoir une transition due à une hydratation résiduelle. Ainsi, il est difficile de savoir si cette inflexion est associée ou non à une véritable transition dynamique. La correspondance des températures le laisse penser, bien qu'à notre connaissance, aucune étude sur des protéines (globulaires) n'ait montré une transition dynamique, à la fois par diffusion de neutrons ou par simulations.

Une modification de la dynamique malgré l'absence d'une couche d'hydratation est traditionnellement attribuée à des processus dans les coeurs hydrophobe et aux groupements méthyles des protéines. La proportion des groupements hydrophobes chez la RNase et Tau y est cependant globalement équivalente (44 et 47% respectivement, tableau A.3). Les mesures présentées dans la section 7.1 montreront de plus que cette transition à 220 K n'est pas associée aux groupements méthyles mais à un processus plus global, qui semble impliquer la totalité de la protéine.

Si on compare les rapports des pentes entre les protéines Tau et RNase "sèches", on trouve un rapport de 0.53 (Tau "sèche" deux fois plus flexible que la RNase "sèche"). Cette valeur à mettre en relation avec le rapport entre les pentes des protéines Tau et MBP "hydratées" (rapport de 0.52). La concordance de ces deux valeurs semble indiquer que cet effet observé prend naissance dans la forme

10. Dans le graphe 3.9, l'échantillon de référence sec utilisé est celui de RNase à 0 g H₂O/g H-Protéine et non de la MBP à 0 g H₂O/g H-Protéine

physique de l'échantillon, à savoir sous forme de poudre (environnement hautement concentré), et non dans la présence d'une couche d'hydratation. Il est possible qu'une molécule de protéine Tau, qui possède une exposition des ces acides aminés de surface plus importante prenne en charge les résidus de surface d'une molécule voisine, en interagissant de la même manière que le ferait une molécule d'eau, mais avec une efficacité moindre. La protéine "sèche" est alors dynamique, chacune des molécules agissant comme un réservoir pour ses plus proches voisins. Cette dynamique permet alors l'apparition d'une modification dynamique vers 220 K, avec cependant une amplitude plus faible, la protéine étant elle même limitée dans ses mouvements.

Le tableau 3.10 ci-dessous résume les différentes constantes de forces apparentes et les rapports entre ces dernières.

	HTau _{sec}	HRNase _{sec}	HTau _{0,4}	HMBP _{0,4}
Cste de force apparente	0.48 N.m ⁻¹	0.91 N.m ⁻¹	0.096 N.m ⁻¹	0.18 N.m ⁻¹
Rapport des constantes				
HTau _{sec} /...	...	0.53	5.00	2.60
HRNase _{sec} /...	1.90	...	9.48	5.10
HTau/...	0.20	0.11	...	0.52
HMBP/...	0.38	0.20	1.92	...

TABLE 3.10 – Constantes de force extraites de la pente des MSDs à hautes températures pour les échantillons HTau_{0,4}, HTau_{sec}, HMBP_{0,4} et RNase_{sec}. Les constantes de forces sont extraites d'après la formule 2.13. Pour une lecture en colonnes, la valeur du rapport donne le gain de flexibilité de la protéine du dénominateur, par rapport à celle du numérateur. En gras, rapport des constantes de force HTau_{sec}/ HRNase_{sec} et HTau_{0,4}/HMBP_{0,4}.

Dynamique des eaux d'hydratation L'utilisation de l'échantillon DTau pour les mesures de diffusion élastique de neutrons permet de se focaliser sur la dynamique de la couche d'hydratation. On peut observer des similitudes entre les deux mesures de MSDs (figure 3.10), en particulier :

- Les MSDs à basses températures (<220 K) sont inchangés entre les deux eaux d'hydratation.
- L'eau d'hydratation de la protéine Tau fait aussi apparaître une transition dynamique.
- Dans les mesures des échantillons DMBP et DTau, les MSDs sont tronqués vers 260 K. Au delà de cette température, apparaît un fléchissement dans les deux courbes. Ce fléchissement caractérise des temps de relaxation trop rapides pour la fenêtre temporelle du spectromètre. Les MSDs au delà de cette température ont été par conséquent retirés.

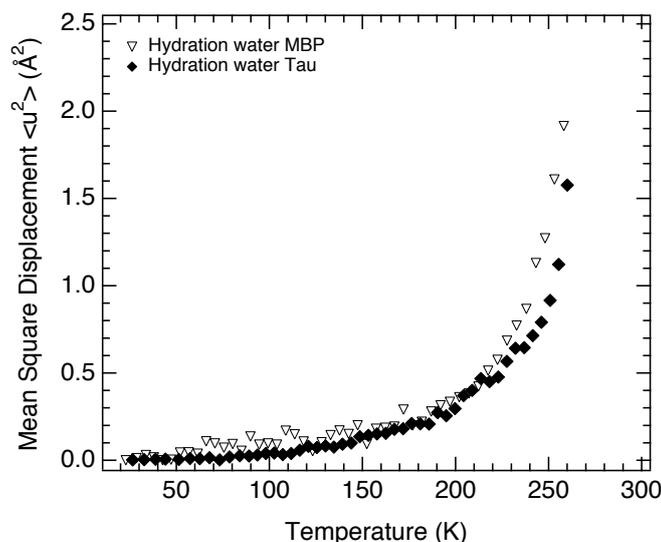


FIGURE 3.10 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur DMBP (triangle ouvert) et DTau (diamant plein), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.19\text{-}1.13 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau et DMBP. Les mesures de l'échantillon DMBP sont issues de (26). IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

Deux différences notables sont cependant observées. Un décalage en température est clairement observé sur les MSDs (figure 3.10). L'eau d'hydratation de la protéine Tau met en évidence une transition dynamique qui semble se produire vers des températures 10 K plus élevées que les températures qui caractérisent la transition dynamique de l'eau d'hydratation de la MBP (220-230 K). A noter de plus que la pente au delà de la transition dynamique est légèrement plus importante pour l'eau de la protéine Tau que pour celle de la protéine MBP, ce qui explique que les deux mesures présentent des températures de dynamique limite (fin des MSDs) équivalentes.

Les logarithmes des intensités élastiques corrigées $I_{sample}(Q)$ dont sont extraits les MSDs des eaux d'hydratation sont les suivants (figure 3.11)

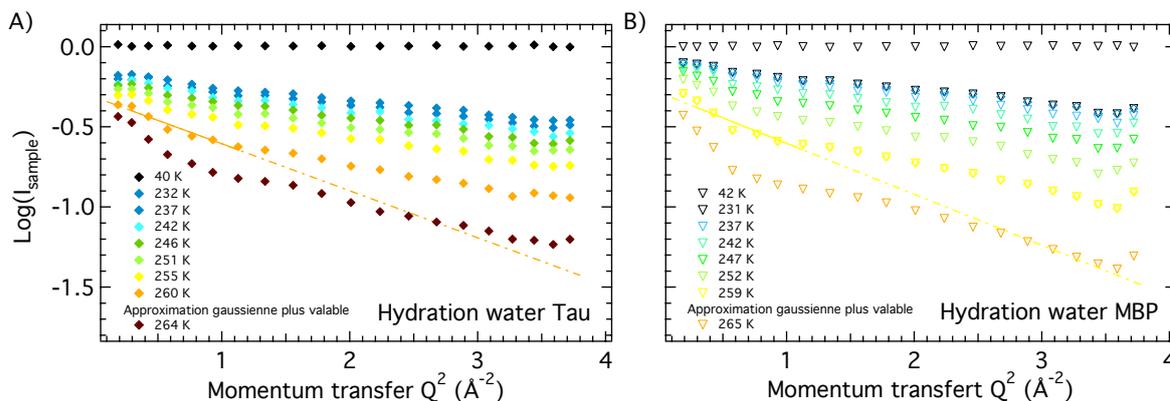


FIGURE 3.11 – Logarithme des intensités élastiques corrigées en fonction de Q^2 , A) de la couche d'hydratation de la protéine Tau (diamant pleins) et B) de la couche d'hydratation de la protéine MBP (triangles inversés vides), de 20 à 300K. Gamme de fit : $0.19-1.13 \text{\AA}^{-2}$. Les mesures de l'échantillon DMBP sont issues de (26). Les traits pleins correspondent au fit linéaire effectué sur la gamme choisie, les traits en pointillés sont les extrapolations du fit à plus hauts Q . Au delà de 260 K, l'approximation gaussienne n'est plus valable, d'où l'absence de fit pour les températures supérieures. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$

Couplage IDP-eau d'hydratation L'utilisation conjointe des échantillons deutérés et hydrogénés permet d'approfondir la relation qu'une protéine entretient avec son eau d'hydratation. La superposition des déplacements carrés moyens d'un même couple (figure 3.12), à savoir une protéine et son eau d'hydratation permet d'estimer dans quelle mesure la protéine et l'eau interagissent.

Les MSDs de la protéine Tau et de son eau d'hydratation semble diverger vers des températures proches de 250 K (figure 3.12.A), alors que les MSDs de la protéine MBP et son eau d'hydratation divergent vers 220 K (figure 3.12.B). Sur une plage de température plus large, la dynamique de la protéine suit celle de son eau d'hydratation, ce qui semble indiquer que les membres du couple IDP/eau_{IDP} s'influencent l'un par rapport à l'autre de manière plus marquée que peut le faire le couple MBP/eau_{MBP}. On parlera alors d'un *couplage* entre la protéine Tau et son eau d'hydratation.

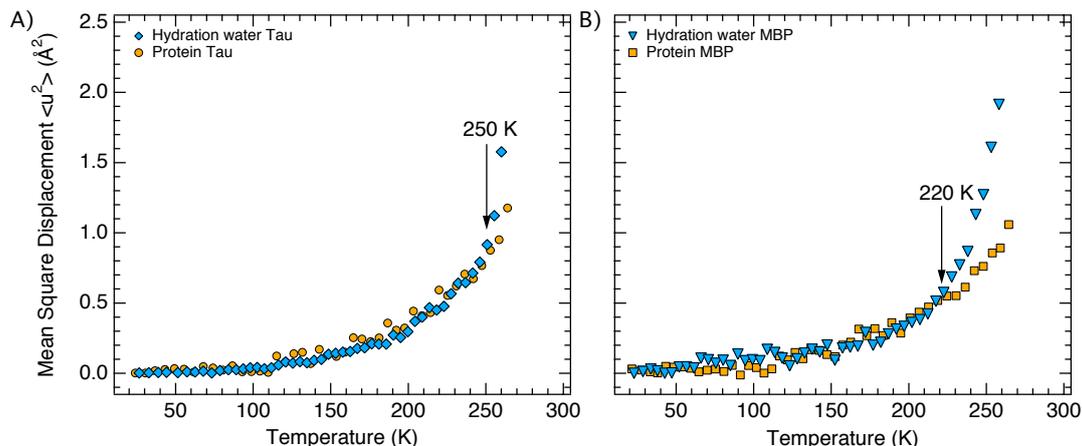


FIGURE 3.12 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique, de 20 à 300 K sur A) DTau (diamant plein) et HTau (rond plein). Gamme de fit : $0.19-1.32 \text{ \AA}^{-2}$ pour HTau et $0.19-1.13 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau et B) sur DMBP (triangle plein) et HMBP (carré plein). Gamme de fit : $0.19-1.32 \text{ \AA}^{-2}$ pour HMBP et $0.19-1.13 \text{ \AA}^{-2}$ pour DMBP. Les mesures des échantillons HMBP et DMBP sont issues de (26). Les MSDs des protéines sont tronqués pour correspondre à la gamme de MSDs des eaux. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

Il est intéressant de combiner un peu différemment les MSDs pour aller plus loin dans la comparaison des deux systèmes dans l'étude du couplage. Si on regarde en même temps les MSDs de la protéine Tau, MBP et l'eau d'hydratation de Tau, on s'aperçoit que la température de divergence des MSDs entre les deux protéines, coïncide avec la température de divergence de l'eau, située vers 260 K (figure 3.13).

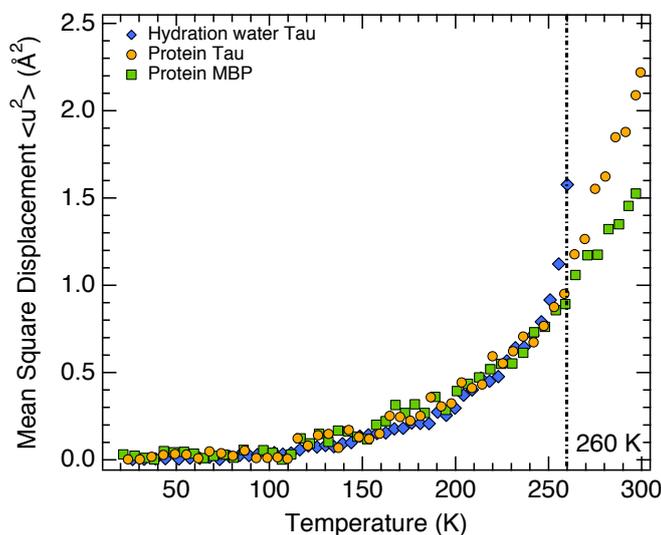


FIGURE 3.13 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur DTau (diamant bleu), HTau (rond orange) et HMBP (carré vert), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.19-1.32 \text{ \AA}^{-2}$ pour HTau et HMBP ; $0.19-1.13 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau. Les mesures de l'échantillon HMBP sont issues de (26). IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

La question de savoir "qui influence qui" reste cependant en suspend, une primauté ne pou-

vant être extraite avec cette définition du couplage. Rappelons nous, en reprenant le paragraphe 1.2 et l'étude (14), que les fluctuations rapides dans la couche d'hydratation influencent et dictent la dynamique d'une protéine globulaire. Pour avancer dans cette problématique pour les protéines intrinsèquement désordonnées, il convient d'analyser deux points, l'évolution conjointe des MSDs en température et les échantillons sans couche d'hydratation.

Malgré des transitions dans des gammes en températures équivalentes, on peut noter un décalage de l'ordre d'une dizaine de Kelvin dans l'apparition de la transition chez l'eau de Tau (230-250 K), par rapport à celle de l'eau de la MBP (220-240 K). Ce décalage en température permet aux MSDs de la protéine Tau et ceux de son eau d'hydratation d'être bien plus proches en terme de valeurs que ne peuvent l'être ceux de la MBP et de son eau d'hydratation, à une température équivalente (figures 3.12 A et B). On parlera dans le cas du couple Tau/eau_{IDP} d'un *couplage plus étroit* que celui du couple MBP/eau_{glob}. Ce dernier est lui même plus étroit que celui impliqué dans le couple protéine membranaire (PM)/eau d'hydratation_{PM}, où il a été montré que le couplage se faisait dans ce cas préférentiellement avec les lipides environnants plutôt qu'avec la couche d'hydratation (31). Etant donné que les protéines connaissent leur transition dynamique à des températures similaires, contrairement aux eaux d'hydratation où celle de Tau est décalée, il est raisonnable de penser que la protéine désordonnée influence de manière non négligeable sa couche d'hydratation, de manière à ce que celle-ci ait une dynamique équivalente à la protéine. L'eau est alors ralentie et ses mouvements plus confinés par l'influence de la protéine. L'eau n'en est pas moins en reste, sur l'influence qu'elle exerce sur la protéine. En reprenant la figure 3.13, on peut observer que la protéine Tau n'est pleinement flexible qu'une fois l'eau sortie de la fenêtre temporelle du spectromètre (260 K). En dessous de cette température, la protéine Tau n'est guère différente en terme de MSDs par rapport à la MBP. On peut envisager la situation où l'eau d'hydratation de la Tau, à travers une interaction forte, entrave la dynamique de la protéine. Une fois la pleine dynamique de la couche d'hydratation atteinte, celle-ci se transmet à la protéine à travers leur couplage. Une relation *bilatérale* semble donc émerger, dans laquelle protéine désordonnée et eau d'hydratation modulent et façonnent leur paysage énergétique respectifs. La figure 3.14 résume cette notion de couplage et le gradient observé à travers les trois classes de protéines, protéines membranaires, globulaires et intrinsèquement désordonnées. Pour aller plus loin dans cette interprétation, les mouvements de Tau et de son eau d'hydratation, par rapport à ceux de la MBP, ont été étudiés par QENS et seront présentés dans les chapitres 4 et 6.

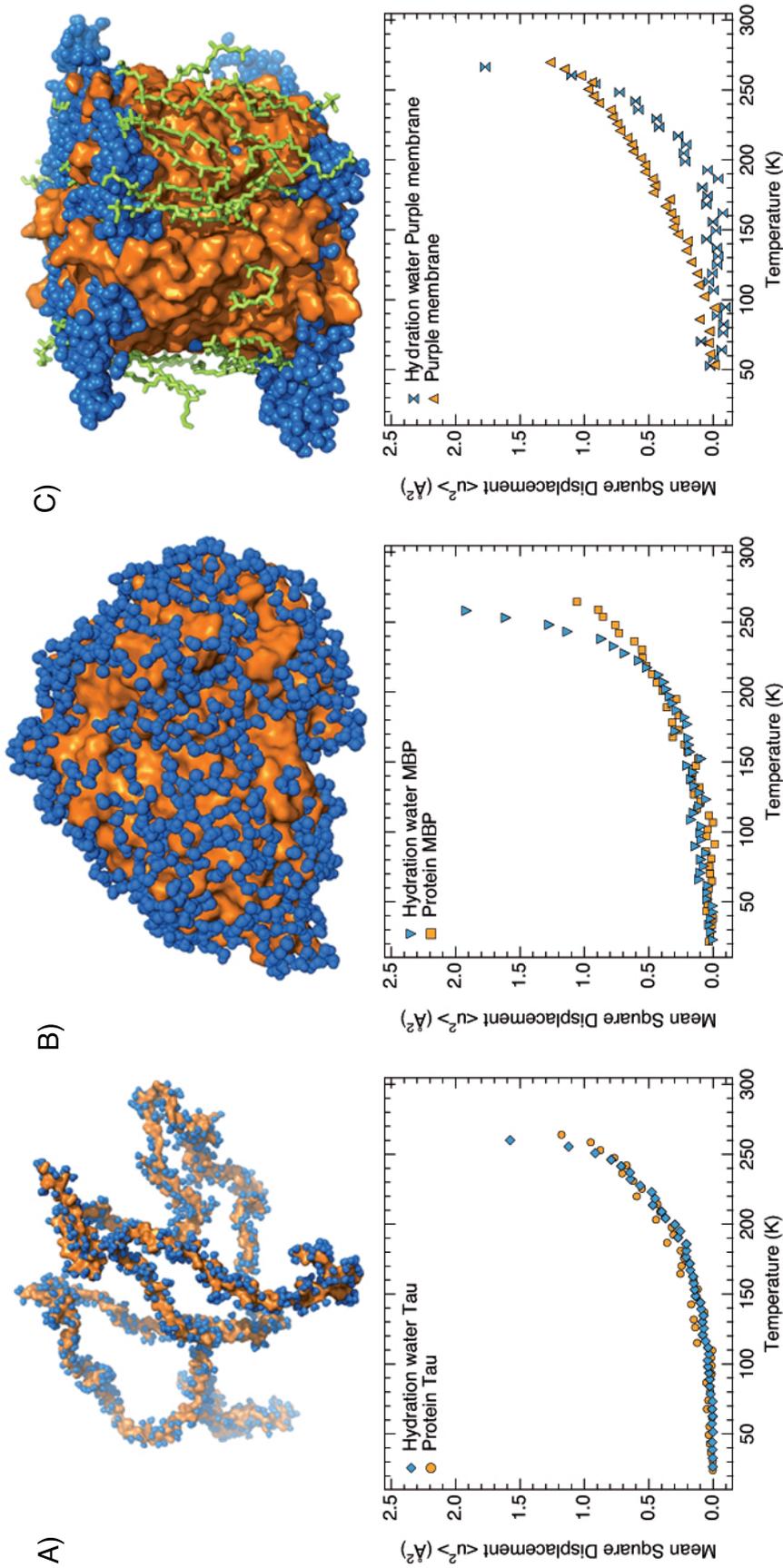


FIGURE 3.14 – A) Figure supérieure : structure simulée (un ensemble de 100 structures de ht40 a été généré en utilisant une librairie de boucles désordonnées et une structure avec un rayon de rotation similaire à celui mesuré par SAXS, 62 Å, a été choisie arbitrairement) de la protéine Tau (orange), avec une monocouche d'eau (1050 molécules d'eau (boules bleues)). Figure inférieure : MSDs de la protéine Tau (cercle orange) et de sa couche d'hydratation (diamant bleu). Reproduction de la figure 3.7.A. B) Figure supérieure : structure de la protéine MBP, avec 922 molécules d'eau (situation de monocouche). Figure inférieure : MSDs de la protéine MBP (carré orange) et de sa couche d'hydratation (triangle inversé bleu). Reproduction de la figure 3.7.B. C) Figure supérieure : structure de la membrane pourpre (extraite de (49)), avec la bactériorhodopsine (orange), une monocouche d'eau (boules bleues) et ses lipides environnants (vert). Figure inférieure : MSDs de la membrane pourpre (triangle orange) et de sa couche d'hydratation (sablier bleu). Les mesures des échantillons HMBP et DMBP sont issues de (26). Les mesures de la protéine BR sont issues de (31)

3.2 Dynamique des protéines dépliées par mutations en conditions natives

3.2.1 Problématiques et motivations

Le système utilisé dans les sections précédentes a fait appel à des protéines intrinsèquement désordonnées, exprimées sous forme désordonnées dans la cellule, avec une fonction biologique donnée. Il est cependant possible de faire produire par la bactérie des protéines désordonnées, désordre issu de la mutation.

La motivation de cette étude vient de la présence de séquences prédites comme désordonnées, qui peuvent mener à des interactions non spécifiques, en particulier à la formation d'agrégats. De nombreuses maladies neurodégénératives font états d'agrégats de protéines comme marqueurs spécifiques. Les PHFs intraneuronaux formés par la protéine Tau ainsi que les fibres amyloïdes extracellulaires, associées à la composante $A\beta$ de la protéine APP (amyloid precursor protein), se sont révélés être les deux signes cliniques observés chez des patients décédés de la maladie d'Alzheimer. De manière moins systématique, la protéine α -synucléine agrégée (corps de Lewy) a été observée chez des patients atteints de la forme familiale de cette maladie. Les agrégats d' α -synucléine sont aussi une des marques de la maladie de Parkinson. Tau, ainsi que l' α -synucléine ont la particularité d'être désordonnée (bien qu'une récente étude datant de septembre 2011 semble indiquer que l' α -synucléine adoptait une conformation repliée *in vivo* (93)). L'accumulation de protéines mal repliées peut donc à terme nuire à l'intégrité de la cellule. Comme dit précédemment, la cellule est capable de mettre en place la *réponse dite de la protéine dépliée*, qui régule le niveau d'expression de certaines protéines afin de limiter l'agrégation. A l'inverse, il a été supposé que celle-ci résultait d'un processus cellulaire qui visait à protéger la cellule de l'accumulation de ces protéines mal repliées. Dans le cas de pathologies où la machinerie cellulaire de dégradation n'est plus efficace ou encore surchargée, la cellule regroupe ces protéines sous forme d'agrégats (94) afin de limiter les effets délétères d'une accumulation cytosolique de protéines. Il a de plus été supposé que cette organisation sous forme d'agrégats permettait une interaction avec la vimentine, une protéine impliquée dans l'architecture des organites de la cellule, de manière à ségréguer les agrégats du reste de la cellule. L'agrégation, au lieu d'être vu comme une conséquence néfaste devient alors une réponse salvatrice de la cellule.

A la lumière de ces contextes biologiques, la dynamique de ces protéines dépliées en conditions natives et des agrégats a été donc étudiée, par diffusion élastique de neutrons.

3.2.2 Système biologique : la MBP dépliée par mutations ou MBP0

Afin d'étudier un système désordonné non physiologique, soluble et agrégé, il a été utilisé un mutant (I56A, L115A, I161A, L147A et I226A) de la MBP, nommé MBP0, qui a été montré par dichroïsme circulaire comme étant déplié (figure 3.15). La protéine a été produite grâce à une sur-expression par *Escherichia coli*. La protéine est produite en corps d'inclusion et purifiée en conditions dénaturantes. Une étape finale de dialyse permet de retirer le dénaturant, permettant d'avoir une protéine soluble désordonnée en condition native (Susan Marqusee et Kathreen Hart, résultats non publiés). La poudre de protéine HMBP0 a été produite par **Kathreen Hart** et **Susan Marqusee**, *University of California Berkeley* (UCB).

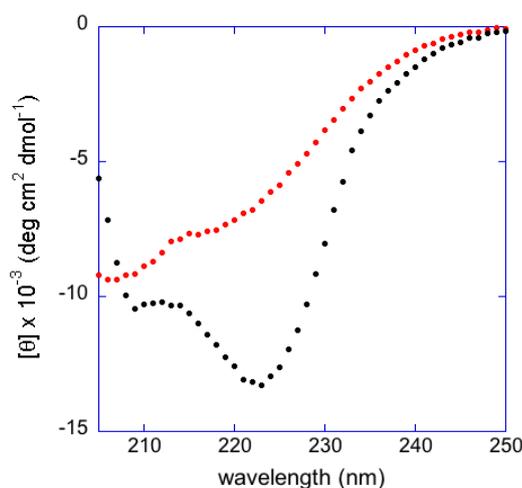


FIGURE 3.15 – Spectre de dichroïsme circulaire effectué sur les protéines MBP (cercles noirs) et MBP0 (cercles rouges) en conditions non dénaturantes. Mesures effectuées par Kathreen Hart, à l’université de Berkeley.

Pour les mesures de la forme soluble, il a été utilisé un échantillon nommé **HMBP0_{soluble}**, en opposition avec l’échantillon composé de MBP0 agrégée, nommé **HMBP0_{agreg.}**

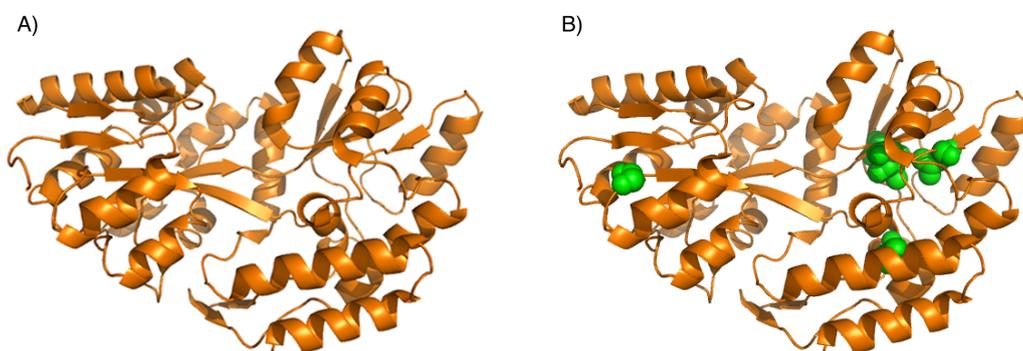


FIGURE 3.16 – A) Structure repliée de la protéine MBP de type sauvage (orange). B) Mutations présentes dans la MBP0 (boules vertes) : I56A, L115A, L147A, I161A et I226A.

3.2.3 Diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine MBP0

Des mesures de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) sur les protéines Tau et MBP0 ont été effectuées à l’ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble), sur la ligne de lumière BioSAXS ID14-3 afin de caractériser la protéine MBP0 en solution. Le tampon utilisé pour les mesures des rayons de giration des protéines Tau et MBP est le suivant : 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl avec des concentration de protéines de 4.7 mg/ml pour Tau et 2.35 mg/ml pour la MBP. Le tampon utilisé pour les mesures des rayons de giration de la protéine MBP0 est le suivant : 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 M chlorure de guanidine avec une concentration de protéine de 0.2 mg/ml. L’absence de dégâts d’irradiation a été vérifiée par 10 expositions successives de 10 s chacune. Le temps d’exposition finale était de 100 s pour tous les échantillons ou tampons. Les clichés de diffusion 2D ont été normalisés avec les mesures d’une solution de BSA (bovine serum albumine)

à 5 mg/ml et intégrés radialement afin d'obtenir les profils d'intensité $I(Q)$. La contribution du solvant a été de plus soustraite. Le rayon de giration a été extrait du logarithme des intensités corrigées.

Les mesures SAXS font apparaître des rayons de giration de l'ordre de 62 Å pour les protéines Tau et MBP0, en accord avec des mesures précédentes pour la protéine Tau (87). La valeur du rayons de giration équivalents pour la protéine Tau comparée à celui obtenue pour la MBP0 confirme le caractère désordonné de la MBP0 en solution. Le rayon de giration de la MBP obtenu est de 23Å, ce qui confirme son caractère globulaire. A noter cependant les tampons différents entre les deux protéines MBP0 et Tau. Les mêmes mesures effectuées sur une solution de protéine Tau, avec le même tampon que celui de la MBP0 donne un rayon de giration de 69 Å.

3.2.4 Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons

La poudre de protéine MBP0 a été traitée selon deux protocoles :

- Par resuspension en D₂O à faible concentration de protéine (0.1 mg/ml) de la poudre de protéine purifiée, puis filtrée sur une membrane de 0.22 μm pour retirer les possibles agrégats. La solution de protéine a été ensuite rehyophilisée. La poudre a ensuite été séchée sur P₂O₅ durant 2 jours sur un porte-échantillon plat en aluminium de surface 4 x 3 cm². Le niveau d'hydratation résultant a été défini comme correspondant à 0 g H₂O /g H-Protéine. La poudre sèche de HMBP0 soluble (32 mg) a été ensuite réhydratée par de la vapeur de D₂O, jusqu'à un niveau d'hydratation de 0.44 g D₂O /g HMBP0 (correspondant à 0.4 g H₂O /g HMBP0 ou 916 molécules de D₂O par molécule de MBP0). Le poids d'eau ajouté a été vérifié par pesage tout au long de la procédure. Les échantillons ont ensuite été scellés par un couvercle en aluminium (0,3 mm d'épaisseur de parcours des neutrons) et un joint d'indium de 1 mm de diamètre. Cette procédure permettra d'obtenir l'échantillon **HMBP0_{soluble}**.
- Le second échantillon utilisé a été préparé à partir de la poudre issue de la purification, resuspendue dans un faible volume de D₂O (5 mg/ml). La solution a été ensuite concentrée par évaporation complète du D₂O jusqu'à avoir une poudre sèche. La procédure d'hydratation précédente, avec 123 mg de poudre sèche de MBP0 agrégée et un taux d'hydratation de 0.44 g D₂O/g HMBP0 (soit 916 molécules de D₂O par molécule de MBP0) a été mise en place. Cette méthode permet de s'assurer de la totale précipitation de la protéine et de ne pas avoir de forme soluble. On forme ainsi **HMBP0_{agreg}**.

Les contributions calculées à la section efficace de diffusion incohérente des deux échantillons sont 98% issus de la protéine (179 240 barns) et 2% de la couche d'hydratation (3 769 barns).

3.2.5 Caractérisation de la MBP0 en solution par chromatographie d'exclusion de taille

Etat d'oligomérisation Afin de s'assurer de l'absence de forme soluble de la protéine dans l'échantillon HMBP0_{agreg} et inversement dans l'échantillon HMBP0_{soluble}, une chromatographie d'exclusion de taille a été effectuée pour vérifier l'état d'oligomérisation en solution de la protéine. Le volume mort de la colonne a été déterminé par du bleu de Dextran (polysaccharide d'un poids moléculaire moyen de 2 000 000). Les agrégats, qui ne sont pas résolus par la colonne, élueront au même volume que le bleu de Dextran. La forme soluble de la protéine éluera à des volumes supérieurs. Une injection de la solution de MBP0 à 5 mg/ml (avant déshydratation) sur une colonne Superdex S200, équilibrée avec l'eau comme tampon, donne une élution à des volumes équivalents à ceux du bleu de Dextran (figure 3.17). On remarque de plus l'absence de formes solubles. Inversement, la solution

de HMBP0 à 0.1 mg/ml injectée sur la colonne donne un volume d'élution de l'ordre de 75 ml, bien supérieur au volume mort (46 ml). Cette injection ne fait de plus apparaître aucune forme agrégée de la protéine.

Calibration de colonne On peut aller plus loin dans la caractérisation des échantillons MBP0 par chromatographie d'exclusion de taille. En utilisant différentes protéines de poids moléculaire et de rayons hydrodynamiques connus, il est possible de réaliser une calibration de la colonne, à savoir rayon hydrodynamique et poids moléculaire en fonction du volume d'élution. En mesurant le volume d'élution de la protéine d'intérêt, il est possible de remonter à son poids moléculaire apparent et son rayon hydrodynamique, par interpolation des deux paramètres (figure 3.18). Il a été utilisé pour la calibration de la colonne les protéines suivantes :

	MM	Rh		MM	Rh
Protéines					
Thyroglobuline	669 kDa	7.85 nm	Ovalbumine	43 kDa	3.0 nm
Ferritine	440 kDa	6.80 nm	Chymotrypsinogène	25 kDa	2.10 nm
Aldolase	158 kDa	4.65 nm	RNase A	14 kDa	1.64 nm
Albumine	67 kDa	3.37 nm			

TABLE 3.11 – Protéines utilisées pour la calibration de la colonne, leur masse moléculaire (MM) et leur rayon hydrodynamique (Rh)

Les profils d'élution des différentes protéines de référence, ainsi que ceux des formes agrégées et solubles la MBP0 sont les suivants (figure 3.17) :

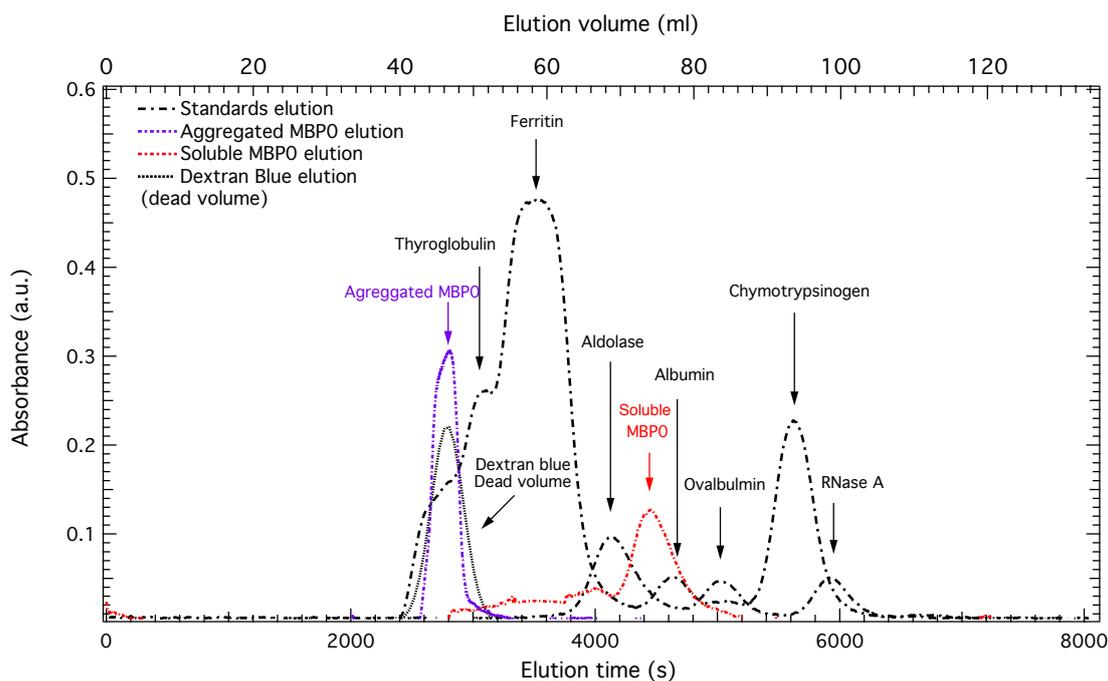


FIGURE 3.17 – Profil d'élution de la protéine HMBP0 dans différents états d'oligomérisation (soluble et agrégé) en sortie d'une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Sephadex S200. Aux profils d'élution de la HMBP0 ($HMBP0_{agreg}$: violet, $MBP0_{soluble}$: rouge) s'ajoutent ceux de protéines de référence dont le rayon hydrodynamique et le poids moléculaire sont connus. Le volume mort de la colonne a été déterminé par une élution de bleu de dextran. Colonne équilibrée en eau. Tampon des protéines : eau. Elution à 1 ml/min

Les rayons hydrodynamiques et les masses moléculaires sont respectivement interpolés en fonction du volume d'élution par une loi linéaire et une simple exponentielle. Ces courbes d'étalonnage permettent de remonter aux rayons et aux masses moléculaires apparents de la MBP0, connaissant leur volume d'élution. Le graphique suivant présente les résultats pour la protéine $HMBP0_{soluble}$. Une mesure du volume d'élution de la protéine Tau a été effectuée dans les mêmes conditions et l'interpolations de la masse apparentes et du rayon hydrodynamique de Tau ont été rajoutés sur la figure 3.18.

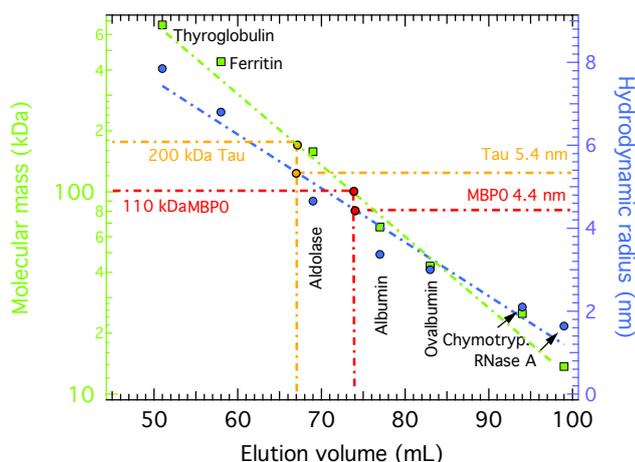


FIGURE 3.18 – Interpolations des masses moléculaires (échelle logarithmique) et des rayons hydrodynamiques (échelle linéaire) grâce aux mesures de calibration par chromatographie d'exclusion de taille. Interpolation linéaire pour les rayons hydrodynamiques et exponentielle pour les masses moléculaires. Le volume d'élution de la MBPO (74 ml) donne un rayon hydrodynamique de 4.4 nm et un poids moléculaire de 110 000, à comparer au poids moléculaire déduit de la séquence primaire (40 628) et au rayon hydrodynamique d'une protéine globulaire de 43 000 (ovalbumine : 3 nm). Par comparaison, la protéine Tau met en évidence un rayon hydrodynamique de 5.4 nm et un poids apparent de l'ordre de 200 kDa, pour un poids moléculaire théorique de 45 849.

3.2.6 Mesures de diffusion élastique incohérente de neutrons à haute résolution (0.9 μeV) sur les échantillons de MBPO

Collecte des données Les intensités élastiques des deux échantillons ont été obtenues sur les spectromètres à rétro-diffusion IN16, ILL et SPHERES, FRM2 (tableau 2.2 pour les caractéristiques de l'instrument). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température de l'échantillon (en 2 heures) jusqu'à 20 K est effectuée. L'intensité élastique à cette température est collectée pendant une heure. Ces intensités serviront à la normalisation des intensités ultérieurement mesurées. Par la suite, une rampe continue en température, de 20 à 300 K est mise en place. En parallèle, les intensités élastiques sont collectées, chaque intensité élastique étant moyennées sur une plage de température de 3 à 5 K. Les paramètres de collecte des données sont résumés dans le tableau 3.12.

Paramètres	HMBPO _{soluble}		HMBPO _{agreg}
	IN16	SPHERES	IN16
Angle	135°	135°	135°
Température	20-300 K	20-300 K	20-300 K
Durée rampe	43 h	24 h	32 h
Vitesse rampe	0.11 K.min ⁻¹	0.15 K.min ⁻¹	0.14 K.min ⁻¹

TABLE 3.12 – Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de diffusion incohérente élastique sur les échantillons HMBPO_{soluble} et HMBPO_{agreg}.

Traitement des données Le traitement des données s'est fait selon les principes développés dans le paragraphe 2.2.1, avec les paramètres présentés dans le tableau 3.13. L'extraction des MSDs

s'est faite à partir des logarithmes des intensités corrigées $I_{sample}(Q)$ (normalisées à la plus basse température, 20 K, et cellule vide soustraite) présentés figure 3.20. Les gammes de Q utilisées pour l'extraction des MSDs de l'échantillon $HMBP0_{agreg}$ ($0.20-1.40 \text{ \AA}^{-2}$), mesuré sur IN16, sont très légèrement différentes de celles présentées dans la section 3.1.5 ($0.19-1.32 \text{ \AA}^{-2}$), dû à un changement des détecteurs.

	$HMBP0_{soluble}$		$HMBP0_{agreg}$
	IN16	SPHERES	IN16
Gamme de fit	$0.2-1.40 \text{ \AA}^{-2}$	$0.3-1.30 \text{ \AA}^{-2}$	$0.2-1.40 \text{ \AA}^{-2}$

TABLE 3.13 – Gammes de fit utilisées pour l'extraction des déplacements carrés moyens issus des mesures de diffusion incohérente élastiques sur les échantillons $HMBP0_{soluble}$ et $HMBP0_{agreg}$.

3.2.7 Résultats et discussion

Résultats On peut mettre en évidence une grande variation de dynamique issue des mesures de diffusion élastique de neutrons sur HMBP, HTau, $HMBP0_{soluble}$ et $HMBP0_{agreg}$. Les MSDs font apparaître clairement une plus grande flexibilité chez la protéine $MBP0_{soluble}$ par rapport aux autres protéines, en particulier la protéine Tau (figure 3.19.A). Les rapports des constantes de forces (résumées dans le tableau 3.14) mettent en évidence des flexibilités quatre fois supérieures pour $HMBP0_{soluble}$ par rapport à HTau, et sept fois supérieures à HMBP. A noter de plus que les MSDs mesurés sur $HMBP0_{soluble}$ sortent de la fenêtre temporelle de l'instrument au delà de 270 K.

Les MSDs de la forme agrégée $HMBP0_{agreg}$ font clairement apparaître une transition dynamique, à des températures proches de 220-250 K. Les valeurs au delà de ces températures montrent une dynamique à peu près équivalente à celle de la protéine Tau (Tau 1.2 fois plus flexible que la $MBP0_{agreg}$), et supérieure à celle de la MBP, avec un facteur 1.5 de gain de flexibilité pour $MBP0_{agreg}$ (figure 3.19).

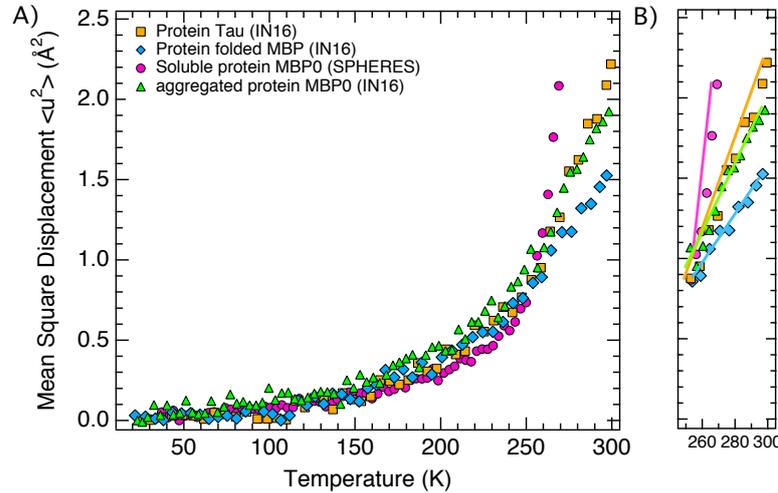


FIGURE 3.19 – A) Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures de diffusion élastique sur $HMBP0_{soluble}$ (rond mauve) sur SPHERES, $HMBP0_{agreg}$ (triangle vert), sur HTau (carré orange) et HMBP (diamant bleu) sur IN16, de 20 K à 300 K. Gamme de fit : $0.2-1.40 \text{ \AA}^{-2}$ pour HTau, $HMBP0_{agreg}$ et HMBP ; $0.3-1.30 \text{ \AA}^{-2}$ pour $HMBP0_{soluble}$. B) Fit linéaire des MSDs à hautes températures pour extraire les constantes de force effectives (présentées dans le tableau 3.14). IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$ et SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

Les logarithmes des intensités élastiques corrigées $I_{sample}(Q)$ en fonction de Q^2 dont sont extraits les MSDs sont présentés figure 3.20 :

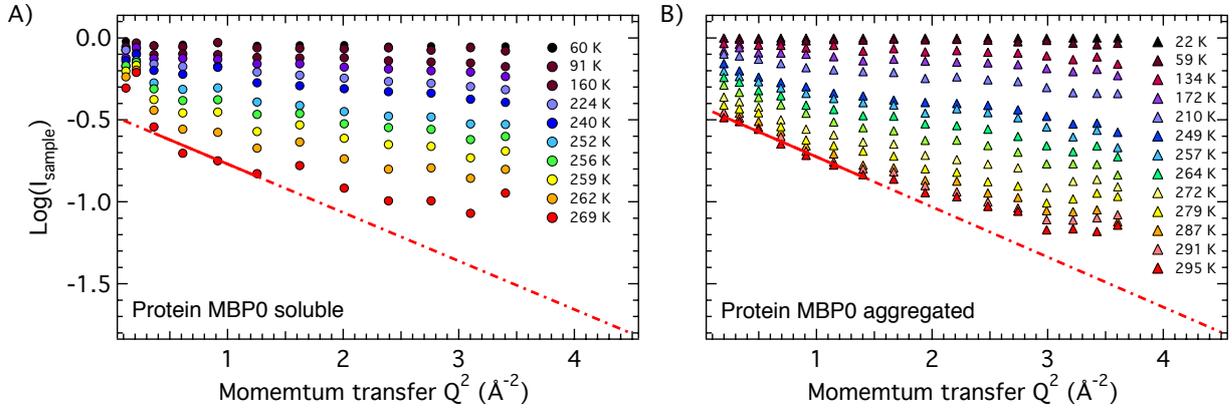


FIGURE 3.20 – Logarithme des intensités en fonction de Q^2 A) de la protéine MBP0 soluble SPHERES (cercles pleins) et B) de la protéine MBP0 agrégée IN16 (triangles pleins), de 20 à 270 K pour la MBP0 soluble et de 20 à 295 K pour la MBP0 agrégée. Gamme de fit : $0.20-1.40 \text{ \AA}^{-2}$ pour $HMBP0_{agreg}$ et $0.30-1.30 \text{ \AA}^{-2}$ pour $HMBP0_{soluble}$. Les traits pleins correspondent au fit linéaire effectué sur la gamme choisie, les traits en pointillés sont les extrapolations du fit à plus hautes valeurs de Q . IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$ et SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

A noter que les MSDs de $HMBP0_{soluble}$ ici présentés ont été obtenus sur SPHERES, pour des raisons de statistiques et de flux d'instrument. Des mesures IN16 ont aussi été réalisées sur le même échantillon pour s'assurer de la pertinence de la mesure entre les deux instruments. On trouvera dans l'annexe C.2 les résultats de la comparaison entre IN16 et SPHERES.

	HTau	HMBP	$HMBP0_{soluble}$	$HMBP0_{agreg}$
Cste de force effective	0.096 N.m^{-1}	0.185 N.m^{-1}	0.0238 N.m^{-1}	0.119 N.m^{-1}
Rapports constantes				
HTau/...	...	0.52	4.03	0.81
HMBP/...	1.92	...	7.77	1.55
$HMBP0_{soluble}/...$	0.25	0.13	...	0.20
$HMBP0_{agreg}/...$	1.24	0.64	5.0	...

TABLE 3.14 – Constantes de forces effectives extraites de la pente des MSDs à hautes températures pour les protéines HTau (255-300 K), HMBP (255-300 K), $HMBP0_{soluble}$ (260-270 K) et $HMBP0_{agreg}$ (255-300 K). Les constantes de force ont été extraites d'après la formule 2.13. Pour une lecture en colonnes, la valeur du rapport donne le gain de flexibilité de la protéine du dénominateur, par rapport à celle du numérateur.

Discussion Les MSDs de la protéine MBP0, à la fois sous ses formes soluble et agrégée montrent de grandes variations, comparées à la fois à la MBP sauvage et repliée et à la protéine Tau. La comparaison des MSDs de la forme soluble avec ceux de la MBP sauvage va de paire avec le caractère désordonné de la protéine. La différence de MSDs des protéines Tau et $MBP0_{soluble}$ pourrait aussi s'interpréter dans ce sens, à savoir une flexibilité supérieure de la MBP0, à tel point que la dynamique de cet échantillon sort de la fenêtre temporelle de l'instrument au delà de 260-270

K. Par contre, la question de la nature du désordre se pose, étant donné que les deux protéines sont désordonnées et de poids moléculaire équivalents. L'état de repliement de la MBP0 a donc été partiellement étudié par chromatographie d'exclusion de taille et SAXS. Il a été observé des comportements hydrodynamiques différents entre les deux protéines (rayons hydrodynamiques respectivement de 4.4 nm et 5.4 nm pour la MBP0 soluble et Tau, pour des poids moléculaires équivalents). Les mesures de diffusion de rayons-X montrent de même des rayons de giration globalement plus faible pour la MBP0. La protéine MBP0 semble adopter une conformation plus compacte que la protéine Tau en solution. Il est donc possible que, malgré une conformation partiellement globulaire plus prononcée chez la MBP0, son désordre à plus petite échelle (absence complète de structures secondaires) soit plus important que chez la protéine Tau, ce qui pourrait expliquer les constantes de forces inférieures pour la MBP0. Cette hypothèse sera difficile à vérifier, si ce n'est par RMN du proton, la cristallographie n'étant pas applicable pour les protéines désordonnées.

Les mesures de la MBP0 agrégée montrent de plus que l'agrégation des protéines a une influence non négligeable sur la dynamique moyenne et permet de confirmer que les poudres des échantillons HTau, HMBP, DTau, DMBP, HRNase et HMB diffèrent d'une poudre d'agrégats.

3.3 Conclusion

Le couplage entre l'eau d'hydratation est donc plus étroit pour une protéine intrinsèquement désordonnée que pour une protéine globulaire. Dans le cas des protéines membranaires, l'apparition de mouvements diffusifs dans la couche d'hydratation à 220 K ne semble pas affecter la dynamique de la membrane lipidique qui semble plutôt être couplée à celle des lipides plutôt qu'à celle de l'eau (31). Ainsi, il existe un *gradient de couplage* avec les mouvements dans l'eau d'hydratation à travers les différentes classes de protéines. L'intensité de ce couplage va croissant, en partant d'une protéine membranaire pour arriver à celui d'une protéine intrinsèquement désordonnée. La protéine globulaire présente un couplage intermédiaire. Les mesures de diffusion de neutrons sur la protéine Tau, à la fois sous sa forme hydratée mais aussi anhydre permettent de reformuler cette vision. Le solvant fait alors partie intégrante du système biologique, dans lequel chacun influence son partenaire. Concluons en remettant les protéines Tau et MBP0 dans leur contexte cellulaire. La flexibilité de la protéine Tau est à mettre en relation avec sa fonction de liaison aux microtubules. L'adaptation constante de la longueur des microtubules afin d'assurer la plasticité neuronale et ses multiples partenaires d'interaction se reflètent dans la dynamique de Tau. A l'inverse, la MBP0 se place dans une situation de désordre non physiologique et qui montre une dynamique encore plus élevée que celle de la Tau. On peut alors penser que l'on se place dans une situation où la fonction biologique "impose la valeur nécessaire et suffisante de la dynamique de la protéine". Les protéines dépliées par mutations en conditions natives présentent un "excès" de dynamique. Cela préfigure de l'accumulation de la protéine sous la forme de PHFs, de fibres amyloïdes ou encore d'agrégats dont la formation à l'équilibre thermodynamique nécessite une rapide interconversion entre les formes monomériques et oligomériques.

Résumé des résultats

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont les suivants :

- **Une augmentation d'un facteur deux dans la flexibilité d'une protéine intrinsèquement désordonnée par rapport à une protéine globulaire.** Les poudres d'IDPs déshydratées montrent une augmentation similaire de flexibilité par rapport à des poudres sèches de protéines globulaires.
- **Les mouvements de molécules d'eau dans la couche d'hydratation des IDPs sont plus contraints** comparée à ceux de l'eau dans la couche d'hydratation d'une protéine globulaire.
- **L'interaction entre une IDP et son eau d'hydratation est plus forte que dans un couple protéine globulaire/eau d'hydratation.**
- **Une protéine dépliée par mutations en conditions natives met en évidence une dynamique plus grande que celle d'une IDP.**

Perspectives

Cette étude de diffusion élastique de neutrons à $0.9 \mu\text{eV}$ de résolution sur les échantillons de Tau et MBP0 appelle des mesures complémentaires, en particulier :

- Les mesures de diffusion élastique sur les protéines désordonnées et leur eau d'hydratation n'ont concerné qu'une seule protéine, à savoir Tau. D'autres IDPs pourraient être étudiées par diffusion élastique de neutrons pour s'assurer de la pertinence de la conclusion quant à l'influence de l'état de repliement sur la dynamique vue par diffusion de neutrons.
- Des mesures de dynamique sur les formes agrégées des protéines Tau et MBP prendraient ici tout leur sens. La forme fibrillée de la protéine Tau et sa dynamique sera particulièrement pertinente. Cet échantillon est en cours de préparation et devrait être mesuré courant 2012.
- La nature des mouvements chez la protéine MBP0 est pour l'instant inconnue. Les dynamiques de la protéine Tau et MBP0 différant sensiblement l'une de l'autre, des données de diffusion quasi-élastiques à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$), à des températures inférieures à 260 K peuvent être collectées. Afin d'étudier la dynamique de la MBP0 à plus haute température, des mesures de diffusion élastique et quasi-élastique à basses résolutions ($80 \mu\text{eV}$) peuvent être de même envisagées.
- La deutération de la protéine MBP0 pourrait être envisagée (bien que probablement coûteuse en temps et en énergie, étant donné le protocole de purification et les quantités nécessaires) pour obtenir des informations sur l'eau d'hydratation des protéines dépliées par mutations en conditions natives. Cet échantillon pourrait être mesuré, par diffusion élastique et quasi-élastique, à basse et haute résolution.

Dynamique de la couche d'hydratation des protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées, par diffusion quasi-élastique de neutrons et spectroscopie Terahertz

Sommaire

4.1	Problématiques et motivations	81
4.2	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons de Tau et de MBP	82
4.2.1	Résultats et discussion	83
4.3	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à résolution intermédiaire (20 μeV) sur les échantillons de Tau et de MBP	89
4.3.1	Résultats et discussion	90
4.4	Spectroscopie d'absorption terahertz des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP	93
4.4.1	Résultats et discussion	95
4.5	Conclusion sur la dynamique fine de l'eau d'hydratation	96

CE CHAPITRE présente les résultats concernant la dynamique de la couche d'hydratation par diffusion quasi-élastique de neutrons à différentes résolutions. Les résultats obtenus par diffusion quasi-élastique seront analysés à la lumière de ceux obtenus par diffusion élastique dans le chapitre précédent.

4.1 Problématiques et motivations

Les déplacements carrés moyen extraits des mesures sur les échantillons deutérés ont permis de mettre en évidence des différences de comportement de l'eau d'hydratation autour des protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées. Il n'est cependant pas possible d'extraire une information fine sur la dynamique, en particulier de prévoir la nature et la géométrie de ces mouvements, avec simplement des mesures de diffusion élastique de neutrons telles qu'elles ont été présentées dans le chapitre précédent. Le but des mesures quasi-élastiques qui vont suivre sera d'explorer ces mouvements dans les couches d'hydratation des protéines et de les relier aux mesures élastiques afin de corrélérer l'augmentation des MSDs avec le changement de dynamique de l'échantillon. La modification de la nature du mouvement, ainsi que l'évolution des temps de corrélation avec la température, le tout à la lumière de la transition dynamique à 220-250 K et des mesures élastiques seront étudiés.

Nature du mouvement dans les couches d'hydratation des protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées Il est en effet supposé que la transition dynamique est intimement liée à l'apparition de mouvements diffusifs dans la couche d'hydratation (45, 46). En étudiant l'évolution du signal quasi-élastique en fonction de la température, il est possible d'esquisser une réponse à cette hypothèse. L'application des concepts présentés dans le paragraphe 2.2.2 permet d'extraire la nature du mouvement à partir des fits des spectres quasi-élastiques. L'étude des demi-largeurs à mi-hauteur (HWHM) $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction du carré du transfert de quantité de mouvement Q^2 nous renseigne sur le type de mouvements. On distingue les mouvements à *longue distance* dont la marque est une variation de $\Gamma(\mathbf{Q})$ avec Q^2 . Aux mouvements diffusifs seront opposés les mouvements *confinés* qui donnent $\Gamma(\mathbf{Q})$ indépendante de Q^2 comme principale caractéristique. Des mesures en dessous et au dessus de la température de la transition dynamique ont donc été réalisées afin d'étudier l'évolution des mouvements dans les couches d'hydratation des protéines Tau et MBP. A chaque température, une courbe de $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2 est obtenue, et selon la nature du mouvement, on peut extraire :

- Un coefficient de diffusion D et un temps de résidence τ d'une molécule d'eau pour des mouvements à *longue distance*. A noter que si mouvements à grandes distances il y a, ces derniers ne seront pas parfaitement diffusifs mais adopteront plutôt une dynamique fractionnée (modèle dit de *jump diffusion*), caractérisée par une diffusion libre (coefficient D), suivie d'une phase stationnaire pendant un temps τ . Ce type de mouvement se traduit par une loi du type

$$\Gamma(\mathbf{Q}) = \frac{DQ^2}{1 + DQ^2\tau} \quad (4.1)$$

sur $\Gamma(\mathbf{Q})$. A petites valeurs de Q^2 , la loi se réduit à $\Gamma(\mathbf{Q}) \sim DQ^2$ (diffusion libre). A grandes valeurs de Q^2 , on obtient $\Gamma(\mathbf{Q}) \sim 1/\tau$ (résidence pendant un temps τ , extrait à $Q=\infty$). Le fit de $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction Q^2 avec la relation (4.1) est réalisé sur toute la gamme de Q^2 et les deux paramètres sont extraits simultanément.

- Un temps de corrélation τ_c pour des mouvements *confinés*. Ces derniers donneront des demi-largeurs à mi-hauteur de la forme

$$\Gamma(\mathbf{Q}) = 1/(2\tau_c) \quad (4.2)$$

indépendantes de Q^2 . Le modèle (4.2) sera de même analysé sur toute la gamme de Q^2 .

Comparaison eaux d'hydratation des protéines globulaires/intrinsèquement désordonnées En reprenant les mesures élastiques sur les eaux d'hydratation (figures 4.1 et 3.10), on

peut observer un décalage en température de l'ordre de 10 K pour avoir des déplacements carrés moyens équivalents dans les couches d'hydratation des protéines Tau et MBP. La seconde motivation de ces mesures quasi-élastiques sera de voir si ce retard en température de la dynamique est associé à un phénomène physique particulier, qui serait absent dans l'eau d'hydratation de la protéine MBP ou inversement dans l'eau d'hydratation de Tau.

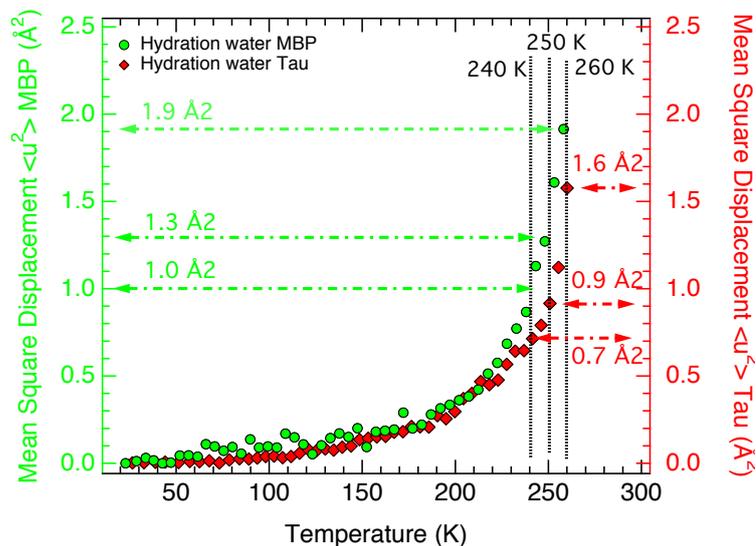


FIGURE 4.1 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur DTau (diamant rouge) et DMBP (rond vert), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.19\text{-}1.13 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau et DMBP. Les données de l'échantillon DMBP sont issues de (26). Mise en évidence des valeurs des MSDs de DTau et DMBP à 240, 250 et 260 K. Les données présentées sur ce graphes sont identiques à celles du graphe 3.10. IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

4.2 Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons de Tau et de MBP

La dynamique de l'eau dans les couches d'hydratation des protéines MBP et Tau a été étudiée par diffusion quasi-élastique de neutrons. Les mesures ont été effectuées à 240, 250 et 260 K. Ces trois températures permettent de sonder la dynamique autour de la transition dynamique. Au delà de 260 K, les mesures de diffusion élastique ont montrés que les temps de corrélation dans les couches d'hydratation des protéines Tau et MBP devenaient trop courts pour pouvoir être résolus par l'instrument.

Collecte des données Les mesures de diffusion incohérente quasi-élastique ont été réalisées sur le spectromètre à rétro-diffusion SPHERES (résolution de 0.6 μeV), au réacteur FRM2 (Garching, Allemagne). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. Les spectres quasi-élastiques à cette température ont été collectés pendant douze heures. Ces spectres serviront à la normalisation des mesures ultérieures. Par la suite, les spectres quasi-élastiques sont collectés à différentes températures, en moyenne pendant 10-12 h par température.

Traitement des données Les données sont traitées et analysées avec la procédure présentée dans la section 2.2.3. Un fit des spectres quasi-élastiques par une lorentzienne nous permet d'extraire pour

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION (0.6 μEV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

chaque température la dynamique moyenne ($\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2) de la molécule d'eau dans les couches d'hydratation.

Les différentes gammes en énergie utilisées pour les fits des spectres des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP sont les suivantes :

SPHERES	
Système	
DTau	-15.8/+15.6 μeV
DMBP	-15.0/+15.0 μeV

TABLE 4.1 – Gamme d'énergies utilisées pour les fits QENS sur les eaux d'hydratation de la MBP et de la Tau.

Analyse de $\Gamma(\mathbf{Q})$ Selon l'évolution de $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2 , déterminé par les fits des spectres (dont la qualité pourra être évaluée sur les figures 4.3 et 4.4), il sera utilisé une fonction de fit de *jump-diffusion* ou un fit indépendant de Q^2 .

Analyse des facteurs de structure incohérents élastiques (EISF) Les facteurs de structure incohérents élastiques extraits des intensités intégrées en énergie (section 2.2.2) seront décomposés en deux contributions, une fraction immobile de protons dans la protéine et une seconde, mobile, qui traduira la géométrie du mouvement. La fraction immobile sera modélisée par une constante p (valeur de l'EISF à grandes valeurs de \mathbf{Q}). La fraction mobile $A'_0(\mathbf{Q})$ sera, elle, analysée par une fonction de diffusion dans une sphère (95).

$$EISF(\mathbf{Q}) = A_0(\mathbf{Q}) = p + (1 - p)A'_0(\mathbf{Q}) = p + (1 - p) \left(\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right)^2 \quad (4.3)$$

avec $j_1(Qa) = \frac{\sin(Qa) - (Qa)\cos(Qa)}{(Qa)^2}$ une fonction de Bessel sphérique du premier ordre, représentative des mouvements diffusifs dans la sphère de rayon a .

4.2.1 Résultats et discussion

L'analyse de $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2 pour les eaux d'hydratation de la protéine MBP et Tau montre un changement de nature du mouvement autour de la transition dynamique (figure 4.2.A). En effet, à des températures de 240 K, les mouvements de l'eau apparaissent comme étant confinés ($\Gamma(\mathbf{Q})$ indépendant de Q^2) dans les deux échantillons. Les temps de corrélation τ_c associés sont respectivement de 719 ± 7 ps et 556 ± 15 ps pour Tau et la MBP. Les temps de corrélation de l'eau de la protéine Tau, 30% supérieurs à ceux de l'eau de la MBP, préfigurent du décalage en température de la dynamique observé par diffusion élastique. La transition semble se faire vers 250 K, là où les demi-largeurs à mi-hauteur commencent à présenter une variation en Q^2 . A 260 K, on observe une variation plus franche des $\Gamma(\mathbf{Q})$ avec Q^2 , ce qui traduit la pleine apparition de mouvements diffusifs dans les deux couches d'hydratation. Cette diffusion de la molécule d'eau à 260 K se fait avec des coefficients de $1.31 \pm 0.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'eau de la protéine Tau. Dans le cas de l'eau de la protéine MBP, le coefficient de diffusion obtenu est $1.48 \pm 0.23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les coefficients extraits des fits ne montrent pas de différences significatives. Les temps de résidence, de 349 ± 9 ps pour l'eau de la protéine Tau et 306 ± 10 ps pour l'eau de la MBP exprime par contre

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

le décalage en température observé par diffusion élastique, avec des temps de résidence de la protéine Tau 15% plus longs à 260 K. On peut aussi remarquer de plus que les temps de résidence de l'eau de la MBP obtenus à 250 K (365 ± 26 ps) sont équivalents à ceux obtenus à 260 K pour l'eau de Tau (349 ± 9 ps). La dynamique de l'eau de la Tau est donc équivalente à celle de l'eau de la MBP 10 K au dessus (tableau 4.2, valeurs en gras), toujours en accord avec les mesures élastiques.

Reprenons les deux motivations associées à ces mesures, à savoir la nature du mouvement dans les couches d'hydratation et la dynamique associée à des températures inférieures et supérieures à celle de la transition dynamique (220 K) et les différences de comportement entre l'eau d'hydratation des protéines intrinsèquement désordonnées et celle des protéines globulaires.

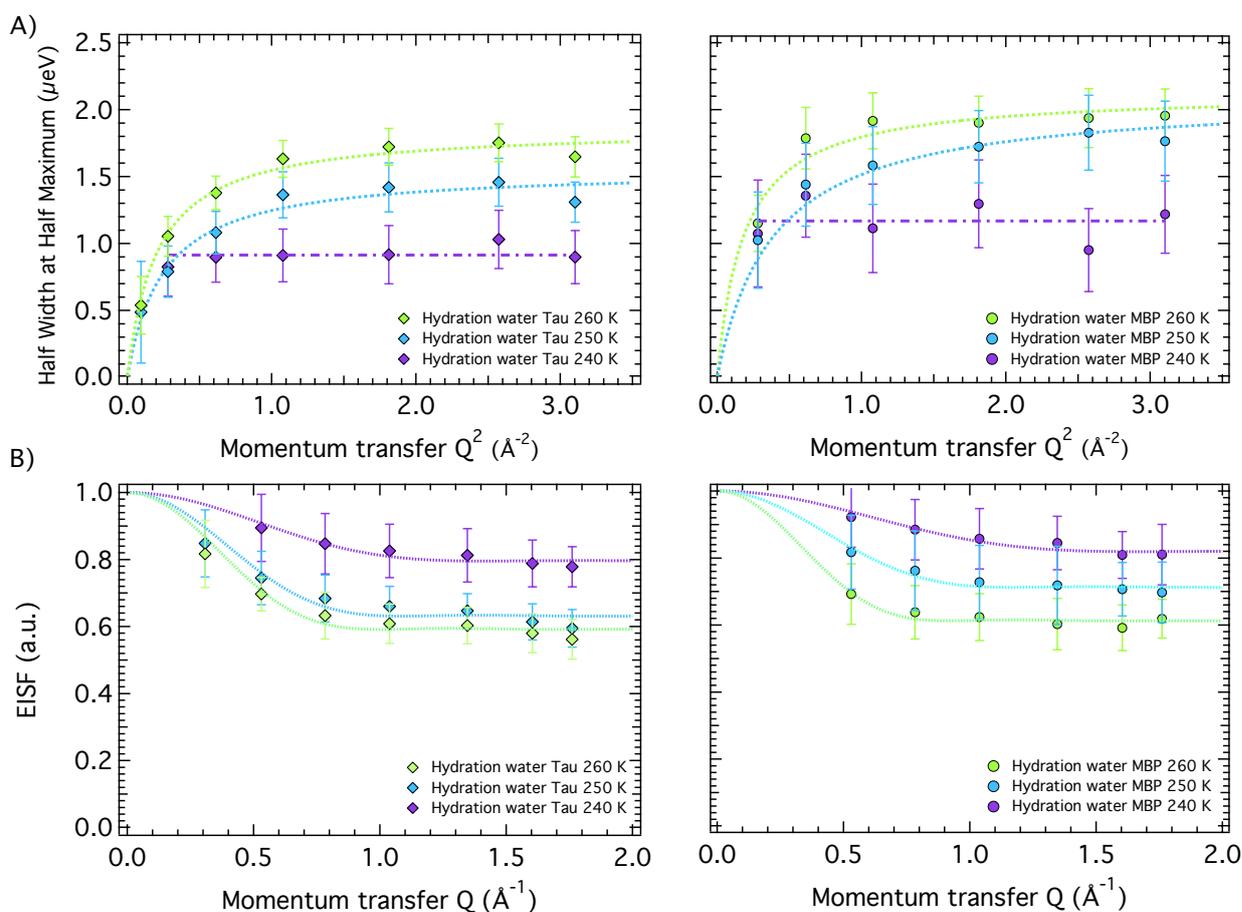


FIGURE 4.2 – A) Demi-largeurs à mi-hauteur en fonction de Q^2 issues des fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation des protéines Tau (figure de gauche) et MBP (figure de droite), à 240 K (violet), 250 K (bleu) et 260 K (vert). B) Facteurs de structure incohérents élastiques (EISF) en fonction de Q issus des fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation des protéines Tau (figure de gauche) et MBP (figure de droite), à 240 K (violet), 250 K (bleu) et 260 K (vert). Fit d'une lorentzienne et d'un pic de Dirac, convolués avec la résolution à 20 K. SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

Les mesures précédentes permettent d'apporter une première réponse à ces questions :

- Par des simulations de dynamique moléculaire, il a été suggéré que l'apparition d'une transition

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE RÉSOLUTION (0.6 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

dynamique était associée à des mouvements diffusifs dans la couche d'hydratation (45, 46, 96). Les résultats obtenus par diffusion quasi-élastiques à 0.6 μeV illustrent cet effet, en mettant en évidence un changement de nature des mouvements, avant et après la transition dynamique. Ces observations constituent la première preuve expérimentale que la transition dynamique d'une protéine est couplée au démarrage de la diffusion translationnelle de l'eau.

- o Attardons nous sur la deuxième motivation de ces mesures, à savoir les différences de comportement de l'eau dans les couches d'hydratation des protéines intrinsèquement désordonnées et globulaires. Les mesures quasi-élastiques font écho à ce qui a été observé par diffusion élastique de neutrons et mettent en évidence le fait que les couches d'hydratation de la protéine Tau et MBP ne sont pas dynamiquement équivalentes l'une par rapport à l'autre. Un décalage d'une dizaine de Kelvin est nécessaire pour que la dynamique de l'eau de Tau soit similaire, en terme de MSDs, à celle de la MBP. Les mesures quasi-élastiques reproduisent ce décalage. A noter cependant que tous les paramètres dynamiques extraits des fits ne reflètent pas clairement cette tendance. La différence dans les coefficients de diffusion est faible. Cet effet de décalage en température ne semble donc pas trouver son origine dans une modification de la dynamique à grandes distances (diffusion libre, à faibles valeurs de Q) mais plutôt dans les mouvements de plus petites amplitudes (temps de résidence, à grandes valeurs de Q). On a pu constater en effet que les temps de résidence différaient de manière significative, avec une augmentation de l'ordre de 15% pour celui de l'eau autour de Tau.

	DTau			DMBP		
	D ($10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	τ (ps)	τ_c (ps)	D	τ	τ_c
Températures						
260 K	1.31±0.14	349±9	...	1.48±0.23	306±10	...
250 K	1.10±0.18	426±18	...	1.08±0.17	365±26	...
240 K	719±7	556±15

TABLE 4.2 – Coefficients de diffusion D, temps de résidences τ et temps de corrélation τ_c associés, issus des fits réalisés sur les spectres des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP. Les valeurs mises en gras montrent les valeurs des temps de résidences similaires à 10 K de différence. SPHERES, FRM2, résolution 0.6 μeV .

On observe de plus une modification de la dynamique de l'eau autour des protéines par rapport à la dynamique de l'eau libre. Les résultats sont à comparer à ceux de la diffusion de l'eau libre à 250 K, avec un coefficient de diffusion de l'ordre de $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (50, 97). Cette comparaison donne un ralentissement d'un facteur cinq pour la diffusion de l'eau autour des protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées. Les valeurs à 298 K obtenues sur un échantillon deutéré de C-Phycocyanine font état d'un ralentissement proche d'un facteur deux par rapport à l'eau libre à la même température (52).

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION (0.6 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

Contexte			D ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	τ (ps)	
Solvant	Eau pure 253 K (50) QENS 100 μeV		4.3	22.7	
	Eau pure 261 K (50) QENS 100 μeV		6.3	7.63	
Protéine globulaire	DMBP 250 K QENS 0.6 μeV		...	365	
	DMBP 260 K QENS 0.6 μeV		1.5	305	
	Protéine désordonnée	DTau 250 K QENS 0.6 μeV		1.1	426
		DTau 260 K QENS 0.6 μeV		1.3	349

TABLE 4.3 – Paramètres de la dynamique de l’eau dans différents contextes biologiques et environnements. En italique, les résolutions des instruments de diffusion de neutrons utilisés. D : coefficient de diffusion. τ_0 : temps de résidence.

Les EISF extraits des intensités intégrées (figure 4.2.B) et fittés avec un modèle de diffusion dans une sphère permettent d’extraire un rayon de diffusion a et une fraction de protons immobiles p pour chaque température (tableau 4.4). Les niveaux à grandes valeurs de Q (fraction d’atomes immobiles) sont à peu près équivalents pour les deux eaux d’hydratations, à 240 K et à 260 K. Seuls les niveaux à grands Q à 250 K sont sensiblement différents d’un échantillon à l’autre. L’un montre une variation monotone avec l’augmentation de la température (DMBP), le second (DTau) montre une variation plus brusque lors du passage 240-250 K. Les barres d’erreurs élevées ne permettent pas de conclure quant à cet effet dans l’échantillon DMBP à 250 K. Les mesures d’EISF ne semblent pas montrer de manière générale des différences significatives entre les deux eaux d’hydratation, en terme d’amplitude de diffusion ou encore de fractions de protons immobiles.

Températures	DTau		DMBP	
	a (Å)	p (a.u)	a	p
260 K	4.49 \pm 0.33	0.59 \pm 0.01	4.90 \pm 0.29	0.61 \pm 0.01
250 K	4.14 \pm 0.41	0.63 \pm 0.01	3.83 \pm 0.23	0.71 \pm 0.01
240 K	3.17 \pm 0.27	0.79 \pm 0.01	2.68 \pm 0.23	0.82 \pm 0.01

TABLE 4.4 – Rayons de diffusion a et population immobile p associés, issus des fits réalisés sur les EISF des couches d’hydratation des protéines Tau et MBP. SPHERES, FRM2, résolution 0.6 μeV .

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

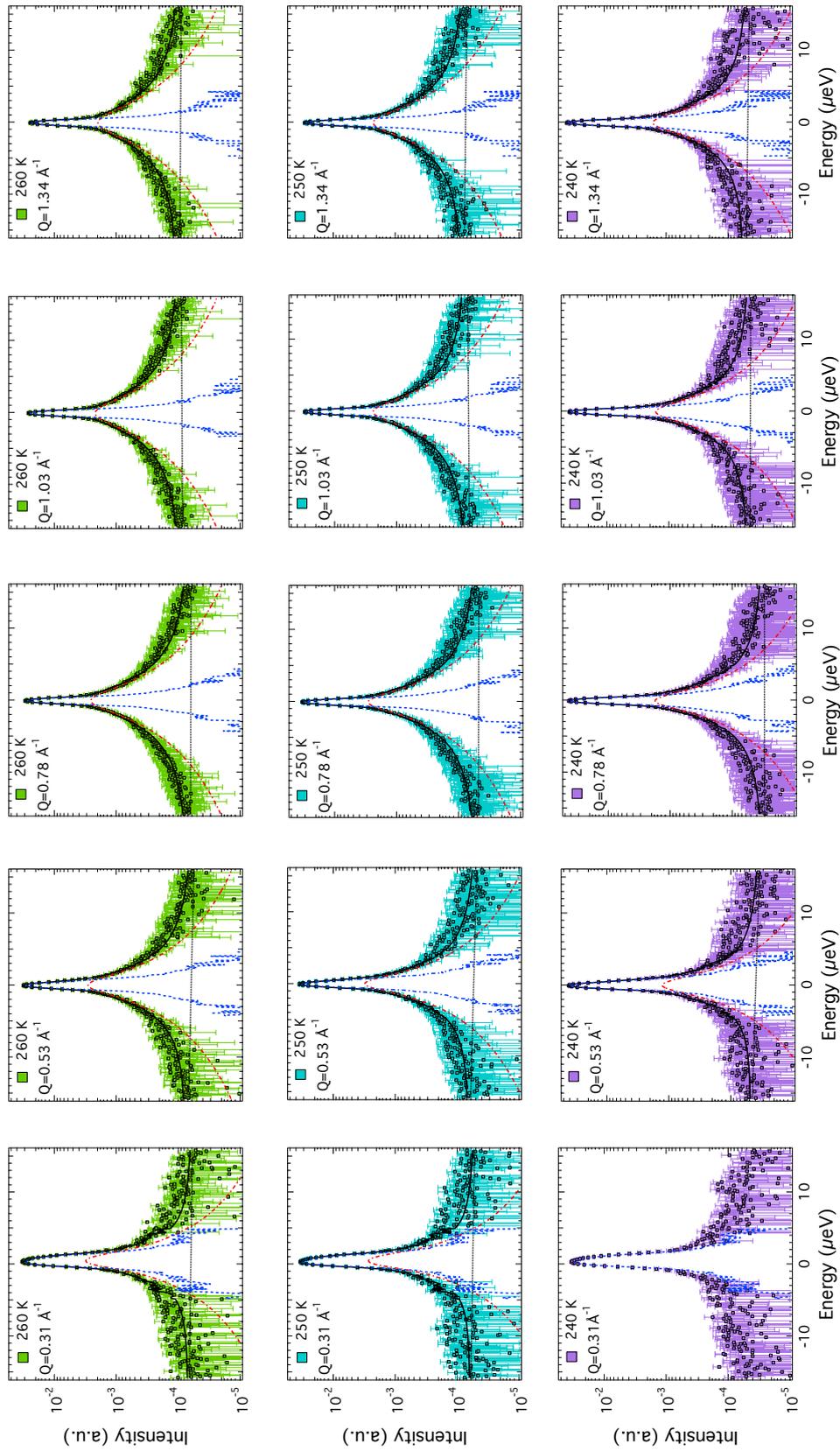


FIGURE 4.3 – Fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation de la protéine Tau à 240 K (figures inférieures), 250 K (figures intermédiaires) et 260 K (figures supérieures), à $Q = 0.31, 0.53, 0.78, 1.03$ et 1.34 \AA^{-1} (figures de gauche à droite). Données : carrés plein. Fit total : trait plein noir. Lorentziennes : tirets rouges. Pic de Dirac : tirets bleus. Convolution avec la résolution à 20K et ajout d'un bruit de fond (pointillés noirs). La barre d'erreur correspond à la racine du nombre de neutrons à une énergie donnée. SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

4.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

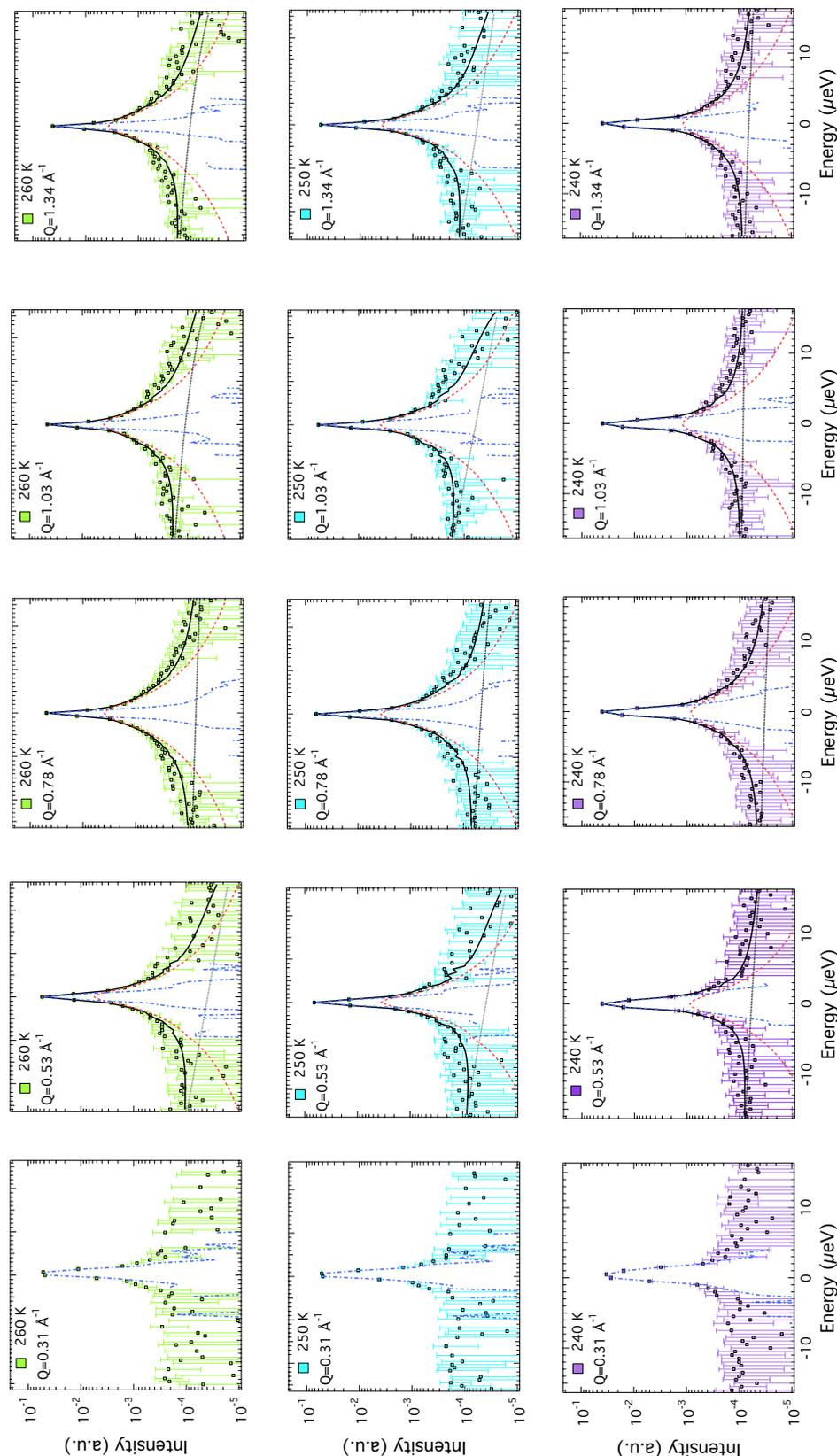


FIGURE 4.4 – Fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation de la protéine MBP à 240 K (figures inférieures), 250 K (figures intermédiaires) et 260 K (figures supérieures), à $Q = 0.31, 0.53, 0.78, 1.03$ et 1.34 \AA^{-1} (figures de gauche à droite). Données : carrés plein. Fit total : trait plein noir. Lorentziennes : tirets rouges. Pic de Dirac : tirets bleus. Convolution avec la résolution à 20K et ajout d'un bruit de fond (pointillés noirs). La barre d'erreur correspond à la racine du nombre de neutrons à une énergie donnée. SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

4.3 Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à résolution intermédiaire (20 μeV) sur les échantillons de Tau et de MBP

Les résultats des sections précédentes ont montré que la dynamique et la géométrie du mouvement de l'hydrogène dans la couche d'hydratation évoluait avec la température. A une géométrie confinée succède une diffusion à longue distance, pour des résolutions de l'ordre de 0.6 μeV (résolution temporelle de 1 ns). Il n'est cependant pas possible d'aller au delà de 260 K à cette échelle de temps. En effet, pour des températures supérieures à 260 K, la dynamique de l'eau devient trop rapide pour le spectromètre (figure 3.10). Des mesures quasi-élastiques à des résolutions plus faibles ont donc été effectuées pour extraire la dynamique des couches d'hydratations à plus hautes températures (260, 270 et 290 K en particulier).

Collecte des données Les mesures de diffusion incohérente quasi-élastique ont été réalisées sur le spectromètre à temps-de vol IN5, ILL La longueur d'onde, choisie à 8 Å permet d'obtenir une résolution de 20 μeV . Cette dernière est associée à des temps de corrélation de l'ordre de 30 ps. L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. Les spectres quasi-élastiques à cette température ont collectée pendant 1 heure. Ces spectres serviront à la normalisation des mesures ultérieures. Par la suite, les spectres quasi-élastiques sont collectés à différentes températures (260, 270 et 290 K), en moyenne pendant 1 h par température.

Traitement des données Les données sont traitées et analysées avec la procédure présentée dans la section 2.2.3. Un fit des spectres quasi-élastiques par une lorentzienne nous permet d'extraire pour chaque température la dynamique moyenne ($\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2) de la molécule d'eau dans les couches d'hydratation.

L'utilisation d'une longueur d'onde de 8 Å donne les caractéristiques suivantes pour l'instrument (tableau 4.5)

		IN5
Paramètres		
	Longueur d'onde	8 Å
	Résolution	20 μeV
	Temps carac.	~ 30 ps
	Q_{max}	1.43 Å ⁻¹
	Gamme d'énergie de mesure	-371/+0.7 meV

TABLE 4.5 – Longueur d'onde, temps caractéristique, gamme de transfert de quantité de mouvement et gamme d'énergie accessible avec la configuration de l'instrument pour les mesures de diffusion quasi-élastique.

A la différence d'un spectromètre à rétro-diffusion, qui collecte les spectres dans une gamme d'énergie forcément plus petite que celle qui définit la zone quasi-élastique ($\Delta E < \pm 1.5$ meV), un spectromètre à temps de vol acquiert des spectres sur une gamme d'énergies typique de -300 meV/+1 meV. Il est donc nécessaire de restreindre la gamme d'étude du spectre pour avoir un signal purement quasi-élastique. Dans notre cas, les gammes suivantes ont été sélectionnées (tableau 4.6).

4.3. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À RÉOLUTION
INTERMÉDIAIRE (20 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

IN5	
Système	
DTau	-0.90/+0.40 meV
DMBP	-0.90/+0.40 meV

TABLE 4.6 – Gamme d’énergies utilisées pour les fits QENS sur les eaux d’hydratation de la MBP et de la Tau.

Analyse des HWHM et des EISF Selon l’évolution des HWHM en fonction de Q^2 , déterminée par les fits des spectres (dont la qualité pourra être évaluée sur la figure 4.6), on utilisera une fonction de fit de *jump-diffusion* ou un fit constant en Q^2 . Les EISF extraits des intensités intégrées en énergie ne seront analysés qu’en terme de fraction d’atomes immobiles, pour des raisons de statistique sur les mesures à basses valeurs de Q . Les rayons de diffusion ne seront donc pas extraits.

4.3.1 Résultats et discussion

Les demi-largeurs à mi-hauteur obtenues avec un fit d’une lorentzienne des spectres montrent une variation en fonction de Q^2 (figure 4.5), ce qui indique clairement la présence de mouvements diffusifs dans les couches d’hydratation des protéines Tau et MBP. Les fits avec un modèle de *jump-diffusion* des demi-largeurs à mi-hauteur donnent respectivement des coefficients de diffusion de $4.92 \pm 0.44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $5.19 \pm 0.28 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour l’eau de la protéine Tau et MBP. Les temps de résidence correspondant sont $14.9 \pm 2.0 \text{ ps}$ et $11.3 \pm 1.7 \text{ ps}$ (valeurs résumées dans le tableau 4.7). Les coefficients de diffusion ne montrent pas de différences significatives pour l’eau de la Tau et de la MBP. Les temps de résidence de l’eau de la MBP, par contre, mettent en évidence des valeurs 30% plus faibles par rapport à ceux de l’eau de la Tau (l’ensemble de ces valeurs est résumé dans les tableaux 4.8 et 4.7). Si on compare le coefficient de diffusion de l’eau libre à 290 K, à savoir $\sim 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, à ceux obtenus pour les deux protéines, on constate que l’eau d’hydratation est ralentie d’un facteur quatre autour des deux protéines à la résolution de 20 μeV . On remarque, en comparant les temps de résidence à 260 et 270 K (tableau 4.7, valeurs en gras) ainsi que les niveaux des HWHM, que la dynamique de l’eau de la protéine Tau à 270 K est équivalente à celle de l’eau de la MBP à 260 K, faisant apparaître le décalage de 10 K précédemment observé, à la fois sur les MSDs (figure 3.10) et sur les mesures quasi-élastiques à 0.6 μeV (tableau 4.2).

4.3. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À RÉOLUTION INTERMÉDIAIRE (20 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

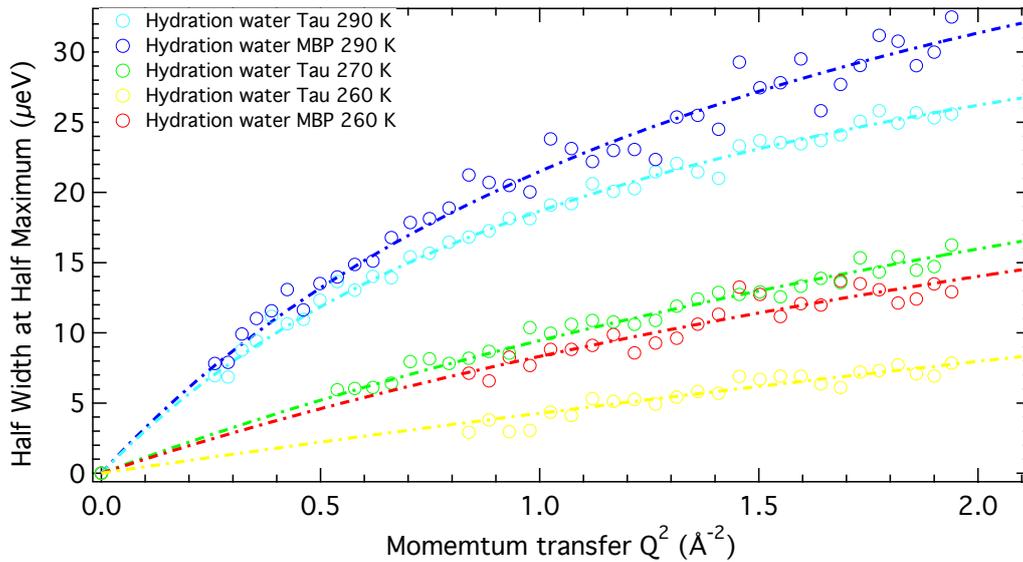


FIGURE 4.5 – Demi-largeurs à mi-hauteur (HWHM) en fonction de Q^2 issues des fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP à 290 K. Fit d'une lorentzienne et d'un pic de Dirac, convolués avec la résolution à 20 K. IN5, ILL, résolution 20 μeV

	DTau		DMBP	
	D ($10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	τ (ps)	D	τ
Températures				
290 K	4.92±0.44	14.9±0.8	5.19±0.28	11.3±1.0
270 K	1.18±0.27	27.3±3.4
260 K	1.55±0.36	32.9±2.8

TABLE 4.7 – Coefficients de diffusion et temps de résidences associés, issus des fits réalisés sur les spectres des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP. IN5, ILL, 20 μeV résolution.

Le modèle de diffusion dans une sphère, appliqué aux EISF permet d'obtenir des fractions de protons immobiles dans les couches d'hydratation de Tau et MBP proches de 0.6 à 290 K. Les fits des spectres à basses valeurs de Q n'ayant pu être effectués (signal quasi-élastique trop étroit en dessous de 0.8 \AA^{-1}), il n'a pas été possible d'obtenir les valeurs des rayons de diffusion. Ici encore, les EISF ne montrent pas de différences particulières entre les deux couches d'hydratation.

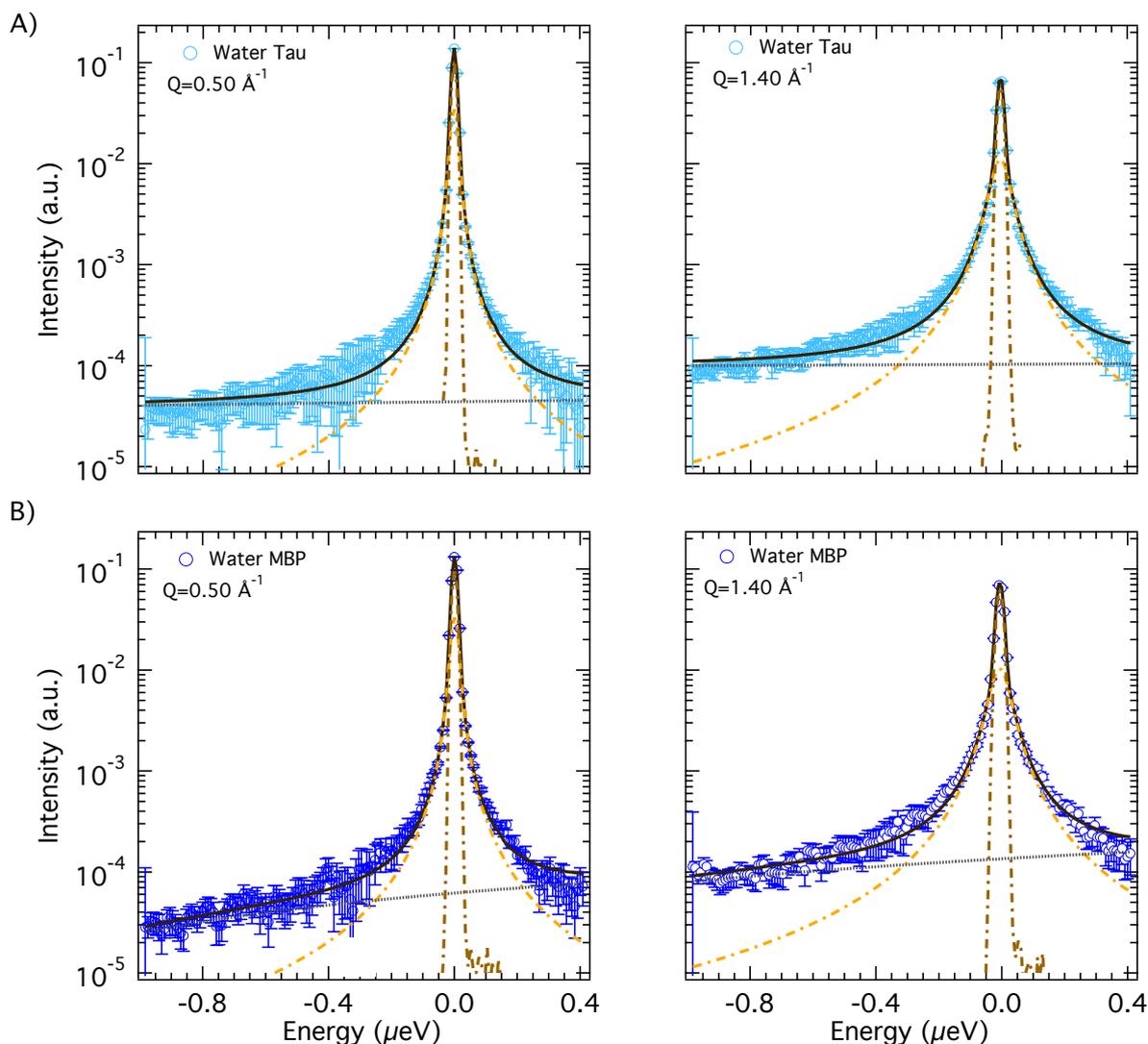


FIGURE 4.6 – A) Fits des spectres quasi-élastiques de la couche d’hydratation de la protéine Tau à 290 K, à $Q=0.50 \text{ \AA}^{-1}$ et $Q=1.40 \text{ \AA}^{-1}$. B) Fits des spectres quasi-élastiques de la couche d’hydratation de la protéine MBP à 290 K, à des valeurs de Q égales à 0.50 \AA^{-1} et 1.40 \AA^{-1} . Données : diamant plein gris (Tau) et diamant ouverts gris (MBP). Fit total : trait plein noir. Lorentzienne : trait plein gris. Pic de Dirac : tirets gris. Convolution avec la mesure à 20 K et ajout d’un bruit de fond (pointillés gris). IN5, ILL, résolution 20 μeV

Contexte		D ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	τ (ps)
Solvant	Eau pure 293 K (50) QENS 100 μeV	22.3	1.25
	Protéines globulaires		
Protéine désordonnée	C-Phycocyanine 298 K (52) QENS 28 et 96 μeV	12.0	6.6
	DMBP 290 K QENS 20 μeV	5.2	11.3
	DTau 290 K QENS 20 μeV	4.9	14.9

TABLE 4.8 – Paramètres de la dynamique de l'eau dans différents contextes biologiques et environnements. En italique, les résolutions des instruments de diffusion de neutrons utilisés. D : coefficient de diffusion. τ : temps de résidence.

4.4 Spectroscopie d'absorption terahertz des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP

La dynamique et la géométrie de la couche d'hydratation autour des protéines désordonnées a été de même caractérisée par spectroscopie terahertz. A l'inverse de la spectroscopie neutronique, qui mesure la dynamique individuelle de l'atome d'hydrogène, la spectroscopie terahertz mesure la dynamique collective d'un ensemble de molécules.

La spectroscopie terahertz (THz) est une spectroscopie d'absorption qui se caractérise par des rayonnements de longueurs d'ondes entre le mm et la dizaine de microns. Cette gamme de longueurs d'onde correspond à des fréquences allant de la centaine de GHz à 30 THz et des énergies allant de la centaine de μeV à la centaine de meV. A ces longueurs d'ondes, l'eau absorbe fortement le rayonnement (coefficient d'absorption de l'ordre de 400 cm^{-1}), ce qui en fait une technique très sensible à la présence d'eau. Elle est donc particulièrement adaptée à l'étude de l'eau dans un contexte biologique.

L'expérience consiste en la mesure d'un coefficient d'absorption de la solution de protéine $\alpha(c)_{\text{solution}}$ en fonction de sa concentration. En parallèle est effectuée la mesure d'absorption du solvant $\alpha(c)_{\text{tampon}}$. La protéine a la particularité de ne pas absorber le rayonnement THz, à l'inverse de la couche d'hydratation. Une mesure de la solution de protéine à laquelle on soustraira une mesure du solvant donnera l'absorption de la couche d'hydratation. Les écarts entre l'absorption du solvant et de la couche d'hydratation sont cependant faibles, avec $\alpha(c)_{\text{hydratation shell}} - \alpha(c)_{\text{tampon}}$ de l'ordre de 10-20 cm^{-1} , ce qui justifie la nécessité d'avoir des sources THz puissantes.

$$\Delta\alpha = \alpha(c)_{\text{hydratation shell}} = \alpha(c)_{\text{solution}} - \alpha(c)_{\text{tampon}} \quad (4.4)$$

Dans notre cas, l'information qui en est retirée est essentiellement géométrique. L'absorbance en fonction de la concentration en protéine reflète le "volume total" des couches d'hydratation dans la solution (somme des volumes de chaque couche d'hydratation)¹. A basses concentrations de protéine,

1. On suppose que la protéine est entourée d'une unique couche d'hydratation dont le volume ne dépend que de

peu de couches d'hydratations sont présentes dans la solution, ce qui ne génère qu'un faible écart d'absorption entre le solvant et la solution. Plus la concentration augmente et plus le volume total de couche d'hydratation augmente. L'écart d'absorption augmente donc progressivement jusqu'à atteindre un maximum c^* qui correspond à un début de pénétration des couches d'hydratation (figure 4.7). Au delà de cette concentration critique, les couches d'hydratation s'interpénètrent de plus en plus, ce qui amène le rayonnement à voir un volume plus faible. On assiste alors à une redescende de l'absorption. L'étude de la forme de la courbe et de la concentration critique c^* permet de renseigner sur l'extension de la couche d'hydratation. Le travail présenté dans (11) met en évidence autour des protéines des couches d'hydratation de l'ordre de 10\AA , 10\AA dans lesquels les propriétés dynamiques du solvant diffèrent de l'eau libre.

A noter que la définition de la couche d'hydratation prise dans le contexte de la spectroscopie terahertz est différente de celle prise pour la diffusion de neutrons. La spectroscopie terahertz se base sur le comportement collectif de l'eau par rapport à l'eau libre, là où les neutrons considèrent la couche d'hydratation comme la quantité d'eau minimale à apporter au système pour que celui-ci soit dynamique et fonctionnel.



FIGURE 4.7 – Influence de la concentration de protéine sur l'absorption THz par les couches d'hydratation (sphères violettes). Au delà d'une concentration critique de protéine, les couches d'hydratation s'interpénètrent, ce qui fait baisser l'absorption du rayonnement terahertz. Image extraite de (98) et modifiée.

Le montage expérimental (figure 4.8) se base sur un laser au germanium (99) permettant de générer des impulsions dans la gamme du terahertz. Ces impulsions vont traverser alternativement l'échantillon et le tampon, pour être mesurées par un bolomètre après traversée de l'échantillon.

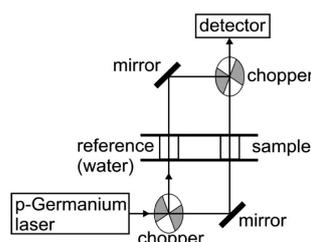


FIGURE 4.8 – Principe d'une mesure de spectroscopie terahertz. La mesure de l'absorption de l'échantillon se fait en parallèle de celle du solvant. La température de l'échantillon est maintenue à $20\text{ }^\circ\text{C}$ en utilisant un module Peltier. L'humidité mesurée à proximité de l'échantillon est de l'ordre de 8%, afin d'éviter toute absorption venant de l'humidité ambiante. Figure extraite de (100).

Influence de la nature de la macromolécule biologique Des études sur l'état de repliement d'une protéine et son influence sur l'absorption du spectre terahertz ont montré de grandes variations, selon son état de repliement. En travaillant sur un domaine d'une protéine native (le répresseur λ), dénaturée par pH, les auteurs de (101) ont montré que l'absorption venait à baisser avec le

la nature de la protéine et du tampon. On supposera de plus que le volume d'une couche d'hydratation ne varie pas avec l'augmentation de la concentration de protéine.

déplie de la protéine. La protéine native a montré le comportement décrit ci-dessus, avec un maximum d'absorption suivi d'une décroissance avec l'augmentation de la concentration. La protéine dénaturée ne fait pas apparaître ce maximum et sur toute la gamme de concentrations montre une décroissance monotone de $\Delta\alpha$. Ce comportement indique que la couche d'hydratation des protéines dénaturées diffère fortement de celle des protéines natives. Il a été postulé que le changement de nature de la couche d'hydratation s'accompagne d'une baisse de son coefficient d'absorption, à telle point qu'elle devient invisible. L'ajout de molécules de protéines dénaturées ne faisait que diluer le système aux yeux du rayonnement terahertz, ce qui explique la baisse monotone de $\Delta\alpha$. Le but de cette étude est de mesurer l'évolution du coefficient d'absorption en fonction de la concentration chez la protéine Tau, afin de comparer les résultats obtenus sur la protéine dépliée par pH. L'attention sera donc portée sur le caractère natif ou non du désordre et voir ainsi son impact sur la dynamique de la couche d'hydratation. Le point de comparaison avec une protéine soluble a été fait avec la protéine MBP.

4.4.1 Résultats et discussion

Les mesures ont été effectuées en collaboration avec **Gudrun Niehues** et **Martina Havenith**, de la *Ruhr-Universität Bochum*, Allemagne, au laboratoire de physique et de chimie II.

Les mesures ont été effectuées sur des gammes de concentrations de 1 mg/ml (0.022 mM) à 45 mg/ml (1 mM) pour la protéine Tau et de 1 mg/ml (0.025 mM) à 110 mg/ml (2.75 mM) pour la protéine MBP, dans un tampon 0.5 M acétate d'ammonium. Les résultats obtenus (figure 4.9) sur la protéine MBP semblent mettre en évidence aux basses concentrations (<5 mg/ml) une augmentation du coefficient, quoique peu prononcée, pour ensuite rebaisser aux plus hautes concentrations (>10 mg/ml) et ce jusqu'à la plus haute concentration mesurée (110 mg/ml).

Dans le cas de la protéine Tau, il semble plus difficile de distinguer une variation du coefficient d'absorption pour des concentrations inférieures à 30 mg/ml. La baisse devient significative à partir de cette concentration. A noter que les mesures à hautes concentrations (>10 mg/ml) présentées sur la figure 4.9 (à la fois pour la MBP et la Tau) n'ont pas été répétées. Si il s'avère qu'après une seconde mesure à 45 mg/ml pour la protéine Tau, la différence d'absorption est proche de zéro cm^{-1} (au lieu de -10 cm^{-1}), on conclura que l'interaction entre la protéine Tau et l'eau fait baisser la densité de la couche d'hydratation, ce qui la rend invisible au rayonnement terahertz. S'il s'avère que la première mesure à 45 mg/ml pour la protéine Tau est pertinente, on viendra à conclure que la protéine Tau possède une couche d'hydratation, dynamiquement équivalente à celle de la MBP. Dans les deux cas, la mesure sur la protéine Tau se démarque de celle obtenue sur le répresseur λ dénaturé, qui a montré une baisse systématique d'absorption de la couche d'hydratation avec l'augmentation de la concentration de protéine.

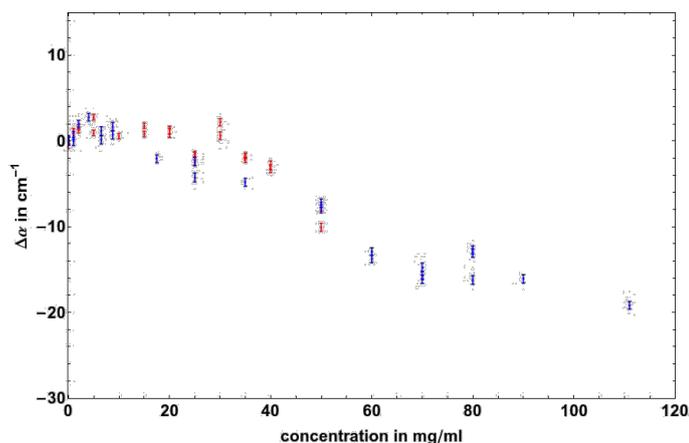


FIGURE 4.9 – Evolution du coefficient d’absorption $\Delta\alpha$ de la couche d’hydratation en fonction de la concentration de la protéine Tau (rouge) et MBP (bleu). L’absorption de référence s’est faite avec le tampon, à savoir 0.5 M ammonium acétate.

Les mesures actuelles ne permettent pas de conclure quant à la nature de la couche d’hydratation de la protéine Tau en solution mais semblent indiquer qu’une protéine intrinsèquement désordonnée en solution diffère d’une protéine dénaturée. Ces protéines dénaturées ne font en effet pas apparaître une couche d’hydratation suffisamment dense pour être observée par absorption THz. Ces conclusions sont cependant à prendre avec précautions, l’influence de la nature du solvant nous étant inconnue, de même que la reproductibilité des mesures ou encore l’effet de taille de la protéine.

4.5 Conclusion sur la dynamique fine de l’eau d’hydratation

Les mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons à basses températures (<260 K) effectuées à des résolutions de $0.6 \mu\text{eV}$ ont permis de clarifier la nature du mouvement dans les couches d’hydratation. Des températures de 240 K ne permettent pas une diffusion translationnelle des molécules d’eau, ce qui se traduit par des demi-largeurs à mi-hauteur indépendantes du transfert de quantité de mouvement (pas de déplacement du centre de masse). Une vingtaine de Kelvin au dessus (~ 260 K), les demi-largeurs à mi-hauteur se révèlent dépendre de Q^2 , impliquant l’apparition d’un mouvement de diffusion translationnelle. Cette diffusion de l’eau autour de la protéine semble se faire cependant avec des valeurs inférieures à celles de la diffusion de l’eau libre à même température. On observe en moyenne un ralentissement de l’ordre d’un facteur quatre. Ce comportement est conservé, même à plus hautes températures (290 K), là où des résolutions plus faibles sont nécessaires pour mesurer la dynamique associée. Le paysage énergétique d’une protéine intrinsèquement désordonnée complexifie la relation que l’eau entretient avec sa protéine. La nature hautement hydrophile et chargée de la surface de Tau module l’interaction que la protéine développe avec son eau d’hydratation, ce qui se traduit par un ralentissement supérieur de la dynamique de l’eau de Tau, comparé à celle de la MBP.

A la lumière de la nature de la surfaces des protéines, il est possible d’esquisser une explication concernant la dynamique des couches d’hydratation. En effet, les surfaces des protéines se démarquent de manière significative de ce que voit une molécule d’eau unique dans une solution. Autour d’une protéine, une molécule verra un ensemble de charges, négatives ou positives, qui elles même côtoient des groupements hydrophiles et hydrophobes. Cet ensemble forme un paysage énergétique plus varié que celui d’une solution d’eau pure. La présence en particulier de ces charges (groupements amine ($-\text{NH}_3^+$) des lysines ou carboxyle ($-\text{COO}^-$) des acides glutamiques) et des grou-

pements hydroxyles (-OH) va permettre une interaction plus forte avec les molécules d'eau de la couche d'hydratation, augmentant le temps de vie d'une liaison hydrogène avec ces groupements (-H₂N...HOH ou -HO...HOH) . L'eau sera de même impliquée dans la solvataion des charges de surface, ce qui peut conduire à une diminution de sa dynamique (augmentation des temps de corrélation et une diminution de l'amplitude des mouvements).

Les surfaces des protéines intrinsèquement désordonnées ont la particularité de refléter la composition moyenne de toute la protéine, l'absence plus ou moins partielle de structure rendant la majorité des acides aminés exposés au solvant. Des calculs d'accessibilité au solvant montrent que la surface accessible au solvant augmentait d'un facteur trois pour les protéines désordonnées (Kathleen Wood, communication personnelle). Cette différence d'exposition au solvant peut expliquer la différence de comportement entre les eaux d'hydratation des protéines globulaires et celles des protéines désordonnées. La présence accrue de charges et de groupements hydrophiles à la surface de la protéine entrave le mouvement de la molécule d'eau, ce qui se traduit par un temps de résidence plus élevé pour l'eau autour de la protéine Tau.

	Eau libre		
	250 K	260 K	290 K
Ralentissement de l'eau d'hydratation			
C-Phycocyanine (52)	~1.8
MBP	...	~4.2	~4.3
Tau	~4	~4.8	~4.6

TABLE 4.9 – Facteur de ralentissement de l'eau d'hydratation autour des protéines MBP et Tau, comparé à l'eau libre à la même température.

Les résultats obtenus pour Tau sont à mettre en lien avec le couplage étroit observé entre une protéine et sa couche d'hydratation. L'expression de ce couplage peut trouver à travers ces mesures une valeur quantitative. Là où des mesures RMN du solide sur les couches d'hydratation de protéines intrinsèquement dépliées mettent en évidence des énergies d'activation de l'ordre de 50% supérieures à celles mesurées pour des protéines globulaires (74), les neutrons eux expriment ce couplage avec des temps de résidence 30% plus longs que ceux obtenues pour une protéine globulaire.

Résumé des résultats

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont les suivants :

- **La transition dynamique observée à 220 K par diffusion élastique de neutrons dans la couche d'hydratation s'accompagne d'un changement de la nature des mouvements de la molécule d'eau, passant d'un mouvement confiné avant la transition à un mouvement diffusif au dessus de la transition.** Cet effet est observé dans les eaux d'hydratation des IDPs et des protéines globulaires.
- **L'eau d'hydratation est ralentie d'un facteur quatre par rapport à l'eau libre**, à la fois pour les protéines globulaires et intrinsèquement désordonnées.
- **L'eau d'hydratation de l'IDP est ralentie de 30% (temps de résidence 30% plus longs) par rapport à celle de la protéine MBP**, en accord qualitatif avec les mesures élastiques.
- **Les mesures d'absorption terahertz indiquent que la couche d'hydratation d'une IDP diffère sensiblement de celle d'une protéine dénaturée.**

Perspectives

Cette étude de diffusion quasi-élastique de neutrons sur les échantillons DTau et DMBP à 0.6 μeV de résolution appelle des mesures complémentaires, en particulier :

- Des mesures de diffusion quasi-élastiques à plus basses résolutions (80-100 μeV) et à plus hautes températures (>260 K), afin d'étudier les mouvements rapides (1-10 ps) dans les couches d'hydratation. Ces mesures avaient déjà été effectuées sur les échantillons DTau mais n'ont pas abouti (problème de fit des spectres quasi-élastiques).
- Des mesures de diffusion quasi-élastique à très haute résolution (10-100 neV). Les valeurs de coefficient de diffusion extraites reposent sur les largeurs à mi-hauteurs à basse valeurs de Q qui ne sont parfois pas bien définies. Ces valeurs pourraient être obtenues par des mesures sur un spectromètre à écho de spin (IN11 ou IN15 à l'ILL), qui permet justement d'atteindre ces résolutions.
- Des mesures d'absorption terahertz pourraient être effectuées, afin d'explorer la dynamique collective de la couche d'hydratation de la protéine MBP0.

Chapitre 5

Dynamique d'un hybride protéine-polymère par diffusion élastique de neutrons en absence de solvant

Sommaire

5.1	Problématiques et motivations	105
5.2	Système biologique : la myoglobine	105
5.3	Biochimie de la myoglobine deutérée	107
5.4	Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons	108
5.5	Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons d'hybrides	108
5.5.1	Résultats et discussion	109
5.6	Conclusion	111

CE CHAPITRE traite de l'influence de la nature de la couche de solvatation sur sa dynamique. Il fait suite au chapitre précédent et explore un système dont la géométrie de la couche de solvatation est restreinte. La dynamique de cette couche de solvatation sera explorée par diffusion élastique de neutrons.

Ce projet est une collaboration avec **Adam Perriman** et **Alex Brogan**, *School of Chemistry, University of Bristol*, Royaume-Unis et **Colin Jackson**, *Australian National University*. Les résultats présentés dans ce chapitre seront proposés à la revue *Journal of the American Chemistry Society*, sous le titre :

A polymer surfactant corona dynamically replaces water in solvent-free protein liquids and ensures macromolecular flexibility and activity

F.-X. Gallat^{*1,2,3,4}, A. Brogan^{*5}, Y. Fichou^{1,2,3}, N. McGrath⁵, M. Moulin^{4,6}, M. Härtlein^{4,6}, J. Combet⁴, J. Wuttke⁹, S. Mann⁵, G. Zaccai^{1,2,3,4}, C. Jackson⁷, A. Perriman⁵ & M. Weik^{1,2,3,8}

¹Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Biologie Structurale, F-38054 Grenoble, France ;
²CNRS, UMR5075, F-38027 Grenoble, France ; ³Université Joseph Fourier, F-38000, Grenoble, France ;
⁴Institut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France ; ⁵School of

Chemistry, University of Bristol, United-Kingdom; ⁶ILL-EMBL Deuteration Laboratory, Partnership for Structural Biology, Grenoble; ⁷School of Chemistry, Australian National University, Australia; ⁸ESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France; ⁹Forschungszentrum Julich, JCNS at FRM II, Lichtenbergstrasse 1, 85747 Garching, Germany.

*These authors contributed equally to this work

A Polymer Surfactant Corona Dynamically Replaces Water in Solvent-Free Protein Liquids and Ensures Macromolecular Flexibility and Activity

François-Xavier Gallat,^{†,‡,§,L,◆} Alex P. S. Brogan,^{||,◆} Yann Fichou,^{†,‡,§} Nina McGrath,^{||} Martine Moulin,^{L,#} Michael Härtlein,^{L,#} Jérôme Combet,^L Joachim Wuttke,[⊗] Stephen Mann,^{||} Giuseppe Zaccai,^{†,‡,§,L} Colin J. Jackson,[∇] Adam W. Perriman,^{*,||} and Martin Weik^{*,†,‡,§,×}

[†]Institut de Biologie Structurale, Commissariat à l'Energie Atomique, F-38054 Grenoble, France

[‡]CNRS, UMR5075, F-38027 Grenoble, France

[§]Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France

^LInstitut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, B.P. 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France

^{||}Center for Organized Matter Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, U.K.

[#]ILL-EMBL Deuteration Laboratory, Partnership for Structural Biology, 38042 Grenoble Cedex 9, France

[⊗]Forschungszentrum Jülich, JCNS at FRM II, Lichtenbergstrasse 1, 85747 Garching, Germany

[∇]Research School of Chemistry, Australian National University, ACT, 0200, Australia

[×]ESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France

Supporting Information

ABSTRACT: The observation of biological activity in solvent-free protein–polymer surfactant hybrids challenges the view of aqueous and nonaqueous solvents being unique promoters of protein dynamics linked to function. Here, we combine elastic incoherent neutron scattering and specific deuterium labeling to separately study protein and polymer motions in solvent-free hybrids. Myoglobin motions within the hybrid are found to closely resemble those of a hydrated protein, and motions of the polymer surfactant coating are similar to those of the hydration water, leading to the conclusion that the polymer surfactant coating plasticizes protein structures in a way similar to hydration water.

At the surface of soluble proteins, hydration water forms a mobile hydrogen-bonding network and permits sufficient macromolecular flexibility for proteins to attain full activity.¹ A loss of flexibility, either through reduction in temperature^{2–4} or loss of hydration water,^{5,6} is known to impair protein function^{7,8} because protein motions necessary to access different conformational states⁹ are suppressed. The coupling of hydration-water dynamics and protein dynamics is currently the subject of controversial discussions. In particular, the question of whether hydration-water dynamics enslave protein motions in a unilateral way,¹⁰ merely act as a plasticizer that provides conformational freedom for the protein,¹¹ or couple differently with different classes of biological macromolecules^{12,13} is currently a matter of considerable interest. It is known that water can in certain cases be substituted as a solvent by organic compounds¹⁴ and that a large number of proteins function as part of cellular membranes where they are often at least partially surrounded by lipids rather than water. However,

all functional proteins have, until recently, been thought to require solvent for function. This view has been challenged by the creation of solvent-free protein–polymer surfactant nano-hybrids (hereafter referred to as “hybrids”).^{15,16} Specifically, a myoglobin hybrid has been shown to be able to reversibly bind oxygen.¹⁶ However, the physical basis for the activity of the hybrid is unknown; if dynamics underpin protein function and solvent plays an essential role in the dynamical behavior of protein molecules, how can a solvent-free protein be biologically active? In this context, the present study addresses two specific questions: do the dynamics of the protein moiety of the hybrid resemble the dynamics of a hydrated protein, and do the dynamics of polymer surfactant coating resemble hydration-water dynamics? Answering these questions by studying this unique experimental system has the potential to shed light on the interplay between protein solvation, dynamics, and function.

Incoherent neutron scattering (INS) is widely used to study protein dynamics and probes atomic motions on the ns–ps time scales and Å length scales.¹⁷ We applied elastic INS (EINS) to study the dynamic behavior of a solvent-free protein–polymer surfactant nanohybrid for the first time. By deuterating either the protein or the polymer moiety of the hybrid, we were able to separately characterize the temperature-dependent atomic mean square displacements (MSD) of the polymer and protein motions, respectively. Our results indicate that the dynamics of myoglobin within the hybrid closely resemble those of hydrated myoglobin and that the dynamics of the polymer corona are similar to those of typical protein hydration water, leading to the conclusion that the polymer

Received: May 1, 2012



coating can plasticize protein structures in a similar way to hydration water.

The hybrids used in this work were synthesized by electrostatically grafting anionic poly(ethylene oxide)-based polymer surfactant chains to the surface of myoglobin that has been cationized (C-Mb) with *N,N*-dimethyl-1,3-propanediamine (DMPA) (Figure 1a)¹⁸ before extraction of solvent

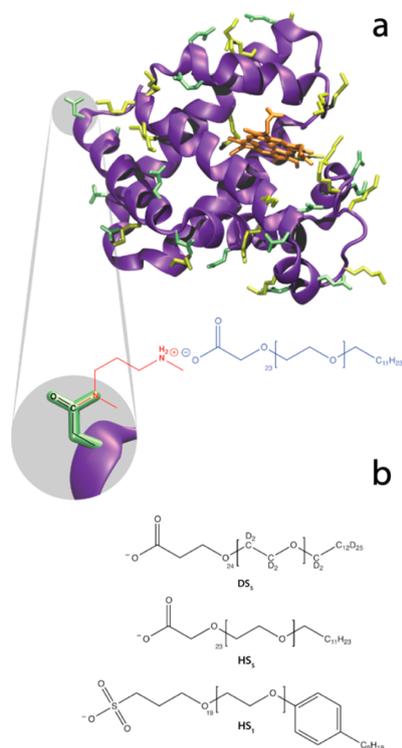


Figure 1. (a) Model illustrating the carbodiimide coupling of *N,N*-dimethyl-1,3-propanediamine (DMPA; red) to an aspartic acid side chain (green) of myoglobin to yield cationized myoglobin (C-Mb), followed by electrostatic coupling with ethylene glycol ethoxylate lauryl ether (HS₅; blue) to give HMb/HS₅. After cationization there were ~41 surfactant binding sites on C-Mb, including modified glutamic (green) and aspartic (green) acid as well as arginine (yellow) and lysine (yellow). (b) Anionic polymer surfactants: α -deuterated tridecanol propionic acid-terminated deuterated poly(ethylene glycol) (DS₅), ethylene glycol ethoxylate lauryl ether (HS₅), and poly(ethylene glycol) 4-nonylphenyl 3-sulfopropyl ether (HS₁).

to a final hydration level (*h*) of 0.0035 g of H₂O per gram of myoglobin hybrid, which corresponded to ~13 waters per hybrid molecule, or 4 waters per protein molecule by mass. This level of hydration is far below the several hundred water molecules needed to form a full hydration shell around small globular proteins such as myoglobin,⁷ and is similar to that of a lyophilized protein powder after drying over P₂O₅ for several days.¹⁹ As described previously, the protein moiety of these hybrids retains significant secondary structure, heme binding,

and oxygen binding/rebinding capacity¹⁶ and can unfold and refold in response to changes in temperature.²⁰

Hybrids of hydrogenated horse myoglobin or deuterated sperm whale myoglobin and the hydrogenated surfactants glycolic acid ethoxylate lauryl ether (HS₅) or poly(ethylene glycol) 4-nonylphenyl 3-sulfopropyl ether (HS₁) or α -deuterated tridecanol propionic acid-terminated deuterated poly(ethylene glycol) (DS₅) were synthesized (Figure 1b; see Materials and Methods in the Supporting Information). Expression and large-scale production of deuterated sperm whale myoglobin were carried out in the ILL-EMBL Deuteration Laboratory (Grenoble, France), and the synthesis of glycolic acid ethoxylate lauryl ether (HS₅) was done at the School of Chemistry, University of Bristol. The samples were lyophilized extensively and kept under nitrogen in a desiccator until required. Four different myoglobin/polymer hybrids were synthesized (Figure 1): (i) hydrogenated myoglobin/hydrogenated polymer HS₅ (HMb/HS₅), (ii) hydrogenated myoglobin/hydrogenated polymer HS₁ (HMb/HS₁), (iii) hydrogenated myoglobin/deuterated polymer DS₅ (HMb/DS₅), and (iv) deuterated myoglobin/hydrogenated polymer HS₅ (DMb/HS₅). The polymer surfactant occupancies of HMb/HS₅, HMb/HS₁, and DMb/HS₅ were approximately 100% (*i.e.*, approximately 41 polymer surfactant chains per C-Mb molecule), while HMb/DS₅ had 43% occupancy (18 polymer surfactant chains per C-Mb). Control samples of hydrogenated horse myoglobin powder, hydrated with D₂O at 0.43 g D₂O/g Mb (HMb/D₂O), and hydrogenated horse myoglobin, dried over P₂O₅ (HMb-dry), were also prepared.

Given that the polymer surfactant used in this study (HS₅) differed slightly from those described previously (HS₁¹⁶ and HS₂²⁰), the samples containing HS₅ were characterized to ensure they retained the same characteristics as the hybrids previously constructed. Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) experiments performed on HMb/HS₅ at 25 °C yielded spectra that are consistent with previous work on HMb/HS₅, confirming that, although there is a reduction in the level of α -helical structure (as compared to hydrated myoglobin), the secondary structure of the protein is still intact (Figure S1). Results from thermal denaturation SRCD experiments (Figure S2) performed on HMb/HS₅ are also largely identical to those of HMb/HS₂; *i.e.*, reversible unfolding of the protein is observed with a half-denaturation temperature (*T*_{1/2}) of 163 °C and a refolding efficiency of 95% from 155 °C (Figure S3). Finally, equilibrium gas binding experiments performed on HMb/HS₅ are consistent with previous work on HMb/HS₁,¹⁶ showing reversible dioxygen binding with an oxygen affinity (*P*_{1/2}) of 3.4(0.2) torr with no cooperativity (Figure S4).

EINS experiments were carried out on the backscattering spectrometers IN16²¹ (Institut Laue-Langevin, Grenoble, France) and SPHERES²² (Jülich Centre for Neutron Science at FRMII, Garching, Germany). Incoherent neutron scattering from biological samples is dominated by the signal from hydrogen nuclei, whose incoherent scattering cross section is ~40 times larger than those of deuterium and other atoms in the sample.¹⁷ Consequently, for the HMb/HS₁ sample, 26% of the EINS signal is from the protein and 74% from the polymer surfactant HS₁. In the case of the HMb/HS₅ sample, 23% of the signal arises from the protein and 77% from the polymer surfactant HS₅. For the DMb/HS₅ sample, 11% of the signal is from protein and 89% is from the polymer surfactant. Thus, in these three samples, the signal is dominated by the polymer

B

dx.doi.org/10.1021/ja303894g | J. Am. Chem. Soc. XXXX, XXX, XXX–XXX

contribution. In contrast, for HMb/DS₅, 91% of the signal is from the protein contribution and 9% from the polymer surfactant HS₅. Finally, in HMb/D₂O (HMb-dry), 98% (100%) of the signal is from protein and 2% (0%) from the D₂O hydration water (see Materials and Methods for detailed contributions to EINS signal).

The temperature dependence of the EINS was measured from 20 to 300 K for all samples, and atomic MSD (Figure 2) were obtained by linear regressions of the logarithm of the elastic intensity as a function of the scattering vector Q^2 (Figure SI Methods 10). Experiments on the fully hydrogenated hybrids HMb/HS₅ and HMb/HS₁ provide MSD averaged over both the Mb and the polymer moieties (Figure 2a). Up to ~120 K, MSD increase linearly due to harmonic motions. At ~120 K, the MSD start to increase at a higher rate, due to methyl rotations entering the experimental window of the neutron spectrometer.^{11,24–26} A dynamical transition³ is observed at temperatures ~250 K, marking the onset of anharmonic motions. A similar dynamical transition is also apparent in the HMb/D₂O sample (Figure 2a), which has been linked to the onset of biological activity in myoglobin.⁸ We conclude that the dynamical behavior of the hybrid is similar to that of hydrated myoglobin and is largely independent of the nature of the polymer employed (HS₁¹⁶ or HS₅).

The polymer surfactant occupancy of the HMb/DS₅ sample was reduced due to an unknown reason related to polymer deuteration. Nevertheless, the temperature dependence of its MSD qualitatively and quantitatively resembles the MSD of a hydrated protein, and is significantly different from those of a dry myoglobin powder (Figure 2b). In particular, the MSD go through a dynamical transition at ~250 K that is absent in the dry protein and are of a similar absolute value at 300 K to those of the HMb/D₂O sample (Figure 2b). Flash photolysis experiments have shown that a heme-bound ligand cannot leave the protein after photodissociation if myoglobin is either hydrated below $h = 0.15$,⁶ embedded in a solid,⁵ or below 230 K.² Thus, the anharmonic equilibrium fluctuations present in the hybrids above 250 K (Figure 2a,b) provide a physical explanation for the observed reversible oxygen binding activity in the hybrids (Figure S4). We suspect that the MSD of the protein moiety of a HMb/DS₅ sample with full polymer occupancy would be even closer to those of HMb/D₂O. However, we cannot exclude the possibility that the reduction in MSD of HMb/DS₅ with respect to HMb/D₂O is a result of the polymer surfactant molecules providing a somehow less plasticizing environment compared to aqueous solvent.

Polymer surfactant motions in the hybrid were probed with the DMb/HS₅ sample. The MSD are almost identical to those of the fully hydrogenated hybrids and are qualitatively similar to the MSD of hydration water on the surface of deuterated maltose binding protein²³ (Figure 2c). Dynamics on the ns–ps time scale of the polymer surfactant coating and of hydration water are thus very similar, suggesting that the corona dynamically replaces water in these hybrids and creates a local environment in which proteins can be biologically active. On a microscopic scale, it remains unclear how the partially hydrophobic polymer surfactant interacts with the protein surface. In contrast to water molecules that hydrogen-bond with polar groups on the protein surface or cluster around apolar groups, the polymer surfactant can also engage in hydrophobic and electrostatic interactions. Electrostatic interactions *via* the DMPA linker might contribute to the dynamical coupling between the polymer surfactant and protein moieties

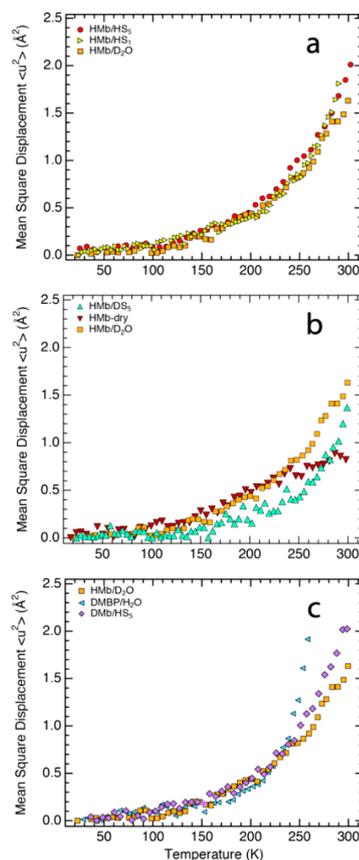


Figure 2. Atomic mean square displacements (MSD) as a function of temperature of solvent-free myoglobin–polymer surfactant hybrids and of their components. (a) Cationized, hydrogenated horse myoglobin complexed with the hydrogenated polymer surfactant HS₁ (HMb/HS₁; yellow triangles) or with the hydrogenated polymer surfactant HS₅ (HMb/HS₅; red circles), hydrogenated horse myoglobin in a powder hydrated at 0.43 g D₂O/g myoglobin¹³ (HMb/D₂O; orange squares). (b) Cationized, hydrogenated horse myoglobin complexed with the deuterated polymer surfactant DS₅ (HMb/DS₅; green triangles), hydrogenated dry Mb powder (HMB-dry; red triangles), and HMb/D₂O¹³ (orange squares). (c) Cationized, deuterated sperm whale myoglobin complexed with hydrogenated polymer surfactant HS₅ (DMb/HS₅; violet diamonds), hydration water in a powder of deuterated maltose binding protein (MBP) hydrated at 0.44 g H₂O/g MBP (blue triangles),²³ and HMb/D₂O¹³ (orange squares). MSD were extracted in the range $0.20 < Q^2 < 1.40 \text{ \AA}^{-2}$ for the HMb/HS₅, HMb/DS₅, and HMb/D₂O samples, in the range $0.18 < Q^2 < 1.33 \text{ \AA}^{-2}$ for the HMB-dry sample, and in the range $0.20 < Q^2 < 1.13 \text{ \AA}^{-2}$ for the DMb/HS₅ sample. Published neutron data of DMBP/H₂O²³ were re-examined for MSD extraction in the Q^2 -range $0.19 < Q^2 < 1.13 \text{ \AA}^{-2}$. All data were collected on IN16²¹ and SPHERES²² and were processed in exactly the same way.

and might themselves modify the dynamics of the protein. The decreased number of hydrogen-bonding donors and acceptors in the polymer surfactant corona within a hybrid as compared

C

dx.doi.org/10.1021/ja303894g | J. Am. Chem. Soc. XXXX, XXX, XXX–XXX

to those in the first water layer in fully hydrated proteins might lead to more electrostatic and polar interactions among surface side chains. As a result, the number of hydrogen-bonding partners per amino acid side chain might be similar in polymer surfactant-coated and hydration-water-covered proteins. Molecular dynamics simulations of a solvent-free protein–polymer surfactant hybrid might shed some light on microscopic details of polymer surfactant–protein interactions.

The observed similarities between the MSD of the polymer surfactant coating in these hybrids and protein hydration water highlight the importance of flexibility in the molecular matrix encapsulating biologically active proteins. We propose that this similarity is the basis of ligand-binding activity in solvent-free liquid myoglobins. Our results indicate that electrostatically linking polymer surfactant molecules to the surface of myoglobin produces a novel class of solvent-free biomolecular liquids in which the attached coronal layer functionally and dynamically substitutes for a hydration shell of water molecules and ensures macromolecular flexibility and conformational dynamics. The ability to replace the solvation shell of proteins without impairment of molecular dynamics could have considerable potential for the design and development of new functional biohybrid nanomaterials for use in anhydrous environments and other technologically challenging milieus.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

Mb deuteration, purification, and characterization; synthesis and characterization of anionic polymer surfactants; Mb functionalization and polymer grafting; neutron scattering experiments; SRCD spectroscopy and thermal denaturation thermodynamics; oxygen binding assays. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

weik@ibs.fr; chawp@bristol.ac.uk

Author Contributions

◆ F.-X.G. and A.P.S.B. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the ILL, the FRMII, and the Diamond Light Source for beamtime. We thank Bernhard Frick for his continuous support related to IN16 experiments and Douglas Tobias for critical reading of an early version of the manuscript. Financial support by the CEA, the CNRS, and the UJF is acknowledged, as well as a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-027) to M.W. and an ILL PhD fellowship to F.-X.G. This work has benefited from the activities of the DLAB consortium funded by the EU (HPRI-2001-50065 and RII3-CT-2003-505925) and from UK EPSRC-funded activity within the ILL-EMBL Deuteration Laboratory (GR/R99393/01 and EP/C015452/1). The study has been supported by the European Commission under the 7th Framework Programme through the “Research Infrastructures” action of the “Capacities” Programme (CP-CSA_INFRA-2008-1.1.1 No. 226507-NMI3) and ERC Advanced Grant scheme (S.M.). We thank the EPSRC (Cross-disciplinary Interfaces Program) for support for AWP. C.J.J. was supported by a Marie Curie International Incoming Fellowship.

■ REFERENCES

- (1) Ball, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74.
- (2) Austin, R. H.; Beeson, K. W.; Eisenstein, L.; Frauenfelder, H.; Gunsalus, I. C. *Biochemistry* **1975**, *14*, 5355.
- (3) Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. *Nature* **1989**, *337*, 754.
- (4) Zaccai, G. *Science* **2000**, *288*, 1604.
- (5) Lehnert, U.; Reat, V.; Weik, M.; Zaccai, G.; Pfister, C. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1945.
- (6) Kleinert, T.; Doster, W.; Post, F.; Settles, M. Hydration Effects on Protein Function: The Kinetics of Ligand Binding to Myoglobin. In *Proceedings of the Italian Physical Society*; Palma, M. U., Palma-Vittorelli, M. B., Parak, F., Eds.; Italian Physical Society: Bologna, 1993; Vol. 43, p 127.
- (7) Rupley, J. A.; Careri, G. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Richards, F. M., Edsall, J. T., Eisenberg, D. S., Eds.; Academic Press: New York, 1991; Vol. 41, p 37.
- (8) Ostermann, A.; Waschpicky, R.; Parak, F. G.; Nienhaus, G. U. *Nature* **2000**, *404*, 205.
- (9) Frauenfelder, H.; Sligar, S. G.; Wolynes, P. G. *Science* **1991**, *254*, 1598.
- (10) Frauenfelder, H.; Chen, G.; Berendzen, J.; Fenimore, P. W.; Jansson, H.; McMahon, B. H.; Strope, I. R.; Swenson, J.; Young, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 5129.
- (11) Doster, W.; Settles, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1749*, 173.
- (12) Khodadadi, S.; Roh, J. H.; Kisiuik, A.; Mamontov, E.; Tyagi, M.; Woodson, S. A.; Briber, R. M.; Sokolov, A. P. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1321.
- (13) Gallat, F.-X.; Laganowski, A.; Wood, K.; Gabel, F.; van Eijck, L.; Wuttke, J.; Moulin, M.; Härtlein, M.; Eisenberg, D.; Colletier, J.-P.; Zaccai, G.; Weik, M. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 129.
- (14) Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 241.
- (15) Perriman, A. W.; Colfen, H.; Hughes, R. W.; Barrie, C. L.; Mann, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6242.
- (16) Perriman, A. W.; Brogan, A. P. S.; Colfen, H.; Tsoureas, N.; Owen, G. R.; Mann, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 622.
- (17) Gabel, F.; Bicout, D.; Lehnert, U.; Tehei, M.; Weik, M.; Zaccai, G. *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 327.
- (18) Perriman, A. W.; Mann, S. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6085.
- (19) Dolman, M.; Halling, P. J.; Moore, B. D.; Waldron, S. *Biopolymers* **1997**, *41*, 313.
- (20) Brogan, A. P. S.; Siligardi, G.; Hussain, H.; Perriman, A. W.; Mann, S. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1839.
- (21) Frick, B.; Gonzalez, M. *Physica B: Condensed Matter* **2001**, *301*, 8.
- (22) Wuttke, J.; Budwig, A.; Drochner, M.; Kämmerling, H.; Kayser, F.-J.; Kleines, H.; Ossovyi, V.; Pardo, L. C.; Prager, M.; Schneider, G. J.; Schneider, H.; Staringer, S.; Richter, D. *Rev. Sci. Instrum.* **2012**, in press.
- (23) Wood, K.; Frolich, A.; Paciaroni, A.; Moulin, M.; Härtlein, M.; Zaccai, G.; Tobias, D. J.; Weik, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4586.
- (24) Roh, J. H.; Novikov, V. N.; Gregory, R. B.; Curtis, J. E.; Chowdhuri, Z.; Sokolov, A. P. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 038101.
- (25) Schiro, G.; Caronna, C.; Natali, F.; Cupane, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1371.
- (26) Wood, K.; Tobias, D. J.; Kessler, B.; Gabel, F.; Oesterheld, D.; Mulder, F. A.; Zaccai, G.; Weik, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4990.

5.1 Problématiques et motivations

Les mesures de diffusion quasi-élastique présentées dans le chapitre précédent ont mis en évidence la diffusion translationnelle de la molécule d'eau autour de la protéine, à des températures supérieures à 250 K (figure 4.2). Ce comportement diffusif est grandement facilité par la géométrie (en particulier la taille) et la nature hautement polaire de la molécule d'eau. La suppression des ses mouvements à grande distance et la restriction à ceux de rotation entraînent une rigidification de la protéine et ne lui permettent plus d'avoir une transition dynamique (45, 46). Ces mouvements de rotation, bien que caractérisés par des dynamiques plus rapides que celles associées à la diffusion translationnelle, ne peuvent pas jouer le rôle de "lubrifiant" entre les différents acides aminés de surface. La nature de la couche de solvatation est donc importante, en particulier la taille de la molécule.

Il faudra attendre 2009 pour voir apparaître des systèmes biologiques, à base de protéines et de polymères, macroscopiquement liquides en l'absence d'une couche de solvatation à base d'eau. Ces systèmes correspondent à des hybrides protéine-polymères (102). Cette couche est constituée de longs polymères d'oxyde de polyéthylène (PEO) dont la géométrie des mouvements est restreinte par leur fixation électrostatique. Cette attachement à la protéine rend les mouvements de diffusion limités, ce qui n'empêche pas la protéine d'être biologiquement active (103).

Les résultats obtenus sur ces hybrides a motivé cette étude par diffusion de neutrons, afin d'étudier dans un premier temps la dynamique des polymères. Dans le chapitre précédent, il a été montré que des mouvements diffusifs dans la couche d'hydratation apparaissaient à la transition dynamique passée. La littérature a montré que celle-ci s'accompagnait d'une fonction biologique. Les hybrides, eux, mettent en évidence une fonction biologique malgré l'absence de mouvements diffusifs. Cette problématique sera analysée par diffusion élastique de neutrons sur un échantillon deutéré de myoglobine et fonctionnalisée par des polymères hydrogénés, afin de cerner leur dynamique.

5.2 Système biologique : la myoglobine

Le système biologique étudié ici consiste en deux myoglobines, de cheval et de cachalot, fonctionnalisées au niveau des acides aminés aspartate et glutamate par du N,N-diméthyl-1,3-propanediamine (DMPA) de structure chimique $\text{CH}_3\text{-NH}_2^+(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2^+\text{-CH}_3$ ¹. Le deuxième groupement amine est libre de former une interaction électrostatique avec deux polymères de PEO, de structure chimique $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{19}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, au niveau du groupement carboxyle de la tête du polymère. Une fois que la protéine est entourée de sa couche de polymères, la solution est dialysée contre de l'eau, afin de retirer l'excédent de polymères et est ensuite lyophilisée (refroidissement à l'azote liquide). La poudre obtenue est ensuite chauffée à 50 °C jusqu'à obtenir une pâte visqueuse. Cette phase liquide de la protéine en l'absence d'eau représente la forme finale et biologiquement active de l'échantillon.

1. Réaction de condensation entre un groupement amine du DMPA et le groupement acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide aminé

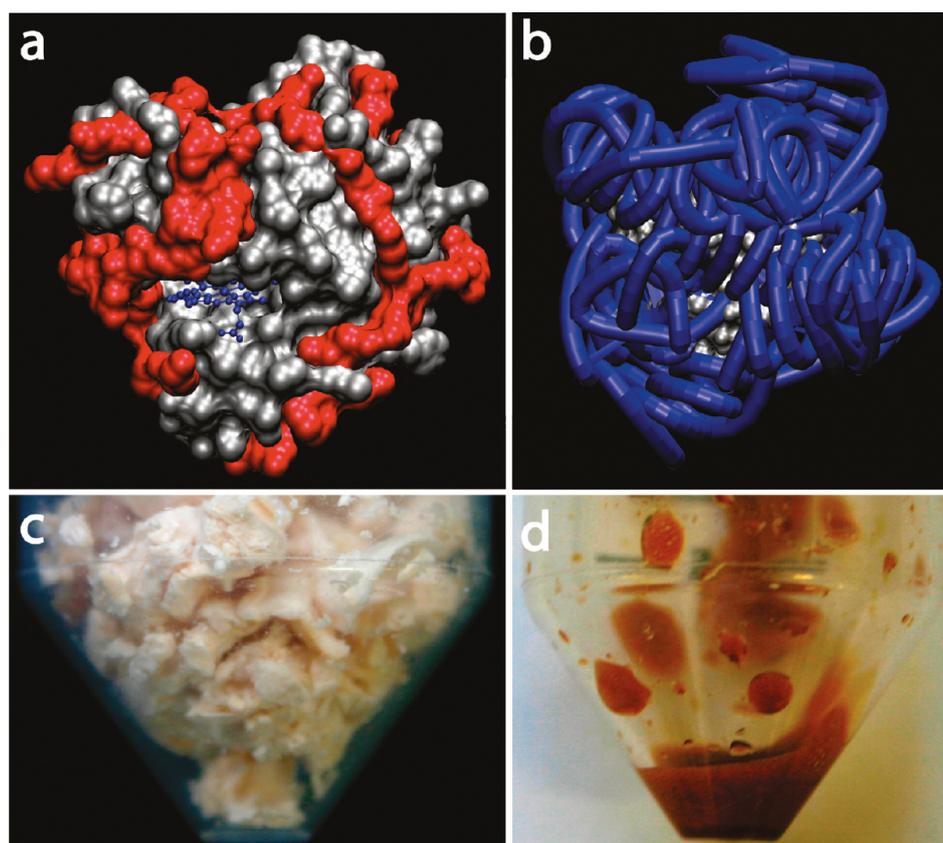


FIGURE 5.1 – A) Structure tridimensionnelle de la myoglobine de cheval (gris), fonctionnalisée par le DPMA (rouge). B) Structure tridimensionnelle de la myoglobine de cheval fonctionnalisée, avec sa couche de polymères (cylindres bleus). C) Poudre déshydratée d'hybride protéine-polymères avant chauffage. D) Poudre déshydratée d'hybride protéine-polymères après chauffage (50 °C). Image extraite de (104)

Afin d'étudier de manière séparée la dynamique du polymère et de la protéine, trois échantillons ont été produits, le premier constitué par la myoglobine de cachalot perdeutérée, fonctionnalisée par du DMPA et du PEO hydrogénés (**DMb/HPol**). Cet échantillon donnera accès à la dynamique du polymère. Un second échantillon consiste en une myoglobine de cheval hydrogénée, fonctionnalisée par du DMPA hydrogéné et du PEO, lui aussi hydrogéné (**HMB/HPol**). Cet échantillon permettra d'approfondir la dynamique de l'hybride. Les deux précédents échantillons seront comparés avec un troisième échantillon contrôle, un de myoglobine de cheval commerciale hydratée en D₂O à 0.43 g D₂O /g H-Protéine (**HMB/D₂O**).

Dans le cadre du projet "Dynamique des hybrides protéine-polymères en absence de solvant", le travail de l'étudiant a consisté en la préparation de la myoglobine deutérée, au DLAB, en collaboration avec **Martine Moulin** et les mesures de diffusion de neutrons. La mise en place du protocole de fonctionnalisation et la caractérisation de l'échantillon ont été faites par **Adam Perriman** et **Alex Brogan**.

5.3 Biochimie de la myoglobine deutérée

Biologie moléculaire Le gène utilisé pour la production de la myoglobine deutérée est celui codant pour la myoglobine de cachalot, longue de 154 acides aminés. Le gène a été cloné dans un vecteur pET-28a (Invitrogen) avec une queue poly-histidine au niveau du domaine N-terminal de la protéine et une résistance kanamycine. Une souche de bactérie BL21(DE3) sous le contrôle du promoteur T7 a ensuite été transformée pour l'expression de la myoglobine. La culture des bactéries s'est faite de la même manière que pour la protéine Tau, à savoir par fermentation.

Purification de la myoglobine La myoglobine deutérée a été purifiée en une étape selon le protocole et les tampons suivants (tableau 5.1) :

Les cellules après culture ont été récoltées par centrifugation et reprises dans 20 ml de tampon de lyse par litre de culture. Des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés et incubés 30 min à 4 °C. La lyse complète des membranes a ensuite été réalisée par sonication sur glace. Une étape de centrifugation à $50\,000 \times g$ pendant 30 min permet de séparer les débris membranaires de la fraction soluble. Cette dernière a été ensuite incubée avec une résine d'affinité au cobalt Talon. Trois étapes de lavage ont été réalisées avec des concentrations de NaCl de 1 M, 500 mM, 100 mM et 8 mM imidazole. L'étape d'éluion s'est faite avec 250 mM imidazole. Les fractions contenant la protéine ont été mises en évidence sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine 12% (figure 5.2) et rassemblées.

Myoglobine deutérée	
Tampons	
Lyse	500 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0
Lavage(s)	1 M-500 mM-100 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 8 mM imidazole
Elution	100 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0 250 mM imidazole

TABLE 5.1 – Composition des tampons pour la purification de la myoglobine en condition deutérée.

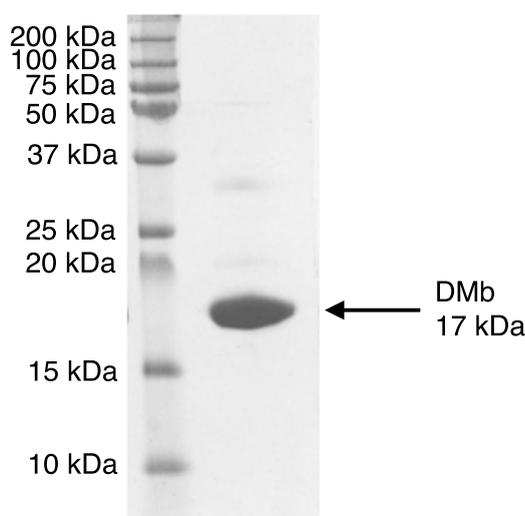


FIGURE 5.2 – Gel SDS PAGE Tris Tricine 12% de pureté finale de myoglobine deutérée

5.4 Préparation des échantillons pour la diffusion de neutrons

Les hybrides ont été séchées sur P_2O_5 durant 24 h pour HMb/HPol et DMb/HPol, sur un porte-échantillon plat en aluminium de surface $4 \times 3 \text{ cm}^2$. Les échantillons ont ensuite été fermés par un couvercle en aluminium (0.3 mm d'épaisseur de parcours des neutrons) et un joint d'indium de 1 mm de diamètre.

5.5 Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons d'hybrides

Des mesures à $0.9 \mu\text{eV}$ de résolution permettent de mettre en évidence des dynamiques moyennes sur l'échelle de 0.1-1 ns, à savoir des mouvements de relaxation, de diffusion des chaînes latérales ou la diffusion du polymère autour de la protéine². Les échantillons DMb/HPol et HMb/HPol (dynamique du polymère et de l'hybride respectivement) ont été mesurés, de 20 à 300 K.

Contribution à la diffusion incohérente des différentes composantes des hybrides

Le calcul des contributions des différentes composantes de ce système montre que dans l'échantillon DMb/HPol, les polymères et le DPMA contribuent à hauteur de 93% (382 662 barns) et la protéine 7% (26 952 barns). Dans l'échantillon HMb/HPol, les polymères et le DPMA contribuent à hauteur de 83% (382 662 barns) et la protéine 17% (78 754 barns). Pour l'échantillon HMb/D₂O, la protéine contribue à hauteur de 98% (78 754 barns) et la couche d'hydratation à 2% (1 577 barns).

Collecte des données Les intensités élastiques des deux échantillons ont été obtenues sur le spectromètre à rétro-diffusion IN16, ILL (tableau 2.2 pour les caractéristiques de l'instrument). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. L'intensité élastique à cette température est collectée pendant une heure. Ces intensités serviront à la normalisation des intensités ultérieurement mesurées. Par la suite, une rampe continue

2. La diffusion du polymère est restreinte car il y a une interaction électrostatique forte entre le polymère et la protéine.

en température, de 20 à 300 K est mise en place. En parallèle, les intensités élastiques sont collectées, chaque intensité élastique étant moyennée sur une plage de températures de 3 à 5 K.

	HMb/HPol	DMb/HPol	HMb/D ₂ O
Paramètre			
Instrument	IN16	IN16	IN16
Angle	135°	135°	135°
Température	20-300 K	20-300 K	20-300 K
Durée rampe	20 h	33 h	24 h
Vitesse rampe	0.24 K.min ⁻¹	0.14 K.min ⁻¹	0.20 K.min ⁻¹

TABLE 5.2 – Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de diffusion incohérente élastique sur les échantillons DMb/HPol, HMb/HPol et HMb/D₂O sur IN16 à 0.9 μeV .

Traitement des données Le traitement des données s'est fait selon les principes développés dans le paragraphe 2.2.1, avec les paramètres présentés dans le tableau 5.3. L'extraction des MSDs s'est faite à partir des logarithmes des intensités corrigées $I_{sample}(Q)$ (normalisées à la plus basse température et cellule vide soustraite).

	HMb/HPol	DMb/HPol	HMb/D ₂ O
gamme de fit	0.20-1.40 \AA^{-2}	0.20-1.40 \AA^{-2}	0.20-1.40 \AA^{-2}

TABLE 5.3 – Gammes de fit utilisées pour l'extraction des déplacements carrés moyens issus des mesures de diffusion incohérente élastiques sur les échantillons DMb/HPol, HMb/HPol et HMb/D₂O sur IN16 à 0.9 μeV . Ici encore, les gammes de Q^2 sont légèrement différentes de celles utilisées pour HTau, HMBP, DTau et DMBP à cause du changement des détecteurs.

5.5.1 Résultats et discussion

Les mesures de MSDs font clairement apparaître chez le polymère une transition dynamique vers 220 K (figure 5.3.A). Cependant, à l'inverse des couches de solvatation à base d'eau, qui présentent des distributions larges de temps de corrélation à la transition dynamique, les polymères présents dans le complexe mettent en avant une transition de plus faible amplitude et plus franche. Le polymère montre des MSDs équivalents à la protéine Tau (figure 5.3), ce qui donne une constante de force apparente de 0.10 N.m⁻¹ (0.098 N.m⁻¹ pour la protéine Tau). Terminons en observant que les polymères ne semblent pas avoir une dynamique qui sort de la fenêtre de l'instrument à hautes températures, à l'inverse des couches de solvatation à base d'eau.

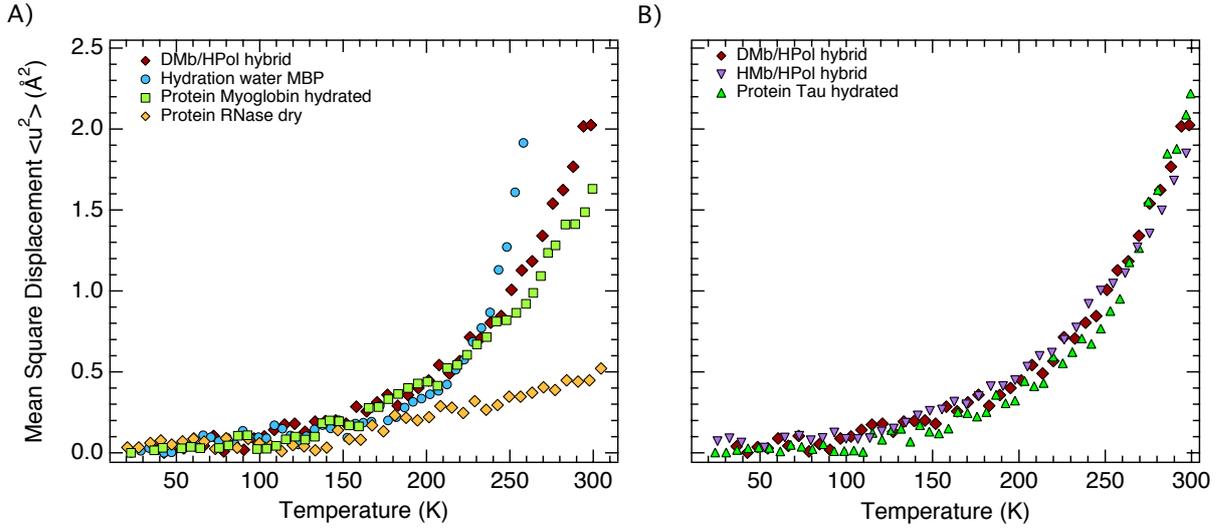


FIGURE 5.3 – Déplacements carrés moyens A) des échantillons HMb/D₂O (carré vert), DMb/HPol (diamant marron), RNase_{sec} et DMBP (cercle bleu) et B) HTau (triangle vert), HMb/HPol (triangle inversé violet) et DMb/HPol (diamant marron), de 20 à 300 K. Gamme de fit : 0.2-1.40 \AA^{-2} pour DMb/HPol, HMb/HPol et HMb/D₂O, 0.19-1.38 \AA^{-2} pour HTau et HRNase_{sec}. IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

Les logarithmes des intensités élastiques corrigées $I_{\text{sample}}(Q)$ dont sont extraits les MSDs de l'hybride DMb/HPol sont les suivants (figure 5.4) :

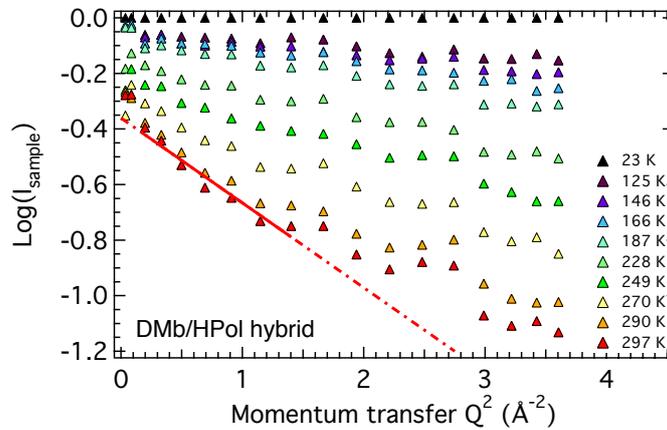


FIGURE 5.4 – Logarithme des intensités en fonction de Q^2 du complexe DMb/HPol (triangle), de 20 à 300 K. Gamme de fit : 0.20-1.40 \AA^{-2} . IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

Il est intéressant de constater la présence d'une transition dynamique chez le polymère, accompagnée d'une constante de forces élevée (0.10 N.m^{-1} , équivalente à celle de Tau) dans un système où on aurait attendu une dynamique du polymère fortement ralentie, du fait du caractère hautement visqueux de l'échantillon. On est amené à penser que le polymère se comporte comme une chaîne gaussienne. Ce surcroît de dynamique, qui justifie les valeurs de MSDs au delà de la transition, doit alors se transmettre à la protéine, dû au caractère hautement hydrophile du polymère, par une interaction avec les résidus de surface de la protéine. Le faible nombre de polymères par molécule de

myoglobine (~ 42) est contrebalancé par la taille d'un polymère individuel, qui couvrant une surface plus grande, doit pouvoir interagir avec un plus grand nombre de résidus de surface. Le polymère fait alors office de couche de solvation dynamique et mime le comportement de l'eau comme source de flexibilité.

L'absence d'échantillon HMb/DPol ne permet pas de conclure quant à la présence d'une transition dans la protéine mais la persistance d'une fonction biologique (103) laisse à penser qu'une transition dans la protéine devrait être présente. Nous n'avons à l'heure actuelle pas effectué de tests d'activité sur les échantillons présentés mais cela sera effectué courant 2012. La question de l'influence du polymère sur la dynamique protéine reste donc ouverte.

5.6 Conclusion

Cette étude préliminaire de diffusion élastique de neutrons sur cette singulière couche de solvation a permis de montrer qu'une couche de solvation à base d'une couronne de polymères et une couche d'hydratation étaient dynamiquement similaires et étaient toutes les deux capables de fournir la flexibilité nécessaire à la fonction biologique de la protéine, et ce malgré des interactions de nature différente avec la protéine. Là où la molécule d'eau a besoin de diffuser afin d'apporter la flexibilité à la protéine, le polymère utilise sa taille afin de prendre en charge un plus grand nombre de résidus.

Résumé des résultats

- **Une couche d'eau et une couche de polymères à la surface de la protéines sont dynamiquement équivalentes**, chacune montrant une transition dynamique et apportant la flexibilité nécessaire à la fonction biologique.
- **L'absence (supposée) de mouvements diffusifs n'est pas forcément un frein à la fonction biologique.**

Perspectives

Cette étude de diffusion élastique de neutrons sur l'échantillon DMb/HPol à $0.9 \mu\text{eV}$ de résolution appelle des mesures et analyses complémentaires, en particulier :

- Des mesures élastiques et quasi-élastiques à haute et basse résolutions (0.6 et $80 \mu\text{eV}$), à différentes températures. Ces mesures quasi-élastiques permettraient de confirmer l'absence de mouvements diffusifs dans la couche de polymères.
- La préparation d'un échantillon avec de la protéine hydrogénée et une couche de polymère deutérée. Cet échantillon permettrait d'étudier la dynamique de la protéine dans le complexe. Jusqu'à présent, la préparation d'un tel échantillon n'a pas été possible, dû au caractère deutéré du polymère (Il est cependant possible de fonctionnaliser la myoglobine avec des polymères deutérés. Cependant, la poudre ne devient pas liquide lors du chauffage). Les mêmes mesures que celles proposées sur l'échantillon DMb/HPol s'appliqueraient à un échantillon HMb/DPol. La présence d'une transition dynamique dans la protéine pourrait être confirmée.

Chapitre 6

Dynamique des IDPs par diffusions élastique et quasi-élastique de neutrons

Sommaire

6.1	Problématiques et motivations	114
6.2	Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons de Tau et de MBP	114
6.2.1	Résultats et discussion	115
6.3	Mesure de diffusion incohérente élastique à basse résolution (80 μeV) sur les échantillons de Tau et de RNase	120
6.3.1	Résultats et discussion	122
6.4	Conclusion	123

Ce chapitre présente les résultats concernant la dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées, chapitre qui fait suite à celui du couplage eau-protéine intrinsèquement désordonnée. La dynamique de la protéine Tau, étudiée par diffusion quasi-élastique de neutrons y est présentée à des résolutions permettant de sonder les mouvements de l'ordre de la dizaine à la centaine de ps. La comparaison avec les protéines globulaires a été faite avec la MBP et la RNase. Ce chapitre apporte un éclairage supplémentaire à celui offert par la diffusion élastique de neutrons.

6.1 Problématiques et motivations

L'évolution des déplacements carrés moyens avec la température a montré des différences notables entre la protéine Tau une fois la transition dynamique passée (~ 250 K, figures 6.1 et 3.6.A). Ces différences semblaient indiquer en particulier que le confinement moyen d'un atome d'hydrogène d'une IDP est deux fois moins important que celui d'une protéine globulaire. La caractère élastique de la diffusion n'a cependant pas permis de clarifier la nature des mouvements et la dynamique associée. Des mesures de diffusion incohérente quasi-élastique à des résolutions de l'ordre de $0.6 \mu\text{eV}$, la même que celle utilisée pour les mesures élastiques, permettent justement de renseigner sur la dynamique fine de l'atome d'hydrogène dans les protéines MBP et Tau.

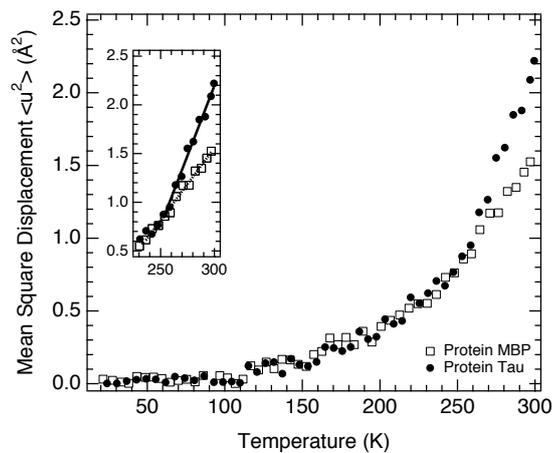


FIGURE 6.1 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur HTau (rond plein) et HMBP (carré ouvert), de 20 à 300 K. Les mesures de la MBP sont issues de (26). Gamme de fit : $0.18\text{-}1.31 \text{ \AA}^{-2}$. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

6.2 Mesure de diffusion incohérente quasi-élastique à haute résolution ($0.6 \mu\text{eV}$) sur les échantillons de Tau et de MBP

Collecte des données Les mesures de diffusion incohérente quasi-élastique ont été réalisées sur le spectromètre à rétro-diffusion SPHERES (résolution de $0.6 \mu\text{eV}$), au réacteur FRM2 (Garching, Allemagne). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. Les spectres quasi-élastiques à cette température sont collectés pendant douze heures. Ces spectres serviront à la normalisation des mesures ultérieures. Par la suite, les spectres quasi-élastiques sont collectés à différentes températures, en moyenne pendant 8-10 h par température.

Traitement des données Les données sont traitées et analysées avec la procédure présentée dans la section 2.2.3. Un fit des spectres quasi-élastiques par une lorentzienne nous permet d'extraire pour chaque température la dynamique moyenne ($\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2) des atomes d'hydrogènes.

Les différentes gammes en énergie des mesures pour les protéines Tau et MBP sont les suivantes

6.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION (0.6 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

SPHERES	
Systeme	
HTau/HMBP	-15.8/+15.7 μeV

TABLE 6.1 – Gamme d'énergies utilisées pour les fits QENS sur les protéines MBP et Tau.

Analyse des $\Gamma(\mathbf{Q})$ et des EISF Selon l'évolution de $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2 , déterminé par les fits des spectres quasi-élastiques (dont on pourra évaluer la qualité sur les figures 6.3 et 6.4), on utilisera une fonction de fit de *jump-diffusion* ou un fit constant en Q^2 . Les EISF extraits des intensités intégrées en énergie seront analysés avec un modèle de diffusion dans une sphère.

6.2.1 Résultats et discussion

A l'inverse des couches d'hydratation qui présentent de grandes variations dans la nature des mouvements des protons, les protéines Tau et MBP mettent en évidence des mouvements confinés, sur toute la gamme de température mesurées (figures 6.2.A). De 230 à 280 K, on constate que les demi-largeurs à mi-hauteur restent indépendantes de Q^2 . Ainsi, à des températures en dessous, proche et au dessus de la transition dynamique, la nature des mouvements des protons reste inchangée, ce qui contraste avec les mesures précédentes sur les couches d'hydratation, qui faisaient état d'une évolution de la nature des mouvements. Ce comportement a déjà été rapporté (27), sur un échantillon de poudre hydratée de RNase A, à des résolutions cependant plus faibles (100 μeV). Les premières mesures de diffusion de neutron sur une IDP, menées sur les caséines (72) ont de même mises en évidence des mouvements confinés, et ce à une résolution de de 30 μeV .

Les temps de corrélations τ_c ($= 1/2\Gamma$) associés à ces mouvements sont respectivement de 220 et 332 ps pour Tau et MBP et 280 K. A 230 K, ils évoluent entre 270 et 520 ps (valeurs des $\Gamma(\mathbf{Q})$ et τ_c) résumées dans le tableau 6.2). A température équivalente, les temps de corrélation de la protéine Tau sont réduits de 30 à 50 %. Une étude en température de ces temps de corrélation permet d'en tirer une énergie d'activation, en étudiant la dépendance en l'inverse de la température. Un graphe du logarithme des temps de relaxation en fonction de l'inverse de la température (figure 6.5) donne une droite, caractéristique d'une loi d'Arrhenius, avec des énergies d'activation de l'ordre de 1.04 kcal.mol⁻¹ pour Tau et 1.48 kcal.mol⁻¹ pour la protéine MBP.

Températures	Tau		MBP	
	Γ (μeV)	τ_c (ps)	Γ	τ_c
280 K	1.49	220	0.99	332
270 K	1.41	230	0.90	365
260 K	1.41	230	0.83	395
250 K	1.35	245	0.77	425
240 K	1.33	248	0.74	445
230 K	1.22	270	0.63	520

TABLE 6.2 – Demi-largeurs moyennes Γ et temps de corrélation τ_c ($=1/2\Gamma$) associés, issus des fits réalisés sur les spectres des protéines Tau et MBP. SPHERES, FRM2, résolution 0.6 μeV .

Les EISF font aussi état de différences entre les deux protéines. Les facteurs de structure incohérents restent similaires jusqu'à 260 K, alors que les mesures à 270 et 280 K sur la protéine Tau montrent des valeurs d'EISF plus faibles que celles de la protéine MBP. Cette différence semble

6.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

traduire à la fois une augmentation du nombre de protons qui apparaissent mobiles dans la fenêtre de l'instrument et une augmentation du rayon de diffusion chez la protéine Tau. A 280 K, on assiste à une augmentation de 12% des populations de protons mobiles par rapport aux niveaux de la MBP (figures 6.2.B, 6.6 et tableau 6.3). On peut noter des valeurs systématiquement supérieures en terme de rayon de diffusion pour la protéine Tau, variant respectivement de 2.9 à 3.14 Å et 2.71 à 3.01 Å pour la Tau et la MBP, pour des températures allant de 230 à 280 K.

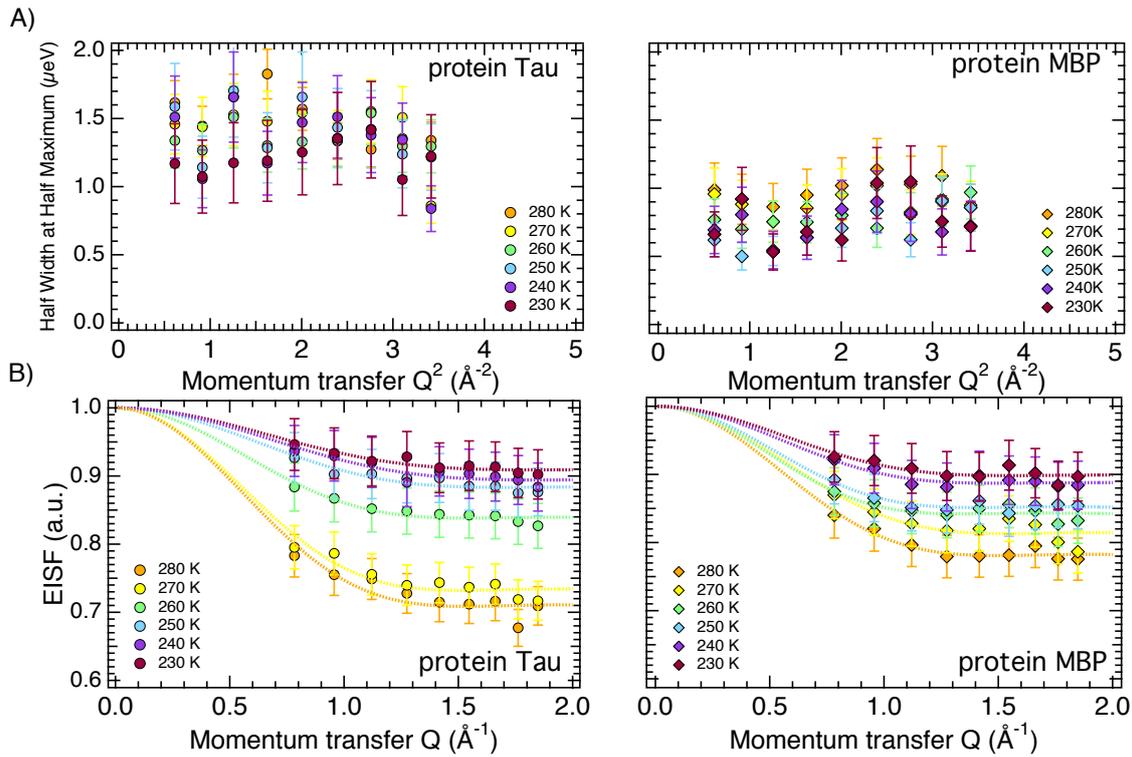


FIGURE 6.2 – A) : Demi-largeurs à mi-hauteur (HWHM) en fonction de Q^2 issues des fits des spectres quasi-élastiques des protéines Tau (cercles pleins) et MBP (diamants pleins), à 230 K (marron), 240 K (violet), 250 K (bleu clair), 260 K (vert), 270 K (jaune) et 280 K (orange). B) : Facteurs de structure incohérents élastiques (EISF) en fonction de Q issus des fits des spectres quasi-élastiques des protéines Tau (cercles pleins) et MBP (diamants pleins), à 230 K (marron), 240 K (violet), 250 K (bleu clair), 260 K (vert), 270 K (jaune) et 280 K (orange). Fit d'une lorentzienne et d'un pic de Dirac, convolués avec la mesure à 20 K. SPHERES, FRM2, résolution $0.6\mu\text{eV}$

6.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

	Tau		MBP		
	a (Å)	p (a.u.)	a	p	
Températures					
	280 K	3.14 ± 0.16	0.71	3.01 ± 0.17	0.79
	270 K	3.12 ± 0.13	0.73	2.94 ± 0.12	0.82
	260 K	3.09 ± 0.10	0.84	2.93 ± 0.13	0.85
	250 K	3.02 ± 0.12	0.88	2.92 ± 0.13	0.86
	240 K	2.94 ± 0.11	0.89	2.78 ± 0.20	0.89
	230 K	2.90 ± 0.14	0.91	2.71 ± 0.17	0.91

TABLE 6.3 – Rayons de diffusion a et fractions de protons immobiles p issus des fits réalisés sur les spectres des couches d'hydratation des protéines Tau et MBP. SPHERES, FRM2, $0.6 \mu\text{eV}$ résolution

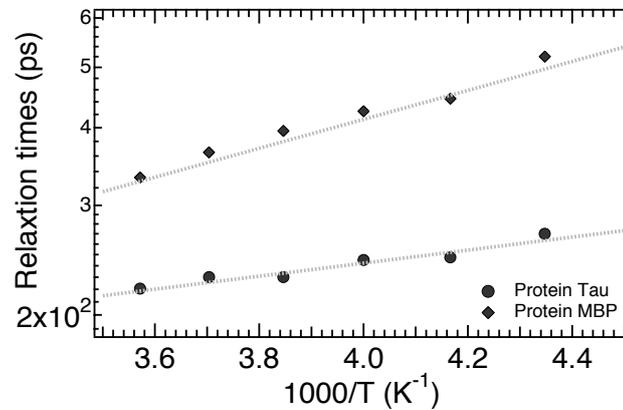


FIGURE 6.5 – Temps de relaxation en représentation d'Arrhenius des protéines Tau (rond plein) et MBP (diamant plein). Un fit linéaire donne des énergies d'activation E_a de l'ordre de $1.04 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour la protéine Tau et $1.48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour la protéine MBP. SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

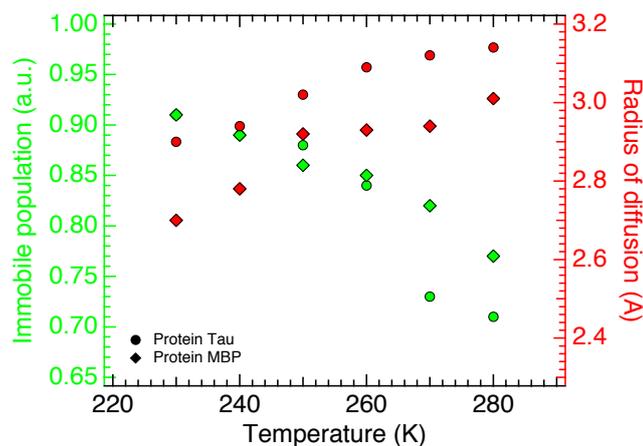


FIGURE 6.6 – Rayons de diffusion a (rouge) et fractions de protons immobiles p (vert) issus des fits réalisés sur les protéines Tau (ronds pleins) et MBP (diamant plein) en fonction de la température. SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

6.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

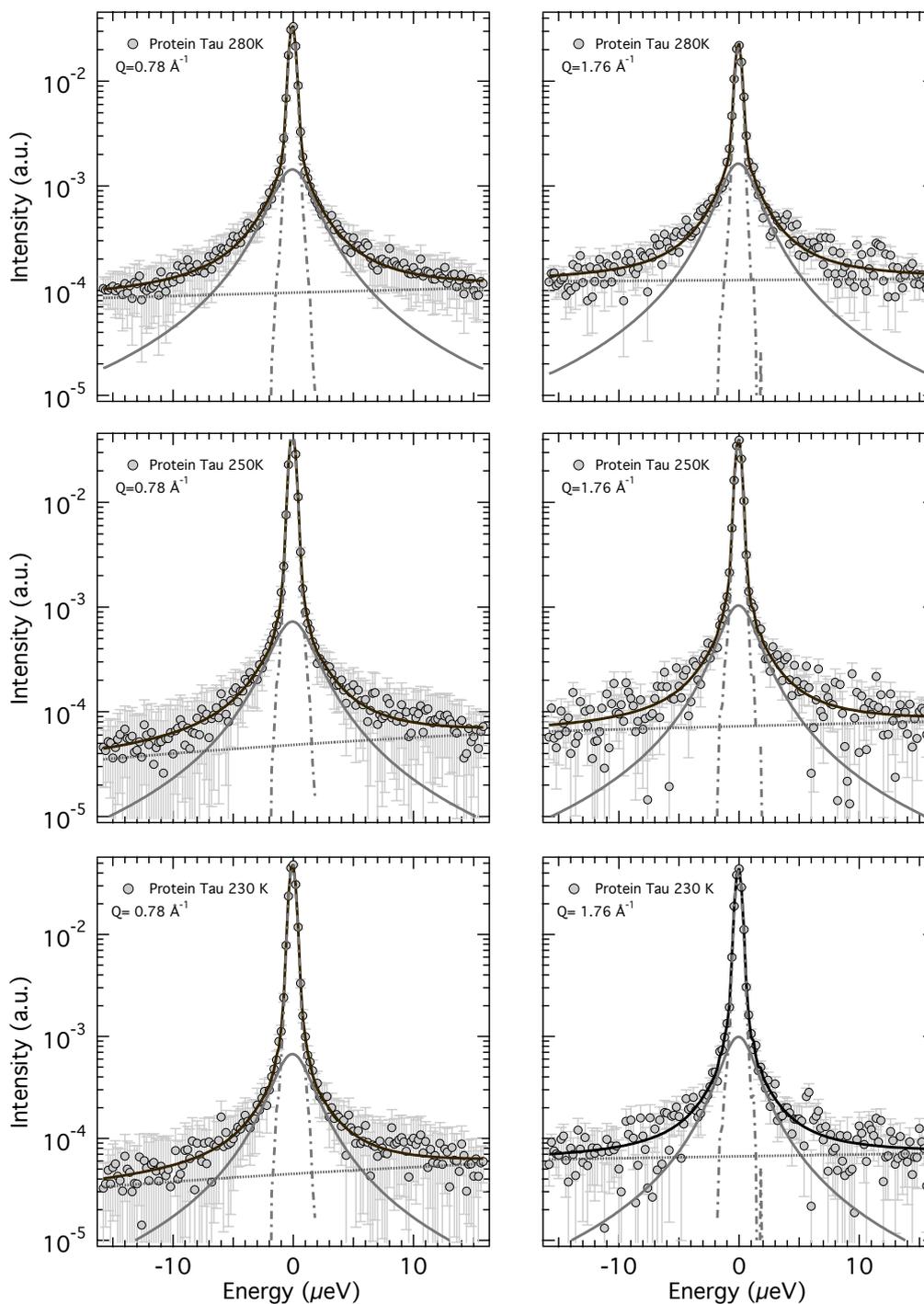


FIGURE 6.3 – Fits des spectres quasi-élastiques de la protéine Tau A) à 280 K, B) à 250 K et C) à 230 K, à des valeurs de Q égales à 0.78 \AA^{-1} (figures de gauche) et 1.70 \AA^{-1} (figures de droite). Données : rond plein. Fit total : trait plein noir. Lorentzienne : trait plein gris. Pic de Dirac : tirets gris. Convolution avec la mesure à 20 K et ajout d'un bruit de fond (pointillés gris). SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

6.2. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE QUASI-ÉLASTIQUE À HAUTE
RÉSOLUTION ($0.6 \mu\text{eV}$) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE MBP

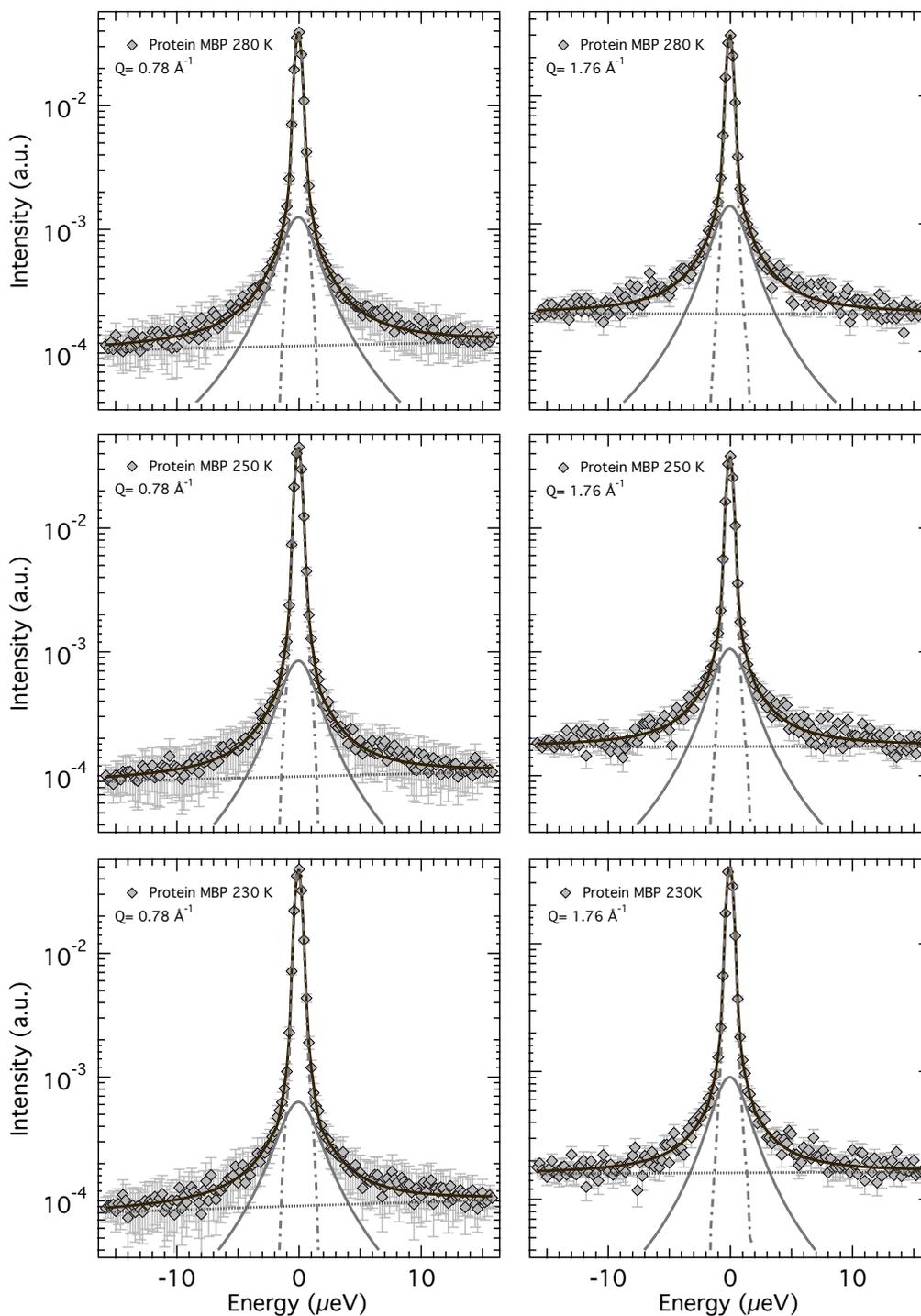


FIGURE 6.4 – Fits des spectres quasi-élastiques de la protéine MBP A) à 280 K, B) à 250 K et C) à 230 K, à des valeurs de Q égales à 0.78 \AA^{-1} (figures de gauche) et 1.70 \AA^{-1} (figure de droite). Données : diamant plein. Fit total : trait plein noir. Lorentzienne : trait plein gris. Pic de Dirac : tirets gris. Convolution avec la mesure à 20 K et ajout d'un bruit de fond (pointillés gris). SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

Les résultats obtenus soulèvent les points suivants :

- Il semble que contrairement aux atomes d'hydrogènes dans les couches d'hydratations, qui adoptent un comportement diffusif à hautes températures, ceux des protéines soient soumis à une géométrie plus restreinte. Ce comportement, observé à toutes les températures est cependant modulé par la nature de la protéine. La protéine intrinsèquement désordonnée semble avoir une dynamique qui ne change que peu avec l'augmentation progressive de la température (diminution de 18% des temps de corrélation entre la plus basse et la plus haute température), avec une valeur de l'ordre de 220 ps vers 280 K et de 270 ps à 230 K. La protéine MBP suit la même tendance, avec cependant des temps de corrélation moyens plus longs, de l'ordre de 332 ps à 280 K et 520 ps à 230 K (36% de diminution entre ces deux températures).
- La relation entre les MSDs et les mesures quasi-élastiques précédents peut être éclaircie avec les résultats obtenus sur les EISF (figure 6.6). Ces derniers font apparaître des rayons de diffusion des hydrogènes de Tau systématiquement plus grands que ceux de la MBP (7% en moyenne) entre 230 et 280 K. De plus, les fractions de protons immobiles sont équivalentes entre 230 et 260 K pour les deux protéines mais divergent au delà de 260 K, avec une diminution plus marquée chez la protéine Tau (10% d'atomes plus mobiles chez Tau par rapport à la MBP à 280 K). Ces modifications de la fraction de protons immobiles sont les seuls marques probantes qui permettent de rendre compte du changement de pente dans les MSDs de Tau. A noter que les résultats obtenus sont cohérents avec la définition de l'intensité élastique, extraite de mesures quasi-élastique (influence de l'EISF développé dans la section 2.4).

A l'instar des couches d'hydratation qui présentent une transition dynamique vers 220 K, les deux protéines font apparaître la leur vers des températures similaires. Dans le chapitre précédent, il a été mentionné que cette transition était couplée à l'apparition des mouvements de translation dans la couche d'hydratation. Dans le cas des protéines, aucun changement de nature des mouvements n'est observé au passage de la transition, qui restent confinés. L'observation de la transition dynamique par diffusion élastique de neutrons se trouve donc corrélée à l'apparition de nouveaux protons mobiles dans la fenêtre du spectromètre. Alors que ce processus se fait de manière continue chez la MBP, le couplage avec le solvant chez la protéine Tau fait que cette proportion d'atomes d'hydrogène augmente de manière plus marquée, plus de protons étant probablement plus exposés au solvant.

6.3 Mesure de diffusion incohérente élastique à basse résolution (80 μeV) sur les échantillons de Tau et de RNase

Les mesures précédentes à haute résolution ont montré des mouvements confinés à travers les protéines (figure 6.2). Les résolutions utilisées ne permettent cependant pas de rendre compte des mouvements plus rapides. Pour dépasser cette limitation, une résolution plus basse a été utilisée sur le spectromètre à temps de vol, IN5. L'instrument a été calibré pour une longueur d'onde de 5 Å, donnant accès à des résolutions de l'ordre de 80-90 μeV . Dans le même contexte que les mesures élastiques sur les protéines Tau et MBP à 0.9 μeV de résolution, des mesures élastiques à 80 μeV ont été réalisées sur la protéine Tau et sur la protéine RNase. Les mesures de diffusion élastique à basse résolution sont issues du travail de thèse de Kathleen Wood (105), et publiées dans (27).

6.3. MESURE DE DIFFUSION INCOHÉRENTE ÉLASTIQUE À BASSE RÉOLUTION (80 μeV) SUR LES ÉCHANTILLONS DE TAU ET DE RNASE

		IN5
Paramètres		
Longueur d'onde		5 Å
Résolution		80 μeV
Temps carac.		~ 10 ps
Q_{max}		2.29 Å ⁻¹
Gamme d'énergie		-0.17/+0.11 meV ¹

TABLE 6.4 – Longueur d'onde, résolution, temps caractéristique, transfert de quantité de mouvement maximale et gamme d'énergie accessibles avec la configuration de l'instruments pour les mesures de diffusion élastique sur la protéine Tau.

Collecte des données Les intensités élastiques des deux échantillons ont été obtenues sur le spectromètre à temp de vol IN5, ILL (tableau 6.4 pour les caractéristiques de l'instrument). L'échantillon, inséré dans un cryostat à température ambiante, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. L'intensité élastique à cette température est collectée pendant une heure. Ces intensités serviront à la normalisation des intensités ultérieurement mesurées. Par la suite, une rampe continue en température, de 20 à 300 K est mise en place. En parallèle, les intensités élastiques sont collectées, avec en moyenne une intensité élastique tout les 3 à 5 K. Les paramètres de collecte des données sont résumés dans le tableau 6.5.

		HTau
Paramètres		
Instrument		IN5
Angle		135°
Température		20-300 K
Durée rampe		10 h
Vitesse rampe		0.46 K.min ⁻¹

TABLE 6.5 – Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de diffusion incohérente élastique sur les échantillons HTau sur IN5 à 80 μeV .

Traitement des données Le traitement des données s'est fait selon les principes développés dans le paragraphe 2.2.1, avec les paramètres présentés dans le tableau 6.6. L'extraction des MSDs s'est faite à partir des logarithmes des intensités corrigées $I_{sample}(Q)$ (normalisées à la basse température et cellule vide soustraite) présentés figure 6.7.B.

		HTau
Gamme de fit		0.25-3.50 Å ⁻²

TABLE 6.6 – Gamme de fit utilisée pour l'extraction des déplacements carrés moyens issus des mesures de diffusion incohérente élastiques sur l'échantillon HTau sur IN5 à 80 μeV .

1. Seul les neutrons situés dans cette gamme d'énergie sont retenus et ensuite sommés pour former un pic élastique à chaque angle. La technique du temps de vol ne permet pas de mesurer directement un pic purement élastique. Une gamme d'énergie la plus restreinte possible est donc choisie pour former un pic élastique.

6.3.1 Résultats et discussion

On peut observer que sur cette gamme de résolution, les MSDs des échantillons HTau_{0.4} et HRNase_{0.4} sont similaires, jusqu'à 260 K, température à partir de laquelle les deux mesures commencent à diverger l'une par rapport à l'autre (figure 6.7.A). A noter de plus que très rapidement, les mouvements de la protéine sortent de la fenêtre de l'instrument. La température de divergence des MSDs correspond à la température de divergence des MSDs de la couche d'hydratation de la protéine Tau, observée à plus haute résolution (figure 6.8).

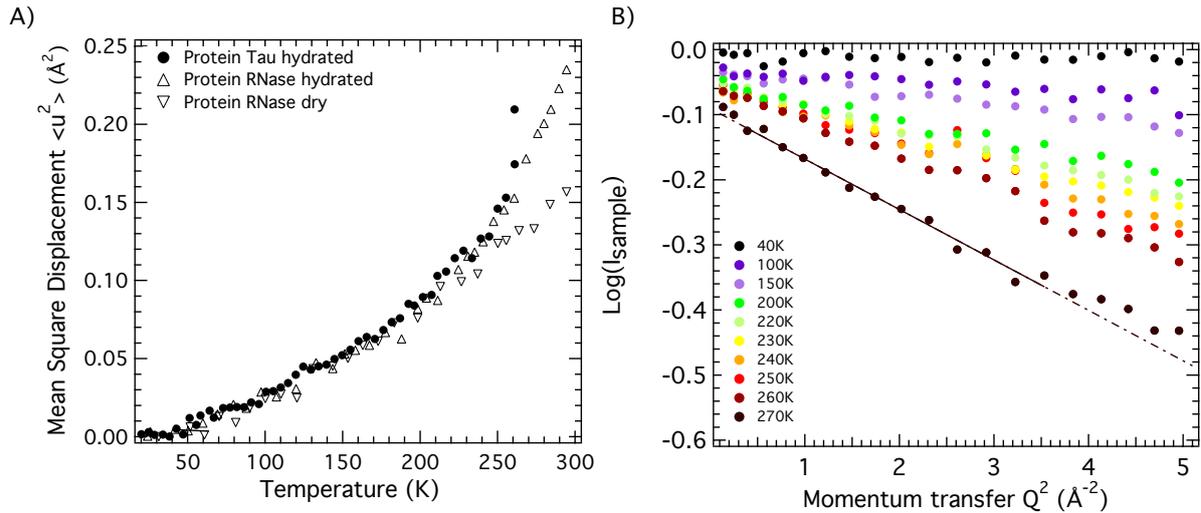


FIGURE 6.7 – A) Déplacements carrés moyens obtenus par des mesure IN5 de diffusion élastique sur HTau (rond plein), HRNase (triangle ouvert) et HRNase_{sec} (triangle inversé ouvert), de 20 à 300 K. B) Logarithme des intensités en fonction de Q^2 de la protéine Tau (cercles pleins). Les traits pleins correspondent au fit linéaire effectué sur la gamme choisie, les traits en pointillés sont les extrapolations du fit à plus hautes valeurs de Q . Les données RNase sont issues de (27) Gamme de fit : $0.25\text{-}3.50 \text{\AA}^{-2}$ pour les échantillons HRNase_{sec}, HRNase_{0.4} et HTau_{0.4}. IN5, ILL, résolution $80 \mu\text{eV}$.

Cette observation semble indiquer la présence de mouvements rapides chez la protéine Tau, mouvements qui se démarquent de ceux de la RNase par le fait de devenir trop rapides au delà d'une température qui coïncide avec la divergence des eaux d'hydratation. Cette constatation laisse à penser que les mouvements rapides dans la protéine Tau ont une plus forte corrélation avec le solvant que ne peuvent l'avoir les mouvements rapides de la protéine RNase avec sa couche d'hydratation.

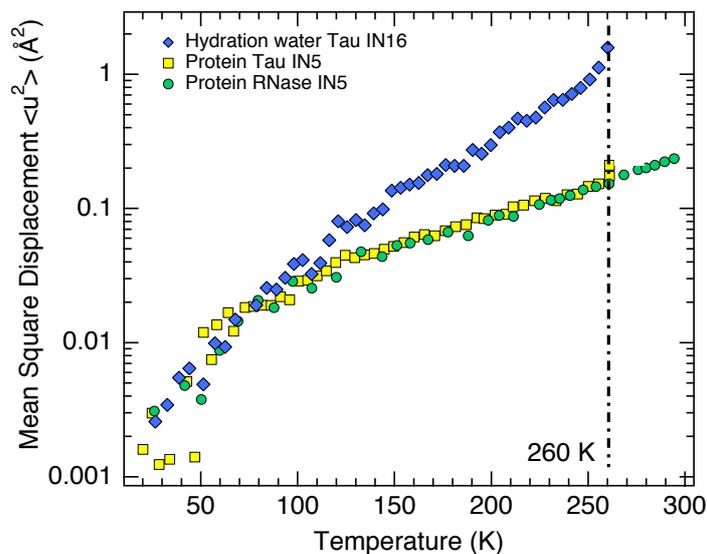


FIGURE 6.8 – Représentation logarithmique des déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 et IN5 de diffusion élastique sur HTau (carré jaune, IN5), DTau (diamant bleu, IN16) et HRNase (rond vert, IN5), de 20 à 300 K. Les MSDs de la RNase sont issues de (27). Gamme de fit : 0.18-1.13 \AA^{-2} pour DTau et 0.25-3.50 \AA^{-2} pour HTau et HRNase. IN16 et IN5, ILL, résolutions 0.9 et 80 μeV respectivement.

6.4 Conclusion

En complément des mesures de diffusion élastique, qui ont montré des différences notables entre les protéines globulaires et celles intrinsèquement désordonnées, les mesures quasi-élastiques ont permis d’avancer dans la compréhension de la dynamique de ces systèmes. L’analyse des demi-largeurs à mi-hauteur a mis en évidence le caractère confiné des mouvements des atomes d’hydrogènes dans les protéines avec cependant des temps de corrélation inférieurs pour la protéine intrinsèquement désordonnée. Ces derniers, qui sont systématiquement inférieurs à ceux de la protéine globulaire sur la gamme de température 230-280 K, ne permettent pas de rendre compte des MSDs observés. La concordance des MSDs dans la gamme 20-250 K pour les deux protéines et leur divergence au delà de 260 K ne se reflète pas dans les temps de corrélation, qui eux, diffèrent d’une protéine à l’autre dans cette gamme de températures. La géométrie des mouvements répond cependant à cette question. L’analyse des facteurs de structure incohérents montre une augmentation de la fraction des atomes vus mobiles par le spectromètre vers 260 K pour la protéine Tau, à cette même température où les MSDs entre les deux protéines divergent. Dans le cas de la protéine globulaire, cette population mobile apparaît à un rythme plus lent.

Résumé des résultats

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont les suivants :

- **Les protéines globulaires et les IDPs présentent des mouvements confinés, en dessous et au dessus de la transition dynamique.** Chez les protéines, la transition dynamique ne met pas en évidence de changement de nature du mouvement, à l'inverse des protons dans les couches d'hydratations.
- **Les temps de corrélation des hydrogènes des IDPs sont de 15 à 30% inférieurs à ceux de la protéine globulaire.**
- **Les IDPs font apparaitre 10 à 12% de protons mobiles supplémentaires à température ambiante.** Les rayons de diffusion de l'atome d'hydrogène chez l'IDP n'augmentent que peu (5%) par rapport à ceux de la protéine globulaire.
- **Les mouvements rapides des IDP (basse résolution) montrent eux aussi des MSDs plus importants au delà de 260 K. Les mouvements associés semblent de plus plus fortement couplés au solvant que ne peuvent l'être ceux des protéines globulaires.**

Perspectives

Cette étude de diffusion quasi-élastique de neutrons sur les échantillons HTau et HMBP à $0.6 \mu\text{eV}$ appelle des mesures et analyses complémentaires, en particulier :

- Des mesures de diffusion quasi-élastique à plus basses résolutions ($80 \mu\text{eV}$), à haute température ($>260 \text{ K}$) afin d'étudier les mouvements rapides des protéines.
- Des mesures quasi-élastiques sur différentes protéines désordonnées et les coupler avec les mesures élastiques, afin de confirmer à la fois le caractère confiné des mouvements dans les protéines mais aussi confirmer l'influence de l'état de repliement sur les temps de corrélation.
- L'étude des spectres quasi-élastiques par un modèle plus fin que la lorentzienne, par exemple une exponentielle étirée. Cette dernière permet de prendre en compte la totalité des processus, sans juger de la nature des mouvements associés.

Dynamique des groupements méthyles par diffusion élastique de neutrons

Sommaire

7.1	Problématiques et motivations	130
7.2	Système biologique : la calbindine	130
7.3	Marquage spécifique de la protéine calbindine	131
7.3.1	Production de la calbindine avec marquages isotopiques	131
7.3.2	Purification de la calbindine	133
7.4	Préparation des échantillons de poudre de protéines pour la diffusion de neutrons	135
7.5	Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons de calbindine marquée	137
7.5.1	Résultats et discussion	137
7.6	Conclusion	140

Ce chapitre, légèrement éloigné des thématiques précédentes, présente l'étude de la dynamique par diffusion élastique de neutrons sur les groupements méthyles (-CH₃) dans les protéines globulaires. Les groupements méthyles représentent une part non négligeable des hydrogènes non échangeables dans une protéine : 20% des hydrogènes totaux chez la protéine MBP, ce qui correspond à 25% de ses hydrogènes non échangeables. L'étude de leur dynamique et de leur influence dans les inflexions à 150 K et la transition dynamique à 220 K est donc des plus pertinentes, d'autant plus que de grosses disparités de dynamiques sont attendues en fonction de l'hydratation de l'échantillon (formation préférentielle d'un coeur hydrophobe avec les groupements méthyles et les acides aminés hydrophobes). Il est possible de produire des échantillons de protéines deutérées avec une grande partie des groupements méthyles hydrogénés, afin d'observer leur dynamique.

Le projet a été initié et est porté par **Kathleen Wood**, en collaboration avec **Renee Otten** et **Frans Mulder** du groupe de RMN de l'*Université de Groningen*, Pays-Bas. Les résultats présentés dans ce chapitre seront proposés à la revue *Angewandte chemie international edition*, sous le titre :

Protein surface and core dynamics display a concerted activation that is dependent on hydration

K. Wood^{*1,2}, F.-X. Gallat^{*3,4,5,6}, R. Otten^{*2}, A. van Heel², M. Lethier^{4,5,6}, L. van Eijck³, M. Moulin^{3,7}, M. Härtlein^{3,7}, M. Weik^{4,5,6,8}, & F. A. A. Mulder²

¹Australian Institute Science and Technology Organisation, Menai NSW Australia; ²Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Nijenborgh 7, Gröningen 9747AG, The Netherlands; ³Institut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, B.P. 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France; ⁴CNRS, UMR5075, F-38027 Grenoble, France; ⁵Université Joseph Fourier, F-38000, Grenoble, France; ⁶Comissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie Structurale, F-38054 Grenoble, France; ⁷ILL-EMBL Deuteration Laboratory, Partnership for Structural Biology, Grenoble; ⁸ESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France.

* These authors contributed equally to this work

Protein surface and core dynamics display a concerted activation that is dependent on hydration

Kathleen Wood, Francois-Xavier Gallat, Renee Otten, Auke J. van Heel, Mathilde Lethier, Lambert van Eijck, Martine Moulin, Michael Haertlein, Martin Weik and Frans A.A. Mulder*

The importance of protein dynamics for biological function is increasingly recognized. Studying protein dynamics as a function of temperature provides information about the underlying energy landscape. At cryo-temperatures proteins behave like harmonic solids, with fluctuations that vary in a linear fashion with temperature^[1]. Biological macromolecules covered with at least one hydration layer exhibit a strong onset in dynamics in the temperature range 180-250 K, as measured by neutron scattering^[1-2] and Mossbauer spectroscopy^[3], amongst other techniques^[4]. The increase in dynamics was termed the ‘protein dynamical transition’ and interpreted as the temperature at which the protein populates states of higher energy^[1]. Although biological activity below the

transition temperature was measured in certain systems^[5], the increased conformational flexibility above the transition temperature is generally thought to correlate with the onset of biological function^[6]. The underlying microscopic nature of the transition^[7] and its interpretation in terms of protein energy landscape is still under much debate^[7b, 8]. The importance of the surrounding solvent in protein dynamics is widely recognized^[9], but the mechanism of interaction between the hydration shell and protein is still an open question^[8a, 10]. Notably, it is not known if both the surface and buried residues undergo the same hydration-dependent transition. Herein a protein dynamical transition is specifically observed in two separate atomic groups: buried in the hydrophobic core and on the solvent accessible surface. We find that probes of dynamics in the protein’s interior and on the surface display comparable behaviors as a function of temperature, and a similar response to hydration.

Elastic incoherent neutron scattering can be used to assess the atomic mean square displacements [MSD] of proteins over a wide temperature range. The measured signal for a natural abundance sample is dominated by scattering from hydrogen nuclei, which are relatively evenly distributed throughout a protein, and the global average dynamics of the sample is therefore probed. Hydrogen’s heavier isotope deuterium is a weak incoherent scatterer however, and by labeling specifically with hydrogen and deuterium it is possible to mask the contribution of the deuterated components.

[*] Prof. Dr. F.A.A. Mulder
Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) and
Department of Chemistry
University of Aarhus
Langelandsgade 140, DK-8000, Aarhus C (Denmark)
Fax: (+45) 86 196199
E-mail: fmulder@chem.au.dk
Homepage: bionmr.chem.au.dk

Dr. K. Wood^[‡]
Australian Nuclear Science and Technology Organisation
Bragg Institute Menai NSW (Australia)

Dr. K. Wood^[‡], Dr. R. Otten^[‡], A.J. van Heel, Prof. Dr.
F.A.A. Mulder
Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology
Institute, University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG,
Groningen (The Netherlands)

Dr. F.X. Gallat^[‡], M. Lethier, Dr. L. van Eijck, M. Moulin, Dr.
M. Haertlein
Institut Laue Langevin
6, rue Jules Horowitz
38042 Cedex 9 Grenoble (France)

Dr. F.X. Gallat^[‡], M. Lethier, Dr. M. Weik
Commissariat à l’Energie Atomique, Institut de Biologie
Structurale, F-38054 Grenoble (France); CNRS, UMR5075,
F-38027 Grenoble; Université Joseph Fourier, F-38000
Grenoble.

[‡] These authors contributed equally

[**] This work has benefitted from the activities of the DLAB consortium funded by the EU under contracts HPRI-2001-50065 and RII3-CT-2003-505925, and from UK EPSRC-funded activity under grants GR/R99393/01 and EP/C015452/1. The authors thank the ILL for beamtime and Bernhard Frick for his continuous support. MW and FAAM thank EGIDE and NOW for funding. KW acknowledges funding from the access to major research facilities program, supported by the Commonwealth of Australia under the International Science Linkages program. Financial support by the CEA, the CNRS and the UJF is acknowledged, as well as a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-027) to MW and an ILL PhD fellowship to FXG.

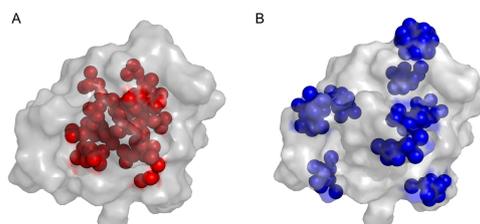


Figure 1. Molecular model (PDB ID 4ICB)^[11] of specifically labeled calbindin D_{9k} samples. Deuterated residues are shown as a grey outline and labeled hydrogen atoms as colored spheres. A) Deuterated calbindin D_{9k} with protonated methyl groups of valine and leucine residues, called Val/Leu-calbindin. B) Deuterated calbindin D_{9k} with protonated lysine residues, called Lys-calbindin. In both cases, the labeled hydrogen atoms contribute 85% of the incoherent neutron scattering in the dry state and 77% in the hydrated state (see Table S1).

In the present study, we produced two specifically H/D labeled samples, one with a probe of dynamics on the ‘inside’ and the other with a probe on the ‘outside’ of the protein. Calbindin D_{9k} P43G^[12] contains 90 hydrogen atoms in lysine side chains and 90 hydrogen atoms in the methyl groups of valine and leucine residues (see supplementary information S1). As can be seen in figure 1A, the



Supporting information for this article is available on the

methyl groups of valine and leucine residues are buried in the hydrophobic core of the protein. In contrast, the lysine residues are all on the protein's surface, as can be seen in figure 1B. These two atomic groups therefore provide us with probes of internal and surface dynamics, respectively.

Deuterated calbindin D_{9k} with the methyl groups of valine and leucine residues protonated (Val-[γ 1, γ 2- 1H_6]/Leu-[δ 1, δ 2- 1H_6]-calbindin), called 'Val/Leu-calbindin', was produced using a deuterated culture medium supplemented with partially deuterated α -ketoisovaleric acid. To compare the dynamics to the lysine residues, we produced deuterated calbindin D_{9k} with protonated lysine residues (Lys-[α , β , γ , δ , ϵ - 1H_6]-calbindin), called 'Lys-calbindin' using a deuterated medium and an excess of [1H]-lysine. Sample quality was assessed by NMR spectroscopy, where it was established that all of the labeling occurred as expected, and no scrambling to other amino acids during biosynthesis was observed (see Figure 2)^[13]. A full description of the sample preparation is given in the supplementary material S2.

The specifically labeled samples were measured as powders in two states: dry and hydrated to 0.44 gram of D_2O per gram of protein using the IN16 backscattering spectrometer at the Institut Laue Langevin^[14]. IN16 probes motions on a timescale faster than ~ 1 ns and on the \AA length scale. The elastically scattered neutrons were recorded as a function of temperature and the atomic MSD were extracted as described in the supplementary material S3.

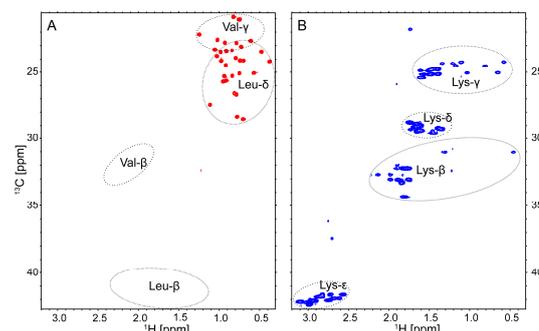


Figure 2. Natural abundance [1H - ^{13}C]-HSQC NMR spectra of the specifically labeled samples of (A) Val/Leu-calbindin and (B) Lys-calbindin^[13]. In the case of Lys-calbindin the $H\alpha$ -positions are fully protonated as expected, but are not shown in panel B.

Figures 3A and 3B show the extracted MSD for Val/Leu-calbindin and Lys-calbindin, respectively, each in both the dry and hydrated states. In the two specifically labeled samples qualitatively similar responses to hydration are observed. At temperatures below 200 K, similar MSD are obtained for both dry and hydrated samples. Between 210 and 230 K the hydrated samples begin to show increased dynamics compared to the dry samples, and a steep increase in MSD is observed for both hydrated samples around 250 K, characteristic of the protein dynamical transition. The hydrated samples are plotted for comparison together in figure S4A, where their close temperature dependence can be clearly seen. An onset of dynamics at ~ 250 K for both hydrated samples is also evident in the raw data from which the MSD are extracted, the elastic intensity, and is shown in figure S5A. The data show that probes of dynamics buried in the protein's hydrophobic core and on the solvent exposed exterior are both sensitive to hydration, and

undergo a hydration-dependent transition in the same temperature range.

The extracted MSD for the two labeled samples presented here, are larger than previously reported values for other natural abundance proteins under the same conditions^[9c, 9f, 15]. When natural abundance samples are measured, global dynamics of the entire proteins is probed, including backbone and all side chains and the resulting MSD are significantly smaller than the labeled groups measured here. The methyl groups at the end of leucine and valine side chains and lysine residues are significantly more mobile than the average protein. The data presented in figure 3 can also be compared to the dynamics of water at the surface of a protein, measured under the same conditions^[9c, 9f], which displays surprisingly similar temperature dependence to the hydrated labeled samples measured here. The result shows that with the onset of water dynamics, both side chains in the interior and exterior show parallel increases in dynamics.

In both the dry and hydrated samples, the labeled methyl groups have increased dynamics compared to the lysine residues above 150 K (see supplementary information S4 and S5 for comparisons). An increase in global protein MSD at ~ 150 K was earlier assigned to methyl group rotation^[16], which enters the 1 ns timescale accessible by backscattering spectrometers at this temperature^[17]. The data from the specifically labeled Val/Leu-calbindin sample further substantiates that the increase in dynamics at 150 K is due to methyl group rotation, since above this temperature the Val/Leu-calbindin sample has increased MSD compared to the Lys-calbindin.

Above the dynamical transition temperature, protein MSD depend strongly on the hydration level of the sample^[18] and the type of solvent^[19]. Below the transition however, several studies have shown that increased hydration can result in a reduction in dynamics compared to a dry sample^[2, 18b, 20]. In Figure 3A, in the temperature region 120 - 220 K, a slightly lower MSD of the hydrated Val/Leu-calbindin sample is observed compared to the dry sample. Although a small effect, the data seem to indicate that at these low temperatures, in the presence of hydration water, dynamics in the protein interior are dampened compared to the dry state, and water molecules exert a stiffening force on the protein. The observation again underlines how protein dynamics, and therefore the protein energy landscape, differ over a wide temperature range when the system is modified by the addition of water molecules.

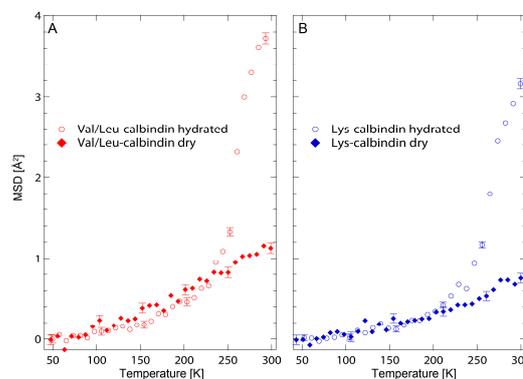


Figure 3. Mean square displacements extracted from neutron scattering A) deuterated calbindin D_{9k} with protonated methyl groups of valine and leucine residues (Val/Leu-calbindin) B) Deuterated calbindin D_{9k} with protonated lysine residues (Lys-calbindin).

A hydration-dependent transition was also observed for a subset of residues in the membrane protein bacteriorhodopsin^[21], where residues in the proton channel were found to be sensitive to hydration. The data presented here show for the first time a response to hydration for atomic groups buried in the protein's hydrophobic interior and on the exterior, and a parallel onset of dynamics for both. An increase in dynamics is observed in two samples where scattering is dominated either by methyl groups or lysine residues, in a temperature range where such an onset is typically called a dynamical transition. The transition is a 'global' one, and not restricted to solvent accessible residues. Lysine residues and the methyl bearing side chains studied here can populate different rotameric states. Our data are consistent with a model in which side chains, both on the surface and in the interior of a sufficiently hydrated protein, can interconvert between different rotameric states if they have sufficient thermal energy^[7], leading to a strong increase in atomic MSD measured by neutron scattering.

Experimental Section

The supplementary material contains details of sample preparation, measurements and additional data plots.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: Neutron Spectroscopy · Proteins · Isotopic Labeling · Protein Dynamical Transition · Hydration

-
- [1] W. Doster, S. Cusack, W. Petry, *Nature* **1989**, 337, 754-756.
 [2] J. Fitter, *Biophys. J.* **1999**, 76, 1034-1042.
 [3] F. Parak, E. W. Knapp, D. Kucheida, *J. Mol. Biol.* **1982**, 161, 177-194.
 [4] aF. Lipps, S. Levy, A. G. Markelz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**; bB. F. Rasmussen, A. M. Stock, D. Ringe, G. A. Petsko, *Nature* **1992**, 357, 423-424.
 [5] aR. M. Daniel, J. C. Smith, M. Ferrand, S. Hery, R. Dunn, J. L. Finney, *Biophys. J.* **1998**, 75, 2504-2507; bJ. M. Bragger, R. V. Dunn, R. M. Daniel, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1480, 278-282.
 [6] aM. Ferrand, A. J. Dianoux, W. Petry, G. Zaccai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9668-9672; bH. Lichtenegger, W. Doster, T. Kleinert, A. Birk, B. Sepiol, G. Vogl, *Biophys. J.* **1999**, 76, 414-422; cA. Ostermann, R. Waschipky, F. G. Parak, G. U. Nienhaus, *Nature* **2000**, 404, 205-208.
 [7] aA. L. Lee, A. J. Wand, *Nature* **2001**, 411, 501-504; bL. Hong, N. Smolin, B. Lindner, A. P. Sokolov, J. C. Smith, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, 107, 148102.
 [8] aW. Doster, S. Busch, A. M. Gaspar, M. S. Appavou, J. Wuttke, H. Scheer, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, 104; bR. D. Young, H. Frauenfelder, P. W. Fenimore, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, 107, 158102; cT. Becker, J. A. Hayward, J. L. Finney, R. M. Daniel, J. C. Smith, *Biophys. J.* **2004**, 87, 1436-1444; dW. Doster, *Eur. Biophys. J.* **2008**, 37, 591-602; eS. Magazu, F. Migliardo, A. Benedetto, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 7736-7743.
 [9] aE. Cornicchi, G. Onori, A. Paciaroni, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 95, 158104; bA. M. Tsai, D. A. Neumann, L. N. Bell, *Biophys. J.* **2000**, 79, 2728-2732; cK. Wood, A. Frolich, A. Paciaroni, M. Moulin, M. Hartlein, G. Zaccai, D. J. Tobias, M. Weik, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4586-4587; dD. Vitkup, D. Ringe, G. A. Petsko, M. Karplus, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 34-38; eC. U. Kim, M. W. Tate, S. M. Gruner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 20897-20901; fF. X. Gallat, A. Laganowsky, K. Wood, F. Gabel, L. Van Eijck, J. Wuttke, M. Moulin, M. Haertlein, H. Eisenberg, J. P. Colletier, G. Zaccai, M. Weik, *Biophys. J.* **2012**, 103, 129-136.
 [10] S. H. Chen, L. Liu, E. Fratini, P. Baglioni, A. Faraone, E. Mamontov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9012-9016.
 [11] L. A. Svensson, E. Thulin, S. Forsen, *J. Mol. Biol.* **1992**, 223, 601-606.
 [12] J. Kordel, S. Forsen, T. Drakenberg, W. J. Chazin, *Biochemistry* **1990**, 29, 4400-4409.
 [13] N. A. Oktaviani, R. Otten, K. Dijkstra, R. M. Scheek, E. Thulin, M. Akke, F. A. A. Mulder, *Biomol. NMR Assignments* **2011**, 5, 79-84.
 [14] B. Frick, M. Gonzalez, *Phys. B (Amsterdam, Neth.)* **2001**, 301, 8-19.
 [15] K. Wood, C. Caronna, P. Fouquet, W. Haussler, F. Natali, J. Ollivier, A. Orecchini, M. Plazanet, G. Zaccai, *Chem. Phys.* **2008**, 345, 305-314.
 [16] aJ. H. Roh, V. N. Novikov, R. B. Gregory, J. E. Curtis, Z. Chowdhuri, A. P. Sokolov, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 95, 038101; bJ. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, A. P. Sokolov, *Biophys. J.* **2006**, 91, 2573-2588; cG. Schiro, C. Caronna, F. Natali, A. Cupane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1371-1376.
 [17] aK. Wood, D. J. Tobias, B. Kessler, F. Gabel, D. Oesterhelt, F. A. A. Mulder, G. Zaccai, M. Weik, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4990-4991; bW. Doster, M. Settles, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1749, 173-186.
 [18] aU. Lehnert, V. Reat, M. Weik, G. Zaccai, C. Pfister, *Biophys. J.* **1998**, 75, 1945-1952; bH. Nakagawa, Y. Joti, A. Kitao, M. Kataoka, *Biophys. J.* **2008**, 95, 2916-2923.
 [19] aV. Reat, R. Dunn, M. Ferrand, J. L. Finney, R. M. Daniel, J. C. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9961-9966; bE. Cornicchi, M. Marconi, G. Onori, A. Paciaroni, *Biophys. J.* **2006**, 91, 289-297.
 [20] M. Diehl, W. Doster, W. Petry, H. Schober, *Biophys. J.* **1997**, 73, 2726-2732.
 [21] K. Wood, U. Lehnert, B. Kessler, G. Zaccai, D. Oesterhelt, *Biophys. J.* **2008**, 95, 194-202.

7.1 Problématiques et motivations

Lors d'expériences de diffusion élastique de neutrons, de nombreux échantillons font apparaître vers des températures proches de 100-150 K un changement notable de pente dans les MSDs (figure 3.14.C). Cette inflexion, particulièrement visible dans les mesures effectuées sur la membrane pourpre (30, 31) semble trouver son origine dans un effet de résolution de l'instrument. Vers des températures de 150 K, la rotation des méthyles devient suffisamment rapide pour être observée, ce qui explique la baisse d'intensité élastique à ces températures. Les lipides environnant la bactériorhodopsine possèdent un grand nombre de ces groupements, ce qui explique le caractère franc de l'inflexion observée dans les mesures élastiques. On retrouve aussi ce changement de dynamique chez la plupart des protéines globulaires, mais de manière moins marquée (106). Des mesures sur des poly-acides aminés, possédant ou non des groupements méthyles, appuient ces conclusions (107) :

- Les polymères d'acides aminés pouvaient ou non présenter une inflexion vers 150 K selon la nature de leur chaîne latérale. Des polymères d'alanines et d'isoleucines semblent présenter cette inflexion, ce qui n'est pas le cas ni de polymères du type poly-glycine ou poly-phénylalanine (107).
- Les protéines montrent ce même comportement vers 100-150 K (106, 107).
- Cette inflexion est observée, même en absence d'une couche d'hydratation autour des acides aminés.

L'ensemble de ces observations incite à penser que cette inflexion est due à la présence de groupements méthyles. Le caractère hydrophobe de ces groupements permet d'expliquer la présence de cette inflexion, malgré l'absence d'une couche d'hydratation (échantillon sec). Les acides aminés qui présentent cette inflexion sont ceux qui possèdent des groupements méthyles (alanine et isoleucine). La glycine, qui ne possède pas de chaîne latérale et la phénylalanine (chaîne latérale de haut poids moléculaire) permettent de conforter cette hypothèse.

A l'inverse, les ARN de transfert (108) et les couches d'hydratation (26, 31, 109) ne présentent pas cette inflexion (quoique les travaux de (110) suggèrent la corrélation entre l'inflexion à 150 K dans les protéines et l'apparition d'une dynamique rotationnelle dans la couche d'hydratation). Des études récentes de dynamique moléculaire (30), de RMN (111) et de diffusion de neutrons sur la membrane pourpre (30) ont confirmé que les rotations des groupements méthyles étaient en grande partie responsables de cette inflexion.

L'objectif de cette étude a été de mettre en évidence de manière expérimentale cet effet chez les protéines globulaires par marquage isotopique des groupements $-CH_3$ des résidus valines et leucines par diffusion élastique de neutrons. Le point de comparaison se fera avec l'étude des chaînes latérales des résidus lysines. Ces dernières ne possèdent en effet pas de groupement méthyle.

7.2 Système biologique : la calbindine

L'étude de la dynamique des groupements méthyle s'est faite avec la protéine calbindine-D_{9k}, une protéine de liaison au calcium¹ dépendante de la vitamine D (niveau d'expression régulé par cette dernière). La protéine est majoritairement présente dans les entérocytes, mais peut aussi se retrouver dans les reins et l'utérus. La calbindine-D_{9k} facilite le transport du calcium à travers l'entérocyte, sans augmenter la concentration en calcium libre dans la cellule. Cette protéine est de plus

1. par l'intermédiaire de deux motifs *EF-hands*

une des protéines modèle en RMN.

Deux formes de la calbindine sélectivement marquées ont été produites par l'étudiant au DLAB :

- o Une première totalement deutérée, à l'exception des groupements méthyles des chaînes latérales des valines et des leucines, qui eux sont hydrogénés. Comme le montre la figure 7.1.B, les groupements méthyles s'ordonnent de manière préférentielle au niveau du coeur de la protéine. Les groupements méthyles seront donc une bonne sonde de la dynamique des zones profondes et hydrophobes des protéines. On nommera cet échantillon **HMeth/DCB/D₂O** ou **HMeth/DCB hydrated**.
- o Un deuxième échantillon qui consiste en la calbindine totalement deutérée, à l'exception des lysines, totalement hydrogénées. Cet échantillon fait office de contrôle, les lysines ne possédant pas de groupement méthyles et leur chaîne latérale sont préférentiellement tournées vers l'extérieur, comme montré sur la figure 7.1.A. L'échantillon sera noté **HLys/DCB/D₂O** ou **HLys/DCB hydrated**

Les deux formes marquées de la protéine seront étudiées chacune à deux taux d'hydratation, 0 et 0.4 D₂O/g H-Protéine. Les mesures à taux d'hydratation nul et de 0.4 H₂O/g H-Protéine permettent d'étudier l'influence de l'hydratation sur des zones qui ne sont pas exposées au solvant.

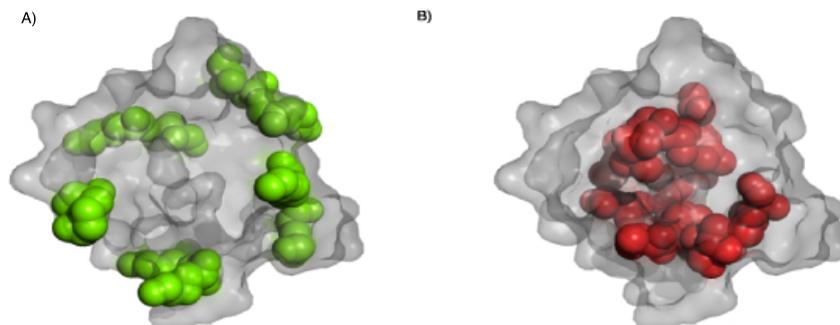


FIGURE 7.1 – A) Structure de la calbindine (surface grise) avec les résidus lysines (vert). Mise en évidence d'une organisation superficielle. B) Structure de la calbindine (surface grise) avec les résidus valine et leucine (rouge). Mise en évidence d'un coeur hydrophobe en majorité composé des groupements méthyles.

Le travail de l'étudiant dans cette étude a consisté en la préparation (production et purification des protéines) des deux échantillons marqués isotopiquement en collaboration avec **Mathilde Lethier** (DYNAMOP, IBS) au DLAB et de mesures partielles de ces échantillons sur IN16 et SPHERES. Les protocoles de production et de purification de la protéine ont été fournis par **Renee Otten**, **Auke van Heel** et **Frans Mulder**.

7.3 Marquage spécifique de la protéine calbindine

7.3.1 Production de la calbindine avec marquages isotopiques

Marquage avec les méthyles hydrogénés Afin d'étudier la dynamique des groupements méthyle dans les protéines, le protocole de marquage isotopique suivant a été adopté :

- Culture de bactéries en milieu minimum complètement deutéré jusqu'à obtenir une DO proche de 10-12.
- Une heure avant induction (DO \sim 12), introduction d'un précurseur, l' α -kétisovalérate ou 2-oxoisovalérate, de formule chimique $(\text{CH}_3)_2\text{CD-CO-COOD}$, à 1 g/l dans le fermenteur. La préparation du précurseur est la suivante :
 - Le précurseur complètement hydrogéné (5 g de $(\text{CH}_3)_2\text{CH-CO-COOH}$) est repris dans un tampon 200 ml D_2O , 0.6 g KH_2PO_4 et 1.2 g Na_2HPO_4 , pD 12.5.
 - La solution est incubée pendant 3 h à 45 °C. Durant cette étape, les hydrogènes sont échangés avec le deutérium de la solution, à l'exception des méthyles.
 - Une fois l'échange effectué, le pD de la solution est descendu à 7.5. On obtient le précurseur utile pour le marquage des méthyles ($(\text{CH}_3)_2\text{CD-CO-COOD}$).
- Le fermenteur est induit vers une DO de 14 pendant 6 h avec 0.5 mM IPTG. Il est recommandé de ne pas dépasser 6 h d'induction à 37 °C afin d'éviter une utilisation autre du précurseur par la bactérie (*metabolic scrambling*).

Ce protocole permet d'hydrogéner 78% des groupements méthyles d'une protéine, le précurseur se situant très proche dans la chaîne terminale de l'anabolisme de ces acides aminés (figure 7.2, voies rouge et verte). Cependant, il ne permet pas par exemple d'obtenir ceux des isoleucines, pourtant proches en structure de la leucine. Le marquage isotopique de ces derniers pourrait se faire en utilisant un second précurseur (figure 7.2, voie orange), le (S) 3-méthyl-2-oxopentanoate ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CHCH}_3\text{-CO-COOH}$). Son utilisation présente un inconvénient : le groupement $-\text{CH}_2$ ne sera pas échangé, même en conditions basiques, et restera sous sa forme hydrogénée. Il est possible de remonter plus loin dans le métabolisme de l'isoleucine pour trouver un précurseur plus simple que le (S) 3-méthyl-2-oxopentanoate, afin de s'affranchir de ce problème. La contrepartie de cette approche sera l'hydrogénation d'un seul des deux groupements méthyles, le second restant deutéré.

Les autres acides aminés présentant des groupements méthyles, à savoir l'alanine, la méthionine et la thréonine ne peuvent être incorporés simplement dans une protéine avec leurs méthyles hydrogénés. L'obtention d'alanine avec son $-\text{CH}_3$ hydrogéné ($\text{CH}_3\text{-CDND}_2\text{-COOD}$) requiert l'utilisation du pyruvate sous la forme $\text{CH}_3\text{-CO-COOD}$. La molécule de pyruvate, aisément accessible, est cependant beaucoup trop central dans le métabolisme d'une bactérie pour pouvoir être utilisée (marquage non spécifique). La forme utile de la thréonine ($\text{CH}_3\text{-CDOD-CDND}_2\text{-COOD}$) nécessite de la glycine totalement deutérée ($\text{ND}_2\text{-CD}_2\text{-COOD}$), ainsi que que l'acétaldéhyde (éthanal) $\text{CH}_3\text{-CDO}$. L'éthanal est une fois de plus trop central dans le métabolisme de la bactérie (impliqué dans la formation de l'acétyl-CoA) et donc inadapté. Quant à la méthionine ($\text{CH}_3\text{-S-CD}_2\text{-CD}_2\text{-CDND}_2\text{-COOD}$), aucune voie métabolique simple n'est envisageable. Le recours à une synthèse chimique de l'acide aminé est nécessaire.

A noter que le protocole d'hydrogénation permet de plus d'isoler une sous-population relativement homogène en dynamique. Il a été montré par RMN que les temps de corrélation des groupements méthyles des leucines et des valines étaient relativement similaires (respectivement 38 et 100 ps à 37 °C), contrairement à ceux des méthionines, qui présentent de plus grandes disparités (112).

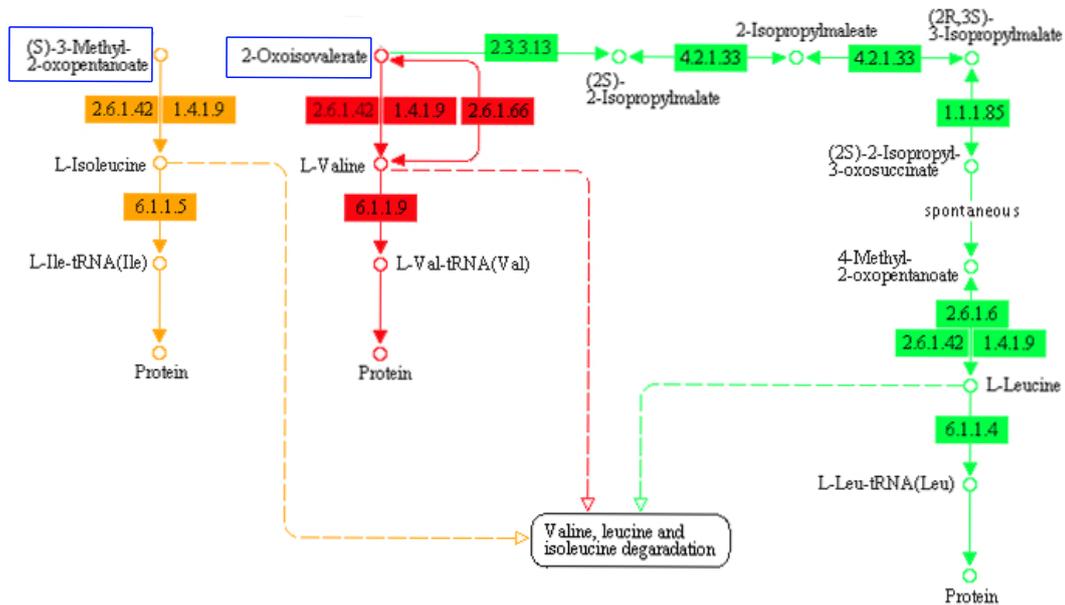


FIGURE 7.2 – Voies métaboliques mises à profit pour le marquage sélectif des groupements méthyles des acides aminés valines (rouge) et leucines (verte). En orange est présentée une troisième voie métabolique pour le marquage des groupements $-CH_3$ des isoleucines. Cette troisième voie n'a cependant pas été utilisée car elle incorpore des groupements méthylènes sous leur forme hydrogénés. Image tirée de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00290.html> et modifiée.

Une fois produite, la pâte bactérienne est traitée selon le protocole décrit ci-dessous afin d'extraire et purifier la protéine.

Marquage avec les lysines hydrogénés dans les protéines deutérées Afin d'étudier la dynamique des lysines dans la protéine calbindine, il a été utilisé une souche de bactérie auxotrophe en lysine (qui ne synthétise pas de lysine par elle-même), dans un milieu de culture supplémenté par 0.5 g/L de solution de D_2O et de poudre de lysine hydrogénée. Une induction de 12 h à 0.5 mM IPTG a été ensuite réalisée. Ici encore, une durée limitée d'induction est recommandée pour éviter une dégradation de la lysine par la bactérie et une réutilisation des produits de dégradation, ce qui générerait un marquage non spécifique.

7.3.2 Purification de la calbindine

La calbindine a été purifiée en trois étapes selon le protocole et avec les tampons suivants :

Les cellules après culture ont été récoltées par centrifugation et reprises dans 10 mL de tampon de lyse par litre de culture. Des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés et incubés 30 min à 4 °C. La lyse complète des membranes a ensuite été réalisée par sonication sur glace. Une seconde étape de purification a consisté en le chauffage de la suspension de bactéries soniquées pendant 5 min à 95 °C. Une étape de centrifugation à $50\,000 \times g$ pendant 30 min permet de séparer les débris membranaires de la fraction soluble. Cette dernière a été ensuite incubée avec une résine échangeuse d'anions Q Sepharose, lavée par du tampon de lyse et éluée avec un gradient de 0 à 1 M NaCl (élution de la calbindine vers 150-200 mM). Les fractions contenant la calbindine ont été mises en évidence sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine 12% (figure 7.3) et rassemblées. S'en est suivi un chargement sur une colonne d'exclusion de taille Hiload 16/60 Superdex 75 préalablement équilibrée en eau. La protéine

éluée est ensuite lyophilisée (refroidissement à l'azote liquide suivi d'une sublimation).

La poudre de protéine est reprise dans une solution de D₂O, 1 M CaCl₂² en quantité suffisante pour avoir un excès de trois en molarité par rapport à la quantité de protéine. Cette étape permet de s'assurer de la saturation des sites de fixation du calcium, tout en limitant la quantité de calcium restant dans la poudre finale de protéine.

La solution de protéine est ensuite chauffée à 95 °C pendant 1 h pour s'assurer de l'échange de la totalité des hydrogènes labiles restants. Cette étape permet en plus de retirer les derniers contaminants. Une centrifugation à 50 000 × g permet de récupérer la fraction soluble qui sera lyophilisée une seconde fois.

Les tampons suivants ont été utilisés :

Tampons		Méthyles	Lysines
	Lyse	20 mM Tris pH 8.0	20 mM Tris pH 8.0
	Elution	200 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0	200 mM NaCl 20 mM Tris pH 8.0
	Exclusion de taille	H ₂ O	H ₂ O
	Lyophilisation	H ₂ O puis D ₂ O	H ₂ O puis D ₂ O

TABLE 7.1 – Composition des tampons pour la purification de la calbindine pour les marquages des méthyles et des lysines hydrogénés.

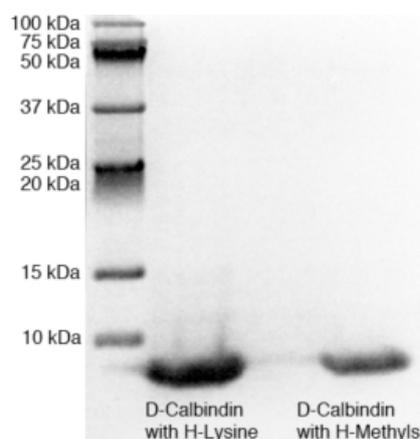


FIGURE 7.3 – Gel SDS PAGE Tris Tricine 12% de pureté finale des deux formes deutérées de la calbindine, avec les méthyles et les lysines hydrogénés

2. La préparation d'une solution de CaCl₂ nécessite de partir d'une poudre de CaCl₂.2H₂O. La poudre commerciale est reprise en D₂O puis passé au rotavapor. Cette étape est réalisée trois fois pour s'assurer un échange complet des hydrogènes labiles.

Vérification du marquage isotopique L'efficacité du marquage isotopique pour les deux échantillons a été vérifié par Renee Otten, à l'université de Groningen, par RMN du proton, avec une séquence HSQC ^1H - ^{13}C . Une séquence HSQC ^1H - ^{13}C permet de mettre en évidence un couplage entre les atomes d'hydrogènes du groupement méthyle et le carbone qui porte le groupement. Les atomes de deutérium ayant un spin de 1, ils n'apparaissent pas dans le spectre. On a là une manière directe de quantifier l'efficacité du marquage. Pour ces mesures, il a été utilisée l'abondance naturelle en ^{13}C pour l'application de la séquence HSQC. La figure 7.4 montre le résultat du spectre obtenu. Les pics rouges correspondent aux protons des groupements méthyles des valines et des leucines, les pics bleus correspondent aux protons des lysines complètement hydrogénées de la protéine. On constate que la totalité des pics associés aux lysines apparaissent, d'où une efficacité de marquage de 100%. Par contre, il manque certains signaux pour les méthyls des lysines et des valines, en particulier dans les *EF-hands* ($\omega_{^{13}\text{C}}$ vers 42 ppm et $\omega_{^1\text{H}}$ vers 1.8 ppm). L'absence de signal dans ces zones vient de l'utilisation de protéine avec l'abondance naturelle du ^{13}C , qui pour ces zones ne donne pas un signal suffisant. Ce protocole donne des bons rendements de marquage isotopique des groupements méthyls (>80-90%). Terminons l'analyse de ce spectre en notant qu'il n'y a que très peu de pics parasites qui correspondraient à un marquage non spécifique.

7.4 Préparation des échantillons de poudre de protéines pour la diffusion de neutrons

Les poudres de protéines lyophilisées ont ensuite été séchées sur P_2O_5 durant 18 jours pour HMeth/DCB et HLys/DCB, sur un porte-échantillon plat en aluminium de surface $4 \times 3 \text{ cm}^2$. Le niveau d'hydratation résultant a été défini comme correspondant à $0 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g H-Protéine}$. Dans le cadre des mesures des protéines sans couche d'hydratation, les poudres sèches de HMeth/DCB (123 mg) et de HLys/DCB (302 mg) ont été utilisées telles quelles. Les échantillons ont été scellés par un couvercle en aluminium (0.3 mm d'épaisseur de parcours des neutrons) et un joint d'indium de 1 mm de diamètre. Les mêmes échantillons ont été utilisés pour les mesures avec une couche d'hydratation. Les échantillons ont été ré-ouverts et séchés sur P_2O_5 . Les poudres ont été ensuite hydratées par de la vapeur de D_2O , jusqu'à un niveau d'hydratation de $0.4 \text{ g D}_2\text{O} / \text{g HMeth/DCB}$ et $0.4 \text{ g D}_2\text{O} / \text{g HLys/DCB}$ (correspondant à par molécule de CB). Le poids d'eau ajouté a été vérifié par pesage tout au long de la procédure. Les échantillons ont de nouveau été scellés par un couvercle en aluminium (0.3 mm d'épaisseur de parcours des neutrons) et un joint d'indium de 1 mm de diamètre.

Les contributions calculées à la section efficace de diffusion incohérente des deux échantillons sont les suivantes :

- Pour l'échantillon HMeth/DCB_{sec} : 87% des groupements méthyle (6 912 barns) et 13% de la protéine deutérée (1 178 barns).
- Pour l'échantillon HMeth/DCB/ D_2O : 80% des groupements méthyle (6 912 barns), 12% de la protéine deutérée (1 178 barns) et 8% de la couche d'hydratation (777 barns).
- Pour l'échantillon HLys/DCB_{sec} : 87% des résidus lysines (7 032 barns) et 13% de la protéine deutérée (1 170 barns).
- Pour l'échantillon HLys/DCB/ D_2O : 80% des résidus lysines (7 032 barns), 12% de la protéine deutérée (1 170 barns) et 8% de la couche d'hydratation (777 barns).

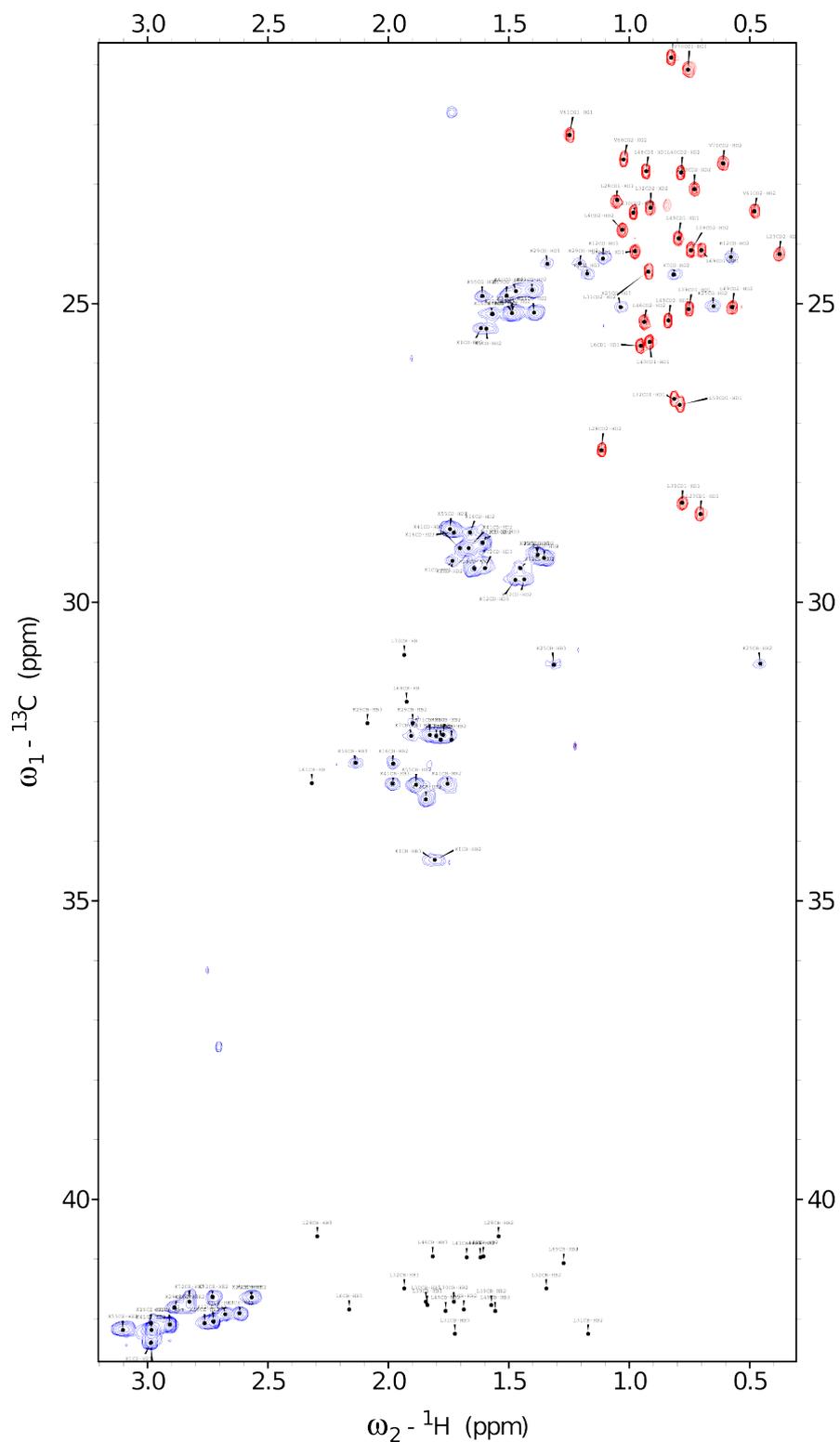


FIGURE 7.4 – Spectre HSQC ^1H - ^{13}C de l'échantillon DCB/HMeth. En rouge, les signaux des méthyles des leucines et des valines. En bleu : signal issu des hydrogènes des chaines latérales des lysines.

7.5 Mesure de diffusion incohérente élastique à haute résolution (0.6 μeV) sur les échantillons de calbindine marquée

Des mesures à 0.9 μeV de résolution permettent de mettre en évidence des dynamiques sur l'échelle de 0.1-1 ns, à savoir des mouvement de relaxation, de diffusion des groupements méthyles dans la protéine. Les échantillons HMeth/DCB/D₂O, HMeth/DCB_{dry}, HLys/DCB_{dry} et HLys/DCB/D₂O ont été mesurés, de 20 à 300 K.

Collecte des données Les intensités élastiques des deux échantillons ont été obtenues sur le spectromètre à rétro-diffusion IN16, ILL (tableau 2.2 pour les caractéristiques de l'instrument). L'échantillon, inséré à température ambiante dans un cryostat, est orienté à 135° par rapport au faisceau incident. Une descente en température (en 2 heures) de l'échantillon jusqu'à 20 K est effectuée. L'intensité élastique à cette température est collectée pendant une heure. Ces intensités serviront à la normalisation des intensités ultérieurement mesurées. Par la suite, une rampe continue en température, de 20 à 300 K est mise en place. En parallèle, les intensités élastiques sont collectées, chaque intensité élastique étant moyennée sur une plage de températures de 3 à 5 K.

Traitement des données Le traitement des données s'est fait selon les principes développés dans le paragraphe 2.2.1, avec les paramètres présentés dans le tableau 7.2. L'extraction des MSDs s'est faite à partir des logarithmes des intensités corrigées $I_{sample}(Q)$ (normalisées à la plus basse température et cellule vide soustraite).

	HMeth/DCB/D ₂ O	HLys/DCB/D ₂ O	HMeth/DCB _{sec}	HLys/DCB _{sec}
Gamme de fit	0.18-1.13 \AA^{-2}	0.18-1.13 \AA^{-2}	0.18-1.13 \AA^{-2}	0.18-1.13 \AA^{-2}

TABLE 7.2 – Gammes de fit utilisées pour l'extraction des déplacements carrés moyens issus des mesures de diffusion incohérente élastiques sur les échantillons HMeth/DCB/D₂O, HLys/DCB/D₂O, HMeth/DCB_{dry} et HLys/DCB_{dry}.

7.5.1 Résultats et discussion

Echantillons secs L'échantillon HMeth/DCB_{dry} fait apparaître vers 150 K une inflexion caractéristique d'une dynamique suffisamment rapide pour tomber dans la fenêtre de l'instrument (figure 7.5.A). Cette inflexion se poursuit jusqu'à 200 K, température à laquelle le signal généré par les groupements méthyle devient trop rapide pour la résolution de l'instrument. Le système fait cependant apparaître à plus haute température (260-270 K) une seconde modification de sa dynamique.

A contrario, l'échantillon HLys/DCB_{dry} ne fait pas apparaître une inflexion à 150 K. Il présente cependant la transition dynamique, à des températures proches de 220-230 K (figure 7.5.A). Les MSDs montrent l'inflexion à 150 K chez les groupements méthyles, absente chez l'échantillon HLys/DCB (figure 7.5.B).

Echantillons hydratés Les MSDs des échantillons cette fois hydratés (figure 7.6) font apparaître la même information que les échantillons secs. L'inflexion à 150 K chez l'échantillon HMeth/DCB/D₂O y est retranscrite dans les MSDs. Une fois 220 K atteinte, la transition dynamique apparaît et les MSDs augmentent plus sensiblement. Pour l'échantillon HLys/DCB/D₂O, celui-ci ne présente pas l'inflexion, en accord avec ce que avait été observé sur l'échantillon sec. Il est cependant important de noter que les niveaux des MSDs des deux protéines sont similaires à des températures inférieures

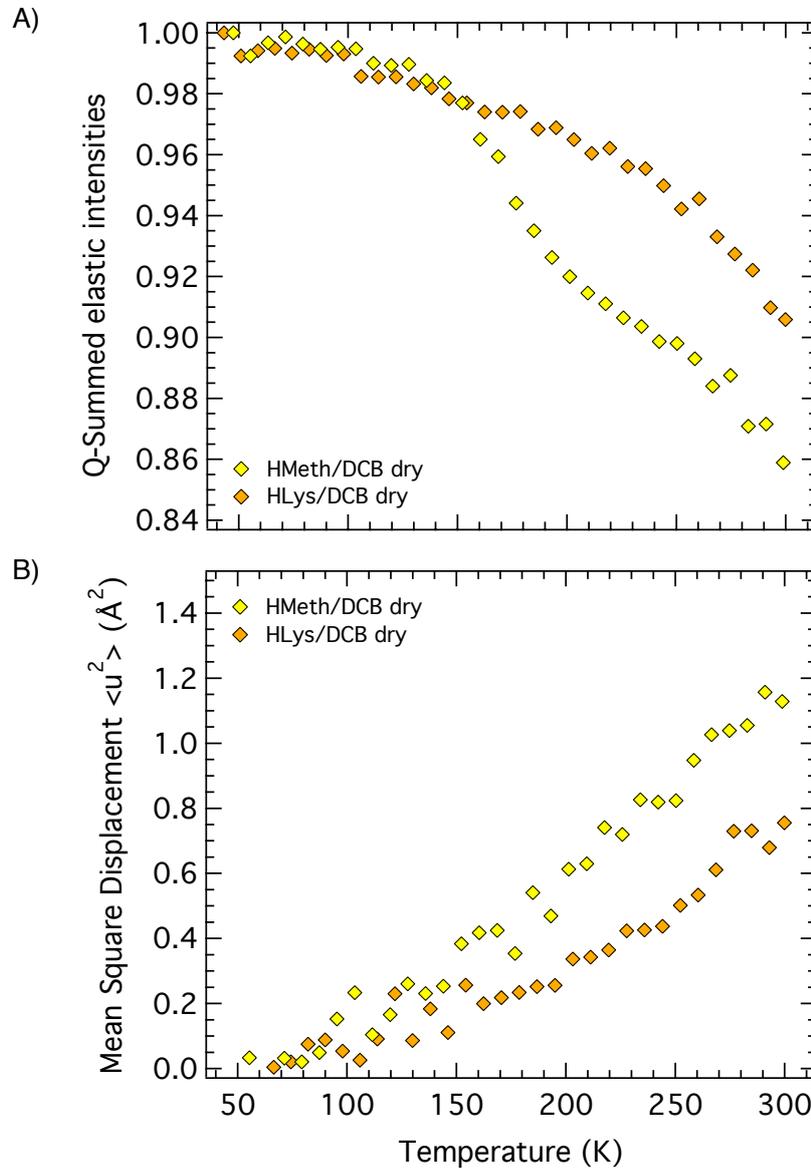


FIGURE 7.5 – A) Intensité intégrée sur les détecteurs $0.18\text{-}1.13 \text{\AA}^{-2}$ des mesures $\text{HMeth}/\text{DCB}_{dry}$ (diamant jaune) et $\text{HLys}/\text{DCB}_{dry}$ (diamant orange). B) Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique $\text{HMeth}/\text{DCB}_{dry}$ (diamant jaune) et $\text{HLys}/\text{DCB}_{dry}$ (diamant orange), de 20 à 300 K. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

à 200 K mais que ceux ci divergent à des températures supérieures. Les MSDs des groupements méthyles montrent des valeurs légèrement supérieures à celles des résidus lysines pour une température équivalente (et inférieures à 270 K).

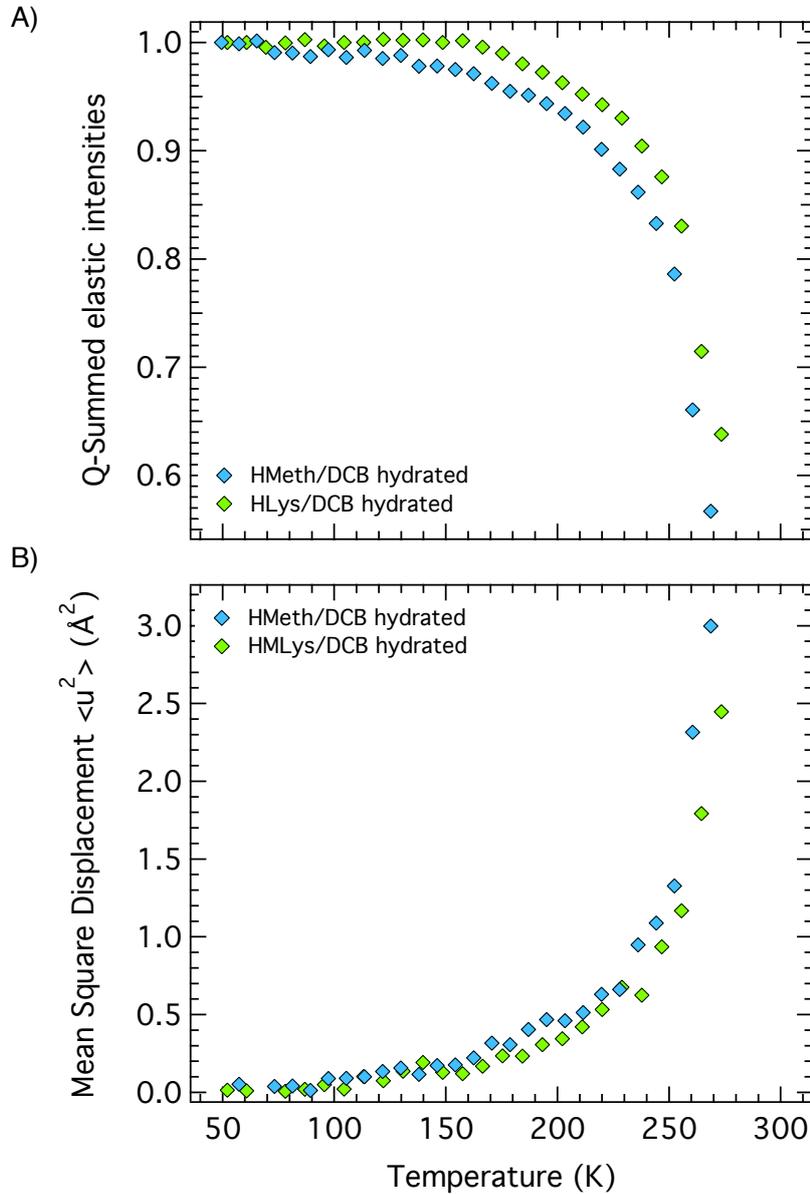


FIGURE 7.6 – A) Intensité intégrée sur les détecteurs $0.18\text{-}1.13 \text{\AA}^{-2}$ des mesures HMeth/DCB/D₂O (diamant bleu) et HLys/DCB/D₂O (diamant vert). B) Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures IN16 de diffusion élastique sur HMeth/DCB/D₂O (diamant bleu) et HLys/DCB/D₂O (diamant vert), de 20 à 300 K. Gamme de fit : $0.18\text{-}1.13 \text{\AA}^{-2}$. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$.

Discussion Les mesures de diffusion élastique sur les groupements méthyle ainsi que sur les résidus lysines des protéines globulaires mettent en évidence cette fois ci de manière directe l'influence des groupements méthyle dans l'inflexion à 150 K, là où les mesures sur les lysines de la calbindine ne la présente pas. Les MSDs à plus hautes températures font apparaître dans les deux échantillons une

transition dynamique, indiquant une modification structurale et dynamique qui semble s'appliquer à la totalité de la protéine, y compris les groupements méthyle.

Dans ce sens, les résultats obtenus s'opposent partiellement à ceux obtenus par (113), sur les groupements méthyle du complexe calmoduline/MLCK (myosin light chain kinase). Les auteurs montrent par RMN que les paramètres d'ordre des groupements méthyle tendent vers 1 (absence de mouvement) vers des températures proches de 220 K, et donc celles de la transition dynamique. Les mesures des paramètres d'ordre, d'abord effectuées à hautes températures (>274 K) ont été ensuite extrapolées linéairement à plus basses températures. L'extrapolation donne une réduction quasi-totale de la dynamique en dessous de 220 K. Les résultats obtenus par diffusion de neutrons sur l'échantillon HMeth/DCB/D₂O ne sont pas contradictoires avec les conclusions de l'étude (113), les MSDs obtenus sur la calbindine et ses groupements méthyles montrant une transition dynamique à 220 K. Il est cependant possible (et probable, aux vues des mesures sur les lysines de la calbindine) que la transition dynamique implique la protéine dans son ensemble et non pas simplement des groupements isolés, comme montré avec HLys/DCB/D₂O.

En reprenant la figure 7.1, on peut constater que les groupements méthyle se situent dans le coeur de la protéine, alors que les lysines pointent leur chaîne latérale vers la surface de la protéine. Malgré le caractère confiné et hydrophobe des méthyles, leurs déplacements carrés moyens sont systématiquement supérieures à ceux des résidus lysines (figure 7.6.B). La dynamique moyenne observée dans le cas des lysines tient compte de la totalité de la chaîne latérale, en particulier les groupements méthylènes, qui en moyenne doivent avoir une dynamique plus lente que les groupements -CH₃, malgré leur exposition au solvant plus prononcée. Les échantillons secs montrent ce même comportement (figure 7.5.B). La couche d'hydratation possède donc une influence forte sur la dynamique de toute la protéine.

7.6 Conclusion

Ces mesures de diffusion élastique ont permis de clarifier, de manière directe et expérimentale, la nature de cette inflexion observée à 150 K. Des mesures de diffusion de neutrons sur des protéines membranaires, ainsi que des simulations de dynamique moléculaire ont suggéré de manière indirecte que cette modification des MSDs était liée à l'apparition dans la fenêtre temporelle de l'instrument de la rotation des groupements méthyles. Le travail développé dans ce chapitre montre de manière directe et expérimentale cet effet, avec l'utilisation conjointe de la deutération sélective de protéines et la diffusion élastique de neutrons. La comparaison s'est effectuée avec un échantillon ayant ses lysines marquées (absence de groupements méthyle). Ce dernier ne montre pas d'inflexion à 150 K mais met en évidence une transition dynamique à 220 K, de plus faible amplitude.

Résumé des résultats

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont les suivants :

- **Les mouvements des méthyles donnent naissance à l'inflexion à 150 K**, une fois leur dynamique suffisamment rapide pour la résolution du spectromètre. **Les méthylènes des lysines ne montrent pas cette inflexion.**
- **Les méthyles présentent cette inflexion, même sous la forme déshydratée.**
- **La dynamique des méthyles est plus importante que celle des groupements lysines.**

Perspectives

Cette étude de diffusion élastique de neutrons sur les échantillons HMeth/DCB et HLys/DCB, à 0.6 μeV de résolution appelle des mesures et analyses complémentaires, en particulier :

- Des mesures de diffusion quasi-élastique sur l'échantillon HMeth/DCB à cette même résolution et à différentes températures. Ces données permettraient d'extraire, premièrement, la nature du mouvements des groupements méthyles dans les protéines et deuxièmement une énergie d'activation moyenne. Ces mesures peuvent être faites à la fois sous les formes sèche et hydratée de l'échantillon afin de caractériser plus finement l'influence de l'hydratation sur la dynamique des méthyles.
- Des mesures de diffusion quasi-élastique sur l'échantillon HLys/DCB. Les mêmes motivations que celles exposées ci dessus pour les CH_3 peuvent être appliquées aux lysines.
- Des mesures sur la dynamique des méthyles et des lysines à plus basse résolution (80 μeV). Des mesures de diffusion quasi-élastique à ces résolutions et à différentes températures permettraient d'approfondir la dynamique d'une protéine, au travers de celle de ces briques qui la composent.
- L'étude d'acides aminés autres que la lysine. Une carte de la dynamique des acides aminés dans une protéine pourrait être dessinée, et voir l'influence de la nature (chargées, hydrophobes, ...) sur leur dynamique.

CONCLUSION

Conclusion générale et perspectives

CHACUN ORGANISME vivant développe pour survivre de nombreuses stratégies. Cela implique par exemple la mise en place de nouvelles voies de synthèse biochimique, une réorganisation plus ou moins partielle de son métabolisme ou encore la sur-expression de protéines particulières. On peut citer les organismes halophiles, qui vivent dans des concentrations intracellulaires de KCl proches de 3.5 M. Ces hautes concentrations de sels leur permet par osmose de lutter contre la déshydratation. *Deinococcus radiodurans* semble avoir développé une stratégie différente pour résister à la déshydratation. Awile et collaborateurs (114), en étudiant les séquences de différentes hydrolases d'organismes extrémophiles (*Deinococcus radiodurans* et *Thermus thermophilus*), suggèrent suite à des simulations que les hydrolases de *Deinococcus radiodurans* présentent dans leur séquence des zones désordonnées, absentes chez *Thermus thermophilus*. Les auteurs ont corrélé la présence de ces zones désordonnées avec une énergie libre d'hydratation plus faible (et donc une interaction plus forte). Le caractère plus hydrophile de ces chaînes a été mis en avant pour expliquer la résistance à la déshydratation, les IDPs jouant ainsi un rôle de réserve d'eau pour la cellule en cas de déshydratation sévère.

A la lumière de ces exemples, on peut apercevoir que l'eau prend toute son importance dans les processus biologiques des êtres vivants. Ce travail de thèse a eu pour but d'étudier la *dynamique de protéines et la relation qu'elles entretiennent avec l'eau d'hydratation*, cette couche qui entoure une macromolécule biologique et qui est essentielle à la fonction biologique. L'utilisation conjointe du marquage isotopique (deutération) et de la diffusion incohérente de neutrons a permis de sonder la dynamique de la protéine Tau, une IDP impliquée dans la maladie d'Alzheimer, à des temps caractéristiques allant de la picoseconde à la nanoseconde sur des échelles spatiales de l'ordre de l'Ångström, mais aussi d'explorer la dynamique de la couche d'hydratation sur ces mêmes échelles.

Les mesures de diffusion élastique effectuées sur des poudres hydratées de protéines intrinsèquement désordonnées ont permis d'extraire une dynamique moyenne, qui dans le cas des IDPs se traduit par des flexibilités à température physiologique deux fois plus grandes et des mouvements de plus grandes amplitudes, à comparer aux analogues globulaires. Les mesures élastiques sur les couches d'hydratation à l'inverse mettent en évidence des mouvements de la molécule d'eau plus restreints, de telle façon à ce que les amplitudes des mouvements des atomes d'hydrogènes des molécules d'eau et ceux des IDPs concordent. On parlera alors d'un *couplage étroit* entre la protéine désordonnée et son eau d'hydratation.

Les mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons réalisées sur les poudres hydratées de protéines globulaires, désordonnées et sur leur eaux d'hydratation respectives ont permis d'aller plus loin dans la caractérisation des différents mouvements qui les animent. La dynamique autour de

la transition dynamique a été approfondie. A des mouvements confinés des atomes des protéines (globulaires et IDPs) s'opposent des mouvements diffusifs de la molécule d'eau, une fois la transition dynamique passée (eaux des protéines globulaires et des IDPs). A l'inverse, la transition dynamique des protéines ne s'accompagne pas de mouvements diffusifs et ceux des atomes d'hydrogène des protéines restent confinés, avant et après la transition dynamique. Le caractère désordonné ou non de la protéine ne fait que moduler l'amplitude de ces phénomènes, sans pour autant en changer la nature. Les mouvements confinés de la protéine Tau se caractérisent par des temps de corrélation sensiblement inférieurs (15-30%) à ceux de la MBP et les temps de résidence de la molécule d'eau de la protéine Tau sont de 30% supérieurs à ceux de l'eau de la MBP. Terminons par mentionner que les mesures quasi-élastiques ont permis de montrer que la diffusion de l'eau d'hydratation des deux protéines se trouvait ralentie d'un facteur quatre par rapport à de l'eau libre. La conjugaison de la deutération de protéines, de la diffusion élastique et quasi-élastique de neutrons ont permis de mettre en lumière la délicate relation qu'une protéine entretenait avec sa couche d'eau, relation dans laquelle chacun module et redessine le paysage énergétique de l'autre.

Des variations sur le thème *Couche d'hydratation, protéines désordonnées et dynamique* ont été étudiées, en particulier la nature du désordre et son influence sur la dynamique. Un mutant désordonné de la MBP a été étudié par diffusion élastique de neutrons. La combinaison de ces mesures, avec celles collectées sur la forme agrégée de ce mutant a permis de poser les premiers jalons du paysage énergétique d'une protéine en fonction de son état de repliement. Etonnamment, les formes désordonnées non physiologiques, solubles et agrégées, se sont respectivement montrées plus flexibles et dynamiquement équivalentes, par rapport aux IDPs. L'agrégat s'est révélé être bien plus dynamique que sa structure le laisse supposer. Une échelle de dynamique, allant de la protéine déshydratée à la protéine désordonnée non physiologique soluble semble se profiler, dans laquelle protéines globulaires, membranaires et intrinsèquement désordonnées viennent remplir les échelons.

La nature de la couche d'hydratation a été explorée, avec l'utilisation de systèmes hybrides protéine/polymères. L'eau est remplacé par une couche de polymères reprenant à son compte le rôle de source de flexibilité.

Des mesures complémentaires de spectroscopie terahertz, spectroscopie qui permet de sonder cette fois-ci les mouvements collectifs de la molécule d'eau ont été initiées. Ces mesures ont permis de sonder la couche d'hydratation des protéines désordonnées, sous un aspect géométrique.

Pour terminer, le volet *Transition, inflexion et autres modifications de la dynamique* a été exploré, avec des mesures de diffusion élastique de neutrons sur deux échantillons de protéines perdeutérés, à l'exception des groupements méthyles pour l'un et des résidus lysines pour le second. Cette étude, un peu plus éloigné des précédentes, a eu pour but de clarifier la nature des différentes transitions et inflexions que met en évidence une protéine sur une large gamme de température. La corrélation entre la présence de groupements méthyles et une inflexion à 150 K a pu être mise en évidence de manière directe dans les protéines globulaires. La présence d'une transition dynamique à 220 K dans les groupements méthyles et les chaînes latérales des lysines a montré que la transition dynamique trouvait son origine dans une modification structurale globale de la protéine.

L'ensemble de ces mesures s'inscrit dans une perspective plus générale, à savoir la dynamique des protéines dans un contexte biologique. Ces travaux ont esquissé un début de compréhension de la dynamique de nouveaux systèmes. Ces systèmes peuvent être biologiques, avec les IDPs et les agrégats, qui prennent part à de nombreuses fonctions dans une cellule et dont la dynamique est fondamentale. Ces systèmes peuvent être aussi de nouvelles constructions adaptées à l'étude de la couche d'hydratation et de phénomènes plus fondamentaux. Les mesures préliminaires sur ces différents systèmes présentés dans ce manuscrit nous l'espérons permettront d'aller plus loin dans le

domaine de la dynamique des objets biologiques, domaine qui connaît depuis des années un certain nombre de controverses encore résolues et dont le territoire d'exploration reste encore bien vaste.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] Price P. (2000) A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1247–1251.
- [2] Tehei M, Franzetti B, Madern D, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Giudici-Orticoni MT, Bruschi M, & Zaccai G. (2004) Adaptation to extreme environments : Macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO reports* **5**, 66–70.
- [3] Hartmann H, Parak F, Steigemann W, Petsko GA, Ponzi DR, & Frauenfelder H. (1982) Conformational substates in a protein : Structure and dynamics of metmyoglobin at 80K. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 4967–4971.
- [4] Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, & Gunsalus IC. (1979) Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry* **14**, 5355–5373.
- [5] Ishikawa H, Kwak K, Kim S, & Fayert MD. (2008) Direct observation of fast protein conformational switching. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 8619–8624.
- [6] McCammon J & Harvey S. (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*. (Cambridge University Press, New York).
- [7] Doster W, Cusack S, & Petry W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature* **337**, 754 – 756.
- [8] Ferrand M, Dianoux AJ, Petry W, & Zaccai G. (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes : Effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9668–9672.
- [9] Rupley JA & Careri G. (1991) Protein hydration and function. *Adv In Protein Chem* **41**, 37–173.
- [10] Svergun DI, Richard S, Koch MH, Sayers Z, Kuprin S, & Zaccai G. (1998) Protein hydration in solution : experimental observation by X-ray and neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2267–2272.
- [11] Ebbinghaus S, Kim SJ, Heyden M, Yu X, Heugen U, Gruebele M, Leitner DM, & Havenith M. (2007) An extended dynamical hydration shell around proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 20749–20752.
- [12] Doster W. (2008) The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions. *Eur Biophys J* **37**, 591–602.

-
- [13] Brooks CL, Karplus M, & Pettitt BM. (1988) Proteins : a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Advan Chem Phys* **71**, 1–249.
- [14] Frauenfelder H, Chen G, Berendzen J, Fenimore PW, Jansson H, McMahon BH, Stroer IR, Swenson J, & Young RD. (2009) A unified model of protein dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 5129–5134.
- [15] Ball P. (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Reviews* **108**, 74–108.
- [16] Ball P. (2009) Water as a biomolecule. *Chem Phys Chem* **9**, 2677–2685.
- [17] Rodríguez JC, Zeng Y, Wilks A, & Rivera M. (2007) The hydrogen-bonding network in heme Oxygenase also functions as a modulator of enzyme dynamics : Chaotic motions upon disrupting the H-bond network in heme Oxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **129**, 11730–11742.
- [18] de la Lande A, Martí S, Parisel O, & Moliner V. (2007) Long distance electron-transfer mechanism in peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase : A perfect fitting for a water bridge. *J Am Chem Soc* **129**, 11700–11707.
- [19] Babu CS & Lim C. (2010) Protein/solvent medium effects on Mg^{2+} - carboxylate interactions in Metalloenzymes. *J Am Chem Soc* **132**, 6290–6291.
- [20] Nutt DR & Smith JC. (2008) Dual function of the hydration layer around an Antifreeze protein revealed by atomistic Molecular Dynamics simulations. *J Am Chem Soc* **130**, 13066–13073.
- [21] De Simone A, Dodson GG, Verma CS, Zagari A, & Fraternali F. (2005) Prion and water : Tight and dynamical hydration sites have a key role in structural stability. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 7535–7540.
- [22] Lopez M, Kurkal-Siebert V, Dunn RV, Tehei M, Finney JL, Smith JC, & Daniel RM. (2010) Activity and dynamics of an enzyme, pig liver esterase, in near-anhydrous conditions. *Biophys Journal* **99**, L62 – L64.
- [23] Young RD, Frauenfelder H, & Fenimore PW. (2011) Mössbauer effect in proteins. *Phys Rev Lett* **107**, 1–4.
- [24] Knapp EW, Fischer SF, & Parak F. (1982) Protein dynamics from mössbauer spectra. the temperature dependence. *J Phys Chem* **86**, 5042–5047.
- [25] Markelz AG, Knaba JR, Chena JY, & Hea Y. (2007) Protein dynamical transition in terahertz dielectric response. *Chem Phys Lett* **442**, 413–417.
- [26] Wood K, Frolich A, Paciaroni A, Moulin M, Haertlein M, Zaccai G, Tobias DJ, & Weik M. (2008) Coincidence of dynamical transition in a soluble protein and its hydration water : Direct measurements by neutron scattering and MD simulations. *J Am Chem Soc* **30**, 4586–4587.
- [27] Wood K, Caronna C, , Fouquet P, Haussler W, Natali F, Ollivier J, Orecchini A, Plazanet M, & Zaccai G. (2008) A benchmark for protein dynamics : Ribonuclease a measured by neutron scattering in a large wavevector-energy transfert range. *Chem Phys* **345**, 305–314.
- [28] Gabel F. (2005) Protein dynamics in solution and powder measured by incoherent elastic neutron scattering : the influence of Q-range and energy resolution. *Eur Biophys J* **34**, 1–12.

-
- [29] Paciaroni A, Cinelli S, & Onori G. (2002) Effect of the environment on the protein dynamical transition : A neutron scattering study. *Biophys J* **83**, 1157–1164.
- [30] Wood K, Tobias DJ, Kessler B, Gabel F, Oesterhelt D, Mulder FA, Zaccai G, & Weik M. (2010) The low-temperature inflection observed in neutron scattering. Measurements of proteins is due to methyl rotation : Direct evidence using isotope labeling and molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* **132**, 4490–4991.
- [31] Wood K, Plazanet M, Gabel F, Kessler B, Oesterhelt D, Tobias DJ, Zaccai G, & Weik M. (2007) Coupling of protein and solvent dynamics in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 18049–18054.
- [32] Wood K, Grudinin S, Kessler B, Weik M, Johnson M, Kneller GR, & Zaccai G, O. (2008) Dynamical heterogeneity of specific amino acids in bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **380**, 581–591.
- [33] Réat V, Patzelt H, Ferrand M, Pfister C, Oesterhelt D, & Zaccai G. (1998) Dynamics of different functional parts of bacteriorhodopsin : ^1H - ^2H labeling and neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4795–4797.
- [34] Caliskan G, Briber RM, Thirumalai D, Garcia-Sakai V, Woodson SA, & Sokolov AP. (2006) Dynamic transition in tRNA is solvent induced. *J Am Chem Soc* **128**, 32–33.
- [35] Khodadadi S, Roh JH, Kisliuk A, Mamontov E, Tyagi M, Woodson SA, Briber RM, & Sokolov AP. (2010) Dynamics of biological macromolecules : not a simple slaving by hydration water. *Biophys J* **98**, 1321–1326.
- [36] Jasnin M, van Eijck L, Koza MM, Peters J, Laguri C, Lortat-Jacob H, & Zaccai G. (2010) Dynamics of heparan sulfate explored by neutron scattering. *Phys Chem Chem Phys* **12**, 3360–3362.
- [37] Rasmussen BF, Stock AM, Ringe D, & Petsko GA. (1992) Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220K. *Nature* **357**, 423–424.
- [38] Frauenfelder H, Sligar SG, & Wolynes PG. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598–1603.
- [39] Daniel RM, Smith JC, Ferrand M, Héry S, Dunn R, & Finney JL. (1998) Enzyme activity below the dynamical transition at 220K. *Biophys J* **75**, 2504–2507.
- [40] Dunn RV, Réat V, Finney J, Ferrand M, Smith JC, & Daniel RM. (2000) Enzyme activity and dynamics : Xylanase activity in the absence of fast anharmonic dynamics. *Biochem J* **346**, 355–358.
- [41] Schiro G, Caronna C, Natali F, Marek Koza M, & Cupane A. (2011) The protein dynamical transition does not require the protein polypeptide chain. *J Phys Chem Lett* **2**, 2275–2279.
- [42] Lichtenegger H, Doster W, Kleinert T, Birk A, Sepiol B, & Vogl G. (1999) Heme-solvent coupling : A mössbauer study of Myoglobin in sucrose. *Biophys J* **76**, 414–422.
- [43] Tsai AM, Neumann DA, & Bell LN. (2000) Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water : a neutron scattering study. *Biophys J* **79**, 2728–2732.
- [44] Sokolov AP. (1998) The glass transition : general scenario and crossover temperature. *J Non-Crystalline Solids* **235-237**, 190–195.

- [45] Tarek M & Tobias DJ. (2002) Role of protein-water hydrogen bond dynamics in the protein dynamical transition. *Phys Rev Lett* **88**.
- [46] Tournier AL, Xu J, & Smith JC. (2003) Translational hydration water dynamics drives the protein glass transition. *Biophys J* **85**, 1871–1875.
- [47] Froelich A, Gabel F, Jasnin M, Lehnert U, Oesterhelt D, Stadler AM, Tehei M, Weik M, Wood K, & Zaccai G. (2009) From shell to cell : neutron scattering studies of biological water dynamics and coupling to activity. *Faraday Discuss* **141**, 117–130.
- [48] Zaccai G. (1987) Structure and hydration of purple membranes in different conditions. *J Mol Biol* **194**, 569–572.
- [49] Baudry J, Tajkhorshid E, Molnar F, Phillips J, & Schulten K. (2001) Molecular dynamics study of bacteriorhodopsin and the purple membrane. *J Phys Chem* **105**, 905–918.
- [50] Teixeira J, Bellissent-Funel MC, Dianoux AJ, & Chen SH. (1985) Experimental determination of the nature of diffusive motions of water molecules at low temperatures. *Phys Rev A* **31**, 1913–1917.
- [51] Bellissent-Funel M, Chen SH, & Zanotti J. (1995) Single-particle dynamics of water molecules in confined space. *Phys Rev E* **51**, 4558–4569.
- [52] Zanotti JM. (1997) Ph.D. thesis (Université de Paris XI).
- [53] Jasnin M, Moulin M, Haertlein M, Zaccai G, & Tehei M. (2008) Down to atomic-scale intracellular water dynamics. *EMBO reports* **9**, 543–547.
- [54] Tehei M, Franzetti B, Wood K, Gabel F, Fabiani E, Jasnin M, Zamponi M, Oesterhelt D, Zaccai G, Ginzburg M, & Ginzburg BZ. (2007) Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a dead sea organism. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 766–771.
- [55] Plaxco W & Gross M. (1997) The importance of being unfolded. *Nature* **386**, page 657.
- [56] Dyson J H & Wright P. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their function. *Nature* **6**, 197.
- [57] Dyson HJ. (2011) Expanding the proteome : disordered and alternatively unfolded proteins. *Quat Rev Biophys* **44**, 467–518.
- [58] Singh GP & Dash D. (2008) How expression level influences the disorderness of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 401–404.
- [59] Gunasekaran K, Tsai CJ, Kumar S, Zanuy D, & Nussinov R. (2003) Extended disordered proteins : Targeting function with less scaffold. *Trends in Bio Sci* **28**, 81–85.
- [60] Tompa P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Bio Sci* **27**, 527.
- [61] Jensen MR, Markwick PRL, Meier S, Griesinger C, Zweckstetter M, Grzesiek S, Bernadó P, & Blackledge M. (2009) Quantitative determination of the conformational properties of partially folded and intrinsically disordered proteins using nmr dipolar couplings. *Structure* **17**, 1169–1185.
- [62] Bernadó P, Blanchard L, Timmins P, Marion D, Ruigrok RW, & Blackledge M. (2005) A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17002–17007.

- [63] Jensen MR, Bernadó P, Houben K, Blanchard L, Marion D, Ruigrok RW, & Blackledge M. (2010) Structural disorder within sendai virus nucleoprotein and phosphoprotein : insight into the structural basis of molecular recognition. *Protein Pept Lett* **17**, 952–960.
- [64] Hegyi H & Tompa P. (2008) Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput Biol* **4**, 1–7.
- [65] Russo D, Pérez J, Zanotti JM, Desmadril M, & Durand D. (2002) Dynamic transition associated with the thermal denaturation of a small β protein. *Biophys J* **83**, 2792–2800.
- [66] Fitter J, Herrmann R, Lechnerd RE, H, & Dencher NA. (2001) Dynamical properties of α -amylase in the folded and unfolded state : the role of thermal equilibrium fluctuations for conformational entropy and protein stabilization. *Physica B* **301**, 1–7.
- [67] Fitter J. (2003) A measure of conformational entropy change during thermal protein unfolding using neutron spectroscopy. *Biophys J* **84**, 3924–3930.
- [68] Bu Z, Cook J, & Callaway DJ. (2001) Dynamic regimes and correlated structural dynamics in native and denatured α -lactalbumin. *J Mol Biol* **312**, 865–873.
- [69] Bu Z, Neumann DA, Lee SH, Brown CM, Engelman DM, & Han CC. (2000) A view of dynamics changes in the molten globule-native folding step by quasielastic neutron scattering. *J Mol Biol* **301**, 525–536.
- [70] Receveur V, Calmettes P, Smith JC, Desmadril M, Coddens G, & Durand D. (1997) Picosecond dynamical changes on denaturation of yeast phosphoglycerate kinase revealed by quasielastic neutron scattering. *Proteins* **28**, 380–387.
- [71] Mamontov E, O’Neill H, & Zhangand Q. (2010) Mean-squared atomic displacements in hydrated lysozyme, native and denatured. *J Biol Phys* **36**, 291–297.
- [72] Gaspar AM, Appavou MS, Busch S, Unruh T, & Doster W. (2008) Dynamics of well-folded and natively disordered proteins in solution : a Time-of-Flight neutron scattering study. *Eur Biophys J* **37**, 573–582.
- [73] Nakagawa H, Kamikubo H, & Kataoka M. (2010) Effect of conformational states on protein dynamical transition. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 27–33.
- [74] Bokor M, Csizmók V, Kovács D, Bánki P, Friedrich P, Tompa P, & Tompa K. (2005) NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins. *Biophys J* **88**, 2030–2037.
- [75] Sengupta N, Jaud S, & Tobias DJ. (2008) Hydration dynamics in a partially denatured ensemble of the globular protein human α -lactalbumin investigated with molecular dynamics simulations. *Biophys J* **95**, 5257–5267.
- [76] Chakraborty S & Bandyopadhyay S. (2008) Dynamics of water in the hydration layer of a partially unfolded structure of the protein hp-36. *J Phys Chem B* **112**, 6500–6507.
- [77] Serdyuk I N, Zaccai N, & Zaccai G. (2007) *Methods in Molecular Biophysics*. (Cambridge Univ. Press, New York).
- [78] Zaccai G. (2000) How soft is a protein ? a protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science* **288**, 1604–1607.

- [79] Frick B, Magerla A, Blanca Y, & Rebeschko R. (1997) The new backscattering spectrometer in16 at the ill. *Physica B : Condensed Matter* **234-236**, 1177–1179.
- [80] Becker T & Smith JC. (2003) Energy resolution and dynamical heterogeneity effects on elastic incoherent neutron scattering from molecular systems. *Phys Rev E* **67**, 021904.
- [81] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, & Kirschner MW. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 1858–1862.
- [82] von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, & Mandelkow E. (2000) Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ($^{306}\text{VQIVYK}^{311}$) forming β structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5129–5134.
- [83] Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, & Zweckstetter M. (2009) Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution. *PLoS Biology* **7**, 1–6.
- [84] Mukrasch MD, Markwick P, Biernat J, Bergen M, Bernadó P, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M, & Blackledge M. (2007) Highly populated turn conformations in natively unfolded Tau protein identified from residual dipolar couplings and molecular simulation. *J Am Chem Soc* **129**, 5235–5243.
- [85] Mandelkow EM & Mandelkow E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* **8**, 425–427.
- [86] Kapust RB & Waugh DS. (1999) Escherichia coli Maltose-Binding Protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science* **8**, 1668–1674.
- [87] Chirita CN, Congdon EE, Yin H, & Kuret J. (2005) Triggers of full-length Tau aggregation : A role for partially folded intermediates. *Biochemistry* **44**, 5862–5872.
- [88] Mylonas E, Hascher A, Bernadó P, Blackledge M, Mandelkow E, & Svergun DI. (2008) Domain conformation of Tau protein studied by solution Small-Angle X-ray Scattering. *Biochemistry* **47**, 10345–10353.
- [89] Pons T, Uyeda HT, Medintz IL, & Mattoussi H. (2006) Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *J Chem Phys B* **110**, 20308–20316.
- [90] Yang PH & Rupley JA. (1979) Protein-water interactions. Heat capacity of the lysozyme-water system. *Biochemistry* **18**, 2654–2661.
- [91] Dolman M, Halling PJ, Moore BD, & Waldron S. (1997) How dry are anhydrous enzymes? measurement of residual and buried ^{18}O -labeled water molecules using mass spectroscopy. *Biopolymers* **41**, 313–321.
- [92] von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, & Mandelkow E. (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 158–166.
- [93] Bartels T, Choi JG, & Selkoe DJ. (2011) α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **477**, 107–110.
- [94] Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, & Mouradian MM. (2004) Aggregates formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* **279**, 4625–4631.

-
- [95] Volino F & Dianoux AJ. (1980) Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry : general formalism and application to diffuse inside a sphere. *Mol Phys* **41**, 271–279.
- [96] Tarek M & Tobias DJ. (2000) The dynamics of protein hydration water : A quantitative comparison of molecular dynamics simulations and neutron-scattering experiments. *Biophys J* **79**, 3244–3257.
- [97] Chen SH, Teixeira J, & Nicklow R. (1982) Incoherent quasielastic neutron scattering from water in supercooled regime. *Phys Rev A* **26**, 3477–3482.
- [98] Leitner DM, Gruebele M, & Havenith M. (2008) Solvation dynamics of biomolecules : modeling and terahertz experiments. *HFSP J* **2**, 314–323.
- [99] Bergner A, Heugen U, Bründermann E, Schwaab G, Havenith M, Chamberlin D R, & Haller E E. (2005) New p-Ge THz laser spectrometer for the study of solutions : THz absorption spectroscopy of water. *Rev Sci Instrum* **76**, 063110–063115.
- [100] Born B, Weingärtner H, Bründermann E, & Havenith M. (2009) Solvation dynamics of model peptides probed by terahertz spectroscopy. observation of the onset of collective network motions. *J Am Chem Soc* **131**, 3752–3755.
- [101] Ebbinghaus S, Kim SJ, Heyden M, Yu X, Gruebele M, Leitner DM, & Havenith M. (2008) Protein sequence- and pH-dependent hydration probed by terahertz spectroscopy. *J Am Chem Soc* **130**, 2374–2375.
- [102] Perriman AW, Cölfen H, Hughes RW, Barrie CL, & Mann S. (2009) Solvent-free protein liquids and liquid crystals. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 6242–6246.
- [103] Perriman AW, Brogan AP, Cölfen H, Tsoureas N, Owen GR, & Mann S. (2010) Reversible dioxygen binding in solvent-free liquid myoglobin. *Nat Chem* **2**, 622–626.
- [104] Perriman AW & Mann S. (2011) Liquid proteins—a new frontier for biomolecule-based nanoscience. *ACS Nano* **5**, 6085–6091.
- [105] Wood K. (2007) Ph.D. thesis (Université de Grenoble).
- [106] Roh JH, Novikov VN, Gregory RB, Curtis JE, Chowdhuri Z, & Sokolov AP. (2005) Onsets of anharmonicity in protein dynamics. *Phys Rev Lett* **95**.
- [107] Schiró G, Caronna C, Natali F, & Cupane A. (2010) Direct evidence of the amino acid side chain and backbone contributions to protein anharmonicity. *J Am Chem Soc* **132**, 1371–1376.
- [108] Roh JH, Briber RM, Damjanovic A, Thirumalai D, Woodson SA, & Sokolov AP. (2009) Dynamics of trna at different levels of hydration. *Biophys J* **96**, 2755–2762.
- [109] Gabel F & Bellissent-Funel MC. (2007) C-phycocyanin hydration water dynamics in the presence of trehalose : an incoherent elastic neutron scattering study at different energy resolutions. *Biophys J* **92**, 4054–4063.
- [110] Zanotti Z.-M., Gibrat G., & Bellissent-Funel M.-C. (2008) Hydration water rotational motion as a source of configurational entropy driving protein dynamics. crossovers at 150 and 220 k. *Phys Chem Chem Phys* **10**, 4865–4870.

- [111] Krishnan M, Kurkal-Siebert V, & Smith JC. (2008) Methyl group dynamics and the onset of anharmonicity in myoglobin. *J Phys Chem B* **112**, 5522–5533.
- [112] Keniry MA, Kintanar A, Smith RL, Gutowsky HS, & Oldfield E. (1984) Nuclear magnetic resonance studies of amino acids and proteins. deuterium nuclear magnetic resonance relaxation of deuteriomethyl-labeled amino acids in crystals and in halobacterium halobium and escherichia coli cell membranes. *Biochemistry* **23**, 288–298.
- [113] Lee AL & Wand AJ. (2001) Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins. *Nature* **411**, 501–504.
- [114] Awile O, Krisko A, Sbalzarini IF, & Zagrovic B. (2010) Intrinsically disordered regions may lower the hydration free energy in proteins : A case study of nudix hydrolase in the bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Comput Biol* **6**.
- [115] Krewulak KD, Shepherd CM, & Vogel HJ. (2005) Molecular dynamics simulations of the periplasmic ferric-hydroxamate binding protein FhuD. *BioMetals* **18**, 375–384.

ANNEXES

Comparaisons des paramètres physico-chimiques et biochimiques des différents échantillons

A.1 Comparaison des systèmes

Le tableau A.1 résume les paramètres physico-chimiques des différentes protéines utilisées dans les différentes études.

	Tau	MBP	MBP0	RNase	Mb	CB
Nombre de résidus	441	370	370	124	154	78
Poids moléculaire	45 849	40 707	40 628	13 690	17 331	8 762
pI	8.24	5.65	5.65	9.6	8.70	4.53
Coefficient 280 nm	0.16	1.56	1.56	0.71	0.89	0.17
Oligomérisation	monomérique (m)	m	m	m	m	m
Rayon hydrodynamique (nm)	5.5 (87)	3.0 (89)
Rayon de giration (nm)	6.2 (88)	2.1 (115)	6.2

TABLE A.1 – Paramètres physico-chimiques des différentes protéines mesurées (MBP : maltose binding protein ; MBP0 : maltose binding protein mutée ; RNase : ribonucléase A ; Mb : myoglobine ; CB : calbindine). Partiellement tirés de (87), (89), (88) et (115). Les rapports rayon de giration/rayon hydrodynamique donnent 1.18 et 0.7 pour Tau et MBP, respectivement. Ces valeurs sont à comparer aux valeurs attendues pour une chaîne aléatoire (1.5) et une protéine globulaire (0.7). L'accord obtenu pour la MBP confirme le caractère globulaire. L'écart obtenu pour Tau montre une déviation du comportement chaîne aléatoire, traduisant un probable ordre résiduel dans la protéine.

Le tableau ci-dessous A.2 résume la composition en acides aminés des différentes protéines, mettant en évidence la proportion plus importante chez Tau d'acides aminés simples, par rapport à la MBP, la RNase ou la myoglobine. Sont aussi montrées les mutations responsables du caractère déplié de MBP0.

	Tau	MBP	MBP0	RNase	Mb	CB
Nombre de résidus	441	370	370	124	154	78
Acide aminés polaires						
Ser S	45 (10%)	12 (3%)	12	12	6	6
Thr T	35	20	20	10	5	2
Gln Q	19	9	9	7	5	5
Asn N	11	21	21	10	1	2
Total	110	62	62	42	17	15
Acide aminés chargés +						
Arg R	14	6	6	4	4	1
His H	12	3	3	4	12	0
Lys K	44	37	37	10	19	11
Total	70	46	46	18	35	12
Acide aminés chargés -						
Asp D	29	24	24	5	7	7
Glu E	27	27	27	5	14	10
Total	56	51	51	10	21	17
Acide aminés hydrophobes						
Cys C	2	0	0	8	0	0
Gly G	49 (12%)	29 (8%)	29	3	11	4
Pro P	43 (10%)	21 (6%)	21	4	4	4
Val V	27	20	20	9	8	3
Ala A	34	44	49	12	17	3
Ile I	15	23	20	3	9	3
Leu L	21	30	28	2	18	11
Met M	6	6	6	4	3	0
Phe F	3 (0.7%)	15 (4%)	15	3	6	5
Trp W	0 (0%)	8 (2%)	8	0	2	0
Tyr Y	5 (1%)	15 (4%)	15	6	3	1
Total	205	211	211	54	81	34

TABLE A.2 – Composition en acides aminés des différentes protéines mesurées selon la nature de l'acide aminé : polaire, chargé positivement, négativement et hydrophobe. En gras, mise en évidence des mutations des isoleucines et leucines en alanines de la MBP pour obtenir la MBP0. En vert, acide aminé qui "favorise" la structure native de la protéine. En rouge, acide aminé qui "défavorise" la structure native de la protéine. MBP : maltose binding protein ; MBP0 maltose binding protein mutée ; RNase : ribonucléase A ; Mb : myoglobine de cachalot ; CB : calbindine.

Protéines		hydrophobes	chargés		polaires	
			chargé +	chargé -		
	Tau	49%	15%	13%	23%	
	MBP	57%	12%	14%	17%	
	MBP0	57%	12%	14%	17%	
	RNase	43%	15%	8%	34%	
	Mb	52%	23%	14%	11%	
	CB	44%	15%	22%	19%	
Index d'hydrophobicité ¹	Tau	MBPwt	MBP0	RNase	Myo	CB
	-0.86	-0.34	-0.37	-0.66	-0.32	-0.61

TABLE A.3 – Pourcentage des acides aminés présents dans les protéines Tau, MBP (MBP0 a globalement les mêmes valeurs que MBP), RNase A, Mb et CB, selon les caractéristiques des acides aminés. A noter que la protéine Tau montre une proportion plus importante d'acides aminés polaires et chargés, ce qui traduit un caractère hydrophile plus important pour Tau. Un calcul d'indice GRAVY confirme cette observation, montrant que Tau est environ 2.5 plus hydrophile que MBP et MBP0 (rapport des deux indexes). MBP : maltose binding protein ; MBP0 : maltose binding protein mutée ; RNase : ribonucléase A ; Mb : myoglobine ; CB : calbindine.

1. index GRAVY ou *Grand average of hydropathicity*. Cet indice traduit le caractère hydrophile ou hydrophobe de la protéine. Une valeur négative correspond à un caractère hydrophile, une valeur positive à un caractère hydrophobe. Il est calculé à partir de la somme des valeurs de chaque acide aminé puis divisé par le nombre d'acide aminés.

Récapitulatif des caractéristiques des échantillons

B.1 Récapitulatif des échantillons

Paramètres	HTau	DTau	HMBP	DMBP
Poids total ¹	38.9127 g	38.1371 g	47.8410 g	48.2941 g
Poids protéine sèche	105 mg	204 mg	186 mg	221 mg
Poids eau d'hydratation	47 mg	77 mg	80 mg	81 mg
Nombre molécules solvant (H ₂ O/D ₂ O)	1026	1028	922	914
Hydratation H-Protéine/D ₂ O ²	0.44	...	0.44	...
Hydratation D-Protéine/H ₂ O ²	...	0.38	...	0.37
Epaisseur cellule	0.3 mm	0.3 mm	0.5 mm	0.5 mm
Temps séchage sur P ₂ O ₅	5 j	28 j	3 j	3 j

	HRNase ²	HMb	DCB/HMeth/D ₂ O	DCB/HLys/D ₂ O
Poids total	...	37.8548 g	38.5049 g	38.0116 g
Poids protéine sèche	200 mg	232 mg	123 mg	302mg
Poids eau d'hydratation	80 mg	103 mg	50 mg	121 mg
Nombre molécules solvant (H ₂ O/D ₂ O)	274	386	191	191
Hydratation H-Protéine/D ₂ O	0.40	0.43
Hydratation D-Protéine/D ₂ O	0.4	0.4
Epaisseur cellule	0.5 mm	0.3 mm	0.3 mm	0.3 mm
Temps séchage sur P ₂ O ₅	...	16 h	18 j	18 j

TABLE B.1 – Caractérisation (suite) des différents échantillons utilisés dans cette étude. Les données pour les échantillons MBP sont extraites de (26). Les données pour les échantillons RNase sont extraites de (27).

1. Base, couvercle, vis, indium, protéine et eau d'hydratation
2. La plupart des taux d'hydratation sont choisis pour avoir 0.4 g H₂O/g H-Protéine (situation de monocouche d'eau). L'échantillon de RNase fait exception et est hydraté à 0.4 g D₂O/g H-Protéine.
3. On compte en moyenne 42 polymères par molécule de myoglobine

B.2. CALCUL DES SECTIONS EFFICACES DE DIFFUSION

	DMb/HPol	HMb/HPol	HMBP0 _{soluble}	HMBP0 _{agreg}
Poids total	37.8226 g	38.2271 g	38.6129 g	38.6412 g
Poids protéine sèche	253 mg	142 mg	32 mg	123 mg
Poids eau d'hydratation	14 mg	53 mg
Nombre molécules solvant (H ₂ O/D ₂ O)	~42 ³	~42 ³	916	916
Hydratation H-Protéine/D ₂ O	0.44	0.43
Epaisseur cellule	0.3 mm	0.3 mm	0.3 mm	0.3 mm
Temps séchage sur P ₂ O ₅	24 h	24 h	15 h	27 h

TABLE B.2 – Caractérisation (suite) des différents échantillons utilisés dans cette étude.

B.2 Calcul des sections efficaces de diffusion

Système	σ_{coh}	σ_{incoh}	σ_{abs}
Protéine HTau	28 804 barns	193 546 barns	6,641 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (1026 molécules)	15 833 barns	4 194 barns	4 barns
Protéine DTau	34 944 barns	69 032 barns	4 805 barns
Couche d'hydratation H ₂ O (1028 molécules)	7 969 barns	164 303 barns	2 364 barns
Protéine HMBP	26 654 barns	179 240 barns	5 893 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (922 molécules)	14 228 barns	3 769 barns	3 barns
Protéine DMBP	32 342 barns	63 994 barns	4 195 barns
Couche d'hydratation H ₂ O (914 molécules)	7 085 barns	146 082 barns	2,101 barns
Protéine HRNase	8 374 barns	55 047 barns	1,945 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (274 molécules)	4 228 barns	1 120 barns	1 barns
HMéthyles	148 barns	6 912 barns	97 barns
DCB	6 947 barns	1 178 barns	661 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (190 molécules)	2 932 barns	777 barns	0.68 barns
HLysine	155 barns	7 032 barns	101 barns
DCB	6 925 barns	1 170 barns	661 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (190 molécules)	2 932 barns	777 barns	0.68 barns

TABLE B.3 – Sections efficaces de diffusion cohérente, incohérente et d'absorption pour les échantillons HProtéine/D₂O et DProtéine/H₂O. Le calcul des sections efficaces des protéines tient compte de 24% d'échange H/D pour Tau (2438 protons non-échangeables pour 3197 protons totaux), 21% pour MBP (2317 protons non-échangeables pour 2961 protons totaux), 27% pour la RNase (664 protons non-échangeables pour 909 protons totaux) et 19% pour les myoglobine de cheval et de cachalot (978 protons non-échangeables pour 1212 protons totaux). Les valeurs pour HMBP0 seront considérées comme équivalentes à celle de HMBP. L'échange est pris nul pour la DCB (hydraté en D₂O). Les calculs ont été effectués sous l'hypothèse que tout les protons échangeables le sont effectivement.

B.2. CALCUL DES SECTIONS EFFICACES DE DIFFUSION

Systeme	σ_{coh}	σ_{incoh}	σ_{abs}
Protéine HMb (cheval)	10 631 barns	78 754 barns	2 535 barns
Couche d'hydratation D ₂ O (386 molécules)	5 959 barns	1 577 barns	7 barns
Protéine DMb (cachalot)	31 480 barns	26 952 barns	1 811 barns
Couche de polymères	25 956 barns	382 662 barns	5 817 barns
$42 \times H-Polymer + 21 \times H-Linker$			
1 molécule de HPolymer	581 barns	8 560 barns	124 barns
1 molécule de HLinker	74 barns	1 120 barns	29 barns
Protéine HMb (cheval)	10 631 barns	78 754 barns	2 535 barns
Couche de polymères	25 956 barns	382 662 barns	5 817 barns
$42 \times H-Polymer + 21 \times H-Linker$			
1 molécule de HPolymer	581 barns	8 560 barns	124 barns
1 molécule de HLinker	74 barns	1 120 barns	29 barns

TABLE B.4 – Sections efficaces de diffusion cohérente, incohérente et d'absorption pour les échantillons HProtéine/D₂O et DProtéine/H₂O. Le calcul des sections efficaces des protéines tient compte de 19% pour les myoglobine de cheval et de cachalot (978 protons non-échangeables pour 1212 protons totaux). Les calculs ont été effectués sous l'hypothèse que tout les protons échangeables le sont effectivement.

Systeme	Signal	Bruit
HTau/D ₂ O	97%	3%
DTau/H ₂ O	71%	29%
HMBP/D ₂ O	98%	2%
DMBP/H ₂ O	70%	30%
HRNase/D ₂ O	98%	2%
DCB/HMeth/D ₂ O	56%	44%
DCB/HLys/D ₂ O	78%	22%
HMb/D ₂ O	98%	2%
DMb (Cachalot)/ <u>H-Couche polymères</u>	93%	7%
$42 \times H-Polymer + 21 \times H-Linker$		
	Polymère	Protéine
HMb (Cheval)/ <u>H-Couche polymères</u>	83%	17%
$42 \times H-Polymer + 21 \times H-Linker$		

TABLE B.5 – Bruit de fond et signal sur les différents systèmes. Le bruit de fond correspond soit à la couche d'hydratation deutérée, soit à la protéine deutérée. Le signal utile viendra soit de la protéine hydrogénée (échange inclus), soit de la couche d'hydratation hydrogéné. Les valeurs pour HMBP0 seront considérées comme les mêmes que celles de HMBP. Dans le cas du complexe HMb/HPol, le bruit sera considéré comme nul et les contributions seront partagées entre la protéine et les polymères.

Mesures complémentaires de diffusion incohérente élastique de neutrons

La variété des systèmes utilisés, ainsi que celle des instruments utilisés nous a amené à contrôler un certain nombre de paramètres, en particulier la reproductibilité des mesures, l'influence de l'instrument à résolution équivalente et l'impact du poids moléculaire de l'échantillon sur les mesures de diffusion élastique.

C.1 Reproductibilité des mesures

La reproductibilité des mesures de diffusion élastique de neutrons a été vérifiée en mesurant une rampe en température couplée à une mesure de diffusion élastique sur un même échantillon, ici HTau. Les rampes ont été choisies pour être à peu près similaires.

Les paramètres de l'instrument choisi (IN16) pour les mesures sont les suivants (tableau C.1)

Paramètres	HTau 1 ^{re}	HTau 2 ^{eme}
Angle		135°
Température		20-300 K
Durée rampe	31 h	28 h
Vitesse rampe	0.15 K.min ⁻¹	0.17 K.min ⁻¹

TABLE C.1 – Paramètres choisis pour la rampe en température et l'extraction des déplacements carrés moyens. IN16, résolution 0.9 μeV .

C.1.1 Résultats de deux mesures de diffusion incohérente élastiques sur la protéine Tau

Les résultats obtenus sont les suivants (figure C.1), mettant en évidence une coïncidence des déplacements carrés moyens des deux mesures sur toute la gamme de température.

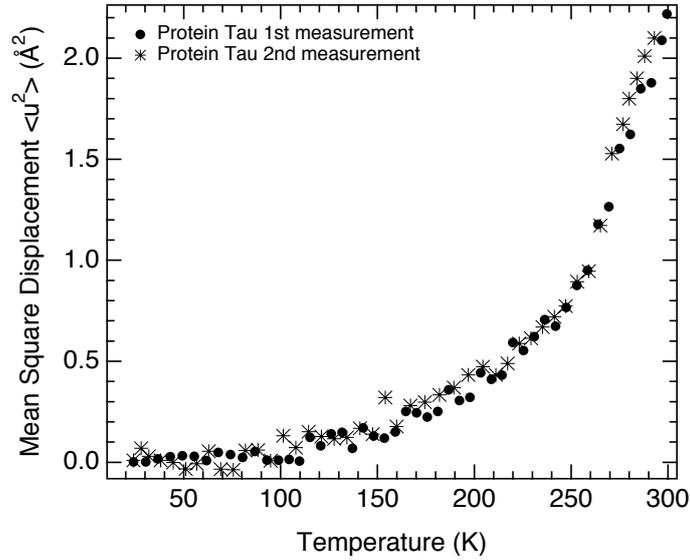


FIGURE C.1 – Déplacements carrés moyens obtenus par une première mesure de diffusion élastique sur la protéine Tau (cercles pleins) et d’une seconde mesure (étoile), de 20 K à 300 K. Gamme de fit : 0.19-1.32 Å^{-2} . La première mesure (cercle plein) est celle utilisée pour la publication des résultats. IN16, ILL, résolution 0.9 μeV

C.2 Comparaison des instruments IN16 et SPHERES pour des mesures de diffusion incohérente élastique

L’influence de l’instrument choisi sur des mesures de diffusion élastique a été vérifiée en mesurant une rampe en température couplée à une mesure de diffusion élastique sur deux échantillons (DTau et HMBP0_{soluble}), sur deux spectromètres à rétro-diffusion, IN16 et SPHERES, comparables en terme de résolution (0.9 μeV et 0.6 μeV respectivement) et de gamme de transfert de quantité de mouvement ($Q_{max}=1.9 \text{Å}^{-1}$).

C.2.1 Résultats obtenus avec l’échantillon DTau

Les paramètres des deux instruments choisis pour la mesure DTau sont les suivants (tableau C.2)

Paramètres	DTau	
	IN16	SPHERES
Instrument	IN16	SPHERES
Angle		135°
Température		20-300 K
Durée rampe	42h	24h
Vitesse rampe	0.11 K.min ⁻¹	0.19 K.min ⁻¹

TABLE C.2 – Paramètres choisis pour la rampe en température et l’extraction des déplacements carrés moyens. On notera en particulier les vitesses de rampe différentes.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure C.2), dans une gamme de Q la plus similaire possible (0.19-1.13 Å^{-2} pour IN16 et 0.36-1.25 Å^{-2} pour SPHERES). On voit une coïncidence des déplacements carrés moyens des deux mesures sur toute la gamme de température.

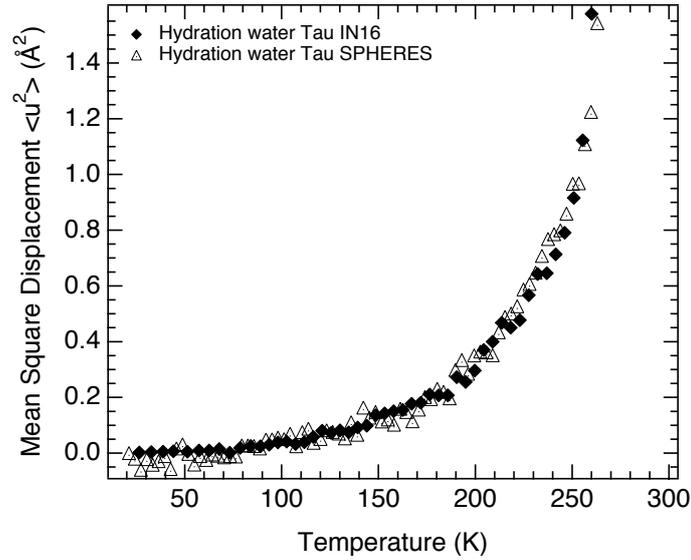


FIGURE C.2 – Déplacements carrés moyens obtenus par une mesure IN16 de diffusion élastique sur DTau (diamants pleins) et d’une seconde mesure SPHERES (triangles ouverts), de 20 K à 300 K. Gamme de fit : $0.19\text{-}1.32 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau-IN16 et $0.36\text{-}1.25 \text{ \AA}^{-2}$ pour DTau-SPHERES. La courbe de MSDs obtenue grâce aux mesures élastiques sur IN16 est celle utilisée pour la publication des résultats. IN16, ILL, résolution $0.9 \mu\text{eV}$ et SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

C.2.2 Résultats obtenus avec l’échantillon HMBP0_{soluble}

Pour des raisons de flux, la courbe présentée dans le texte principal pour les MSDs de HMBP0_{soluble} a été obtenue sur le spectromètre à rétro-diffusion SPHERES. Le graphe C.3 ci dessous montre la comparaison entre les mesures entre IN16 et SPHERES sur le même échantillon. Les résultats et les paramètres sont les suivants :

Paramètres	HMBP0 _{soluble}	
	IN16	SPHERES
Angle		135°
Température		20-300 K
Durée rampe	43 h	24 h
Vitesse rampe	$0.11 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.15 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$

TABLE C.3 – Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de diffusion incohérente élastique sur les échantillons HMBP0_{soluble} IN16 et SPHERES.

Les résultats obtenus (figure C.3) dans une gamme de Q la plus similaire possible ($0.20\text{-}1.40 \text{ \AA}^{-2}$ pour HMBP0_{soluble}-IN16 et $0.30\text{-}1.30 \text{ \AA}^{-2}$ pour HMBP0_{soluble}-SPHERES) montrent une coïncidence des déplacements carrés moyens sur toute la gamme de température.

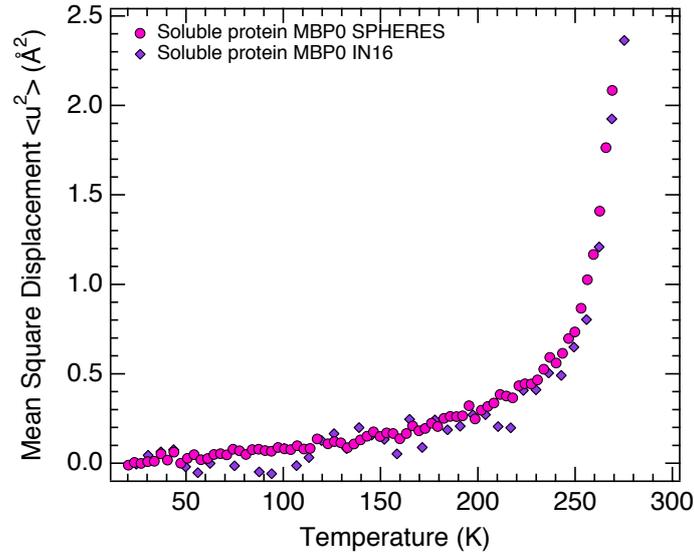


FIGURE C.3 – Déplacements carrés moyens obtenus par des mesures SPHERES (rond) et IN16 (diamant) de diffusion élastique sur $\text{HMBP0}_{\text{soluble}}$, de 20 K à 300 K. Gamme de fit : $0.20\text{-}1.40 \text{ \AA}^{-2}$ pour $\text{HMBP0}_{\text{soluble}}\text{-IN16}$, et $0.30\text{-}1.30 \text{ \AA}^{-2}$ pour $\text{HMBP0}_{\text{soluble}}\text{-SPHERES}$. IN16, ILL, résolutions $0.9 \mu\text{eV}$ et SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

Les logarithmes des intensités élastiques corrigées $I_{\text{sample}}(Q)$ dont sont extraits les MSDs de la protéine MBP0 sont les suivants (figure C.4) :

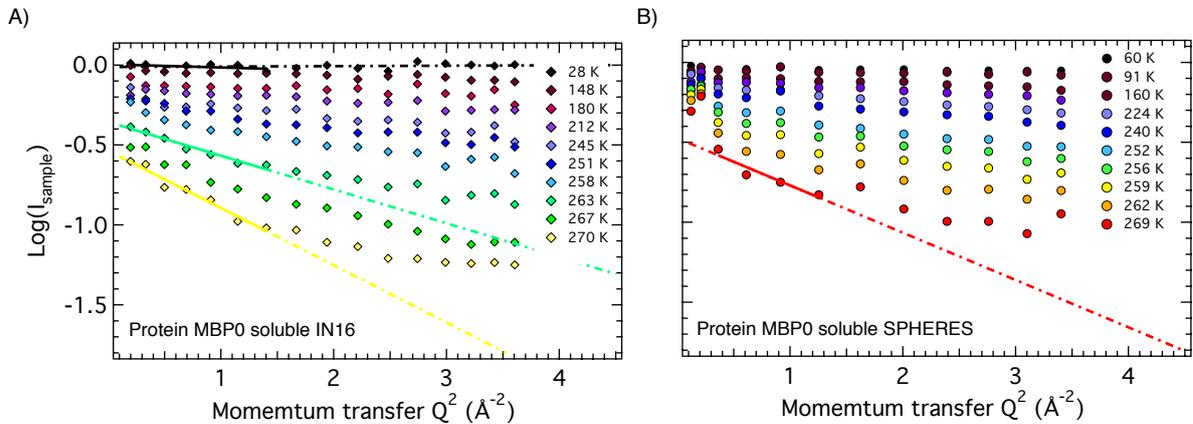


FIGURE C.4 – A) Logarithme des intensités en fonction de Q^2 de la protéine MBP0 soluble IN16 (diamant pleins). B) Logarithme des intensités en fonction de Q^2 de la protéine MBP0 soluble SPHERES (rond plein), de 20 K à 270 K. Gamme de fit : $0.20\text{-}1.40 \text{ \AA}^{-2}$ pour IN16 et $0.30\text{-}1.30 \text{ \AA}^{-2}$ pour SPHERES. Les traits pleins correspondent aux fits linéaires effectués sur la gamme choisie à la plus haute température accessible. les traits en pointillés représentent l'extrapolations du fit à plus hautes valeurs de Q . IN16, ILL, résolutions $0.9 \mu\text{eV}$ et SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$.

C.3 Influence du poids moléculaire sur la dynamique de la protéine

L'influence de la masse moléculaire de la protéine sur les MSDs obtenus par diffusion élastique de neutrons a été étudiée en comparant trois courbes de MSDs issus des protéines MBP (45 kDa), RNase (15 kDa) et la myoglobine de cheval (17 kDa). Les données de la MBP et de la RNase, extraites de (26) et (27) respectivement ont été traitée de manière similaires, de même que l'échantillon de myoglobine de cheval, avec les paramètres expérimentaux présentés dans le tableau C.4.

	HMBP	HRNase	HMb
Instrument		IN16	
Angle		135°	
Température		20-300 K	
Durée rampe	24 h	39 h	24h
Vitesse rampe	0.19 K.min ⁻¹	0.12 K.min ⁻¹	0.19 K.min ⁻¹

TABLE C.4 – Paramètres choisis pour la rampe en température et l'extraction des déplacements carrés moyens. Les paramètres utilisés pour les mesures de diffusion élastique sur la protéine MBP sont extraits de (26) et ceux utilisés pour la RNase sont extraits de (27).

C.3.1 Résultats obtenus avec les échantillons de protéine MBP, RNase et myoglobine

Les résultats (figure C.5) sont les suivants, mettant en évidence une indépendance de la mesure face au poids moléculaire de la protéine globulaire, du moins dans la gamme de résolution de l'instrument, ici 0.9 μeV .

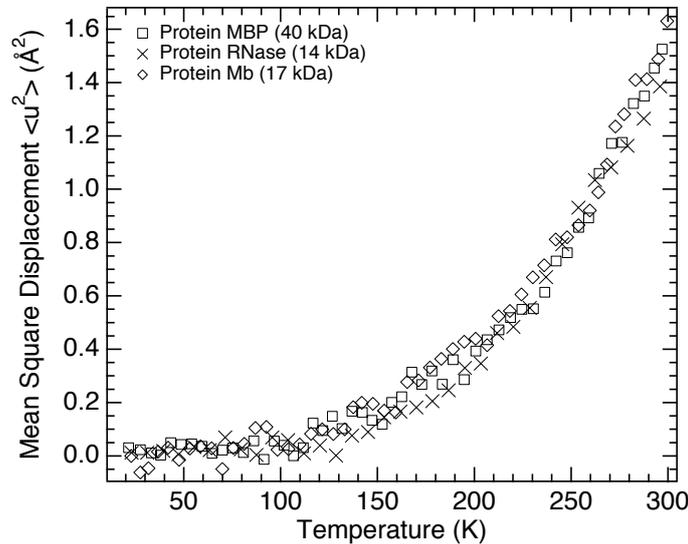


FIGURE C.5 – Déplacements carrés moyens obtenus par une mesure de diffusion élastique sur la protéine RNase (croix), sur la myoglobine de cheval (diamant ouvert) et sur la protéine MBP (carrés ouverts), de 20 K à 300 K. Gamme de fit : 0.19-1.38 Å^{-2} pour les trois protéines. Les courbes sont extraites de (27) pour la RNase et de (26) pour la MBP. IN16, ILL, résolution 0.9 μeV .

Analyse de la qualité des fits des spectres quasi-élastiques

D.1 Résultats de l'approche par deux lorentziennes

Il est intéressant de noter sur la figure D.1.A que le fit total du signal quasi-élastique est systématiquement en dessous des données expérimentales dans la gamme 5-10 μeV et au dessus des données pour les énergies supérieures à 10 μeV . Cette constatation amène à penser que le modèle de la simple lorentzienne ne permet pas de rendre parfaitement compte de la dynamique moyenne du système. Les figures D.1.A et D.1.B ci-dessous montrent les différences de qualité de fit entre une et deux lorentziennes (une "large" et une "étroite").

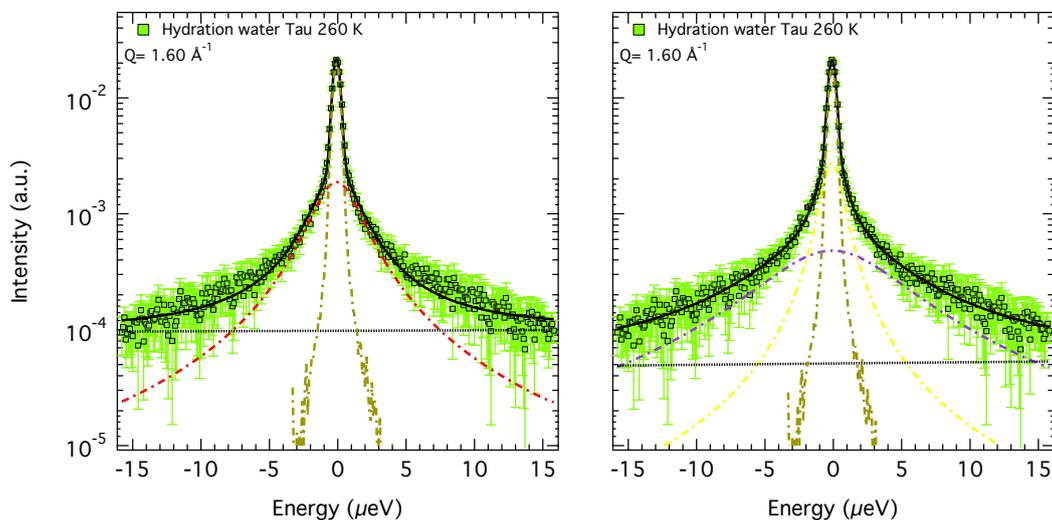


FIGURE D.1 – Fits des spectres quasi-élastiques de la couche d'hydratation de la protéine Tau à 260 K, à $Q = 1.60 \text{ \AA}^{-1}$ A) avec une lorentzienne (reproduction partielle de la figure 4.3) et B) avec deux lorentziennes. Données : carré gris bleu. Fit total : trait plein noir. Lorentzienne large : tiret violet. Lorentzienne étroite : tiret jaune. Pic de Dirac : tiret noir. Convolution avec la résolution à 20 K et ajout d'un bruit de fond (pointillé noir). SPHERES, FRM2, résolution $0.6 \mu\text{eV}$

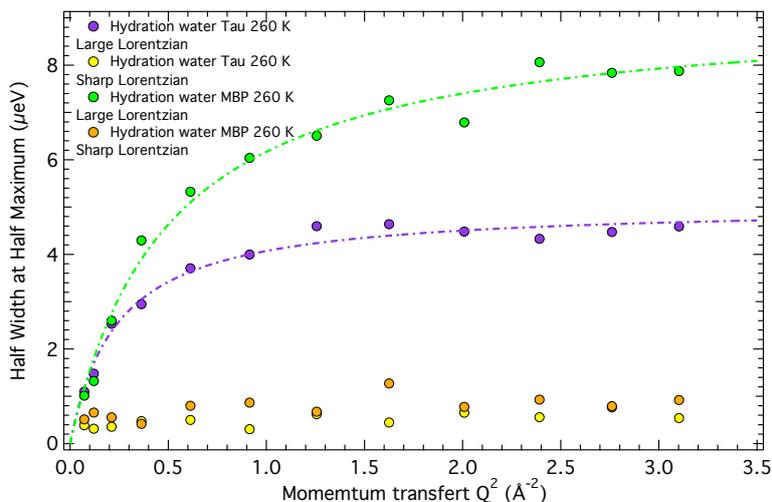


FIGURE D.2 – Demi-largeurs à mi-hauteur (HWHM) en fonction de Q^2 issues des fits des spectres quasi-élastiques des couches d'hydratation des protéines Tau (jaune et violet) et MBP (vert et orange), à 260 K. Fit de deux lorentziennes et d'un pic de Dirac, convolués avec la résolution à 20K. SPHERES, FRM2, résolution $0.6\mu\text{eV}$

Les spectres quasi-élastiques fittés avec deux lorentziennes ne semblent pas apporter plus d'informations que ne le font ces mêmes mesures traitées avec une lorentzienne. Le décalage en température de la dynamique entre l'eau d'hydratation de Tau et MBP se retrouve dans les demi-largeurs à mi-hauteur, à savoir celle de la lorentzienne large (lorentzienne de "diffusion" car dépendance en Q^2) plus importante pour l'eau de la MBP par rapport à celles de l'eau de la Tau. La lorentzienne étroite (lorentzienne de "rotation" car pas de dépendance en Q^2) donne des temps de corrélation légèrement inférieurs pour l'eau de la MBP, ce qui est cohérent. La pertinence des fits est cependant discutable, aux vues des paramètres extraits des fits des $\Gamma(\mathbf{Q})$ en fonction de Q^2 . Les temps de corrélation extraits des lorentziennes étroites montrent des niveaux de l'ordre de 300 ps, ce qui paraît peu probable pour une rotation. Inversement, la lorentzienne de diffusion extraite des mesures DTau à 260 K donne des coefficients de diffusion de l'ordre de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ces coefficients de diffusion sont typiquement ceux obtenus pour la diffusion de l'eau libre de 260 K. Il est probable que la dynamique extraite d'un fit à deux lorentziennes ne soit pas adaptée à la gamme de résolution du spectromètre. Le fit à deux lorentziennes illustre bien les difficultés d'interprétation et la limite du modèle *rotation-diffusion*.