



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique

Présentée par

Mlle LE CŒUR Clémence

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**INFLUENCE DE L'ENCOMBREMENT CYTOPLASMIQUE SUR LA
STABILITE ET LA DIFFUSION DES PROTEINES**

Thèse soutenue le 8 Mars 2010 devant le jury composé de :

Mme. V. Receveur-Brechot, Chargée de recherche CNRS, IMR Marseille

M. E. Trizac, Professeur, Université Paris Sud XI

M. J-F. Joanny, Professeur, Université Paris VI, Institut Curie

M. W. Doster, Professeur, Technische Universität München

M. S. Longeville, Physicien CEA, LLB Saclay

M. J. Teixeira, Directeur de recherche CNRS, LLB Saclay

Rapporteur

Rapporteur

Président du Jury

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Mangin et Christiane Alba-Simionesco, successivement directeurs, Susanna Gota-Goldman, directrice adjointe, et Alain Menelle pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire Léon Brillouin (LLB).

Je remercie Véronique Receveur-Bréchet et Emmanuel Trizac d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, d'avoir porté un grand intérêt à mon travail et d'avoir apporté des commentaires intéressants et constructifs. Je remercie également Jean-François Joanny pour avoir assuré le rôle de président du jury, ainsi que Wolfgang Doster d'avoir accepté de faire partie du jury.

Tout d'abord, mes remerciements vont à mes encadrants. Je remercie particulièrement Stéphane Longeville d'avoir proposé ce sujet et de m'avoir initiée aux techniques de diffusion de neutrons dont j'aurais aujourd'hui du mal à me passer. Au cours de ces trois ans, j'ai beaucoup aimé "imaginer des vaches sphériques dans des champs infinis" et j'espère continuer dans cette voie pendant encore longtemps. Je remercie également José Teixeira pour ses conseils toujours très constructifs et sa disponibilité quand je le sollicitais notamment au cours de la rédaction et de la préparation de la soutenance.

Je voudrais remercier les chercheurs du laboratoire que j'ai pu côtoyer à "l'étage", sur les "spectros", ou autour de nombreux cafés : Jacques, Marie-Claire, Géraldine qui m'a initiée à la chimie, Lay-Theng, François, Giulia, Natalie, Didier, Jean-Marc (car leau cest la vie et les protéines aussi), Sophie pour son aide en biologie, Alain, Annie, Fabrice "Michael" Cousin, la 106 verte, sa playliste et ses boîtes de Ricolos.

Ces remerciements ne seraient pas complets si j'oubliais les "non-permanents" côtoyés au cours de ces années. Je remercierai d'abord mes "co-promo", Nicolas Jouault et Chloé Chevigny. Merci à toi Chloé car, ensemble, nous ne riions plus, nous atteignions un pic de résonance et nous glouissions. Malgré tes efforts, je crains être restée insensible aux animaux que ça soit les rats, les chats, et bien sûr les double-poneys!!! (quoique je me sois apparemment découverte une passion pour le cheval...). Nicolas, je suis un peu déçue que tu n'aies pas fini la "domination

masculine", ni même vu le film... cependant, ton attitude au cours de ces 3 ans me laisse supposer que tu as lu en cachette le "2ème sexe"... De toute façon, je compte sur vous 2 pour organiser les JDN 26 à Pointe-à Pitre (ou Albe) et créer un plan W de tour operator de visite de "ville-centre de neutrons".

Je tiens également à remercier les "vieux" thésards : Jeremy et l'équipe de Metz, Karine car nous pouvions également parler expo au labo, et bien sûr Gabriel pour lequel je garderai toujours une pensée particulière. Il me faut bien sûr dire un mot sur "les jeunots" car cest eux qui ont supporté jusqu'au bout du bout alors que j'étais plus que ronchon... Merci à François car l'échange culturel Aveyron-14ème a toujours été très enrichissant (surtout en aligot) ; à Christophe därför det var jättekull att arbeta och studera med dig, jag önskar dig mycket skämt ; à Anne-Sophie car bien quelle tienne un peu mieux les subarus que les maghémites, elle a toujours et "encore" de beaux résultats et puis bien sûr car "ah oui, toi cest clémence...je sais...", courage pour la fin, je suis pas trop loin ; à Sindhu mon co-bureau qui a beaucoup progressé en français, enfin, surtout quand il rate quelque chose sur son ordi (oh...p), je tiens d'ailleurs à préciser, je ne conduis pas d'hélicoptère. Merci à l'ensemble des thésards, stagiaires, post-doc rencontrés : Jérôme, Anne-Laure car le cheval cest génial, Cynthia, Gilbert mon co-TP, Jawhar et son bureau dans un lieu...original, Alexandros, Perrine, Isabelle, Audrey, Benjamin, Caroline (seule représentante d'un autre étage), Carole, Cédric (pour sa finesse légendaire), les deux Céline, Guillaume, Lucie, Romain, Zineb , Vincent, Danny, Joe et mon petit poney.

Je remercie enfin les amis qui se sont déplacés pour ma soutenance et ont apprécié les rayons de giration, Sophie, Gaou, NicoDhoye, Ali, Julien, Stéphane (la prochaine thèse, cest la tienne) et Naomie. Mes derniers remerciements vont bien sûr à ma famille qui est venue me voir devenir docteur en toute sérénité...

Table des matières

Introduction	1
1 Influence de l'encombrement cytoplasmique	7
1.1 Généralités sur le repliement des protéines	9
1.1.1 Structure des protéines	9
1.1.2 Le repliement des protéines	11
1.2 Influence de l'encombrement cytoplasmique	14
1.2.1 La cellule biologique : un milieu encombré	14
1.2.2 Influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines	20
1.2.3 Etude de l'influence de l'encombrement sur la diffusion des protéines	29
1.2.4 Les objectifs de la thèse	31
1.3 Systèmes étudiées	34
1.3.1 La myoglobine et l'hémoglobine	34
1.3.2 Les substituts sanguins	38
2 Stabilité des protéines en milieu encombré	45
2.1 Choix et caractérisation de l'agent d'encombrement	47
2.1.1 Le Ficoll et le Dextran	47
2.1.2 Le PEG	56
2.1.3 Extinction de l'agent d'encombrement	56
2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement	58
2.2.1 Influence du volume exclu sur la conformation d'une chaîne	59
2.2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement	67
2.2.3 Influence du rapport d'échelle	74
2.2.4 Modification de l'agent d'encombrement, utilisation du Dextran	82
2.2.5 Analyse par la théorie de Flory	84

2.3	Influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la Myoglobine	88
2.3.1	Influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique	88
2.3.2	Dénaturation thermique de la myoglobine	89
2.3.3	Étude de la structure tertiaire d'une protéine	102
2.4	Discussion	109
3	Les solutions d'hémoglobine concentrées : un environnement encombré <i>in-vivo</i>	115
3.1	Généralités	116
3.2	Structure de l'hémoglobine en solution	117
3.2.1	L'hémoglobine en solution diluée	117
3.2.2	Solutions concentrées d'hémoglobine	119
3.3	Mesure de la dynamique par diffusion de neutrons à écho de spin (NSE)	122
3.3.1	Diffusion a temps court en solution concentrée : mesure par Echo de Spin	122
3.3.2	Etude en température proche de la température physiologique	127
3.3.3	Etude en concentration	128
3.4	Conclusion	129
4	Le complexe PEG-hémoglobine-PEG : corrélation structure réactivité	133
4.1	Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, un substitut sanguin	134
4.1.1	Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, une efficacité peu comprise	134
4.1.2	Préparation des échantillons	135
4.1.3	Caractérisation	135
4.2	Structure du complexe PEG-hémoglobine	137
4.2.1	Greffage de chaînes de PEG deutérées, analyse du complexe D-Peg-Hb-D-PEG	138
4.2.2	Informations "globales" sur le complexe	142
4.2.3	Les différents modèles de greffage	145
4.3	Discussion	147
4	Conclusion	153
A	Diffusion de neutrons	159
A.1	Diffusion de neutrons : principes généraux	159
A.1.1	Propriétés générales	159
A.1.2	Principe de la diffusion	160
A.1.3	Diffusion cohérente et incohérente	161
A.1.4	Intensité diffusée, section efficace de diffusion et longueur de diffusion	163
A.1.5	Le formalisme de Van Hove	164

B	Diffusion de neutrons aux petits angles	165
B.1	Principes	165
B.2	Le spectromètre	165
B.3	Section efficace de diffusion	166
B.4	Facteur de forme, Facteur de structure	167
B.5	Variation de contraste	168
B.6	Caractérisation des échantillons par DNPA	168
B.6.1	Domaine de Guinier	168
B.6.2	Domaine de Porod	169
B.6.3	Détermination de la masse et des interactions des objets diffusants	169
B.7	Quelques facteurs de formes usuelles	170
B.8	Traitement des données	171
C	Spectromètre à écho de spin	173
C.1	Généralités	173
C.2	Le spectromètre	174
D	Spectroscopie optique	179
D.1	Principe	179
D.2	Mesure de concentration par spectroscopie optique	180
E	Dichroïsme circulaire	181
E.1	Principe	181
E.2	Etude de la structure secondaire des protéines par CD	182
F	Préparation des échantillons	185
F.1	Préparation des protéines	185
F.1.1	La myoglobine	185
F.1.2	L'hémoglobine	185
F.1.3	Détermination de la concentration en hémoprotéine	186
F.2	Préparation du complexe PEG-hémoglobine-PEG	189
F.2.1	Préparation de l'hémoglobine	189
F.2.2	Fonctionnalisation du PEG	189
F.2.3	Greffage des chaînes de PEG sur l'hémoglobine	192
F.2.4	Caractérisation par électrophorèse	192
F.3	Melanges agent d'encombrement	192

Introduction

Les protéines jouent un rôle biologique clé. Elles participent aussi bien au stockage et au transport d'autres molécules qu'à la catalyse de réactions biochimiques. Leurs multiples fonctions dépendent de leur repliement en une structure tridimensionnelle unique, de leur flexibilité et de leur mobilité. Le mauvais repliement des protéines est à l'origine de nombreuses pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Le repliement des protéines est un des problèmes centraux de la biologie.

Le milieu cellulaire est un environnement complexe constitué d'une multitude de molécules de tailles et de formes très différentes : des ions, d'autres protéines, l'ARN... De nombreux paramètres comme le pH ou les forces électrostatiques vont modifier les équilibres biochimiques. La plupart des études expérimentales sont réalisées en solution diluée. Dans les conditions physiologiques le cytoplasme contient un grand nombre de macromolécules différentes dont la fraction volumique totale peut atteindre 0.3 à 0.4. Cet environnement peut être qualifié d'environnement "encombré" ou, en anglais, de "crowded". Le volume exclu (le volume inaccessible au centre de masse d'une particule) peut affecter les processus biologiques, physiques, ou chimiques des protéines.

L'influence du volume exclu a été étudiée d'un point de vue théorique à partir de systèmes modèles, notamment par A. Minton. Les processus de transport vont être ralentis. Les réactions qui vont induire une modification du volume entre produits et réactifs vont favoriser les conformations qui occupent un plus faible volume. Une des réactions biochimiques induisant ce changement de conformation est le repliement des protéines. C'est le processus physico-chimique par lequel une chaîne polypeptidique passe d'un ensemble de formes dépliées à une structure unique biologiquement active, dite native. Selon ces études, la présence d'un cosoluté augmente le volume exclu et a ainsi tendance à faire diminuer le volume occupé par la protéine dépliée. La présence de cosolutés inertes stabilise donc la protéine à l'état natif (N) en déstabilisant les

conformations les plus étendues de la protéine dénaturée (D). Cela déplace l'équilibre $N \rightleftharpoons D$ vers l'état natif.

L'objet de nos travaux est d'observer *in-vitro* l'influence de l'encombrement cytoplasmique sur les propriétés de stabilité et de diffusion des protéines. Observer une protéine dans un environnement encombré est une étude complexe. Afin de réaliser une telle étude nous devons dans un premier temps choisir des systèmes modèles, les plus simples possibles, pour comprendre les effets du volume exclu. Les techniques de diffusion de neutrons sont des techniques de choix pour étudier ces systèmes. La diffusion de neutrons aux petits angles permet d'étudier la structure d'un objet dans une structure complexe à une échelle de l'ordre de la dizaine d'ångström. La diffusion à écho de spin permet de sonder la dynamique des protéines en solution à des échelles de temps jusqu'à la centaine de nanosecondes.

Nous nous sommes intéressés aux changements conformationnels que l'encombrement cytoplasmique pourrait induire sur une protéine dénaturée. Les protéines à l'état dénaturé adoptent une conformation de type chaîne gaussienne. Nous avons mis en évidence par diffusion de neutrons aux petits angles la compression de chaînes d'un homopolymère, le Poly-éthylène glycol (PEG), lorsque la fraction en agent d'encombrement augmente. Dans un second temps, nous avons étudié par dichroïsme cellulaire et diffusion de neutrons la stabilité de la myoglobine en présence d'un agent d'encombrement. Nous avons pu observer la stabilisation de l'état natif de la protéine ainsi que la compression de son état dénaturé.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'encombrement sur la dynamique des protéines. La dynamique en milieu concentré est complexe, on doit distinguer différents phénomènes dynamiques collectifs ou individuels dans différentes gammes temporelles. L'hémoglobine *in-vivo* est très concentrée (de l'ordre de 330 g.l^{-1}). À cette concentration, les solutions d'hémoglobine ont une structure proche des solutions idéales de sphères dures. Nous avons mis en évidence par diffusion de neutrons à écho de spin des temps de relaxation à grand vecteur d'onde de l'ordre de plusieurs picosecondes. L'origine de cette relaxation ne peut être interprétée uniquement en terme de mouvements diffusifs et reste inexplicée.

Le dernier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'étude structurale d'un substitut sanguin à base d'hémoglobine, le PEG-hémoglobine-PEG. L'hémoglobine est une protéine essentielle dans le transport de l'oxygène des poumons aux tissus. Seule, elle ne peut servir de substitut sanguin. Des complexes comme celui que nous avons étudié sont aujourd'hui développés.

Ce mémoire s'articule en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à la présentation des notions fondamentales sur le repliement et la diffusion des protéines dans un environnement

encombré nécessaire à la compréhension des études expérimentales ainsi qu'à la présentation des systèmes étudiés. Dans le chapitre 2, nous nous sommes attachés à étudier la conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un agent d'encombrement. Cette étude nous a permis d'étudier la stabilité d'une protéine, la myoglobine, en présence d'un agent d'encombrement. Le chapitre 3 est consacré à une étude dynamique des solutions concentrées d'hémoglobine. Le chapitre 4 décrit d'un point de vue structural un substitut sanguin.

Nous avons fait le choix de présenter en annexe l'ensemble des techniques expérimentales utilisées.

Chapitre **1**

Influence de l'encombrement cytoplasmique sur la stabilité et la diffusion des protéines

Sommaire

1.1 Généralités sur le repliement des protéines	9
1.1.1 Structure des protéines	9
1.1.2 Le repliement des protéines	11
1.2 Influence de l'encombrement cytoplasmique	14
1.2.1 La cellule biologique : un milieu encombré	14
a) La cellule biologique	14
b) Notion de volume exclu	16
i) Non idéalité	18
ii) Influence du volume exclu sur les équilibres chimiques	19
1.2.2 Influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines	20
a) Aspects théoriques	21
i) Le repliement : modèle à deux états	21
ii) Modélisation	23
b) Aspects expérimentaux	24
i) Les systèmes utilisés	24
ii) Les méthodes utilisées	26
iii) Quelques résultats expérimentaux	26
1.2.3 Etude de l'influence de l'encombrement sur la diffusion des protéines	29

CHAPITRE 1. INFLUENCE DE L'ENCOMBREMENT CYTOPLASMIQUE

a) Généralités sur les mouvements des protéines	29
b) Étudier des systèmes complexes : théorie, simulation et expériences	30
1.2.4 Les objectifs de la thèse	31
a) Les mécanismes responsable de la stabilisation <i>in-vivo</i>	31
b) Les mécanismes de diffusion <i>in-vivo</i>	32
1.3 Systèmes étudiées	34
1.3.1 La myoglobine et l'hémoglobine	34
a) Fonction biologique	35
i) Structures de la myoglobine et de l'hémoglobine	35
ii) Des molécules de transport et de stockage	36
1.3.2 Les substituts sanguins	38

1.1 Généralités sur le repliement des protéines

Les protéines ont été découvertes en 1839 par Mulder ^[1] qui les nomma sur la suggestion du chimiste Berzelius d'après le grec *proteios* qui signifie premier en importance. Elles sont les artisans moléculaires de la cellule. Elles assurent de multiples fonctions biologiques : les enzymes catalysent les réactions chimiques intra et extra cellulaires, elles forment le cytosquelette qui permet de donner à la cellule sa structure, certaines comme les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine...) sont des molécules de transport, d'autres comme l'insuline sont des hormones, d'autres encore sont des anticorps, des toxines... et la liste est loin d'être exhaustive.

Les multiples fonctions des protéines dépendent de leur structure, de leur flexibilité et de leur mobilité. Les protéines sont synthétisées sur les ribosomes sous forme de chaîne polypeptidique dont la séquence est déterminée à partir des informations génétiques. Elles doivent ensuite se replier en une structure tridimensionnelle unique afin d'être biologiquement actives ¹. Outre le fait qu'il ne permet pas d'assurer la fonction biologique, le mauvais repliement des protéines est à l'origine de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Le repliement des protéines est un des problèmes centraux de la biologie.

1.1.1 Structure des protéines

Les protéines sont des chaînes hétéropolymères dont les monomères sont les acides aminés. Il en existe 20 différents. C'est **la structure primaire** des protéines. (fig. 1.1).

Au niveau local, deux types de formes spécifiques ont été précisées grâce aux travaux de Linus Pauling ^[2] : les hélices α et les feuillets β . A la fin des années 50, l'étude cristallographique de la myoglobine et de l'hémoglobine par Kendrew et Perutz ^[3] ^[4] est venue confirmer l'existence des hélices α . D'autres types de structures (comme les hélices 3_{10} ou les feuillets α) sont prédites mais elles ne sont observées que plus rarement. C'est **la structure secondaire** des protéines. Lorsque la conformation locale ne correspond à aucune des structures secondaires définies, la chaîne protéique adopte une conformation qui s'apparente à celle d'une pelote statistique.

Les structures secondaires s'arrangent les unes par rapport aux autres pour former la structure tridimensionnelle de la protéine, c'est **la structure tertiaire** des protéines. La structure

1. Il existe également des protéines désordonnées biologiquement actives. Nous ne parlerons dans ce travail que des protéines globulaires.

[1] Mulder, G. *J. für prakt. Chem.* **16**, 129 (1839).

[2] Pauling, L., Corey, R., and Branson, H. *PNAS* **37**, 205–211 (1951).

[3] Kendrew, J. and all. *Nat.* **181**(4610), 662–666 (1958).

[4] Perutz, M. *Nat.* **185**(4711), 416–422 (1960).

tertiaire est particulièrement importante pour l'activité des protéines. Elle permet à des acides aminés très éloignés au niveau de la chaîne primaire de se retrouver très proches spatialement. Les protéines qui, comme l'hémoglobine, possèdent plusieurs chaînes polypeptidiques présentent un niveau supplémentaire d'organisation qui correspond, c'est **la structure quaternaire**.

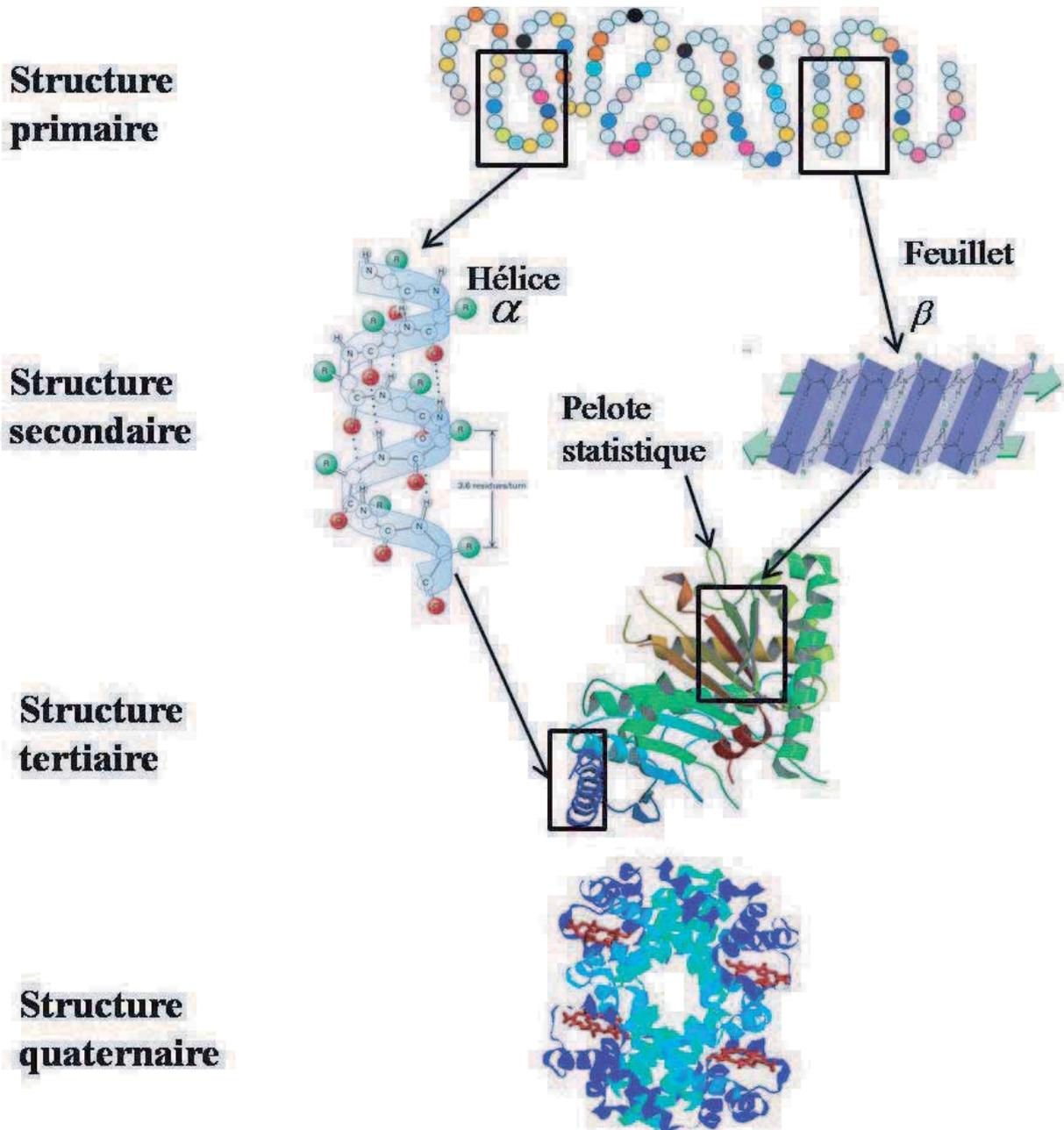


FIGURE 1.1 – Représentation de la structure des protéines : de la structure primaire à la structure tridimensionnelle.

1.1.2 Le repliement des protéines

La protéine biologiquement active est dite à l'**état natif**, noté N. Lorsque la structure tridimensionnelle de la protéine est altérée, la protéine est dite à l'**état dénaturé**, noté D_i . Elle n'est plus active biologiquement. *In-vivo*, elles se replient dans la même conformation native en des temps allant de quelques microsecondes à la minute.

Il existe un équilibre thermodynamique entre la multitude d'états dénaturés, D_i , et l'état natif N, unique :

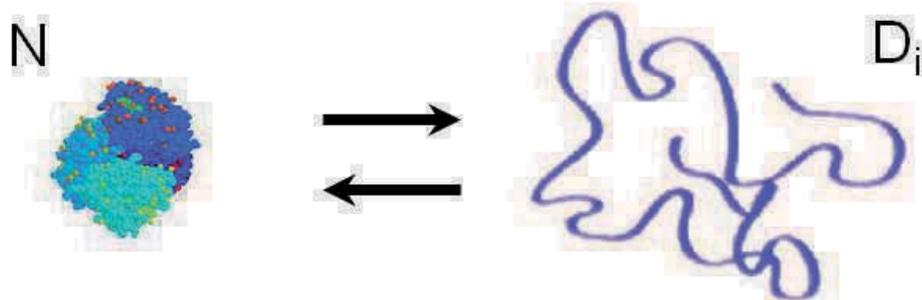


FIGURE 1.2 – Schéma de l'équilibre entre la protéine à l'état natif compact et l'ensemble des états dénaturés D_i .

L'énergie libre, ΔG_{ND} , de l'équilibre de la réaction est défini par :

$$\Delta G_{ND} = \Delta H_{ND} - T\Delta S_{ND} = -RT \ln K_{ND} \quad (1.2)$$

où ΔH_{ND} est le changement de l'enthalpie de la réaction de passage de N à D, ΔS_{ND} celui de l'entropie et K_{ND} la constante de la réaction.

L'équilibre état natif/état dénaturé (fig. 1.2) dépend de la balance entre entropie et enthalpie. L'entropie conformationnelle de la protéine à l'état dénaturé, qui possède de multiples conformations possibles, est plus élevée que celle de l'état natif, unique. Cette perte d'entropie est compensée par des gains enthalpiques dû à différentes interactions (interactions de Van der Valls, interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène...) à l'intérieur même de la chaîne ou entre la chaîne et le solvant. Ces interactions peuvent également favoriser le repliement d'un point de vue entropique.

Les premières études sur le repliement des protéines ont été effectuées dans les années 1930,

notamment par Pauling ^[5] qui a proposé un modèle de repliement fondé essentiellement sur la création de liaisons hydrogène.

Au début des années 60, Anfinsen ^[6] ^[7] a émis l'hypothèse que le repliement des protéines est fondé sur la thermodynamique. Toute l'information nécessaire au repliement est contenue dans la chaîne polypeptidique. La conformation de la protéine à l'état natif serait celle pour laquelle l'énergie libre est la plus faible. Selon cette théorie, la protéine peut adopter une infinité de conformations isoénergétiques (sur la figure 1.3(a) représentant le paysage énergétique d'un tel modèle, cela correspond au plan : la protéine se déplace dessus de manière aléatoire) avant de "tomber" dans le puits de potentiel pour atteindre l'état d'équilibre d'énergie minimum.

Au milieu des années 60, Levinthal ^[8] a infirmé l'hypothèse d'un repliement à deux états (état natif, état dénaturé). Il a montré que, si une protéine explorait chacune des conformations possibles, le repliement d'une protéine prendrait beaucoup plus de temps que celui observé expérimentalement. Pour des questions cinétiques, la recherche aléatoire du minimum d'énergie est impossible. En prenant l'exemple simpliste d'une chaîne comportant une centaine d'acides aminés qui peuvent chacun adopter deux conformations différentes, on peut estimer le nombre de conformations possibles à 2^{100} . Le temps minimum de passage entre deux conformations étant de l'ordre de 10^{-13} s, il faudrait 10^{10} années à la protéine pour explorer la totalité des conformations. C'est le "**Paradoxe de Levinthal**".

Afin de résoudre ce paradoxe, Levinthal a supposé qu'une protéine ne cherche pas sa structure de manière aléatoire mais qu'elle suit des "chemins de repliement" (fig. 1.3(b)). Elle adopte à chaque étape une structure parmi certaines qui mènent vers un minimum local d'énergie. L'état natif n'est plus forcément l'état le plus stable thermodynamiquement mais peut être un état métastable.

Depuis la fin des années 90, d'autres types d'approches théoriques du repliement ont été développés. Ces modèles s'appuient sur une vision dite ensembliste et sont plutôt basés sur la physique statistique et la physique des polymères. Ils peuvent être abordés à l'aide d'un schéma énergétique dit en "entonnoir" représenté par Dill ^[9]. Lorsque le repliement de la structure progresse vers l'état natif, le nombre de conformations à explorer diminue. La cinétique est reliée à la courbure du paysage énergétique : plus elle est grande, plus le repliement est rapide. Le repliement se fait en deux temps : l'effondrement hydrophobe lève la dégénérescence des états dénaturés et permet d'atteindre un état globule fondu. Le globule fondu ("Molten Globule") est

[5] Pauling, L. and Mirsky, A. *PNAS* **22**, 439–447 (1936).

[6] Anfinsen, C. and Haber, E. *J. Biol. Chem.* **236**(5), 1361–1363 (1961).

[7] Anfinsen, C. *Sci.* **181**(96), 2230–230 (1973).

[8] Levinthal, C. *Sci.* **65**, 44–45 (1968).

[9] Dill, K. and Chan, H. *Nat. Stru. Biol.* **4**, 10–19 (1997).

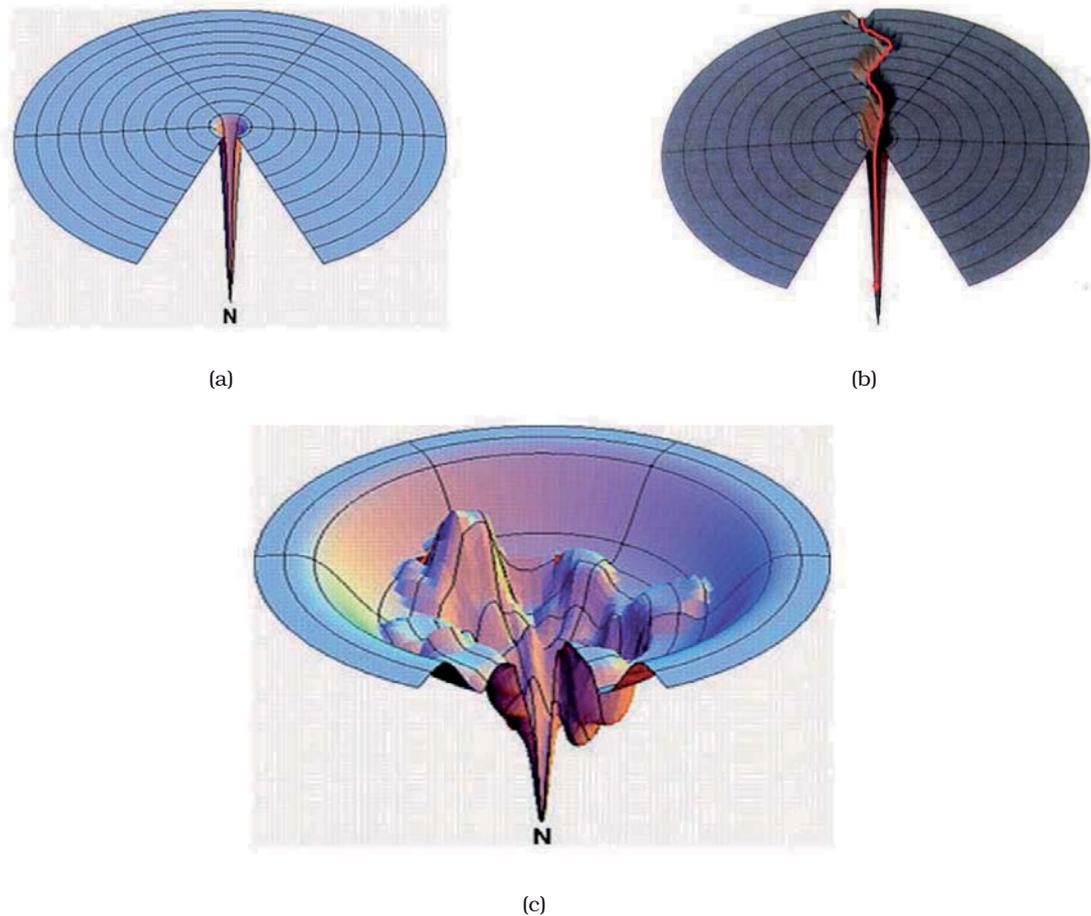


FIGURE 1.3 – Différents types de paysage énergétique : (a) Ce paysage correspond à un modèle à deux états : la recherche de l'état stable dont l'énergie libre est plus faible se fait de manière aléatoire . Ce paysage énergétique est cinétiquement impossible. (b) Ce paysage énergétique correspond à un repliement guidé par un chemin préférentiel proposé par Levinthal. (c) Ce paysage énergétique correspond au paysage de l'entonnoir proposé par Dill . Les conformations dépliées ne sont pas dégénérées en énergie, la chaîne s'effondre avant d'atteindre sa structure native. La vitesse de repliement est limitée par la courbure du schéma énergétique et non par la "recherche" de l'état thermodynamique le plus stable.

une structure dont la majorité des structures secondaires natives sont formées mais dont la structure tertiaire n'est pas atteinte. L'état natif atteint est celui de plus grande stabilité. Cet entonnoir peut être "rugueux" (fig.1.3(c)). Ces rugosités correspondent à des pièges cinétiques ou à des barrières thermodynamiques. La vision ensembliste permet de comprendre à la fois les repliements dits à "deux états" et les repliements qui permettent d'observer plusieurs états intermédiaires.

Bien que le modèle de repliement à deux états ne soit donc pas physiquement vérifié pour l'ensemble des protéines, il reste souvent une bonne approximation. L'hypothèse ne consiste pas à nier l'existence des états intermédiaires mais à supposer qu'ils ne sont pas significativement peuplés. Dans une étude expérimentale de microcalorimétrie, Privalov ^[10] a étudié cinq petites protéines globulaires (la ribonucléase, le lysozyme, la chymotrypsine, le cytochrome C et la myoglobine) et il a analysé l'écart entre l'enthalpie de Van't Hoff correspondant à un modèle à deux états et celle mesurée par calorimétrie. Cet écart ne dépasse pas 5% et a été attribué à l'existence d'espèces intermédiaires très instables. Les résultats expérimentaux semblent montrer que l'équilibre état natif - état dénaturé peut être décrit par une transition réversible, symétrique et très coopérative et que, au moins pour les petites protéines, l'approximation des deux états est souvent validée.

1.2 Influence de l'encombrement cytoplasmique

1.2.1 La cellule biologique : un milieu encombré

a) La cellule biologique

Le cytoplasme des cellules est un environnement complexe, il contient un grand nombre de macromolécules différentes ^[11] ^[12] (protéines, acides nucléiques, ribosomes, mitochondries, hydrates de carbone...)(fig. 1.4 ^[13]). Chacune des protéines est, à quelques exceptions près, présente à une faible concentration. La fraction massique totale de macromolécules est de l'ordre de 200 à 400 mg/ml ^[14] ^[15] ce qui correspond à une fraction volumique de l'ordre de 30 à 35% . Cet environnement peut être qualifié d'environnement "encombré", ou, en anglais de "crowded".

[10] Privalov, P. *J. Mol Biol.* **86**, 665–684 (1974).

[11] Fulton, A. *Cell* **20**, 2093 – 2120 (1982).

[12] Zimmerman, S. and Trach, S. *J. Molec. Biol.* **222**(3), 599 – 620 (1991).

[13] Goodsell, D. *Springer-Verlag NY inc* (1993).

[14] Ellis, R. *Trends Biochem. Sci.* **26**(10), 597 – 604 (2001).

[15] Ellis, R. *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**(1), 114 – 119 (2001).

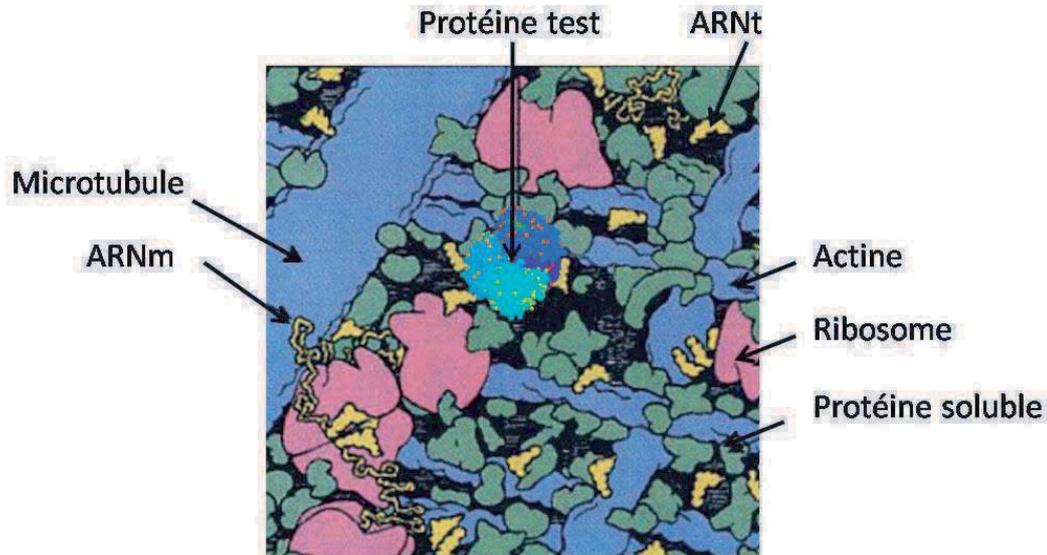


FIGURE 1.4 – Schéma d'une cellule eucaryote à l'échelle 1 : 1 000 000. La protéine test (en rouge) est dans un milieu fluide encombré par des protéines solubles (en vert), de l'ARN (en jaune), des ribosomes (en rose) et le cytosquelette (en bleu).

En général, les études in-vitro des protéines sont effectuées dans des solutions tampons à de très faibles concentrations (de l'ordre du 1 mg.l^{-1} à 1 g.l^{-1}) et l'influence de l'encombrement cytoplasmique est négligée.

Dans la cellule, un grand nombre d'interactions existe entre les macromolécules. On en distingue deux grandes classes : les interactions spécifiques et les non-spécifiques. Les interactions spécifiques sont, comme leur nom l'indique, spécifiques à chaque protéine et dépendent de la structure des protéines elles-mêmes. Les interactions non-spécifiques dépendent des propriétés globales des macromolécules et sont, en général, plus faibles que les interactions spécifiques. Comme les particules ne sont pas interpenetrables, l'encombrement cytoplasmique induit des interactions stériques non-spécifiques et répulsives entre les macromolécules. L'encombrement cytoplasmique va avoir une influence sur de nombreux métabolismes cellulaires : les réactions biologiques, les équilibres biochimiques, la diffusion à l'intérieur de la cellule... Dans le cas des réactions biochimiques, l'encombrement va modifier les équilibres des réactions comme les dimérisations ^[16], la formation d'amyloïdes ^[17] ou le repliement des protéines.

[16] Pielak, G. and all. *Protein Sci.* **11**, 997–1003 (2002).

[17] Fink, L. and all. *J. of molec. recognition* **11**, 456–464 (2004).

Les premières études sur l'influence de l'encombrement sur les propriétés biologiques *in-vivo* remontent à la période allant de la fin des années 1940 aux années 1960 [18] [19]. Elles introduisent la notion de volume exclu [20] en observant l'influence sur les protéines de l'acide hyaluronique à forte concentration. Les premières études théoriques semi-quantitatives remontent au début des années 1980 [21]. Depuis une dizaine d'années de nombreuses études expérimentales et théoriques tentent d'observer et de quantifier les effets de l'encombrement [12] [22] [23].

b) Notion de volume exclu

Le volume exclu à une particule, v_e , est le volume inaccessible au centre de masse de cette particule dans une solution, dû à la présence d'autres macromolécules. Il dépend de plusieurs paramètres :

- la taille des macromolécules en solution, qu'on appellera les macromolécules d'encombrement, de rayon caractéristique R_e
- la fraction volumique en particules d'encombrement, ϕ_v
- la taille de la particule que l'on introduit, de rayon caractéristique R_i
- la forme des macromolécules d'encombrement et introduites

La figure 1.5 est une illustration schématique à 2D de la notion de volume exclu. Les macromolécules d'encombrement sont représentées par des sphères. Le volume libre, v_l , correspond au volume accessible au centre de masse de la particule que l'on souhaite introduire. Le volume exclu est donc défini par $v_e = v_t - v_l$ où v_t est le volume total. Pour une fraction volumique constante de l'ordre de $\Phi_v \approx 30\%$, v_l diminue fortement lorsque la taille de la particule d'encombrement augmente.

La probabilité pour la particule i de trouver un espace libre de toute macromolécule d'encombrement décroît comme $(1 - \Phi) \exp(-3\Phi(R_i + R_e)^3 / 4\pi R_e^3)$ [24] (fig. 1.6)

[18] Ogston, A. and Stanier, J. *Biochem. J.* **46**(3), 364–376 (1950).

[19] Laurent, T. *Biochem. J.* **93**, 106–112 (1964).

[20] Ogston, A. *Trans. Faraday Soc.* **54**(11), 1754–1757 (1958).

[21] Minton, A. *Molecular and Cellular Biochem.* **55**, 119–141 (1983).

[12] Zimmerman, S. and Trach, S. *J. Molec. Biol.* **222**(3), 599 – 620 (1991).

[22] Zimmerman, S. and Minton, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **22**, 27–65 (1993).

[23] Minton, A. and Ellis, R. *Nat.* **425**, 27 – 28 (2001).

[24] Cheungand, M., Klimov, D., and Thirumalai, D. *Proceed. of the Nat. Ac. Sci. of U.S.A.* **102**(13), 4753–4758 (2005).

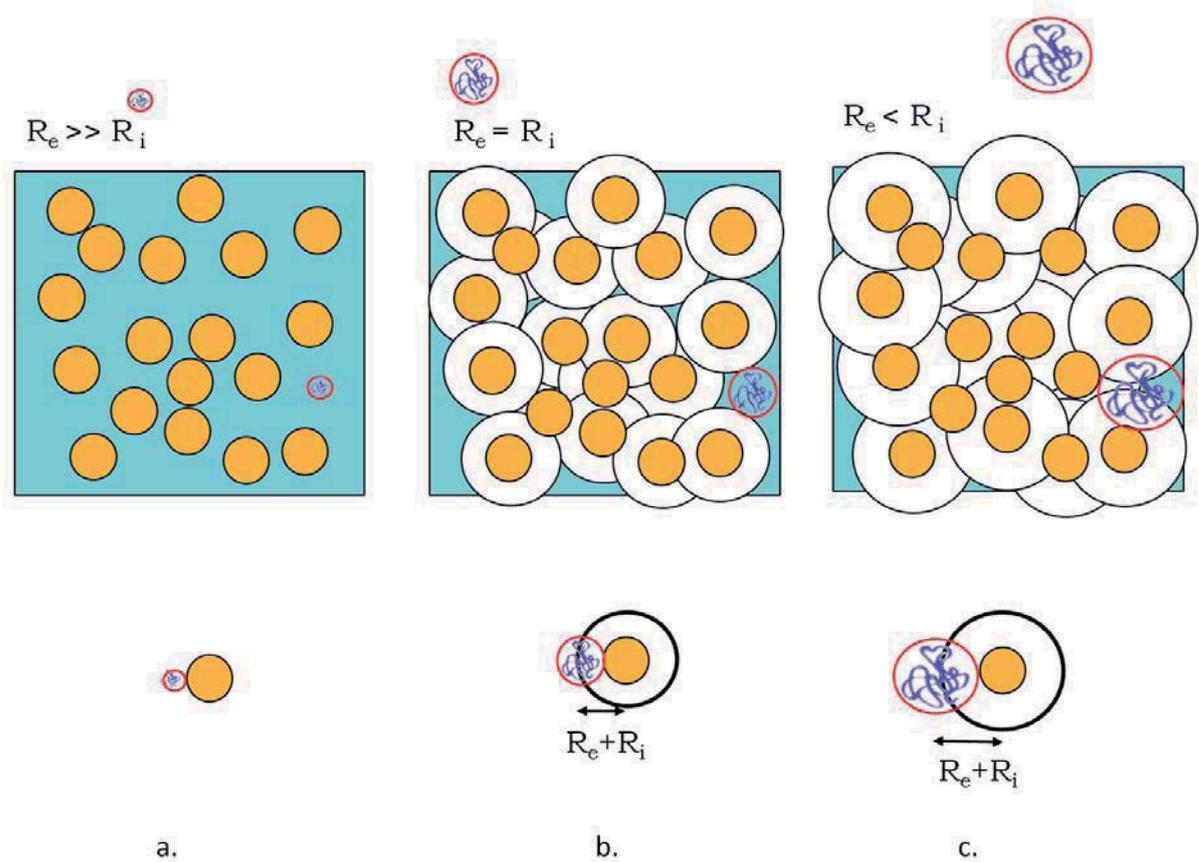


FIGURE 1.5 – Notion de volume exclu représenté en 2D pour une fraction surfacique en particules d'encombrement de l'ordre de 30%. Les particules d'encombrement sont représentées en orange, le volume exclu en blanc, le volume libre est en cyan. Lorsque le rayon de la particule introduite, R_i , est très faible devant le rayon de la particule d'encombrement, R_e , le volume exclu correspond pratiquement au volume occupé par les particules d'encombrement (figure (a)). Lorsque R_i augmente (fig b et c) le volume exclu augmente fortement par rapport au volume libre.

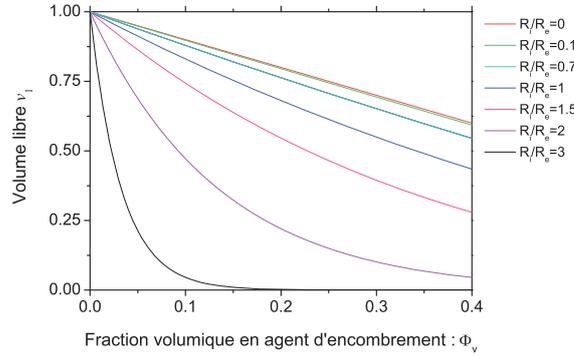


FIGURE 1.6 – Evolution du volume libre en solution en fonction de la fraction volumique en agent d'encombrement lorsque l'on considère que la particule introduite et les particules d'encombrement sont des sphères pour différents rapports R_i/R_e . courbe rouge : on n'introduit pas de macromolécules. courbe vert à noir : le rapport R_i/R_e augmente progressivement.

i) Non idéalité

Pour une solution idéale de particules i en solution diluée (le solvant est en très large excès par rapport au soluté), les interactions entre particules peuvent être négligées. Par analogie avec les gaz parfaits, Π , la pression osmotique de la solution, obéit à l'équation d'état :

$$\Pi = \rho kT \quad (1.3)$$

où ρ est la densité en particules i , k est la constante de Boltzmann et T la température.

En intégrant cette équation d'état, on détermine le potentiel chimique de la particule (l'énergie libre par particule), μ_i :

$$\mu_i = \mu_i^o + RT \ln c_i \quad (1.4)$$

où μ_i^o est le potentiel chimique de la molécule i en solution, c_i la concentration en i et R la constante des gaz parfaits.

Lorsqu'il existe des interactions entre les particules (électrostatiques, stériques...), la solution ne peut plus être considérée comme idéale. On ajoute au potentiel chimique un terme de non-idéalité :

$$\mu_i = \mu_i^o + kT \ln c_i + kT \ln \gamma_i \quad (1.5a)$$

$$\mu_i = \mu_i^o + kT \ln a_i \quad (1.5b)$$

où γ_i est le coefficient de non idéalité et $a_i = \gamma_i c_i$ l'activité de la particule i .

Lorsqu'on tient compte uniquement de l'exclusion stérique, on peut définir le coefficient de non-idéalité et l'activité de la particule par rapport au volume libre en solution, $v_{l,i}$ et au volume

total, v_t .

$$\gamma_i = \frac{v_t}{v_{l,i}} \quad (1.6a)$$

$$a_i = c_i \frac{v_t}{v_{l,i}} \quad (1.6b)$$

L'activité, a_i , est la concentration effective en espèce i : la concentration de l'espèce i , dans le volume libre.

Lorsqu'on ne tient compte que des interactions de type volume exclu, l'activité d'une particule est d'autant plus grande que le volume libre est faible. A fraction ϕ en agent d'encombrement constante, plus la particule occupe un volume important (fig. 1.5), plus son activité sera grande.

Pour tenir compte des interactions, des termes doivent également être ajoutés à la pression osmotique dont l'expression devient :

$$\Pi = \rho kT(1 + a_2\rho + a_3\rho^2 + \dots) \quad (1.7)$$

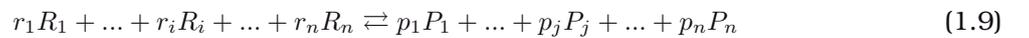
a_2 , a_3 sont les second, troisième... coefficients du viriels. a_2 représente le volume exclu entre 2 particules et est défini par :

$$a_2 = 2\pi \int_0^\infty [1 - e^{-U(r)/kT}]r^2 dr \quad (1.8)$$

où $U(r)$ est le potentiel d'interaction entre les particules.

ii) Influence du volume exclu sur les équilibres chimiques

Comme nous l'avons vu, le volume exclu a une influence sur le potentiel chimique d'une espèce i . La valeur du potentiel chimique des produits et des réactifs détermine l'équilibre des réactions chimiques. Il est important d'étudier l'influence que peuvent avoir des macromolécules "inertes" qui créent des interactions non spécifiques stériques sur l'équilibre thermodynamique d'un système biologique. Par exemple, l'équilibre d'une réaction qui induirait un changement de volume entre produits et réactifs va être perturbé par le volume exclu.



où r_i est le coefficient stœchiométrique du réactif i et p_j celui du produit j . La constante de réaction de cet équilibre est K .

$$K = \frac{\prod_{i=1}^n a_{P_i}^{p_i}}{\prod_{i=1}^n a_{R_i}^{r_i}} \quad (1.10)$$

où a_{P_i} est l'activité du i -ème produit i et a_{R_i} celle du i -ème réactif i .

K est la constante de réaction apparente qui peut se décomposer ^[25] en :

$$K = K^\circ \Gamma \quad (1.11)$$

[25] Hall, D. and Minton, A. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. and Proteomics* **1649**(2), 127 – 139 (2003).

où $K^o = \frac{\prod_{i=1}^n c_{P_i}^{p_i}}{\prod_{i=1}^n c_{R_i}^{r_i}}$ est la constante d'équilibre de la réaction dans le cas d'une solution idéale et $\Gamma = \frac{\prod_{i=1}^n \gamma_{P_i}^{p_i}}{\prod_{i=1}^n \gamma_{R_i}^{r_i}}$ est le "facteur de non idéalité". Lorsqu'on ne tient compte que des interactions de type stérique on a :

$$\Gamma = v_t^m \frac{\prod_{i=1}^n v_{l,p_i}}{\prod_{i=1}^n v_{l,r_i}} \quad (1.12)$$

où $m = \sum r_i - \sum p_i$.

Le terme de non idéalité de l'équilibre chimique dépend du volume libre pour le produit ou le réactif i , donc du volume exclu pour cette espèce. Cet équilibre est influencé par l'encombrement cytoplasmique. Les réactions qui vont créer un changement de volume entre le produit et les réactifs vont être fortement influencées par l'encombrement.

La cinétique des réactions va être affectée par l'encombrement. Dans le cas d'une cinétique simple en solution idéale (qui ne dépend pas d'un catalyseur ou d'un autre paramètre), la vitesse de réaction, v_r , de l'équilibre 1.9 s'exprime en fonction de la concentration en réactifs :

$$v_r = k_r c_{r_1}^{m_1} \cdot c_{r_2}^{m_2} \dots c_{r_i}^{m_i} \dots c_{r_n}^{m_n} \quad (1.13)$$

où les m_i sont les ordres partiels de la réaction pour le réactif i et k_r est la constante cinétique de réaction.

En présence d'encombrement cytoplasmique, différents paramètres influencent la cinétique des réactions :

- Les phénomènes diffusifs vont être modifiés par l'encombrement et vont représenter un facteur cinétiquement limitant des équilibres biochimiques.
- La concentration effective augmente avec l'encombrement et favorise la cinétique des réactions.
- Les états intermédiaires des réactions vont être modifiés par l'encombrement, en se stabilisant ou non, ce qui ralentira ou accélérera la réaction.

L'encombrement va modifier les équilibres de manière cinétique et il est important de comprendre l'influence de l'encombrement sur la diffusion des protéines.

1.2.2 Influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines

Au cours des dernières années, l'étude de l'influence de l'encombrement cytoplasmique sur la stabilité des protéines s'est développée au même titre que celle du pH, de la force ionique, des interactions électrostatiques, de la quantité d'agents chimiques dénaturants...

a) Etudes de l'influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines : aspects théoriques

Les premières études théoriques sur ce sujet ont été menées par Minton au début des années 80 [26] [21], cependant ce n'est que depuis une dizaine d'années qu'elles ont été développées. Ce sont des modèles de physique statistique qui essaient de décrire le mieux possible les systèmes biologiques. Dans ce paragraphe nous présenterons rapidement le principe et les conclusions des plus récents et physiquement pertinents.

i) Le repliement : modèle à deux états

Les études théoriques se placent dans le cadre d'un modèle de "repliement simple" à deux états. Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle à deux états peut être une bonne approximation du repliement pour de nombreuses protéines, notamment pour les petites protéines globulaires. Chaque état dénaturé a un rayon de giration $R_{g,i}$. L'encombrement cytoplasmique occupe une fraction volumique Φ_v .

Le potentiel chimique de la protéine à l'état natif, N est définie par :

$$\mu_N = \mu_N^o + RT \ln c_N + RT \ln \gamma_N \quad (1.14)$$

où μ_N^o est le potentiel chimique de la protéine à l'état natif pour une concentration unitaire pour une solution idéale, c_N est la concentration en N et γ_N est le coefficient de non idéalité.

On peut de même exprimer le potentiel chimique d'une protéine dans l'état dénaturé D_i à l'aide des études faites par Minton [27] :

$$\mu_{D_i} = \mu_{D_i}^o + RT \ln c_i + RT \ln \gamma_i \quad (1.15)$$

$\mu_{D_i}^o$, c_i et γ_i sont respectivement les potentiels chimiques en solution idéalement diluée à la concentration unitaire, la concentration et le coefficient de non idéalité de l'état D_i . Le potentiel chimique de la protéine dans un autre état dénaturé D_j s'exprime en fonction de l'état D_i :

$$\mu_j(c) = \mu_i(c) + RT \ln \frac{\gamma_j}{\gamma_i} \quad (1.16)$$

On peut déterminer f_i l'abondance en état D_i parmi l'ensemble D :

$$f_i = \frac{c_i}{\sum_j c_j} \quad (1.17)$$

A l'équilibre thermodynamique, les produits chimiques de toutes les espèces sont identiques. En nous plaçant dans les conditions d'équilibre, on a donc $\frac{c_i}{c_0} = \frac{\gamma_0}{\gamma_i}$ et l'abondance d'une espèce i

[26] Minton, A. *J. mol. Biol.* **20**, 4821–4826 (1981).

[21] Minton, A. *Molecular and Cellular Biochem.* **55**, 119–141 (1983).

[27] Minton, A. *Biophys. J.* **78**(1), 101 – 109 (2000).

s'exprime sous la forme :

$$f_i = \frac{\gamma_i^{-1}}{\sum_j \gamma_j^{-1}} \quad (1.18)$$

On peut donc obtenir la valeur moyenne de tous les γ_i , $\langle \gamma_D \rangle$.

$$\langle \gamma_D \rangle = \sum_i f_i \gamma_i \quad (1.19a)$$

$$\langle \gamma_D \rangle = \frac{\Lambda}{\sum_j \gamma_j^{-1}} \quad (1.19b)$$

où Λ est le nombre total d'états dénaturés

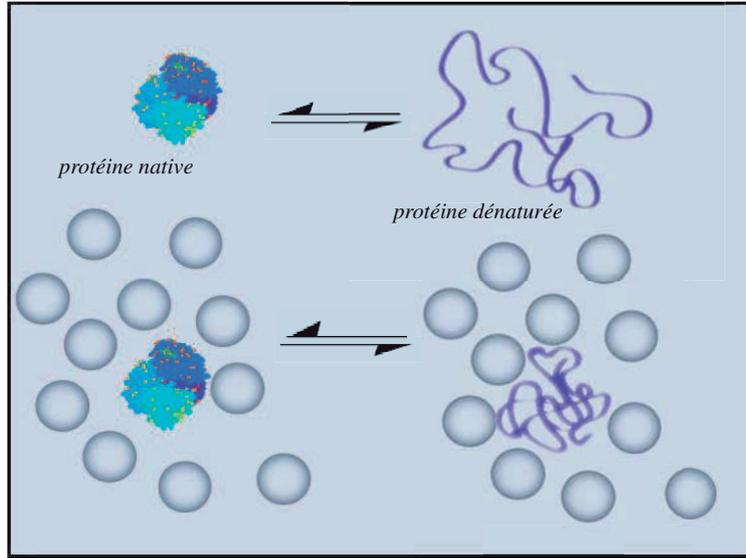


FIGURE 1.7 - Influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines.

La constante d'équilibre de la réaction à deux états s'exprime comme la différence de potentiel chimique entre réactif et réactant. Nous noterons par un indice D toutes les valeurs moyennes pour l'ensemble des états D_i et nous exprimerons par la suite nos calculs en fonction de cette valeur moyenne D.

$$K^o = \exp\left(-\frac{\mu_D^o - \mu_N^o}{RT}\right) \quad (1.20)$$

La constante de réaction apparente, K_{ND} s'écrit :

$$K_{ND} = \exp\left(-\frac{\mu_D - \mu_N}{RT}\right) \quad (1.21a)$$

$$K_{ND} = \exp\left(\frac{\mu_D^o - \mu_N^o + kT \ln c_D - kT \ln c_N + kT \gamma_D - kT \ln \gamma_N}{kT}\right) \quad (1.21b)$$

$$K_{ND} = K^o \frac{\gamma_N c_N}{\gamma_D c_D} \quad (1.21c)$$

On peut définir K_{app} , la constante d'équilibre apparente comme la fraction du produit sur les réactifs, donc, du rapport entre la fraction de protéines dénaturées et la fraction de protéines à l'état natif :

$$K_{app} = \frac{f_D}{f_N} \quad (1.22a)$$

$$K_{app} = \frac{\sum_j c_j}{c_N} \quad (1.22b)$$

$$K_{app} = K^o \Lambda \frac{\gamma_N}{\langle \gamma_D \rangle} \quad (1.22c)$$

L'équilibre est régi par les coefficients de non-idéalité de la protéine à l'état natif et celui de l'ensemble des états dénaturés. Les conformations les plus étendues, celles de l'ensemble des états dénaturés, sont déstabilisées par la présence de l'encombrement. La stabilité des protéines peut être étudiée grâce de l'équilibre N/D (fig. 1.7). L'étude de la conformation de la protéine à l'état dénaturé et de sa déstabilisation par l'encombrement est donc nécessaire pour obtenir des informations sur la protéine à l'état natif.

ii) Modélisation

A ce stade, il est nécessaire de modéliser les différents éléments du système : le milieu cellulaire, la protéine à l'état natif, la protéine à l'état dénaturé.

Comme nous l'avons déjà vu, *in vivo*, l'encombrement est constitué d'une multitude de macromolécules de tailles et de formes différentes. Afin, de comprendre chaque paramètre séparément (effet du volume exclu, celui de la forme des particules, l'importance des mélanges...), dans la plupart des modèles théoriques de la littérature, l'encombrement cytoplasmique est modélisé par des corps "durs". Le cas de la sphère est le plus souvent utilisé car il permet d'effectuer des calculs simples mais suffisants pour comprendre semi-quantitativement les effets du volume exclu.

Dans la plupart de ces études la protéine à l'état natif, est modélisée par une particule convexe dure [28] [29]. Cela permet de calculer assez simplement les interactions entre la protéine native et l'encombrement.

[28] Minton, A. In *Energetics of Biological Macromolecules Part B*, Ackers, G. K. and Johnson, M. L., editors, volume 295 of *Methods in Enzymology*, 127 – 149. Academic Press (1998).

[29] Winzor, D. and Wills, P. R. B. *Gregory editor. Marcel Dekker New York*, 483 – 520 (1995).

Il est beaucoup plus difficile de calculer l'interaction entre une macromolécule et une protéine dénaturée. C'est dans la modélisation de la protéine à l'état dénaturé que diffèrent les modèles. Nous en évoquerons ici quelques uns des plus récents.

Zhou et Hall ^[30] modélisent l'état dénaturé par une sphère dure dont le rayon peut varier. En faisant cette hypothèse, les auteurs arrivent à la conclusion qualitative qu'un agent d'encombrement relativement petit par rapport à la protéine la déstabilise, tandis qu'un agent ayant une taille plus grande stabilise l'état natif. Modéliser la protéine à l'état dénaturé par une sphère n'est physiquement pas réaliste. En effet, il a été montré, notamment par diffusion de neutrons, qu'en présence d'une forte concentration molaire en agent chimique dénaturant, les états dénaturés de la protéine adoptent une conformation de chaîne type "chaîne gaussienne" ^[31].

Depuis une dizaine d'années, la plupart des modèles théoriques cherchent à modéliser les protéines à l'état dénaturé par des chaînes aléatoires ^[27] ^[32] ^[24]. Contrairement au modèle précédent, cela permet de prendre aussi en compte les interactions intramoléculaires. La conclusion générale de ces études est que la distribution des rayons de giration de l'ensemble des états dénaturés diminue lorsque la fraction en agent d'encombrement augmente. Une étude récente ^[32] prévoit que, pour un agent d'encombrement et une particule introduite de taille similaire, le rayon de giration le plus probable diminue de l'ordre de 50% pour une fraction en agent d'encombrement de l'ordre de 40% (fig. 1.8). Les modèles prédisent donc un mécanisme de stabilisation des protéines à l'état natif par l'encombrement, qui serait dû à une déstabilisation de l'ensemble des états dénaturés.

b) Les études expérimentales de l'influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines

i) Les systèmes utilisés

Les méthodes expérimentales actuelles ne nous permettant pas d'étudier la stabilité d'une seule protéine dans l'environnement cellulaire complexe. Comme dans les modèles théoriques, il est nécessaire de modéliser l'encombrement cytoplasmique. Afin d'observer uniquement l'effet du volume exclu, le milieu cellulaire est modélisé par une macrolécule appelé agent d'encombrement présente à forte concentration. Celle-ci doit être neutre, ne pas avoir d'interactions spécifiques avec la protéine dont la stabilité est étudiée, être solvatable dans l'eau en grande quantité et avoir

[30] Zhou, Y. and Hall, A. C. *J. Biolpolymers* **38**(2), 273–284 (1996).

[31] Calmettes, P., Durand, D., Desmadril, M., Minard, P., Receveur, V., and Smith, J.-C. *Biophys. Chem.* **53**(1-2), 105 – 113 (1994).

[27] Minton, A. *Biophys. J.* **78**(1), 101 – 109 (2000).

[32] Minton, A. *Biophys. J.* **88**(2), 971 – 985 (2005).

[24] Cheungand, M., Klimov, D., and Thirumalai, D. *Proceed. of the Nat. Ac. Sci. of U.S.A.* **102**(13), 4753–4758 (2005).

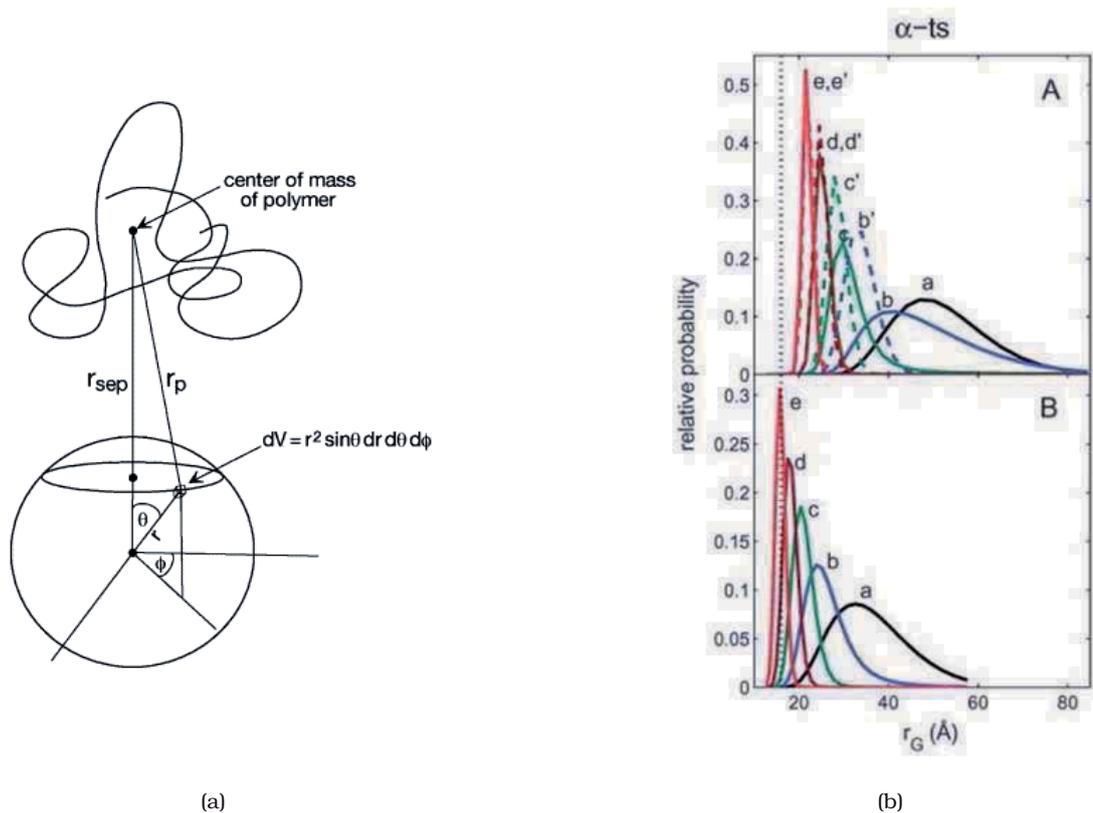


FIGURE 1.8 – (a) : Modèle pour le calcul des interactions entre une sphère dure et une chaîne gaussienne , (b) Distribution des rayons de giration pour une protéine obtenue par Minton , calculée en prenant en compte les interactions intramoléculelaires à longue portée (A) ou en les négligeant (B) Les courbes en traits pleins ont été obtenues en utilisant le modèle du nuage gaussien et les courbes en pointillés ont été obtenues par un modèle de sphères équivalentes. Le trait vertical correspond au rayon de la protéine à l'état natif. Les distributions ont été calculées pour $\Phi = 0, 0.1, 0.2, 0.3,$ et 0.4 pour les courbes allant de a à e.

une taille caractéristique proche de celle de la protéine (de l'ordre de quelques dizaines d'ångström). Afin de pouvoir analyser les études expérimentales à la lumière des études théoriques, elle doit également être le plus sphérique possible.

Parmi les agents d'encombrement répondant à ces critères, on distingue 2 familles : des macromolécules biologiques (l'hémoglobine, l'albumine -BSA-..) et des synthétiques (les polysaccharides très ramifiés comme le Dextran et le Ficoll). Le PEG, un polymère linéaire neutre, est parfois utilisé car il est très soluble dans l'eau et disponible en grande quantité. Cependant, il ne peut être modélisé par une sphère dure.

ii) Les méthodes utilisées

Les systèmes permettant d'observer l'influence de l'encombrement sont des systèmes ternaires complexes. En effet, l'objet de telles études est d'observer une macromolécule à faible concentration (de l'ordre de quelques g.l^{-1}) en présence d'une autre macromolécule à une concentration beaucoup plus importante (de l'ordre de la centaine de g.l^{-1}). Différentes méthodes sont utilisées : le dichroïsme circulaire (DC) qui permet d'observer la structure secondaire des protéines (voir annexe) ; la DSC (Differential Scan Calorimetry) permettant de mesurer la capacité calorifique induite par la dénaturation thermique des protéines ; des mesures d'activité directe permettant de savoir si la protéine est native ou dénaturée (test enzymatique sur le lysozyme par exemple) ; des mesures de FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) permettant, grâce au marquage de la particule test, d'observer la compaction de celle-ci, ou la HPLC (High Performance Liquid Chromatography) qui permet d'étudier la cinétique de la réaction en mesurant la constante de temps caractéristique du repliement.

iii) Quelques résultats expérimentaux

Nous avons répertorié dans le tableau 1.1 certains des résultats expérimentaux ^{[33][34][35][36][37][38]} _{[39][40][41][42]} concernant la stabilité des protéines en présence d'un agent d'encombrement. La

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

[34] Yomo, T. and all. *Prot. Sci.* **13**, 125 – 133 (2004).

[35] van den Berg, B., Ellis, R., and Dobson, C. *EMBO J.* **18**, 6827–69233 (1999).

[36] Stagg, L., Zhang, S., Cheung, M., and Wittung-Stafshede, W. *Proceed. of the Nat. Ac.of Sci.* **104**(48), 18976–18981 (2007).

[37] Perham, M., Stagg, L., and Wittung-Stafshede, P. *FEBS Letters* **581**(26), 5065 – 5069 (2007).

[38] van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C., and all. *EMBO J.* **19**, 3870–3875 (2000).

[39] Huawei, J., Hea, J., and Li, S. *Tsinghua Sci. and Tech.* **13**, 454–457 (2008).

[40] Phie, P. M., Ni, Y., and Minton, A. *J. Mol. Biol.* **361**, 7–10 (2006).

[41] Sasaki, Y., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. *nucleic acids res.* **35**, 4086–4093 (2007).

[42] Ai, X., Zhou, Z., and Choy, Y. B. W. Y. *J. am. chem. soc.* **128**, 3946–3917 (2006).

plupart des résultats expérimentaux montrent effectivement que l'état natif est stabilisé par rapport à l'état dénaturé.

L'amplitude de cette stabilisation dépend fortement du système étudié et des conditions expérimentales. En prenant l'exemple de la dénaturation thermique, le décalage de la température de dénaturation dû à la présence d'agent d'encombrement peut aller de quelques degrés à plus de 20°. Au regard des études expérimentales faites au cours des dix dernières années, il semble que l'influence de l'encombrement dépend fortement du système d'étude, plusieurs paramètres entrant en ligne de compte :

l'agent d'encombrement : des études nous montrent l'influence de la masse de l'agent d'encombrement, de son type (protéine comme la BSA, polymère linéaire comme le PEG, polysaccharide ramifié comme le Ficoll ou le Dextran), de sa forme (les effets du Ficoll, plus sphérique, sur la stabilité de la Flavodoxine sont moins importants que ceux du Dextran, plus linéaire et flexible ^[36])

la protéine étudiée : le décalage en température observé lors d'une étude par dénaturation thermique peut être de quelques degrés pour le Cytochrome C ^[33] par exemple, à une dizaine voire une vingtaine de degrés Celsius pour la flavodoxine ^[37].

les conditions d'étude (pH, tampon, taux d'urée...): la force ionique du tampon, le tampon en lui-même (en étudiant la dénaturation thermique de la flavodoxine ^[37] on passe d'un décalage en température d'une quinzaine de degrés à seulement quelques degrés en augmentant la force ionique du tampon), le pH de la solution, le taux d'urée modifient le décalage de la température de dénaturation.

La plupart des études théoriques prédisent une stabilisation de l'état natif des protéines par l'encombrement essentiellement grâce à l'abaissement de l'entropie conformationnelle de l'état dénaturé. Dans les systèmes étudiés, nous pouvons constater que d'un système à l'autre, l'effet de l'encombrement varie énormément pour des protéines de tailles comparables. Par ailleurs, d'autres interactions non spécifiques comme les interactions électrostatiques ou les interactions hydrophobes sont éventuellement présentes. Il est donc nécessaire de trouver un système modèle plus général qui nous permette de n'observer que l'effet du volume exclu.

[36] Stagg, L., Zhang, S., Cheung, M., and Wittung-Stafshede, W. *Proceed. of the Nat. Ac.of Sci.* **104**(48), 18976–18981 (2007).

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

[37] Perham, M., Stagg, L., and Wittung-Stafshede, P. *FEBS Letters* **581**(26), 5065 – 5069 (2007).

CHAPITRE 1. INFLUENCE DE L'ENCOMBREMENT CYTOPLASMIQUE

agent d'encombrement	protéine	méthode	type d'étude	résultat
Dextran	cytochrome c	DC	Dénaturation thermique	Stabilisation de l'état globule fondu par rapport à l'état totalement déplié.
PEG 20 000 , Ficoll 70	RNase A	DC, FCS, RMN	Dénaturation par ajout d'urée	L'ajout de 35% de PEG ou de Ficoll à pH 3 et 25°C stabilise l'état natif de la protéine par rapport à l'ajout d'urée. Sa renaturation est favorisée par l'addition de 30% massique de PEG. Compression de la RNase dénaturée en présence de PEG et de Ficoll.
Ficoll 70, Dextran	Lysozyme A	test d'activité enzymatique	Dénaturation par ajout de chaotropes	A pH 3, l'encombrement favorise le repliement du lysozyme oxydé mais le repliement du lysozyme réduit est inexistant car l'encombrement favorise l'agrégation de la protéine à l'état dénaturé.
Ficoll 70, Dextran 70	Flavodoxine	DC	Dénaturation thermique	A pH 7, la température de dénaturation augmente de 15°C avec l'ajout de 40% massique de Ficoll et de 20°C par ajout de Dextran. Cette dénaturation dépend également du tampon.
Ficoll 70	Flavodoxine, Vls	DC	Dénaturation par ajout de chaotropes et thermique	Le contenu structural de la Flavodoxine et du VlsE augmente de 33% et de 70% respectivement lors de l'ajout de 400 g.l ⁻¹ (pH 7, 20 °C).
BSA, Ficoll 70	Lysozyme	HPLC	Renaturation	A pH 8.5, accélération du processus de renaturation.
Dextran	Creatine Kinase	DC	Dénaturation thermique	Augmentation de la température de dénaturation lorsque la fraction massique en agent d'encombrement augmente.
Dextran 30K	Apomyoglobine	DC	Dénaturation thermique	A pH 2, la température de dénaturation froide est abaissée de 13°C et la température de dénaturation chaude augmente de 20°C
PEG 4K	DNase		Dénaturation thermique	La température de dénaturation augmente de 15°C avec l'ajout de 20% massique de PEG.
PEG 20K	Rd-apocyt b ₅₆₂	N RMN	Renaturation thermique	Le taux de renaturation augmente, celui de dénaturation varie peu. La vitesse de renaturation augmente.

TABLE 1.1 – Récapitulatif de quelques études expérimentales de l'influence de l'encombrement sur le repliement et la stabilité des protéines.

1.2.3 Etude de l'influence de l'encombrement sur la diffusion des protéines

a) Généralités sur les mouvements des protéines

Dans la cellule, les propriétés de diffusion sont importantes car, elles concernent non seulement les mécanismes de transport direct, mais aussi, la cinétique de nombreuses réactions biochimiques.

Dans la cellule, il existe trois mécanismes de transport différents :

- Le transport assisté, spécifique à chaque protéine et chaque environnement. Dans cette étude, consacrée aux interactions non spécifiques, nous ne nous intéresserons pas à ce type de transport.
- La diffusion normale que l'on qualifie de brownienne. Dans le cas d'une solution infiniment diluée et en l'absence de toute interaction modifiant le mouvement de la protéine, ce déplacement est aléatoire. Le déplacement carré moyen, $\langle r^2 \rangle$, est proportionnel au temps τ :

$$\langle r^2 \rangle \propto \tau \quad (1.23)$$

- La diffusion anormale, lorsqu'on s'écarte du régime Brownien. Le déplacement carré moyen n'est pas une fonction linéaire du temps τ et il existe un coefficient α tel que :

$$\langle r^2 \rangle \propto \tau^\alpha \quad (1.24)$$

Dans notre étude nous ne nous intéresserons qu'aux phénomènes de transport diffusif normal et anormal.

Pour une solution infiniment diluée, le mouvement de la particule est Brownien, et le déplacement carré moyen est :

$$\langle r^2 \rangle = 6D_s\tau \quad (1.25)$$

où D_s est le coefficient de diffusion brownien de la protéine, ou le coefficient dit de "self-diffusion" donné par la relation d'Einstein ^[43] :

$$D_s = k_B T / f. \quad (1.26)$$

T est la température en Kelvin et f est un terme de friction. Pour une particule sphérique de rayon R dans un solvant de viscosité η , on a d'après la formule de Stokes :

$$f = 6\pi\eta R \quad (1.27)$$

Le régime anormal ne peut être défini par l'équation d'Einstein. On décrit en général le déplacement carré moyen des mouvements non browniens par une expression semi-empirique :

$$\langle r^2 \rangle = 6D\tau^\alpha \quad (1.28)$$

[43] Einstein, A. *Ann. der Phys.* **17**, 549–560 (1905).

Lorsque $\alpha < 1$, on parle de régime sous-diffusif, tandis que lorsque $\alpha > 1$ on parle de régime sur-diffusif.

Dans le cas d'une solution encombrée comme à l'intérieur de la cellule, l'agent d'encombrement modifie le volume libre dans lequel la particule peut diffuser et crée des "barrières" pour les mouvements de la particule. Aux temps longs, l'encombrement va induire un régime anormal sous diffusif.

b) Étudier des systèmes complexes : théorie, simulation et expériences

L'influence de l'encombrement sur les mouvements diffusifs est un phénomène complexe qui est difficile d'étudier théoriquement ^[44]. Ces mouvements dépendent d'interactions diverses : celles entre les particules elles-mêmes et les interactions hydrodynamiques (l'encombrement modifie les interactions). Des calculs ont été menés afin de déterminer le phénomène de diffusion en 2-D dans les membranes ^[45], mais les phénomènes de diffusion en 3D posent encore des problèmes ^{[22][46]}.

Étant donnée la complexité de la diffusion en milieu encombré, la méthode de simulation est préférée à l'approche purement analytique. Plusieurs méthodes ont été employées pour simuler la diffusion en 3-D en présence d'un agent d'encombrement mobile en 3D ^[47] : la dynamique moléculaire prenant en compte tous les atomes (les moyens technologiques actuels ne permettent pas d'obtenir des résultats), la dynamique stochastique ^{[48] [49] [50]} (cette méthode postule que les particules n'ont pas d'inertie et "sautent" instantanément à une autre position)... Ces études montrent que la diffusion peut être soit normale soit anormale dans un régime sous-diffusif.

La DLS (Dynamic Light Scattering) permet d'observer les fluctuations de densité à des échelles de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres; les techniques de fluorescences comme le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), le FRET (Fluorescence Resonance by Energy Transfert) et la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) étudient la dynamique sur la même échelle spatiale mais à des temps longs (de l'ordre de la seconde); la RMN à champ pulsé donne des informations à des échelles qui excèdent l'échelle intermoléculaire (200 nm au lieu de quelques nm) à des temps de l'ordre de la milliseconde.

[44] Dix, J. and Verkam, A. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 247–263 (2008).

[45] Vereb, G., Szöllosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T., and Damjanovich, S. *PNAS* **100**, 8053 – 8058 (2003).

[22] Zimmerman, S. and Minton, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **22**, 27–65 (1993).

[46] Han, J. and Herzfeld, J. *Biophys. J.* **65**, 1155–1161 (1993).

[47] Takahashi, K., Arjunan, S., and Tomita, M. *FEBS lett.* **579**, 1783–1788 (2005).

[48] Ermak, D. and McCammon, J. *J. of chem. phys.* **69**(4), 1352–1360 (1978).

[49] Dix, J., Hom, E. Y., and Verkman, A. *J. of Phys. chem. B* **110**(4), 1896–1906 (2006).

[50] McGuffee, S. and Elcock, A. *J. Of Am. Chem. Soc.* **128**(37), 12098–12110 (2006).

Contrairement à la technique de diffusion de neutrons, ces techniques ne permettent pas d'étudier la diffusion sur des distances intermoléculaires.

1.2.4 Les objectifs de la thèse

Notre étude s'est portée sur l'étude de l'influence de l'encombrement cytoplasmique sur deux paramètres essentiels du fonctionnement de la cellule biologique : la stabilité des protéines et leur diffusion.

a) Quel mécanisme conduit à la stabilisation des protéines par l'encombrement ?

Comme nous l'avons vu, selon de nombreuses études théoriques et expérimentales, l'encombrement influence l'équilibre des réactions biochimiques *in-vivo*. L'objectif de notre travail est d'étudier son influence sur la conformation des protéines à l'état dénaturé. Il n'est pas aisé de décorrélérer les interactions de types stérique des autres interactions qui peuvent exister dans la cellule, qu'elles soient spécifiques ou non spécifiques.

Au cours de notre étude, nous allons utiliser un modèle simple qui permet d'observer et de comprendre la réduction d'entropie conformationnelle induite par la présence de l'encombrement en tentant de rendre négligeables les autres types d'interactions.

Nous étudions un système ternaire constitué du solvant, de l'agent d'encombrement à une concentration très importante, et d'une molécule sonde à faible concentration. La Diffusion de Neutrons aux petits Angles (DNPA) nous permet d'observer la conformation de chacun de ces éléments séparément grâce à la méthode de variation de contraste et d'observer ainsi la conformation de la chaîne gaussienne quelle que soit la fraction massique en agent d'encombrement (voir annexe).

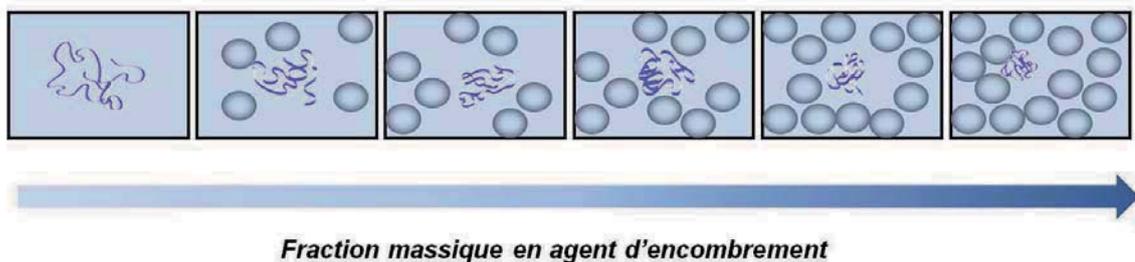


FIGURE 1.9 – Observation de la conformation d'une chaîne gaussienne quelle que soit la fraction massique en agent d'encombrement par DNPA.

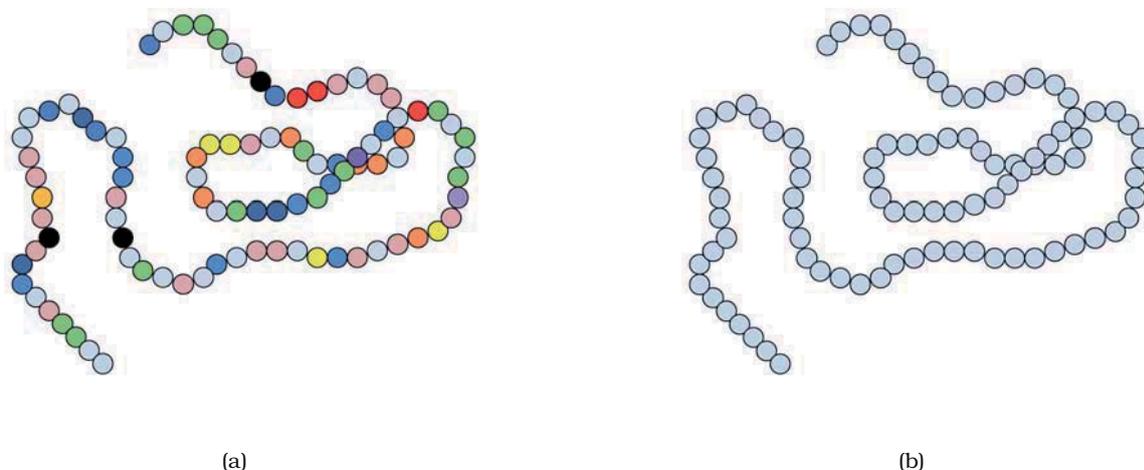


FIGURE 1.10 – Représentation d'un polypeptide (a) et d'un homopolymère (b). Dans le cas du polypeptide, chaque couleur représente un acide aminé différent. Il y a diverses interactions entre les différents acides aminés (hydrophobes, électrostatiques...).

Cette étude a pour objet d'observer la conformation d'une chaîne gaussienne, modélisant la protéine dénaturée, en présence d'un agent d'encombrement (fig. 1.12).

La variation de contraste ne pouvant être utilisée que sur des systèmes homogènes, il est impossible d'étudier directement la conformation d'une chaîne dépliée à l'intérieur d'un milieu cellulaire. Nous avons utilisé des agents d'encombrement synthétiques : des polysaccharides (le Dextran et, surtout, le Ficoll).

Nous utilisons comme modèle de chaîne gaussienne le Poly(ethylene-glycol)(PEG). C'est un homopolymère neutre pour lequel l'eau est un bon solvant. Ce système permet d'observer l'influence de l'encombrement sur la conformation d'une chaîne gaussienne en essayant de minimiser au maximum les interactions non stériques qui existent à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique.

Dans une seconde étape, nous essayons de nous rapprocher d'un vrai système biologique. Le PEG étant un homopolymère il n'a pas la même variété d'interactions (types hydrophobes, électrostatiques...etc) à l'intérieur même de la chaîne (fig. 1.10). Après avoir compris la conformation d'une chaîne gaussienne modèle en présence d'un agent d'encombrement, nous essayons d'observer la conformation d'une protéine, la myoglobine.

b) Les mécanismes de diffusion *in-vivo*

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'encombrement cytoplasmique modifie la diffusion des protéines *in-vivo*. Ce phénomène a pu être observé, mais, il est difficile d'en comprendre les mécanismes responsables. L'objet de notre étude est de trouver un système nous permettant de

mesurer la diffusion à l'échelle intermoléculaire et de mieux comprendre l'influence de l'encombrement.

Le système biologique que nous avons choisi d'étudier est l'hémoglobine en solution concentrée. C'est le constituant essentiel des globules rouges ; elle représente 93% de sa masse sèche (fig. 1.11). In-vivo, l'hémoglobine est présente en très forte concentration dans les globules rouges (de l'ordre de 330 g.l^{-1}) et les solutions d'hémoglobine concentrée peuvent être de bons modèles de solution de protéines concentrées et faiblement chargées. ^[51]



FIGURE 1.11 – (a) : Globules rouges observés au microscope électronique. (b) : Représentation en coupe d'un globule rouge entouré de sérum (d'après Goodsell)

Pour l'hémoglobine, le coefficient d'auto-diffusion, D_s , diminue lorsque la fraction Φ en hémoglobine augmente (1.12^[22]). En solution concentrée, la diffusion est complexe et l'objet de notre étude est de comprendre les mécanismes et de mesurer la diffusion à une échelle inter moléculaire. Les techniques de diffusion de neutrons donnent des informations à une échelle plus petite et nous pouvons obtenir des informations sur les mouvements en dessous de l'échelle intermoléculaire. Elles permettent également d'obtenir aussi des informations sur les corrélations de paires.

[51] Goodsell, D. (2000).

[22] Zimmerman, S. and Minton, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **22**, 27–65 (1993).

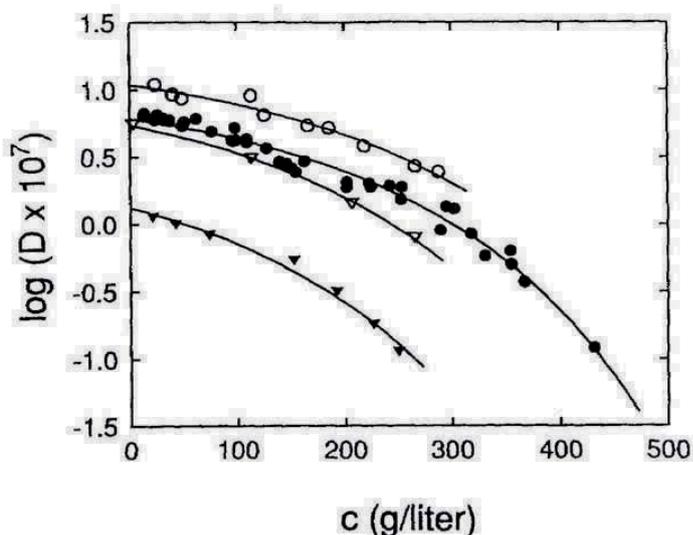


FIGURE 1.12 – Coefficient d'auto-diffusion de différentes protéines globulaires en fonction de la concentration. ○ : myoglobine ; ● : hémoglobine ; ▽ : Ovalbumine ; ▼ : hémoglobine d'invertébré. Pour chacune de ces protéines, le coefficient d'auto-diffusion diminue avec la concentration. Pour l'hémoglobine, il est divisé par 5 lorsqu'on est à la concentration de 400 g.l^{-1} .

1.3 Systèmes étudiés

1.3.1 La myoglobine et l'hémoglobine

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux protéines : la myoglobine et l'hémoglobine. Ces deux protéines sont impliquées dans le transport et le stockage de gaz di et triatomiques, comme le dioxygène, le monoxyde d'azote ou le monoxyde de carbone ^[52].

L'hémoglobine est le constituant principal des globules rouges (elle représente 92% de sa masse sèche). C'est elle qui assure, par l'intermédiaire du sang, le transport du dioxygène et du dioxyde de carbone des poumons aux tissus. La myoglobine est présente dans les cellules musculaires et permet le stockage de ces gaz. Elle est suspectée d'aider au transport de l'oxygène vers les mitochondries.

[52] Wittenberg, J. and Wittenberg, B. *Ann. Rev. of Biophys. and Biophysical chem.* **19**, 217-241 (1990).

a) Fonction biologique

i) Structures de la myoglobine et de l'hémoglobine

L'hémoglobine et la myoglobine (notées par la suite respectivement Hb et Mb) sont des hémoprotéines. Elles ont été les deux premières protéines dont la structure a été déterminée par diffraction de rayons X [4][3].

Nous avons utilisé la myoglobine de cœur de cheval dont la structure a été étudiée par diffraction de rayons X [53]. C'est une protéine globulaire ellipsoïdale dont les axes ont les dimensions 63 x 29 x 33 Å³ et dont le poids moléculaire est 17 000 Da. Elle possède une chaîne polypeptidique, dont 70% de la structure est repliée en 7 hélices α , appelées A-H (fig. 1.13(a)).

Sur cette chaîne se trouve la fonction hème. L'hème est un ligand cyclique (porphyrine) dont le centre est occupé par un atome de fer (fig. 1.13(a)). Des interactions hydrophobes et quelques liaisons électrostatiques lient la porphyrine à la chaîne polypeptidique. L'atome de fer est hexacoordiné, c'est à dire qu'il donne six valences, quatre pour les azotes de la porphyrine et deux pour deux Histidines de la protéine.

L'atome de fer de l'hème est à la base des réactions variées qui ont lieu dans les hémoprotéines. Il peut fixer différentes molécules, les ligands, dont l'oxygène, O₂. C'est en se liant à différents ligands comme le CO, NO, O₂ ou en changeant son état d'oxydation, que l'atome de fer de l'hème va permettre à la protéine à laquelle il est lié d'accomplir sa fonction.

Son état de coordination détermine son état d'oxydation :

Fe²⁺, la forme ferreuse en absence de ligand. La myoglobine est appelée déoxymyoglobine ou myoglobine deox.

Fe³⁺, la forme ferrique. L'hème peut se ligander de façon réversible avec l'oxygène et former un complexe $Fe^{3+}O_2^-$, la myoglobine est appelée oxymyoglobine. Le fer peut également être irrémédiablement oxydé. Dans ce cas, la myoglobine est dite oxydée, ou metmyoglobine.

Nous avons également étudié l'hémoglobine humaine. Sa structure a été étudiée par diffraction de rayons X [54] et RMN [55]. C'est une ellipsoïde de dimensions 64 x 55 x 50 Å³ dont le poids moléculaire est de 64 000 Da. Elle possède 4 chaînes polypeptidiques, 2 α et 2 β (fig.1.13(b)). Malgré des séquences différentes d'acides aminés, la structure de chacune des chaînes est relativement similaire à celle de la myoglobine. Les chaînes sont repliées en hélices, 7 pour les

[4] Perutz, M. *Nat.* **185**(4711), 416–422 (1960).

[3] Kendrew, J. and all. *Nat.* **181**(4610), 662–666 (1958).

[53] Copeland, D., Soares, A., West, A., and Richter-Addo, G. *J.Inorg.Biochem.* **100**, 1413 – 1425 (2006).

[54] Park, S., Yokoyama, T., Shibayama, N., Shiro, Y., and Tame, J. *J.Mol.Biol.* **360**, 690 – 701 (2006).

[55] Xu, Y., Zheng, Y., Fan, J., and Yang, D. *Nat.Methods* **3**, 931 – 937 (2006).

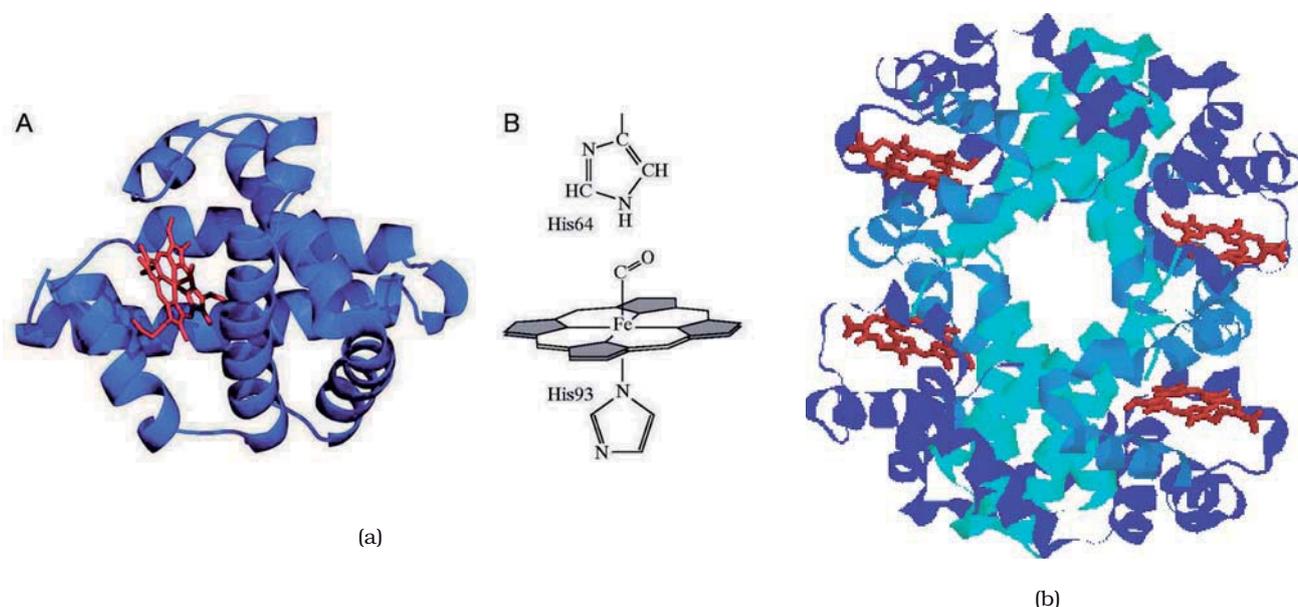


FIGURE 1.13 – (a) A : Représentation schématique de la structure de la myoglobine. La myoglobine ne comporte que des hélices α et des structures amorphes. L'hème est représenté en rouge. B : structure développée de l'hème. Le Fer, hexacoordonné, se situe au centre de la porphyrine. L'hème est représenté ici, ligandé avec CO. (b) : Structure de l'hémoglobine : chaînes α en bleu foncé, chaînes β en bleu clair et vert. Les 4 fonctions hème sont représentées en rouge.

chaînes β et 6 pour les α . Chacune est associée à un groupement hème. Chaque molécule d'hémoglobine peut donc fixer 4 molécules de O_2 ou d'une autre molécule. De la même manière que pour la myoglobine, on définit en fonction du degré d'oxydation du fer la déoxyhémoglobine, l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine.

ii) Des molécules de transport et de stockage

L'hémoglobine transporte l'oxygène des poumons aux tissus et la myoglobine permet, entre autres, de stocker l'oxygène dans les cellules des muscles, pouvant le libérer pendant les périodes d'hypoxie ou d'anoxie ^{[56][57]}. L'hémoglobine fixe également le CO et le NO. L'affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde de carbone est d'environ 240 à 250 fois supérieure à celle de l'oxygène. La toxicité de CO est due pour une grande partie à la formation de carboxyhémoglobine (COHb), qui empêche le transport de l'oxygène par le sang ^[58].

[56] Ordway, G. and Garry, D. *J. of Exp. Biology* **207**, 3441 – 3446 (2004).

[57] Bowen, W. and Poel, W. *Fede Proc.* **7**(1), 10–11 (1948).

[58] Yoshikawa, S., Choc, M., Otoole, M., and Caughey, W. *J. molec. biol.* **252**(15), 5498–5508 (1977).

La fixation d' O_2 sur l'Hb est un phénomène coopératif ^{[59][60]} : la capacité de fixer O_2 sur un des 4 hèmes de l'Hb dépend de l'état (oxygéné ou non) des hèmes situés sur la même molécule (d'où une courbe d'affinité de l' O_2 pour l'hémoglobine en sigmoïde fig. 1.14). A proximité des poumons, où la pression partielle en oxygène est importante, l'hémoglobine est totalement oxygénée (fig.1.14). O_2 est transporté via les globules rouges jusqu'aux muscles. A ce niveau, la pression partielle en oxygène diminue, l' O_2 se libère d'Hb, diffuse dans les cellules et se lie à Mb dont l'affinité pour O_2 est alors plus importante. La capacité de l'Hb à fixer O_2 dépend aussi du pH (fig 1.14). Cet effet a été décrit par le danois Christian Bohr ^[61]. Quand les muscles sont actifs, ils ont besoin de plus d'oxygène afin de produire plus d'énergie. Les tissus produisent alors des acides, ce qui permet le relargage de plus d' O_2 .

A l'intérieur des cellules musculaires, la myoglobine permet le stockage de l'oxygène. Elle joue également un rôle essentiel dans son transport jusqu'aux mitochondries. Lorsque la pression en oxygène est faible, elle libère O_2 permettant ainsi la production d'ATP et le travail musculaire.

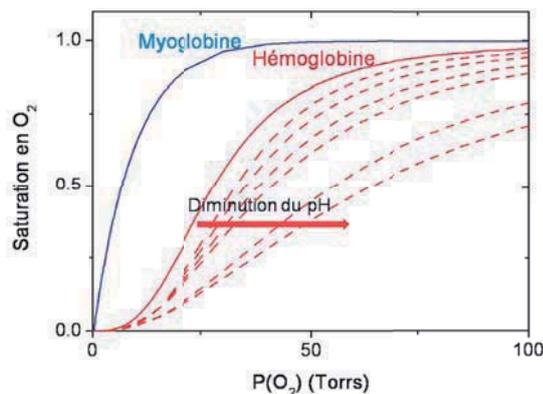


FIGURE 1.14 – Courbe de saturation en O_2 en fonction de sa pression partielle. Quand la pression partielle d'oxygène est élevée, l'hémoglobine fixe l'oxygène. Dans le muscle au repos, la pression partielle d'oxygène baisse, l'hémoglobine libère l'oxygène, mais la myoglobine qui a une affinité plus forte que l'hémoglobine, va récupérer cet oxygène libre. Lorsque la pression partielle baisse encore, la myoglobine va à son tour être sursaturée en oxygène et le libérer dans son environnement, le muscle.

[59] Cassoly, R. and Gibson, Q. *J. molec. biol.* **91**(3), 301–313 (1975).

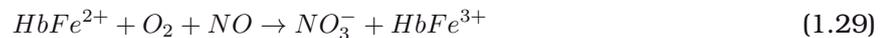
[60] Meyer, R., Sweeney, H., and Kushmerick, M. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **246**(5), 365–377 (1984).

[61] Bohr, C. T. *Zentr. Physiol.* **17**, 682 (1903).

1.3.2 Les substituts sanguins

Comme nous venons de le voir, l'hémoglobine joue un rôle biologique clef, notamment pour le transport de l'oxygène. La perte de sang soudaine induit une desoxygénation des tissus qui peut être très dangereuse. Elle peut être compensée par un apport de transporteurs d'oxygène, sorte de sang artificiel. Les transfusions sanguines peuvent causer de nombreux problèmes sanitaires (transfusion avec du sang contaminé par le virus du sida, ou des hépatites), de biocompatibilité (à cause du système ABO, seul le sang du groupe O est compatible avec tous les autres) ou de disponibilité (par exemple, dans le cas d'une attaque cardiaque, la transfusion doit être extrêmement rapide). Afin de substituer ces transfusions sanguines par d'autres transporteurs d'oxygène, des substituts sanguins ont été développés. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à un substitut sanguin en particulier et au rôle de sa structure sur sa réactivité, le complexe PEG-hémoglobine-PEG.

Des solutions d'hémoglobine ont été parmi les premiers substituts expérimentés car elles permettent d'éviter les problèmes de compatibilité de groupe et de rhésus et peuvent être chauffées... Les tests cliniques ont montré qu'elles induisaient une forte hypertension ^[62] dont le mécanisme n'est, pour le moment, pas totalement compris. Un des mécanismes clefs est sans doute la réaction de l'hémoglobine avec l'oxide nitrique, NO ^[63,64]. D'autres expériences suggèrent que le transport du NO sur les cys $\beta 93$ joue un rôle important dans la vasoconstriction ^[65].



NO est produit dans les cellules endothéliales à proximité des vaisseaux sanguins. Il diffuse dans la paroi des vaisseaux afin d'activer une enzyme (la guanylyl cyclase) qui permet la dilatation des artères et maintient le flux sanguin.

Dans les conditions physiologiques "normales", NO diffuse dans les parois et doit traverser de nombreuses barrières de diffusion avant d'atteindre Hb : la zone sans globules rouges, la membrane des globules rouges (fig. 1.15). La zone sans globules rouges est dû au flux sanguin qui est trop important pour que les globules rouges (de taille caractéristique de l'ordre de quelques microns) aient le temps de diffuser jusqu'aux parois. Comme son temps de demi vie est court (environ 2 ms), très peu de molécules atteignent les globules rouges. La réaction entre NO et Hb est ainsi minimisée. L'hémoglobine acellulaire est plus petite et donc moins affectée par le flux intravasculaire, elle peut donc réagir plus facilement avec NO (réaction 1.29) avec une forte

[62] Winslow, R. M. *Vox Sanguinis* **91**(2), 102–110 (2006).

[63] Alayash, A. *Nat Rev Drug Discov* **3**(2), 152–159 (2004).

[64] Alayash, A. *Nat. Biotechnology* **17**(6), 545–549 (1999).

[65] Wenner, J. and Bloomfield, V. *Biophys. J.* **77**(6), 3234 – 3241 (1999).

constante de réaction ($k = 8,9107M^{-1}.s^{-1}$). NO ne peut donc plus réagir avec la guanylyl cyclase et on observe la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. L'injection directe d'hémoglobine acellulaire est donc impossible, d'autres substituts sanguins doivent être développés.

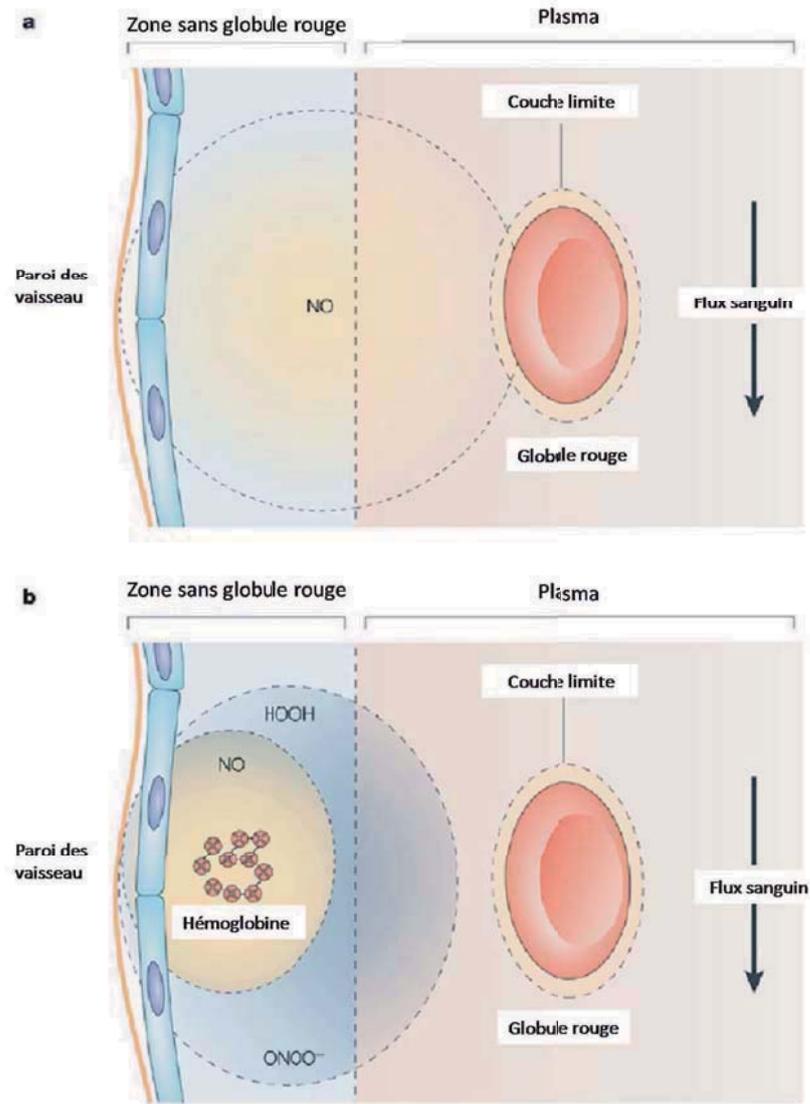


FIGURE 1.15 – Schéma décrivant la différence de réactivité de l'hémoglobine avec l'oxyde nitrique NO lorsqu'elle est située à l'intérieur des globules rouges (a) ou acellulaire (b). L'hémoglobine acellulaire peut se rapprocher de la paroi des vaisseaux sanguins et réagir avec NO, l'empêchant ainsi de réagir avec la guanylyl cyclase, une enzyme qui permet la dilatation des vaisseaux : ce qui entraîne une très forte hypertension.

Le tableau 1.2 présente de nombreux substituts sanguins qui ont été développés. Parmi ceux-ci, on distingue deux catégories :

Les perfluorocarbones (PFC) : Ce sont des émulsions non solubles dans le sang, qui permettent de dissoudre de grandes quantités d'oxygène. Ceux-ci sont rapidement éliminés par l'organisme et ils ne peuvent être utilisés que de manière transitoire.

Les substituts à base d'hémoglobine, couramment appelés HBOC (haemoglobin oxygen carrier) :

Comme leur nom l'indique, l'oxygène est transporté par l'hème de l'hémoglobine dont la réactivité avec NO a été modifiée.

Chaque substitut est à un stade différent de développement ^[66] mais ceux à base d'hémoglobine sont les plus développés.

Type de substitut	nom	fabrication
perfluorocarbones	Oxygent	émulsion PFC
	Oxycyte	emulsion PFC
	Oxyfluor	emulsion PFC
Cross-linked Hb	HemAssist	Cross-linked Hb
	$\alpha\alpha$ Hb, DCIHb	
	rHb 1.1	Hb recombinant
	rHb 2.0	Hb recombinant
Hb polymérisée	Polyheme	Hb pyridoxal Glutaraldehyde
	HbOC-201	Hb bovine Glutaraldehyde
	Hemolink	Hb polymerisée
Hb conjuguée	PHP	Hb humaine-PEG
	PEG-Haemoglobin	Hb bovine-PEG
	Hemospan	Hb humaine-PEG

TABLE 1.2 – Tableaux récapitulatifs des différents substituts sanguins.

Afin de réduire l'effet vasoconstrictif de l'hémoglobine acellulaire, deux voies principales ont été explorées : modifier directement la poche de l'hème afin de réduire sa réactivité avec NO ou augmenter le poids moléculaire de l'hémoglobine (donc réduire sa mobilité) ^{[67][68][69]}.

Afin d'augmenter le poids moléculaire de l'hémoglobine, deux stratégies sont principalement utilisées : la réticulation de l'hémoglobine ou le greffage d'un polymère à sa surface. Cette der-

[66] John, R. *Transfusion Medicine Reviews* **20**(3), 247 – 248 (2006).

[67] Griffiths, P., Paul, A., Khayat, Z., Wan, K., King, S., Grillo, I., Schweins, R., Ferruti, P., Franchini, J., and Duncan, R. *Biomacromolecules* **5**(4), 1422–1427 (2004).

[68] Rogers, M., Ryan, B., Cashon, R., and Alayash, A. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology* **1248**(2), 135–142 (1995).

[69] Doyle, M., Apostol, I., and Kerwin, B. *J. Biol. Chem.* **274**(4), 2583–2591 (1999).

nière stratégie est largement étudiée car elle permet de réduire de manière considérable les effets vasoconstrictifs de l'hémoglobine. Dans notre étude, nous nous intéresserons au greffage d'un polymère, le Poly(ethylene glycol) (PEG) sur l'hémoglobine.

Le PEG est un polymère fréquemment utilisé dans le domaine pharmaceutique et présente de nombreux intérêts. Il est biocompatible et inerte. La pegylation (le fait de greffer un PEG sur une protéine) augmente la taille de la molécule, limite sa diffusion, ce qui diminue sa filtration par les reins ^{[70][71]} et augmente donc son temps de circulation dans l'organisme.

La réactivité de ce substitut sanguin varie en fonction de la masse des chaînes de PEG greffées ^[72]. Nous nous intéresserons dans ce travail à la structure du complexe et à l'influence qu'elle peut avoir sur sa réactivité afin de pouvoir optimiser ce substitut sanguin.

[70] Veronese, F. *Biomaterials* **22**(5), 405–417 (2001).

[71] Roberts, M., Bentley, M., and Harris, J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**(4), 459 – 476 (2002). Peptide and Protein Pegylation.

[72] Manjula, B., Tsai, A., Intaglietta, M., Tsai, C., Ho, C., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R., Smith, P., Perumalsamy, K., Kanika, N., Friedman, J., and Acharya, A. S. *J. Biol. Chem.* , 403468200 (2004).

Chapitre **2**

Stabilité des protéines en milieu encombré

Sommaire

2.1 Choix et caractérisation de l'agent d'encombrement	47
2.1.1 Le Ficoll et le Dextran	47
a) Le Ficoll et le Dextran : des sphères dures ?	48
b) La pression osmotique	54
2.1.2 Le PEG	56
2.1.3 Extinction de l'agent d'encombrement	56
a) Extinction du signal du Ficoll et du Dextran	57
b) Extinction du signal du PEG-D	57
2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement	58
2.2.1 Influence du volume exclu sur la conformation d'une chaîne	59
a) Conformation d'une chaîne de polymère	59
i) Quelques éléments de théorie	59
ii) Un modèle de chaîne gaussienne dans l'eau, le PEG	61
b) Interactions non spécifiques entre la chaîne gaussienne et le sucrose	64
2.2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement	67
a) Compression de la chaîne	70
b) Modification des interactions effectives	71
i) Etude du second coefficient du viriel	71
ii) Un système réversible	73
2.2.3 Influence du rapport d'échelle	74
2.2.4 Modification de l'agent d'encombrement, utilisation du Dextran	82

2.2.5	Analyse par la théorie de Flory	84
a)	Chaîne idéale	85
b)	Chaîne réelle	85
2.3	Influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la Myoglobine .	88
2.3.1	Influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique .	88
2.3.2	Dénaturation thermique de la myoglobine	89
a)	La dénaturation de la myoglobine	89
b)	La dénaturation de la myoglobine	92
i)	Étude de l'interaction Ficoll-urée	92
ii)	Étude en fonction de la fraction massique en Ficoll	96
iii)	Modification de l'agent d'encombrement : le Dextran	97
c)	Analyse et discussion	100
2.3.3	Étude de la structure tertiaire d'une protéine	102
a)	Quel système étudier?	102
b)	Caractérisation de la myoglobine par DNPA	104
c)	Influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique	106
2.4	Discussion	109

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'étude de systèmes modèles permettant d'étudier l'influence de l'encombrement sur la stabilité des protéines.

Afin de nous rapprocher des conditions stériques de la cellule, nous devons choisir un agent d'encombrement que nous caractériserons dans ce chapitre. Nous chercherons à utiliser des agents d'encombrement sphériques afin de pouvoir interpréter nos résultats à l'aide des modèles théoriques précédemment exposés. Dans un premier temps, nous étudierons un modèle simplifié de chaîne aléatoire, un homopolymère, le poly(éthylène glycol) (PEG). Cette étude vise à comprendre la déstabilisation de l'état dénaturé dont les études théoriques prédisent une diminution du rayon de giration lorsque la fraction en encombrement augmente. Nous mettrons en évidence la compression de la chaîne ainsi que la modification des interactions effectives chaîne-chaîne. Cette étude nous permettra également d'avoir une idée plus précise de la conformation de la chaîne dans un milieu encombré. Dans une seconde étape, nous nous rapprocherons des systèmes biologiques. L'encombrement reste modélisé par une macromolécule synthétique (polymère ou polysaccharide), mais la chaîne que nous étudions est une protéine, la myoglobine. En étudiant sa dénaturation thermique nous verrons que l'encombrement stabilise sa structure secondaire. Nous essaierons d'observer la structure tertiaire de la protéine lorsque la température augmente.

2.1 Choix et caractérisation de l'agent d'encombrement

Comme nous l'avons vu précédemment, un "bon" agent d'encombrement est une macromolécule neutre, sans interactions spécifiques avec les particules étudiées et dont la forme est la plus simple possible afin de pouvoir comparer les résultats expérimentaux aux études théoriques. Pour "modéliser" l'encombrement cytoplasmique, on utilise des molécules biologiques comme la Bovine Serum Albumin (BSA) ou des polymères synthétiques comme le Dextran, le PEG ou le Ficoll. La plupart des modèles théoriques modélisent les macromolécules d'encombrement par des sphères dures neutres.

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé différents agents d'encombrement synthétiques : le Ficoll, le Dextran et le PEG. Le Ficoll et le Dextran permettent de modéliser l'encombrement cytoplasmique par un modèle de sphère dure. Afin de mener des études approfondies sur l'influence de l'encombrement et de pouvoir analyser nos résultats à la lumière des études théoriques, il est important de caractériser précisément l'agent d'encombrement utilisé.

2.1.1 Le Ficoll et le Dextran

Le Ficoll 70 et le Dextran sont des polysaccharides très ramifiés. Le Ficoll est issue de la réticulation du sucrose (fig. 2.1(a)), $C_{12}H_{22}O_{11}$, et de l'épichlorhydrine. Le Dextran est un polymère

de glucose, ($C_6H_{12}O_6$) (fig. 2.1(b)). Il sont neutres et hydrophiles.

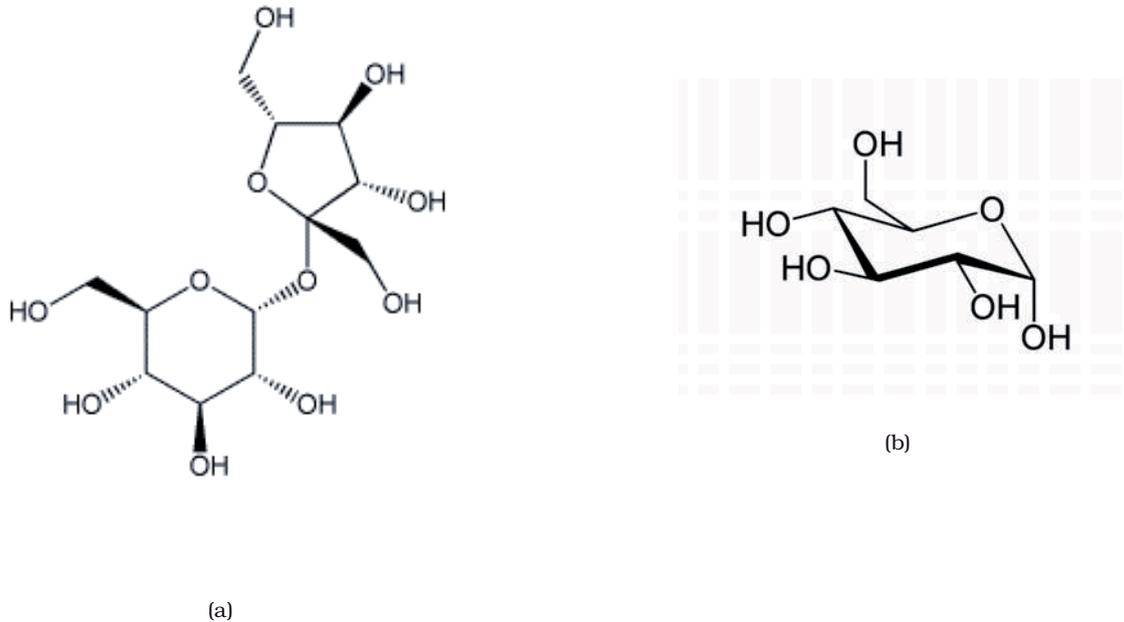


FIGURE 2.1 – Représentation développée plane du sucrose (a) et du glucose (b).

a) Le Ficoll et le Dextran : des sphères dures ?

Parmi les agents d'encombrement non biologiques utilisés, le Ficoll et le Dextran sont considérés comme les meilleurs ^[73] et sont fréquemment utilisés non seulement comme agent d'encombrement mais aussi pour des études de permselectivité. Selon de nombreuses études, le Ficoll a une forme très symétrique et se rapprocherait de la sphère, même si ce n'est pas une sphère dure à proprement parler ^[74]. Le Dextran, lui, aurait une forme plus étendue, plus flexible et plus déformable.

Le Ficoll que nous avons utilisé est du Ficoll 70 (de masse moléculaire 70 000 Da) fourni par Sigma Aldrich. Son rayon hydrodynamique mesuré par diffusion de lumière ^[75] et grâce à des membranes poreuses ^[76] r_h , est de 45 à 52 Å.

[73] Venturoli, D. and Rippe, B. *Am. J. of physiology renal physio.* **288**(4), 605–613 APR (2005).

[74] Fissell, W., Manley, S., Dubnisheva, A., Glass, J., Magistrelli, J., Eldridge, A., Fleischman, A., Zydney, A., and Roy, S. *Am. J. of physiology-renal physiology* **293**(4), F1209–F1213 (2007).

[75] Bohrer, M., Patterson, G., and Carroll, P. *Am. Chem. soc.* **17**(6), 1170 – 1173 (1984).

[76] Hemmelder, M., Jong, P. D., and de Zeeuw, D. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **132**(5), 390 – 403

Nous avons choisi d'utiliser un Dextran de même masse qui a une polydispersité de 1.1. fourni par Sigma Aldrich. Son rayon hydrodynamique est de l'ordre de 60 Å,^{[77],[75]}.

L'étude du rayon hydrodynamique d'un objet en fonction de sa masse permet d'avoir des informations sur la forme de cet objet. Le volume que peut occuper une molécule de densité uniforme est minimal si la forme est sphérique. Sa masse moléculaire, M_w , est facilement calculable à partir du rayon et de la densité, d .

$$M_w = \frac{4\pi r_h^3}{3} N_a d \quad (2.1)$$

où N_a est le nombre d'Avogadro.

Des études mesurant le rayon hydrodynamique de protéines globulaires, du Ficoll et du Dextran en fonction de leur masse ont été menées et ont permis de déterminer la relation entre masse moléculaire et rayon hydrodynamique. Le coefficient b tel que $r_h \propto M_w^b$ (fig. 2.2) peut être résumé par :

- pour une sphère dure : $r_h \propto M_w^{1/3}$ (courbe théorique en noire)
- pour une sphère hydratée : $r_h \propto M_w^{1/3}$ (courbe théorique en noire pointillé, seule la densité de l'objet est modifiée)
- pour une protéine globulaire $r_h \propto M_w^{0.386}$ (ajustement à partir d'une courbe expérimentale, en bleu ^[78])
- pour le Ficoll $r_h \propto M_w^{0.427}$ (ajustement à partir d'une courbe expérimentale, en vert ^[79])
- pour le Dextran polydisperse $r_h \propto M_w^{0.463}$ (ajustement à partir d'une courbe expérimentale, en rouge foncé ^[78])
- pour le Dextran monodisperse $r_h \propto M_w^{0.437}$ (ajustement à partir d'une courbe expérimentale, en rouge clair ^[78])

(1998).

[77] Ohlson, M., Sörensson, J., and Haraldsson, B. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(3), 396 – 405 (2001).

[75] Bohrer, M., Patterson, G., and Carroll, P. *Am. Chem. soc.* **17**(6), 1170 – 1173 (1984).

[78] Rippe, S. and Gunnar, B. *Kidney Int* **35**(5), 1234 – 1244 (1989).

[79] Oliver, J., Anderson, S., Brenner, J. T. B., and Deen, W. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**(2), 214–228 (1992).

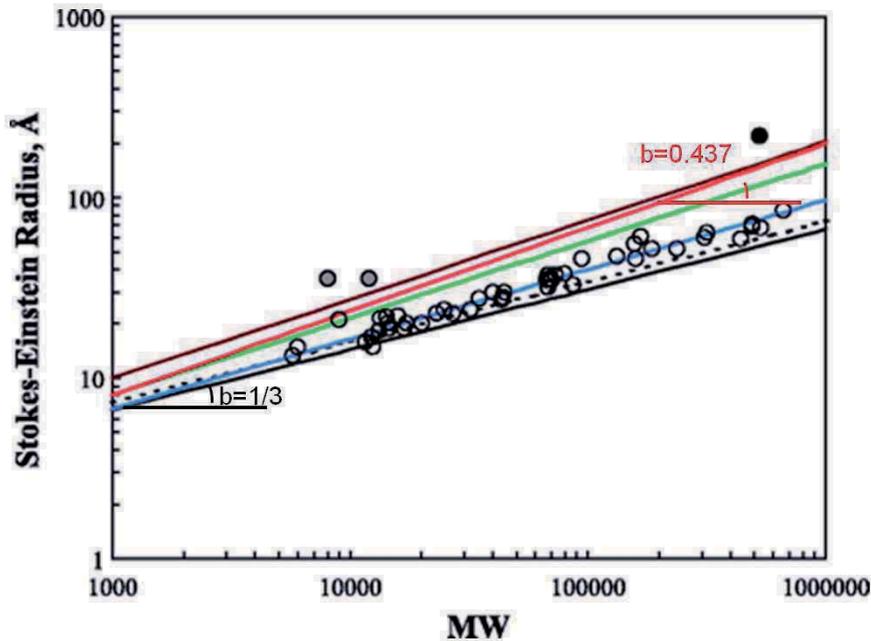


FIGURE 2.2 – Rayon de Stokes (rayon hydrodynamique) en fonction du poids moléculaire . ligne noire continue : calculé pour une sphère dure. Ligne en pointillé : calculé pour une sphère dure hydratée. Ligne bleue : meilleur ajustement pour les protéines globulaires. Ligne verte : pour le Ficoll, lignes rouges, pour le dextran (rouge clair : dextran monodisperse, rouge foncé polydisperse). o : 50 protéines globulaires différentes.

Sur la figure 2.2, on observe que les masses moléculaires du Ficoll, du Dextran et même celle des protéines ne varient pas comme leurs rayons à la puissance $1/3$ et s'écartent d'une courbe "théorique" de sphère dure. Les coefficients obtenus pour le Ficoll et le Dextran sont du même ordre de grandeur, celui du Ficoll est légèrement inférieur. Chacun d'eux est supérieur à celui obtenu pour une sphère dure mais reste inférieur à celui d'une chaîne gaussienne. Le Ficoll et le Dextran sont des objets relativement compacts qui ne peuvent être considérés strictement comme des sphères dures, le Ficoll étant plus compact que le Dextran.

La caractérisation par DNPA nous permet d'avoir des informations plus précises sur la conformation et la taille du Ficoll et du Dextran.

Les mesures ont été faites sur les spectromètres PAXE et PACE au LLB. Afin de collecter des informations sur une gamme de vecteurs d'onde suffisante, nous avons utilisé deux distances échantillon-détecteur ($7.10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < Q < 4.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$). L'intensité de diffusion incohérente a été soustraite afin de ne représenter que l'intensité de diffusion cohérente. Nous avons effectué une étude en concentration du Ficoll (de 5 à 30 g.l^{-1}) dans du D_2O (afin d'augmenter le contraste). Le Ficoll possédant 8 hydrogènes labiles, nous devons tenir compte de l'échange H-D pour dé-

terminer la densité de diffusion du Ficoll.

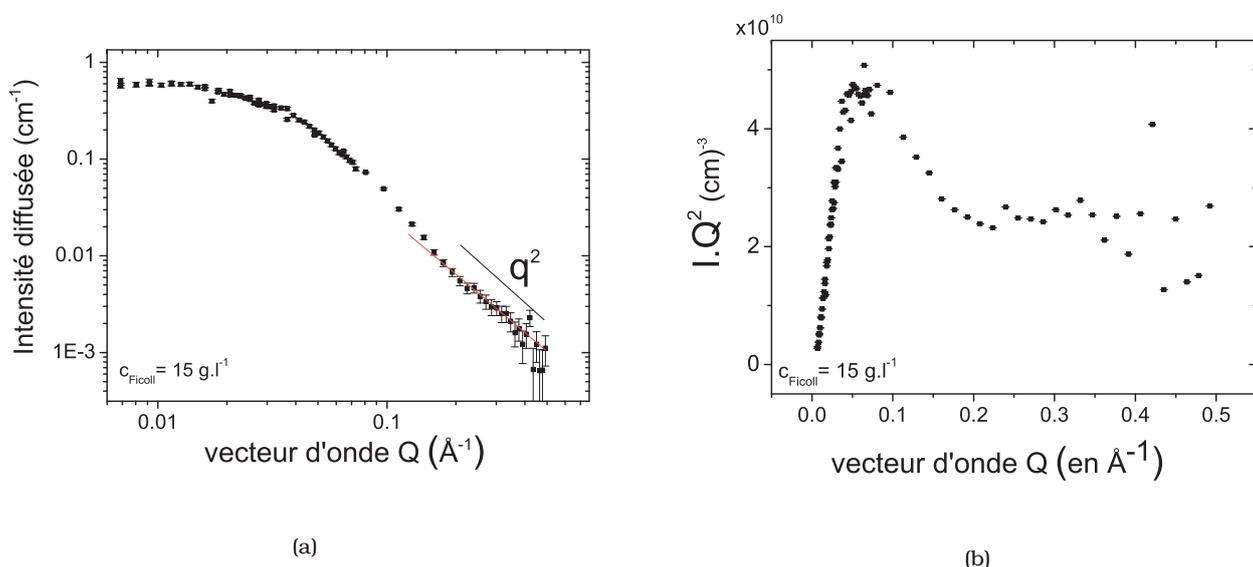


FIGURE 2.3 – (a) : Intensité diffusée par le Ficoll dans le D_2O à 15 mg.ml^{-1} . (b) Représentation de Kratky de l'intensité diffusée.

La figure 2.3(a) représente le spectre de diffusion du Ficoll dans le D_2O en fonction du vecteur d'onde. Comme on peut le voir sur la représentation de type Kratky ($I.Q^2$ en fonction du vecteur d'onde), à $Q \approx 0.07 \text{ \AA}^{-1}$, on observe une bosse caractéristique des sphères. A grand vecteur d'onde ($Q > 0.15 \text{ \AA}^{-1}$), l'intensité diffusée est proportionnelle à Q^{-2} , caractéristique d'une structure de type chaîne gaussienne. Dans cette gamme de vecteur d'onde, seule la structure localement gaussienne est visible.

Comme nous avons essayé de le représenter sur la figure 2.4, le Ficoll est une sphère peu compacte dont la structure locale est gaussienne.



FIGURE 2.4 – Représentation schématique du Ficoll. Le Ficoll est un polymère très ramifié. Sa structure locale est gaussienne. A plus grande échelle, sa structure peut être assimilée à celle d'une sphère.

La figure 2.5(a) présente le même type d'étude menée sur le Dextran. Comme pour le Ficoll 70, on observe que la variation de l'intensité diffusée à grand vecteur d'onde est en Q^{-2} . Mais contrairement au Ficoll, on n'observe aucune bosse caractéristique de sphère à faible vecteur d'onde. Le dextran a une structure locale gaussienne. Son rayon de giration est plus petit que le rayon de giration d'une chaîne gaussienne de même taille. Le Dextran est un objet relativement compact non sphérique.

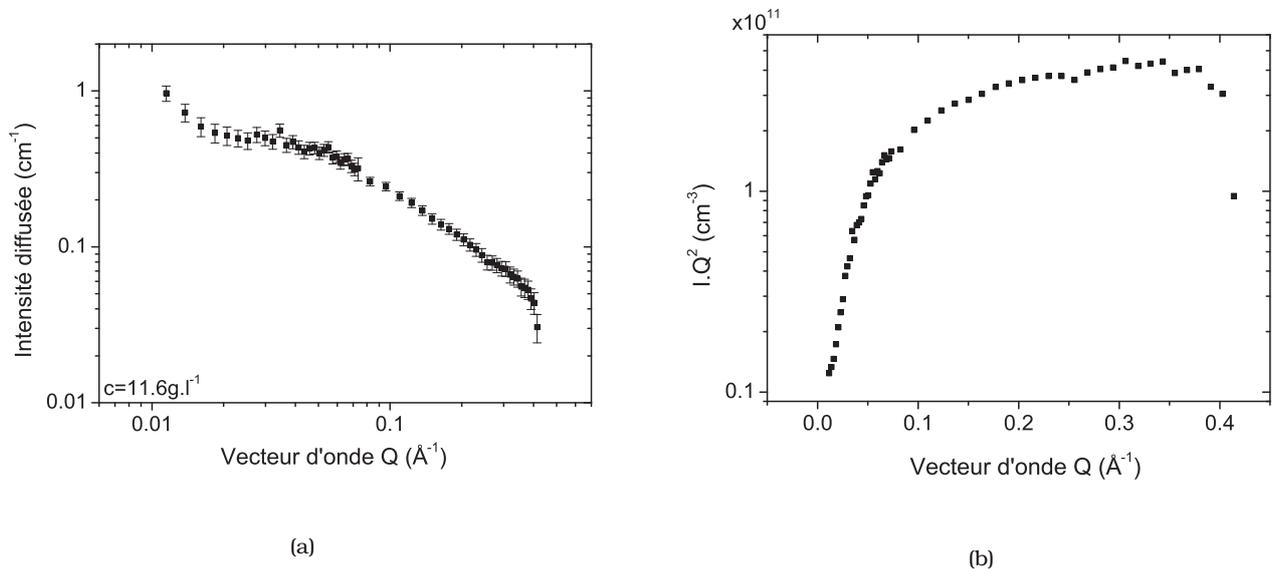


FIGURE 2.5 – Intensité diffusée par le Dextran dans le D_2O à 11.6 mg.ml^{-1} (a) et sa représentation de Kratky (b).

Pour chaque concentration, nous avons déterminé le rayon de giration des objets diffusants grâce à un ajustement de Guinier pour $Q < 2.10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ (cf annexes). Afin de ne pas tenir compte des interférences dues au facteur de structure, nous avons extrapolé (cf annexes) les données de la masse apparente, $M_a(\Phi_F)$ et $M_a(\Phi_d)$ (Φ_F et Φ_D sont respectivement les fractions massiques en Ficoll et en Dextran) et le rayon de giration, R_g à concentration en Ficoll et en Dextran nulle (fig. 2.6 et 2.7). Les résultats pour le Ficoll et le Dextran sont récapitulés dans le tableau (2.2).

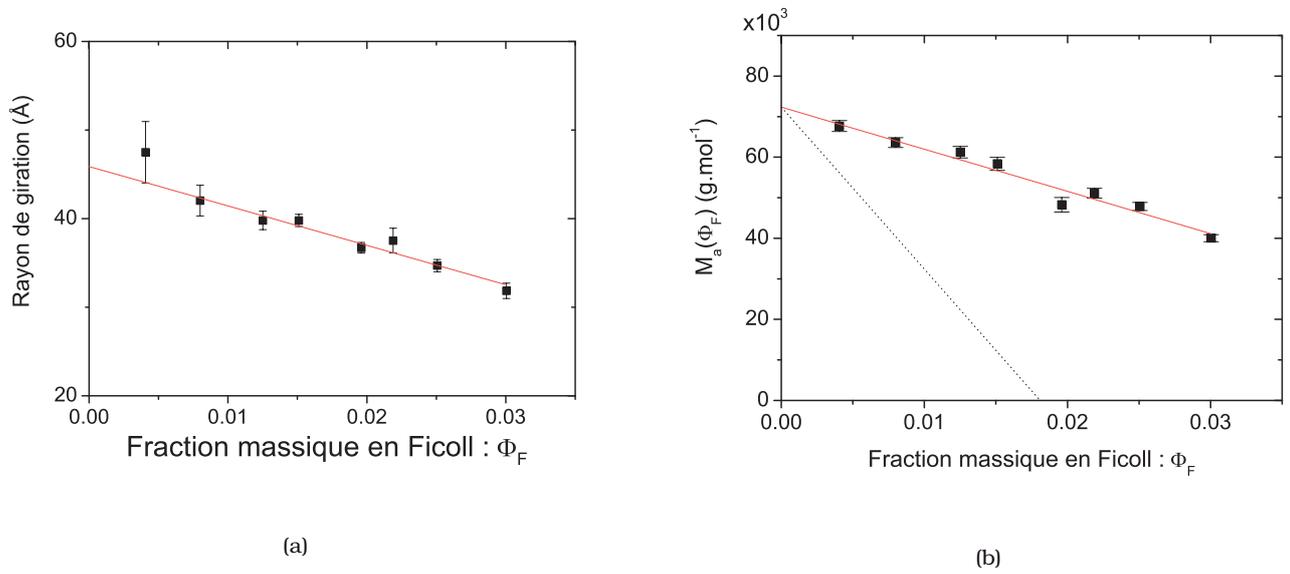


FIGURE 2.6 – Extrapolation du rayon de giration (fig a) et de la masse du Ficoll (fig b). En trait plein : ajustement des données expérimentales. En trait pointillé : masse apparente calculée pour une sphère dure de même rayon de giration et de même masse.

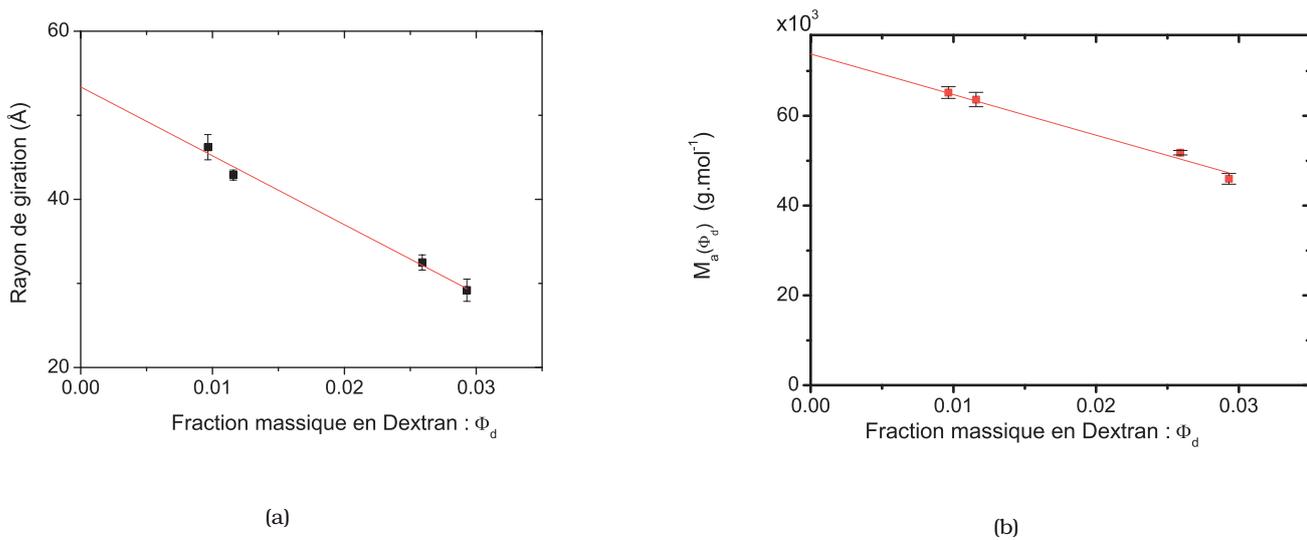


FIGURE 2.7 – Extrapolation du rayon de giration (fig a) et de la masse du Dextran (fig b).

	M_w mesuré	R_g	r_h	a_2	$a_{2s,calc}$
Ficoll	$72100 \pm 4000 g.mol^{-1}$	$46.2 \pm 2.5 \text{ \AA}$	$45 - 50 \text{ \AA}$	$858\ 000 \pm 78\ 000 \text{ \AA}^3$	$3\ 553\ 000 \text{ \AA}^3$
Dextran	$73700 \pm 6000 g.mol^{-1}$	$53.7 \pm 2.7 \text{ \AA}$	60 \AA	$771\ 000 \pm 80\ 000 \text{ \AA}^3$	$5\ 583\ 000 \text{ \AA}^3$

TABLE 2.2 – Caractérisation du Ficoll et du Dextran.

Le rayon d'une sphère dure est égale à $\sqrt{5/3}R_g$. Dans le cas du Ficoll et du Dextran, r_h est légèrement supérieur à R_g . Ceci conforte notre constatation précédente : les 2 polysaccharides ne sont pas des sphères dures.

Afin de caractériser les interactions entre macromolécules à faible concentration, nous avons déterminé le second coefficient du viriel, a_2 . Les interactions entre Ficoll ou entre Dextran sont répulsives. Nous pouvons comparer les valeurs obtenues avec le second coefficient du viriel d'une sphère dure de même rayon, $a_{2s,calc}$ (tab. 2.2).

Pour une sphère dure de rayon R_0 son second coefficient du viriel est a_{2s} :

$$a_{2s} = \frac{16}{3}\pi R_0^3 = 4\nu_s \quad (2.2)$$

où ν_s est le volume de la sphère.

Pour le Ficoll, le second coefficient du viriel mesuré est 4 fois inférieur à celui d'une sphère dure de même rayon en solution et plus de 6 fois pour le Dextran.

Les agents d'encombrement que nous avons choisis ne sont pas à proprement parler des sphères dures. Le Ficoll est, parmi les agents d'encombrement synthétiques utilisés celui dont la forme se rapproche le plus de celle d'une sphère. Nous l'utiliserons dans la plupart de nos études.

b) La pression osmotique

Pour 2 solutions, séparées par une membrane semi-poreuse, la pression osmotique est définie comme la pression exercée sur cette membrane. Comme nous l'avons vu en introduction, pour les solutions non-idéales, la relation entre fraction massique et pression osmotique, Π , n'est pas linéaire :

$$\Pi = \rho kT(1 + a_2\rho + a_3\rho^2 + \dots) \quad (2.3)$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température, ρ la densité en particule et a_2 , a_3 sont les second et troisième coefficients du viriel.

Dans le cadre de notre étude, le Ficoll sera en solution fortement concentrée (jusqu'à des fractions massiques de l'ordre de 0.3, 0.4). Nous mesurons la pression osmotique pour ces solutions

par compression osmotique. Des solutions de pressions osmotiques différentes vont être séparées par une membrane semi-poreuse. Une pression va s'exercer sur cette membrane jusqu'à ce que les pressions osmotiques dans chacun des réservoirs s'égalisent.

Une solution de Ficoll de concentration fixe est préparée. Celle-ci est placée à l'intérieur d'une membrane semi-perméable dont la masse de coupure est de $3\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Cette membrane est placée dans un réservoir de solution de PEG dont la pression osmotique a été étalonnée en fonction de la concentration ^[80]. Le réservoir a un volume 100 fois plus grand que le volume à l'intérieur de la membrane de dialyse (fig. 2.8). La membrane laisse passer l'eau. Le Ficoll et le PEG restent dans leur réservoir respectif (voir fig 2.8 ^[81]). Nous avons dialysé pendant 3 semaines et changé 3 fois le bain de dialyse afin d'équilibrer le mélange. A la fin de la dialyse, la pression osmotique à l'intérieur de la membrane et du réservoir sont égales. La concentration en Ficoll a été modifiée. Nous avons mesuré la concentration massique en Ficoll grâce à la Thermo gravimétrie (TGA).

Nous avons préparé 16 solutions différentes de PEG de masse $20\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de pression osmotique connue jusqu'à une pression de $3\cdot 10^5\ \text{Pa}$. L'ensemble des données collectées ainsi que celles issues de la littérature ^[82] sont représentés sur la figure 2.9.

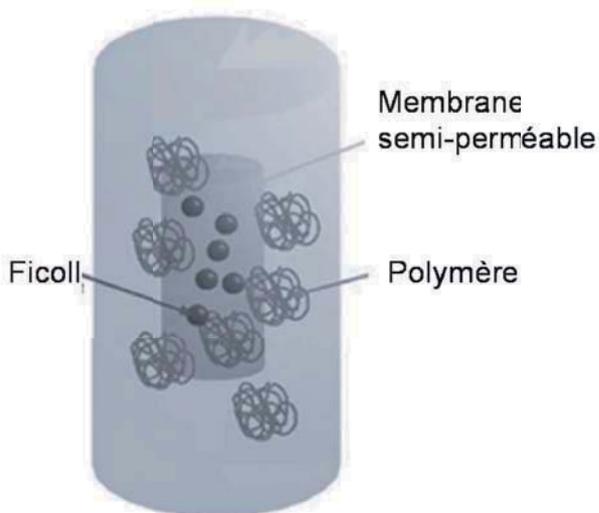


FIGURE 2.8 – Schéma du principe de la compression osmotique . Le réservoir a une pression osmotique connue. La concentration en eau à l'intérieur de la membrane de dialyse varie de manière à équilibrer la pression de part et d'autre de celle-ci. On mesure ensuite la concentration à l'intérieure de la membrane.

[80] <http://www.brocku.ca/researchers/peterrand/osmotic/data/peg20000> .

[81] Robbes, A.-S., Cousin, F., and Meriguet, G. *Brazilian J. of Phys.* **39**, 156 – 162 (2009).

[82] <http://www5.gelifesciences.com> .

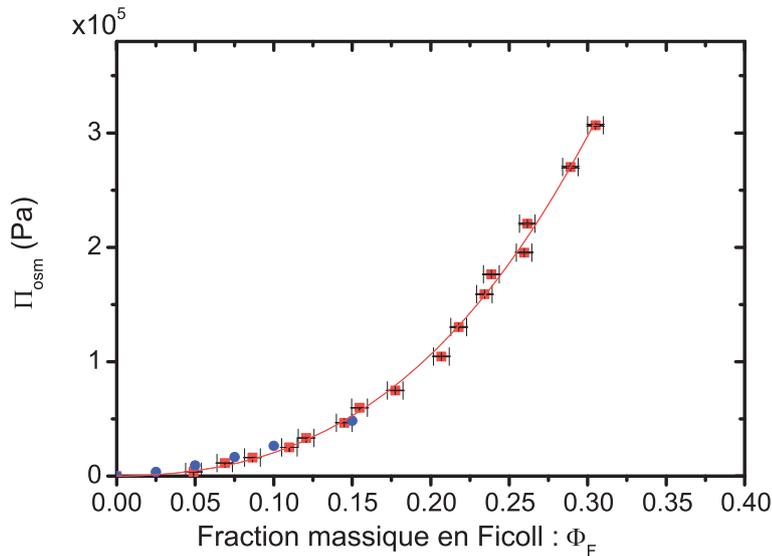


FIGURE 2.9 – Pression osmotique d'une solution de Ficoll en fonction de la fraction massique en Ficoll. En carrés rouges, nous avons représenté les données expérimentales. La courbe rouge est l'ajustement des données par une fonction de puissance. En bleu nous avons ajouté des points issus de la littérature. Les données expérimentales et celles de la littérature sont cohérentes.

Afin de tenir compte de la non-idéalité de la solution, les données ont été affinées par l'équation 2.3 jusqu'à l'ordre 3 en fixant la valeur du second coefficient du viriel trouvée par diffusion de neutrons. Dès que la fraction massique en Ficoll augmente, la solution est fortement non-idéale et les interactions stériques ne peuvent plus être négligées.

2.1.2 Le PEG

Le PEG-deutééré a également été utilisé comme agent d'encombrement. Sa masse est de 19 000 g.mol⁻¹. C'est un homopolymère neutre. Il adopte une conformation de type chaîne gaussienne que nous expliquerons par la suite (chapitre 3). Il ne peut être interprété par les mêmes modèles.

2.1.3 Extinction de l'agent d'encombrement

Le but de notre étude est d'observer un chaîne gaussienne ou une protéine en présence d'un encombrement. Afin de ne pas observer le signal de l'agent d'encombrement nous devons "éteindre" son signal dans le solvant.

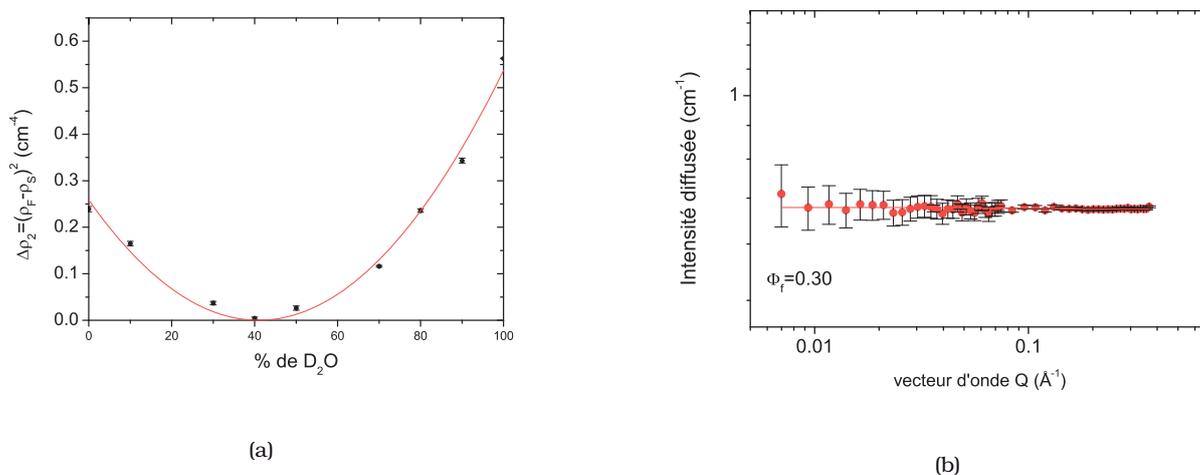


FIGURE 2.10 – Etude par variation de contraste du Ficoll dans un solvant H_2O/D_2O (a). Le signal s'éteint dans le solvant pour une fraction massique en D_2O de 41%. (b) Spectre de diffusion du Ficoll à une fraction massique $\Phi = 0.3$ pour $x_{D_2O} = 0.41$.

a) Extinction du signal du Ficoll et du Dextran

Nous avons éteint le signal du Ficoll dans le solvant, l'eau. Afin de déterminer avec précision la fraction, x_{D_2O} , de D_2O dans le solvant nécessaire à l'extinction totale du signal, nous avons mesuré l'intensité diffusée par le Ficoll pour différentes fractions de x_{D_2O} comprises entre 0 et 1.

Pour une fraction massique en D_2O de 41%, le signal du Ficoll est éteint quelle que soit sa fraction massique. La figure 2.10(b) représente l'intensité diffusée par le Ficoll à une fraction massique de 0.3.

Une étude similaire permet de déterminer la fraction massique en D_2O permettant d'éteindre le signal du Dextran dans le solvant. La fraction obtenue est également de 41 %.

b) Extinction du signal du PEG-D

Le PEG-D a une densité de longueur de diffusion supérieure à celle du D_2O (fig. 2.11). Il est donc impossible d'éteindre complètement le signal du PEG-D dans un mélange H_2O/D_2O .

Quand on utilise le PEG-D, sa fraction massique dans le système est de plus de 10%, tandis que la myoglobine que nous voulons observer a une fraction massique de l'ordre de 0.1%. L'extinction du PEG doit être quasi parfaite pour observer la myoglobine.

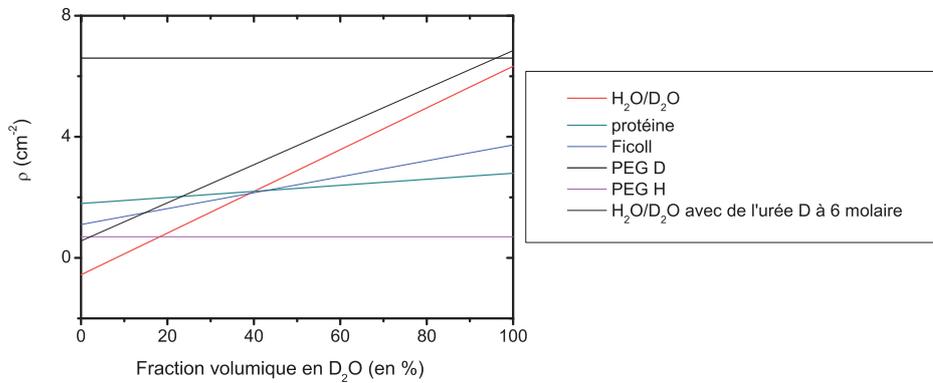


FIGURE 2.11 – densité de longueur de diffusion de différentes molécules et de différents solvants en fonction de la fraction en D_2O . Le point d'intersection entre la densité de longueur de diffusion d'un solvant et d'un soluté est le point d'extinction du soluté dans le solvant. On observe bien que les protéines et le Ficoll hydrogénés s'éteignent pour la même fraction en D_2O , il est impossible d'observer le signal d'une protéine en présence de Ficoll.

L'urée deutérée a une densité de longueur de diffusion supérieure à celle du D_2O . A 6 mol.l^{-1} , la quantité d'urée n'est pas négligeable et permet d'augmenter la densité de longueur de diffusion du solvant de manière significative. Comme on peut le voir (fig. 2.11), dans un tel solvant, le signal du PEG-D peut être éteint.

2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier un système simplifié afin de mieux comprendre les effets du volume exclu. Nous avons choisi d'étudier la conformation d'un homopolymère modèle (le poly(éthylène glycol)) en présence d'encombrement. Cet homopolymère ne permettra pas d'observer le repliement des protéines puisqu'il n'existe pas d'interactions spécifiques à l'intérieur même de la chaîne, mais, de comprendre *a priori* la destabilisation entropique de la chaîne dépliée.

2.2.1 Influence du volume exclu sur la conformation d'une chaîne

a) Conformation d'une chaîne de polymère

i) Quelques éléments de théorie

Une chaîne idéale est une chaîne dont deux maillons consécutifs peuvent tourner librement autour de leur point d'attache. On suppose qu'il n'y a pas d'interactions entre les monomères (fig. 2.12 [83]).

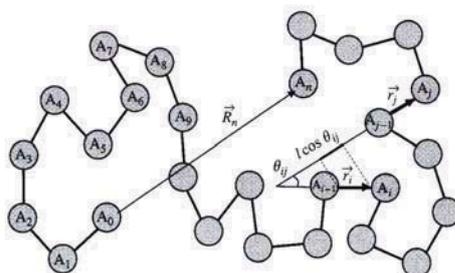


FIGURE 2.12 – Schéma de la conformation d'une chaîne de polymère flexible comportant $n+1$ monomères. Chacun d'entre-eux est représenté par une sphère A_i . \vec{r}_i est le vecteur de liaison entre deux monomères voisins (A_{i-1} et A_i), θ_{ij} l'angle entre \vec{r}_i et \vec{r}_j et \vec{R}_n est le vecteur entre les deux extrémités de la chaîne (A_0 et A_n).

Une chaîne idéale constituée de $n+1$ monomères peut être schématisée (fig. 2.12) par $n+1$ sphères A_i , le vecteur entre deux sphères voisines, A_{i-1} et A_i , est \vec{r}_i de longueur a , et l'angle que définissent \vec{r}_i et \vec{r}_j est θ_{ij} . On peut calculer la distance bout à bout de la chaîne \vec{R} :

$$\vec{R} = \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \quad (2.4)$$

Le rayon de Flory, R est défini comme :

$$R = \langle \|\vec{R}\|^2 \rangle^{1/2} \quad (2.5)$$

Sa valeur quadratique moyenne est donc :

$$\langle R^2 \rangle = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle \quad (2.6a)$$

$$\langle R^2 \rangle = a^2 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \cos \theta_{ij} \rangle \quad (2.6b)$$

[83] Rubinstein, M. and Colby, R. *Polymer physics*. Oxford University Press, (2003).

Pour une chaîne idéale, les interactions entre 2 monomères sont négligées (y compris les interactions stériques), θ_{ij} a donc une valeur aléatoire. Pour un nombre de monomères n suffisamment grand, on aura $\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \cos\theta_{ij} \rangle = n$. On en tire :

$$\langle R^2 \rangle = a^2 n \quad (2.7)$$

La taille moyenne de la chaîne, $R_0 = \sqrt{\langle R^2 \rangle}$, est proportionnelle au nombre de monomères à la puissance 1/2.

Le rayon de giration, R_g , d'un objet est le rayon de la sphère (creuse) qui aurait le même moment d'inertie. D'un point de vue plus formel, le rayon de giration correspond à la moyenne quadratique sur toutes les configurations possibles des distances entre deux atomes.

Pour une chaîne gaussienne :

$$\langle R_g^2 \rangle = \langle R^2 \rangle / 6 \quad (2.8a)$$

$$R_g \propto n^{1/2} \quad (2.8b)$$

La probabilité de la distribution de la distance bout à bout R , $P(R)$ est gaussienne :

$$P(R) \propto e^{-\frac{3R^2}{2\langle R^2 \rangle}} \quad (2.9)$$

Pour une chaîne réelle, contrairement à la chaîne idéale, on tient compte des interactions monomères-monomères. Elles se décomposent en :

- interactions entre proches voisins
- interactions entre monomères éloignés sur la chaîne mais, qui peuvent être voisins grâce à la souplesse de la chaîne. C'est le cas par exemple des monomères A_5 et A_0 sur la figure 2.12.

Les interactions entre proches voisins sont des interactions à courte distance caractérisées par la longueur de persistance, l_p , du polymère. C'est la longueur pour laquelle la chaîne a "oublié" les contraintes sur les angles de liaison entre 2 segments. Par exemple la longueur de persistance d'un brin d'ADN double hélices est de 50nm. En tenant compte uniquement de ces interactions de courte portée, on peut assimiler la chaîne réelle à une chaîne idéale dont l'unité statistique n'est pas la distance entre 2 monomères, mais la longueur de persistance. Le rayon de giration d'une telle chaîne est définie par :

$$R_g = 2l_p \cdot n^{1/2} \quad (2.10)$$

Les interactions entre 2 monomères éloignés sur une même chaîne sont dues à l'enchevêtrement de celle-ci. Ces interactions peuvent être caractérisées par le volume exclu d'un monomère, v_m ¹, défini par :

$$v_m(T) = - \int (e^{-V(r)/kT} - 1) dr^3 \quad (2.11)$$

1. le volume exclu d'un monomère est a bien différencier du deuxième coefficient du viriel a_2 qui représente le volume exclu à la chaîne elle-même.

où $V(r)$ est le potentiel d'interaction entre monomères. Pour une interaction de type cœur dur, $v_m(T)$ est le covolume associé au monomère.

De manière générale, le rayon de giration d'un polymère s'exprime comme une fonction de son nombre de monomères, n .

$$R_g \propto n^\nu \quad (2.12)$$

où ν est un exposant critique de gonflement de la chaîne. Il dépend de la qualité du solvant. En bon solvant, la conformation de la chaîne est "gonflée" par rapport à sa conformation idéale. La valeur de l'exposant critique déterminée grâce à la théorie de Flory, 3/5, est proche de la valeur obtenue grâce à la théorie de renormalisation ^[84] $\nu \simeq 0.588$.

ii) Un modèle de chaîne gaussienne dans l'eau, le Polyethylene glycol (PEG)

Au cours de cette étude, nous avons utilisé un homopolymère linéaire, le Polyéthylène glycol (PEG) ou polyéthylène oxyde (PEO) (son nom d'usage dépend de sa masse molaire) comme modèle de chaîne gaussienne. Son unité monomère est CH_2CH_2O et il est neutre, non toxique, facile à produire et deutérable.

Nous avons étudié 3 masses molaires de PEG différentes : $M_w = 18\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ($M_n = 17\,000 \text{ g.mol}^{-1}$), $M_w = 42\,800 \text{ g.mol}^{-1}$ ($M_n = 40\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) et $M_w = 132\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ($M_n = 124\,500 \text{ g.mol}^{-1}$) où M_w et M_n sont respectivement les masses moléculaires moyennes en poids et en nombre des polymères. Pour des raisons de contraste, nous avons utilisé des PEGs deutérés, $(CD_2CD_2 - O)_n$. Les PEG ont été fournis par Polymer Source.

Chaque PEG a été étudié en solution dans de l'eau par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) sur les spectromètres PACE au LLB ou D22 à l'ILL. Pour chaque mesure, nous avons utilisé deux configurations de distances et de collimation afin de couvrir une gamme de vecteur d'onde s'étendant de $6.10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ à $3.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Nous avons étudié les spectres de diffusion de neutrons aux petits angles pour 5 concentrations en PEG, c_p , différentes.

La figure 2.13 représente les structures de chaque PEG dans l'eau (en l'absence de Ficoll) pour une concentration $c_p \approx 10 \text{ g.l}^{-1}$. Elles ont été affinées en prenant une intensité théorique :

$$I(Q) = \frac{c_p \Delta \rho^2 \nu_s^2}{N_a} M_a(c_p, \Phi) P(Q) \left(1 - 2 \frac{a_2(\Phi)}{M_a} c_p\right) \quad (2.13)$$

où $P(Q)$ est le facteur de forme d'une chaîne gaussienne donnée par la formule de Debye (voir annexe), N_a est le nombre d'Avogadro, $\Delta \rho$, le contraste entre le solvant et le PEG, ν_s , le volume spécifique du PEG, $a_2(\phi)$ est le second coefficient du viriel (défini dans le chapitre 1), $M_a(c_p, \Phi)$

[84] Brezin, E., Guillou, J.-C. L., and Zim-Justin, J. *Phase transitions and critical phenomena*. (1976).

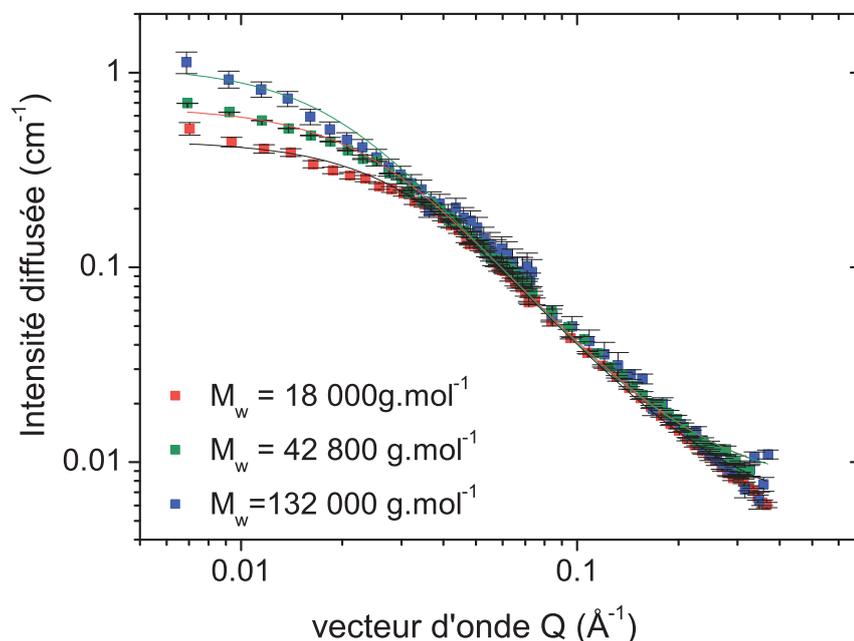


FIGURE 2.13 – Intensité diffusée par les 3 PEG de masses molaires différentes dans l'eau. Les données ont été affinées par un facteur de forme de Debye (traits pleins). ■ : $M_w=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=42\ 800\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=132\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$.

est la masse apparente de l'objet diffusant et Φ , la fraction massique en agent d'encombrement (dans ce cas nulle)

Comme expliqué en annexe, on obtient grâce à cet ajustement :

- l'intensité diffusée extrapolée à vecteur d'onde nul qui nous permet de déterminer la masse apparente, $M_a(c_p, \Phi)$, de l'objet diffusant grâce à

$$M_a(c_p, \Phi) = \frac{N_a}{c_p \nu_s^2 \Delta \rho^2} I(Q \rightarrow 0, c_p) \quad (2.14)$$

- le rayon de giration des objets diffusants

La figure 2.14(a) représente $M_a(c_p, \Phi = 0) = M_a(c_p)$ obtenue par l'équation 2.14 en fonction de la concentration en PEG, c_p . La masse de la chaîne de polymère, M_p , est obtenue par extrapolation à concentration nulle, $M_p = M_a(c_p \rightarrow 0)$. Pour chaque masse de polymère, on observe que l'on reste dans une dépendance linéaire décroissante. La concentration en PEG est suffisamment faible pour rester dans le domaine de validité du développement de la masse au second ordre (coefficient du second viriel). A partir de la pente des droites ajustées de la figure 2.14(a), on dé-

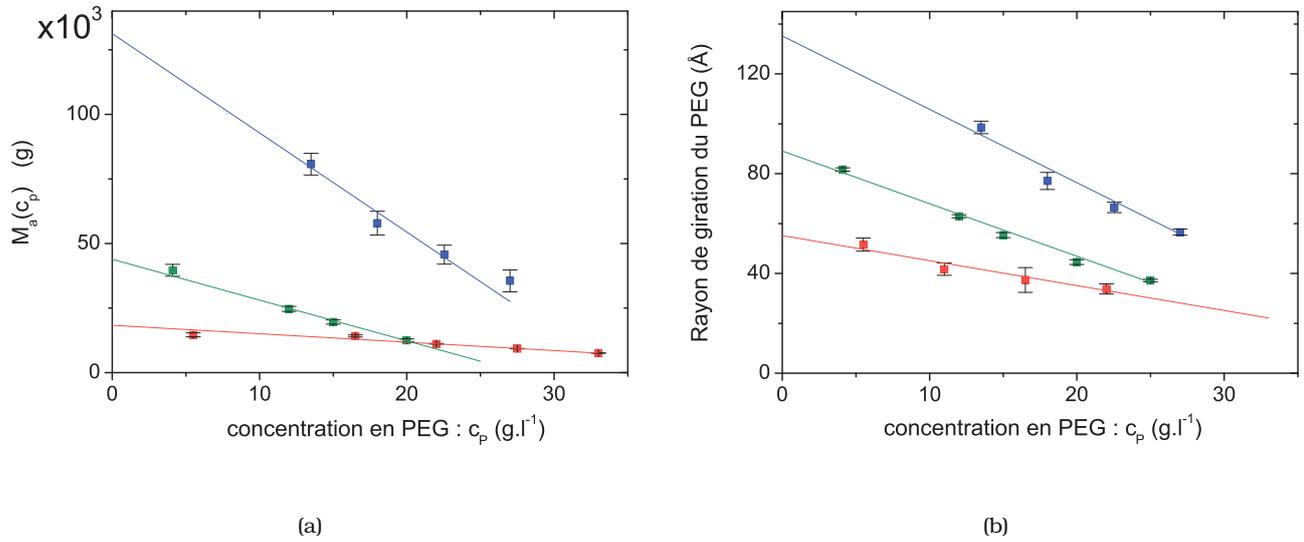


FIGURE 2.14 – (a) : Evolution de la masse apparente du PEG en fonction de sa concentration en solution : la masse du PEG est obtenue par extrapolation à concentration en PEG nulle. ■ : $M_w=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=42\ 800\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=132\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$. (b) : Evolution du rayon de giration du PEG en fonction de sa concentration en solution : le rayon de giration du PEG est obtenu par extrapolation à concentration en PEG nulle.

termine le second coefficient du viriel, a_2 , proportionnel aux interactions entre polymères. Elles sont répulsives pour toutes les masses moléculaires de PEG. Les valeurs de a_2 sont récapitulées dans le tableau 4.1. Plus la taille de la chaîne augmente, plus les interactions sont répulsives.

De manière analogue au développement de la masse apparente à $c_p=0$, le rayon de giration de chaque PEG est obtenu par extrapolation à concentration nulle des rayons de giration apparents. On représente l'évolution du rayon de giration apparent du PEG en fonction de c_p (fig. 2.14(b)).

Les rayons de giration et les masses extrapolées pour chaque masse molaire sont récapitulés dans le tableau 4.1. Le premier point à noter est que les valeurs des masses obtenues sont en bon accord avec les masses indiquées par le fournisseur : Polymersource. En considérant le PEG comme une chaîne idéale de longueur de persistance, l_p , on peut estimer la valeur du rayon de giration du PEG en fonction de sa masse grâce à l'équation 2.10. Les valeurs des rayons de giration calculés sont récapitulés dans le tableau 4.1. Ce bon accord entre les rayons calculés et les résultats expérimentaux semble indiquer que le PEG dans l'eau se comporte comme une chaîne idéale.

M_w	M_w mesuré	R_g	R_g calculé (à partir de la valeur de l_p de la littérature)	a_2
18 000 $g.mol^{-1}$	18 600 ± 550 $g.mol^{-1}$	56.7 ± 1.6 Å	56.8 Å	16 300 ± 550 Å ³
42 800 $g.mol^{-1}$	43 800 ± 2 000 $g.mol^{-1}$	81.3 ± 2.3 Å	82.5 Å	78 300 ± 4 000 Å ³
132 000 $g.mol^{-1}$	131 500 ± 3 850 $g.mol^{-1}$	136.1 ± 4 Å	145.5 Å	191 000 ± 2 200 Å ³

TABLE 2.3 - Caractérisation des PEG deutérés.

De manière générale, on peut à partir de l'équation 2.10, déterminer une loi de puissance du rayon de giration en fonction de sa masse :

$$R_g = 2l_p \left(\frac{M_p}{6M_e} \right)^\nu \quad (2.15)$$

où l_p est la longueur de persistance du PEG, M_p sa masse molaire, M_e la masse molaire de l'éthylène-glycol le monomère du PEG.

Afin de déterminer la manière dont le rayon de giration de la chaîne dépend de la masse, on l'a représenté sur la figure 2.15 en fonction de la masse molaire du PEG. Les masses molaires de 5 000, 16 000 et 35 000 $g.mol^{-1}$ sont ajustées à partir des données du chapitre 6. En affinant nos données grâce à eq. 2.15, on obtient $\nu = 0.46 \pm 0.05$ et une longueur de persistance $l_p = 8.4 \pm 2.1$ Å. Le PEG dans l'eau peut donc être considéré comme une chaîne idéale en bon solvant ou en régime Θ .

Dans la suite de notre étude nous considérons donc le PEG comme modèle de chaîne gaussienne et nous étudierons l'influence de l'encombrement sur sa conformation.

b) Interactions non spécifiques entre la chaîne gaussienne et le sucrose

L'objet de notre étude est d'observer l'effet des interactions stériques entre un agent d'encombrement et la chaîne gaussienne.

Nous devons donc vérifier qu'il n'existe pas d'interactions spécifiques entre la chaîne gaussienne et l'agent d'encombrement. Comme nous l'avons vu, la chaîne gaussienne que nous utiliserons est le PEG et l'agent d'encombrement est le Ficoll, polysaccharide de sucrose

Afin de vérifier qu'il n'y a pas d'interactions spécifiques entre le PEG et le Ficoll, nous allons mesurer celles entre un PEG (celui de masse $M_w = 18\,000\,g.mol^{-1}$) et le sucrose. Nous mesurons l'intensité diffusée par des solutions PEG-sucrose dans un solvant aqueux à 41% massique en D₂O (tel que le signal du sucrose soit éteint dans le solvant). $\Phi = \Phi_s$ est la fraction massique en sucre et la concentration en PEG, c_p est fixe, $c_p = 10\,g.l^{-1}$.

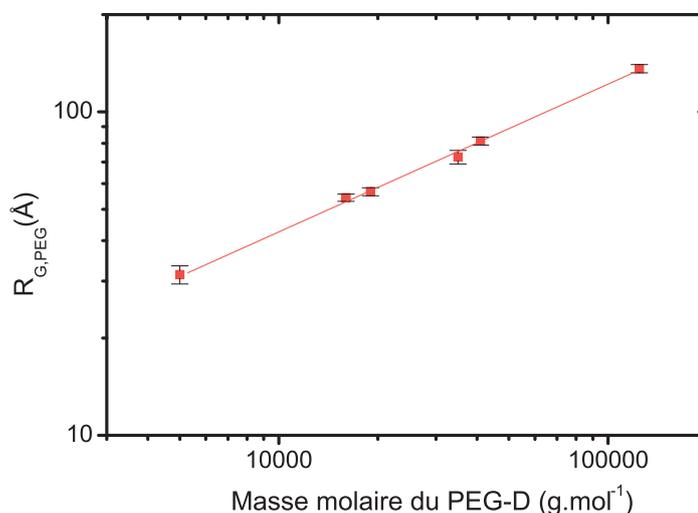


FIGURE 2.15 – Représentation en log-log du rayon de giration du PEG-D en fonction des masses molaires.

Ces dix solutions ont été étudiées par DNPA sur les spectromètres PACE au LLB ou D22 à l'ILL. L'intensité diffusée par le PEG est affinée par l'expression 2.13. Quelles que soient la fraction massique en sucrose, le PEG garde une conformation de chaîne gaussienne et son rayon de giration apparent ne varie pas avec la fraction massique en sucre. L'ajout de sucre, même à une forte fraction massique, ne modifie pas sensiblement la qualité du solvant. Nous en déduisons donc qu'entre le sucrose et le PEG, il n'y a pas d'interactions spécifiques notables. Le PEG reste en bon solvant dans le mélange "H₂O/D₂O - sucre".

Dans un second temps, on ajoute du Ficoll à la place du sucrose, ($\Phi = \Phi_f$). La concentration en PEG reste identique ($c_p = 10 \text{ g.l}^{-1}$). Les spectres de diffusion obtenus pour deux fractions en Ficoll ($\Phi = 0$ et $\Phi = 0.3$) sont représentés sur la figure 2.16. Chacun des spectres a été affiné grâce à l'expression 2.13. Les rayons de giration apparents obtenus (représentés en violet sur la figure 2.17) augmentent fortement lorsque la fraction massique en Ficoll augmente. Cela reflète une tendance à l'agrégation des chaînes de PEG. A partir d'une certaine fraction massique en Ficoll, qui dépend de la masse du PEG et de sa concentration, l'échantillon devient même turbide.

Le Ficoll étant le polymère du sucrose, cette variation du rayon de giration est due aux interactions stériques et non à des interactions spécifiques entre la chaîne et l'agent d'encombrement.

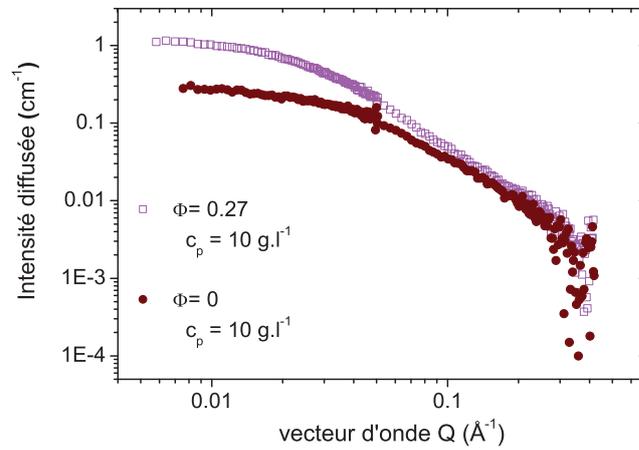


FIGURE 2.16 – Spectres de diffusion du D-PEG ($M_w=18\ 000\text{ g.mol}^{-1}$) à la concentration $c_p=10\text{ g.l}^{-1}$ pour deux fractions massiques en Ficoll différentes : \bullet : $\Phi=0$; \square : $\Phi = 0.3$.

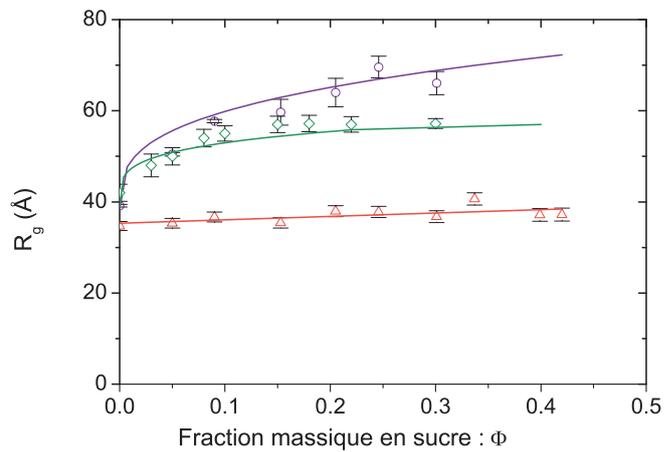


FIGURE 2.17 – Rayon de giration du PEG de masse $M_w=18\ 000\text{ g.mol}^{-1}$ à la concentration de 10 mg.ml^{-1} en fonction de la fraction massique en sucrose (Δ) et pour des concentrations de 10 mg.ml^{-1} (\circ) et de 5 mg.ml^{-1} (\diamond) en fonction de la fraction massique en Ficoll

Cela nous permet de penser que la modification de la conformation du PEG en présence du Ficoll observée est principalement due aux interactions de type stérique.

Nous observons sur la figure 2.17 qu'à concentration en PEG constante, le rayon de giration apparent du PEG augmente de presque un facteur 2 quand la fraction en agent d'encombrement est de 0.4 par rapport à celui mesuré dans l'eau. Cela semble en contradiction avec les prédictions théoriques ^{[85][32]}.

Lorsque la concentration en PEG diminue (5 g.l^{-1}), la variation du rayon de giration apparent semble moins importante (fig. 2.17). A concentration en PEG fixe (5 ou 10 g.l^{-1}), la masse apparente des objets diffusants augmente également quand Φ augmente. Cette augmentation de la masse est due au facteur de structure entre chaînes de PEG et à une tendance à l'agrégation des chaînes. Afin d'obtenir des informations sur la conformation d'une seule chaîne de PEG, nous devons, pour chaque fraction en agent d'encombrement, extrapoler nos résultats à concentration en PEG nulle.

2.2.2 Conformation d'une chaîne gaussienne en présence d'un encombrement de rayon de giration similaire

Dans ce paragraphe nous nous intéresserons à la conformation d'une chaîne de PEG de rayon de giration, dans l'eau, proche de celui de l'agent d'encombrement. Nous avons étudié un PEG de masse molaire $M_w = 18\,000 \text{ g.mol}^{-1}$, dont le rayon de giration dans l'eau est de 56.7 \AA . Le rayon de giration du Ficoll est de 46.2 \AA .

[85] Minton, A. *J. of Biol. Chem.* **276**(14), 10577–10580 (2001).

[32] Minton, A. *Biophys. J.* **88**(2), 971 – 985 (2005).

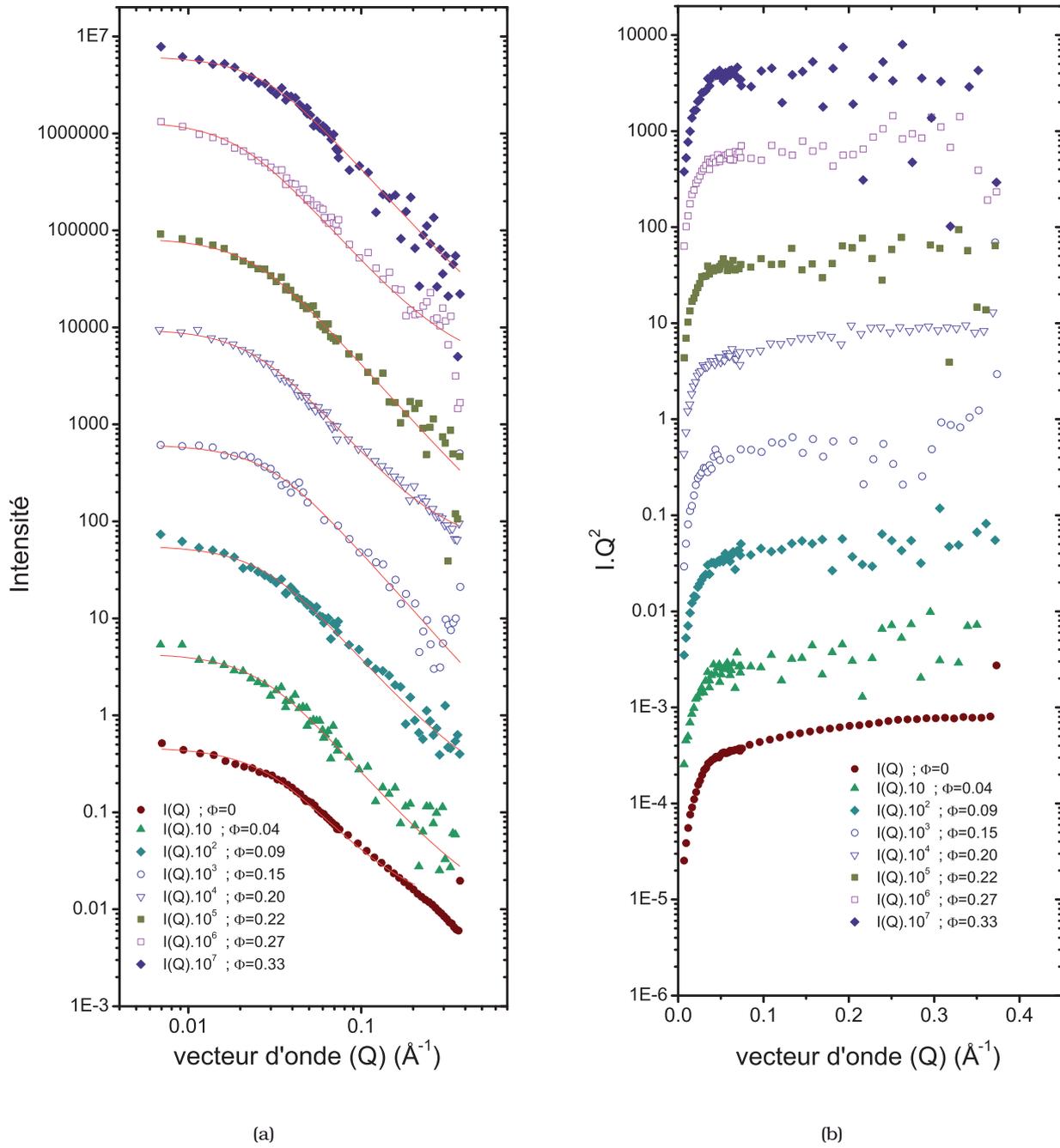


FIGURE 2.18 – (a) : Représentation de l'intensité diffusée affinée par un facteur de forme de Debye pour les huit différentes fractions massiques en Ficoll à une concentration en PEG, c_p proche de 10 g.l^{-1} (b) : représentation de Kratky de l'intensité diffusée pour les huit différentes fractions massiques en Ficoll.

Afin d'observer la conformation d'une seule chaîne de PEG, nous devons donc désormais étudier l'évolution des paramètres en fonction de la concentration en polymère à fraction massique en Ficoll constante. Pour chacune des huit différentes fractions massiques en Ficoll ($\Phi=0 \dots 0.340$), nous étudions la conformation de la chaîne en fonction de sa concentration dans un mélange H_2O/D_2O à 41% en D_2O . L'intensité diffusée est affinée par un facteur de forme de Debye quelle que soit la concentration en PEG ou en Ficoll dans la solution. La représentation de Kratky (fig. 2.18(b)) montre que quelle que soit la fraction massique en agent d'encombrement, l'intensité diffusée par la chaîne peut être raisonnablement affinée par un facteur de forme de Debye. La pente à grand Q est proche de $Q^{-1.7}$, ce qui est caractéristique des chaînes à volume exclu.

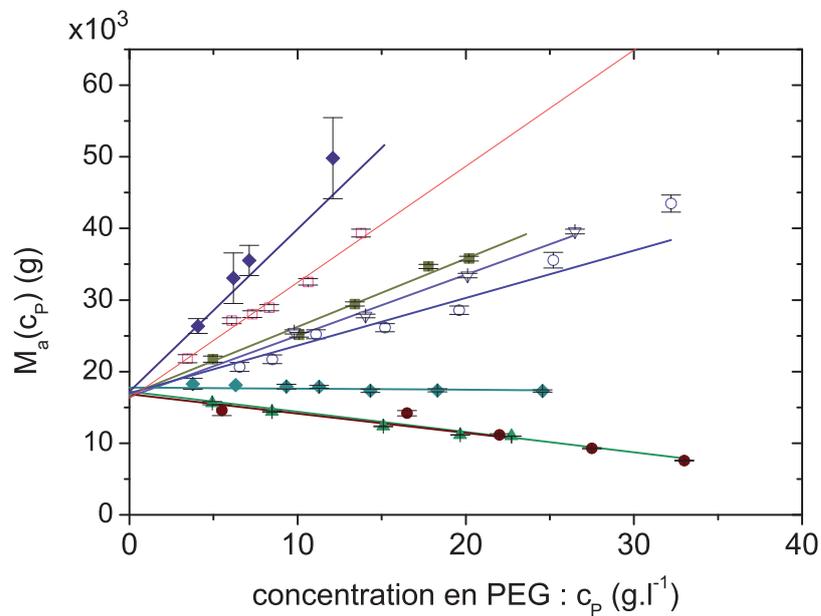


FIGURE 2.19 – Masse apparente, $M_a(c_p, \Phi)$ des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG, c_p pour différentes fractions massiques en Ficoll. \bullet : $\Phi = 0$; \blacktriangle : $\Phi = 0.045$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$; \circ : $\Phi = 0.150$; \blacktriangledown : $\Phi = 0.200$; \blacksquare : $\Phi = 0.220$; \square : $\Phi = 0.270$; \blacklozenge : $\Phi = 0.340$. Les droites convergent toutes à $c_p=0$ vers une valeur qui correspond à la valeur M_w de la chaîne donnée par le fournisseur.

La figure 2.19 représente la masse apparente des objets diffusants pour chaque fraction massique en Ficoll. L'extrapolation de la masse apparente ($M_a(c_p \rightarrow 0, \Phi)$) converge vers la même valeur pour les huit droites correspondantes à chacune des différentes fractions massiques en Ficoll. La masse ainsi obtenue est de 18 000 g, ce qui correspond à la valeur de M_w donnée

par le fournisseur Polymersource. A concentration en PEG nulle, nous évitons les effets dus à l'agrégation des chaînes pour observer une seule chaîne de polymère.

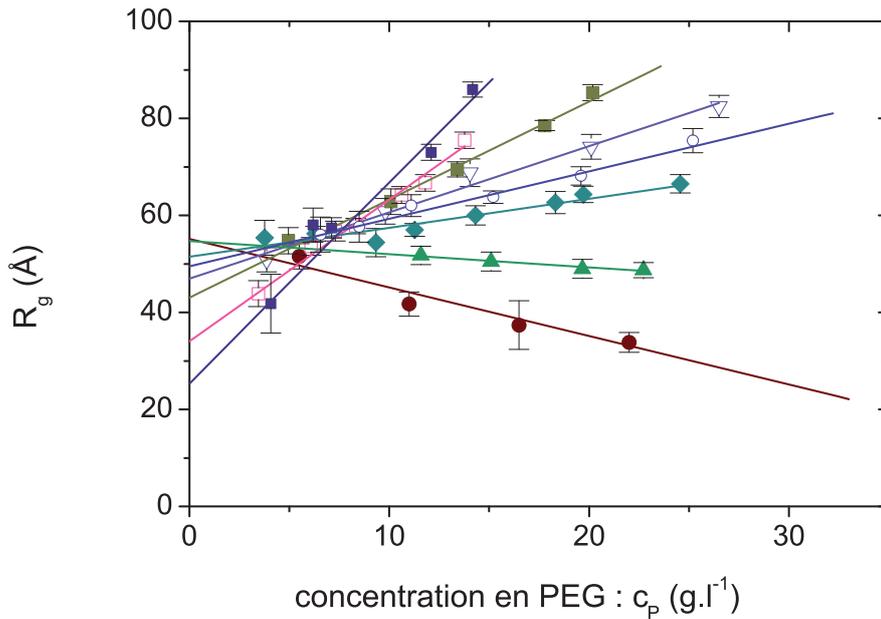


FIGURE 2.20 – Rayon de giration, R_g des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG, c_p pour différentes fractions massiques en Ficoll. ● : $\Phi = 0$; ▲ : $\Phi = 0.045$; ◆ : $\Phi = 0.090$; ○ : $\Phi = 0.150$; ▽ : $\Phi = 0.200$; ■ : $\Phi = 0.220$; □ : $\Phi = 0.270$; ◆ : $\Phi = 0.340$. Les droites sont obtenues par ajustement avec une fonction linéaire pour chacune des fractions massiques.

a) Compression de la chaîne

De même que nous avons tracé la masse apparente des objets diffusants, nous représentons (fig. 2.20) les rayons de giration obtenus par l'ajustement de Debye en fonction de c_p pour chacune des fractions Φ . L'extrapolation des résultats à concentration nulle nous donne le rayon de giration d'une seule chaîne.

Sur la figure 2.21, nous avons représenté les rayons de giration obtenus par extrapolation à concentration en PEG nulle pour chacune des fractions massiques étudiées. Lorsque Φ augmente, le rayon de giration de la chaîne diminue. Pour la fraction massique en Ficoll la plus

élevée ($\Phi = 0.34$), on a une diminution du rayon de giration de la chaîne de plus de 50%. Ce qui correspond à une diminution du volume occupé par la chaîne proche d'un facteur 8!

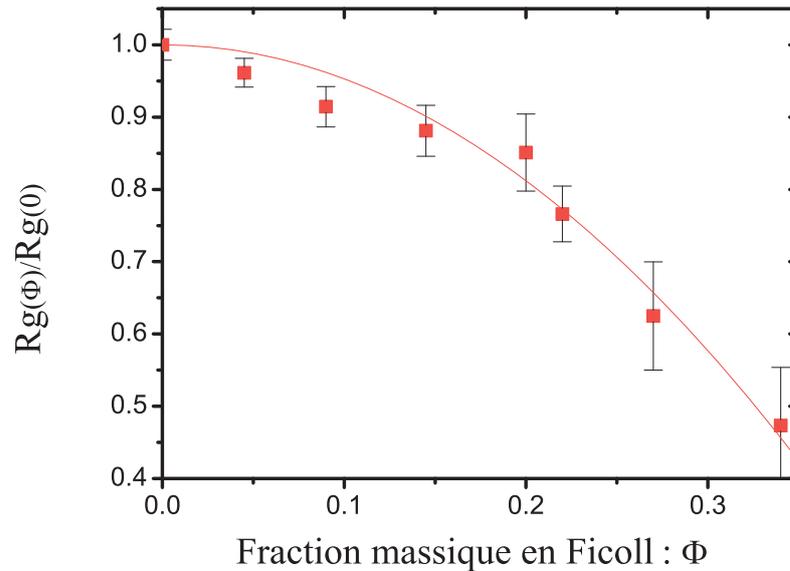


FIGURE 2.21 – Observation de la diminution du rayon de giration d'une chaîne gaussienne lorsque la fraction en agent d'encombrement augmente. $R_g(\Phi)$ est normalisé par le rayon de giration dans l'eau ($R_g(\phi = 0)$).

b) Modification des interactions effectives

i) Etude du second coefficient du viriel

La dépendance de la masse apparente du PEG en fonction de la concentration est linéaire pour chaque fraction massique en Ficoll Φ . La pente de chacune des droites, proportionnelle aux interactions, dépend fortement de la fraction massique Φ . Quand $\Phi \rightarrow 0$, a_2 est positif. Ce qui reflète des interactions PEG-PEG répulsives, caractéristiques des polymères en bon solvant. En augmentant la fraction en agent d'encombrement, le second coefficient du viriel (fig. 2.22) passe de positif à négatif pour une fraction $\Phi \approx 0.07$, les interactions effectives entre les chaînes, de répulsives à attractives à forte fraction massique en Ficoll et, pour des fractions Φ plus importantes, les chaînes ont tendance à s'agréger quand leur concentration augmente (figure 2.23). Le mélange devient turbide pour une fraction Φ élevée.

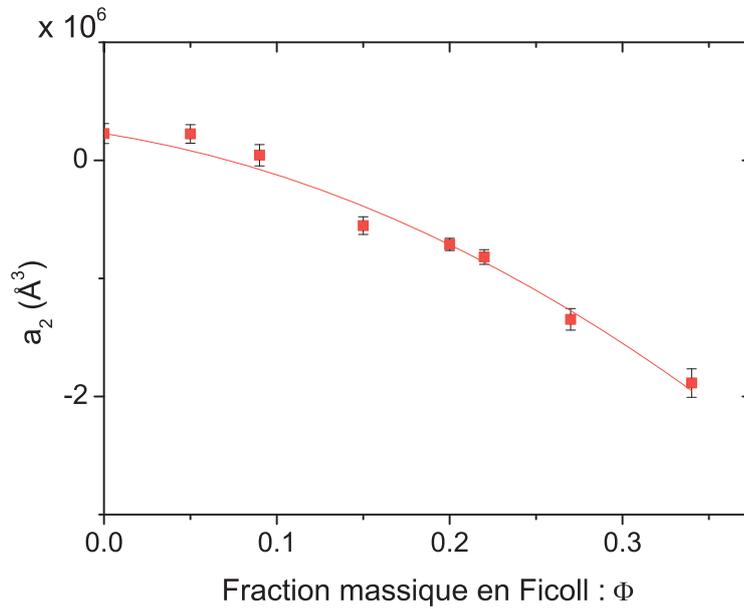


FIGURE 2.22 – Représentation du second coefficient du viriel en fonction de la fraction massique en Ficoll. Il passe de positif à négatif, soit les interactions entre chaînes de PEG passent de répulsives à attractives quand la fraction massique en Ficoll augmente.

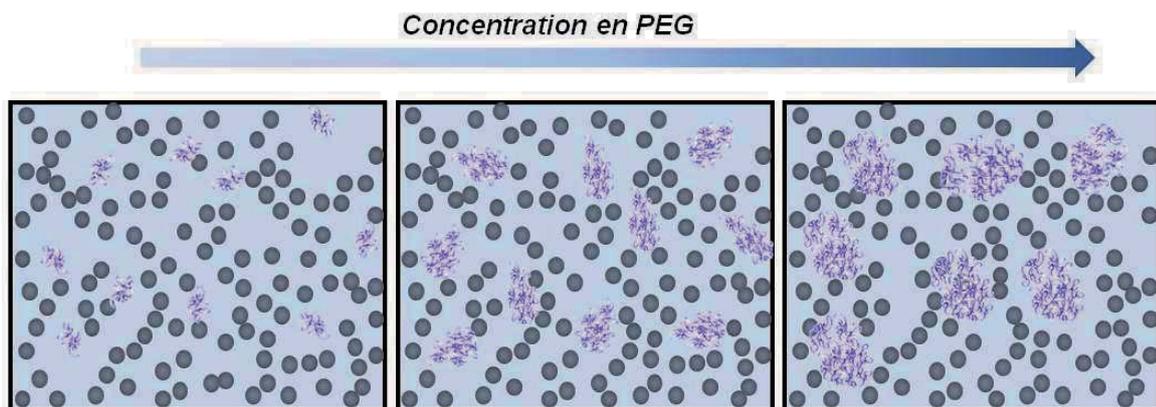


FIGURE 2.23 – Représentation schématique d'une solution de PEG (chaînes violettes) et de Ficoll (sphères grises) pour une fraction massique en agent d'encombrement fixe ($\Phi \approx 0.25$) et de son évolution lorsque la concentration en PEG, c_p augmente. Il existe des interactions effectives chaîne-chaîne attractives. A partir d'une certaine concentration en PEG les échantillons deviennent turbides.

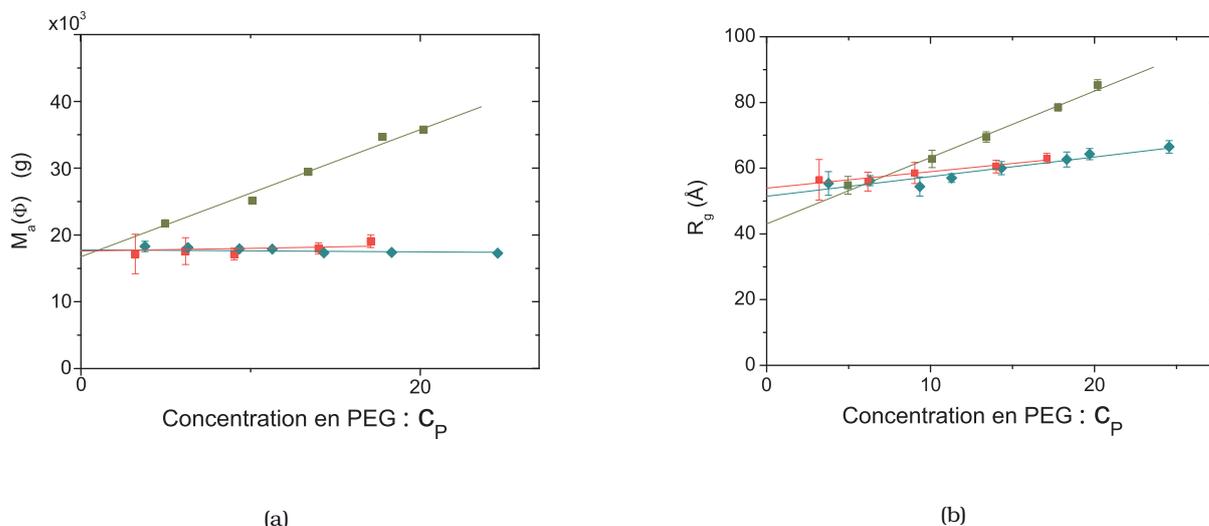


FIGURE 2.24 - (a) Masse apparente des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG pour différentes séries d'échantillons : \blacksquare : $\Phi = 0.22$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$; \blacksquare : $\Phi = 0.090$, obtenue par redilution d'une solution initiale telle que $\Phi = 0.22$. b) : Rayon de giration, R_g des objets diffusants en fonction de la concentration en chaînes, c_p pour différentes fractions massiques en Ficoll.

ii) Un système réversible

Est ce que la conformation des objets diffusants dépend des conditions de mélange du PEG et du Ficoll ou dépend-elle uniquement de la fraction Φ ? Cette "agrégation" est-elle réversible?

Dans un premier temps, on peut simplement observer que les échantillons qui étaient turbides (à fraction massique Φ élevée pour une concentration en PEG de l'ordre de 30 g.l^{-1}) semblent redevenir limpides quand ils sont redilués. Mais cette simple observation ne nous permet pas de connaître avec précision le système obtenu par redilution. Les solutions de "PEG-Ficoll" initialement préparées à $\Phi = 0.22$ ont été diluées de manière à obtenir des solutions à $\Phi = 0.09$. Ces solutions ont été mesurées par DNPA et les intensités diffusées ont été ajustées à partir de l'expression 2.13. La masse apparente et le rayon de giration obtenus à partir de l'ajustement sont représentés sur la figure 2.24. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus pour des solutions de PEG-Ficoll telles que $\Phi = 0.090$ dès la préparation des échantillons. On remarque qu'après redilution les masses apparentes et rayons de giration sont identiques (aux erreurs près) à ceux des solutions telles qu'initialement, $\Phi = 0.09$. L'agrégation observée est donc réversible.

Pour une chaîne dont le rayon de giration dans l'eau est proche de celui de l'agent d'encombrement, on observe bien une compaction de la chaîne de PEG ainsi qu'une forte modification des interactions effectives entre chaînes. Cette compaction est du même ordre de grandeur que la compaction prédite grâce au modèle du nuage gaussien [27]. En effet, nous pouvons comparer nos résultats avec les résultats d'une des simulations concernant une protéine dont le rayon de giration à l'état dénaturé était de 50 Å, l' α TS. Pour une fraction Φ de 0.3, son rayon de giration était de 30 Å quand celui-ci était obtenu à partir d'un modèle de la protéine à l'état dénaturé de type nuage gaussien et d'une simulation Monte-Carlo, et de 28 Å quand il était obtenu toujours par le modèle du nuage gaussien mais cette-fois ci à l'aide d'un calcul semi-empirique de la distribution des états dénaturés en utilisant une distribution Lhuillier [32]. La diminution du rayon de giration observée dans notre cas est bien proche de 40% pour $\Phi = 0.3$.

Cependant, pour de plus faibles fractions Φ , la diminution du rayon de giration obtenue d'après le calcul semi-empirique de Minton [32], est plus importante que celle observée.

2.2.3 Rapport d'échelle entre les tailles de la chaîne et de l'agent d'encombrement

L'étude de ce système pour une masse molaire de PEG fixée, nous permet de bien observer la compression d'une chaîne due à l'encombrement. En gardant le même agent d'encombrement, nous allons modifier la taille de la chaîne de PEG. Cela nous permettra d'obtenir des informations à la fois sur l'influence du rapport de la taille des objets sur le volume exclu, et, sur la conformation de la chaîne elle-même.

Comme rappelé en introduction, l'effet du volume exclu dépend des tailles respectives de la particule d'encombrement et de la particule test. Quand l'objet que l'on introduit est très petit par rapport à l'agent d'encombrement, le volume exclu correspond au volume de l'encombrement. Plus l'objet introduit est grand, plus le volume exclu est important par rapport au volume de l'encombrement. Quand on augmente la taille de la chaîne de PEG, à fraction en Ficoll constante, le volume exclu augmente. Est ce que la compression d'une chaîne de plus grande taille est modifiée différemment? Va t-elle être plus affectée par le volume exclu?

Plus précisément, l'effet du volume exclu dépend du rapport de taille entre la chaîne introduite et l'agent d'encombrement. Nous noterons $a_{v,e}$ le rapport des rayons de giration, $R_{g,e}$, de l'agent d'encombrement et de celui R_g du PEG.

$$a_{v,e} = \frac{R_{g,e}}{R_g} \tag{2.16}$$

[27] Minton, A. *Biophys. J.* **78**(1), 101 – 109 (2000).

[32] Minton, A. *Biophys. J.* **88**(2), 971 – 985 (2005).

Dans le paragraphe ci-dessus nous avons étudié un système tel que $a_{v,e} \approx 1$. Nous allons désormais modifier ce rapport afin d'en voir l'effet sur la compression de la chaîne. Nous avons étudié deux autres masses molaires de PEG, M_w , 42 800 et 132 000 g.mol^{-1} telles que les rapports $a_{v,e}$ soient respectivement de 0.55 et 0.34.

Pour différentes fractions massiques en Ficoll, nous avons étudié la conformation des chaînes à différentes concentrations. L'intensité diffusée (fig. 2.25) a été affinée par l'expression 2.13. L'accord entre les courbes théoriques et les résultats expérimentaux est raisonnable pour les 3 masses étudiées. Quelle que soit la concentration en PEG, la fraction massique en Ficoll et la masse molaire du polymère, la conformation de la chaîne est du type chaîne gaussienne. A partir des paramètres obtenus par ces ajustements nous pouvons, pour chacune de ces deux masses, tracer les dépendances en concentration c_p (fig. 2.26 et 2.27).

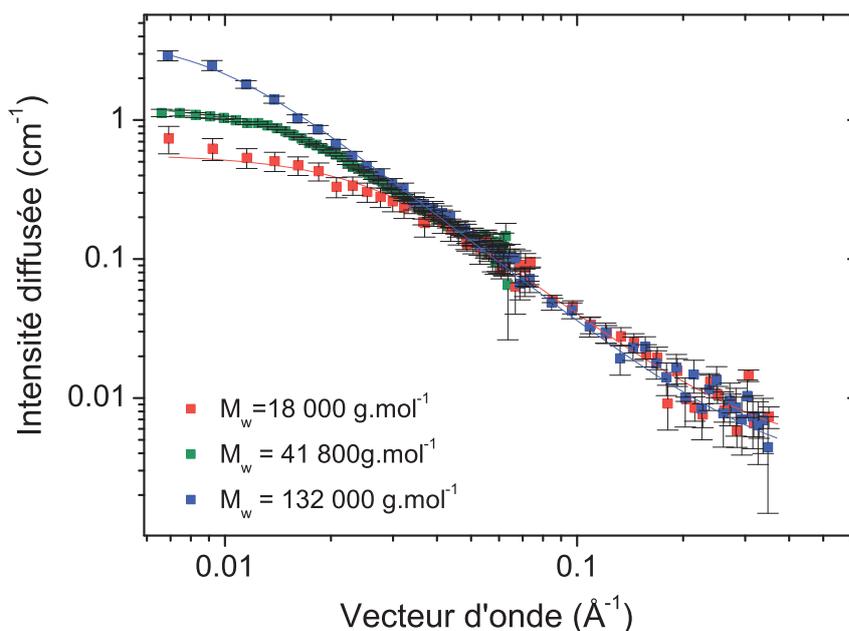


FIGURE 2.25 – Observation de l'intensité diffusée pour une fraction massique en Ficoll $\Phi \approx 0.090$ pour les trois différentes masses de PEG étudiées. ■ : $M_w=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=42\ 800\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=132\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$.

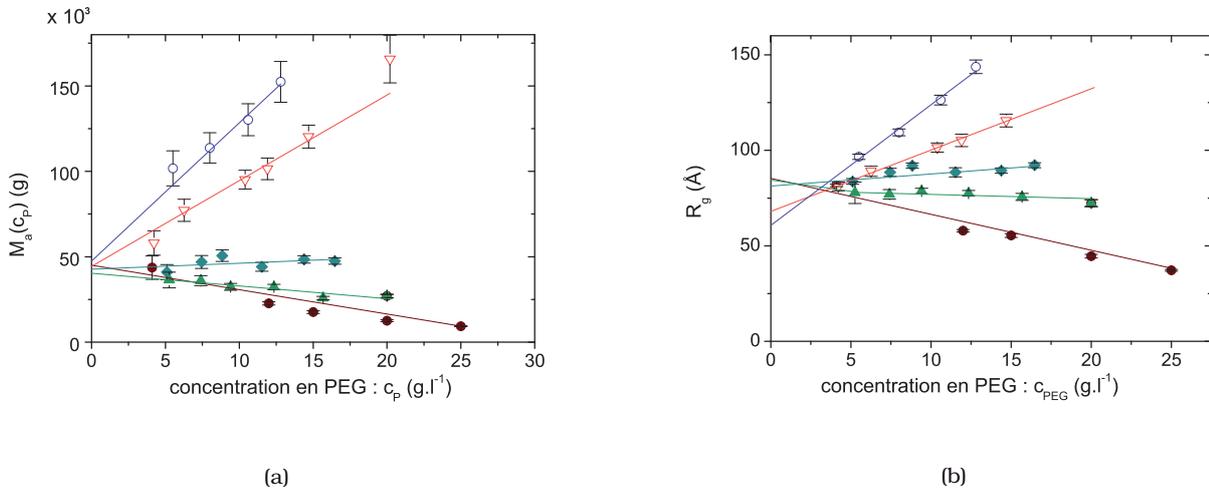


FIGURE 2.26 – Masse apparente $M_A(c_p)$ (a) et rayon de giration, $R_g(c_p)$ (b) des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG, c_p pour différentes fractions massiques en Ficoll pour un PEG de masse $M_w = 42\,800\text{ g.mol}^{-1}$. \bullet : $\Phi = 0$; \blacktriangle : $\Phi = 0.045$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$; \blacktriangledown : $\Phi = 0.150$; \circ : $\Phi = 0.180$. Les droites sont obtenues par ajustement avec une fonction linéaire pour chacune des fractions massiques.

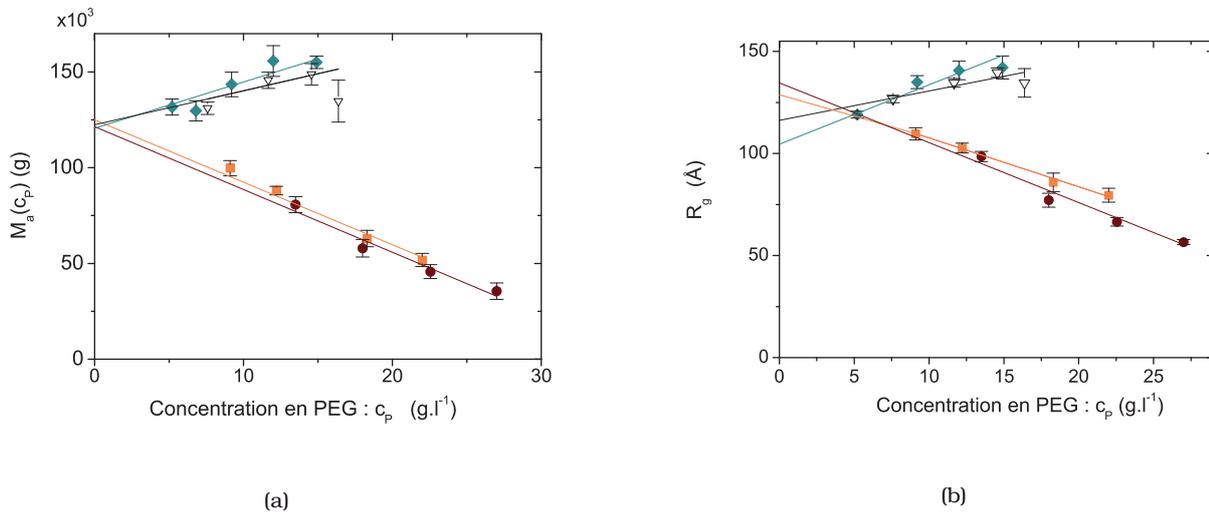


FIGURE 2.27 – Masse apparente $M_A(c_p)$ (a) et rayon de giration, $R_g(c_p)$ (b) des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG, c_p pour différentes fractions massiques en Ficoll pour un PEG de masse $M_w = 132\,000\text{ g.mol}^{-1}$. \bullet : $\Phi = 0$; \blacksquare : $\Phi = 0.030$; \blacktriangledown : $\Phi = 0.070$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$. Les droites sont obtenues par ajustement avec une fonction linéaire pour chacune des fractions massiques.

Comme nous l'avions fait pour le PEG de masse $M_w=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$, nous pouvons extrapoler à $c_p \rightarrow 0$ la masse d'une seule chaîne de PEG. Nous obtenons respectivement, sur les figures 2.26(a) et 2.27(a), les masses $M_w=42\ 000$ et $M_w=125\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ quelles que soient les fractions en agent d'encombrement qui correspondent bien aux masses données par le fournisseur Polymeresource.

Pour chacune des masses de PEG, la fraction en agent d'encombrement la plus élevée, Φ_m , pour laquelle nous avons étudié le système "PEG-Ficoll" est différente. Plus la masse molaire de la chaîne étudiée est élevée, plus cette fraction Φ_m est faible. Au delà de Φ_m le système devient turbide pour une très faible concentration c_p et l'étude par DNPA est impossible.

Quelle que soit la masse de la chaîne étudiée, les interactions effectives chaîne-chaîne passent de répulsives pour le PEG dans l'eau, ou pour de faibles fractions massiques en agent d'encombrement, à attractives quand Φ augmente (fig. 2.28). Pour le PEG en solution diluée dans l'eau, le second coefficient du viriel $a_2(M_a, 0)$ dépend fortement de la masse de PEG utilisée. Dans le cas de la solution idéale, le second coefficient du viriel correspond environ au volume occupé par la chaîne. Un tel comportement du coefficient second viriel en physique des polymères est généralement observé lors d'un changement de la qualité du solvant (dû par exemple à la température) et induit soit l'effondrement de la chaîne sur elle même, soit son agrégation. Dans notre cas, nous nous sommes assurés que le Ficoll ne modifiait pas la qualité du solvant et que le passage d'interactions répulsives à attractives ne peut être attribué à un tel effet.

Lorsque la fraction Φ est importante, l'intensité des interactions répulsives entre chaînes augmente fortement avec la masse du PEG étudié. Cela correspond à une augmentation du phénomène d'agrégation quand la taille de la chaîne augmente, ce qu'explique que le domaine de stabilité du mélange ternaire "eau-PEG-Ficoll" diminue fortement quand la masse du PEG étudié augmente.

Dans notre système, le second coefficient du viriel ne caractérise pas uniquement les interactions directes chaîne-chaîne. Il dépend également de l'agent d'encombrement et des interactions chaîne-Ficoll et Ficoll-Ficoll. Son interprétation est donc complexe. On peut le décomposer en :

$$a_2(\Phi) = a_{2,pp} + a_{2,pe}c_p\Phi + \dots \quad (2.17)$$

où $a_{2,pp}$ caractérise les interactions directes chaîne-chaîne et $a_{2,pe}$ celles PEG-Ficoll. Quand Φ augmente, les interactions PEG - Ficoll ne peuvent plus être négligées.

La fraction massique en Ficoll pour laquelle le second coefficient du viriel s'annule ($a_2(\Phi)=0$) semble être indépendante de la masse de PEG et est proche de $\Phi \approx 0.06 - 0.07$. Cependant, la quantité de données ainsi que les incertitudes sur les mesures ne nous permettent pas de conclure sur ce point.

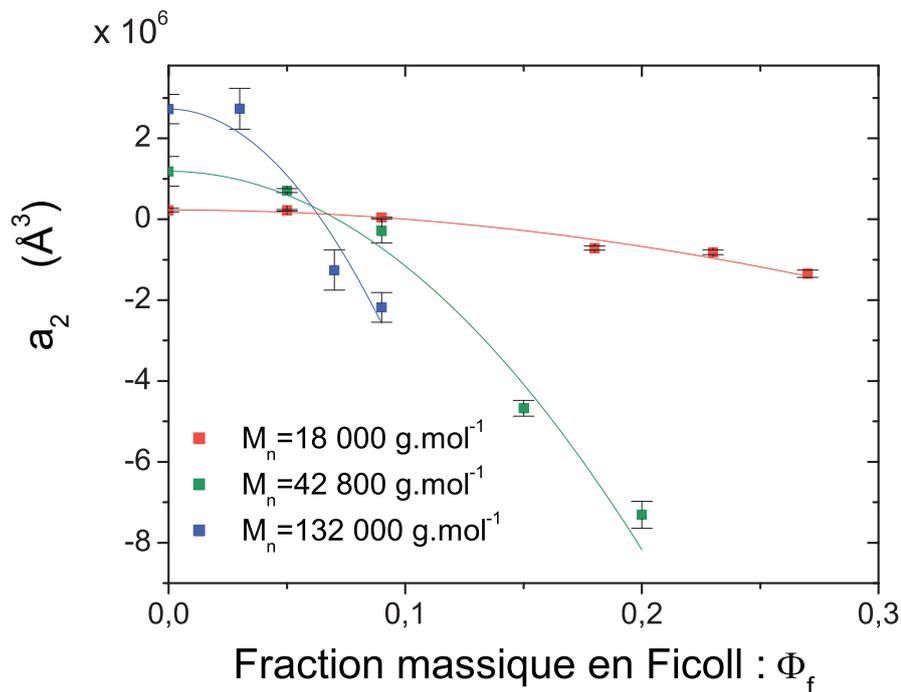


FIGURE 2.28 – Evolution du second coefficient du viriel, $a_2(\Phi)$ en fonction de la fraction en agent d'encombrement. ■ : $M_w=18\,000$ g.mol $^{-1}$; ■ : $M_w=42\,800$ g.mol $^{-1}$; ■ : $M_w=132\,000$ g.mol $^{-1}$.

L'extrapolation des rayons de giration à $c_p \rightarrow 0$ des chaînes de masses 42 800 g.mol $^{-1}$ (fig. 2.26(b)) et 132 000 g.mol $^{-1}$ (fig. 2.27(b)), nous permet d'obtenir l'évolution du rayon de giration d'une seule chaîne de PEG quand Φ augmente. Quel que soit le rapport de taille entre la chaîne et le Ficoll, la valeur du rayon de giration normalisé du PEG, $Rg(\phi)/Rg(0)$, diminue quand la fraction massique en agent d'encombrement augmente. Une chaîne de plus grande masse molaire est, à fraction volumique constante, plus affectée par l'agent d'encombrement qu'une masse plus faible. Pour que le rayon de giration du PEG ait diminué d'environ 20 % (fig. 2.29), il faut une fraction Φ de l'ordre de 0.10, pour le PEG de masse 132 000 g.mol $^{-1}$, 0.15 pour 42 800 g.mol $^{-1}$ alors que $\Phi = 0.20$ était nécessaire pour 18 000 g.mol $^{-1}$.

L'intensité diffusée à faible concentration en PEG peut toujours être affinée par un facteur de forme du type Debye, ce qui montre que la chaîne de PEG adopte une conformation de chaîne aléatoire. On observe cependant, pour chacune des masses étudiées, une compression de la chaîne lorsque la fraction massique en agent d'encombrement augmente. Peut-on interpréter ces résultats en termes de changement de conformation de la chaîne de PEG ?

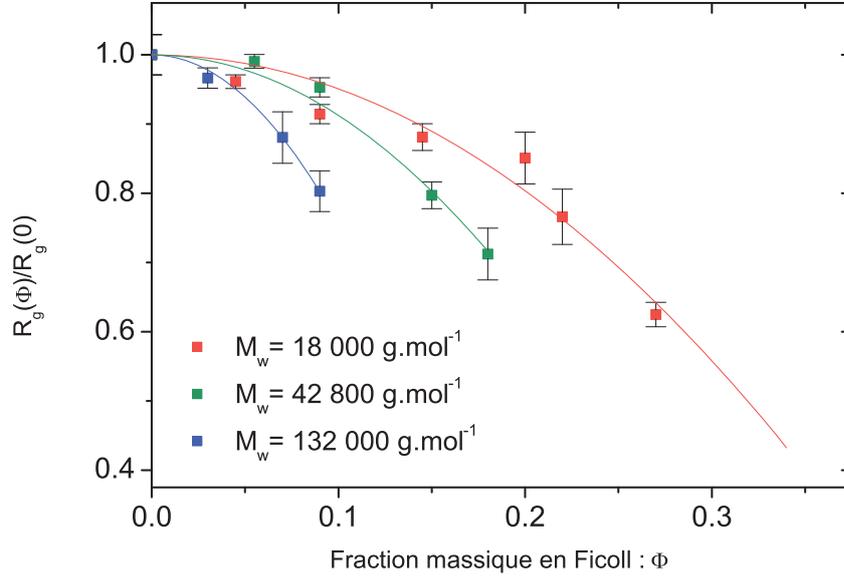


FIGURE 2.29 – Observation de la diminution du rayon de giration pour chacune des chaînes de PEG quand on augmente la fraction en agent d'encombrement. $R_g(\Phi)$ est normalisé par le rayon de giration du PEG dans l'eau. ■ : $M_w=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=42\ 800\ \text{g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w=132\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$.

Le rayon de giration d'un polymère est fonction de sa masse, M :

$$R_g(M) \propto M^\nu \quad (2.18)$$

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, $\nu=1/2$ pour une chaîne gaussienne et $\nu=1/3$ pour un objet compact (une sphère par exemple).

Le rapport des rayons de giration à chaque Φ nous permet d'obtenir ce coefficient ν :

$$\nu = \frac{\ln\left(\frac{R_g(M_1)}{R_g(M_2)}\right)}{\ln\left(\frac{M_1}{M_2}\right)} \quad (2.19)$$

Pour le calcul de ν nous avons de prendre $M_2=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$. Etant donné que les fractions massiques en Ficoll pour lesquelles nous avons étudié les différentes masses de PEGs sont différentes, nous avons utilisé les valeurs des rayons de giration obtenue de l'ajustement de la courbe fig. 2.21. Nous avons ensuite obtenu le coefficient ν en utilisant les valeurs des rayons de giration des PEG de masses $M_w=132\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ (en bleu) et $M_w=42\ 800\ \text{g.mol}^{-1}$ (en vert). On passe d'un comportement du rayon de giration en $M^{1/2}$ pour de faibles valeurs de Φ , caractéristique des chaînes gaussiennes à un comportement en $M^{1/3}$ pour Φ plus élevé, caractéristique

des objets compacts. Pour des fractions massiques en Ficoll importantes, le comportement du type "objet compact" semble en contradiction avec le facteur de forme du PEG observé. A grand vecteur d'onde, le facteur de forme décroît en Q^{-2} (fig. 2.25) et n'est pas celui d'un objet compact avec une interface nette avec le solvant (qui donnerait une décroissance en Q^{-4}).

Si les chaînes adoptaient une conformation parfaitement compacte, leurs rayons de giration seraient respectivement de 14.1 Å, 18.8 Å et 27.5 Å pour les PEG de masses $M_w = 18\ 000$, 42 800 et 132 000 g.mol⁻¹. Or les valeurs de R_g les plus petites mesurées sont respectivement de 26.6 Å, 60,7 Å et de 109 Å.

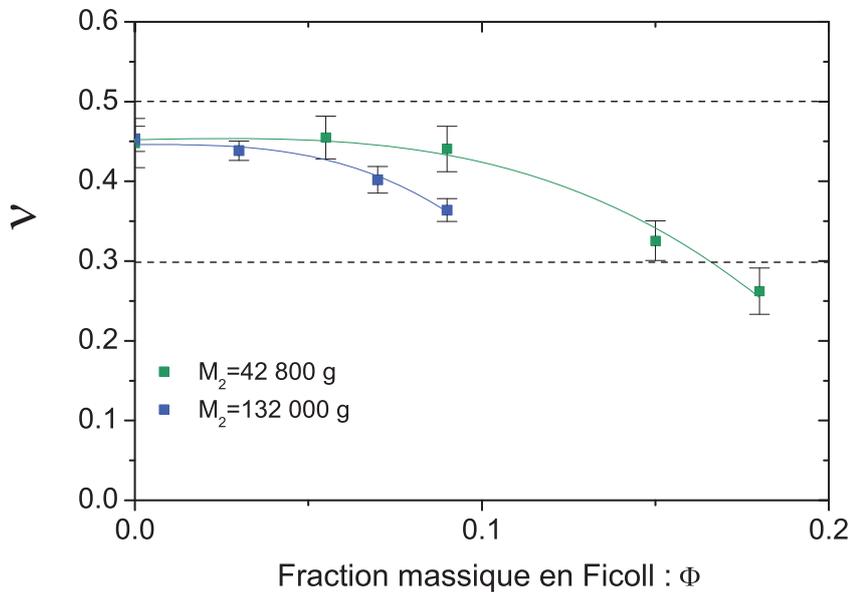


FIGURE 2.30 – Représentation du coefficient ν obtenu à partir du rapport des rayons de giration des PEG de masses $M_w=132\ 000$ g.mol⁻¹ (en bleu) et $M_w=42\ 800$ g.mol⁻¹ (en vert) par celui de masse $M_w=18\ 000$ g.mol⁻¹. Les droites horizontales correspondent à $\nu=1/2$ et $\nu=1/3$. On passe d'un comportement du type "chaîne gaussienne" à un comportement d'objet compact.

Quelle conformation qui soit à la fois compatible avec une compaction proportionnelle à $M^{1/3}$ et un facteur de structure variant en Q^{-2} à grands vecteurs d'onde adopte la chaîne ?

Jusqu'à une certaine fraction massique Φ en Ficoll, la chaîne peut être considérée comme une chaîne aléatoire, sa conformation se rapproche de la conformation représentée sur la figure

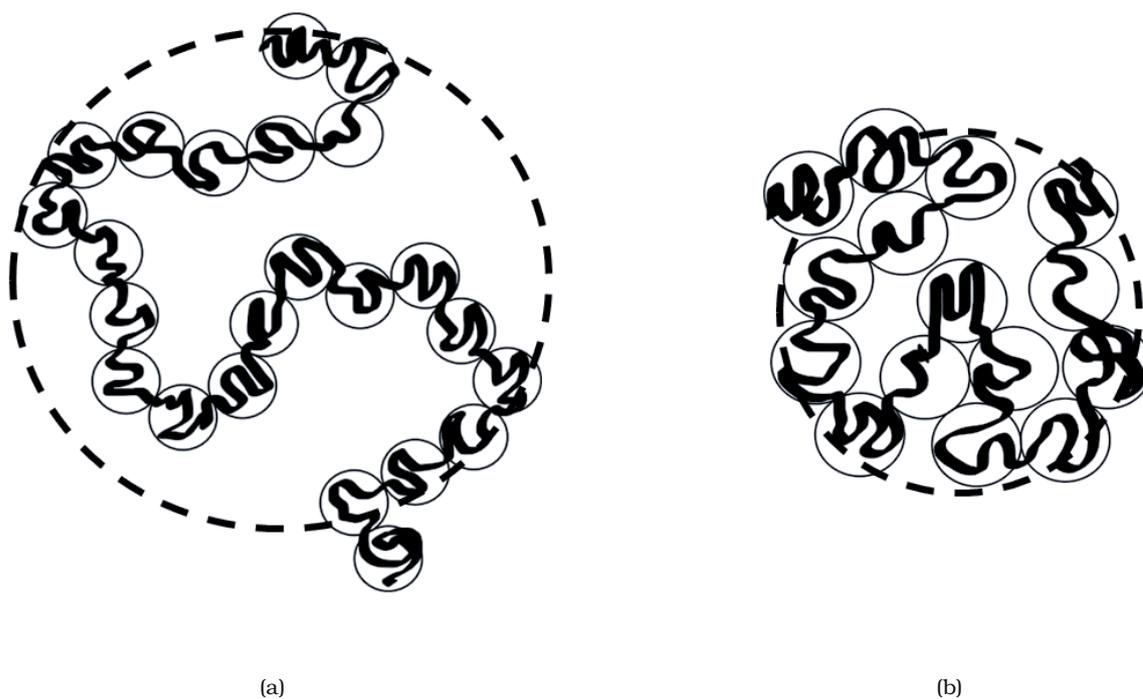


FIGURE 2.31 – (a) : Conformation de type "gaussien" d'une chaîne de polymère.
(b) : Schéma de la conformation d'une chaîne constituée de la somme compacte d'objets gaussiens. Les deux conformations donnent des spectres de diffusion proportionnels à Q^{-2} aux grands vecteurs d'onde.

2.31(a). Lorsque la fraction en Ficoll augmente, la conformation de la chaîne de PEG est plus complexe et peut être vue comme la somme compacte d'objets gaussiens (fig 2.31(b)). Il y a une compression de la chaîne à longue distance, ou, une compression d'objets non-compacts. La représentation de cette conformation se rapproche de la vision d'une chaîne compacte de blob thermique. Cependant, les objets non compacts qui constituent la chaîne ne sont probablement pas des blobs proprement dits car ils n'ont à priori ni la même nature ni la même taille.

Comme nous l'avons dit précédemment, la compaction de la chaîne de PEG observée en présence d'un agent d'encombrement n'est pas due à une modification de la qualité du solvant et, elle est donc d'un point de vue physique, différente de l'effondrement de la chaîne sur elle même (communément appelée collapse en anglais).

2.2.4 Modification de l'agent d'encombrement, utilisation du Dextran

Ce paragraphe est consacré à l'étude de la compression avec un autre agent d'encombrement : le Dextran 70. C'est un polysaccharide de même masse que le Ficoll 70. Il est un objet moins compact et moins sphérique que le Ficoll et son rayon de giration est plus grand.

Le Dextran est fréquemment utilisé comme agent d'encombrement et son effet est souvent comparé, malgré leurs différences de forme, à l'effet induit par l'encombrement dû au Ficoll. Par exemple, des mesures de dichroïsme circulaire sur la Flavodoxine à pH 7 ont été menées en présence de 40% massique de Ficoll et de Dextran de même masse ([37]). La température de dénaturation mesurée pour la Flavodoxine par ajout de Ficoll est décalée de 15°C par rapport à la protéine dans son tampon et de 20°C pour le Dextran. Ce décalage n'est pas un cas spécifique de la Flavodoxine, et de nombreuses études [38][25] [39] tendent à montrer que, pour une fraction massique équivalente, l'effet induit par le Dextran est plus important que celui induit par le Ficoll.

Nous avons donc cherché à déterminer l'effet du Dextran sur la conformation d'un PEG de masse $M_w = 42\,800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ comme chaîne gaussienne. Pour trois fractions massiques en Dextran différentes ($\Phi = \Phi_d = 0; 0.090; 0.150$), nous étudions la conformation de la chaîne de PEG pour six concentrations différentes. L'intensité diffusée est affinée comme précédemment et les rayons de giration obtenus pour chaque concentration en PEG, et chaque fraction massique en Dextran, sont représentés en fonction de c_p sur la figure 2.32. En extrapolant nos résultats quand $c_p \rightarrow 0$, on observe que, quand la fraction massique en Dextran augmente, le rayon de giration du PEG diminue.

[37] Perham, M., Stagg, L., and Wittung-Stafshede, P. *FEBS Letters* **581**(26), 5065 – 5069 (2007).

[38] van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C., and all. *EMBO J.* **19**, 3870–3875 (2000).

[25] Hall, D. and Minton, A. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. and Proteomics* **1649**(2), 127 – 139 (2003).

[39] Huawei, J., Hea, J., and Li, S. *Tsinghua Sci. and Tech.* **13**, 454–457 (2008).

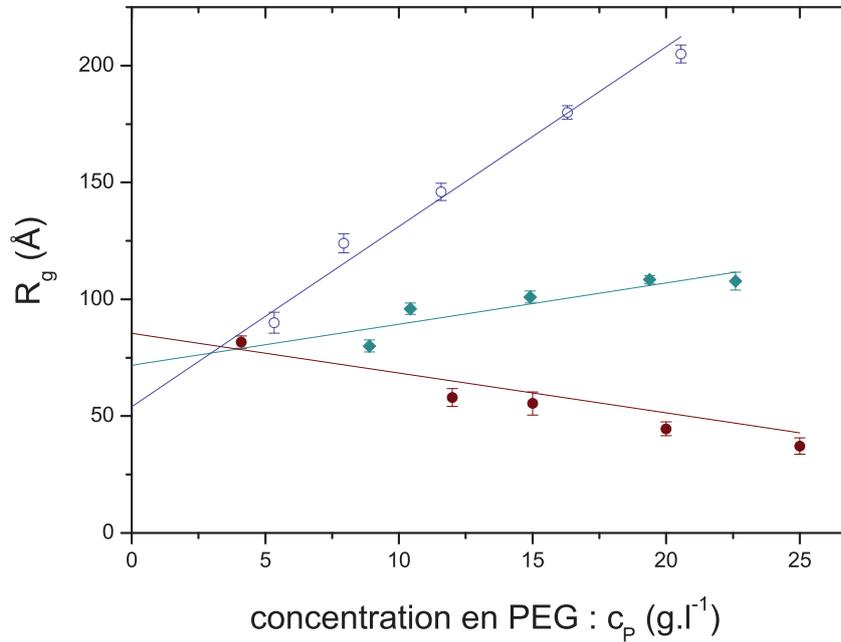


FIGURE 2.32 – Rayon de giration, R_g des objets diffusants en fonction de la concentration en PEG, c_p pour différentes fractions massiques en Dextran. \bullet : $\Phi = 0$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$; \circ : $\Phi = 0.150$. Les droites sont obtenues par ajustement avec une fonction linéaire pour chacune des fractions massiques en Dextran.

Le Dextran et le Ficoll utilisés sont deux polysaccharides ramifiés de même masse, $70\,000\text{ g.mol}^{-1}$. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, le Ficoll est plus compact que le Dextran. A fraction massique en agent d'encombrement Φ constante (fig. 2.33), la compression est plus importante lorsqu'on ajoute du Dextran que lorsqu'on ajoute du Ficoll. En effet, pour une fraction $\Phi \approx 0.150$, le rayon de giration de la chaîne diminue d'environ 20% lorsqu'on ajoute du Ficoll et de presque 40% lorsqu'on a ajouté du Dextran.

Comme nous l'avons vu, en modifiant la taille de la chaîne de PEG, l'encombrement dépend fortement du rapport des rayons de giration, $a_{v,e}$. Le Ficoll et le Dextran ont la même masse mais le rayon de giration du Dextran ($R_{g,D} = 53.7\text{ Å}$) est plus grand que celui du Ficoll ($R_{g,F} = 46\text{ Å}$). A fraction massique en agent d'encombrement constante, le volume exclu induit par le Dextran est plus important que pour le Ficoll et la chaîne va être plus compacte.

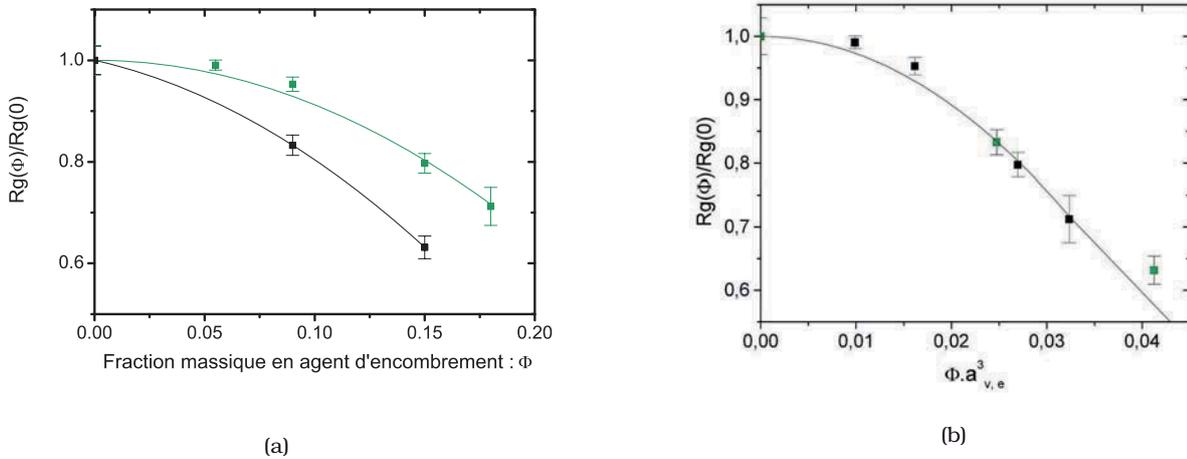


FIGURE 2.33 – (a) Evolution des rayons de giration renormalisés d’une chaîne de PEG de masse $42\,800\text{ g.mol}^{-1}$ en fonction de la fraction Φ d’agent d’encombrement pour deux types d’agents d’encombrement : ■ : Ficoll ; ■ : Dextran. (b) Evolution des rayons de giration renormalisés d’une chaîne de PEG de masse $41\,000\text{ g.mol}^{-1}$ en fonction d’une grandeur tenant compte de la différence de volume entre le Ficoll et le Dextran : $\Phi \cdot R_{g,e}^3 / R_g^3$.

Le rayon de giration de la chaîne a été tracé en fonction de $\Phi \cdot a_{v,e}^3$ (fig. 2.33(b)). Cette représentation permet de renormaliser le volume exclu. Les diminutions de la valeur du rayon de giration de la chaîne observées pour le Ficoll et le Dextran semblent se renormaliser. La courbe ne représente pas un ajustement des données mais, uniquement, un guide afin de visualiser cette diminution.

Pour l’étude du volume exclu, le coefficient pertinent semble bien être le rapport des rayons de giration entre chaîne et agent d’encombrement, $a_{v,e}$. Cependant, il nous faut prendre ces résultats avec précaution car nous avons effectué des mesures sur uniquement deux fractions massiques différentes en Dextran.

2.2.5 Analyse par la théorie de Flory

Les mesures effectuées nous montrent une nette compression de la chaîne gaussienne due à l’encombrement. Nous avons essayé de quantifier les effets dus au volume exclu grâce à la théorie de Flory.

a) Chaîne idéale

L'énergie libre, F , d'une chaîne idéale comportant N monomères et de longueur de Kuhn b (la longueur de Kuhn est telle que $b = 2l_p$ où l_p est la longueur de persistance du polymère) est définie par les théories de Flory comme :

$$F = k_B T \left(\frac{R^2}{Nb^2} + \frac{Nb^2}{R^2} \right) \quad (2.20)$$

A l'équilibre, on a :

$$\frac{\partial F}{\partial R} = 0 \quad (2.21)$$

d'où

$$\frac{2R}{Nb^2} - \frac{2Nb^2}{R^3} = 0 \quad (2.22)$$

b) Chaîne réelle

Pour une chaîne réelle, l'énergie libre doit être modifiée, un terme d'interaction doit être ajouté.

$$F = k_B T \left(\frac{R^2}{Nb^2} + \nu \frac{N^2}{R^3} + \frac{Nb^2}{R^2} \right) \quad (2.23)$$

Dans le cas des solutions encombrées, un terme dû à la pression osmotique induite par l'encombrement doit également être ajouté. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la pression osmotique d'une solution de Ficoll concentrée n'est pas négligeable ($\Pi \approx 3 \cdot 10^5$ Pa pour $\Phi \approx 0.3$). Tous les paramètres dépendent de la fraction Φ en agent d'encombrement présent en solution.

$$F(\Phi) = k_B T \left(\frac{R(\Phi)^2}{Nb^2} + \nu \frac{N^2}{R(\Phi)^3} + \frac{Nb^2}{R(\Phi)^2} \right) + \Pi(\Phi)v \quad (2.24)$$

où $\Pi(\Phi)$ est la pression osmotique qui dépend de la fraction en agent d'encombrement.

Lorsque la chaîne n'est pas soumise à une pression osmotique, pour $\Phi = 0$, on a :

$$F = k_B T \left(\frac{R^2}{Nb^2} + \nu \frac{N^2}{R^3} + \frac{Nb^2}{R^2} \right) \quad (2.25)$$

Comme dans le cas de la chaîne idéale, à l'équilibre, on a :

$$\frac{\partial F}{\partial R} = 0 \quad (2.26a)$$

d'où

$$\frac{2R}{Nb^2} - \frac{2Nb^2}{R^3} - \frac{3N^2\nu}{R^4} = 0 \quad (2.26b)$$

ce qui nous donne

$$\nu = \frac{1}{3N^2} \left(\frac{2R^5 - 2(Nb^2)^2 R}{Nb^2} \right) \quad (2.27)$$

On suppose que dans notre cas $R^2 = 6R_g^2$ car le PEG dans l'eau peut être considéré comme un polymère en bon solvant.

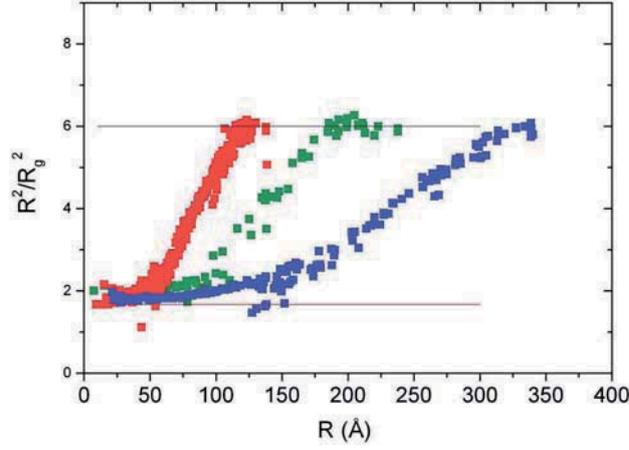


FIGURE 2.34 – Evolution du rapport R^2 / R_g^2 en fonction du rayon de Flory R pour les différentes masses de PEG utilisées : ■ : $M_w = 18\,000\text{ g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w = 42\,800\text{ g.mol}^{-1}$; ■ : $M_w = 132\,000\text{ g.mol}^{-1}$. Ce rapport varie, quelle que soit la masse de PEG entre 6 pour une chaîne idéale (qui correspond dans notre simulation à une chaîne dont le rayon de giration n'est pas contraint par le rayon de Flory) à $5/3$ pour la chaîne totalement compact.

La valeur de ν obtenue est supposée constante quelle que soit la fraction Φ .

Pour une fraction Φ , la pression osmotique $\Pi(\Phi)$ exercée sur la chaîne de Flory, R est tel que $\frac{\partial F}{\partial R} = 0$, ce qui nous donne :

$$\Pi(\Phi) = \frac{k_B T}{v} \left(\frac{R(\Phi)^2}{N b^2} + \nu \frac{N^2}{R(\Phi)^3} + \frac{N b^2}{R(\Phi)^2} \right) \quad (2.28a)$$

$$\Pi(\Phi) = \frac{k_B T}{4/3\pi R(\Phi)^3} \left(\frac{R(\Phi)^2}{N b^2} + \nu \frac{N^2}{R(\Phi)^3} + \frac{N b^2}{R(\Phi)^2} \right) \quad (2.28b)$$

Nous obtenons expérimentalement le rayon de giration R_g et non le rayon de Flory de la chaîne. Dans un premier temps, nous pouvons utiliser la relation qui existe entre R_g et R pour une chaîne gaussienne : $R^2 = 6.R_g^2$.

Nous avons également effectué une simulation très simple afin de déterminer pour chaque masse de PEG utilisée le rapport entre rayon de giration et rayon de Flory. Nous avons, pour chacune des masses de PEG, imposé des valeurs discrètes du rayon de Flory et déterminé par itération le rayon de giration de la chaîne de marche aléatoire (nous n'avons pas tenu compte du volume exclu). Les résultats de cette simulation sont représentés sur la figure 2.34.

La pression osmotique $\Pi(\Phi)$ obtenue à partir de l'expression 2.28b et de la simulation représentée en 2.34 est comparée à la pression osmotique due au Ficoll mesurée dans le chapitre 2.

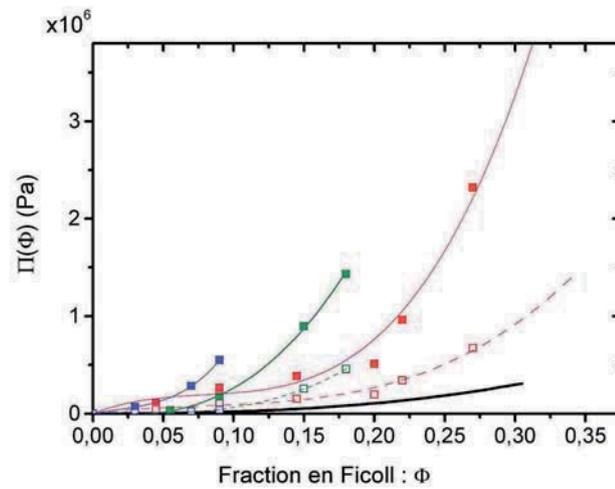


FIGURE 2.35 – Pression osmotique de la solution en fonction de la fraction Φ en Ficoll mesurée (en noire) et calculée à partir des rayons de giration mesurés pour les différentes masses moléculaires en PEG. Le rayon de Flory est déterminé comme $R_F^2 = 6 R_g^2$: \square : $M_w = 18\,000\text{ g.mol}^{-1}$; \square : $M_w = 42\,800\text{ g.mol}^{-1}$; \square : $M_w = 132\,000\text{ g.mol}^{-1}$. Le rayon de Flory est déterminé à l'aide des résultats de la figure 2.34 : \blacksquare : $M_w = 18\,000\text{ g.mol}^{-1}$; \blacksquare : $M_w = 42\,800\text{ g.mol}^{-1}$; \blacksquare : $M_w = 132\,000\text{ g.mol}^{-1}$.

D'après ce calcul, il existe un facteur 10 entre la pression osmotique nécessaire calculée et celle de la solution mesurée (fig. 2.35).

La pression osmotique est la pression qui s'exerce sur les parois d'une membrane entre 2 compartiments, elle ne correspond pas à la pression locale exercée sur le polymère à l'intérieur de la solution. Le calcul que nous avons effectué à partir des théories de Flory ne tient donc pas compte de la pression exercée localement sur le polymère. La pression osmotique ne correspondant pas à l'échelle locale, elle est, dans ce cas, surestimée par le calcul. La compression de la chaîne est principalement un phénomène entropique. Comme nous l'indique le titre d'un article récent, "Macromolecular crowding : qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges" [25], il est difficile de quantifier les effets du volume exclu à cause de la complexité du système.

Les calculs théoriques effectués à partir du modèle du nuage gaussien de Minton donnent quant à eux une assez bonne estimation de la compression d'une chaîne gaussienne pour d'assez grandes valeurs de Φ mais ne rendent pas bien compte de son évolution quand la fraction massique augmente.

[25] Hall, D. and Minton, A. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. and Proteomics* **1649**(2), 127 – 139 (2003).

L'encombrement favorise une compaction importante de la chaîne. Pour un rapport des rayons de giration entre chaîne initiale introduite et agent d'encombrement de l'ordre de 1, le rayon de giration d'une chaîne diminue d'environ 50% pour une fraction massique en agent d'encombrement de l'ordre de 30%. La compaction de la chaîne est difficile à quantifier.

Ce système modèle nous a permis de comprendre des mécanismes impliqués dans la stabilité des protéines. Cette étude était essentielle avant de pouvoir observer la conformation d'une protéine deutérée dans un milieu encombré. Elle nous a permis de pouvoir nous rapprocher d'un système biologique en étudiant l'influence de l'encombrement sur une protéine, la myoglobine.

2.3 Influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la Myoglobine

Après avoir étudié la conformation d'un chaîne modèle en milieu encombré, nous étudions celle d'une protéine, la myoglobine. Plusieurs paramètres permettent de déplacer l'équilibre état natif/état dénaturé : la température, la pression, la présence de chaotropes... Nous avons choisi ici d'étudier l'influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la myoglobine.

2.3.1 Influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique d'une protéine

Le modèle simple d'équilibre état natif/état dénaturé des protéines ^[27] expliqué en introduction, a permis d'établir des relations théoriques entre la dénaturation thermique des protéines et l'encombrement ^[33]. La constante d'équilibre de la réaction peut être décrite par la loi de Van't Hoff.

$$\frac{d \ln K_{ND}}{dT^{-1}} = -\frac{-\Delta H_{ND}^{\circ}}{R} \quad (2.29)$$

Un des paramètres caractéristiques de la dénaturation thermique est T_m , fréquemment appelée température de dénaturation. T_m est la température pour laquelle $K_{ND}=1$, ou autrement dit $f_D=f_N=0.5$ (f_D et f_N sont respectivement les fractions en protéines dénaturées et en protéines natives). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'encombrement cytoplasmique déstabilise la protéine à l'état dénaturé. Il va préférentiellement déplacer l'équilibre vers l'état natif.

$$\frac{1}{T_m(\Phi)} - \frac{1}{T_m(0)} = 2.3R \int_{\log K_{ND}(0)}^{\log K_{ND}(\Phi)} \frac{d \log K}{\Delta H^{\circ}(T_m)} \quad (2.30)$$

T_m est une fonction de $K_{ND}(\Phi)$ donc de Φ . La présence de l'encombrement cytoplasmique modifie la température de dénaturation des protéines. Des études expérimentales ont été me-

[27] Minton, A. *Biophys. J.* **78**(1), 101 – 109 (2000).

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

nées [33][37][36] afin d'observer ce décalage en température en fonction de l'encombrement cytoplasmique. Il varie de quelques degrés Celsius pour, par exemple, le lysozyme (T_m augmente de 2°C quand la fraction en Ficoll passe de 0 à 0.3) à plus de 15°C pour la Flavodoxine.

2.3.2 Influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique de la myoglobine

Afin de pouvoir analyser nos résultats à la lumière des modèles théoriques, nous avons cherché à étudier une protéine globulaire dont le repliement pouvait être modélisé par un modèle de transition à deux états [10]. Nous avons choisi la myoglobine. Elle possède plusieurs avantages pour cette étude : outre le fait que son repliement peut être modélisé par un modèle à "deux états", elle ne possède que des hélices α et sa dénaturation peut donc être suivie par Dichroïsme Circulaire (DC) à 222 nm (voir annexes). Le modèle de transition à deux états n'est pas nécessaire à notre étude, il permet cependant d'obtenir par un ajustement simple des informations sur la dénaturation de la protéine.

a) La dénaturation de la myoglobine

Avant d'étudier l'influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la myoglobine, nous avons étudié la dénaturation de la myoglobine dans un environnement dilué. La protéine est placée en tampon phosphate à pH 7, à 10mM. La dénaturation thermique est suivie par la mesure de l'ellipticité molaire de la protéine, $\Delta\theta$, en dichroïsme circulaire à 222nm.

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

[37] Perham, M., Stagg, L., and Wittung-Stafshede, P. *FEBS Letters* **581**(26), 5065 – 5069 (2007).

[36] Stagg, L., Zhang, S., Cheung, M., and Wittung-Stafshede, W. *Proceed. of the Nat. Ac.of Sci.* **104**(48), 18976–18981 (2007).

[10] Privalov, P. *J. Mol Biol.* **86**, 665–684 (1974).

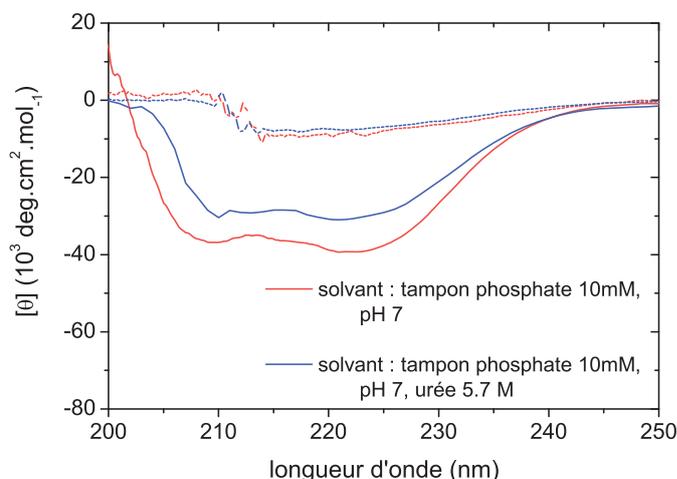


FIGURE 2.36 – Spectre dichroïque de la myoglobine dans un tampon phosphate 10 mM à pH 7, à 20°C (trait plein rouge) et à 90°C (pointillé rouge), ($c_m=80 \mu\text{M.l}^{-1}$); dans un tampon phosphate 10 mM à pH 7 et 5.7M d'urée, à 20°C (trait plein bleu) et à 90°C (pointillé bleu), ($c_m=80 \mu\text{M.l}^{-1}$).

Quand on augmente la température et qu'on observe le spectre dichroïque de la myoglobine à 90°C, la diminution du pouvoir rotatoire de la myoglobine à 222 nm correspond à une perte des hélices α . On estime que la myoglobine est en grande partie dénaturée. La figure 2.36 représente cette perte du signal entre 20 et 90°C.

Nous ajustons les courbes de dénaturation par un modèle de transition à deux états utilisé dans une étude similaire sur le lysozyme [33]. L'observable est $\theta_{obs}(T)$, l'ellipticité molaire mesurée à 222 nm.

$$\theta_{obs}(T) = [a_1 + a_2.T + (a_3 + a_4.T)\exp(-\Delta G_{ND}(T)/RT)] / [1 + \exp(-\Delta G_{ND}(T)/RT)] \quad (2.31)$$

où

$$\Delta G_{ND}(T) = \Delta H_{ND}(T)\left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p[T_m - T + T.\ln\left(\frac{T}{T_m}\right)] \quad (2.32)$$

$\Delta G_{ND}(T)$ est l'énergie libre de la dénaturation, $\Delta H_{ND}(T)$ son enthalpie libre, ΔC_p la capacité calorifique de cette dénaturation. a_1 et a_3 sont respectivement le pouvoir rotatoire de la solution de myoglobine native et celui de la protéine dénaturée à $T=0^\circ\text{C}$, a_2 l'évolution du pouvoir rotatoire de la protéine native en fonction de la température, a_4 celui de la protéine dénaturée.

A partir de cet ajustement, on détermine la fraction en protéine dénaturée, f_D .

$$f_D(T) = \frac{a_1 + a_2.T - \theta_{obs}}{a_1 + a_2.T - a_3 - a_4.T} \quad (2.33)$$

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

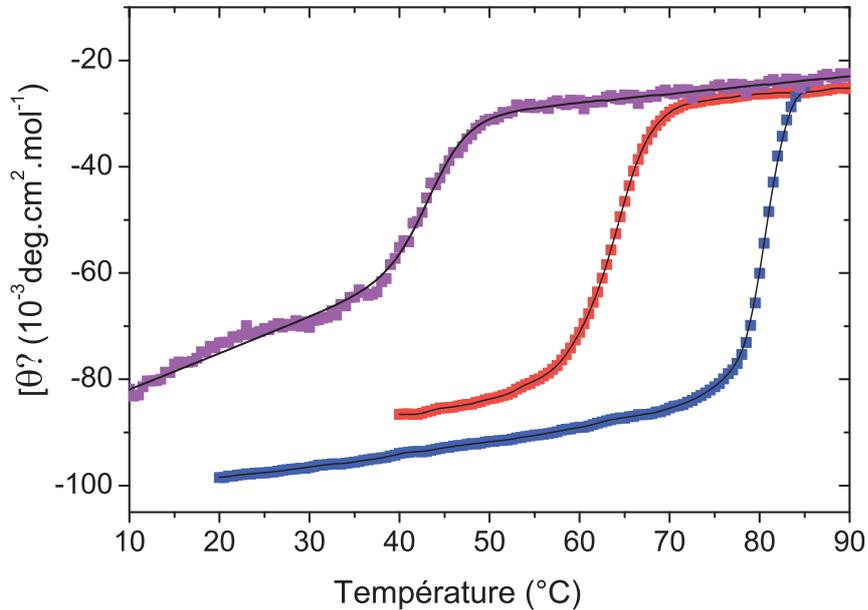


FIGURE 2.37 – Dénaturation thermique de la myoglobine dans un tampon phosphate à 10mM en présence d'une concentration molaire en urée $c_u = 0$ M ■ ; 3 M ■ ; 5.7 M ■. Les ajustements sont représentés en trait continu noir.

Nous obtenons $T_m \approx 83^\circ\text{C}$. Nous souhaitons observer la stabilisation de la myoglobine due à la présence d'un agent d'encombrement, donc l'augmentation de sa température de dénaturation. La myoglobine dans ce tampon a une température de dénaturation trop élevée pour observer un tel décalage. Afin d'abaisser la température de dénaturation de la protéine en solution diluée, nous choisissons de déstabiliser la myoglobine grâce à un chaotrope. Le chaotrope choisi est l'urée.

Nous avons ajouté de l'urée à 2 concentrations molaires : 3 et 5.7 mol.l⁻¹ et suivi la dénaturation de la myoglobine dans chacun des solvants par DC. Nous effectuons une rampe en température de 0.2°C/min sur des plages de température variées de telle sorte que nous puissions à chaque fois observer la dénaturation. Les courbes de dénaturation sont analysées comme précédemment par un modèle à deux états. Cet ajustement nous permet d'obtenir les températures de dénaturation pour $c_u = 3$ mol.l⁻¹ et $c_u = 5.7$ mol.l⁻¹, on obtient respectivement $T_m = 64 \pm 0.11^\circ\text{C}$ et $T_m = 43.54 \pm 0.14^\circ\text{C}$. La dénaturation de la myoglobine a lieu à des températures notablement plus faibles que pour la myoglobine dans le tampon seul (2.37).

b) Influence du Ficoll sur la dénaturation thermique de la myoglobine

Nous allons étudier la dénaturation thermique de la myoglobine en présence d'urée et de Ficoll. Le système étudié est complexe. Comme nous l'avons vu, le Ficoll est utilisé comme agent d'encombrement dans de nombreuses études de dénaturation de protéines. Ces études de dénaturation concernent soit des dénaturations thermiques, soit des dénaturations dues à un agent chimique dénaturant (principalement l'urée ou le chlorure de guanadinium). Même lorsque la dénaturation observée est une dénaturation thermique, la protéine est souvent déstabilisée au préalable par un agent dénaturant. Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé d'étude sur l'interaction entre le Ficoll et l'agent dénaturant. Le système "tampon - agent dénaturant" est considéré comme homogène et le Ficoll comme une sphère dure n'absorbant pas l'urée.

i) Étude de l'interaction Ficoll-urée

Comme nous l'avons vu précédemment, le Ficoll n'est pas une sphère dure à proprement parler. On peut donc envisager qu'il absorbe préférentiellement l'urée, ou au contraire la rejette. La fraction massique en Ficoll utilisée dans ces études étant importante, la concentration en agent dénaturant sondée par la protéine pourrait fortement varier.

Nous avons essayé de voir si l'urée est absorbée préférentiellement ou pas par le Ficoll, en utilisant la diffusion de neutrons aux petits angles. L'absorption préférentielle de l'urée ou son rejet, modifierait la densité de longueur de diffusion du Ficoll (fig. 2.38). La mesure du contraste entre le Ficoll et le solvant devrait nous permettre de conclure.

L'urée

L'urée est un agent dénaturant fréquemment utilisé, sa formule est $CO(NH_2)_2$, sa masse molaire est de 60 g.mol^{-1} .

L'étude a été menée dans le D_2O . L'urée possède 4 H labiles. Afin de connaître exactement la densité de longueur de diffusion du solvant et du Ficoll en s'exonérant des problèmes d'échange H-D, nous avons deutéré l'urée. Pour cela, nous avons dissout de l'urée hydrogénée dans du D_2O dans une proportion massique de 1g d'urée pour 5g d'eau lourde. La solution a ensuite été lyophilisée. Cette opération a été réitérée à trois reprises afin d'obtenir une deutériation la meilleure possible comme le montre la mesure de la diffusion incohérente.

En déterminant pour différentes concentrations en urée, la densité de la solution eau/urée, nous avons ensuite déterminé la densité de l'urée deutérée à l'aide de l'équation 2.34 (fig. 2.40).

$$d_s(c_{uD}) = d_{D_2O} + c_{uH} M_{uD} v_s \left(1 - \frac{d_{D_2O}}{d_{uD}}\right) \quad (2.34)$$

où c_{uD} et c_{uH} sont les concentrations molaires en urée hydrogénée et deutérée en mol.l^{-1} , v_s le

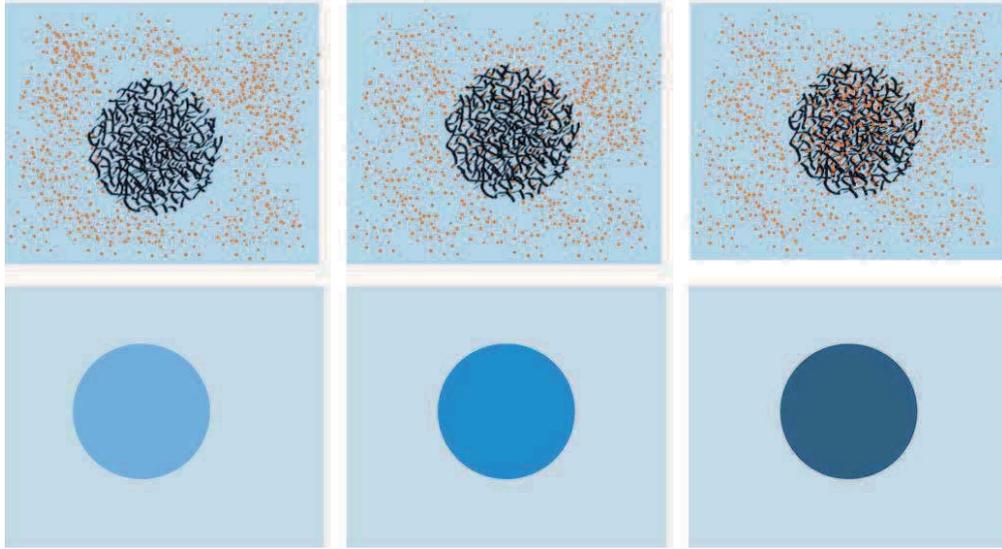


FIGURE 2.38 – Schéma de l'influence de l'absorption par le Ficoll de l'urée sur la densité de longueur de diffusion du Ficoll. Sur la première ligne de gauche à droite, on a représenté les différents cas possibles : (a) l'urée a une concentration moins importante à l'intérieur du Ficoll qu'en solution, (b) la même concentration, (c) une concentration supérieure. Sur la ligne du dessous, nous avons schématisé par des "couleurs" comment, à faible fraction massique en Ficoll, cela modifierait la densité de longueur de diffusion du Ficoll sans modifier celle du solvant. Une mesure de la densité de longueur de diffusion permettrait de connaître la concentration en urée à l'intérieur du Ficoll.

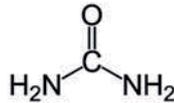


FIGURE 2.39

volume spécifique du solvant exprimé en l.g^{-1} . d_s , d_{D_2O} , d_{uD} sont respectivement les densités du mélange urée-D / D_2O , du D_2O et de l'urée deutérée. Les données sont affinées et on obtient la densité de l'urée deutérée, 1.416.

Nous pouvons déterminer la densité de longueur de diffusion d'un solvant, $\rho_s = \frac{\sum b_i}{v}$, constitué de D_2O avec une concentration molaire en urée-D de c_{uD} .

$$x_{uD}(c_{uD}) = \frac{c_{uD} M_{uree-D} v_e}{d_{ud}} d_s(c_{uD}) \quad (2.35)$$

où x_{uD} est la fraction volumique en urée-D dans le D_2O et v_e le volume spécifique de l'eau en

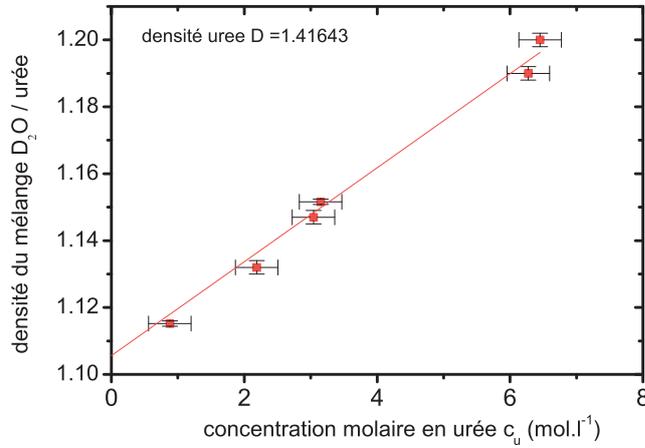


FIGURE 2.40 – Détermination de la densité de l'urée deutérée dans le D₂O.

l.g⁻¹.

$$\rho_s = x_{uD}\rho_{uD} + (1 - x_{uD})\rho_{D_2O} \quad (2.36)$$

Détermination de la densité de longueur de diffusion du Ficoll

Nous préparons trois solutions à des concentrations différentes en urée. Pour chacune de ces concentrations en urée, nous introduisons du Ficoll à environ 10g.l⁻¹. La concentration de Ficoll étant faible par rapport à celle en solvant, quelle que soit la configuration, nous considérons que la concentration en urée dans le solvant reste constante. Seule la concentration à l'intérieur du Ficoll n'est pas considérée comme constante, donc la densité de longueur de diffusion du système {urée + Ficoll}, $\rho_{F,u}(c_u)$, également.

Nous déterminons, pour une mole de Ficoll dans l'eau le volume occupé par le Ficoll, v_F , et le volume occupé par le solvant est v_s . $x_{s,F}$ est la fraction volumique en solvant à l'intérieur du Ficoll.

$$v_F = M_F \nu_F \quad (2.37a)$$

$$v_s = R_0^3 - v_F \quad (2.37b)$$

$$x_{s,F} = \frac{R_0^3 - v_F}{R_0^3} \quad (2.37c)$$

$$\rho_{F,u}(c_u) = x_{s,F}\rho_s(c_{uD}) + (1 - x_{s,F})\rho_s(c_u) \quad (2.37d)$$

où M_F est la masse du Ficoll, ν_F son volume spécifique et R_0 son rayon.

En se plaçant à une concentration en Ficoll constante (environ 10 g.l⁻¹), le rapport des intensités normalisées par la concentration en Ficoll de la solution avec et sans urée, nous permet de

déterminer, pour chaque concentration en urée dans le solvant (6.27, 4.2, 2.1 et 0 mol.l⁻¹), la concentration en urée à l'intérieur du Ficoll.

$$\frac{I(Q)_{c_u}/c_F}{I(Q)_0/c_F} = \frac{M_{F,s}\Delta\rho_{F,c_u}^2}{M_F\Delta\rho_{F,0}^2} \quad (2.38a)$$

$$\frac{I(Q)_{c_u}/c_F}{I(Q)_0/c_F} = \frac{(M_F + d_s * R)\Delta\rho_{F,c_u}^2}{M_F\Delta\rho_{F,0}^2} \quad (2.38b)$$

Le rapport $\frac{I(Q)_{F,c_u}/c_F}{I(Q)_{F,0}/c_F}$ est représenté sur fig.2.41 pour chacune des concentrations. Ce rapport nous a permis de déterminer la concentration en urée à l'intérieur du Ficoll.

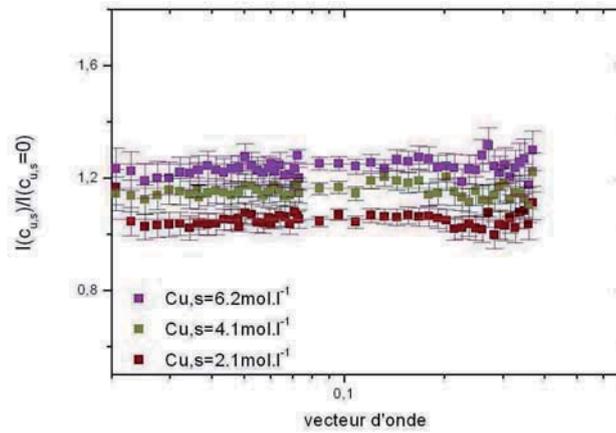


FIGURE 2.41 – Rapport des intensités du Ficoll dans un solvant avec et sans urée, normalisé par les concentration. Ce rapport a été effectué pour trois concentrations molaires en urée différentes.

D'après nos mesures, la concentration en urée à l'intérieur du Ficoll est légèrement supérieure à celle du solvant. On a :

- pour $c_u=6.2 \text{ mol.l}^{-1}$, $5.9 \text{ mol.l}^{-1} < c_{u,F} < 7.8 \text{ mol.l}^{-1}$
- pour $c_u=4.1 \text{ mol.l}^{-1}$, $3.9 \text{ mol.l}^{-1} < c_{u,F} < 5.4 \text{ mol.l}^{-1}$
- pour $c_u=2.1 \text{ mol.l}^{-1}$, $2.2 \text{ mol.l}^{-1} < c_{u,F} < 3.4 \text{ mol.l}^{-1}$

La barre d'erreur est importante. Pour une concentration $c_u=6.1 \text{ mol.l}^{-1}$, nous avons calculé, en tenant compte de l'absorption de l'urée par le Ficoll, la concentration en urée dans le solvant en fonction de la fraction massique en Ficoll ajouté (fig 2.42). Pour une fraction massique en Ficoll de 30 %, on a $5.9 \text{ mol.l}^{-1} < c_u < 6.15 \text{ mol.l}^{-1}$. La modification de la concentration en urée dans le solvant est assez faible. On considérera par la suite que cette variation est négligeable.

Nous avons par la suite essayé de déterminer si cette concentration évoluait avec la température. Nous avons procédé au même type de mesures sur le spectromètre PAXE pour six

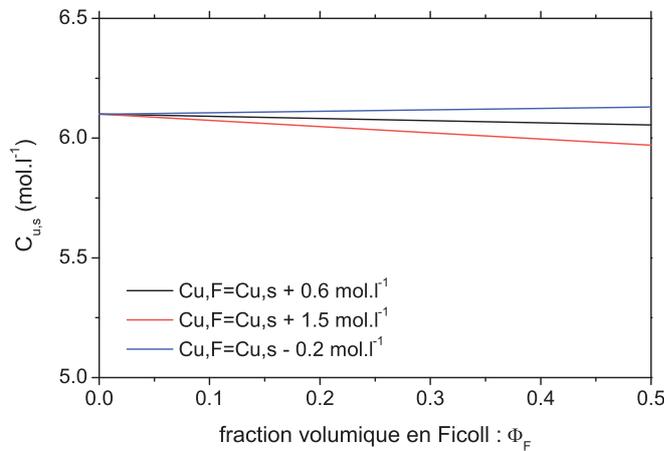


FIGURE 2.42 – Variation de la concentration en urée dans le solvant en fonction de la fraction volumique en Ficoll. En noir : courbe "moyenne". en rouge et en bleu sont représentées les droites limites prenant compte des incertitudes sur la mesure de la concentration à l'intérieur du Ficoll.

températures de 20 à 75°C, qui est la gamme de température sur laquelle nous observons la dénaturation des protéines.

L'intensité diffusée par chaque échantillon ne varie pas en fonction de la température, la concentration en urée à l'intérieur du Ficoll est constante quelle que soit la température. Nous considérerons par la suite que la présence de Ficoll ne modifie pas la concentration en urée dans le solvant au cours de l'ensemble des études en température.

ii) Étude de la dénaturation thermique en fonction de la fraction massique en Ficoll

La concentration en urée pouvant être considérée comme constante lorsqu'on ajoute du Ficoll, nous pouvons nous intéresser à l'influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la myoglobine en présence d'urée.

Pour une solution de myoglobine dans un tampon phosphate à 10 mM, et en présence d'urée à la concentration $c_u=3.0 \text{ mol.l}^{-1}$, nous mesurons l'ellipticité à 222 nm en fonction de la température de la solution en présence de cinq fractions massiques en Ficoll : $\Phi = 0; 0.068; 0.17; 0.27; 0.34$ (la rampe en température que nous avons utilisée est la même que précédemment (0.2°C /min)). Nous avons également mesuré la renaturation de la myoglobine en procédant à une rampe en température descendante. De la même manière que nous avons défini T_m , nous définissons la température de renaturation, T_r , température pour laquelle $f_N = f_D = 0.5$. L'ellipticité obtenue pour la renaturation est affinée grâce au même modèle que pour la dénaturation.

Quelle que soit la fraction Φ en Ficoll, les courbes de dénaturation et de renaturation obtenues

par dichroïsme (fig. 2.43) ne se superposent pas : on a $T_m > T_r$. L'équilibre "état natif/ état dénaturé" n'est pas symétrique et réversible. Cependant, le modèle de transition à 2 états permet d'obtenir un bon affinement des courbes. Par ailleurs, une part qui augmente avec Φ de la myoglobine ne se renature pas. Pour $\Phi=0.27$ et 0.34 , on peut considérer que la protéine ne se renature pas du tout. Lorsque la fraction massique en agent d'encombrement augmente, l'agrégation de la protéine dénaturée augmente. Ces résultats sont en accord avec les mesures des interactions entre chaînes de polymère effectuées dans le chapitre précédent. Plus la fraction en Ficoll augmente, plus les interactions effectives entre protéines dénaturées sont attractives, l'agrégation est favorisée.

Lorsque la fraction massique en Ficoll augmente, la température de dénaturation T_m augmente. Pour une fraction massique maximum $\Phi=0.34$, l'augmentation de T_m est de 2.3°C . La température de renaturation T_r augmente plus fortement que T_m . En effet, pour une fraction $\Phi=0.17$, $\Delta T_r(\Phi) = T_r(\Phi) - T_r(0)=7.75^\circ\text{C}$ et $\Delta T_m(\Phi) = T_m(\Phi) - T_r(0)=0.5^\circ\text{C}$. L'encombrement a une plus grande influence sur la renaturation que sur la dénaturation de la myoglobine. Les études théoriques et l'étude expérimentale menée dans le chapitre précédent montrent que l'état natif d'une protéine est principalement stabilisé par l'encombrement grâce à la déstabilisation de l'état dénaturé. Lorsque la protéine est dénaturée, l'encombrement lui permet d'être dans un état plus compact qui favorise sa renaturation.

Modification de la concentration en urée, $c_u=5.7 \text{ mol.}^{-1}$

Nous avons augmenté la concentration en urée afin d'observer l'influence de l'encombrement pour la myoglobine dans des conditions de solvant moins stable.

Sur la figure 2.44(a), nous avons représenté une grandeur fonction de l'ellipticité, $\Delta\theta_{norm}$ afin de pouvoir comparer plus facilement les transitions de $\Delta\theta$. $\Delta\theta_{norm}$ est définie par $\Delta\theta_{norm} = \frac{\Delta\theta(T) - \Delta\theta(20^\circ)}{\Delta\theta(20^\circ) - \Delta\theta(80^\circ)}$ (où $\Delta\theta(20^\circ)$ et $\Delta\theta(80^\circ)$ sont les ellipticités mesurées à 20°C et 80°C). Les mesures ont été affinées comme expliqué précédemment par un modèle de transition à deux états. La fraction f_N , obtenue pour chacune des fractions Φ , à partir de l'affinement a été représentée sur la figure 2.44(b). La température de dénaturation mesurée, T_m est représentée sur la figure 2.45

T_m augmente de plus de 12°C pour une fraction en Ficoll $\Phi=0.33$ (fig. 2.45). La stabilisation est donc plus importante lorsque la concentration en urée augmente. Pour une fraction $\Phi=0.33$, $\Delta T_m=2.3^\circ\text{C}$ pour $c_u=3\text{M}$ et $\Delta T_m=12.3^\circ\text{C}$ pour $c_u=5.7\text{M}$.

iii) Modification de l'agent d'encombrement : utilisation du Dextran

Nous avons utilisé du Dextran comme agent d'encombrement et étudié comme précédemment la dénaturation thermique de la myoglobine dans un tampon phosphate-urée ($c_u=5.7 \text{ mol.l}^{-1}$) pour

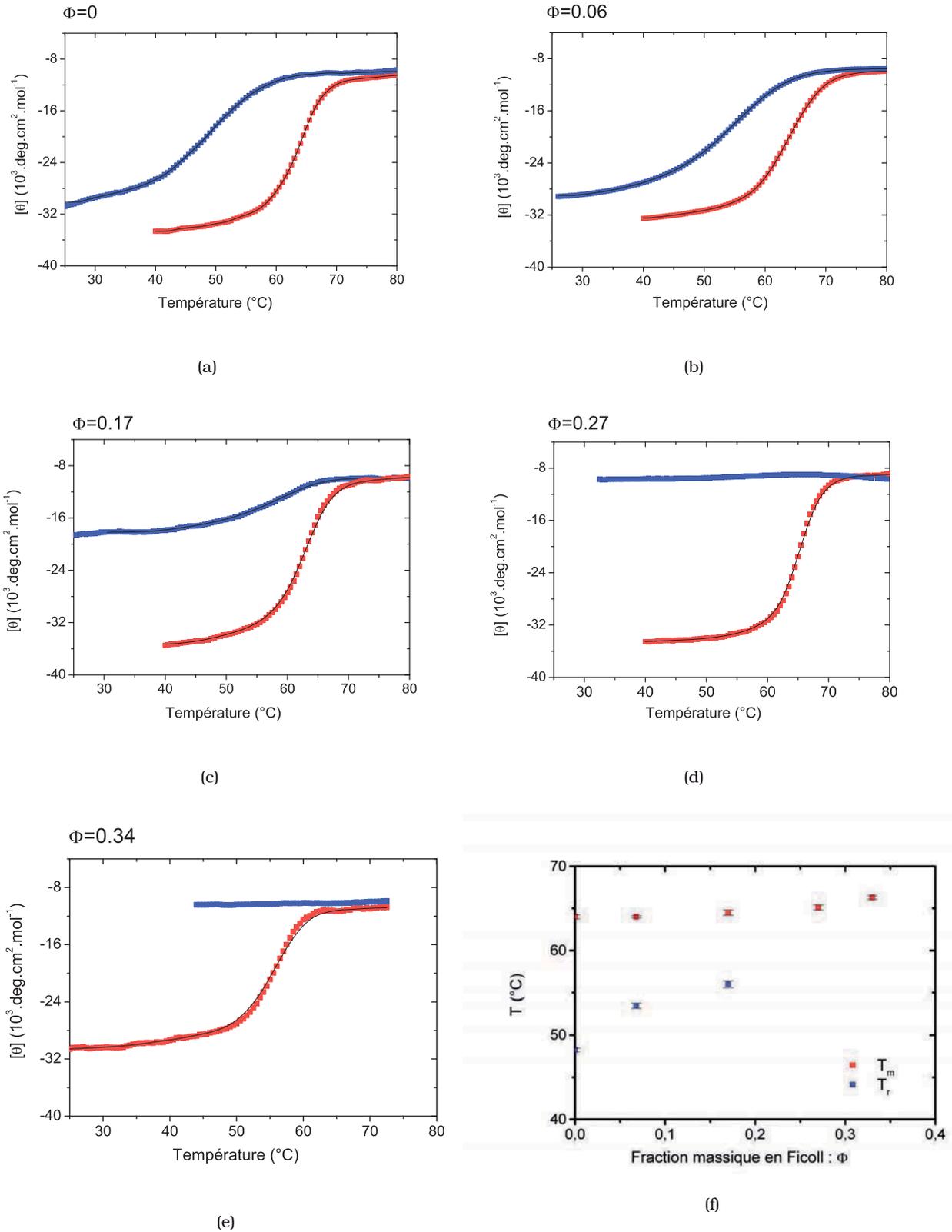
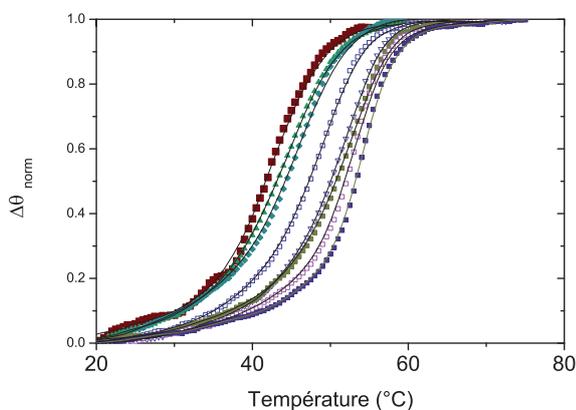
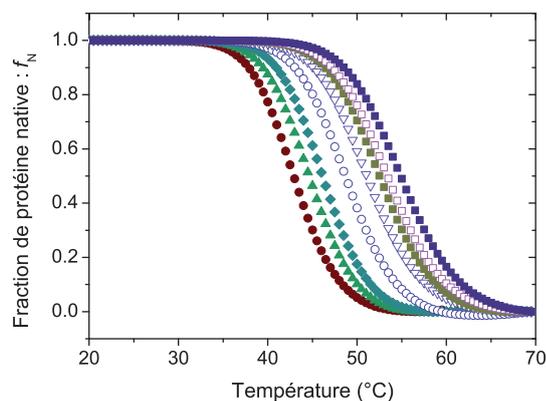


FIGURE 2.43 – Etude par DC de la dénaturation (■) et de la renaturation (■) de la myoglobine dans un tampon phosphate 10mM en présence de 3M d'urée pour différentes fractions massiques en Ficoll : (a) : $\Phi= 0$; (b) : $\Phi= 0.068$; (c) : $\Phi= 0.17$; (d) : $\Phi=0.27$; (e) : $\Phi= 0.34$. Les mesures ont été affinées par un modèle à 2 états. La figure (f) représente l'évolution de la température de dénaturation, T_m , et de renaturation, T_r , en fonction de la fraction massique en Ficoll.



(a)



(b)

FIGURE 2.44 – (a) : Evolution de l'ellipticité normalisée $\Delta\theta_{norm}$ mesurée par CD en fonction de la température, pour une solution de myoglobine à une concentration $c_m \approx 80\mu M$ pour un tampon phosphate, en présence de $c_u=5.7M$, pour différentes fractions massiques en Ficoll : \bullet : $\Phi = 0$; \blacktriangle : $\Phi = 0.045$; \blacklozenge : $\Phi = 0.090$; \circ : $\Phi = 0.150$; ∇ : $\Phi = 0.200$; \blacksquare : $\Phi = 0.220$; \square : $\Phi = 0.270$; \blacklozenge : $\Phi = 0.340$. Les données ont été ajustées par le modèle a 2 états (courbes noires) ; (b) Evolution des fractions en protéine native f_N obtenues par ajustement des données de la fig. (a) pour les mêmes fractions massiques en Ficoll.

une fraction massique en Dextran $\Phi = 0.33$. Nous observons bien un décalage de la température de dénaturation (fig. 2.46), qui est, à fraction massique constante, plus important pour le Dextran ($T_m = 60.7 \pm 0.18$ °C) que pour le Ficoll ($T_m = 55.2 \pm 0.15$ °C). Ces résultats sont en accord avec la plupart des études expérimentales observant des décalages en température allant de quelques

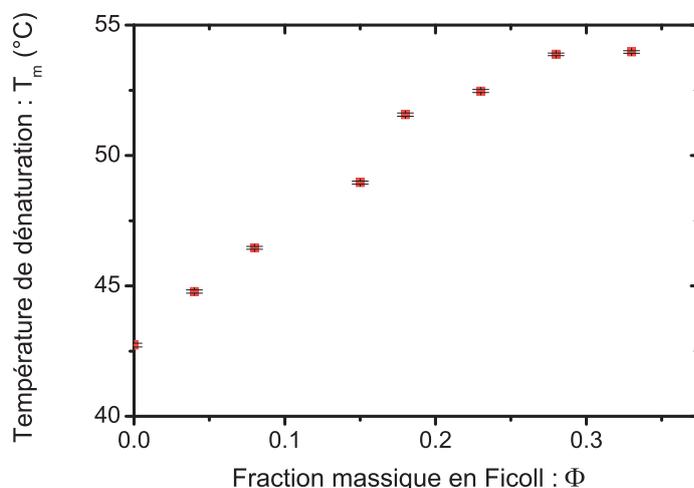


FIGURE 2.45 – Evolution de la température de dénaturation, T_m , en fonction de la concentration en agent d'encombrement, Φ .

degrés à plus de 20°C [33][35][41][37].

c) Analyse et discussion

Quel que soit le système étudié, on observe une stabilisation de la myoglobine par l'encombrement macromoléculaire vis à vis de la dénaturation thermique. L'ensemble des résultats est résumé sur la figure 2.47 qui représente l'amplitude de la stabilisation thermique $\Delta T_m(\Phi) = T_m(\Phi) - T_m(0)$ ou $\Delta T_r(\Phi) = T_r(\Phi) - T_r(0)$. Cette stabilisation dépend de différents paramètres tels que l'agent d'encombrement ou la concentration en urée. Pour une même fraction massique en agent d'encombrement de l'ordre de 0.3, ΔT_m va de 2°C à plus de 17.5°C. L'encombrement n'influence pas de la même manière la dénaturation et la renaturation.

Comment comprendre ces différences? De nombreuses études expérimentales montrent, comme dans notre étude, qu'une protéine "déstabilisée" grâce aux conditions du tampon (concentration en chaotrope, modification de l'espèce du tampon, de sa force ionique) est plus influencée par l'encombrement vis à vis de la dénaturation thermique.

Plus c_u est élevée, plus la protéine est au départ déstabilisée et plus l'effet de l'encombrement est important. Au même titre que nous avons défini T_m , on peut définir $c_{50}(\Phi)$, la concentration

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

[35] van den Berg, B., Ellis, R., and Dobson, C. *EMBO J.* **18**, 6827–69233 (1999).

[41] Sasaki, Y., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. *nucleic acids res.* **35**, 4086–4093 (2007).

[37] Perham, M., Stagg, L., and Wittung-Stafshede, P. *FEBS Letters* **581**(26), 5065 – 5069 (2007).

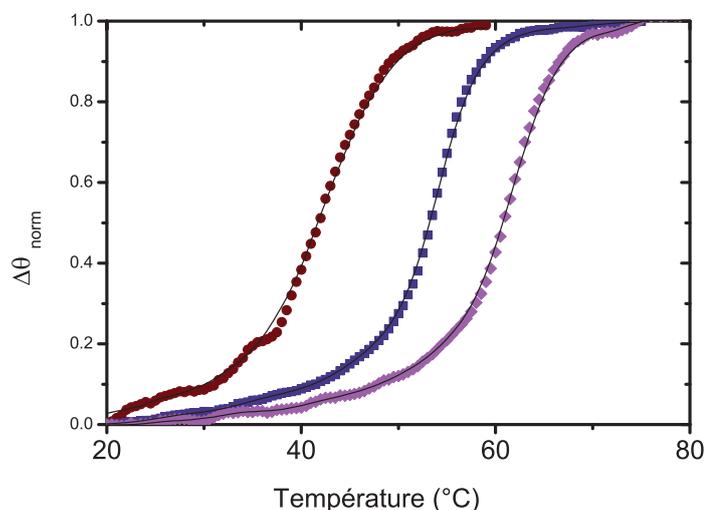


FIGURE 2.46 – Dénaturation de la myoglobine en utilisant le Dextran comme agent d'encombrement. Comparaison avec le Ficoll. $\Phi=0.33$. \bullet : $\Phi = 0$; \blacksquare : $\Phi = \Phi_F = 0.34$; \blacklozenge : $\Phi = \Phi_D = 0.34$.

en urée pour laquelle $f_N = f_D = 0.5$. Une étude ^[33] prédit que c_{50} augmente quand Φ augmente. Les décalages en température que nous observons en présence d'un encombrement sont dus à l'addition de la stabilisation de la protéine vis à vis de la dénaturation thermique et vis à vis des chaotropes.

Cependant, il reste difficile de comprendre pourquoi une protéine déstabilisée par les conditions de tampon est plus stabilisée par l'encombrement que la même protéine dans des conditions de tampon plus stable. L'urée est un chaotrope, la dénaturation induite par la présence d'urée est un phénomène principalement enthalpique. La dénaturation thermique est principalement une réaction entropique. Ce décalage est dû à la complexité de la balance entropie / enthalpie qui régit l'équilibre de dénaturation.

[33] Sasahara, K., McPhie, P., and Minton, A. P. *Am. Chem. Soc.* **326**, 1227–1237 (2003).

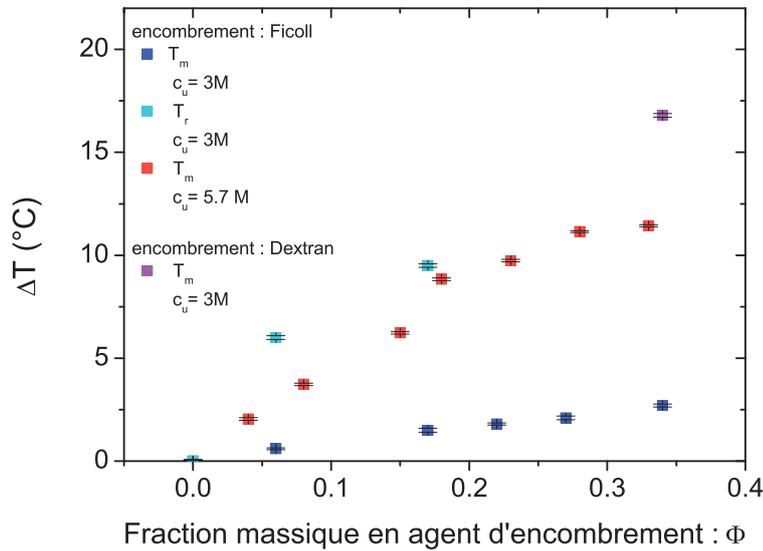


FIGURE 2.47 – Evolution de ΔT_m ou de ΔT_r en fonction de Φ pour les différents systèmes étudiés en fonction de la fraction massique en agent d'encombrement (Ficoll ou Dextran).

2.3.3 Étude de la structure tertiaire d'une protéine

L'étude précédente a permis d'observer l'évolution de la structure secondaire de la myoglobine en fonction de la fraction en agent d'encombrement.

Les études théoriques se sont principalement intéressées à la modification de la structure tertiaire des protéines due à l'encombrement car il induit une diminution des valeurs de la distribution des rayons de giration de la protéine. Nous cherchons donc à observer la conformation d'une protéine en présence d'un agent d'encombrement.

a) Quel système étudier ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, il est impossible d'observer la conformation d'une protéine hydrogénée en présence d'un agent d'encombrement comme le Ficoll ou le Dextran hydrogéné.

Les protéines deutérées étant difficiles à obtenir, nous avons souhaité, avant de mener plus loin cette étude, vérifier qu'il était possible d'observer l'influence de l'encombrement sur une protéine hydrogénée. Nous devons donc utiliser un agent d'encombrement dont la densité de longueur de diffusion n'est pas proche de celle des protéines hydrogénées. Le Ficoll et le Dextran

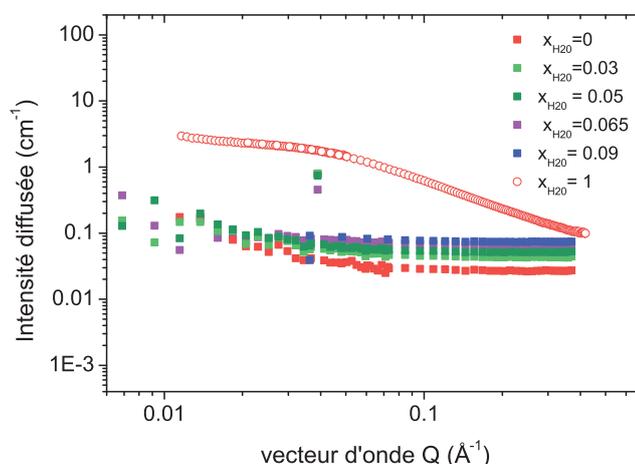


FIGURE 2.48 – Intensité diffusée par le PEG à la concentration $c_p \approx 9 \text{ g.l}^{-1}$ pour différents rapports $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$ dans un solvant contenant 5.7 M d'urée deutérée.

sont difficilement deutérables. Le PEG est un agent d'encombrement fréquemment utilisé [41][42] et il est disponible, sous forme commerciale, deutéré. Sa densité de longueur de diffusion est alors très différente de celle d'une protéine. Comme nous l'avons vu, le PEG est un polymère linéaire en bon solvant dans l'eau, nous ne pourrions pas interpréter simplement l'encombrement par un modèle de sphère dure ou de cœur dur. Cette étude ne peut être directement comparée aux précédentes observations.

Nous avons étudié par DNPA l'influence de l'encombrement sur la conformation de la myoglobine dans un tampon phosphate à 10mM en présence d'urée à 5.7 M. Nous avons choisi de nous placer dans ces conditions pour différentes raisons. Dans l'étude précédente, nous observions pour une fraction Φ élevée, un décalage de la température de dénaturation de 12°C. Un plus fort décalage de la température de dénaturation est bien sûr favorable à sa mise en évidence.

Le PEG-D a une densité de longueur de diffusion supérieure à celle du D_2O et son signal ne peut être éteint dans l'eau lourde pure, mais en ajoutant de l'urée deutérée, la densité de longueur de diffusion du solvant augmente et le signal du PEG-D peut être éteint. L'extinction du signal du PEG-D doit être quasi parfaite car nous avons une concentration en PEG de l'ordre de 100 fois la concentration en protéine que nous voulons observer.

En faisant varier la fraction $x_{\text{H}_2\text{O}}$ dans le solvant, nous avons cherché la fraction pour laquelle l'extinction était la meilleure (fig. 2.48). Nous avons par la suite travaillé à une fraction $x_{\text{H}_2\text{O}}=0.05$.

[41] Sasaki, Y., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. *nucleic acids res.* **35**, 4086–4093 (2007).

[42] Ai, X., Zhou, Z., and Choy, Y. B. W. Y. *J. am. chem. soc.* **128**, 3946–3917 (2006).

b) Caractérisation de la myoglobine par DNPA

Dans un premier temps, nous avons déterminé la conformation et la taille de la myoglobine en solution diluée dans l'environnement que nous avons choisi. La conformation de la myoglobine a ensuite été étudiée pour différentes températures. Ces expériences ont été réalisées dans un solvant deutéré "eau-urée" pour une concentration en urée $c_u = 5.7 \text{ mol.l}^{-1}$ à des concentrations en protéine, c_m , de 5 à 21 g.l^{-1} .

A 20°C, le facteur de forme de la myoglobine est celui d'un objet globulaire (fig. 2.49). La pente à grand vecteur d'onde est en Q^{-4} , caractéristique des interfaces nettes. A faible vecteur d'onde on observe une légère agrégation de la myoglobine. Elle est sans doute due au fait que nous avons utilisé de la myoglobine en poudre fournie par Sigma. Malgré les multiples centrifugations que nous avons effectuées, des traces d'agrégation subsistent.

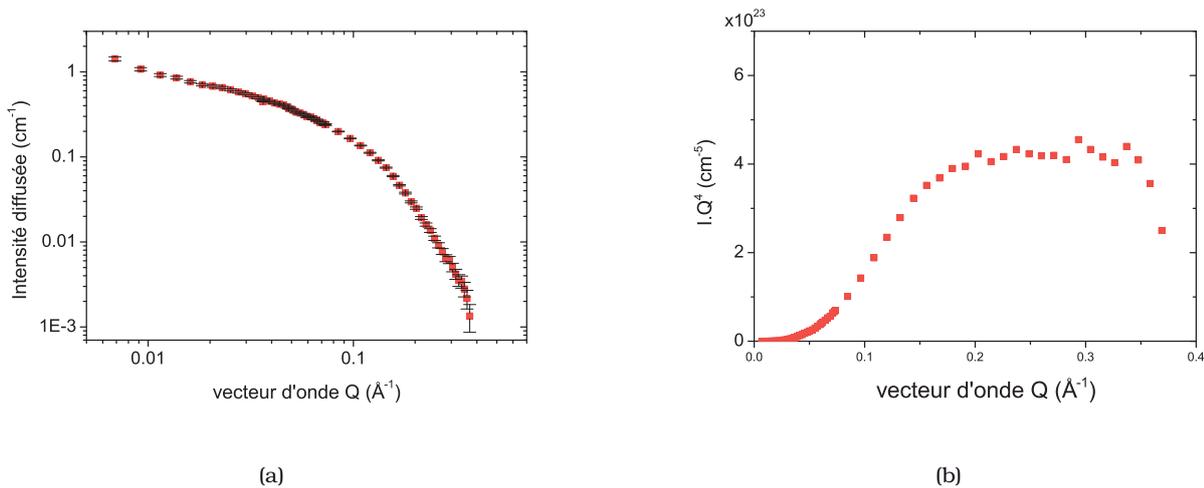


FIGURE 2.49 – Intensité diffusée par la myoglobine à la concentration $c_m = 5.6 \text{ g.l}^{-1}$ dans un tampon à pH 7 à 20°C.

Selon l'étude par dichroïsme circulaire, la myoglobine dans le tampon et en présence de 5.7 M d'urée est dénaturée à 68° C. Nous avons étudié sa conformation dans ces conditions dans un solvant deutéré. Le facteur de forme de la myoglobine à une telle température peut être affiné par un facteur de Debye avec une bonne précision (fig. 2.50). Nous avons étudié la conformation de la myoglobine pour deux températures intermédiaires, T=40 et 52°C. L'évolution de $I.Q^2$ en fonction de Q est représentée sur la figure 2.51. Quand la température augmente on passe progressivement d'une pente à grand Q en Q^{-4} à une pente en Q^{-2} .

Pour T=40°C et T=52°C, la myoglobine est en partie dénaturée. Il existe une fraction f_D de protéine dénaturée et f_N native. Le rayon de giration déterminé en affinant nos données par un

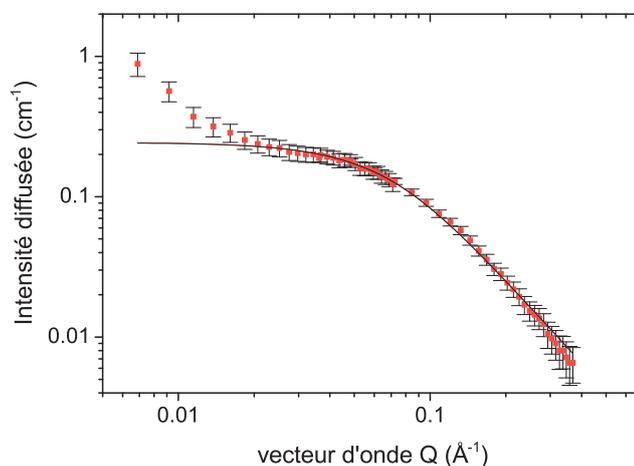


FIGURE 2.50 – Intensité diffusée par la myoglobine à la concentration $c_m = 5.6 \text{ g.l}^{-1}$ à pH 7 dans une solution d'urée à 75°C . Les données ont été affinées par un facteur de forme de Debye.

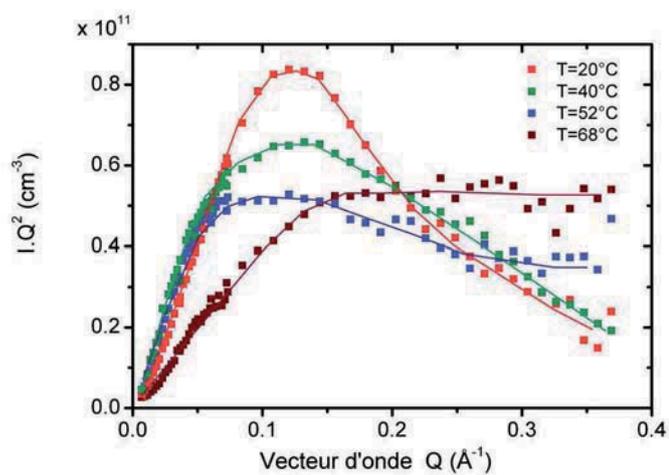


FIGURE 2.51 – $I.Q^2$ en fonction de Q pour 4 températures 20, 40, 52 et 68°C . On passe d'une conformation de type corps dur à une chaîne dépliée.

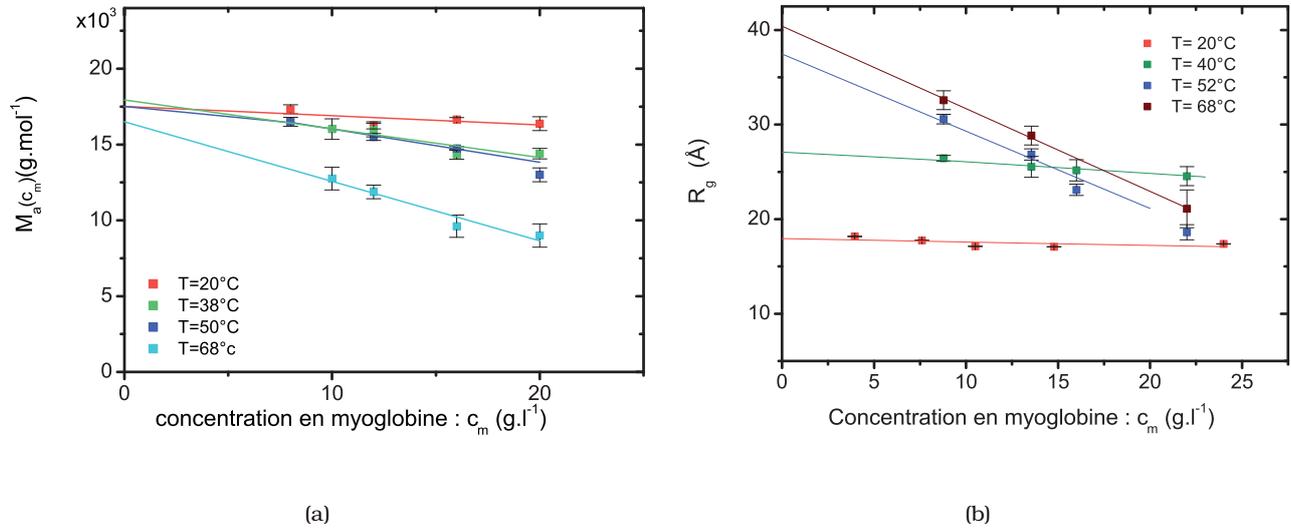


FIGURE 2.52 – Extrapolation de la masse (a) et du rayon de giration (b) de la myoglobine.

ajustement de Guinier pour $Q.R < 1.3$ n'est pas le rayon de giration de la myoglobine dans un seul état mais le rayon de giration moyen d'un mélange protéine à l'état natif / protéine à l'état dénaturé.

Pour chaque température, les mesures ont été faites à cinq concentrations différentes (de 5 à 21 g.l^{-1}). Les données extrapolées à partir des ajustements de Guinier nous permettent d'effectuer une représentation de Zimm de la masse apparente et du rayon de giration en fonction de la concentration en myoglobine (fig. 2.52).

Lorsque la température augmente, le second coefficient du viriel augmente ce qui traduit l'augmentation du volume exclu donc des interactions quand la chaîne se déplie. Son rayon de giration augmente avec la température. On passe d'un objet compact, la protéine à l'état natif, à une chaîne aléatoire, la chaîne polypeptidique de la protéine dénaturée.

c) Influence de l'encombrement sur la dénaturation thermique de la myoglobine

Dans une seconde étape, nous analysons donc la conformation de la myoglobine en présence de notre agent d'encombrement, le PEG-D. Nous nous plaçons à une fraction massique en PEG-D, $\Phi = 0.16$. Contrairement à ce que nous avons fait pour chacune de nos études (que ce soit pour la myoglobine en solution diluée ou pour la conformation des PEG en présence de Ficoll), nous n'avons pu effectuer une étude en concentration de la myoglobine pour $\Phi = 0.16$. Le PEG est fréquemment utilisé comme un agent favorisant la cristallisation des protéines. Pour une fraction

massique en PEG élevée, la myoglobine s'agrège très vite au delà d'une certaine concentration (par effet du volume exclu). Dans le cas de notre solution, on observe une agrégation de la myoglobine pour une concentration de l'ordre de 2.5 g.l^{-1} . Pour des concentrations trop faibles en myoglobine, l'intensité diffusée par la myoglobine est trop faible par rapport au bruit de fond afin de pouvoir observer un facteur de forme avec une statistique correcte. La conformation de la myoglobine n'a donc été étudiée que pour deux concentrations c_m différentes. Ces concentrations étant très faibles, nous faisons l'hypothèse que le rayon de giration obtenu correspond à celui obtenu à concentration nulle.

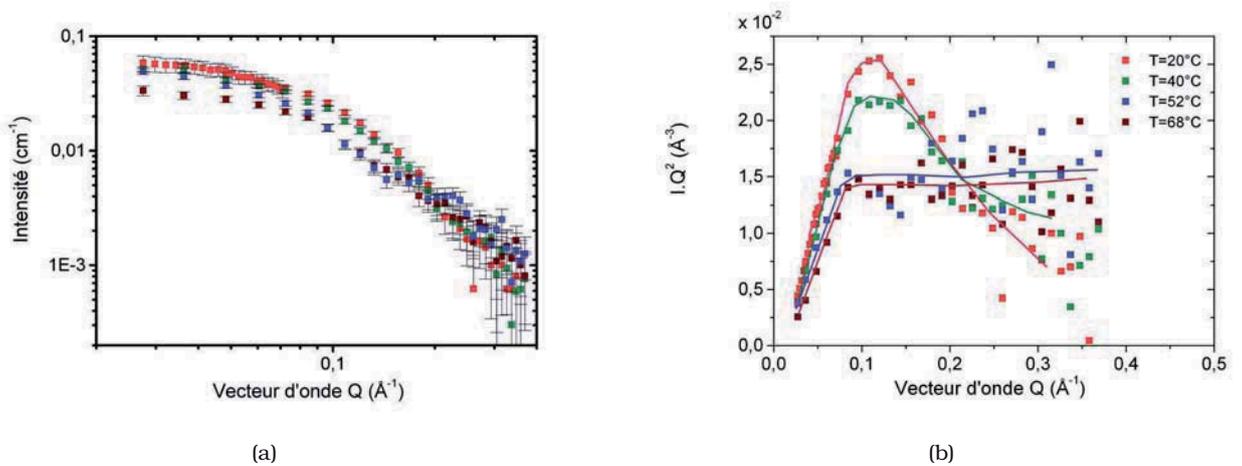


FIGURE 2.53 – (a) : Intensité diffusée par la myoglobine à la concentration $c_{myo} = 2.1 \text{ g.l}^{-1}$ dans un tampon à pH 7 en présence d'urée à 5.7M et pour une fraction en agent d'encombrement $\Phi=0.16$.

La figure 2.53(a) représente l'intensité cohérente diffusée par la myoglobine pour chacune des quatre températures étudiées. Sur la figure 2.53(b), les spectres sont transformés en représentation de Kratky. Quand la température augmente, à grand vecteur d'onde, on passe de Q^{-4} à Q^{-2} . Pour $T=40^\circ\text{C}$, la protéine adopte, contrairement à la myoglobine en solution diluée, une conformation très proche de la conformation de la protéine à l'état natif.

En présence de l'agent d'encombrement, la protéine dénaturée semble avoir une conformation plus compacte que celle de la protéine diluée (fig. 2.54(b)). Cette mesure est en accord avec les études théoriques et les mesures effectuées sur une chaîne gaussienne modèle. Cependant le rayon de giration que nous avons mesuré n'est pas le rayon de giration de la myoglobine

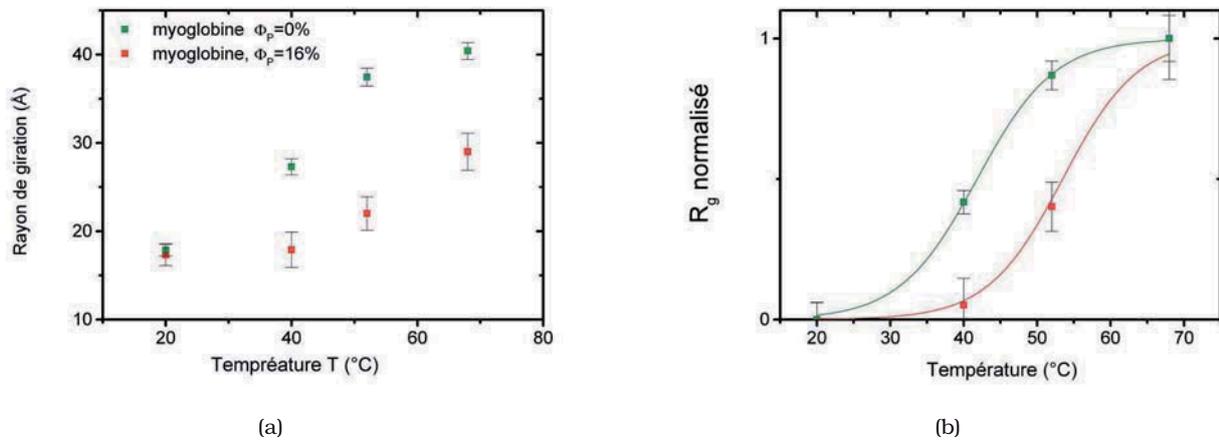


FIGURE 2.54 – (a) : Rayon de giration de la myoglobine en fonction de la température en présence et en l'absence d'un agent d'encombrement. (b) Rayon de giration de la myoglobine normalisé par le rayon de giration obtenu pour $T=68^\circ\text{C}$.

extrapolé à concentration nulle, seulement une moyenne. L'encombrement cytoplasmique modifiant fortement les interactions, le rayon de giration d'une protéine à faible concentration est légèrement différent du rayon observé.

En parallèle, la dénaturation de la myoglobine en présence de l'agent d'encombrement semble se faire à une température plus élevée. Les mesures ne nous permettent pas de conclure précisément sur la température de dénaturation de la myoglobine car nous n'en avons effectué que pour quatre températures différentes.

La figure 2.54(a) représente un ajustement du rayon de giration normalisé défini par $R_{g,norm} = \frac{R_g(T) - R_{g,N}}{R_{g,D} - R_{g,N}}$ où $R_{g,N}$ et $R_{g,D}$ sont les rayons de giration de la myoglobine native et dénaturée. L'évolution de $R_{g,norm}$ en fonction de Φ a été ajustée par un modèle classique de transition à deux états, en fixant les rayons de la protéine à l'état natif et à l'état dénaturé. Étant donné la précision des mesures et le nombre de températures étudiées, ces courbes sont plus des guides pour les yeux permettant de visualiser la transition qu'un véritable ajustement. La précision des mesures nous permet néanmoins de conclure que la dénaturation thermique de la myoglobine en présence d'agent d'encombrement a lieu pour des températures plus élevées. L'agent d'encombrement stabilise la structure tertiaire de la myoglobine vis à vis de la dénaturation thermique et son état dénaturé est plus compact que pour la protéine diluée. L'état natif n'est pas influencé par l'encombrement.

2.4 Discussion

Dans cette étude nous voulions observer l'effet du volume exclu sur la stabilisation des protéines. En nous basant sur les études théoriques établissant la stabilisation de la protéine à l'état natif grâce à la destabilisation de la protéine dénaturée et la diminution du rayon de giration de celle-ci, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps un modèle très simplifié. L'étude d'un homopolymère (le PEG) en présence d'un agent d'encombrement quasi-sphérique (le Ficoll) nous avons observé la compression d'une chaîne gaussienne pour 3 différentes tailles.

Quel que soit l'encombrement, la chaîne de PEG garde une conformation de type gaussienne, et, pour une fraction massique en PEG importante le rayon de giration diminue fortement (pour une chaîne de rayon initiale proche de celui du Ficoll la diminution est d'un facteur deux pour une fraction massique en Ficoll de l'ordre de 30%). La chaîne que nous avons étudiée est un homopolymère et pas un polypeptide, il n'existe pas les multiples interactions (interactions hydrophobes, électrostatiques...) à l'intérieur de la chaîne permettant son repliement. Le repliement des protéines résulte de la balance complexe entre entropie et enthalpie. En faisant l'analogie entre la chaîne de PEG et une chaîne polypeptidique, nous pouvons considérer que l'encombrement diminue l'entropie conformationnelle de la protéine à l'état dénaturé. Si on revient au paysage énergétique du repliement de Dill (fig. 2.55), le niveau d'énergie a été abaissé. On est "plus bas dans l'entonnoir" d'un point de vue thermodynamique. L'encombrement macromoléculaire favorise les états de plus petit volume. Il diminue l'entropie conformationnelle de la protéine à l'état dénaturé, favorisant la compaction de la chaîne polypeptidique et déplace l'équilibre état natif - état dénaturé vers l'état natif de la protéine. Cependant, comme il n'y pas d'interactions enthalpiques à l'intérieur de la chaîne, il n'y a pas d'effondrement de la chaîne d'homopolymère.

L'analogie homopolymère-protéine à l'état dénaturé nous indique une destabilisation de la protéine à l'état dénaturé par une diminution de son entropie conformationnelle. La protéine à l'état natif serait stabilisée. Dans un second temps nous avons donc choisi d'étudier la dénaturation d'une protéine la myoglobine. En présence d'un agent d'encombrement, la dénaturation thermique de la myoglobine a lieu pour des températures plus élevées (on observe un décalage de l'ordre de la dizaine de degré). Comme nous l'avons observé pour l'homopolymère, on a pu observer que le rayon de giration de la chaîne polypeptidique dénaturée diminuait lorsqu'on augmentait la fraction massique en agent d'encombrement. Cette observation confirme l'analogie que nous avons pu faire sur la conformation de la chaîne d'homopolymère en présence d'encombrement, l'entropie conformationnelle de la chaîne diminue. Cette diminution de l'entropie conformationnelle de la chaîne à l'état dénaturé s'accompagne d'une stabilisation de la myoglobine native vis à vis de la dénaturation thermique. D'un point de vue qualitatif, l'effet de

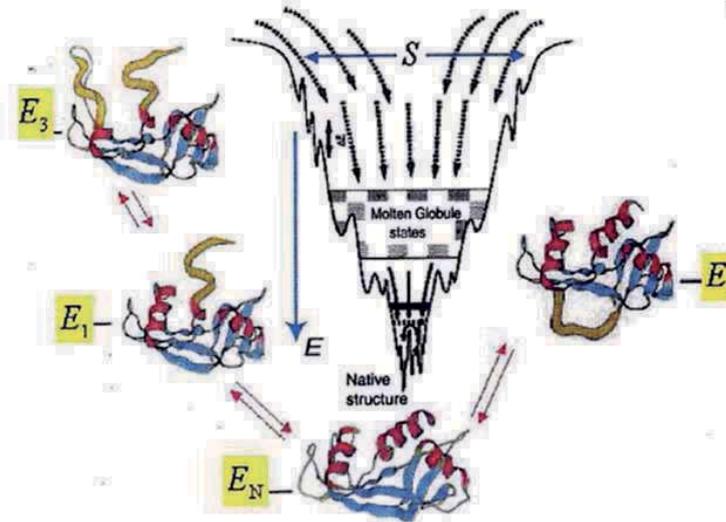


FIGURE 2.55 – Représentation énergétique du chemin de repliement. Ce schéma est un schéma en entonnoir. Selon notre étude, l'encombrement cytoplasmique diminuerait l'entropie conformationnelle de la chaîne dépliée.

l'encombrement semble en accord avec les études théoriques récentes de la littérature ^{[85][27][25]}. D'un point de vue quantitatif, l'influence de l'encombrement est plus complexe. L'importance de l'encombrement sur la dénaturation thermique dépend fortement des conditions expérimentales (protéine étudiée, agent d'encombrement utilisé, présence de chaotropes...). Nous avons pu observé qu'en modifiant la concentration en chaotrope (urée), le décalage dû à l'encombrement passait de quelques degrés (pour une concentration de 3M en urée) à une dizaine de degré (pour une concentration de 5.7M). Les effets de l'encombrement dépendent fortement du système étudié. Jusqu'à présent, il a été difficile de comprendre dans quelle mesure les conditions de tampon modifiaient l'influence de l'encombrement. Chaque système permet d'observer la stabilisation d'une protéine grâce à l'encombrement macromoléculaire, l'amplitude de ces stabilisations est cependant peu expliquée.

La cellule est un milieu complexe. In-vivo, l'encombrement n'est pas constitué d'une seule molécule de forme et de taille définies mais d'une multitude de molécules de formes et de tailles très différentes. Les études de l'effet de l'encombrement n'en sont qu'à leur balbutiement et

[85] Minton, A. *J. of Biol. Chem.* **276**(14), 10577–10580 (2001).

[27] Minton, A. *Biophys. J.* **78**(1), 101 – 109 (2000).

[25] Hall, D. and Minton, A. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. and Proteomics* **1649**(2), 127 – 139 (2003).

un affinement des modèles est nécessaire. Les résultats expérimentaux obtenus tendent tous à indiquer une stabilisation de la protéine à l'état natif grâce à l'encombrement. Ces résultats ainsi que l'importance de cette stabilisation sont fortement dépendants des systèmes étudiés.

Par ailleurs, notre étude a également montré que la présence d'encombrement favorisait les interactions attractives entre chaînes. Dans un système biologique, cela signifie que l'encombrement cytoplasmique favoriserait l'agrégation. Cette propriété est importante si on veut mieux comprendre la formation *in-vivo* d'assemblages moléculaires.

Notre étude a permis de trouver un système modèle permettant d'observer de manière qualitative l'influence de l'encombrement sur les structures secondaires et tertiaires d'une protéine. L'influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique, et donc sur l'équilibre de l'état natif peut être suivi par DNPA. Cette méthode permet d'obtenir des informations sur la conformation d'une protéine. Dans la mesure où nous avons dû modifier la nature et la forme de l'agent d'encombrement, l'étude que nous avons menée nous permet d'obtenir des informations qualitatives sur cette influence de l'encombrement sur la conformation de la myoglobine. L'étude sur une protéine deutérée permettrait d'utiliser le Ficoll comme agent d'encombrement et ainsi de pouvoir interpréter les résultats à l'aide des modèles théoriques qui modélisent l'encombrement par un cœur dur.

Chapitre **3**

Les solutions d'hémoglobine concentrées : un environnement encombré *in-vivo*

Sommaire

3.1 Généralités	116
3.2 Structure de l'hémoglobine en solution	117
3.2.1 L'hémoglobine en solution diluée	117
3.2.2 Solutions concentrées d'hémoglobine	119
3.3 Mesure de la dynamique par diffusion de neutrons à écho de spin (NSE)	122
3.3.1 Diffusion a temps court en solution concentrée : mesure par Echo de Spin	122
3.3.2 Etude en température proche de la température physiologique	127
3.3.3 Etude en concentration	128
3.4 Conclusion	129

Dans les globules rouges, l'hémoglobine atteint une concentration de l'ordre de 330 g.l^{-1} . Les solutions concentrées d'hémoglobine sont donc de bons systèmes, proches des solutions *in-vivo*, permettant l'étude de l'influence de l'encombrement sur les protéines *in-vitro*. Nous avons étudié des solutions d'hémoglobine à des concentrations allant de quelques grammes par litre à la concentration physiologique.

La présence de nombreuses macromolécules en solution modifie fortement la diffusion des protéines. L'étude de solutions encombrées est complexe car la diffusion de tels systèmes dépend de multiples coefficients de diffusion qui correspondent à des phénomènes collectifs ou individuels et à des temps différents.

Dans ce chapitre nous nous attacherons à étudier la structure de l'hémoglobine en solution concentrée, et leur dynamique à temps court.

3.1 Généralités

En solution concentrée, il n'existe plus un seul coefficient de diffusion, défini par la loi de Stokes-Einstein ou par une loi de Stokes généralisée (cf introduction), mais plusieurs régimes de diffusion dus aux interactions entre les particules. On en distingue généralement 3 types :

La diffusion libre pour $t \leq \tau_B$. τ_B est le temps que met la particule avant d'atteindre un régime brownien. Il dépend essentiellement de la masse de la particule étudiée et d'un coefficient de friction, f_0 obtenu par l'équation d'Einstein, $\tau_B \simeq M/f_0$.

La diffusion à temps court pour $\tau_B \leq t \leq \tau_i$. τ_i est le temps que met la particule pour interagir avec une autre. Les particules sont soumises aux interactions hydrodynamiques.

La diffusion à temps long pour $\tau_i \leq t$. Les particules sont soumises à toutes les interactions dans la solution (interactions hydrodynamiques et interactions entre particules).

La dynamique collective des solutions concentrées à temps court est un phénomène relativement bien compris d'un point de vue théorique ^{[86][87]}. Des modèles ont permis d'exprimer un coefficient de diffusion apparent qui décorrèle les interactions hydrodynamiques des interactions directes entre particules :

$$D^{app} = D^0 \frac{H(Q)}{S(Q)} \tag{3.1}$$

[86] Ackerson, B. *J. Chem. Phys.* **64**, 242–246 (1976).

[87] Ackerson, B. *J. Chem. Phys.* **69**, 684–690 (1978).

où $H(Q)$ est le facteur hydrodynamique ^{[88][89]}, $S(Q)$ le facteur de structure et D^0 le coefficient de diffusion défini par la relation de Stokes Einstein.

La dynamique à temps long n'a pas été clairement explicitée. Les phénomènes d'auto-diffusion à temps court et à temps long ont été approchés d'un point de vue théorique pour des solutions de sphères dures ^[90].

Dans ce chapitre, nous étudierons un système encombré le plus simple possible, l'hémoglobine à des concentrations physiologiques. Nous essaierons de comprendre sa structure et sa dynamique.

3.2 Structure de l'hémoglobine en solution

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hémoglobine est une protéine quasi sphérique dont la structure a été la deuxième déterminée par rayons X ^[4]. Sa forme est très proche de celle d'une sphère.

La diffusion des protéines en solution concentrée à temps court dépend de leur structure en solution que nous avons déterminée par DNPA. Cette étude permet de caractériser les interactions entre protéines à faible ou forte concentration.

3.2.1 L'hémoglobine en solution diluée

L'étude de l'hémoglobine en solution diluée est nécessaire à la détermination de son facteur de forme. Nous avons, dans un premier temps, étudié des solutions d'hémoglobine humaine diluée sous deux formes, oxy et met. Sur la figure 3.1, nous avons représenté le spectre de diffusion de l'oxyhémoglobine dans le D_2O pour une concentration de l'ordre de 10 g.l^{-1} .

A grand vecteur d'onde, l'intensité diffusée, $I(Q)$ décroît selon une pente en Q^{-4} , caractéristique des interfaces nettes. $I(Q)$ est ajustée par un facteur de forme de sphère. L'oscillation à $Q \approx 0.22 \text{ \AA}^{-1}$ correspond à la première oscillation du facteur de forme d'une sphère ou à la corrélation entre les monomères du tétramère. Ces résultats ont été comparés au facteur de forme calculé à partir de la position des atomes obtenue par rayons X grâce à un programme simple réalisé sur MATLAB effectuant. L'oscillation observée est décalée vers les plus petites valeurs de

[88] Gapinsky, J., Wilk, A., Patkowsky, A., Haüssler, W., Bianchio, A. J., Holmquist, G., Pecoraand, R., and Nagele, G. *J. chem. Phys* **123**, 054708 (2005).

[89] Gapinsky, J., Patkowsky, A., Bianchio, P., Holmquist, G., Meier, M., and Nagele, G. *J. chem. Phys* **126**, 104905 (2007).

[90] Tokuyama, M. and Oppenheim, I. *Phys. Rev. E* **50**, R16–R19 (1994).

[4] Perutz, M. *Nat.* **185**(4711), 416–422 (1960).

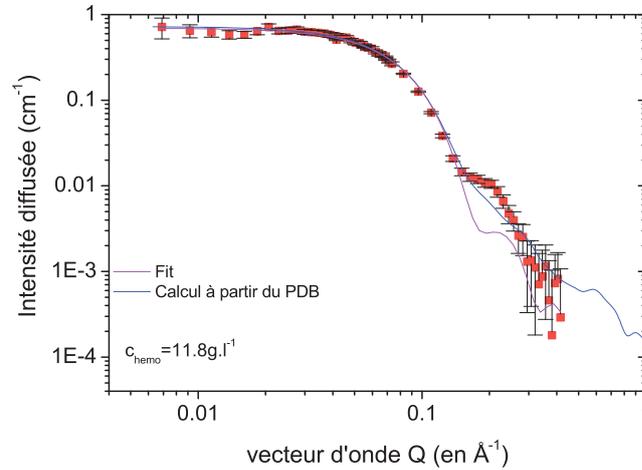


FIGURE 3.1 – Intensité diffusée normalisée de l'oxy-hémoglobine en solution diluée dans le D_2O . Les données ont été affinées par le facteur de forme d'une sphère (mauve). Le facteur de forme de l'hémoglobine calculé à partir de la structure PDB de la protéine est représenté en bleu.

Q par rapport au facteur de forme calculé. Les spectres de diffusion aux petits angles de la met et de l'oxyhémoglobine sont similaires : ils ne dépendent que très peu de l'état du ligand.

Une étude en concentration des solutions d'hémoglobine diluée (c_h de 3 à 12 $g.l^{-1}$) pour deux des formes de l'hémoglobine (forme met et forme oxy) (fig. 3.2), nous a permis de déterminer le rayon de sphère dure de l'hémoglobine et le second coefficient du viriel caractéristique des interactions entre protéines en solution diluée.

En extrapolant le rayon apparent à concentration nulle (fig. 3.2(a)), on obtient $R_0^{met} = 31.2 \pm 0.8 \text{ \AA}$ et $R_0^{oxy} = 30.4 \pm 0.6 \text{ \AA}$. En accord avec la littérature ^{[91][92]}, on observe un gonflement de la protéine après le départ du ligand. Les seconds coefficients du viriel sont $a_2 = 174\ 000 \pm 46\ 000 \text{ \AA}^3$ pour l'oxy et $a_2 = 134\ 000 \pm 30\ 000 \text{ \AA}^3$ la methemoglobine. Ces valeurs sont inférieures au second coefficient du viriel que l'on peut calculer pour une sphère dure de même rayon (de l'ordre de $500\ 000 \text{ \AA}^3$). Nous observerons, dans la suite de notre étude, l'hémoglobine dans une seule forme de ligand, l'oxy-hémoglobine.

[91] Schneider, R., Mayer, A., Schmatz, W., Kaiser, B., and Schmer, R. *The J. of mol biol.* **247**, 5436–5441 (1972).

[92] Schelten, J., Schelcht, P., Schmatz, W., and Mayer, A. *The J. of biol. chem.* **247**, 5436–5441 (1972).

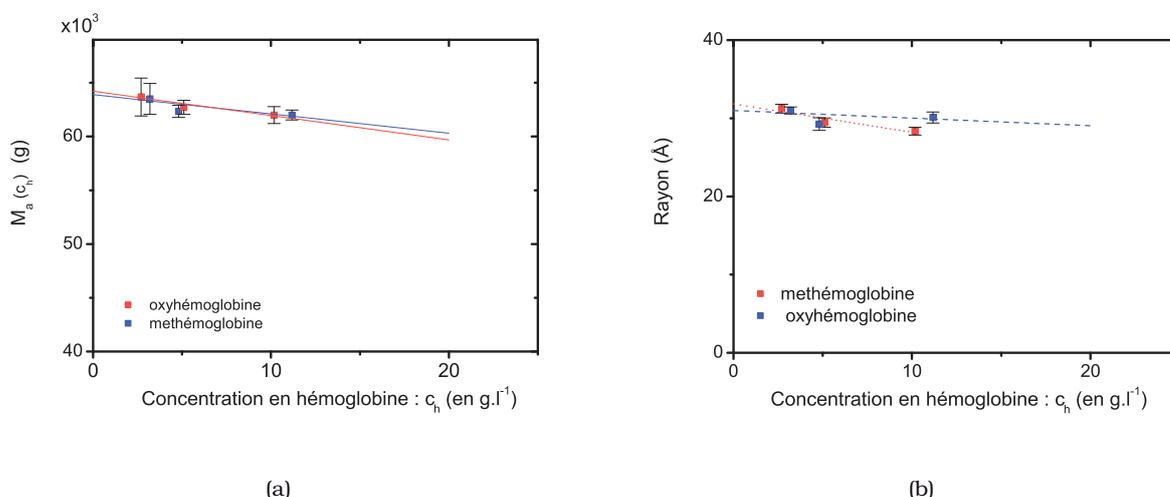


FIGURE 3.2 – Masse (a) et rayon de sphère dure (b) de l'hémoglobine en fonction de sa concentration.

3.2.2 Solutions concentrées d'hémoglobine

A plus forte concentration, le second coefficient du viriel ne peut caractériser les interactions entre protéines. Les termes d'ordre supérieure à 2 dans le développement de la pression osmotique ne sont plus négligeables et on doit en tenir compte dans le développement du viriel.

$$\Pi = \Pi_0(T)(1 + a_2 \cdot \rho_h + a_3 \cdot \rho_h^2 + \dots) \quad (3.2)$$

où ρ_h est la densité en hémoglobine et $\Pi_0(T) = \rho_h kT$. Afin de caractériser les interactions protéine-protéine en solutions concentrées, nous avons étudié par DNPA l'hémoglobine pour 4 concentrations différentes : $c_h = 50, 220, 335, 420 \text{ g.l}^{-1}$. Pour des objets centrosymétriques, l'intensité cohérente diffusée est approximativement :

$$I(Q) = \Phi v_0^2 \Delta \rho^2 P(Q) S(Q) \quad (3.3)$$

où Φ est la fraction volumique en particules, v_0 leur volume. $P(Q)$ est le facteur de forme de la particule et $S(Q)$ le facteur de structure particule-particule. On obtient le facteur de structure des solutions d'hémoglobine concentrées en divisant l'intensité diffusée par le facteur de forme normalisé obtenu à faible concentration (normalisé par les concentrations).

Pour chacune des 4 concentrations (fig. 3.3(a)), on observe une très faible agrégation de l'hémoglobine (même pour celles les plus élevées).

Un pic de structure qui correspond aux corrélations entre molécules apparaît lorsque la concentration augmente. Pour la solution la moins concentrée ($c_h = 50 \text{ g.l}^{-1}$), le pic de structure, observé à $Q \approx 0.08 \text{ \AA}^{-1}$, est relativement faible. Le vecteur d'onde, Q_{max} , et l'intensité du pic

correspondant au maximum de $S(Q)$ augmentent lorsque la concentration augmente. Sa position varie linéairement en fonction de $c_h^{1/3}$ (fig. 3.4).

Les interactions entre protéines peuvent être calculées à partir de modèles mis au point pour les colloïdes.

Nous pouvons, en première approximation, utiliser le modèle de Percus-Yevick ^[93]. Il permet de modéliser les interactions entre deux sphères dures non chargées et comprend 2 paramètres : le rayon de sphère dure de la particule, R_0 et la fraction volumique des sphères. Ce modèle peut nous sembler pertinent étant donné que nous étudions des solutions d'hémoglobine, proche de son point isolélectrique. Le rayon de sphère dure obtenue varie très peu lorsque la concentration augmente, cependant il est inférieur au rayon de sphère dure mesuré précédemment en solution diluée ou trouvé dans la littérature (respectivement 31.2 et 31.3 Å). Les fractions volumiques obtenues sont légèrement supérieures à celles mesurées directement. Ce modèle semble relativement robuste.

Dans un second temps, nous pouvons affiner notre modélisation et utiliser un modèle MSA (Mean Spherical Approximation) ^[94] calculé par Hayter et Penfold qui permet d'obtenir le facteur de structure d'une solution de colloïdes à l'aide d'un potentiel d'interaction $V(r)$ de type sphère dure possédant une queue électrostatique. Il est décrit par :

$$V(r) = +\infty \text{ pour } r < 2R_0 \quad (3.4a)$$

$$\beta V(r) = V_{ij}(2R_0) \cdot \frac{2R_0}{r} e^{-\kappa(r-2R_0)} \text{ pour } r > 2R_0 \quad (3.4b)$$

où κ est l'inverse de la longueur de Debye et $V_{ij}(R_0)$ est le potentiel de contact. Il dépend de la charge de contact de la protéine Z_p .

L'ajustement de type MSA a été corrigé par Belloni ^[95] dans le cas des fortes concentrations en sphères chargées. Il nous permet de tirer deux principaux paramètres : le rayon de l'hémoglobine et sa charge effective. Les rayons de sphères dures mesurés sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus grâce au modèle de Percus-Yevick. Cette étude a été menée à pH 7, proche du point isolélectrique de l'hémoglobine. La charge effective de la protéine obtenue, comprise entre 1 et 1.8, est cohérente avec le pH de la solution. Une étude similaire a été menée précédemment à différents pH (ou pD) par Krueger ^[96] et pour des solutions de myoglobine concentrée ^[97]. Les résultats issus des deux modèles "MSA" et "Percus-Yevick" sont cohérents. Le modèle de Percus-Yevick, bien que moins bon que le MSA, est relativement robuste dans notre cas car, comme

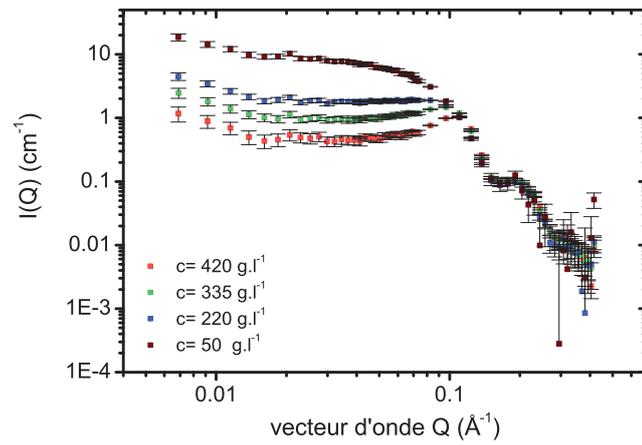
[93] Percus, J. and Yevick, G. *Phys. rev.* **110**(1), 1–13 (1958).

[94] Hayter, J. and Penfold, J. *Molecular Phys.* **42**(1), 109–118 (1981).

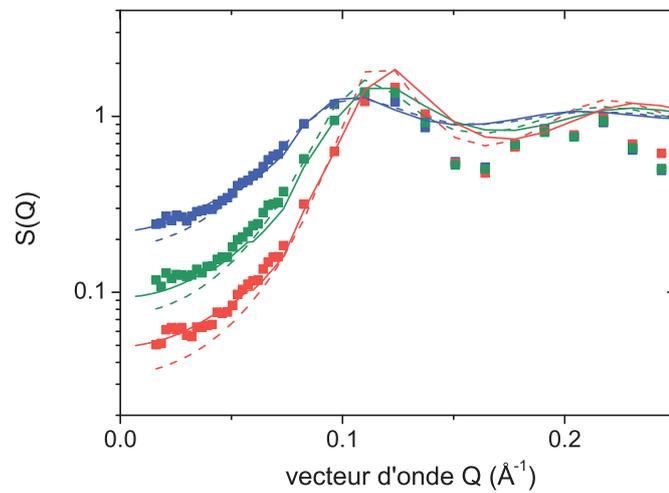
[95] Belloni, L. *J. Chem. Phys.* **85**(1), 519–526 (1986).

[96] Krueger, S., Chen, S., Hofrichter, J., and Nossal, R. *Biophys. J.* **58**(3), 745–757 (1990).

[97] Longeville, S., Doster, W., and Kali, G. *Chem. Phys.* **292**(2-3), 413–424 (2003).



(a)



(b)

FIGURE 3.3 – (a) : Intensité diffusée pour 4 concentrations $c_h = \blacksquare$: 50 g.l^{-1} ; \blacksquare : 250 g.l^{-1} ; \blacksquare : 335 g.l^{-1} ; \blacksquare : 420 g.l^{-1} . (b) : Facteur de structure, $S(Q)$ des trois concentrations les plus élevées affiné par un facteur de forme découlant du modèle de Percus-Yevick (trait plein) ou du modèle MSA (pointillés).

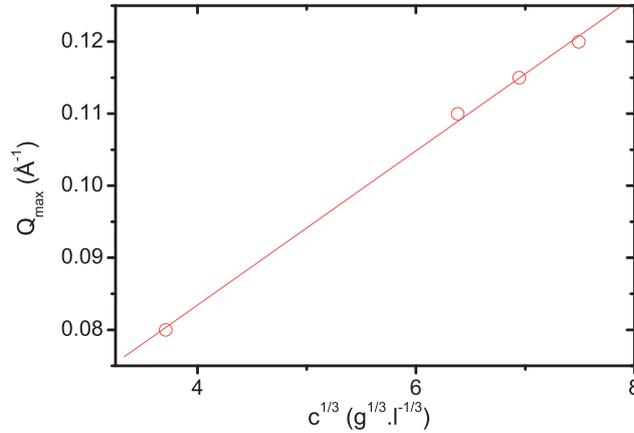


FIGURE 3.4 – Evolution du maximum du pic de structure en fonction de la concentration en hémoglobine affinée par une fonction linéaire.

Conc ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	R_0^{PY} (Å)	Φ^{PY}	R_0^{MSA} (Å)	Z_p^{MSA}
250	28.87	0.21	28.4	1.8 e
350	28.70	0.32	27.2	1.3 e
440	28.16	0.41	27.1	1 e

TABLE 3.1 – récapitulatif MSA

nous l'avons montré pour MSA, la charge effective de l'hémoglobine étant faible, les solutions peuvent être comparées à des solutions de sphères dures non chargées.

3.3 Mesure de la dynamique par diffusion de neutrons à écho de spin (NSE)

3.3.1 Diffusion a temps court en solution concentrée : mesure par Echo de Spin

La dynamique des solutions concentrées de protéines aux temps longs a été étudiée, notamment pour des solutions de myoglobine [98]. Les résultats expérimentaux correspondent relativement bien à ceux obtenus par calcul théorique. Dans cette étude, nous avons choisi d'observer

[98] Doster, W. and Longeville, S. *Biophys. J.* **93**(4), 1360 – 1368 (2007).

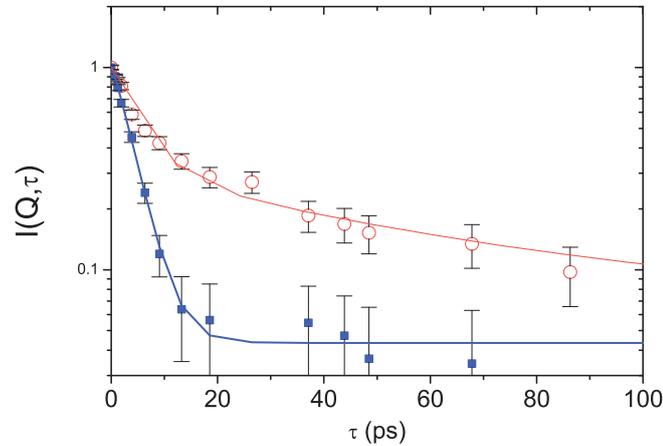


FIGURE 3.5 – Fonction intermédiaire de diffusion d'une solution d'hémoglobine à la concentration $c_h = 350 \text{ g.l}^{-1}$ à $Q = 1 \text{ \AA}^{-1}$.

la transition de l'auto-diffusion à temps long à celle à temps court.

Nous avons étudié la fonction intermédiaire de diffusion par écho de spin d'une solution d'hémoglobine à 350 g.l^{-1} à 310K et au vecteur d'onde $Q = 1 \text{ \AA}^{-1}$. Pour des raisons de polarisation du faisceau diffusé, les mesures ont été effectuées dans l'eau légère. Nous devons séparer les contributions liées au solvant et à la protéine. Chacune d'entre elles est proportionnelle au nombre de protons respectifs. Pour de telles concentrations, la quantité de protons de la protéine représente environ 22% du nombre total. Nous avons également mesuré la relaxation du solvant seul, c'est à dire de l'eau légère. La figure 20 représente les fonctions intermédiaires, $I(Q, \tau)$, de la solution d'hémoglobine et de l'eau pure mesurées sur G1 Bis à Saclay. En ajustant nos résultats par une simple exponentielle décroissante, nous mesurons un temps de diffusion de l'eau de $D_s = 2.28 \pm 0.06 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette mesure est très proche des coefficients de diffusion trouvés dans la littérature ^{[99][100]} $D_s = 2.37 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Dans la solution d'hémoglobine, la dynamique de l'eau légère est modifiée et son temps caractéristique de relaxation est supérieur de 50% au temps de l'eau pure.

En ajustant les résultats obtenus pour la solution d'hémoglobine par une double exponentielle, nous extrayons un temps de caractéristique pour la protéine de, $\tau = 67 \pm 15 \text{ ps}$. On détermine le coefficient de diffusion apparent associé (celui qui correspond à une relaxation associée à un mouvement d'auto diffusion), $D^{app} = \frac{1}{\tau Q^2} = 14.9 \pm 3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

[99] Mills, R. *J. of phys. chem.* **77**(5), 685–688 (1973).

[100] Dipple, T. Phd thesis, Max Planck Institut für Metallforschung, Institut Physik Stuttgart, (1991).

Origine du temps de relaxation observé

Un mouvement purement diffusif a un temps de relaxation, τ , proportionnel à l'inverse du carré du vecteur d'onde. Nous avons étudié la fonction intermédiaire de diffusion par Echo de Spin à la même concentration pour différents vecteurs d'onde $Q=1.5$ et 1.9 \AA^{-1} afin d'observer cette dépendance (fig. 3.6). On obtient $\tau=55 \pm 18$ ps pour $Q=1.5 \text{ \AA}^{-1}$ et pour $Q=1.9 \text{ \AA}^{-1}$ on ne peut mesurer que le temps de relaxation de l'eau. La relativement grande incertitude ne nous permet pas d'observer la dépendance en Q^2 caractéristique des phénomènes diffusifs.

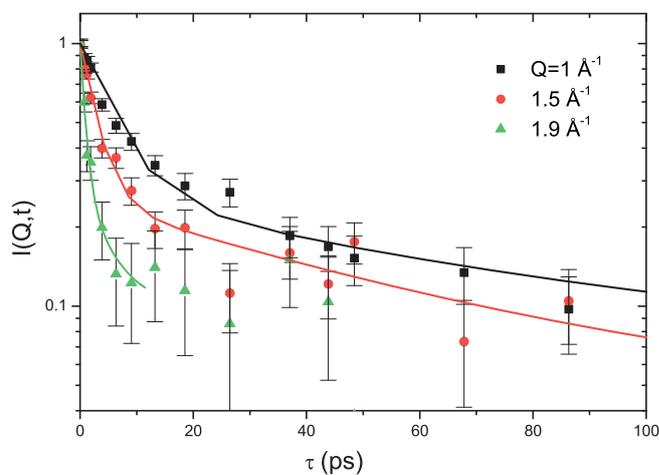


FIGURE 3.6 – Fonction intermédiaire de diffusion de l'hémoglobine à 350 g.l^{-1} pour trois vecteurs d'onde différents : $Q=1, 1.5$ et 1.9 \AA^{-1} .

Afin d'essayer de comprendre à quoi correspond ce temps de relaxation, on peut le comparer au coefficient de l'hémoglobine à la même concentration et à la même température obtenue par diffusion d'écho de spin directement dans le globule rouge, $D_s^l = 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ [98] et à celui obtenu pour une solution infiniment diluée $D^0=6.8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ [101]. D^0 est théoriquement la valeur limite pour les coefficients d'auto diffusion à temps court et à temps long (fig. 3.7). La relaxation que nous observons ne peut être associée à un mouvement purement diffusif translationnel.

Un mouvement rotationnel brownien ?

Il nous faut donc chercher un autre mécanisme à l'origine du temps de relaxation mesuré. Les protéines possèdent un mouvement rotationnel Brownien dont l'origine est comparable au translationnel. Il est dû au moment aléatoire créé par les collisions non compensées des molécules

[98] Doster, W. and Longeville, S. *Biophys. J.* **93**(4), 1360 – 1368 (2007).

[101] Hall, R. and Johnson, C. *The J. of Chem. Phys.* **72**(7), 4251–4253 (1980).

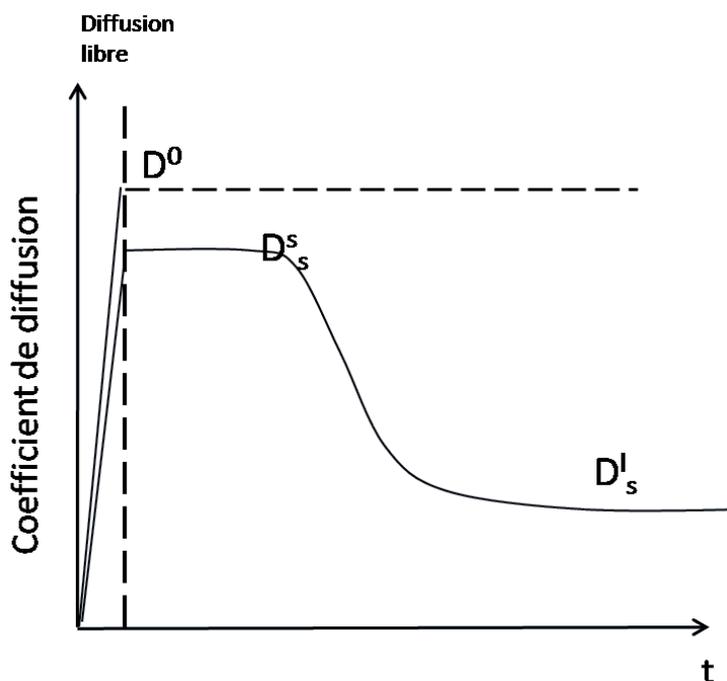


FIGURE 3.7 – Evolution des coefficients de diffusion à différentes échelles de temps. D^0 est le coefficient issu de la relation de Stokes Einstein, il n'y a qu'un seul régime temporel. D_s^s et D_s^l sont les coefficients d'auto diffusion à temps court et long.

du solvant avec les protéines. Pour des particules sphériques homogènes, ce mouvement ne contribue pas au signal cohérent diffusé mais seulement au signal incohérent.

A partir du développement effectué par Sears [102], nous pouvons estimer la contribution du mouvement rotationnel à la fonction intermédiaire de diffusion obtenue par diffusion de neutrons à écho de spin pour un seul proton. Un calcul similaire a été effectué par Perez [103] pour les fonctions intermédiaires de diffusion dans le domaine des énergies.

$$I(Q, t) = e^{-D_s Q^2 t} \sum_{l=0}^{\infty} A_l(Qr) e^{-l(l+1)D^r t} \quad (3.5)$$

où $A_l(Q.r) = (2l + 1)j_l^2(Qr)$ est la fonction de Bessel sphérique tel que $j_l(x) = \sqrt{\frac{\pi}{2x}} J_{l+1/2}(x)$, D_s est le coefficient de diffusion translationnel, D^r est le coefficient rotationnel et $J_i(x)$ est la fonction de Bessel d'ordre i .

En sommant sur l'ensemble des N protons de la protéine, on obtient :

$$I(Q, t) = e^{-D_s Q^2 t} \sum_{i=1}^N \left(\sum_{l=0}^{\infty} A_l(Qr_i) e^{-l(l+1)D^r t} \right) \quad (3.6)$$

[102] Sears, V. *Can. J. of Phys.* **45**, 237 (1967).

[103] Pérez, J., Zanotti, J.-M., and Durand, D. *Biophys. J.* **77**(1), 454 – 469 (1999).

Sachant que l'hémoglobine peut être considérée comme une sphère, on peut remplacer la somme par une intégrale de 0 à R_0 le rayon de la sphère dure :

$$I(Q, t) = e^{-D_s Q^2 t} \frac{1}{R_0^3} \int_0^{R_0} \left(\sum_{l=0}^{\infty} A_l(Qr) e^{-l(l+1)D^r t} \right) r^2 dr \quad (3.7)$$

Nous avons calculé cette fonction pour Q allant de 0 à 2 \AA^{-1} pour une sphère de rayon 28 \AA (en approximant la fonction de Bessel). Pour chaque vecteur d'onde, nous avons ensuite affiné la fonction intermédiaire de diffusion par une exponentielle étirée $e^{-(t/\tau)^\beta}$. L'exposant β reste sensiblement égal à 1. L'inverse du temps de relaxation obtenue est représenté sur la figure 3.9 pour $D_s=0$ en fonction du carré du vecteur d'onde, Q^2 .

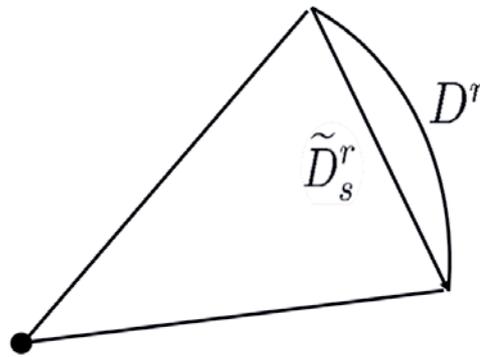


FIGURE 3.8 – La diffusion brownienne rotationnelle de coefficient de diffusion D^r peut être vue comme une diffusion translationnelle apparente due à la rotation de coefficient de diffusion, \tilde{D}_s^r .

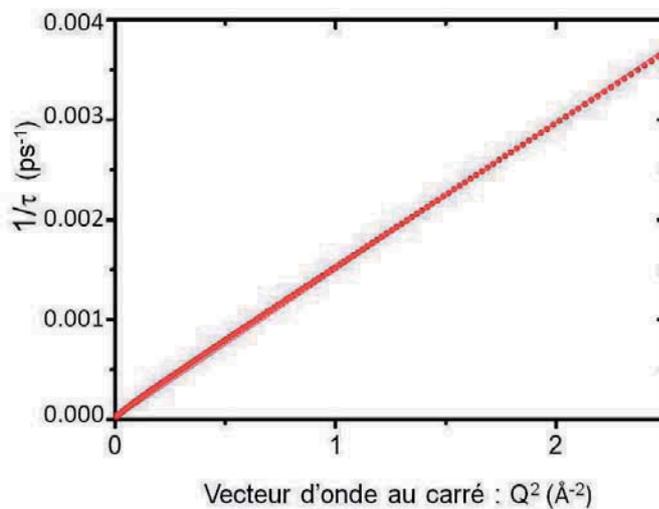


FIGURE 3.9 – Inverse du temps de relaxation obtenu pour un mouvement rotationnel brownien pour $D_s=0$ en fonction du carré du vecteur d'onde, Q^2 .

Dans cette gamme de vecteur d'onde, l'inverse du temps de relaxation est proportionnel à Q^2 et on peut définir un coefficient de diffusion apparent dû à la rotation $\tilde{D}_s^r = 1/\tau$. A grand vecteur d'onde, on peut interpréter la diffusion rotationnelle comme une diffusion translationnelle apparente qui s'ajouterait au mouvement translationnel brownien (fig. 3.8) :

$$\tilde{D}_s = D_s + \tilde{D}_s^r \quad (3.8)$$

A partir d'études antérieures, nous pouvons essayer d'obtenir l'ordre de grandeur du coefficient, $\tilde{D}_s = D_s + \tilde{D}_s^r$, pour une sphère dure de rayon 28 Å.

Pour une concentration de 350 g.l⁻¹, le coefficient translationnel D^s est de l'ordre de la moitié de D^0 , $D^s \simeq D^0/2$ (cela correspond aux prédictions théoriques [21])

Des temps de diffusion rotationnelle ont été obtenus par RMN [104] pour l'hémoglobine en solution diluée, $\tau_{dil} = 37.7 \pm 2.1 \cdot 10^{-9}$ s, et dans les globules rouges, $\tau_{gr} = 84.0 \pm 4.3 \cdot 10^{-9}$ s. Cela nous permet d'obtenir leur coefficient de diffusion respectif à partir du développement de Sears : $\tilde{D}_{dil}^r = 6.4 \cdot 10^{-7}$ cm².s⁻¹ et $\tilde{D}_{gr}^r = 2.8 \cdot 10^{-7}$ cm².s⁻¹.

On obtient l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion apparent lié à la relaxation d'un tel mouvement, $\tilde{D}_s = D_s + \tilde{D}_{gr}^r = 6.2 \cdot 10^{-7}$ cm².s⁻¹. Cette valeur est très inférieure à la valeur mesurée, $D^{app} = 14.9 \pm 3 \cdot 10^{-7}$ cm².s⁻¹. (plus de 2.5 fois inférieure). Ce coefficient apparent doit donc être associé à une autre contribution, probablement liée à un mouvement interne.

3.3.2 Etude en température proche de la température physiologique

Des études récentes [105] [106] ont montré une transition dynamique à la température physiologique de 310K. Quel que soit l'état d'oxydation de l'hémoglobine, une étude de la viscosité des solutions d'hémoglobine concentrées permet d'observer une transition de celle-ci à 309.4K. Selon les auteurs [107] [108], cette transition dynamique de l'hémoglobine serait liée à une transition dynamique de l'auto-diffusion à temps court.

Nous avons essayé de voir si cette transition était observable par Echo de Spin en étudiant la solution d'hémoglobine concentrée pour quatre températures entre 300 et 315K. La fonction intermédiaire de diffusion ne montre aucune différence significative (fig. 3.10) lorsque la température augmente. Nos mesures ne permettent donc pas d'observer une telle transition. Cette

[21] Minton, A. *Molecular and Cellular Biochem.* **55**, 119–141 (1983).

[104] Wang, D., Kreutzer, U., Chung, Y., and Jue, T. *Biophys. J.* **73**(5), 2764 – 2770 (1997).

[105] Kelemen, C., Chien, S., and Artmann, G. *Biophys. J.* **80**(6), 2622–2630 (2001).

[106] Artmann, G., Burns, L., Canaves, J., Temiz-Artmann, A., Schmid-Schonbein, G., Chien, S., and Maggakis-Kelemen, C. *Europ. biophys. J.* **33**(6), 490–496 (2004).

[107] Digel, I., Maggakis-Kelemen, C., Zerlin, K., Linder, P., Kasischke, N., Kayser, P., Porst, D., Artmann, A., and Artmann, G. *Biophys. J.* **91**(8), 3014–3021 (2006).

[108] Stadler, A., Digel, I., Artmann, G., Embs, J., Zaccai, G., and Bueldt, G. *Biophys. J.* **95**(11), 5449–5461 (2008).

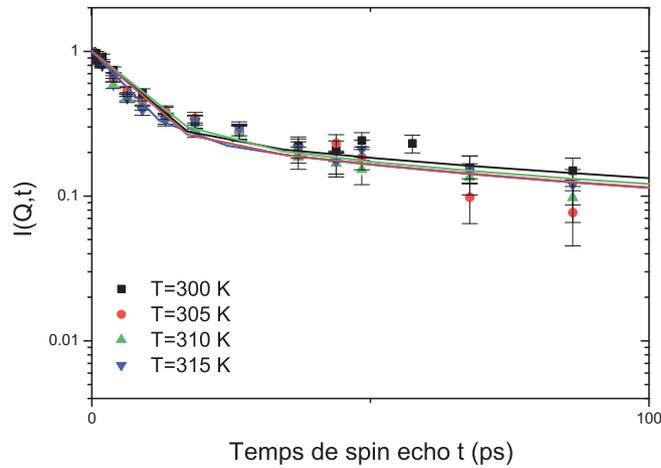


FIGURE 3.10 – Fonction intermédiaire de la solution d'hémoglobine concentrée ($c_h = 300 \text{ g.l}^{-1}$) à $Q=1 \text{ \AA}^{-1}$, à 4 températures : $T=300, 305, 310$ et 315K .

apparente contradiction avec les études précédentes peut être due à l'incertitude relativement importante de nos mesures, ou au fait que nous ne soyons pas forcément dans la bonne fenêtre d'observation de cette transition. Selon ces études la transition serait due à une dénaturation réversible partielle de l'hémoglobine à la température physiologique. Cet effet, potentiellement très important d'un point de vue physiologique, requiert une étude plus approfondie.

3.3.3 Etude en concentration

Un mouvement purement diffusif a un temps de relaxation qui dépend de la concentration en macromolécules. Pour un mouvement purement interne, cette dépendance est plus complexe. L'encombrement modifie la viscosité du solvant, ce qui peut induire une modification de la dynamique interne de la protéine. La température modifie également la viscosité de l'eau. L'étude précédente ne nous permet pas d'observer une modification notable de la relaxation en fonction de la température. S'il est indépendant de la viscosité, un mouvement interne aurait un temps de relaxation qui ne dépendrait à priori pas de la concentration en hémoglobine. Nous avons étudié des solutions d'hémoglobine plus et moins concentrées que la concentration physiologique à $T=300\text{K}$ pour le même vecteur d'onde que précédemment, $Q=1\text{\AA}^{-1}$ (fig. 3.11, fig. 3.12(b)). Pour les 2 concentrations étudiées $c_h=400$ et 250 g.l^{-1} , la quantité de protons de la protéine représente respectivement environ 25% et 16% du nombre total de protons .

Les résultats des affinements nous permettent d'extraire des temps de relaxation de $\tau_{400}=95 \pm 19 \text{ ps}$ et $\tau_{250}=36 \pm 12 \text{ ps}$, ce qui donne des coefficients de diffusion apparents : $D_{400}^{app} = 10.5 \pm 3.10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ et $D_{250}^{app} = 27.3 \pm 7 .10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. Même si l'incertitude de nos mesures est

relativement élevée, nous observons que le coefficient de diffusion apparent augmente quand la concentration en hémoglobine diminue et que donc la viscosité de la solution diminue. La relaxation observée ne serait pas liée à un mouvement purement interne.

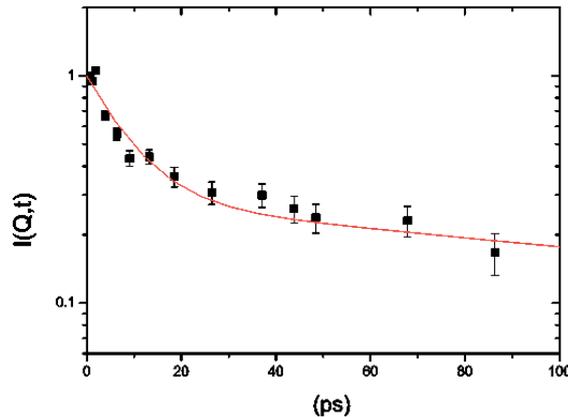


FIGURE 3.11 – Fonction intermédiaire de diffusion pour $c_h=400 \text{ g.l}^{-1}$, $Q=1\text{\AA}^{-1}$ et $T=300\text{K}$.

Pour la concentration $c_h=250 \text{ g.l}^{-1}$, nous avons également fait une étude en fonction du vecteur de diffusion (fig. 3.12(b)). $1/\tau$ augmente avec le vecteur d'onde mais il est difficile d'observer réellement une dépendance en Q^2 . Pour des vecteurs d'onde élevés ($Q=1.5$ et 1.7\AA^{-1}), l'incertitude est due en grande partie au fait que le signal de l'eau et celui de la protéine sont difficilement séparables.

3.4 Conclusion

Les solutions concentrées d'hémoglobine sont probablement un des systèmes biologiques les plus simples permettant d'observer l'encombrement dans des conditions proches de celles existantes *in-vivo*. Des études ont permis d'étudier la dynamique de l'hémoglobine à l'intérieur même des globules rouges [98]. L'étude *in-vitro* permet de varier les paramètres tels que la concentration, le pH, la salinité... afin de mieux comprendre la dynamique *in-vivo*. Les solutions concentrées et, plus généralement encombrées, restent des systèmes dont la dynamique est complexe. Nous devons décorréler la dynamique associée aux mouvements internes de la protéine et celle liée à la diffusion normale ou anormale induite par l'encombrement de la solution.

[98] Doster, W. and Longeville, S. *Biophys. J.* **93**(4), 1360 – 1368 (2007).

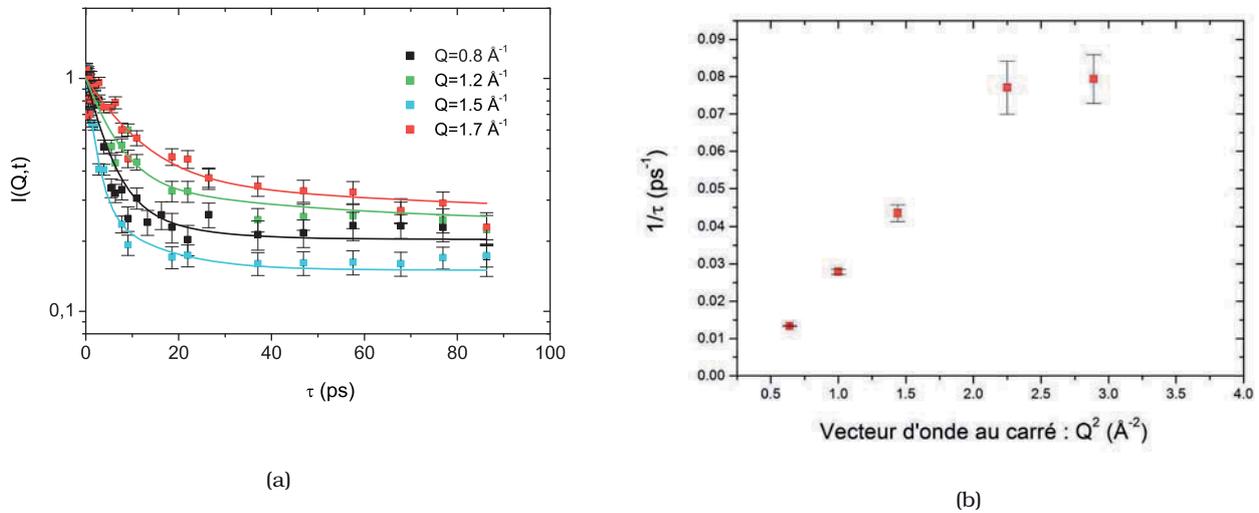


FIGURE 3.12 – (a) Fonction intermédiaire de diffusion pour $c_h=250 \text{ g.l}^{-1}$ et $T=300\text{K}$ pour $Q=0.8, 1.2, 1.5$ et 1.7 \AA^{-1} . (b) $1/\tau$ obtenu ajustement en fonction du carré du vecteur d'onde, Q^2 .

Notre étude a permis de mettre en évidence un phénomène de relaxation qui ne peut être interprété uniquement en terme de mouvement diffusif. Celui-ci dépend de la concentration mais nos mesures ne permettent pas de mettre en évidence une dépendance claire en fonction du vecteur d'onde. Par ailleurs, les études actuelles observent une transition dynamique à temps court autour de la température physiologique de 37°C . Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une telle transition.

Afin de comprendre le mouvement associé à nos mesures et leur dépendance en fonction de la température et du vecteur d'onde, nous compléterons notre étude pas d'autres mesures, notamment, par des mesures de Temps de Vol. Une étude visant à observer sa dispersion est en cours.

Chapitre **4**

Le complexe

PEG-hémoglobine-PEG : corrélation structure réactivité

Sommaire

4.1 Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, un substitut sanguin	134
4.1.1 Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, une efficacité peu comprise	134
4.1.2 Préparation des échantillons	135
4.1.3 Caractérisation	135
4.2 Structure du complexe PEG-hémoglobine	137
4.2.1 Greffage de chaînes de PEG deutérées, analyse du complexe D-Peg-Hb-D-PEG	138
a) Observation de l'hémoglobine	138
b) Observation de la conformation des PEG	140
4.2.2 Informations "globales" sur le complexe	142
4.2.3 Les différents modèles de greffage	145
4.3 Discussion	147

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hémoglobine joue un rôle extrêmement important d'un point de vue physiologique puisqu'elle permet de transporter entre autre les gaz di et tri atomiques, comme l'oxygène, des poumons aux tissus ou vis versa. Etant donné son rôle primordial, de nombreux substituts sanguins ont été développés.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à la structure d'un des transporteurs d'oxygène actuellement à l'étude, le complexe PEG-hémoglobine-PEG. Sa toxicité et son efficacité dépendent fortement du poids moléculaire du PEG greffé et nous essaierons de comprendre comment sa structure peut nous donner des informations ses qualités.

4.1 Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, un substitut sanguin

4.1.1 Le complexe PEG-hémoglobine-PEG, une efficacité peu comprise

La pegylation de l'hémoglobine acellulaire diminue fortement les effets vasoconstrictifs. Ce phénomène n'est pas encore tout a fait compris. Plusieurs explications sont avancées :

- le complexe PEG-Hb-PEG est plus gros, et, il est donc plus difficile pour lui d'entrer dans l'espace interstitiel.
- le complexe a une plus basse pression de demi saturation en O_2 (ref [9]). Sa grande viscosité et sa pression oncotique peuvent induire des changements de l'effet vasoconstrictif [109] [110] [72].
- les PEG greffés "cachent" un site de l'hémoglobine entrant dans le mécanisme de réaction avec NO .

La masse moléculaire de l'hémoglobine est augmentée par la pegylation [111][72][112]; cependant, les propriétés du complexe ne sont pas reliées linéairement à sa masse moléculaire. Des complexes de différents poids moléculaires ont été étudiés en greffant des PEG de différentes masses moléculaires. Tout d'abord, l'effet vasoconstrictif dû à l'hémoglobine diminue lorsqu'on augmente la masse du PEG, puis, arrivé à un certain seuil, l'effet vasoconstrictif augmente, augmentant ainsi la pression artérielle. La conformation du PEG sur l'hémoglobine apparaît être un

[109] Winslow, R., Gonzales, A., Gonzales, M., Magde, M., McCarthy, M., Rohlf, R., and Vandegriff, K. *J. of Applied Physiology* **85**(3), 993–1003 (1998).

[110] Manjula, B., Tsai, S., Upadhyay, R., Perumalsamy, K., Smith, P., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R., Intaglietta, M., Prabhakaran, M., Friedman, J., and Acharya, A. *Bioconj. chem.* **14**(2), 464–472 (2003).

[72] Manjula, B., Tsai, A., Intaglietta, M., Tsai, C., Ho, C., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R., Smith, P., Perumalsamy, K., Kanika, N., Friedman, J., and Acharya, A. S. *J. Biol. Chem.*, 403468200 (2004).

[111] Migita, R., Gonzales, A., Gonzales, M., Vandegriff, K., and Winslow, R. *J. Appl. Physiology* **82**(6), 1995–2002 (1997).

[112] Gattoni, M., Boffi, A., and Chiancone, E. *FEBS letters* **424**(3), 275–278 (1998).

facteur déterminant dans les propriétés du complexe PEG-hémoglobine-PEG [72]. L'étude de la structure du complexe PEG-hémoglobine-PEG est particulièrement importante pour comprendre ce mécanisme.

Le but de notre étude est d'étudier l'influence de la taille du polymère greffé sur la structure du complexe.

4.1.2 Préparation des échantillons

Le complexe PEG-hémoglobine-PEG est synthétisé en plusieurs étapes. Le PEG ne possède pas de site spécifique capable de se fixer sur l'hémoglobine. C'est pourquoi, le PEG a besoin d'être fonctionnalisé avant d'être greffé sur les fonctions thiol des deux cystéines des chaînes β .

Pour cette étude, nous avons utilisé un PEG monofonctionnel, le mono methoxy poly(ethylene glycol). Il possède une seule terminaison $-OH$ afin d'éviter les réactions de condensation ou le greffage d'un même PEG sur deux thiols différents. Il a besoin d'être fonctionnalisé par une fonction maléïmide afin de réagir avec les cystéines. L'hémoglobine possède six fonctions cystéines (en orange et rouge sur la représentation de la figure 4.1) dont seules deux sont accessibles (en rouge). Chaque PEG étant monofonctionnel, chaque molécule sera greffée au maximum de deux chaînes de polymère.

La préparation des échantillons (préparation de l'hémoglobine, fonctionnalisation des PEG et greffage) est décrite précisément dans les annexes. La solution finale est constituée du complexe hémoglobine PEG. Le greffage du PEG sur l'hémoglobine peut être partiel.

4.1.3 Caractérisation

Avant de caractériser le complexe PEG-hémoglobine-PEG, nous étudions chacun des éléments du système. L'hémoglobine utilisée a été précédemment étudiée par DNPA (chap 5).

Nous avons caractérisé les PEG greffés par DNPA. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3, le facteur de forme peut être affiné par une fonction de Debye. Le rayon de giration apparent et l'intensité à vecteur d'onde nul ont été déterminés à partir des ajustements effectués pour plusieurs concentrations. Le rayon de giration et la masse des objets diffusants ont été déterminés par extrapolation des résultats à concentration nulle (fig. 4.2 et fig. 4.3).

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 3), le PEG est un polymère gaussien. Les rayons de giration des PEG obtenus par diffusion de neutrons sont assez bien approximés par le calcul du rayon de giration en fonction de son nombre de monomères à la puissance $1/2$. Le PEG

[72] Manjula, B., Tsai, A., Intaglietta, M., Tsai, C., Ho, C., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R., Smith, P., Perumalsamy, K., Kanika, N., Friedman, J., and Acharya, A. S. *J. Biol. Chem.* , 403468200 (2004).

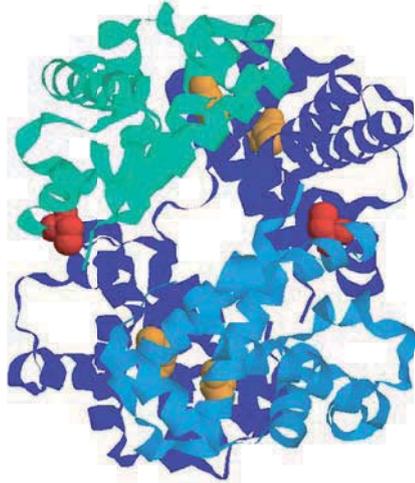


FIGURE 4.1 – Représentation de l'hémoglobine : les chaînes α sont représentées en bleu foncé, les chaînes β en vert et bleu clair. En rouge, sont représentés les atomes des cystéines 93 accessibles au PEG, en orange, les atomes des cystéines inaccessibles au PEG.

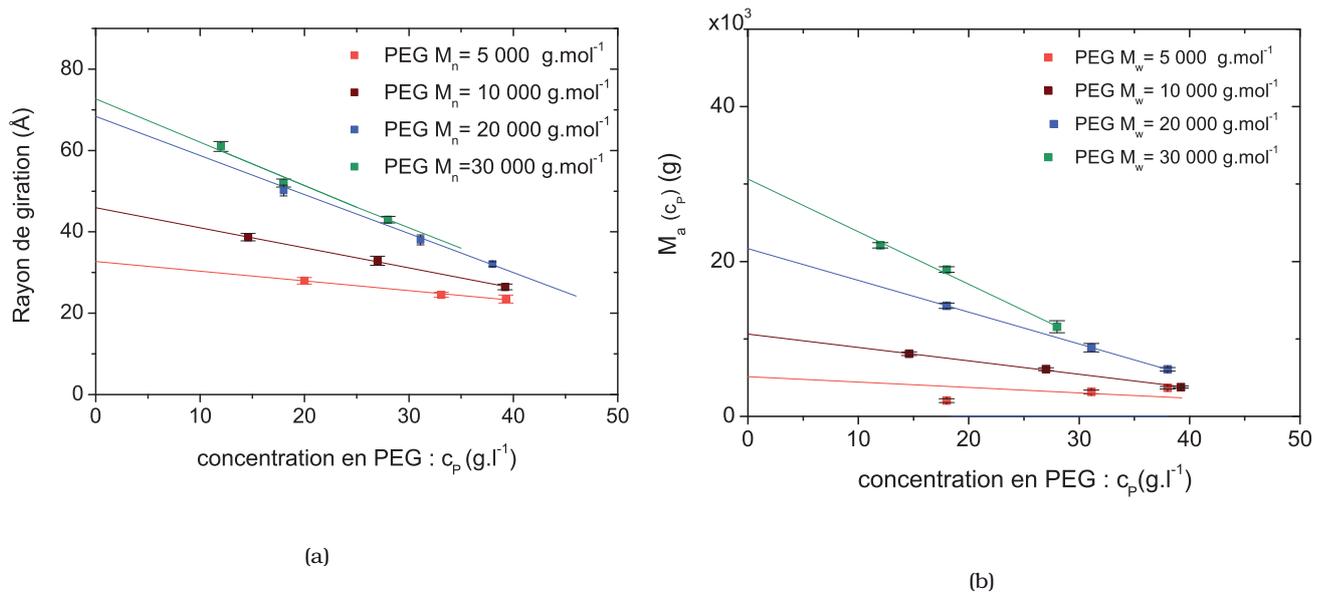


FIGURE 4.2 – Détermination du rayon de giration (a), de la masse et du second coefficient du viriel (b) des H-PEG utilisés.

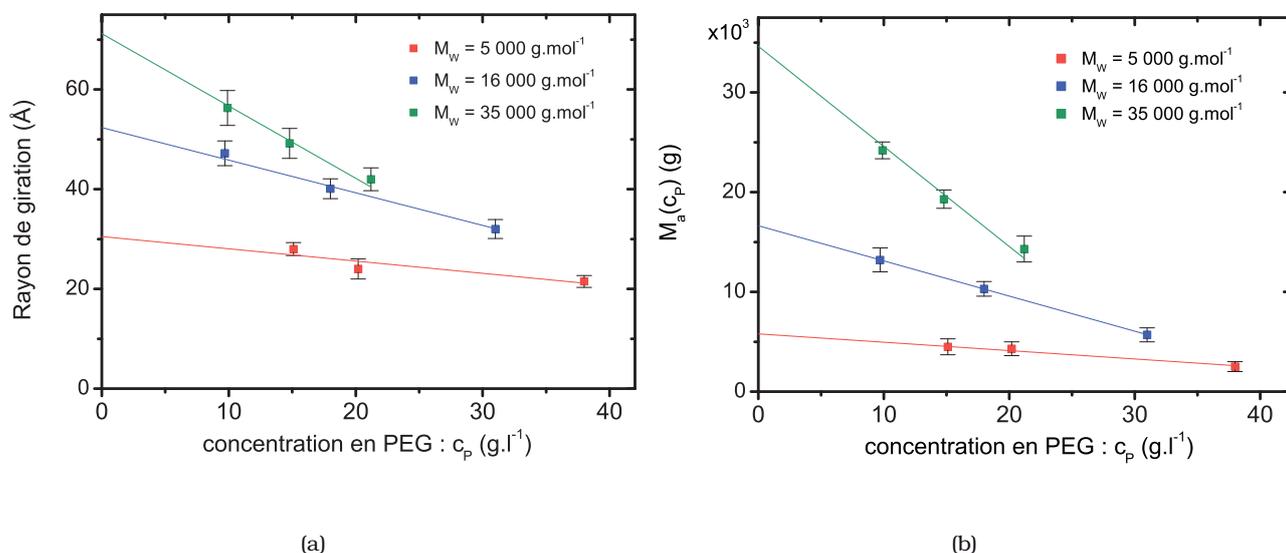


FIGURE 4.3 – Détermination du rayon de giration (a), de la masse et du second coefficient du viriel (b) des D-PEG utilisés.

échantillon	M_w PEG greffé	R_g	R_g calculé	a_2
D-PEG	5 000 $g.mol^{-1}$	$31.4 \pm 2 \text{ \AA}$	29.2 \AA	$56\ 000 \pm 3\ 000 \text{ \AA}^3$
D-PEG	16 000 $g.mol^{-1}$	$54.3 \pm 1.4 \text{ \AA}$	52.2 \AA	$282\ 000 \pm 28\ 000 \text{ \AA}^3$
D-PEG	35 000 $g.mol^{-1}$	$72.6 \pm 3.5 \text{ \AA}$	77.2 \AA	$860\ 000 \pm 53\ 000 \text{ \AA}^3$
H-PEG	5 000 $g.mol^{-1}$	$32.0 \pm 3.5 \text{ \AA}$	30.5 \AA	$46\ 000 \pm 4\ 000 \text{ \AA}^3$
H-PEG	10 000 $g.mol^{-1}$	$46.1 \pm 1.5 \text{ \AA}$	43.1 \AA	$178\ 000 \pm 21\ 000 \text{ \AA}^3$
H-PEG	20 000 $g.mol^{-1}$	$68.9 \pm 1.3 \text{ \AA}$	61.0 \AA	$429\ 000 \pm 38\ 000 \text{ \AA}^3$
H-PEG	30 000 $g.mol^{-1}$	$72.1 \pm 2.5 \text{ \AA}$	74.6 \AA	$668\ 000 \pm 42\ 000 \text{ \AA}^3$

TABLE 4.1 – Caractérisation des PEG greffés.

étant en bon solvant ou en régime Θ dans l'eau, les interactions entre polymères sont répulsives et le second coefficient du viriel augmente en fonction de la taille du polymère.

4.2 Structure du complexe PEG-hémoglobine

Comme nous l'avons vu, la réactivité de ce substitut sanguin change en fonction de sa masse moléculaire. Nous avons donc cherché à déterminer la structure du complexe pour différentes masses de polymère greffé (de 5 000 à 35 000 $g.mol^{-1}$).

Une étude du complexe avec un PEG de masse moléculaire $5\,000\text{ g.mol}^{-1}$ a été menée ^[113] par diffusion de rayons X aux petits angles. Cette étude a permis de déterminer une structure du complexe cependant la diffusion par rayons X ne permet pas d'observer séparément la conformation de chacun des éléments du même complexe. La DNPA va nous permettre d'obtenir des informations plus précises sur le complexe car, en jouant sur le solvant et la deutération des PEG greffés, on observera successivement le complexe en entier, l'hémoglobine et les PEG (fig. 4.4).

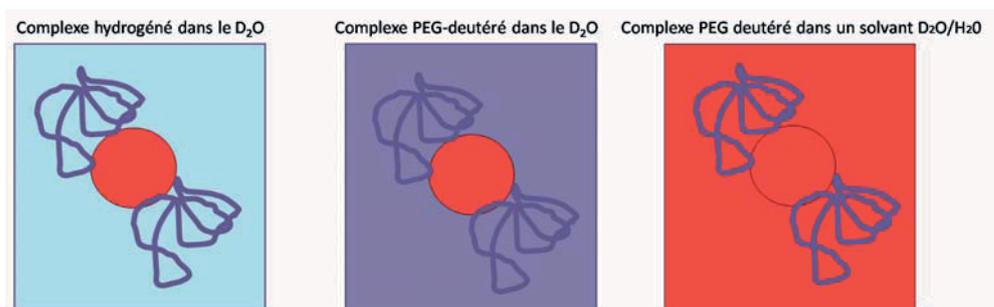


FIGURE 4.4 – Schéma de l'observation successive du complexe, de l'hémoglobine et des PEG. Le signal du PEG n'est jamais éteint à 100 %. Chaque couleur représente une densité de longueur de diffusion différente.

4.2.1 Greffage de chaînes de PEG deutérées, analyse du complexe D-Peg-Hb-D-PEG

avons fonctionnalisé du monométhoxy éthylène glycol deutéré par le même procédé que précédemment. Ces PEG deutérés de différentes masses, $5\,000$, $16\,000$ et $35\,000\text{ g.mol}^{-1}$ ont été greffés sur l'hémoglobine (cf annexes).

a) Observation de l'hémoglobine

Le PEG deutéré a une densité de longueur de diffusion supérieure à celle du D_2O . A faible concentration en complexe hémoglobine-PEG, le contraste entre l'hémoglobine et le D_2O est très important face au contraste entre PEG et D_2O . Nous pouvons considérer que l'intensité cohérente diffusée due aux PEG est négligeable devant celle due à l'hémoglobine. L'étude du complexe hémoglobine-PEG-D dans le D_2O , nous permettra d'observer uniquement le signal dû à l'hémoglobine dans cette gamme de vecteur d'onde.

Cette observation a été effectuée pour une seule masse de PEG greffé ($M_w=16\,000\text{ g.mol}^{-1}$) afin de voir si le greffage induisait une modification de la structure de l'hémoglobine. D'après

[113] Svergun, D., Ekstrom, F., Vandegriff, K., Malavalli, A., Baker, D., Nilsson, C., and Winslow, R. *Biophys. J.* **94**(1), 173-181 (2008).

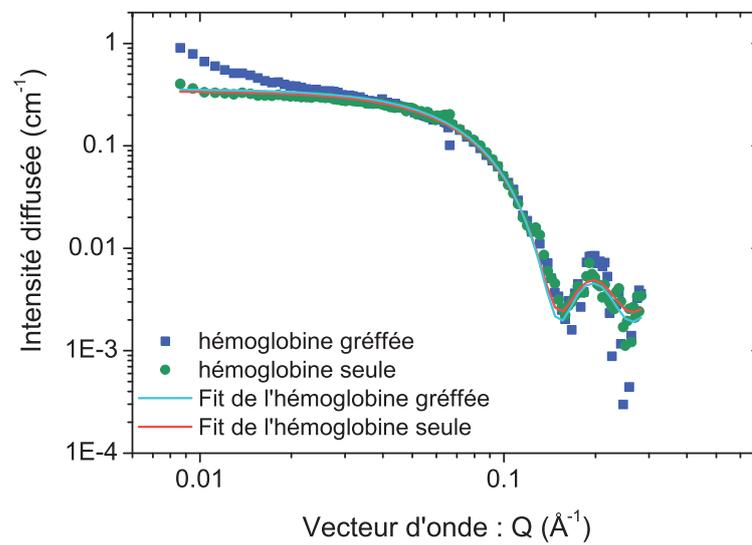


FIGURE 4.5 – Observation de l'hémoglobine dans le complexe hemo-PEG. Comparaison de l'intensité diffusée par l'hémoglobine seule dans le tampon deutéré (vert) et greffée (bleu) pour une concentration en hémoglobine $c_h = 1.8 \text{ g.l}^{-1}$. Pour chacune des deux mesures, l'intensité diffusée a été affinée par un facteur de forme de type sphère dure (lignes).

une étude réalisée par Svergun ^[113], le PEG ouvre légèrement la structure de l'hémoglobine. Les auteurs observent une modification du rayon de giration de l'hémoglobine complexée. Selon cette étude la structure quaternaire de l'hémoglobine serait compactée.

Les spectres de diffusion de l'hémoglobine greffée (en bleu) et seule (en rouge) (fig. 4.5) se superposent pour $Q > 0.025 \text{ \AA}^{-1}$. A petit vecteur d'onde, on observe pour le spectre de l'hémoglobine greffée une remontée de l'intensité diffusée. Cette remontée peut être interprétée comme l'agrégation des complexes.

L'hémoglobine ne montre aucune modification de sa structure, son facteur de forme peut être affiné par le facteur de forme d'une sphère de même rayon que celui de l'hémoglobine diluée dans le même tampon. La modification de la structure de l'hémoglobine, s'il y en a une, est donc inférieure à la résolution.

b) Observation de la conformation des PEG

Dans un second temps, nous avons étudié la conformation des chaînes greffées sur l'hémoglobine. Pour cela, nous avons cherché à éteindre le signal diffusé par l'hémoglobine dans le solvant.

Extinction du signal de l'hémoglobine

L'intensité diffusée par les protéines s'éteint dans un solvant H_2O/D_2O pour une fraction massique, x_{D_2O} en D_2O de l'ordre de 40%. En mesurant l'intensité diffusée par l'hémoglobine pour différentes fractions massiques en D_2O , nous avons déterminé à quelle fraction massique exacte en D_2O le signal de l'hémoglobine était parfaitement éteint dans le solvant (fig. 4.6). On obtient $x_{D_2O}=0.39$.

Observation des PEG-D greffés

L'hémoglobine est dialysée dans un tampon PBS à pH 7 dont la fraction massique en D_2O est de 39.5% afin d'éteindre le signal de l'hémoglobine.

La concentration en PEG est calculée à partir de la concentration en hémoglobine en solution en supposant dans un premier temps que chaque molécule d'hémoglobine est greffée de deux chaînes de PEG, d'où $c_P = 2c_h$. La concentration en hémoglobine est déterminée de manière précise par une mesure de l'absorption dans le visible (cf annexe).

Pour chacune des masses de D-PEG greffée, nous avons fait une étude du complexe pour six concentrations différentes de 4 à 30 g.l^{-1} de D-PEG. Quelle que soit la masse du PEG greffée, l'intensité diffusée peut être affinée par une fonction de Debye .

[113] Svergun, D., Ekstrom, F., Vandegriff, K., Malavalli, A., Baker, D., Nilsson, C., and Winslow, R. *Biophys. J.* **94**(1), 173-181 (2008).

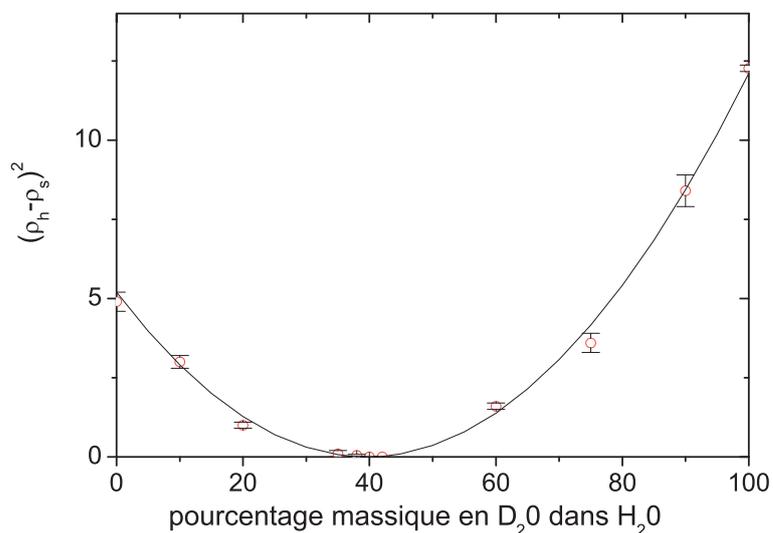


FIGURE 4.6 – Extinction de l'hémoglobine dans le solvant.

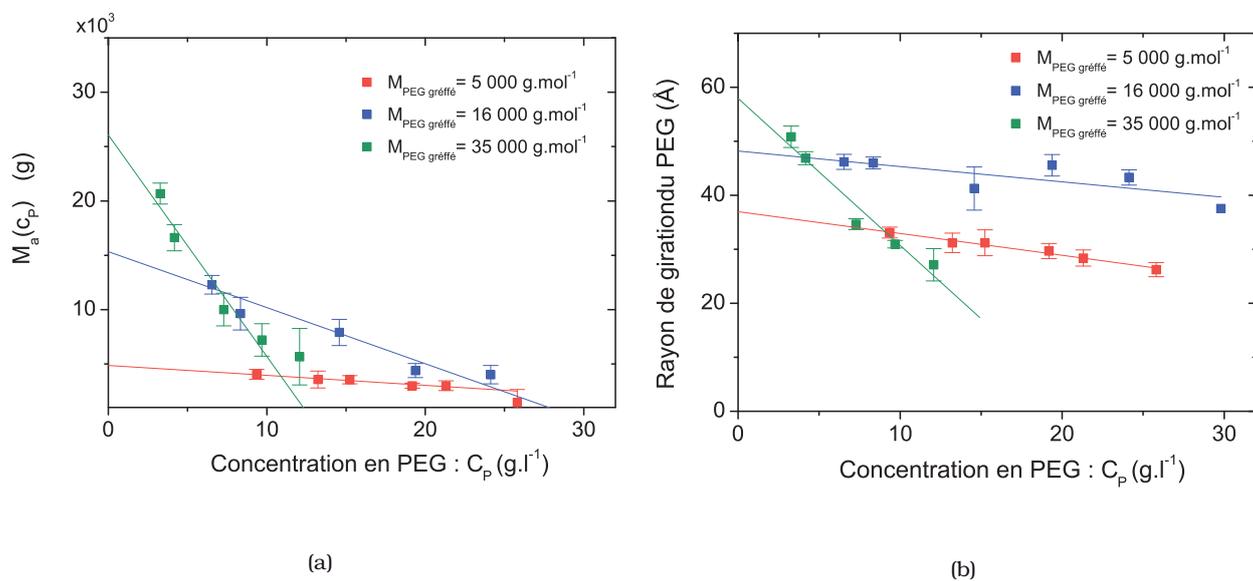


FIGURE 4.7 – Extrapolation de la masse apparente (a) et du rayon de giration (b) de chaînes gréffées sur les complexes. $M_p = 5\,000\text{ g.mol}^{-1}$ en rouge, $M_p = 10\,000\text{ g.mol}^{-1}$ en bleu, $M_p = 35\,000\text{ g.mol}^{-1}$ en vert. Pour le PEG de masse $35\,000\text{ g.mol}^{-1}$ nous avons représenté la masse du polymère en fixant $c_p = 2c_h$ (a) et son rayon de giration (b).

M_w (g.mol ⁻¹)	Masse obtenue (g.mol ⁻¹)	a_2 (Å ³)	R_g (Å)	R_g PEG dans l'eau (Å)
5 000	4 800 ± 400	72 000 ± 12 000	36.9 ± 0.8	31.4 ± 2
16 000	15 200 ± 1 000	428 000 ± 56 000	48.2 ± 2.1	54.3 ± 1.4
35 000	26 000 ± 3 500	1 570 000 ± 140 000	58.0 ± 3.0	72.6 ± 3.5

TABLE 4.2 – Récapitulatif des résultats obtenus sur les D-PEG greffés en affinant les données par un facteur de forme de Debye.

Les masses des D-PEG greffées (tab. 4.2) pour les PEG 5 000 et 16 000 g.mol⁻¹ sont cohérentes avec l'hypothèse que nous avons faite : chaque molécule d'hémoglobine est greffée par deux PEG. Pour le PEG de masse moléculaire 35 000 g.mol⁻¹, la masse extrapolée est inférieure à celle du polymère (fig. 4.7(a), tab. 4.2). Pour chaque molécule d'hémoglobine, la masse apparente de PEG greffé est de 52 000 ± 6 000 g.mol⁻¹, soit une moyenne de 1.5 PEG greffé par molécule. Le greffage a moins bien fonctionné, et nous avons un mélange d'hémoglobine greffée d'une et de deux chaînes. Les mesures suivantes ont pris en compte cette modification de la concentration en PEG.

Comme en solution diluée, les interactions entre les chaînes de PEG restent répulsives. Pour chacune des masses de PEG, le second viriel augmente presque d'un facteur deux. Celui-ci ne peut pas être interprété aussi simplement que pour le polymère seul en solution, les interactions observées sont des interactions médiées par l'hémoglobine. Les deux chaînes greffées sur la même molécule se repoussent de manière stérique.

Nous avons analysé les rayons de giration des objets diffusants. Pour le PEG de masse 5000 g.mol⁻¹, celui-ci est très légèrement supérieur à celui du même polymère libre en solution (36.9 Å contre 31 Å). Le PEG greffé est un peu plus étendu que le PEG libre en solution, cela peut s'expliquer par une gêne stérique due à l'hémoglobine. Lorsque la masse du PEG augmente, nous n'observons pas le même comportement des rayons de giration. Pour le PEG, $M_w=16\ 000$ g.mol⁻¹, le R_g du PEG greffé est légèrement inférieur (48 Å contre 54 Å) au PEG dans du solvant. Pour le PEG de masse $M_w=35\ 000$ g.mol⁻¹, son R_g est très nettement inférieur. Quand la taille du polymère greffé augmente, on passe d'une conformation de la chaîne proche de celle du PEG dans l'eau à une conformation 20% plus compacte que celle-ci.

4.2.2 Informations "globales" sur le complexe

Afin de compléter notre étude, nous avons étudié la structure du complexe PEG-hémoglobine-PEG pour 4 masses de PEG différentes sans éteindre ni le PEG ni l'hémoglobine (fig. 4.8). Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles ont été menées sur les spectromètres PACE du laboratoire Léon Brillouin à Saclay (France) et sur le spectromètre KWS2 à Munich

(Allemagne).

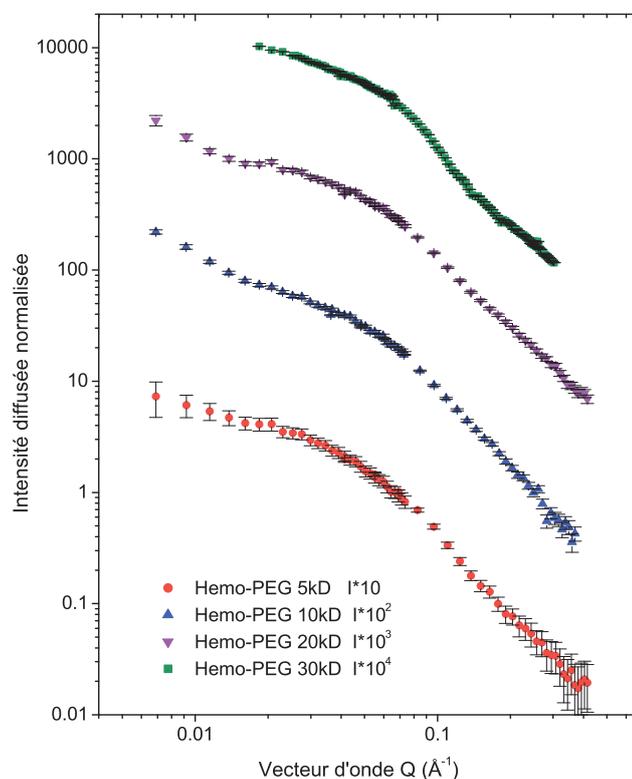


FIGURE 4.8 – Intensité diffusée par les complexes PEG-hémoglobine-PEG pour les 4 masses de PEG étudiées à une concentration $c_h = 5 \text{g.l}^{-1}$

Les objets diffusants

Nous avons fait une représentation de type Kratky (fig. 4.9) de l'intensité diffusée par le complexe greffé de PEG de masse $M_{w,P} = 10\,000 \text{ g.mol}^{-1}$. Pour $Q \approx 0.08 \text{ \AA}^{-1}$, on observe une bosse caractéristique de la protéine quasi-sphérique. A grand Q , l'intensité diffusée par les PEG (en Q^{-2}) prédomine sur celle de l'hémoglobine (en Q^{-4}).

Masse apparente des objets diffusants

L'intensité à vecteur d'onde nul nous permet de calculer la masse apparente des objets diffusants. En développant l'expression de l'intensité diffusée à vecteur d'onde nul pour le complexe en hémoglobine possédant N_c chaînes de PEG, on obtient :

$$\left[\frac{I(Q \rightarrow 0)}{c} \right]_{c \rightarrow 0} = \frac{1}{Na(N_c M_P + M_h)} [M_h \Delta \rho_h v_h + N_c M_P \Delta \rho_P v_P]^2 \quad (4.1)$$

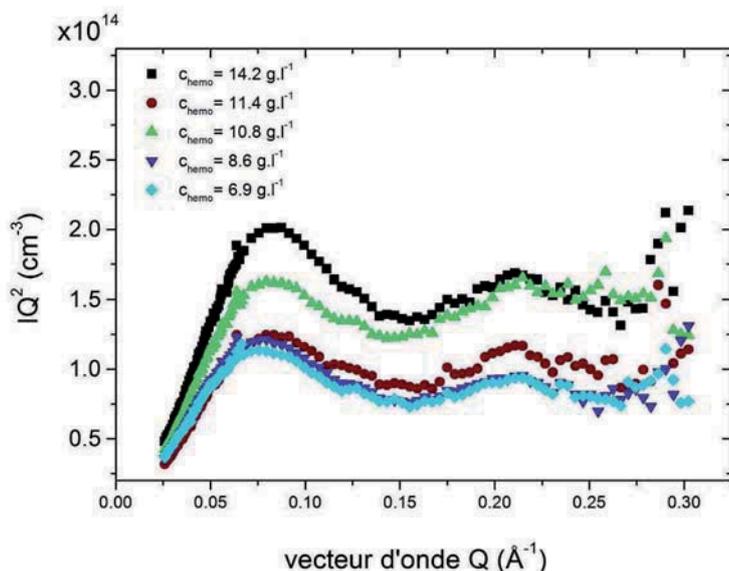


FIGURE 4.9 – Représentation de Kratky de l'intensité diffusée par le complexe PEG-hémoglobine-PEG, $M_wP=10\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ pour les 6 concentrations étudiées.

v_h et v_P sont les volumes spécifiques de l'hémoglobine et du PEG, M_h et M_P leurs masses et ρ_P et ρ_h leurs densités de longueurs de diffusion. N_c est le nombre de chaînes greffées et c_h est la concentration en complexe.

On peut ainsi déterminer N_cM_P la masse de PEG greffée sur chaque hémoglobine. L'ensemble est récapitulé dans le tableau 4.3. Pour trois des quatre masses greffées, la masse apparente des objets diffusants correspond, aux barres d'erreur près, à la masse d'une molécule greffée de deux PEG. Pour le PEG de masse la plus élevée, $M_w=30\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$, la masse du complexe est inférieure à la masse théorique d'un complexe PEG-hémoglobine-PEG. Comme nous avons pu l'observer pour les PEG-deutérisés, le greffage est moins bon pour un polymère de plus grand poids moléculaire.

Rayon de giration des objets diffusants

En affinant l'intensité diffusée dans le domaine de Guinier (c'est à dire pour $Q.R < 1.3$) par une fonction de Guinier, on détermine le rayon de giration apparent de chaque objet.

Le rayon de giration du complexe augmente lorsque la masse du PEG greffée augmente. On passe d'une molécule de rayon de giration $R_g=24.3\ \text{\AA}$ à un rayon de $42.6\ \text{\AA}$ quand on greffe un PEG de masse $30\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$. Cette augmentation est relativement grande pour les PEG de faibles masses tandis que, lorsque le PEG a un poids moléculaire plus important, l'augmentation du R_g est proportionnellement moins importante.

Les interactions entre les complexes augmentent par rapport à celles de la protéine seule dans

Masse PEG greffés	Masse totale obtenue	Masse théorique du complexe	$R_{g,complexe}$
5 000 g.mol ⁻¹	72 300 ± 6 000 g.mol ⁻¹	74 500 g.mol ⁻¹	32.8 ± 1.5 Å
10 000 g.mol ⁻¹	86 100 ± 4 800 g.mol ⁻¹	84 500 g.mol ⁻¹	38.5 ± 2 Å
20 000 g.mol ⁻¹	98 700 ± 7 000 g.mol ⁻¹	104 500 g.mol ⁻¹	43.7 ± 3.2 Å
30 000 g.mol ⁻¹	111 200 ± 8 000 g.mol ⁻¹	124 500 g.mol ⁻¹	48.6 ± 2.5 Å

TABLE 4.3 – Caractérisation du complexe PEG-hémoglobine-PEG.

le solvant. Dans le tampon, les interactions entre protéines sont très faiblement répulsives et celles entre PEG sont répulsives. Les interactions entre complexes sont répulsives et supérieures à celles des PEG libres en solution. Ce résultat est en contradiction avec l'agrégation observée aux petits angles de la figure 4.5.

4.2.3 Les différents modèles de greffage

Les PEG sont greffés sur les 2 cystéines des chaînes β de l'hémoglobine (fig. 4.1), donc de chaque côté de la molécule d'hémoglobine.

A partir des conformations de l'hémoglobine et des PEG observées précédemment, nous modélisons le substitut sanguin par une sphère d'hémoglobine de même rayon que l'hémoglobine acellulaire greffée de 2 chaînes aléatoires tel que schématisé sur la figure 4.10. Chaque PEG est considéré comme une chaîne de polymère qui n'interagit pas avec la protéine (fig. 4.10).

Le facteur de forme d'un tel modèle (sphère dure greffée de N_c chaînes gaussiennes) a été déterminé par Pedersen [114].

$$P_c(Q) = \frac{1}{a} \sum_i \sum_j b_i b_j e^{-iqr_i} e^{iqr_j} \quad (4.2a)$$

$$P_c(Q) = \frac{1}{(\Delta\rho_h + N_c\Delta\rho_P)^2} (N_c\Delta\rho_P^2 P_{gaussian}(Q) + N_c(N_c - 1)\Delta\rho_P^2 S_{P-P}(Q) + \quad (4.2b)$$

$$N_c^2\Delta\rho_P\Delta\rho_h S_{P-h}(Q) + \Delta\rho_h^2 P_s^2(Q, R_0)) \quad (4.2c)$$

où les indices h et P désignent respectivement les grandeurs rapportées à l'hémoglobine et au PEG. avec $P_s(Q, R_0) = \Phi^2(QR_0)$

$$\text{où } \Phi(QR_0) = 3 \frac{\sin(QR_0) - QR_0 \cos(QR_0)}{(QR_0)^3}$$

$$P_{gaussian}(Q) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + e^{-x}]$$

[114] Pedersen, J. *J. Appl. Cryst* **33**, 637–640 (2000).

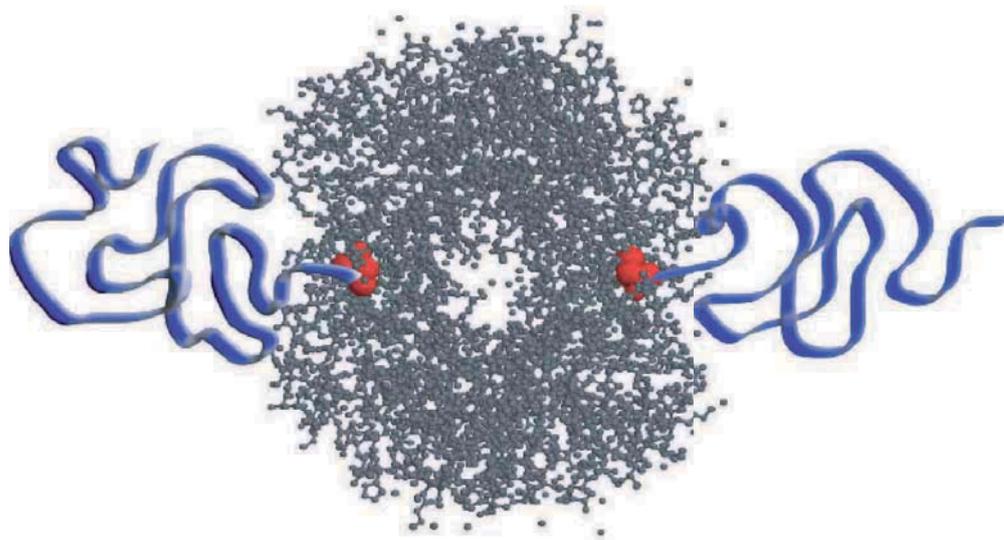


FIGURE 4.10 – Schéma d'un modèle de conformation des chaînes de PEG greffées sur l'hémoglobine : les chaînes de PEG ont une conformation de chaîne gaussienne.

où x est défini par $x = (QR_g)^2$

avec R_g le rayon de giration de la chaîne greffée, R_0 est le rayon de la sphère dure, l'hémoglobine, et N_c le nombre de chaînes greffées.

$$S_{P-h}(Q) = \frac{\sin(QR_0)}{QR_0} \Phi(QR_0) \Psi(QR_g) \quad (4.3a)$$

$$S_{P-P}(Q) = \Psi^2(QR_g) \left[\frac{\sin(Q(R_0 + R_g))}{Q(R_0 + R_g)} \right]^2 \quad (4.3b)$$

où $\Psi(x) = \frac{1-e^{-x}}{x}$

S_{P-P} et S_{P-h} sont respectivement les facteurs de structure entre les PEG greffés sur l'hémoglobine et entre le Peg greffé et l'hémoglobine.

Chacun des spectres a été ajusté avec un modèle de Pedersen. Étant donné les résultats obtenus en éteignant le signal du PEG, nous avons fixé le rayon de l'hémoglobine. L'ajustement nous permet de tirer principalement 2 paramètres : le nombre de chaînes greffées, N_c et le rayon de giration de chacun des PEG.

Pour les trois masses les plus faibles, le nombre de chaînes greffées obtenu est proche de 2, tandis qu'il est proche de 1.5 pour la plus grande masse. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus pour le greffage des PEG deutérés ainsi qu'avec la masse des complexes.

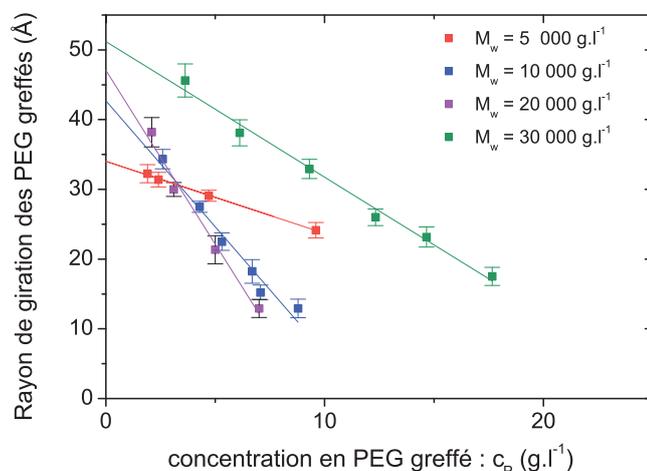


FIGURE 4.11 – Rayon de giration des PEG greffés.

Masse PEG greffés	R_g	R_g PEG dans l'eau	N_c
5 000 g.mol ⁻¹	34.0 ± 2 Å	30.5 ± 2 Å	1.8
10 000 g.mol ⁻¹	42.7 ± 3.5 Å	43.1 ± 1.4 Å	2.1
20 000 g.mol ⁻¹	47.1 ± 2.3 Å	60.9 ± 1.3 Å	1.9
30 000 g.mol ⁻¹	51.2 ± 3.4 Å	74.6 ± 2.5 Å	1.4

TABLE 4.4 – Rayon de giration des PEG greffés, R_g , et nombre de chaîne greffée, N_c , obtenus à partir de l'ajustement de Pedersen. Le rayon de giration du PEG greffé est comparé au rayon de giration du même PEG mesuré dans l'eau.

Les rayons de giration obtenus (fig. 4.11) pour les deux masses de PEG les plus faibles (5 000 et 10 000) sont proches ou supérieurs au rayon de giration des PEG dans l'eau. Pour les deux masses les plus élevées, ces rayons sont inférieurs.

4.3 Discussion

On ne note pas de différences notables dans les résultats tirés de l'étude des complexes hydrogénés et deutérés. On peut estimer que les deux types de PEG forment des complexes de structures similaires.

Le rayon de giration du complexe augmente lorsque la masse du PEG greffé augmente. La taille de la molécule d'hémoglobine, ne semble pas modifiée, contrairement aux observations qui avaient été faites par Svergun. L'étude précise du complexe nous permet de mesurer l'augmentation de la taille de chaque polymère greffé avec l'augmentation de sa masse (fig. 4.12). On peut

distinguer deux régimes :

- Pour $M_w \leq 10\,000$ g.mol⁻¹ les PEG greffés ont un rayon de giration proche ou supérieur au rayon de giration du PEG dans l'eau.
- Pour $M_w > 10\,000$ g.mol⁻¹ les PEG greffés ont un rayon de giration inférieur au rayon de giration du PEG dans l'eau.

Pour les faibles masses, nos résultats sont cohérents avec un modèle de deux chaînes gaussiennes greffées de chaque côté de l'hémoglobine, gênées stériquement par celle-ci, comme on a pu le représenter sur la figure 4.10. Cette représentation, dite "champignon" est cohérente avec les résultats obtenus pour un PEG de masse 5 000 g.mol⁻¹ par Svergun [113].

Lorsque la masse du PEG augmente, ce modèle ne peut s'appliquer, les rayons de giration mesurés étant trop faibles. Comme la qualité de solvant n'est pas modifiée, cette diminution n'est pas due à l'effondrement de la chaîne sur elle même. Cette compaction peut être due à l'interaction entre la chaîne et la protéine. Des études ont permis de montrer que le PEG interagissait avec les résidus non polaires des protéines [115] et, récemment, l'interaction du PEG 5kD à la surface du cytochrome C [116] a été observée. Lorsque la masse de la chaîne augmente, la chaîne se replierait sur l'hémoglobine comme nous l'avons montré pour un cas limite sur la figure 4.13.

Cette conformation expliquerait que, pour une masse de PEG élevée, dans certains cas le polymère "cache" la deuxième cystéine 93, la rendant moins accessible à la fonction maléïmide, ce qui expliquerait le fait que pour les deux plus grandes masses de PEG, le taux de greffage obtenu par ajustement est proche de 1.5.

Nous pouvons essayer de relier cette conformation des chaînes greffées à la surface de l'hémoglobine à la réactivité du complexe. Nous avons vu que l'effet vasoconstrictif du complexe diminuait lorsque la masse du PEG augmentait jusqu'à une certaine limite de la masse du PEG (entre 10 et 20 000 g.mol⁻¹), masse pour laquelle cet effet ré-augmentait. Cette valeur seuil est du même ordre de grandeur que celle pour laquelle on observe une modification de la conformation du PEG.

Nous pouvons spéculer cette différence de réactivité. La conformation de la chaîne de PEG est telle, qu'à partir d'une certaine masse (entre 10 et 20 000 g.mol⁻¹), elle pourrait "cacher" les

[113] Svergun, D., Ekstrom, F., Vandegriff, K., Malavalli, A., Baker, D., Nilsson, C., and Winslow, R. *Biophys. J.* **94**(1), 173-181 (2008).

[115] Timasheff, S. *Prot. Sc.* **1**(9), 1133-1143 (1992).

[116] Garcia-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincon, G., and Vazquez-Duhalt, R. *Bioconj. Chem.* **13**, 1336-1344 (2002).

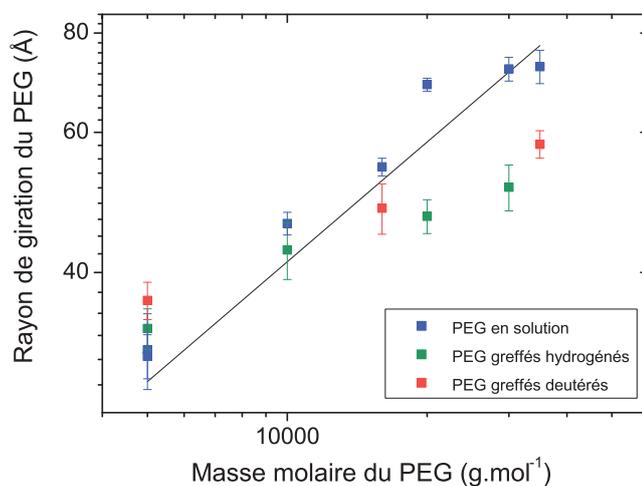


FIGURE 4.12 – Graphe récapitulatif des rayons de giration des PEG greffés comparé à celui des mêmes PEG dans l'eau. La droite représente l'évolution théorique du rayon de giration du PEG en fonction de sa masse.

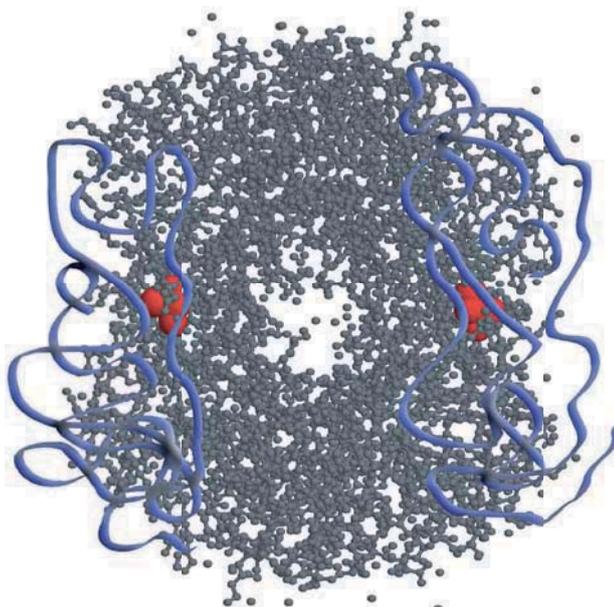


FIGURE 4.13 – Schéma d'un modèle de la conformation des chaînes de PEG greffées sur l'hémoglobine : les chaînes s'enroulent autour de l'hémoglobine.

sites de fixation de NO, les rendant moins accessibles à NO. L'effet vasoconstrictif diminuerait. Au delà de cette masse, l'accessibilité de NO n'est pas modifiée. Le rayon de giration et la masse

du complexe augmente, sa vitesse diminue à l'intérieur des vaisseaux sanguins et le temps de contact entre NO et le substitut sanguin augmente. NO a le temps de diffuser et d'atteindre l'hème.

Cette hypothèse est cohérente avec notre modèle de la structure du complexe.

De nombreux complexes sont actuellement en phase de développement, visant à greffer plus de deux PEG par molécule d'hémoglobine (5, 6 ou 7). Différentes études montrent que le site β cys est impliqué dans la coopérativité de la fixation de l'hémoglobine. Il est donc intéressant de greffer l'hémoglobine sur d'autres sites. Des études cherchant à obtenir de tels complexes sont en cours.

Notre étude a permis d'observer une transition de la structure des chaînes greffées sur l'hémoglobine. Cette transition a lieu pour une masse proche de celle pour laquelle on observe une transition du pouvoir vasoconstrictif du complexe. Pour le moment, nous ne pouvons affirmer qu'il y ait une corrélation entre ces deux phénomènes. L'étude similaire de plusieurs des substituts sanguins d'hémoglobine greffée, par exemple ceux pour lesquels le greffage se fait sur d'autres sites, nous permettrait de savoir si seule la taille du complexe compte ou si, les sites que "cachent" le PEG ont une importance.

Conclusion

La cellule est un environnement complexe. Le pH, la force ionique ou l'encombrement cytoplasmique ... sont des paramètres qui influencent les réactions biochimiques. Il est généralement difficile d'étudier in-vivo l'influence d'un seul de ces paramètres. Le volume exclu induit par la présence de nombreuses macromolécules en solution crée des interactions non spécifiques stériques. L'objet de notre travail était d'étudier les effets de ces interactions sur la dynamique des protéines et leur équilibre entre état natif et état dénaturé.

Des études théoriques ont montré que l'encombrement modifiait la diffusion apparente des protéines et stabilisait leur état natif en déstabilisant l'ensemble des états dénaturés. Chacune de ces études a nécessité de trouver des systèmes adaptés à l'observation des effets du volume exclu. Les solutions concentrées d'hémoglobine (jusqu'à 400 g.l^{-1}) ont constitué un modèle biologique pour la dynamique des protéines dans un environnement encombré par sa propre concentration. Pour l'étude de l'équilibre état natif - état dénaturé, nous avons choisi d'étudier un modèle de chaîne dépliée, dans un premier temps, un polymère, le Poly(éthylène-glycol)(PEG) puis, une protéine, la myoglobine. L'encombrement cytoplasmique a été principalement modélisé par un polysaccharide neutre et quasisphérique, le Ficoll.

La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) et plus particulièrement la possibilité d'éteindre le signal d'un des constituants d'un système ternaire dans le solvant, nous a permis d'observer la conformation d'une seule chaîne quelle que soit l'encombrement. Son rayon de giration diminue d'un facteur deux par rapport au polymère dans l'eau pour une fraction massique en Ficoll de l'ordre de 30%. La chaîne garde une structure locale de chaîne aléatoire, mais à plus grande échelle, elle est compactée. Cette étude a été dans un premier temps, menée sur un modèle simple, le PEG et nous a permis de nous rapprocher d'un système biologique en étudiant l'influence de l'encombrement sur une protéine, la myoglobine.

L'influence de l'encombrement cytoplasmique sur la dénaturation thermique, et donc sur l'équilibre de l'état natif peut être suivi par DNPA et par dichroïsme circulaire. En couplant mesure de dichroïsme circulaire et DNPA, nous avons obtenu des informations sur les structures secondaire et tertiaire de la protéine. Nous avons pu observer directement la stabilisation de l'état natif et la compression de la protéine à l'état dénaturé, comme les études actuelles le

prédisent. Les effets de l'encombrement dépendent cependant fortement du système d'étude. Jusqu'à présent, il a été difficile de comprendre dans quelle mesure les conditions de tampon modifiaient l'influence de l'encombrement. Chaque système permet d'observer la stabilisation d'une protéine grâce à l'encombrement macromoléculaire, l'amplitude de ces stabilisations est cependant peut expliquée.

Quand la fraction en agent d'encombrement augmente, l'entropie conformationnelle de la chaîne protéique à l'état dénaturé diminue. En présence d'un milieu encombré, la constante de l'équilibre déplace l'équilibre vers l'état natif. Si on revient au paysage énergétique du repliement de Dill, on peut considérer que le niveau d'énergie a été abaissé. On est "plus bas dans l'entonnoir" d'un point de vue thermodynamique. La chaîne que nous avons étudiée est un homopolymère et pas un polypeptide. Pour un polypeptide il existe de multiples interactions à l'intérieur de la chaîne permettant son repliement (interactions hydrophobes, électrostatiques etc ...).

Par ailleurs, notre étude a également montré que la présence d'encombrement favorisait les interactions attractives entre chaînes. Dans un système biologique, cela signifie que l'encombrement cytoplasmique favoriserait l'agrégation. Cette propriété est importante si on veut mieux comprendre la formation *in-vivo* d'assemblages moléculaires.

Dans une seconde partie, nous avons mis en évidence par diffusion de neutrons à écho de spin un phénomène de relaxation dans la fenêtre d'observation des temps courts qui ne peut être interprété uniquement comme un mouvement diffusif. Celui-ci dépend de la concentration mais nos mesures ne permettent pas de mettre en évidence une réelle dépendance en fonction du vecteur d'onde. Une des hypothèses pour expliquer nos mesures consiste à penser que la relaxation serait associée à un mouvement local interne à la protéine, qui varierait cependant en fonction de la viscosité du solvant et donc de la concentration en hémoglobine. Nos mesures ne permettent pas de mettre en évidence une transition dynamique autour de la température physiologique contrairement à ce que tendent à montrer différentes études récentes tendent à montrer pour lesquelles on observe une transition de la dynamique à temps court autour de 37°C.

Perspectives

Les techniques de diffusion de neutrons sont des méthodes privilégiées pour l'étude des systèmes encombrés. Nous avons pu observer la compression d'une chaîne en présence d'un agent d'encombrement modèle. Cette étude était essentielle avant de pouvoir observer la conformation d'une protéine deutérée dans un milieu encombré. L'étude d'une protéine deutérée nous permettra d'utiliser un agent d'encombrement simple qui peut être modélisé comme un cœur

dur, le Ficoll. Cette étude nécessite une relativement grande quantité de protéine deutérée (une étude complète nécessiterait environ 600 mg) et il était nécessaire d'observer les effets sur une chaîne modèle avant de s'engager dans un tel projet. Une étude similaire peut désormais être menée sur une protéine deutérée, notamment la myoglobine. A cause du coût entropique très élevé associé à un effondrement complet de la chaîne d'homopolymère, celui-ci ne peut avoir lieu. Par contre, dans des systèmes plus complexes tels que des chaînes polypeptidiques possédant des liaisons à courtes portées un effondrement total pourrait être envisagé et stabiliser un état de globule fondu.

Notre étude a également mis en évidence des phénomènes d'agrégation. Le système agent d'encombrement -protéine deutérée nous permettrait d'étudier la formation des assemblages moléculaires *in-vivo*.

Annexe A

Diffusion de neutrons

A.1 Diffusion de neutrons : principes généraux

A.1.1 Propriétés générales

Le neutron est une particule élémentaire découverte en 1932 par James Chadwick ^[117]. Les neutrons utilisés dans les expériences de diffusion ont une énergie de quelques meV à quelques centaines de meV et une longueur d'onde de l'ordre de quelques Angström (de l'ordre de la distance interatomique ou intermoléculaire).

Les neutrons produits grâce à la fission de l'uranium 235 dans un réacteur nucléaire ont une énergie de 1.6 MeV. Ils doivent être ralentis par un modérateur (comme l'eau ou le graphite). Leur énergie est donc modifiée grâce à un modérateur qui nous permet d'obtenir une large distribution d'énergie, de quelques meV au à la centaine de meV. Par exemple pour le réacteur Orphée, à Saclay, les neutrons sont ralentis par le D_2O , ils ont en moyenne une énergie de 0,025 eV (à 300K).

On distingue en général trois gammes d'énergie qui permettent l'étude de la matière molle et condensée :

neutrons "chauds" Ils possèdent une énergie proche de l'énergie thermique, kT , à $T=1$ 200 K.

Sur le réacteur Orphée, la source chaude est constituée par un bloc de graphite.

neutrons "thermiques" Les neutrons sont thermalisés par un modérateur dont la température est 300 K (l'eau lourde au réacteur Orphée). Ils ont une énergie inférieure à 0.025 eV. Leur vitesse moyenne est de 2 200 m/s et leur longueur d'onde moyenne de 1.8 Å. C'est de l'ordre des distances interatomique. Ils permettent de sonder la matière à des distances allant de

[117] Chadwick, J. *Nature* **129**, 312 (1932).

l'ångström à quelques nanomètres et à des échelles de temps allant de la picoseconde à la centaine de nanosecondes.

neutrons "froids" Ils possèdent une énergie proche de l'énergie thermique, kT , à $T=20$ K. Au réacteur Orphée, ils sont thermalisés à l'hydrogène liquide.

Les techniques de diffusion de neutrons sont donc particulièrement adaptées pour étudier la structure et la dynamique de la matière condensée.

Les neutrons sont des particules élémentaires de masse $m_n = 1,6275 \cdot 10^{-27} \text{kg}$ et de spin nucléaire $1/2$. Ils interagissent avec le noyau des atomes.

Un neutron peut être vu comme une onde de longueur d'onde λ , de vecteur d'onde \vec{k} et de moment \vec{p} ou comme une particule.

$$\lambda = \frac{h}{m_n v} \quad (\text{A.1a})$$

où v est la vitesse du neutron et h la constante de Planck

$$|\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{A.1b})$$

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad (\text{A.1c})$$

où \hbar est la constante de Planck réduite. L'énergie que possède un neutron de vitesse, v , est définie par :

$$E = \frac{1}{2} m_n v^2 = \frac{h^2}{2m_n \lambda^2} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_n} \quad (\text{A.2})$$

L'interaction entre la matière et le faisceau de neutrons est caractérisée par une longueur de diffusion, b . Cette longueur est un nombre complexe, la partie réelle correspondant à la diffusion et la partie imaginaire correspondant à l'absorption.

Contrairement à la diffusion par les rayons X, la longueur de diffusion caractéristique de l'interaction noyau - neutron ne dépend pas de manière monotone du numéro atomique de l'atome. Des atomes légers et lourds peuvent avoir des longueurs de diffusion comparables mais deux éléments proches, ou deux isotopes peuvent avoir des longueurs de diffusion de très différentes, c'est par exemple le cas du deutérium et de l'hydrogène.

A.1.2 Principe de la diffusion

Un neutron de longueur d'onde λ peut être défini par une onde plane de vecteur d'onde \vec{k}_i et d'énergie E_i . Lorsque cette onde interagit avec le noyau d'un atome sous l'effet d'un potentiel $V(\vec{r})$, elle est diffusée dans toutes les directions. L'onde diffusée est caractérisée par un vecteur d'onde k_f et une énergie, E_f . L'angle caractéristique de la diffusion, 2θ , est l'angle formé par les vecteurs d'onde \vec{k}_i et \vec{k}_f (fig. A.1).

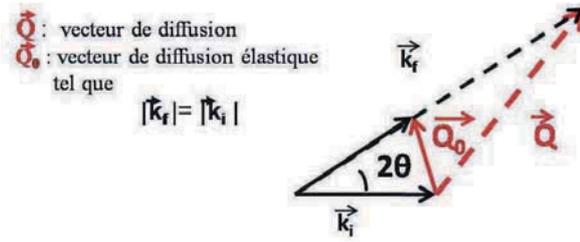


FIGURE A.1 – Schéma dans l'espace réciproque d'une expérience de diffusion. Le vecteur d'onde incident est \vec{k}_i , le vecteur diffusé \vec{k}_f . Ils sont séparés par un angle 2θ . Lorsque la diffusion est élastique, $|\vec{k}_f| = |\vec{k}_i|$ et $\vec{Q} = \vec{Q}_0$

On définit d'après la loi de conservation du moment et de l'énergie le vecteur de diffusion, \vec{Q} et l'énergie de transfert, $\hbar\omega$.

$$\vec{Q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i \quad (\text{A.3})$$

$$\hbar\omega = E_f - E_i \quad (\text{A.4})$$

L'intensité du vecteur de diffusion est donc :

$$\frac{|\vec{Q}|^2}{|\vec{k}_i|^2} = 2 + \frac{\hbar\omega}{E_i} - 2\cos(2\theta)\sqrt{\frac{\hbar\omega}{E_i} + 1} \quad (\text{A.5})$$

Cette fonction est représentée à vecteur d'onde incident fixé pour différents angles θ sur la figure A.2. Dans le cas d'une diffusion élastique (où le transfert d'énergie $\hbar\omega$ peut être considéré comme nul), le vecteur de diffusion élastique est \vec{Q}_0 , d'intensité

$$Q_0 = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (\text{A.6})$$

Lorsque la diffusion est inélastique, on peut noter que $|\vec{Q}|$ et ω sont des grandeurs indépendantes (fig. A.2).

A.1.3 Diffusion cohérente et incohérente

L'interaction neutron-noyau est quantifiée par la longueur de diffusion, b . Chaque isotope interagit de manière différente. Il existe des fluctuations de longueurs de diffusion dues à la présence de différents éléments chimiques ou isotopes parmi les atomes de l'échantillon, et à l'existence de différents états de spin du système "neutron-noyau".

Nous décrivons dans le paragraphe qui suit l'incohérence de spin. Les neutrons possèdent un spin de valeur $1/2$. Lorsque les noyaux des atomes avec lesquels ils interagissent possèdent un spin nucléaire I , le système "neutron - noyau" possède un spin de $I \pm 1/2$.

On note b^+ et b^- les longueurs de diffusion associées aux systèmes de spin $I + 1/2$ et $I - 1/2$. Leur nombre d'état est $2(I + 1/2) + 1 = 2I + 2$ et $2(I - 1/2) + 1 = 2I$ respectivement. Lorsque les

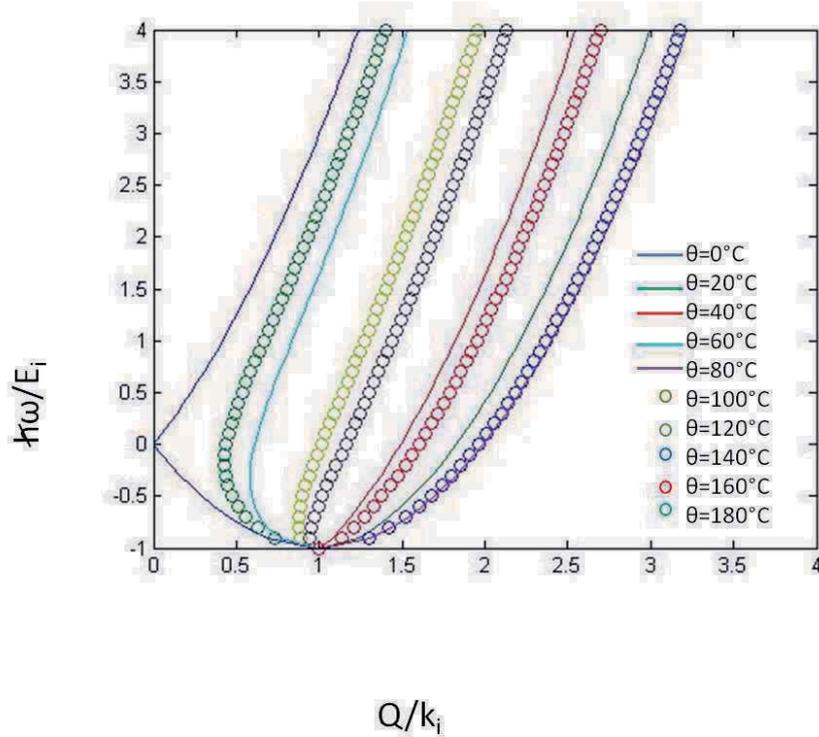


FIGURE A.2 – Evolution de $\hbar\omega/E_i$ en fonction de Q/k_i pour différents θ de 0 à 180° C à vecteur d'onde incident fixé

neutrons ne sont pas polarisés et que les spins nucléaires sont orientés de manière aléatoire, chaque état de spin a la même probabilité. La probabilité de b^+ est donc de $\frac{2I+2}{4I+2} = \frac{I+1}{2I+1}$ et celle de b^- est de $\frac{I}{2I+1}$.

Pour chaque isotope, on définit les longueurs de diffusion

– cohérente, b_{coh} comme la moyenne des longueurs de diffusion sur tous les états de spin

$$b_{coh} = \bar{b} = \frac{1}{2I+1} [(I+1)b^+ + Ib^-]^2 \quad (\text{A.7})$$

où \bar{x} est la moyenne de x .

– incohérente b_{inc} comme l'écart quadratique à la moyenne. La diffusion incohérente caractérise les fluctuations par rapport à la valeur moyenne.

$$b_{inc} = \overline{b^2} - \bar{b}^2 = \frac{1}{2I+1} [(I+1)(b^+)^2 + I(b^-)^2] - \frac{1}{(2I+1)^2} [(I+1)b^+ + Ib^-]^2 \quad (\text{A.8})$$

On peut décrire de manière analogue l'incohérence isotopique et définir les longueurs de

diffusion cohérente, b_{coh} et incohérente, b_{inc} de l'échantillon :

$$\overline{b_i \cdot b_j} = \bar{b}^2 + (\bar{b}^2 - \bar{b}^2) \delta_{ij} \quad (\text{A.9a})$$

$$\overline{b_i \cdot b_j} = b_{coh} + b_{inc} \quad (\text{A.9b})$$

On définit de même les sections efficaces cohérente σ_{coh} et incohérente σ_{inc} :

$$\sigma_{coh} = 4\pi \bar{b}^2 \quad (\text{A.10a})$$

$$\sigma_{inc} = 4\pi(\bar{b}^2 - \bar{b}^2) \quad (\text{A.10b})$$

A.1.4 Intensité diffusée, section efficace de diffusion et longueur de diffusion

L'intensité mesurée expérimentalement est proportionnelle à la *section efficace de diffusion*, $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$. La section efficace de diffusion est le nombre total de neutrons diffusés par unité de temps dans l'angle solide $d\Omega$ dans la direction 2θ et par unité de transfert d'énergie $d\hbar\omega$.

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\hbar\omega} = \frac{1}{\Phi_0} \frac{\text{nombre de neutrons diffusés par seconde dans } d\Omega \text{ et } d\hbar\omega}{d\Omega d\hbar\omega} \quad (\text{A.11a})$$

où Φ_0 est le flux de neutrons incident. Pour un échantillon monoatomique, on a :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\hbar\omega} = \frac{k_f}{k_i} \frac{\sigma}{4\pi} S(\vec{Q}, \omega) \quad (\text{A.11b})$$

Pour un échantillon composé de N atomes :

$$I \propto \frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \propto \frac{1}{N} \int_{-\infty}^{+\infty} \sum_{i,j} \langle e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i(0)} e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_j(t)} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (\text{A.12})$$

La diffusion engendrée par l'interaction avec un noyau donne naissance à une onde sphérique de fonction d'onde Ψ (fig. A.3, ^[118]). Ainsi, on mesure l'intensité de cette onde diffusée, I.

$$I = \Psi \Psi^* \quad (\text{A.13})$$

Comme

$$\Psi \propto \sum_{i=1}^n b_i e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i(t)} e^{-i\omega t} \quad (\text{A.14})$$

On a

$$I \propto \frac{1}{N} \int_{-\infty}^{+\infty} \sum_{i,j} \langle e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i(0)} e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_j(t)} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad (\text{A.15})$$

[118] Teixeira, J. *Introduction à la diffusion de neutrons*. (2007).

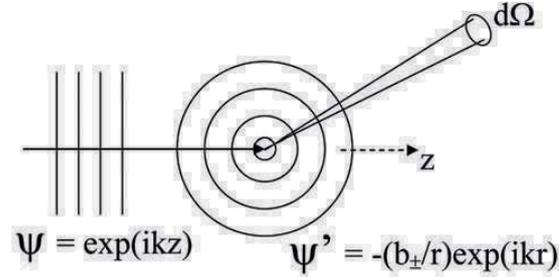


FIGURE A.3 – Schéma du principe de la diffusion par un noyau de longueur de diffusion b .

A.1.5 Le formalisme de Van Hove

Le formalisme de Van Hove fait le lien entre l'intensité et les fonctions de corrélation ^[119].

Des modèles dynamiques déterminent théoriquement la fonction de corrélation de paire, $G(\vec{r}, t)$. $G(\vec{r}, t)$ permet de calculer le facteur de structure. $G(r, t)$ est une fonction de corrélation, on peut la séparer en une fonction d'auto-corrélation, $G_s(\vec{r}, t)$ (qui donne la probabilité de trouver une particule p à \vec{r} au temps t), et une fonction de corrélation de paire $G_d(\vec{r}, t)$ (qui donne la probabilité d'y trouver une autre particule, p').

$$G(\vec{r}, t) = G_s(\vec{r}, t) + G_d(\vec{r}, t) \quad (\text{A.16})$$

Sa transformée de Fourier spatiale et en temps est :

$$S(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} G(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q} \cdot \vec{r} - \omega t)} d\vec{r} dt \quad (\text{A.17})$$

On définit ainsi respectivement $S_{inc}(\vec{Q}, \omega)$ et $S_{coh}(\vec{Q}, \omega)$ les transformés de Fourier de $G_s(\vec{r}, t)$ et de $G_d(\vec{r}, t)$.

Les fonctions $S(Q, \omega)$ et $I(Q, t)$ peuvent être obtenues directement par diffusion de neutrons. La section efficace de diffusion mesurée s'exprime en fonction de la fonction intermédiaire de diffusion ou facteur de structure dynamique, $S(\vec{Q}, \omega)$:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{1}{N} \cdot \frac{k_f}{k_i} (b_{coh}^2 S(\vec{Q}, \omega) + b_{inc} S_{inc}(\vec{Q}, \omega)) \quad (\text{A.18})$$

La transformée de Fourier en énergie de $S(Q, \omega)$ nous permet d'obtenir, $I(Q, t)$, la fonction intermédiaire de diffusion :

$$I(\vec{Q}, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\vec{Q}, \omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (\text{A.19})$$

[119] Hove, L. V. *Phys. Rev.* **95**(1), 249-262 (1954).

Annexe B

Diffusion de neutrons aux petits angles

La diffusion de neutrons aux petits angles permet d'accéder aux propriétés statiques de la matière à une échelle plus grande que celles des distances interatomiques. Elle permet l'étude de la conformation globale d'une macromolécule et ses interactions. Cette technique s'appuie sur l'hypothèse dite "approximation statique" : l'onde qui parcourt l'échantillon interagit avec les noyaux des atomes de celui-ci dans le volume de cohérence pendant des temps courts par rapport aux temps caractéristiques de la matière. L'approximation consiste à négliger la dépendance temporelle de $\vec{R}_i(t)$.

B.1 Principes

La technique de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) mesure les fluctuations de densités de longueur de diffusion à de faibles valeurs d'angle θ , donc à de faibles vecteurs d'onde, \vec{Q} . Elle permet d'étudier la structure et l'organisation des échantillons à grande échelle (de l'ordre 10 à 500 Angström environ) dans un milieu continu.

L'intensité du vecteur d'onde (fig. A.1) est directement reliée à l'angle 2θ de diffusion et la longueur d'onde λ du faisceau par la relation :

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (\text{B.1})$$

B.2 Le spectromètre

Un sélecteur mécanique de vitesse sélectionne une gamme de longueur d'onde du faisceau produit par la source froide du réacteur ($\Delta\lambda/\lambda \approx 0.1$). Pour l'étude de macromolécules de la taille

des protéines ou des polymères utilisés pour nos études, la longueur d'onde sélectionnée est en général de l'ordre de quelques Angström.

Ce faisceau de neutrons monochromatique est alors collimaté et envoyé sur l'échantillon (fig. B.1 [120]). Les neutrons diffusés sont détectés à une distance D, de l'échantillon. La collimation du faisceau dépend de la distance à laquelle est placé le détecteur.

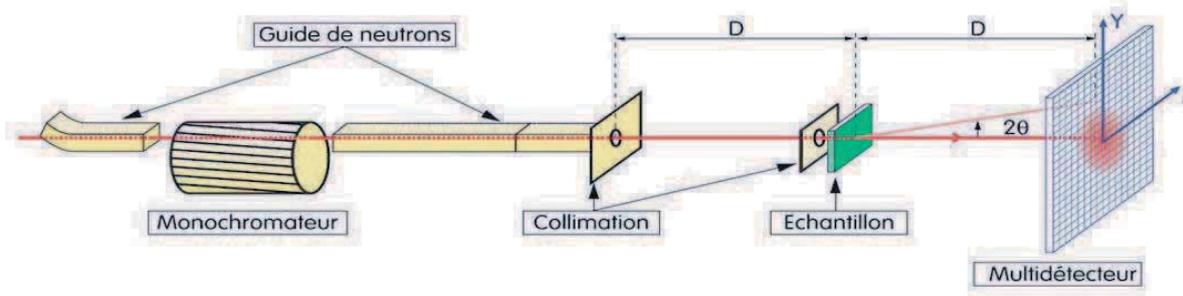


FIGURE B.1 – schéma de principe d'un spectromètre DNPA.

Afin d'avoir des informations sur une grande gamme de vecteurs d'onde (donc une grande échelle de distance) on doit souvent, pour un même échantillon, faire des mesures à différentes configurations de distance et de longueurs d'onde, puis regrouper les résultats.

B.3 Section efficace de diffusion

Expérimentalement, on mesure le nombre de neutrons diffusés par unité d'angle solide $d\Omega$. Pour un volume V comportant n noyaux de longueurs de diffusion b_i , on définit :

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}(Q) \quad (\text{B.2})$$

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \sum_{ij}^n b_i b_j \langle e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_j} e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i} \rangle \quad (\text{B.3})$$

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} n b_{inc}^2 + \frac{1}{V} b_{coh}^2 \sum_{ij}^n \langle e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_j} e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i} \rangle \quad (\text{B.4})$$

$$\frac{d\Sigma_{inc}}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} n b_{inc}^2 \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} b_{coh}^2 \sum_{ij}^n \langle e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}_j} e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_i} \rangle \quad (\text{B.6})$$

Dans le cadre de l'approximation statique, la section efficace de diffusion incohérente peut être considérée comme une constante en fonction du vecteur d'onde. Nous nous intéresserons par la suite uniquement à la section efficace de diffusion cohérente.

Pour un ensemble de N molécules contenant n atomes chacune.

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \sum_{\alpha} n b_{inc}^2 + \frac{1}{V} \sum_{\alpha\beta} \sum_{ij}^n \langle b_{coh}^{\alpha} \rangle \langle b_{coh}^{\beta} \rangle \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i} \rangle \quad (\text{B.7})$$

B.4 Facteur de forme, Facteur de structure

Pour de faibles valeurs de Q la matière peut être considérée comme un milieu continu. Considérons une solution comportant N macromolécules contenant chacune n atomes différents de longueurs de diffusion b_i . On peut définir sa densité de longueur de diffusion, $\rho = \sum_i \frac{b_i d N_a}{M}$ où d est la densité du composé, M sa masse molaire et N_a le nombre d'Avogadro. ρ_s est la densité de longueur de diffusion du solvant. La section efficace de diffusion cohérente de la solution peut être alors définie par :

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \langle [\int (\rho(\vec{R}) - \rho_s) e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}} dR^3]^2 \rangle \quad (\text{B.8})$$

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega} = \frac{1}{V} \nu^2 \Delta\rho^2 \sum_{\alpha,\beta} \sum_{i,j}^n \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j^{\alpha}} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i^{\beta}} \rangle \quad (\text{B.9})$$

$$(\text{B.10})$$

$$\text{où } \Delta\rho = \rho - \rho_s \quad (\text{B.11})$$

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega} = \frac{1}{V} \nu^2 \Delta\rho^2 n N^2 \left(\frac{1}{N^2} \sum_{i=j}^N \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j^{\alpha}} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i^{\beta}} \rangle + \sum_{i \neq j}^N \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j^{\alpha}} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i^{\beta}} \rangle \right) \quad (\text{B.12})$$

$$(\text{B.13})$$

On définit alors, P(Q) et Q(Q) comme

$$P(Q) = \sum_{i=j}^N \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j^{\alpha}} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i^{\beta}} \rangle \quad (\text{B.14})$$

$$Q(Q) = \sum_{i \neq j}^N \langle e^{i\vec{Q}\cdot\vec{R}_j^{\alpha}} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{R}_i^{\beta}} \rangle \quad (\text{B.15})$$

on a

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega} = \frac{1}{V} \nu^2 \Delta\rho^2 n N^2 (P(Q) + nQ(Q)) \quad (\text{B.16})$$

P(Q) est le **facteur de forme** de l'objet diffusant.

Dans le cas de systèmes centrosymétriques, cette relation peut être simplifiée en

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega} = \frac{1}{V} \nu^2 \Delta\rho^2 n N^2 P(Q) S(Q) \quad (\text{B.17})$$

$S(Q)$ est le **facteur de structure** de l'échantillon, il dépend de la forme des objets diffusants et des interactions entre eux.

Pour un système dilué, $S(Q) \simeq 1$ (les interactions entre objets diffusants sont très faibles) donc

$$\frac{d\Sigma_{coh}}{d\Omega} = \frac{1}{V} \nu^2 \Delta\rho^2 n N^2 P(Q) \quad (\text{B.18})$$

On peut ainsi déterminer le facteur de forme des objets.

B.5 Variation de contraste

Pour des constituants A et B dans un solvant, l'intensité diffusée dépend des densités de longueur de diffusion de A, de B et du solvant.

$$I(Q, \rho_A, \rho_B, \rho_s) = (\rho_A - \rho_s)^2 I_A(Q) + (\rho_A - \rho_s)(\rho_B - \rho_s) I_{AB}(Q) + (\rho_B - \rho_s)^2 I_B(Q) \quad (\text{B.19})$$

Dans le cas des solutions aqueuses, on peut varier la densité de longueur de diffusion du solvant en jouant sur le rapport H_2O/D_2O [121]. Si on note x la fraction d'eau légère en solution et $(1-x)$ la fraction d'eau lourde, alors,

$$\rho_s = x\rho_{H_2O} + (1-x)\rho_{D_2O} \quad (\text{B.20})$$

Ainsi, si la densité de longueur de diffusion de la particule A est telle que $\rho_{H_2O} < \rho_A < \rho_{D_2O}$, on pourra ajuster la densité de longueur de diffusion du solvant à celle de la molécule A, $\rho_A = \rho_s$.

L'intensité diffusée ne dépendra alors plus que du contraste entre B et le solvant :

$$I(Q, \rho_A, \rho_B, \rho_s) = (\rho_B - \rho_s)^2 I_B(Q) = (\rho_B - \rho_A)^2 I_B(Q) \quad (\text{B.21})$$

On dit que le signal de A est "éteint" (fig. B.2).

B.6 Caractérisation des échantillons par DNPA

B.6.1 Domaine de Guinier

Pour de faibles vecteurs d'onde, que l'on nomme domaine de Guinier ($Q.R_G \ll 1$), le facteur de forme ne dépend pas de la forme de la particule mais seulement de son rayon de giration, R_g .

$$P(Q) = \left(1 - \frac{(QR_g)^2}{3} + \dots\right) \quad (\text{B.22a})$$

d'où

$$P(Q) \approx e^{-Q^2 \frac{R_g^2}{3}} \quad (\text{B.22b})$$

cette approximation permet de déterminer le rayon de giration des objets diffusants.

[121] Cotton, J.-P. and Benoit, H. *J. Phys* **36**, 905–910 (1975).

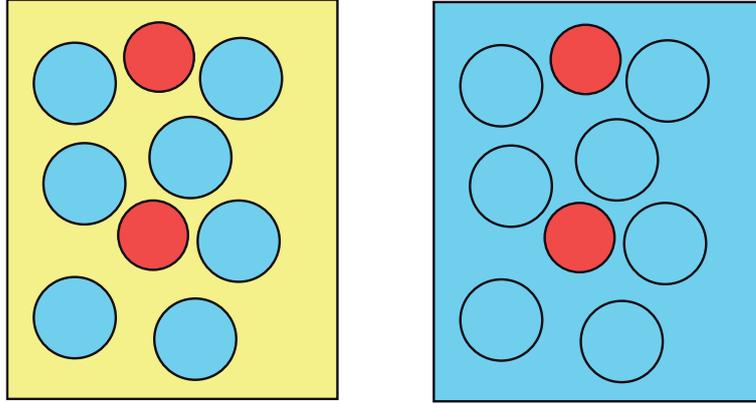


FIGURE B.2 – Schématisation de la méthode de variation de contraste. Chaque densité de longueur de diffusion est représentée par une couleur. Sur le premier schéma, chaque élément a une densité de longueur de diffusion différente. Sur le deuxième, la densité de longueur de diffusion du solvant a été ajustée grâce à un mélange solvant hydrogéné/solvant deutéré à la densité de longueur de diffusion d'un des éléments. On observera un signal correspondant uniquement à la diffusion de l'élément représenté en rouge.

B.6.2 Domaine de Porod

Dans le domaine asymptotique (à grand Q), le facteur de forme $P(Q)$ varie comme $Q^{-\alpha}$ où α est un exposant qui permet d'avoir des indications sur l'objet diffusant à son interface. Ce coefficient a été déterminé pour différents modèles de facteur de forme :

- pour une interface de type nette, $\alpha = 4$
- pour une chaîne gaussienne, $\alpha = 2$
- pour une chaîne à volume exclu, $\alpha = 1.7$

B.6.3 Détermination de la masse et des interactions des objets diffusants

Dans le cas de la diffusion par une macromolécule homogène de masse M , de longueur de diffusion b , de volume spécifique ν et à la concentration, c , dans un solvant de longueur de diffusion b_0 et de volume spécifique ν_0 , on peut obtenir la limite à petits angles de l'intensité diffusée.

$$\lim_{Q \rightarrow 0} I(Q) = \left(b - \frac{b_0 \nu}{\nu_0}\right)^2 \left(\frac{c}{M}\right)^2 kT \left(c \frac{d\pi}{dc}\right)^{-1} \quad (\text{B.23})$$

Lorsque la concentration en objet diffusant tend vers 0, on a :

$$\left(c \frac{d\pi}{dc}\right)^{-1} = \left(kT \frac{c}{M}\right) \quad (\text{B.24a})$$

d'où

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_{Q \rightarrow 0}}{c} \right) = (b - b_0 \frac{\nu}{\nu_0})^2 M \quad (\text{B.24b})$$

Dans ce travail, on définit $K = (b - b_0 \frac{\nu}{\nu_0})$ et la masse apparente des objets diffusants, M_a :

$$M_a = \frac{1}{K^2} \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_{Q \rightarrow 0}}{c} \right) \quad (\text{B.25})$$

En extrapolant l'intensité diffusée à vecteur d'onde nul et à concentration nulle, on obtient donc la masse de l'objet diffusant. En pratique, il faudra faire plusieurs mesures à faibles concentrations afin d'extrapoler les résultats à concentration en objet diffusant nulle.

En faisant le développement classique de la pression osmotique pour des particules en interaction faible telle qu'en solution diluée, on a

$$\left(c \frac{d\pi}{dc} \right)^{-1} = \frac{kTc}{M} (1 - 2a_2c/M + \dots) \quad (\text{B.26})$$

d'où

$$\left[\frac{I_0}{c} \right]_{c \rightarrow 0} = K^2 \cdot M (1 - 2a_2c/M + \dots) \quad (\text{B.27})$$

a_2 est le second coefficient du viriel, c'est à dire le volume exclu entre deux objets. Celui-ci représente les interactions entre particules et dépend de la forme des objets, du solvant... Dans le cas de sphères dures de rayon R_s et de volume V_s en bon solvant, on $a_2 = 16\pi R^3/3 = 4V_s$.

Le coefficient d'interaction entre deux objets est directement accessible grâce à la pente des droites représentant l'intensité diffusée en fonction de la concentration en objet diffusant. Une pente négative reflète des interactions répulsives, tandis qu'une pente positive reflète des interactions attractives.

B.7 Quelques facteurs de formes usuelles

Sphère

Le facteur de forme d'une sphère homogène de rayon R_s , $P_s(Q, R_s)$ est :

$$P_s(Q, R_s) = \left[3 \frac{\sin(QR_s) - QR_s \cos(QR_s)}{(QR_s)^3} \right]^2 \quad (\text{B.28})$$

Polymère gaussien

Pour un polymère gaussien, de rayon de giration R_g , le facteur de forme est déterminé par la formule de Debye.

$$P(Q) = \frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x) \text{ avec } x = Q^2 R_g^2 \quad (\text{B.29})$$

B.8 Traitement des données

Les spectres comptés par le détecteur et enregistrés par électroniques doivent être traités afin d'obtenir l'intensité diffusée absolue en fonction du vecteur de diffusion \vec{Q} .

La diffusion de nos échantillons étant isotrope, on procède tout d'abord à un regroupement radial des données. L'intensité diffusée aux petits angles par un volume d'échantillon, V , est alors :

$$I(Q) = \Phi \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) \Delta\Omega V \quad (\text{B.30})$$

$$I(Q) = \Phi \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) \Delta\Omega A l \quad (\text{B.31})$$

Où Φ est le flux du faisceau incident, A est la section du faisceau incident et l l'épaisseur de l'échantillon.

Une partie des neutrons étant absorbée par l'échantillon, on définit sa transmission comme

$$T = \frac{I_{tr}}{I_i} \quad (\text{B.32})$$

où I_{tr} et I_i sont les intensités transmises et incidentes.

Si on tient maintenant compte de l'efficacité du détecteur ϵ_d et de la transmission de l'échantillon, l'intensité diffusée détectée est :

$$I(Q) = \epsilon_d \Phi \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) \Delta\Omega A l T \quad (\text{B.33})$$

On peut définir une constante d'appareil $C(\lambda)$ qui dépend uniquement des conditions expérimentales : $C(\lambda) = \Phi \Delta\Omega \epsilon_d A$ On a ainsi

$$I(Q) = C(\lambda) T l \frac{d\Sigma}{d\Omega} \quad (\text{B.34})$$

Par ailleurs, on doit tenir compte de la cellule contenant l'échantillon et soustraire la diffusion due à cette dernière. Pour finir, le signal détecté est normalisé par l'eau légère ou le plexi afin de corriger les variations d'efficacité de chaque cellule du détecteur ^{[122][123]}. Pour chaque série de données, on calcule la section efficace de diffusion due à l'objet diffusant ainsi :

$$\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega} \right)_{\text{echantillon}}(Q) = \left(\frac{d\Sigma}{d\Omega} \right)_{\text{eau}} \frac{\frac{I_{exp}(Q)}{l T_{ech}} - \frac{I_{CV}(Q)}{l_{CV} T_{CV}}}{\frac{I_{eau}(Q)}{l_{eau} T_{eau}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV}}} \quad (\text{B.35})$$

où le sigle CV désigne la cellule vide.

[122] Lindner, P. and Zemb, T. *Neutrons, X-ray and light : scattering methods applied to soft and condensed matter*. (2002).

[123] Calmettes, P. *Diffusion des neutrons aux petits angles : choix de l'échantillon et traitement des données*. (1999).

Annexe C

Spectromètre à écho de spin

Plusieurs techniques permettent d'obtenir des informations sur la dynamique des échantillons sur une large gamme de temps. Le temps de vol (TOF), le spin écho (NSE) et la rétrodiffusion (BS) permettent de sonder des gammes de temps et d'énergie différentes (fig. C.1). Pour notre étude, nous avons utilisé la technique d'écho de spin de neutrons. Contrairement aux autres techniques, la résolution de la mesure ne dépend pas de l'incertitude sur la longueur d'onde du faisceau. Cette technique permet de mesurer l'intensité diffusée dans l'espace des temps et non dans celui des transferts d'énergie. Elle permet ainsi d'obtenir la dynamique à des temps plus longs.

C.1 Généralités

Le spectromètre à écho de spin est un outil qui permet d'analyser la diffusion quasi-élastique de neutrons avec la plus haute résolution en énergie. Le principe de ce type de spectromètre a été étudié par Mezei en 1972 ^[124].

Le spectromètre à écho de spin mesure directement les changements de vitesse de chaque neutron. Il ne mesure pas la fonction de diffusion, $S(Q, \omega)$, mais la fonction intermédiaire de diffusion $I(Q, t)$.

Les mesures que nous avons effectuées ont été réalisées sur le spectromètre MUSES au Laboratoire Léon Brillouin.

[124] Mezei, F. *Z. Phys.* **255**, 146 (1972).

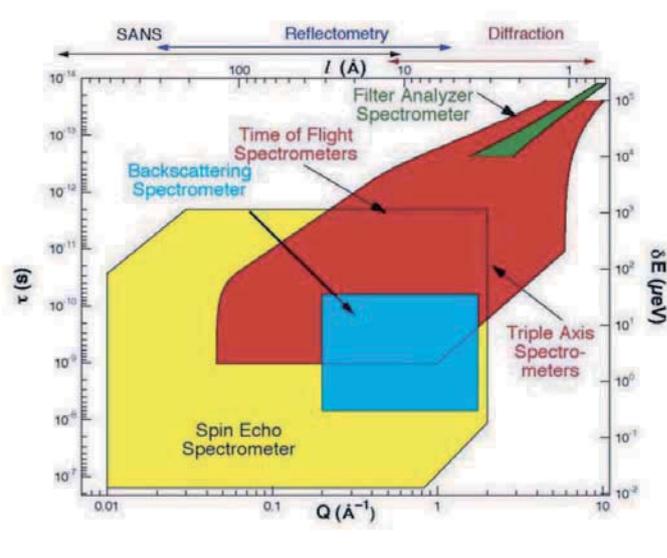


FIGURE C.1 – Schéma des gammes d'énergie et de vecteurs d'onde qui peuvent être sondés par différents spectromètres.

C.2 Le spectromètre

Un faisceau monochromatique de neutrons de longueur d'onde λ_0 est polarisé dans la direction Z. Un "flipper $\pi/2$ " permet d'orienter le spin des neutrons dans une direction perpendiculaire à un champ magnétique, \vec{B}_1 . Cela crée une force perpendiculaire au plan formé par le moment magnétique de spin et le champ \vec{B}_1 . Le spin des neutrons (1/2) entre alors en précession dans la direction du champ magnétique, \vec{B}_1 selon la pulsation de Larmor (C.1) :

$$\omega_1 = \gamma B_1 \quad (\text{C.1})$$

où γ est le rapport gyromagnétique du neutron.

Dans une expérience d'écho de spin, le faisceau de neutrons, polarisés suivant z, traverse deux bras alternativement, séparés par l'échantillon et constitués de deux bobines dont les champs magnétiques, \vec{B}_1 et \vec{B}_2 ont des sens opposés.

Dans chaque bras de longueur S, le spin des neutrons de longueurs d'onde λ_0 précesse et, les angles totaux de précession, $\Phi_1^{\lambda_0}$ et $\Phi_2^{\lambda_0}$, sont directement proportionnels au temps passé dans chaque champ magnétique

$$\Phi_1^{\lambda_0} = \frac{\gamma m_n \lambda_0}{h} \int_0^S B_1 dz = 2\pi N_1^{\lambda_0} \quad (\text{C.2a})$$

où

$$N_1^{\lambda_0} = \frac{\gamma m_n \lambda_0}{2\pi h} \int_0^S B_1 dz \quad (\text{C.2b})$$

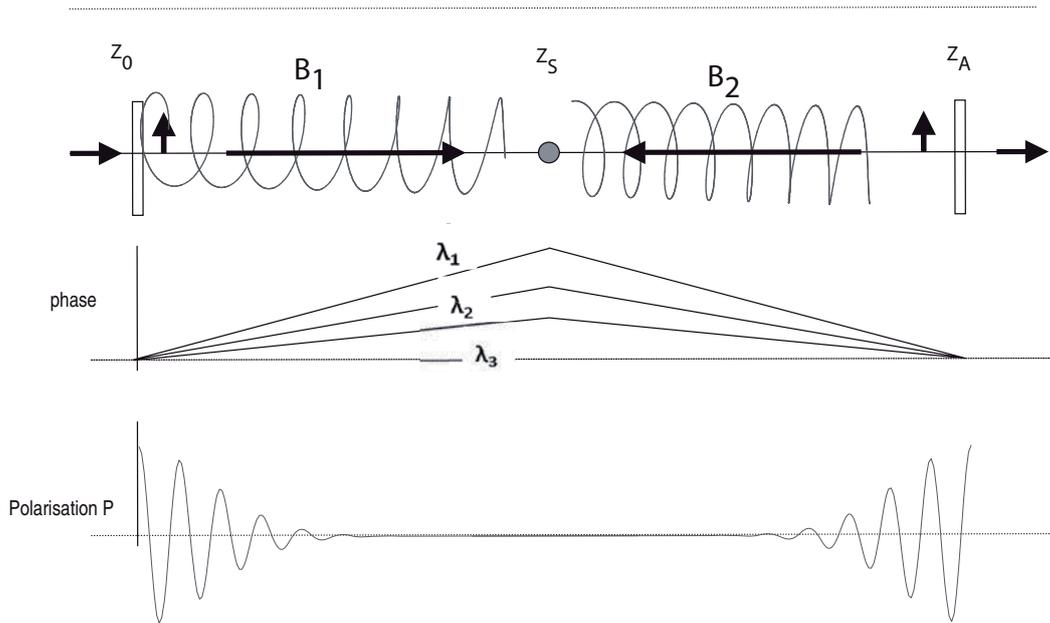


FIGURE C.2 – Schéma de principe d'un spectromètre à écho de spin. Un neutron de longueur d'onde λ_0 avec un spin $|+\rangle$ arrive à $t=0$ à la position $z=Z_0$. Un "flipper $\pi/2$ " permet d'orienter le spin des neutrons dans une direction perpendiculaire à un champ magnétique, \vec{B}_1 et d'initier la précession. Le neutron traverse une bobine de longueur S qui crée un champ d'intensité B_1 . Le neutron diffusé après l'échantillon traverse un champ B_2 de même intensité que B_1 mais de direction opposée. La phase accumulée, Φ , dépend du temps, de la longueur d'onde et de la distance (partie centrale du schéma). A cause de la polychromaticité du faisceau ($\Delta\lambda/\lambda \approx 15\%$), la polarisation, $P=\langle\cos\Phi\rangle$ (partie basse du schéma) diminue lorsque le neutron précesse. Lorsque la diffusion est élastique, l'angle de précession totale, $\Phi(Z_A)$ est nul. Lorsque la diffusion est quasi-élastique, la polarisation du signal en Z_A est une fonction du temps de relaxation, τ .

De même

$$\Phi_2^{\lambda_0} = \frac{\gamma m_n \lambda_0}{\hbar} \int_0^S B_2 dz = 2\pi N_2^{\lambda_0} \quad (\text{C.3a})$$

où

$$N_2^{\lambda_0} = \frac{\gamma m_n \lambda_0}{2\pi h} \int_0^S B_2 dz \quad (\text{C.3b})$$

Le faisceau n'est pas parfaitement monochromatique, on a une distribution de longueur d'onde centrée sur λ_0 avec $\Delta\lambda/\lambda \approx 15\%$. Pour une longueur d'onde λ'_0 , l'angle de precession peut être calculé simplement.

$$\Phi_1^{\lambda'_0} = \frac{\gamma m_n \lambda'_0}{h} \int_0^S B_1 dz = 2\pi N_1^{\lambda_0} \frac{\lambda'_0}{\lambda_0} \quad (\text{C.4a})$$

$$\Phi_2^{\lambda'_0} = \frac{\gamma m_n \lambda'_0}{h} \int_0^S B_2 dz = 2\pi N_2^{\lambda_0} \frac{\lambda'_0}{\lambda_0} \quad (\text{C.4b})$$

$$\Phi \lambda'_0 = \Phi_2 \lambda'_0 + \Phi_1 \lambda'_0 \quad (\text{C.5})$$

Dans le cas d'une diffusion élastique, le nombre de tours effectués dans chaque bras est le même lorsque l'intégrale du champ dans chaque bras est la même quelle que soit la longueur d'onde. Ce point est appelé "l'écho".

Lorsque l'on place un échantillon quasiélastique entre les deux bras, on observe un étalement du spectre des vitesses dans le second bras en fonction des propriétés dynamiques de l'échantillon.

Le signal mesuré est la polarisation des neutrons diffusés, c'est-à-dire la projection de l'orientation des spins à la fin du second bras.

$$P = \frac{|+ \rangle \langle -| - \rangle \langle +|}{|+ \rangle \langle +| - \rangle \langle -|} \quad (\text{C.6})$$

Pour un diffuseur purement élastique, on a

$$P = \int_0^{+\infty} f(\lambda'_0) \cos(\alpha \lambda'_0) d\lambda'_0 \quad (\text{C.7})$$

$f(\lambda'_0)$ est la distribution en longueur d'onde du faisceau incident, supposée gaussienne.

$$f(\lambda'_0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-(\lambda'_0 - \lambda_0)^2 / 2\sigma^2} \quad (\text{C.8})$$

ce qui nous donne :

$$P = \cos(\alpha \lambda_0) e^{-\alpha^2 \sigma^2 / 2} \quad (\text{C.9})$$

L'intensité de la polarisation en fonction du champ a une forme d'écho.

Lorsqu'il y a un processus quasiélastique, on peut exprimer l'intensité de la polarisation du faisceau diffusé :

$$\langle P \rangle = \int_0^{+\infty} I(\lambda'_0) \int_{-\lambda'_0}^{+\infty} p(\lambda'_0, \delta\lambda) \cos(\Phi(\lambda'_0, \delta\lambda)) d(\delta\lambda) d\lambda'_0 \quad (\text{C.10})$$

où $p(\lambda'_0, \delta\lambda)$ est la probabilité qu'un neutron ayant la longueur d'onde λ'_0 soit diffusé au vecteur d'onde \vec{Q} et induise un changement de longueur d'onde de $\delta\lambda$.

donc

$$\langle P \rangle = \int_0^{+\infty} I(\lambda) d\lambda \int_{-\infty}^{+\infty} S(\vec{Q}, \omega) \cos(\omega\tau) d\omega \approx I(\vec{Q}, \tau) \quad (\text{C.11})$$

avec τ_{NSE} le temps de Fourier :

$$\tau = \frac{m^2 \gamma \int B dz}{2\pi h^2} \lambda^3 \quad (\text{C.12})$$

La polarisation s'exprime directement comme une fonction du temps de Fourier, τ .

Annexe **D**

Spectroscopie optique

Une molécule qui possède un état fondamental S_0 (d'énergie E_0) et un ensemble d'états excités S_i (d'énergie E_i) peut absorber un photon d'énergie $E = h\nu$ s'il existe un état i tel que $h\nu = E_i - E_0$. La spectroscopie d'absorption permet de sonder les états excités des atomes et des molécules dans un domaine d'énergie donné. Nous nous intéresserons ici à la spectroscopie UV-visible. Les photons UV, ou visibles, ayant des énergies de l'ordre de grandeur de celles des électrons de valence, la spectroscopie d'absorption permet d'observer les transitions électroniques.

D.1 Principe

Le schéma de principe de la spectroscopie d'absorption est représenté sur la figure D.1.

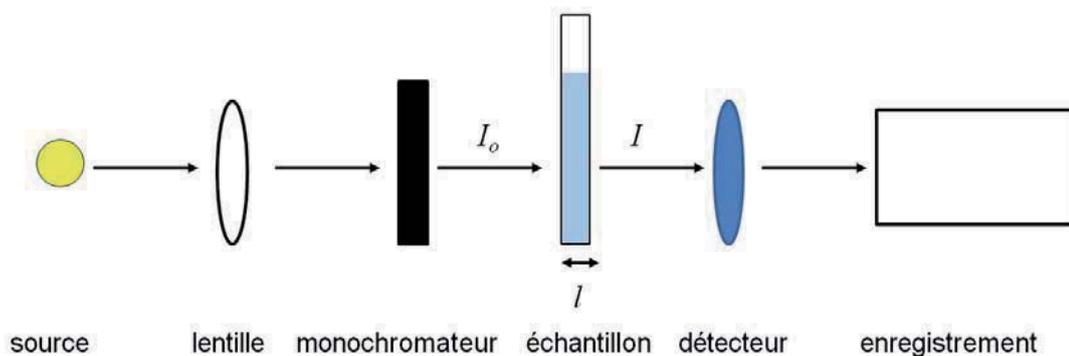


FIGURE D.1 – Schéma de principe d'un spectromètre d'absorption optique.

Un faisceau de lumière de longueur d'onde λ et d'intensité I_0 est envoyé sur l'échantillon. L'intensité I mesurée en sortie est celle qui n'a pas été absorbée par l'échantillon. Elle permet de

définir la transmission à une longueur d'onde donnée, $T(\lambda)$, ainsi que l'absorbance, $A(\lambda)$:

$$T(\lambda) = 100 \cdot \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (\text{D.1})$$

$$A(\lambda) = -\log_{10} T(\lambda) \quad (\text{D.2})$$

L'absorption de photons UV ou visibles est souvent reliée à des transitions électroniques de type $\sigma \rightarrow \pi$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$; c'est pourquoi la plupart des chromophores (molécules colorées) contiennent des doubles ou des triples liaisons. Dans le cas de liaisons conjuguées, on voit souvent apparaître plusieurs pics d'absorbance distincts. Dans le cas de complexes ligandés, la modification du ligand va induire une modification de la longueur d'onde de l'absorption du complexe (c'est le cas pour l'hème de la myoglobine et de l'hémoglobine).

D.2 Mesure de concentration par spectroscopie optique

Pour de faibles concentrations, l'absorbance est définie par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad (\text{D.3})$$

où l est le chemin optique exprimé en cm et c la concentration de la solution étudiée exprimée en mol.l^{-1} , $\epsilon(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire en $\text{l.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$. $\epsilon(\lambda)$ est caractéristique d'une molécule à la longueur d'onde λ dans un environnement et un état donnés. Pour de nombreuses molécules $\epsilon(\lambda)$ est tabulé dans la littérature. Pour la myoglobine et l'hémoglobine avec leurs différents ligands, ces données sont récapitulées dans ^[125]. La concentration des solutions est donc mesurée à partir de la mesure de leur l'absorbance.

[125] Antonini, E. and Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. (1971).

Annexe E

Dichroïsme circulaire

E.1 Principe

Le dichroïsme circulaire est une méthode de spectroscopie optique permettant de mesurer le pouvoir rotatoire d'un échantillon.

La technique utilisée est proche de la spectroscopie d'absorption. Une onde polarisée circulaire de longueur d'onde fixe est envoyée sur un échantillon. Les ondes polarisées circulaires gauche et droite ne sont pas absorbées de façon équivalente par une molécule chirale. Après avoir traversé l'échantillon, la lumière initialement polarisée circulairement ressort polarisée elliptiquement. La somme de 2 ondes circulaires droite et gauche d'intensité différentes donne une ellipse.

L'absorbance d'un milieu dichroïque peut être décomposée en absorbance "gauche", A_G et en absorbance "droite", A_D qui sont les absorbances dues respectivement aux ondes circulaires gauches et droites. Elles suivent, à faible concentration, la loi de Beer-Lambert.

$$A_G = \epsilon_G.l.c \quad (\text{E.1})$$

$$A_D = \epsilon_D.l.c \quad (\text{E.2})$$

d'où

$$\Delta A = (\epsilon_G - \epsilon_D).l.c = \Delta\epsilon.l.c \quad (\text{E.3})$$

où ϵ_G , et ϵ_D , sont les coefficients d'extinction molaires respectifs de la lumière polarisée circulaire gauche et circulaire droite, c est la concentration molaire, et l est la longueur traversée en cm. $\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$ est la différence des coefficients d'extinction molaires. Cependant la grandeur mesurée n'est pas directement $\Delta\epsilon$. En effet, il est seulement possible de mesurer l'ellipticité θ de l'onde obtenue grâce à des polariseurs.

Pour relier l'ellipticité mesurée au dichroïsme circulaire, on a recours à une approximation très souvent vérifiée : on suppose que l'effet de ce dichroïsme est faible, on fait alors l'approximation $\tan\theta \approx \theta$. On obtient :

$$\Delta\epsilon \propto \frac{\theta}{cl} \quad (\text{E.4})$$

La mesure de l'ellipticité θ nous permet d'avoir des informations sur la structure chirale des molécules. On définit ainsi l'ellipticité molaire, $[\theta]$:

$$[\theta] = 100\theta/(c.l) \quad (\text{E.5})$$

où $[\theta]$ s'exprime en $\text{deg.cm}^2.\text{mol}^{-1}$.

E.2 Etude de la structure secondaire des protéines par CD

En ce qui concerne les protéines, leur structure secondaire possède des propriétés de chiralité. Les hélices α et les feuillets β et la "pelote aléatoire" possèdent des asymétries structurales qui permettent d'obtenir pour chacune d'entre elles un signal dichroïque différent. L'étude par DC en UV-lointain d'une protéine permet donc de sonder la structure secondaire des protéines (fig. E.1). Pour les protéines comportant des hélices α on mesure l'ellipticité à 222nm, pour celles composées de feuillets β , la mesure est effectuée à 217nm.

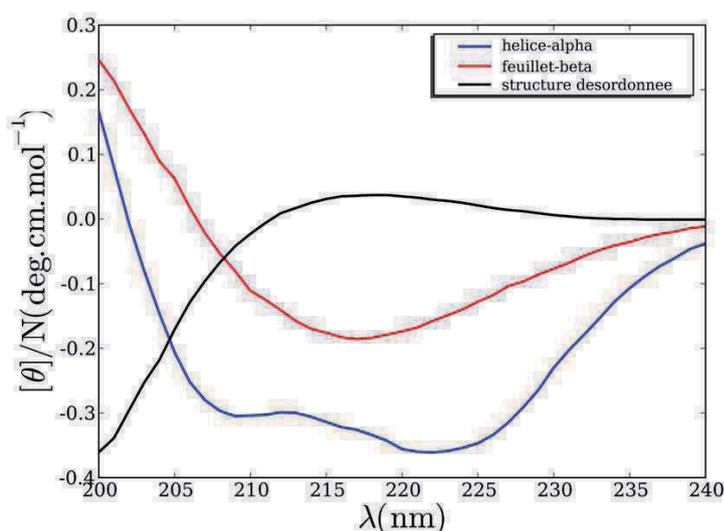


FIGURE E.1 – Signal dichroïque dans l'UV des structures hélice α (—), feuillet β (—) et de la pelote aléatoire (—).

La dénaturation thermique des protéines peut donc être suivie par DC. Pour une protéine

"tout α " (la même étude peut être faite pour une protéine ne comportant que des structures β en adaptant la longueur d'onde), l'évolution du signal dichroïque peut être étudiée en fonction de l'évolution du dénaturant (la température, un agent dénaturant tel que l'urée ou le chlorure de guanadinium...etc). Dans le cas des dénaturations thermiques, nous pouvons effectuer une rampe en température (nous avons utilisé dans toutes nos études une rampe de 0.2°C/min) et observer le signal dichroïque à chaque température. Ce signal est fonction de la structure secondaire et permet d'accéder à la fraction en protéine native et dénaturée.

F
Annexe

Préparation des échantillons

F.1 Préparation des protéines

F.1.1 La myoglobine

Nous avons utilisé de la myoglobine de cœur de cheval lyophilisée (Sigma-Aldrich). Nous avons dissous Mb dans le tampon phosphate 10mM, pH 7. Les solutions de myoglobine ont ensuite été centrifugées à 5 000g pendant 10 minutes. Les agrégats, qui n'étaient pas visibles à l'œil nu, restent au fond du tube de centrifugation. La solution est ensuite dialysée dans son tampon afin de retirer de la solution les additifs ajoutés par Sigma puis recentrifugée.

F.1.2 L'hémoglobine

Dans un premier temps, nous avons essayé d'utiliser de l'hémoglobine humaine lyophilisée (Sigma-Aldrich) que nous avons dissoute dans une solution tampon. Cette solution posait différents problèmes. Lors de la lyophilisation de l'hémoglobine, des additifs sont ajoutés. Les solutions d'hémoglobine préparées à partir de l'Hb lyophilisée sont un mélange d'hémoglobine avec différents degrés d'oxydation et donc différents états du ligand (met, deox, oxy). Par ailleurs, elle ne nous a pas permis d'obtenir des solutions d'hémoglobine à des concentrations proches de la concentration *in-vivo* de l'Hb.

Donc, nous avons donc finalement préféré purifier directement l'hémoglobine humaine à partir de poches de sang. Les solutions d'hémoglobine sont préparées à partir de culots sanguins fournis par l'Institut Français du Sang. Nous séparons les globules rouges du plasma, puis nous libérons l'hémoglobine des globules rouges. L'hémoglobine est ensuite purifiée selon le protocole suivant.

Purification de l'hémoglobine

L'ensemble de la purification est effectuée à 4°C.

Le sang est centrifugé à 2 500 g pendant 5 minutes. Cette centrifugation permet de séparer le serum des hématies sans faire éclater les globules rouges. Les globules rouges se trouvent au fond du tube tandis que le plasma reste dans le surnageant, que l'on retire à l'aide d'une pipette. La solution d'hémoglobine est ensuite lavée par une solution de NaCl physiologique à 9 g.l⁻¹ dans des proportions de 1 volume de solution de NaCl pour 2 volumes de solution sanguine. La solution obtenue est recentrifugée à 2 500 g pendant 5 minutes et on retire une nouvelle fois le surnageant. Cette opération est reproduite 3 fois. Cette opération de lavage permet d'éliminer les graisses présentes dans la solution.

Dans un second temps, on va libérer les globules rouges de leur contenu en procédant à une lyse par l'eau (1 volume d'eau pour un volume de solution sanguine). Les membranes des globules rouges sont ensuite précipitées en ajoutant une solution de phosphate à pH 6.8 et 2.8 M dans des proportions de 1 volume pour 10 volumes de solution sanguine et en la plaçant sous agitation une demi-heure. On centrifuge la solution à 5 000 g pendant 30 minutes. Nous prélevons l'hémoglobine qui est alors dans le surnageant à l'aide d'une pipette puis, la dialysons contre de l'eau pendant 24 heures en changeant plusieurs fois le réservoir de dialyse. Nous recentrifugeons à 5 000 g pendant 10 minutes la solution d'hémoglobine puis la passons sur une colonne désionnissante afin de la libérer du 2,3-Diphosphoglycerate. La solution d'hémoglobine obtenue a une concentration de 20 à 50 g.l⁻¹.

Concentration de l'hémoglobine

Les solutions obtenues ont une concentration de l'ordre de 50 g.l⁻¹. Nous avons concentré l'hémoglobine en procédant à différentes centrifugations successives à 6 000 g sur des centricons de masse de coupure de 30 000 g.mol⁻¹ pendant une durée de 2 à 4 jours afin d'atteindre une concentration de l'ordre de 330 g.l⁻¹ (c'est la concentration physiologique).

F.1.3 Détermination de la concentration en hémoprotéine

a) Spectroscopie d'absorption des hémoprotéines

Le spectre d'absorption des hémoprotéines dépend fortement de la structure de la porphyrine et, plus exactement, du degré d'oxydation du Fer et de son ligand [125]. Dans le visible, les propriétés d'absorption de la Mb et de l'Hb sont liées à la structure de l'hème. L'absorbance est due aux transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ du système aromatique de la porphyrine. Ces transitions sont perturbées par les orbitales des électrons 3d du fer et dépendent du degré d'oxydation du

[125] Antonini, E. and Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. (1971).

fer et du champ des ligands.

Les spectres d'absorption de l'hémoglobine et de la myoglobine (dans leurs différentes formes), présentent différentes bandes caractéristiques^[125] :

entre 390 et 450 nm une bande intense, dite *bande de Soret*. Elle est principalement liée aux transitions des électrons π de la porphyrine. Cette bande existe quelle que soit la forme dans laquelle est l'hémoprotéine.

entre 500 et 650 nm des bandes présentes dans cette zone sont également principalement liées aux transitions des électrons π de la porphyrine. Lorsque le fer est ligandé, les bandes présentes dans cette zone dépendent fortement de la forme dans laquelle se trouve l'hémoprotéine.

entre 250 et 350 nm (UV) l'absorption par des protéines est due aux acides aminés. A 280 nm, l'absorption dépend principalement de la teneur de Tyrosine, de Tryptophane et Phénylalanine.

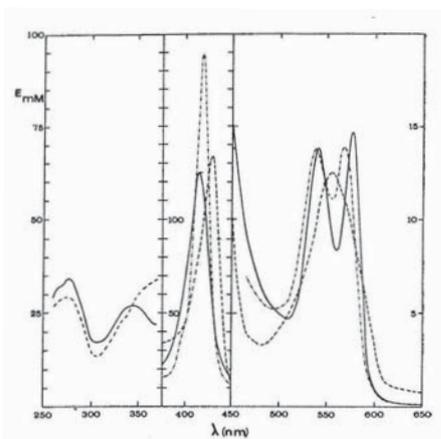


FIGURE F.1 – Spectre UV-visible de l'hémoglobine : trait plein : oxyhémoglobine ; pointillés : deox; points et pointillés : HbCO.

b) Dosage de la myoglobine et de l'hémoglobine par spectroscopie d'absorption

Comme nous l'avons vu, le spectre d'absorption des hémoprotéines dépend de l'état du ligand. Afin de déterminer la concentration en hémoprotéine, nous devons mesurer l'absorption de l'hème ligandé sous une seule forme. La méthémoglobine et la metmyoglobine ont une très forte affinité pour le cyanure, CN^- . Cette forte affinité de CN^- pour l'hème est la cause de sa grande toxicité. Nous avons utilisé cette réaction pour déterminer précisément la concentration

[125] Antonini, E. and Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. (1971).

des 2 hémoprotéines. Nous oxydons tout d'abord l'hémoprotéine en forme met. Pour cela nous utilisons du nitrite de sodium, $NaNO_2$ en large excès, puis nous dialysons la solution. Nous ajoutons du cyanure de potassium (KCN) en large excès afin de complexer le fer de l'hème. Nous obtenons de la cyanmethémoglobine et de la cyanmetmyoglobine qui possèdent chacune un pic d'absorption connu à $\lambda=546$ nm ^[125]. Contrairement aux autres complexes formés par l'hème, l'absorption du complexe à cette longueur d'onde ne dépend pas du tampon et du pH de la solution. La concentration de la solution est déterminée grâce à la loi de Beer-Lambert.

L'ensemble des concentrations en hémoglobine et en myoglobine a été déterminé par mesure de l'absorption de la cyanmethémoglobine et de la cyanmetmyoglobine.

[125] Antonini, E. and Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. (1971).

F.2 Préparation du complexe PEG-hémoglobine-PEG

F.2.1 Préparation de l'hémoglobine

L'hémoglobine a été préparée comme décrit précédemment. La solution d'hémoglobine a ensuite été dialysée dans un tampon PBS à pH 7.

F.2.2 Fonctionnalisation du PEG

La réaction de fonctionnalisation du mono méthoxy poly(éthylène glycol) est une réaction d'estérification entre la fonction terminale OH de l'alcool du PEG et l'acide maleoyl--alanine (MAP). Les masses de PEG utilisées sont 5 000, 10 000, 16 000, 20 000 et 30 000 et 35 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les estérifications étant fortement sensibles à la présence d'eau en solution, le PEG a besoin d'être lyophilisé avant la réaction. Pour déplacer l'équilibre dans le sens de la formation de l'ester, le poly(éthylène-glycol) a été préalablement séché via une lyophilisation dans le THF.

Dans un tricol, on ajoute successivement le PEG, la DCC (dicyclohexylcarbodiimide) puis le MAP dans les rapports de quantité indiqués dans le tableau. La DCC sert à capter l'eau formée au cours de la réaction pour toujours déplacer l'équilibre dans le sens de la formation de l'ester.

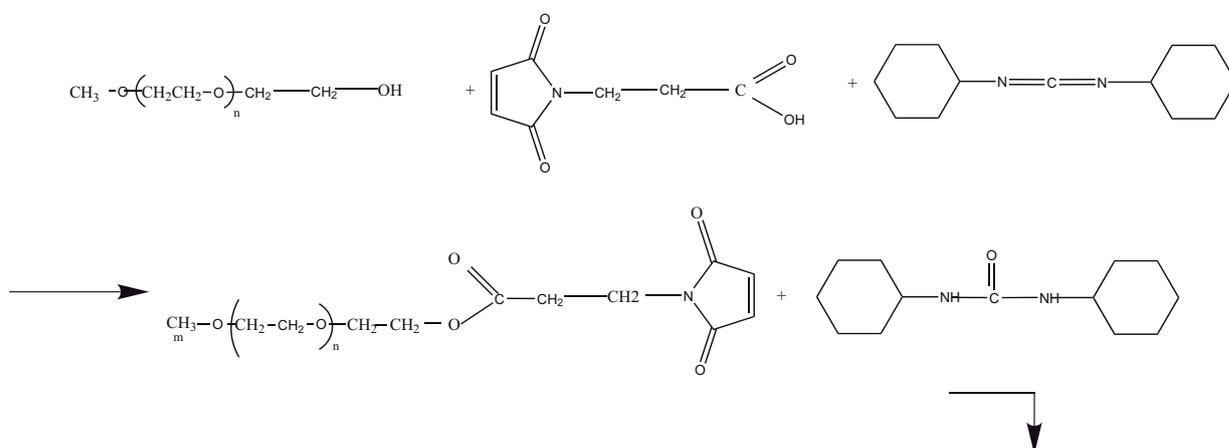


FIGURE F.2 – Réaction d'estérification : fonctionnalisation du PEG par un groupe maléimide.

Le produit formé (urée) précipite et on l'élimine en le filtrant sur Buchner. L'urée étant un agent dénaturant pour les protéines, il est particulièrement important de bien supprimer toute trace d'urée du PEG que nous allons greffer.

Nous avons ensuite optimisé notre taux de fonctionnalisation en modifiant les conditions expérimentales, le temps de fonctionnalisation, les quantités stœchiométriques de chacun des

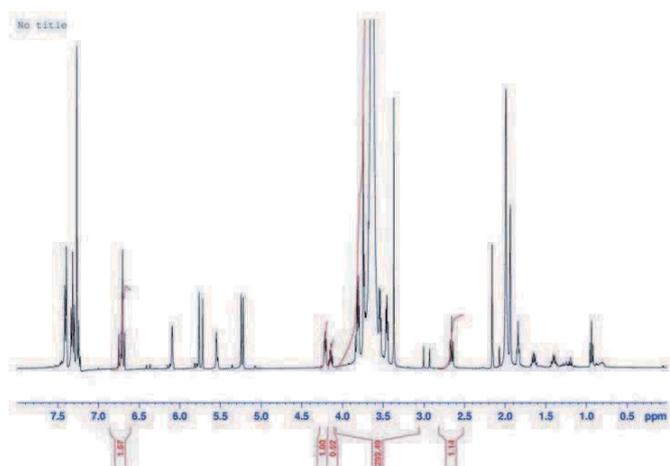
ANNEXE F. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

réactifs ou en ajoutant un catalyseur le DMAP (diméthyl amino pyridine) qui permet de déprotomer l'hydrogène de l'alcool pour favoriser la réaction.

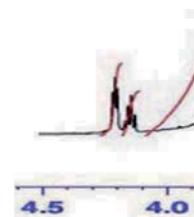
exp	PEG	DCC	MAP	temps de réact.	autre	% Rendement de fonctionnalisation
1	1 eq. mol	1.5 eq. mol	2 eq. mol	1 jour	/	66%
2	1 eq. mol	1.5 eq. mol	2 eq. mol	1 jour	0.3 eq mol DMAP	10%
3	1 eq. mol	1.5 eq. mol	3 eq. mol	1 jour	/	66%
3	1 eq. mol	1.5 eq. mol	2 eq. mol	3 jours	/	80%
3	1 eq. mol	1.5 eq. mol	3 eq. mol	3 jours	/	100%
3	1 eq. mol	1.5 eq. mol	3 eq. mol	1 jour	chauffage à 40°	100%

TABLE F.1 – Optimisation des paramètres de réaction de la fonctionnalisation du PEG.

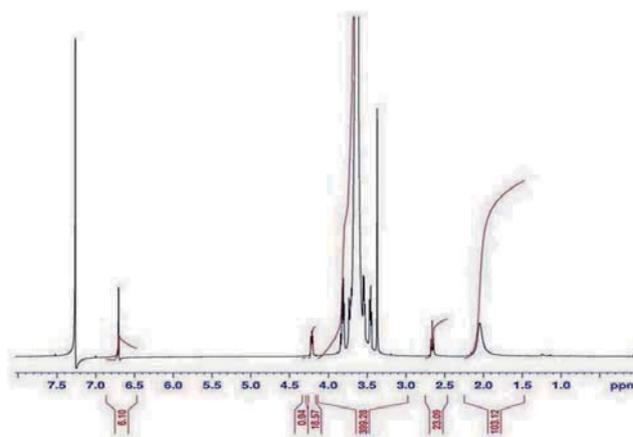
Après réaction, le polymère est ensuite purifié encore deux fois par recristallisation dans le dichlorométhane. Le rendement de cette fonctionnalisation a été déterminé par RMN ¹H du proton. Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker de fréquence 400 MHz. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel XWin NMR. L'analyse des réactifs de départ (MAP et le PEG) nous permet d'identifier les déplacements chimiques des protons pour mieux différencier produits et réactifs. Ainsi on observe que le déplacement des protons des PEG greffés ou non greffés sont différents. Lorsque le PEG est greffé, le triplet présent initialement à 4.1 ppm se déplace à 4.2 ppm. Le rapport des intensités des signaux des déplacements à 4.2 ppm et 2.7 ppm nous permet de déterminer le rendement de la réaction. Les résultats sont récapitulés dans le tableau F.1. Comme on peut le voir, la présence d'une base (la DMAP) n'améliore pas l'efficacité de la fonctionnalisation. Par contre, le fait de chauffer ou de faire réagir plus longtemps permet d'augmenter le taux de fonctionnalisation. Une fonctionnalisation de 100 % du PEG n'est pas nécessaire à l'expérience, puisque, par définition les PEG non fonctionnels ne se grefferont pas sur l'hémoglobine. Cependant, un taux de fonctionnalisation de 100 % nous permettra par la suite d'utiliser de manière efficace du PEG deutéré dont le prix est bien plus élevé.



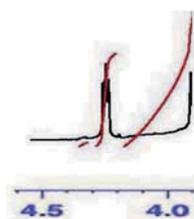
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURE F.3 – Spectre RMN ^1H du PEG partiellement fonctionnalisé (a) et (b) et totalement fonctionnalisé (c) et (d). Le triplet à 4.3 ppm, caractéristique du PEG non fonctionnalisé lorsque le rendement de la réaction est de 100% disparaît. Le rapport des triplets nous permet d'obtenir le rendement de la réaction.

F.2.3 Greffage des chaînes de PEG sur l'hémoglobine

La réaction de greffage du PEG fonctionnalisé sur la protéine est relativement facile à mettre en oeuvre. Comme indiqué dans ^[110], le PEG fonctionnalisé est mis en large excès (à 10 pour 1) avec l'hémoglobine dans un tampon de PBS à pH 7 pendant une nuit. Les cystéines de la protéine possèdent des fonctions thioles qui forment une liaison covalente avec les groupes maléïdo des PEGs fonctionnalisés. Chaque hémoglobine va être greffée de deux PEGs.

Le complexe est ensuite dialysé à l'aide de membranes dont la masse de coupure est de 60000 g.mol⁻¹ dans un bain à une proportion de 1 pour 10. Le bain est changé quatre fois. Les chaînes de PEG libres en solution vont migrer de la solution concentrée (dans le tube de dialyse) vers la solution diluée (le réservoir). En revanche, le complexe PEG-hémoglobine-PEG ne passe pas le seuil de coupure donc reste piégé à l'intérieur du tube. La solution finale est constituée de complexe hémoglobine PEG. Le greffage du PEG sur l'hémoglobine peut être partiel.

F.2.4 Caractérisation par électrophorèse

Nous avons effectué une électrophorèse SDS-PAGE afin de vérifier si du PEG a été greffé sur la protéine. Cette électrophorèse est dénaturante, elle dissocie les quatre chaînes polypeptidiques, et nous a permis de vérifier que des PEGs étaient bien greffés sur l'hémoglobine. Cette méthode n'étant pas quantitative, nous ignorons à ce stade de notre étude si le greffage a été total (2 PEGs par molécules) ou non.

F.3 Melanges agent d'encombrement

Solutions "agent d'encombrement-PEG"

La fraction massique voulue d'agent d'encombrement (Dextran ou Ficoll) a été dissoute dans une solution H₂O/D₂O avec 40% en D₂O. Les solutions ont été agitées pendant une nuit.

Le PEG, à la concentration c_p , est ajouté dans la solution. Chaque fois, la solution a été agitée 4h avant d'être mesurée. Les fractions massiques en Ficoll ont été vérifiées par analyse thermo gravimétrique.

Mélange protéine-agent d'encombrement

[110] Manjula, B., Tsai, S., Upadhyaya, R., Perumalsamy, K., Smith, P., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R., Intaglietta, M., Prabhakaran, M., Friedman, J., and Acharya, A. *Bioconj. chem.* **14**(2), 464–472 (2003).

a) Mélange Ficoll-myoglobine

Le Ficoll a été dissous dans une solution d'urée à la concentration molaire voulue. Quelques microlitres de myoglobine en solution très concentrée sont ajoutés.

b) Mélange PEG-myoglobine

Le PEG a été ajouté dans une solution d'urée. La fraction massique en PEG est un peu plus faible que la solution finale voulue. Nous avons ajouté la myoglobine diluée. La fraction massique du PEG est ajustée par compression osmotique. La solution obtenue est centrifugée.

Bibliographie

- [1] G. Mulder. *J. für prakt. Chem.*, 16 :129, 1839.
- [2] L. Pauling, R.B. Corey, and H.R. Branson. The structure of proteins : Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS*, 37 :205–211, 1951.
- [3] J.C. Kendrew and all. 3-Dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nat.*, 181(4610) :662–666, 1958.
- [4] M.F. Perutz. Structure of haemoglobin - 3-Dimensional Fourier synthesis at 5.5 a resolution obtained by X-ray analysis. *Nat.*, 185(4711) :416–422, 1960.
- [5] L. Pauling and A.E. Mirsky. On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *PNAS*, 22 :439–447, 1936.
- [6] C.B. Anfinsen and E. Haber. Studies on the Reduction and Re-formation of Protein Disulfide Bonds. *J. Biol. Chem.*, 236(5) :1361–1363, 1961.
- [7] C.B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Sci.*, 181(96) :2230–230, 1973.
- [8] C. Levinthal. Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique. *Sci.*, 65 :44–45, 1968.
- [9] K.A. Dill and H.S. Chan. The effects of internal constraints on the configurations of chain molecules. *Nat. Stru. Biol.*, 4 :10–19, 1997.
- [10] P.L. Privalov. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure a calorimetric study. *J. Mol Biol.*, 86 :665–684, 1974.
- [11] A.B. Fulton. How crowded is the cytoplasm? *Cell*, 20 :2093 – 2120, 1982.
- [12] S.B. Zimmerman and S.O. Trach. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of escherichia coli. *J. Molec. Biol.*, 222(3) :599 – 620, 1991.
- [13] D.S. Goodsell. The machinery of life. *Springer-Verlag NY inc*, 1993.

-
- [14] R.J. Ellis. Macromolecular crowding : obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.*, 26(10) :597 – 604, 2001.
- [15] R.J. Ellis. Macromolecular crowding : an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 11(1) :114 – 119, 2001.
- [16] G.J. Pielak and all. Effects of molecular crowding by saccarides on α -chymotrypsin dimerization. *Protein Sci.*, 11 :997–1003, 2002.
- [17] L. Fink and all. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *J. of molec. regognition*, 11 :456–464, 2004.
- [18] A.G. Ogston and J.E. Stanier. On the state of hyaluronic acid in synovial fluid. *Biochem. J.*, 46(3) :364–376, 1950.
- [19] T.C. Laurent. The interaction between polysaccharides and other macromolecules. *Biochem. J.*, 93 :106–112, 1964.
- [20] A.G. Ogston. The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Trans. Fraraday Soc.*, 54(11) :1754–1757, 1958.
- [21] A.P. Minton. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins : some biochemical consequences. *Molecular and Cellular Biochem.*, 55 :119–141, 1983.
- [22] S.B. Zimmerman and A.P. Minton. Macromolecular crowding : biochemical biophysical and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 22 :27–65, 1993.
- [23] A.P. Minton and R.J. Ellis. Cell biology : Join the crowd. *Nat.*, 425 :27 – 28, 2001.
- [24] M.S. Cheungand, D. Klimov, and D. Thirumalai. Molecular crowding enhances native state stability and refolding rates of globular proteins. *Proceed. of the Nat. Ac. Sci. of U.S.A.*, 102(13) :4753–4758, 2005.
- [25] D. Hall and A.P. Minton. Macromolecular crowding : qualitative and semiquantitative successes quantitative challenges. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. and Proteomics*, 1649(2) :127 – 139, 2003.
- [26] A.P. Minton. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. mol. Biol.*, 20 :4821–4826, 1981.
- [27] A.P. Minton. Effect of a concentrated 'inert' macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaotropes : A statistical-thermodynamic model. *Biophys. J.*, 78(1) :101 – 109, 2000.
- [28] A.P. Minton. Molecular crowding : Analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. In Gary K. Ackers and Michael L. Johnson, editors, *Energetics of Biological Macromolecules Part B*, volume 295 of *Methods in Enzymology*, pages 127 – 149. Academic Press, 1998.

-
- [29] D.J. Winzor and P.R. Wills. Thermodynamic nonideality and protein solvation. in protein-solvent interactions. *R. B. Gregory editor. Marcel Dekker New York*, pages 483 – 520, 1995.
- [30] Y. Zhou and A.C. Hall. Solute excluded-volume effects on the stability of globular proteins : A statistical thermodynamic theory. *J. Biolpolymers*, 38(2) :273–284, 1996.
- [31] P. Calmettes, D. Durand, M. Desmadril, P. Minard, V. Receveur, and J-C. Smith. How random is a highly denatured protein? *Biophys. Chem.*, 53(1-2) :105 – 113, 1994.
- [32] A.P. Minton. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes : Macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys. J.*, 88(2) :971 – 985, 2005.
- [33] K. Sasahara, P. McPhie, and A. P. Minton. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. *Am. Chem. Soc.*, 326 :1227–1237, 2003.
- [34] T. Yomo and all. Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Prot. Sci.*, 13 :125 – 133, 2004.
- [35] B. van den Berg, R.J. Ellis, and C.M. Dobson. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.*, 18 :6827–69233, 1999.
- [36] L. Stagg, S.Q. Zhang, M.S. Cheung, and W.S. Wittung-Stafshede. Molecular crowding enhances native structure and stability of protein flavodoxin. *Proceed. of the Nat. Ac.of Sci.*, 104(48) :18976–18981, 2007.
- [37] M. Perham, L. Stagg, and P. Wittung-Stafshede. Macromolecular crowding increases structural content of folded proteins. *FEBS Letters*, 581(26) :5065 – 5069, 2007.
- [38] B. van den Berg, R. Wain, C.M. Dobson, and all. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics : Implications for folding inside the cell. *EMBO J.*, 19 :3870–3875, 2000.
- [39] J.Z. Huawei, J.Z. Hea, and S. Li. Macromolecular crowding enhances thermal stability of rabbit muscle creatine kinase. *Tsinghua Sci. and Tech.*, 13 :454–457, 2008.
- [40] P. Mc Phie, Y.S. Ni, and A.P. Minton. Macromolecular crowding stabilizes the molten globule form of apolmyoglobin with respect to both cold and heat unfolding. *J. Mol. Biol.*, 361 :7–10, 2006.
- [41] Y. Sasaki, D. Miyoshi, and N. Sugimoto. Regulation of dna nuclease by macromolecular crowding. *nucleic acids res.*, 35 :4086–4093, 2007.
- [42] X. Ai, Z. Zhou, and Y. Bai W. Y. Choy. ¹⁵n nmr spin relaxation dispersion study of the macrolecular crowding effects on protein folding under native conditions. *J. am. chem. soc.*, 128 :3946–3917, 2006.
- [43] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Ann. der Phys.*, 17 :549–560, 1905.

- [44] J.A. Dix, E.F. Y. Hom, and A.S. Verkman. Fluorescence correlation spectroscopy simulations of photophysical phenomena and molecular interactions : A molecular dynamics/Monte Carlo approach. *J. of Phys. chem. B*, 110(4) :1896–1906, 2006.
- [45] J.A. Dix and A.S. Verkam. Crowding effets on diffusion in solutions and cell. *Annu. Rev. Biophys.*, 37 :247–263, 2008.
- [46] G. Vereb, J. Szöllosi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mátyus, T.A. Waldmann, and S. Damjanovich. Dynamic yet structured : the cell membrane three decades after singer-nicolson model. *PNAS*, 100 :8053 – 8058, 2003.
- [47] J. Han and J. Herzfeld. Macromolecular diffusion in crowded solutions. *Biophys. J.*, 65 :1155–1161, 1993.
- [48] K. Takahashi, S.N. Arjunan, and M. Tomita. Space in systems biology of signaling pathways-towards intracellular molecular crowding in silico. *FEBS lett.*, 579 :1783–1788, 2005.
- [49] D.L. Ermak and J.A. McCammon. Brownian dynamics with hydrodynamic inteactions. *J. of chem. phys.*, 69(4) :1352–1360, 1978.
- [50] S.R. McGuffee and A.H. Elcock. Atomically detailed simulations of concentrated protein solutions : The effects of salt, pH, point mutations, and protein concentration in simulations of 1000-molecule systems. *J. Of Am. Chem. Soc.*, 128(37) :12098–12110, 2006.
- [51] D.S. Goodsell. 2000.
- [52] J.B. Wittenberg and B.A. Wittenberg. Mechanism of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Ann. Rev. of Biophys. and Biophysical chem.*, 19 :217–241, 1990.
- [53] D.M. Copeland, A.S. Soares, A.H. West, and G.B. Richter-Addo. Crystal structures of the nitrite and nitric oxide complexes of horse heart myoglobin. *J.Inorg.Biochem.*, 100 :1413 – 1425, 2006.
- [54] S.Y. Park, T. Yokoyama, N. Shibayama, Y. Shiro, and J.R. Tame. 1.25 a resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms. *J.Mol.Biol.*, 360 :690 – 701, 2006.
- [55] Y. Xu, Y. Zheng, J.S. Fan, and D. Yang. Ma new strategy for structure determination of large proteins in solution without deuteration. *Nat.Methods*, 3 :931 – 937, 2006.
- [56] G.A. Ordway and D.J. Garry. Myoglobin : an essential hemoprotein in striated muscle. *J. of Exp. Biology*, 207 :3441 – 3446, 2004.
- [57] W.J. Bowen and W.E. Poel. The effet of anoxia upon myoglobin concentration. *Fede Proc.*, 7(1) :10–11, 1948.

- [58] S. Yoshikawa, M.G. Choc, M.C. Otoole, and W.S. Caughey. IR Study of CO binding to heart cytochrome-C oxidase and hemoglobin, implications of re O_2 reactions. *J. molec. biol.*, 252(15) :5498–5508, 1977.
- [59] R. Cassoly and Q.H. Gibson. Conformation, cooperativity and ligand-binding in human hemoglobin. *J. molec. biol.*, 91(3) :301–313, 1975.
- [60] R.A. Meyer, H.L. Sweeney, and M.J. Kushmerick. A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 246(5) :365–377, 1984.
- [61] C. Bohr. heoretische behandlung der quantitativen verhältnisse bei der sauerstoffaufnahme des haemoglobins. *T. Zentr. Physiol.*, 17 :682, 1903.
- [62] R. M. Winslow. Current status of oxygen carriers ('blood substitutes') : 2006. *Vox Sanguinis*, 91(2) :102–110, 2006.
- [63] A. Alayash. Oxygen therapeutics : can we tame haemoglobin? *Nat Rev Drug Discov*, 3(2) :152–159, 2004.
- [64] A.I. Alayash. Hemoglobin-based blood substitutes : oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? *Nat. Biotechnology*, 17(6) :545–549, 1999.
- [65] J.R. Wenner and V.A. Bloomfield. Crowding effects on ecorv kinetics and binding. *Biophys. J.*, 77(6) :3234 – 3241, 1999.
- [66] R.H. John. Blood substitutes. *Transfusion Medicine Reviews*, 20(3) :247 – 248, 2006.
- [67] P.C. Griffiths, A. Paul, Z. Khayat, K.W. Wan, S.M. King, I. Grillo, R. Schweins, P. Ferruti, J. Franchini, and R. Duncan. Understanding the mechanism of action of poly(amidoamine)s as endosomolytic polymers : Correlation of physicochemical and biological properties. *Biomacromolecules*, 5(4) :1422–1427, 2004.
- [68] M. Rogers, B. Ryan, R. Cashon, and A. Alayash. Effects of polymerization on the oxygen-carrying and redox properties of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology*, 1248(2) :135–142, 1995.
- [69] M.P. Doyle, I. Apostol, and B.A. Kerwin. Glutaraldehyde Modification of Recombinant Human Hemoglobin Alters Its Hemodynamic Properties. *J. Biol. Chem.*, 274(4) :2583–2591, 1999.
- [70] F.M. Veronese. Peptide and protein PEGylation : a review of problems and solutions. *Bio-materials*, 22(5) :405–417, 2001.
- [71] M.J. Roberts, M.D. Bentley, and J.M. Harris. Chemistry for peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4) :459 – 476, 2002. Peptide and Protein Pegylation.
- [72] B.N. Manjula, A.G. Tsai, M.T. Intaglietta, C. Tsai, Chien Ho, A. Malavalli, K.D. Vandegriff, R.M. Winslow, P.K Smith, K. Perumalsamy, N. Kanika, J.M. Friedman, and A. Seetharama

- Acharya. PEGylated hemoglobin : Role of surface configuration of PEG for the modulation of hemoglobin vasoactivity. *J. Biol. Chem.*, page 403468200, 2004.
- [73] D. Venturoli and B. Rippe. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity : effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *Am. J. of physiology renal physio.*, 288(4) :605–613, APR 2005.
- [74] W.H. Fissell, S. Manley, A. Dubnisheva, J. Glass, J. Magistrelli, A.N .Eldridge, A.J. Fleischman, A.L. Zydney, and S. Roy. Ficoll is not a rigid sphere. *Am. J. of physiology-renal physiology*, 293(4) :F1209–F1213, 2007.
- [75] M.P. Bohrer, G.D. Patterson, and P.J. Carroll. Hindered diffusion of dextran and ficoll in microporous membranes. *Am. Chem. soc.*, 17(6) :1170 – 1173, 1984.
- [76] M.H. Hemmeler, P.E. De Jong, and D. de Zeeuw. A comparison of analytic procedures for measurement of fractional dextran clearances. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132(5) :390 – 403, 1998.
- [77] M. Ohlson, J. Sörensson, and B. Haraldsson. A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(3) :396 – 405, 2001.
- [78] S. Rippe and B. Gunnar. Simulations of peritoneal solute transport during capd. application of two-pore formalism. *Kidney Int*, 35(5) :1234 – 1244, 1989.
- [79] J.D. Oliver, S. Anderson, J.L. Troy B.M. Brenner, and W.H. Deen. Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with Ficoll. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 3(2) :214–228, 1992.
- [80] <http://www.brocku.ca/researchers/peterrand/osmotic/data/peg20000>.
- [81] A-S. Robbes, F. Cousin, and G. Meriguet. Osmotic stress on concentrated colloidal suspensions : a path towards equilibrium? *Brazilian J. of Phys.*, 39 :156 – 162, 2009.
- [82] <http://www5.gelifesciences.com>.
- [83] M. Rubinstein and R.H. Colby. *Polymer physics*. Oxford University Press, 2003.
- [84] E. Brezin, J-C. Le Guillou, and J. Zim-Justin. *Phase transitions and critical phenomena*. 1976.
- [85] A.P. Minton. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J. of Biol. Chem.*, 276(14) :10577–10580, 2001.
- [86] B.J. Ackerson. Correlations for interacting brownian particules. *J. Chem. Phys.*, 64 :242–246, 1976.
- [87] B.J. Ackerson. Correlations for interacting brownian particules 2. *J. Chem. Phys.*, 69 :684–690, 1978.

-
- [88] J. Gapinsky, A. Wilk, A. Patkowsky, W. Haüssler, A. J. Bianchio, G. Holmquist, R. Pecoraand, and G. Nagele. Diffusion and microstructutral porperties of solutions of charges nanosized proteins : experiment versus theory. *J. chem. Phys*, 123 :054708, 2005.
- [89] J. Gapinsky, A. Patkowsky, P. Bianchio, G. Holmquist, M.P. Meier, and G. Nagele. Collective diffusion in charge-stabilized suspensions. concentration and salt effects. *J. chem. Phys*, 126 :104905, 2007.
- [90] M. Tokuyama and I. Oppenheim. Dynamic of hard sphere suspension. *Phys. Rev. E*, 50 :R16–R19, 1994.
- [91] R. Schneider, A. Mayer, W. Schmatz, B. Kaiser, and R. Schmer. Neutron small angle scattering from aqueous solution of oxy-and deoxyhaemoglobin. *The J. of mol biol.*, 247 :5436–5441, 1972.
- [92] J. Schelten, P. Schelcht, W. Schmatz, and A. Mayer. Neutron small angle scattering of hemoglobin. *The J. of biol. chem.*, 247 :5436–5441, 1972.
- [93] J.K. Percus and G.J. Yevick. Analysis of classical statistical mechanics by means of collective coordinates. *Phys. rev.*, 110(1) :1–13, 1958.
- [94] J.B. Hayter and J. Penfold. An analytic structure factor for macroion solutions. *Molecular Phys.*, 42(1) :109–118, 1981.
- [95] L. Belloni. Electrostatic interactions in colloidal solutions - comparaisn between primitive and one-component models. *J. Chem. Phys.*, 85(1) :519–526, 1986.
- [96] S. Krueger, S.H. Chen, J. Hofrichter, and R. Nossal. Small Angle Neutron Scattering studies of HbA in concentrated solutions. *Biophys. J.*, 58(3) :745–757, 1990.
- [97] S. Longeville, W. Doster, and G. Kali. Myoglobin in crowded solutions : structure and diffusion. *Chem. Phys.*, 292(2-3) :413–424, 2003.
- [98] W. Doster and S. Longeville. Microscopic diffusion and hydrodynamic interactions of hemoglobin in red blood cells. *Biophys. J.*, 93(4) :1360 – 1368, 2007.
- [99] R. Mills. Self diffusion in normal and heavy-water in range 1-45 degrees. *J. of phys. chem.*, 77(5) :685–688, 1973.
- [100] T. Dipple. Phd thesis, Max Planck Institut für Metallforschung, Institut Physik Stuttgart, 1991.
- [101] R.S. Hall and C.S.Jr. Johnson. Experimental evidence that mutual and tracer diffusion coefficients for hemoglobin are not equal. *The J. of Chem. Phys.*, 72(7) :4251–4253, 1980.
- [102] V.F. Sears. Cold neutron scattering by molecular liquids. III. Methane. *Can. J. of Phys.*, 45 :237, 1967.

- [103] J. Pérez, J-M. Zanotti, and D. Durand. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys. J.*, 77(1) :454 – 469, 1999.
- [104] D. Wang, U. Kreutzer, Y. Chung, and T. Jue. Myoglobin and hemoglobin rotational diffusion in the cell. *Biophys. J.*, 73(5) :2764 – 2770, 1997.
- [105] C. Kelemen, S. Chien, and G.M. Artmann. Temperature transition of human hemoglobin at body temperature : Effects of calcium. *Biophys. J.*, 80(6) :2622–2630, 2001.
- [106] G.M. Artmann, L. Burns, J.M. Canaves, A. Temiz-Artmann, G.W. Schmid-Schonbein, S. Chien, and C. Maggakis-Kelemen. Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature. *Europ. biophys. J.*, 33(6) :490–496, 2004.
- [107] I. Digel, C. Maggakis-Kelemen, K.F. Zerlin, P. Linder, N. Kasischke, P. Kayser, D. Porst, A. Artmann, and G.M. Artmann. Body temperature-related structural transitions of monotremal and human hemoglobin. *Biophys. J.*, 91(8) :3014–3021, 2006.
- [108] A.M. Stadler, I. Digel, G.M. Artmann, J.P. Embs, G. Zaccari, and G. Buehler. Hemoglobin Dynamics in Red Blood Cells : Correlation to Body Temperature. *Biophys. J.*, 95(11) :5449–5461, 2008.
- [109] R.M. Winslow, A. Gonzales, M.I. Gonzales, M.R. Magde, M. McCarthy, R.J. Rohlf, and K.D. Vandegriff. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J. of Applied Physiology*, 85(3) :993–1003, 1998.
- [110] B.N. Manjula, S. Tsai, R. Upadhyaya, K. Perumalsamy, P.K. Smith, A. Malavalli, K. Vandegriff, R.M. Winslow, M. Intaglietta, M. Prabhakaran, J.M. Friedman, and A.S. Acharya. Site-specific PEGylation of hemoglobin at cys-93(beta) : Correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconj. chem.*, 14(2) :464–472, 2003.
- [111] R. Migita, A. Gonzales, M.L. Gonzales, K.D. Vandegriff, and R.M. Winslow. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J. Appl. Physiology*, 82(6) :1995–2002, 1997.
- [112] M. Gattoni, A. Boffi, and E. Chiancone. Immobilized apo-myoglobin, a new stable reagent for measuring rates of heme dissociation from hemoglobin. *FEBS letters*, 424(3) :275–278, 1998.
- [113] D.I. Svergun, F. Ekstrom, K.D. Vandegriff, A. Malavalli, D.A. Baker, C. Nilsson, and R.M. Winslow. Solution structure of poly(ethylene) glycol-conjugated hemoglobin revealed by small-angle x-ray scattering : Implications for a new oxygen therapeutic. *Biophys. J.*, 94(1) :173–181, 2008.

-
- [114] J.S. Pedersen. Form factors of block copolymer micelles with spherical, ellipsoidal and cylindrical cores. *J. Appl. Cryst.*, 33 :637–640, 2000.
- [115] S.N. Timasheff. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Prot. Sc.*, 1(9) :1133–1143, 1992.
- [116] H. Garcia-Arellano, B. Valderrama, G. Saab-Rincon, and R. Vazquez-Duhalt. High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconj. Chem.*, 13 :1336–1344, 2002.
- [117] J. Chadwick. Letters to the editor : Possible existence of a neutron. *Nature*, 129 :312, 1932.
- [118] J. Teixeira. *Introduction à la diffusion de neutrons*. 2007.
- [119] L. Van Hove. Correlations in space and time and born approximation scattering in systems of interacting particles. *Phys. Rev.*, 95(1) :249–262, 1954.
- [120] LLB. www-llb.cea.fr.
- [121] J-P. Cotton and H. Benoit. Étude du contraste et de son influence sur les déterminations de l'intensité diffusée et du rayon de giration dans les systèmes de macromolécules hétérogènes. *J. Phys.*, 36 :905–910, 1975.
- [122] P. Lindner and T. Zemb. *Neutrons, X-ray and light : scattering methods applied to soft and condensed matter*. 2002.
- [123] P. Calmettes. *Diffusion des neutrons aux petits angles : choix de l'échantillon et traitement des données*. 1999.
- [124] F. Mezei. Neutron spin echo : A new concept in polarized thermal neutron techniques. *Z. Phys.*, 255 :146, 1972.
- [125] E. Antonini and M. Brunori. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. 1971.

Résumé

La cellule est un environnement complexe. Le pH, la force ionique ou l'encombrement cytoplasmique ... sont des paramètres qui influencent les réactions biochimiques. Il est généralement difficile d'étudier in-vivo l'influence d'un seul de ces paramètres. L'objet de notre étude était de comprendre celle de l'encombrement cytoplasmique sur deux aspects différents : la dynamique des protéines et leur équilibre entre état natif et état dénaturé. Le volume exclu induit par la présence de nombreuses macromolécules en solution crée des interactions non spécifiques stériques et influence la stabilité et la dynamique des protéines.

Récemment des études ont permis de mettre en évidence que l'encombrement cytoplasmique stabilise la protéine à l'état natif en déstabilisant l'ensemble des états dénaturés. Les protéines dénaturées adoptent une conformation de chaîne gaussienne. Des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles nous ont permis de montrer que le rayon de giration d'une chaîne gaussienne modèle diminue considérablement avec la fraction massique en agent d'encombrement. Dans un second temps, ce travail a mis en évidence que dans le cas de la myoglobine, l'état natif est stabilisé, notamment vis à vis de la dénaturation thermique. En présence d'encombrement, le rayon de giration de la protéine dénaturée diminue.

L'encombrement cytoplasmique modifie également la dynamique des protéines. Celle-ci ne peut plus simplement être brownienne, il existe différents régimes de diffusion collective ou individuelle (à temps court et long). Notre étude a permis de mettre en évidence un temps de relaxation pour les solutions d'hémoglobine fortement concentrées. Celui-ci ne peut être associé à un mouvement purement diffusif et peut être lié à un mouvement localisé.

Dans ce manuscrit nous avons également étudié la structure d'un substitut sanguin, l'hémoglobine greffée de deux poly(éthylène-glycol). La réactivité du complexe varie avec le poids moléculaire des polymères greffés. L'étude de sa structure nous a permis d'observer que celle-ci était sans doute fortement reliée à sa structure.

Summary

Cell is a complex environment. pH, ionic forces or macromolecular crowding are parameters that play a role in biochemical reactions. In vivo, it is quite hard to study the influence of only one of these parameters. The aim of our study is to understand the influence of macromolecular crowding on two different aspects : protein dynamic and the equilibrium between native and unfolded states. In a crowded solution, the multitudes of macromolecules create excluded volume which is responsible of non specific steric interactions and influences protein stability and dynamic.

Studies have recently revealed that macromolecular crowding stabilizes protein in the native state by destabilization of unfolded states. Unfolded proteins have a Gaussian chain conformation. Small Angle Neutrons Scattering measurements have shown that the radius of gyration of a model Gaussian chain decreases when the crowder mass fraction increases. In a second step, this work has clearly shown that, in the case of myoglobin, protein was stabilized against thermal denaturation by adding macromolecular crowders. In that case, the radius of gyration of the unfolded protein decreases.

Macromolecular crowding modified also proteins dynamic which cannot be described by simple Brownian dynamic anymore. There are different regimes of diffusion which can be collective or individual (at long or short time). Our studies have revealed that there is a relaxation time for high concentrated hemoglobin solution. This time cannot be associated with a purely diffusive movement and may be due to a localized movement.

In this manuscript we have also studied the structure of one red blood cells substitute, Poly (ethylene-glycol) grafted hemoglobin. Complex reactivity is modified by the increase of grafted polymer molecular weight. This study enables us to observe that it is probably to polymer conformation on hemoglobin.