

2m11.3035.4

Université de Montréal

**Étude du mécanisme de repliement de l'ubiquitine de levure par l'introduction
de contraintes conformationnelles dans son état dénaturé**

Par

Jean-François Turcotte

Département de biochimie

Programme de biologie moléculaire

Faculté des Études Supérieures

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire**

Octobre 2002

© Jean-François Turcotte, 2002



QH
506
1154
2003
N. 006

[Faint, illegible markings]

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures**

Ce mémoire intitulé :

**Étude du mécanisme de repliement de l'ubiquitine de levure par l'introduction
de contraintes conformationnelles dans son état dénaturé**

présenté par :

Jean-François Turcotte

a été évalué par un jury comprenant les personnes suivantes :

Dr. Sylvie Mader **présidente-rapporteuse**

Dr. Stephen Michnick **directeur de recherche**

Dr. Alain Moreau **membre du jury**

Mémoire accepté le : 20 décembre 2002

Résumé

Nous étudions les mécanismes de repliement des protéines vers leurs structures natives dans le but éventuel de développer des outils de prédiction de structures. Le modèle proposé accorde une grande importance aux structures résiduelles persistantes dans l'état dénaturé des protéines ainsi qu'à la capacité que possèdent ces structures à initier le repliement et à guider les événements subséquents qui mènent à la structure native. Un intérêt particulier est porté aux tours bêta et aux renversements de la chaîne polypeptidique à 180°. Afin d'éprouver le modèle, nous insérons un court peptide ultra-stable de 12 acides aminés qui adopte une conformation en bêta-*hairpin*, le *trpzip2* [Cochran A.G., Skelton N.J. et Starovasnik M.A. (2001), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98, 5578-5583], au sommet des tours bêta chez l'ubiquitine de levure. Ceci permet de stabiliser le renversement à 180° de la chaîne polypeptidique dans ces sous-régions et de simuler la présence de tours bêta pré-formés dans l'état dénaturé. Les protéines résultantes ont été purifiées et leur repliement analysé par des expériences cinétiques à l'aide d'un appareil de *stopped-flow* avec suivi par fluorescence des tryptophanes. Nous observons que l'insertion du *trpzip2* au sommet du tour bêta du bêta-*hairpin* N-terminal de l'ubiquitine produit une nette augmentation de la stabilité de la protéine et de sa vitesse de repliement, de même qu'une diminution de sa vitesse de dépliement. Nous en concluons que la formation de ce tour est une étape essentielle au repliement rapide et efficace de l'ubiquitine vers sa structure native.

Mots-clé : structure native, fluorescence, tryptophane, tour bêta, bêta-*hairpin*, *stopped-flow*, dichroïsme circulaire, *his-tag*, *tryptophan zipper*

Abstract

We study the mechanisms by which proteins fold to achieve their native structures, which eventually should lead to the design of a structural prediction tool. The model we propose emphasizes the importance of persisting residual structures found in the denatured state of proteins and the capacity of these structures to initiate the folding process and to guide subsequent events toward reaching the native state. Particular attention is given to beta-turns and 180° polypeptide chain reversal. To test this model, we insert a short, hyper-stable, 12-residues peptide which adopts a beta-hairpin structure, the trpzip2 [Cochran A.G., Skelton N.J. et Starovasnik M.A. (2001), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98, 5578-5583], at the top of the beta-turns found in yeast ubiquitin. This allows for stabilisation of the 180° reversal conformation of the polypeptide chain and for the simulation of a preformed turn in the denatured state. The resulting proteins have been purified and their folding characteristics analysed by kinetic stopped-flow experiments using tryptophan fluorescence as probes. The insertion of trpzip2 at the top of the N-terminal beta-hairpin of ubiquitin results in a clear increase in protein stability and folding rate, as well as a decrease of its unfolding speed. We conclude that the formation of this turn is an essential step for ubiquitin to fold quickly and efficiently toward its native structure.

Key-words : native structure, fluorescence, tryptophan, beta-turn, beta-hairpin, stopped-flow, circular dichroïsm, his-tag, tryptophan zipper

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract (résumé anglais)	IV
Table des matières	V
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations	XI
Remerciements.....	XII
Avant-propos.....	XIV
Chapitre 1 : Contexte et historique.....	1
1.1 Origine de la biologie structurale.....	2
1.2 Pourquoi étudier le repliement ?	3
1.3 L'hypothèse thermodynamique et les mécanismes de repliement....	5
1.4 Les intermédiaires de repliement	7
1.5 L'état de transition	8
1.6 La topologie et l'importance des contacts locaux.....	9
1.7 L'état dénaturé : la pierre de Rosette tant attendue ?	10
Chapitre 2 : Buts et méthodologie de la présente étude.....	13
2.1 Le modèle proposé	14
2.2 Les tours bêta : sites d'initiation du repliement ?	15
2.3 Stabiliser la formation des tours bêta dans l'état dénaturé	15

2.4	L'ubiquitine : une protéine idéale	16
Chapitre 3 : Résultats.....		18
3.1	Insertion des peptides dans les tours bêta de l'ubiquitine de levure .	19
3.2	Construction, expression et purification des mutants.....	24
3.3	Caractérisation du système de référence : l'ubiquitine de levure F45W avec <i>his-tag</i>	27
3.4	Caractérisation du peptide <i>trpzip2</i>	32
3.5	Effet de l'insertion du peptide <i>trpzip2</i> à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine : caractérisation des mutants yUbiF45W-D1 et yUbi-D1	37
3.6	Effet de l'insertion du peptide <i>trpzip2</i> au sommet du premier <i>beta-hairpin</i> de l'ubiquitine : caractérisation des mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1.....	45
Chapitre 4 : Discussion.....		53
4.1	Succès de la stratégie de mutagenèse.....	54
4.2	Les boucles riches en glycines : un contrôle négatif inapproprié	54
4.3	Effet des résidus histidines	55
4.4	Comportement du peptide <i>trpzip2</i>	58
4.5	Légitimité d'utiliser un modèle en deux états.....	60
4.6	Accélération et stabilisation de l'ubiquitine découlant de l'insertion du peptide <i>trpzip2</i> en position A : comparaison avec les domaines SH3-Bergerac.....	63
4.7	Importance des interactions aromatiques	66
4.8	Conclusion	68
Chapitre 5 : Matériels et méthodes.....		69
5.1	Provenance des gènes.....	70
5.2	Insertion des boucles dans la séquence de yUbi.....	70

5.3	Expression et purification des mutants <i>yUbi-trpzip2</i> en conditions natives et dénaturantes.....	74
5.4	Provenance du peptide <i>trpzip2</i>	77
5.5	Préparation des solutions de GdnHCl	77
5.6	Dichroïsme circulaire à l'équilibre.....	77
5.7	Fluorescence à l'équilibre.....	78
5.8	Fluorescence cinétique	78
5.8.1	Expériences de repliement	79
5.8.2	Expériences de dénaturation.....	79
5.8.3	Temps mort de l'appareil	80
5.9	Analyse des traces cinétiques	80
5.9.1	Modélisation des traces cinétiques	80
5.9.2	Courbes de Chevron et analyse des paramètres cinétiques selon un modèle en deux états.....	81
5.9.3	Courbes d'équilibre et analyse des paramètres thermodynamiques.....	82
Chapitre 6 : Références.....		84
Appendice I :	Carte de restriction du plasmide pQE-32 (modifié) utilisé pour effectuer les constructions d'ADN nécessaires à la conduite du projet.....	i
Appendice II :	Séquence codante du vecteur pQE-32 modifié contenant le gène codant pour l'ubiquitine de levure type sauvage et pour l'ubiquitine de levure F45W	ii
Appendice III :	Séquence des oligonucléotides utilisés pour les constructions d'ADN.....	iii
Appendice IV :	Données brutes de fluorescence à l'équilibre	xi

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Alignement des séquences des mutants de l'ubiquitine de levure qui ont été conçus pour la présente étude 23
- Tableau 2** : Sommaire récapitulatif des étapes de construction, d'expression, de purification et de caractérisation ayant été complétées pour chaque mutant d'ubiquitine qui avait été planifié 26
- Tableau 3** : Résumé des propriétés thermodynamiques et cinétiques de yUbiF45W ainsi que de yUbiF45W-his⁻ à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0..... 31
- Tableau 4** : Résumé des propriétés biophysiques de yUbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 41
- Tableau 5** : Résumé des propriétés thermodynamiques et cinétiques de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0..... 50

Liste des figures

- Figure 1** : Visualisation des quatre sites d'insertion des peptides *trpzip2* dans la structure de l'ubiquitine 20
- Figure 2** : Courbe d'équilibre de γ UbiF45W à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces cinétiques de dénaturation 29
- Figure 3** : Courbe de Chevron de γ UbiF45W à 298 K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 30
- Figure 4** : Données brutes de fluorescence du peptide *trpzip2* en fonction de la concentration de GdnHCl à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 33
- Figure 5** : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain du peptide *trpzip2* (10 μ M) à différentes concentrations de GdnHCl, dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 à 294 K 35
- Figure 6** : Ellipticité molaire et longueur d'onde correspondant au maximum d'activité optique du peptide *trpzip2* (10 μ M) en fonction de la concentration de GdnHCl, dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 à 294 K 36
- Figure 7** : Courbe d'équilibre de γ UbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces de relaxation cinétique de dénaturation 39

- Figure 8** : Courbe de Chevron de yUbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 40
- Figure 9** : Intensités de fluorescence extrapolées au temps infini des traces cinétiques de dénaturation de yUbi-D1 en fonction de la concentration de GdnHCl, à 298 K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 43
- Figure 10** : Courbe d'équilibre de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces de relaxation cinétique de dénaturation..... 48
- Figure 11** : Courbe de Chevron de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 49
- Figure 12** : Stratégie de mutagenèse par laquelle les séquences correspondant aux peptides ont été insérés dans le gène de l'ubiquitine de levure 72
- Figure 13** : Lysats cellulaires de bactéries XL-1 induites à l'IPTG 0,5 mM chargés sur gel tricine-SDS-PAGE 18% révélé au Bleu de Coomassie..... 73
- Figure 14** : Gel tricine-SDS-PAGE 18% révélé au Bleu de Coomassie qui illustre la progression des étapes de purification du mutant yUbi-A1 par chromatographie d'affinité avec résine Ni-NTA-agarose..... 76

Liste des abréviations

ADN.....	Acide désoxyribonucléique
DMSO.....	Diméthylsulfoxyde
E.Coli.....	Escherichia Coli
GdnHCl.....	chlorure de guanidinium (<i>guanidine hydrochloride</i>)
<i>His-tag</i>	Queue de six résidus histidines
IPTG	Isopropyl-bêta-D-thiogalactopyranoside
mUbi.....	Ubiquitine de mammifère
mUbiF45W.....	Ubiquitine de mammifère comportant la mutation F45→W
Ni-NTA-agarose.....	Nickel-acide nitriloacétique-agarose
PCR.....	Réaction de polymérase en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
R.M.N.	résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE.....	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de dodécylsulfate de sodium
<i>trpzip1</i>	<i>Tryptophan zipper 1</i>
<i>trpzip2</i>	<i>Tryptophan zipper 2</i>
UV	Ultra-violet
yUbi	Ubiquitine de levure
yUbiF45W.....	Ubiquitine de levure comportant la mutation F45→W

Remerciements

Je tiens personnellement à remercier les personnes suivantes, sans lesquelles rien de tout ce qui est présenté ici n'aurait été pu être réalisé :

Alexis (*Bill Binding*) Vallée-Bélisle, mon mentor et maître de stage, qui m'a initié au domaine du repliement de protéine et m'a appris à en apprécier les subtilités, avec lequel j'ai appris dans la joie et la misère les techniques et la maîtrise des appareils, qui était toujours prêt à m'aider et à me critiquer de façon constructive, avec qui au cours des années, j'ai pu tenir de merveilleuses conversations à haute teneur intellectuelle, ainsi que d'autres plus légères mais combien rafraîchissantes ;

François-Xavier Campbell-Valois, pour tous les conseils, avis techniques et éléments de connaissance étendus dont il n'a jamais cessé de me dispenser pour faire progresser mes travaux (même si ça n'a pas toujours marché !), pour avoir été le seul à aimer la musique que je faisais jouer, ainsi que pour les séances d'obstination véhémentes à haute saveur politique qui ont raffermi mon caractère ;

tous les autres membres présents ou passés du laboratoire : Martin, André, Galia, Dimitri, Geoffroy, Hugo, Stéphane, Kirill, Philippe, Annie, Nathalie, Nathalie (2), Luciano, Jérôme et Ingrid, qui m'ont offert leur aide lorsque j'en ai eu besoin et qui ont supporté mes sautes d'humeur, ma musique du diable qui ne vous plaisait pas toujours, mes tirades politiques, mon sens de l'humour parfois douteux ou encore tout simplement ma grande gueule ;

les étudiants du laboratoire de Jeff Keillor, au département de chimie, ainsi que Jeff Keillor lui-même, pour nous avoir toléré moi et Alexis alors que nous passions d'interminables heures dans leur laboratoire à travailler sur le *stopped-flow* et à vider des bonbonnes d'azote extra-sec ;

Philippe Savard et les autres de la *gang* du club de sciences du cégep de Bois-de-Boulogne, qui m'ont appris à percevoir et apprécier le visage humain de la science, son côté amusant ainsi que l'importance de la communication entre les scientifiques et le public;

mes parents, qui m'ont toujours aidé, supporté, encouragé à poursuivre mes études et mon apprentissage ;

mon directeur, Stephen Michnick, qui m'a accueilli dans son laboratoire pendant ces années, qui a réuni les fonds qui ont permis de réaliser ces travaux et à qui je dois l'idée originale de mon projet.

Finally, I would like to thank from the bottom of my heart my very dear friend Joëlle, who has been for me a attentive ear, who has listened to my complaints without bronchitis, who has spared me good advice when I needed it, and who has never stopped praising me and complimenting me, even when I did not deserve it. Joëlle, without you, I would never have been able to get rid of my old demons nor found the courage to pursue and finish what I had undertaken. I cannot find the words to thank you as I would like.

Jean-François Turcotte

Avant-propos

Certains collègues m'ont déjà confié qu'ils jugeaient les sciences fondamentales inutiles et d'un ennui mortel. Il m'a été dit qu'il ne s'agissait en fait que d'un phénomène parfois connu sous l'expression à consonance péjorative « pelletage de nuage ». En se remémorant ces paroles, l'idéaliste curieux et inquisiteur que je suis est peiné, peiné par cette fermeture d'esprit et cette vision à si étroite et à court terme qu'ont ces gens de la science. J'ai certes choisi une science qui se veut essentiellement appliquée, la biochimie et/ou la biologie moléculaire. Dans ce domaine, il est généralement commun d'étudier un phénomène en particulier, étroitement ciblé et bien défini, souvent dans le but éventuel de développer une thérapie, une technique ou une application qu'il soit un jour possible de breveter et de vendre. Mais, voguant à contre-courant, j'ai été appelé à étudier un aspect qui se veut davantage fondamental, un aspect qui ne débouchera sur aucun médicament, aucune thérapie, aucun brevet ni profit.

À partir du moment où le scientifique perd son émerveillement et sa curiosité devant le monde qui l'entoure et qu'il étudie, il perd également sa raison d'être. Ces études fondamentales, que certains jugent inutiles par leur nature, produisent du savoir et de la compréhension. Elles permettent à la science de progresser, d'accumuler des connaissances qui s'ajoutent au patrimoine commun de l'humanité, disponible pour tous et chacun afin d'étayer leurs réflexions, argumentations et décisions. Elles approfondissent notre perception et compréhension du monde qui nous entoure. Elles dévoilent toujours davantage à notre regard des parcelles de la Réalité, tout en nous empêchant de la saisir complètement et en la maintenant inaccessible, nous laissant douter perpétuellement. L'arrêt de la recherche fondamentale signifierait la fin de l'évolution de notre pensée, la fin de notre adaptation au changement – bref, la fin du progrès. Et pour ces raisons, gare à ceux qui oseront douter de sa valeur et de sa juste contribution aux bien-être respectifs de la science et de la société en général.

L'étude des mécanismes de repliement de protéine représente un défi intellectuel formidable, un casse-tête sans fin pour l'esprit des scientifiques, et ce depuis que le phénomène a été décrit aux tout premiers balbutiements de la biologie moléculaire et structurale. La compréhension de ces mécanisme nous permettrait un tel pouvoir prédictif de la structure et de la fonction des protéines qu'elle provoquerait sans doute une explosion du savoir, un changement dans notre conception du fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Cela mènerait probablement à un changement de paradigme. Cette perspective, et le fait de contribuer à résoudre l'énigme, rendent ces études de repliement fascinantes. Tantôt terrifiantes par leur besoin d'avoir à traiter et à intégrer une montagne de détails et de phénomènes, par la désespérante irrégularité ou imprévisibilité des résultats qu'elles engendrent, ou encore par leur abstraction intrinsèque, les études de repliement sont à la fois tellement fascinantes par l'approche concertée et intégratrice d'éléments de plusieurs disciplines comme la chimie, la physique, et l'informatique qu'elles nécessitent, ainsi que par l'espoir qu'elles suscitent et les réflexions à haute teneur philosophique qu'elles entraînent.

Je suis heureux de pouvoir affirmer que cette étude, complétée dans le cadre de ma maîtrise en biologie moléculaire, a produit du savoir et des connaissances et qu'elle a contribué, si peu soit-il, à ce patrimoine commun de l'humanité. Elle introduit également foule de doutes et d'incertitudes. Elle suscite peut-être même davantage de questions que de réponses. Mais n'est-ce pas formidable ? N'est-ce pas un signe de succès ? Si vous êtes perplexes suite à la lecture de cet ouvrage, sachez qu'après son écriture, je le suis probablement encore davantage. Auparavant, j'aurais perçu cette confusion, ces questions, ces incertitudes comme autant d'échecs à atteindre le but. À présent, je les vois comme une multitude de buts supplémentaires à atteindre. Et cela, c'est merveilleux à imaginer.

Il a également été dit, par un étudiant en philosophie : « Pelleter des nuages, c'est parfois ce qui nous permet d'apercevoir le soleil. » Vous tenez mon soleil entre vos mains.

1 – Contexte et historique

1.1 Origine de la biologie structurale

La biologie structurale est une discipline relativement jeune qui a émergé d'un mariage entre de multiples domaines, notamment la biologie, la chimie bio-organique et la physique. Elle a principalement pour but d'étudier la structure des macromolécules qui composent les systèmes biologiques afin de mieux comprendre leur fonctionnement. L'avènement des techniques de cristallographie et de diffraction de rayons X dans les années 1930 a mené aux travaux de pionniers tels ceux de Max Perutz sur la structure de l'hémoglobine [1-3], de Linus Pauling sur les structures en hélice [4] ainsi que ceux de Watson et Crick sur la structure de l'ADN [5].

Contrairement à la structure de l'ADN, il a été constaté avec déception que la structure des protéines était presque totalement dépourvue de cette régularité et simplicité qui caractérise la double hélice. Ainsi, il existe une considérable diversité de structures distinctes qui soient connues, et ce nombre augmente de jour en jour [6]. La connaissance de la structure atomique détaillée des protéines représente une manne d'informations pour les biologistes, car ceci permet de mieux comprendre les fonctions et les mécanismes d'action de chaque protéine. En fait, la structure tridimensionnelle des protéines est ce qui permet de donner un sens aux informations génétiques. Par celle-ci, il est possible de comprendre beaucoup plus efficacement des phénomènes tel le mécanisme de catalyse enzymatique, la liaison de ligands aux récepteurs, les changements de conformation, ainsi que l'arrimage (*docking*¹) des protéines de signalisation. Il devient alors possible de mieux comprendre les phénotypes et les pathologies qui affectent les systèmes biologiques, non plus simplement aux niveaux tissulaires et cellulaires, mais également au niveau moléculaire, et en retour de pouvoir concevoir des thérapies, des drogues, des médicaments beaucoup plus efficaces et au mécanisme d'action beaucoup plus ciblés [7].

¹ Plusieurs termes scientifiques et techniques sont une traduction littérale du terme original anglais ; celui-ci sera initialement indiqué dans le texte en italique entre parenthèses

1.2 Pourquoi étudier le repliement ?

Lorsque synthétisée sur le ribosome, la chaîne polypeptidique ne comporte initialement pas de structure tridimensionnelle compacte. Par contre, cette chaîne polypeptidique passera rapidement d'un état dit dénaturé, c'est-à-dire chaotique, instable, à haute entropie, hétérogène et dépourvu de structures clairement définies, à un état dit natif, ordonné, stable, à faible entropie, compact et structuré, par lequel elles sont capables d'exercer une ou plusieurs fonctions biologiques précises. Il s'agit d'un remarquable exemple d'auto-organisation, de création spontanée d'ordre à partir du chaos, un phénomène caractéristique des systèmes biologiques.

Aujourd'hui, suite à l'achèvement de plusieurs projets de méga-séquençage de génomes complets, la biologie se trouve confrontée à une montagne d'informations génétiques qui codent pour des protéines dont les structures et les fonctions sont inconnues, ce qui empêche les biologistes d'obtenir une vision globale du fonctionnement d'une cellule vivante, et encore moins celui d'un organisme entier. Outre leur complexité et leur caractère onéreux, les projets de biologie structurale à grande échelle seront inévitablement limités par plusieurs difficultés techniques, par exemple l'étude des protéines trans-membranaires, de protéines marginalement solubles en absence de partenaire de liaison ou de substrats, ou encore de protéines retrouvées dans de très grosses et complexes structures. De plus, de tels projets, s'ils s'annoncent capables de fournir une grande quantité d'informations, devront par leur nature superficielle omettre une grande quantité de détails structuraux qui s'avèreraient très utiles pour les biologistes, notamment l'effet de la liaison de ligands ou de substrats, ou encore l'effet des conditions de salinité, de pH ou de température sur la structure fine des protéines. Le perfectionnement graduel des techniques d'analyse a permis de déterminer expérimentalement un nombre important de ces structures, à des résolutions grandissantes. Par contre, malgré ces progrès, la détermination de structure ne demeure essentiellement qu'empirique, fonctionnant selon un principe de cas par cas. La biologie structurale s'est graduellement tournée vers les simulations informatiques afin de comprendre et

éventuellement de prédire la structure des produits des génomes, afin de compléter les méthodes à grande échelle d'analyse de structures [8]. Malgré tous les progrès ayant pu être réalisés au cours des dernières années, il est toujours difficile de prédire efficacement, même grossièrement, la structure tertiaire d'une protéine à partir de sa simple séquence en acides aminés, bien qu'il soit reconnu que la séquence à elle-seule soit suffisante pour dicter le mécanisme de repliement qui mènera à la structure native [9].

Plusieurs outils de prédiction de structure s'appuient sur des méthodes de prédiction *de novo*, ou *ab initio*, qui modélisent les conformations de chaque résidu de la protéine et calculent l'énergie de la structure qui en résulte par des fonctions de potentiel ; la forme native de la protéine correspond à la conformation possédant une énergie minimale [10-11]. L'utilisation de tels outils a déjà mené à certains succès pour prédire grossièrement la structure de plusieurs protéines [12-15]. Il est toutefois devenu évident que la mise au point d'algorithmes prédictifs de structure ne pouvait passer par une recherche aléatoire de toutes les conformations théoriquement accessibles. La modélisation intégrale aléatoire de tous les atomes d'une protéine mènerait en effet à un nombre astronomiquement élevé de conformations à traiter, et serait impensable pour la puissance de calcul disponible. Il convient alors d'accélérer la recherche pour que le résultat parvienne dans des délais raisonnables en simplifiant le modèle. Par contre, une simplification du modèle n'amènera pas forcément à une représentation exacte de la réalité ; en fait, lorsque les modèles simples sont incorrectement formulés, il est certain qu'ils déboucheront sur des résultats erronés [16].

Alternativement, s'il était possible de reproduire fidèlement, dans les expériences de modélisation, les phénomènes physiques qui guident d'eux-mêmes le repliement d'une protéine, aucune simplification du modèle ne serait alors nécessaire pour accélérer la recherche. Aucun biais artificiel dans la recherche ne serait requis pour orienter la recherche. La protéine, obéissant simplement aux lois de la physique, trouverait d'elle-même sa conformation native sous l'effet des paramètres et

contraintes qui guident sa modélisation. Par contre, une telle approche requiert une connaissance étendue du mécanisme de repliement lui-même et des phénomènes qui en sont à la source. Il convient alors de se poser la question : quels sont ces phénomènes physiques qui guident le repliement et qui pourraient servir de base pour les outils de modélisation et de prédiction de structure ?

Étudier le repliement des protéines n'est donc pas simplement qu'un défi intellectuel très intéressant à relever ; il s'agit également de produire des connaissances qui, éventuellement, s'avéreront cruciales pour l'analyse structurale et fonctionnelle des produits des génomes.

1.3 L'hypothèse thermodynamique et les mécanismes de repliement

Les expériences de Christian Anfinsen [9] ont démontré que le repliement d'une protéine n'est guidé que par les forces thermodynamiques (enthalpie et entropie), et se trouve donc à être un processus réversible. La forme native et la forme dénaturée de la protéine existent en équilibre, la forme native étant généralement fortement favorisée par les conditions régnant dans les systèmes biologiques. La structure native est donc la conformation qu'adopte spontanément la chaîne polypeptidique pour minimiser son énergie. Cette volonté thermodynamique à se replier est un phénomène principalement dicté par la tendance des acides aminés hydrophobes de la chaîne polypeptidique à s'enfouir à l'intérieur de la structure afin de se masquer du solvant [17]. Par contre, replier la chaîne implique une grande perte d'entropie conformationnelle chez la chaîne polypeptidique, laquelle est compensée par l'énergie gagnée par les contacts hydrophobes et par l'exclusion de l'eau du centre de la protéine.

Ce repliement implique également que plusieurs liens peptidiques fortement polarisés seront enfouis à l'intérieur de la structure plutôt que de former des ponts hydrogènes avec le solvant. Il en résulte donc une nécessité pour la chaîne

polypeptidique de former des ponts hydrogènes internes entre groupements carbonyles (C=O) et amides (N-H) afin d'éviter de hautes concentrations de charges partielles à l'intérieur de la protéine repliée. De plus, pour réduire au maximum la surface hydrophobe exposée au solvant, la chaîne repliée doit s'empaqueter (*packing*) de façon serrée et complémentaire, bien que pas nécessairement de façon spécifique [18]. En conséquence de ces nécessités, de même qu'en raison de contraintes stériques dictées par les chaînes latérales de chaque type de résidu, les acides aminés qui composent les chaînes polypeptidiques adoptent un nombre relativement restreint de conformations dans les structures natives des protéines [19-20]. C'est pour cette raison que les chaînes polypeptidiques adoptent majoritairement dans leur structure native des conformations en hélice α ou en amas de brins β qui forment des feuillets ; ces conformations permettent de maximiser les contacts hydrophobes, de minimiser les surfaces exposées au solvant et de former facilement des ponts hydrogènes inter-résiduels.

Bien qu'il soit établi que le repliement des protéines soit guidé par les forces thermodynamiques, celles-ci ne permettent, au premier abord, que de comprendre pourquoi une protéine adopte sa structure native, et non pas comment elle y parvient. Les travaux de Cyrus Levinthal ont mené au célèbre paradoxe qui porte son nom : les protéines ne peuvent atteindre l'état natif par une simple recherche aléatoire dans l'espace conformationnel de la conformation possédant la plus basse énergie. Elle y passerait un temps supérieur à l'âge estimé de l'Univers à essayer sans succès de se replier, en raison du nombre astronomiquement élevé de conformations [21]. Pour cette raison, il doit exister un chemin bien défini, un mécanisme, une voie de repliement (*foldings pathway*) que la protéine emprunte de son état dénaturé vers son état natif. Selon la vision classique du modèle, chaque étape du repliement éliminerait la possibilité d'accéder à certaines conformations, restreignant ainsi l'espace conformationnel accessible jusqu'à ce qu'ultimement une seule conformation ne demeure possible : l'état natif final.

1.4 Les intermédiaires de repliement

Les chimistes et biologistes structuraux se sont alors demandés comment la nature s'y prenait pour restreindre sa recherche, sur quels critères les ensembles de conformations étaient progressivement éliminés de la recherche et l'état natif finalement atteint. Les études initiales des mécanismes de repliement se sont donc d'abord concentrées sur les intermédiaires, c'est-à-dire des espèces incomplètement repliées mais néanmoins considérablement plus ordonnées que l'état dénaturé et pourvues d'éléments de structure définis. De telles espèces ne sont généralement pas observées à l'équilibre, car elles sont presque toujours plus instables à la fois que la forme native et que la forme dénaturée. Par contre, des études cinétiques ont révélé la présence d'intermédiaires qui s'accumulent de façon transitoire pendant le repliement de plusieurs protéines. Se pose alors la question : les contacts formés par les résidus dans ces intermédiaires de repliement sont-ils natifs, ce qui correspondrait à un intermédiaire de type natif, donc faisant partie de la voie de repliement (*on-pathway*), ou encore sont-ils non-natifs, auquel cas ils devraient être brisés pour que la protéine parvienne à se replier, ce qui en ferait des trappes cinétiques (*off-pathway*) ? En fait, la présence d'intermédiaires de type natif [22] ainsi que d'intermédiaires de type non-natif [23] ont toutes deux été démontrées.

L'importance d'étudier la structure des intermédiaires a été fortement remise en question par la découverte en 1991 que certaines protéines se repliaient selon un mécanisme en deux états, c'est-à-dire sans présence détectable d'intermédiaires thermodynamiques ou cinétiques [24]. Il est néanmoins généralement reconnu que des intermédiaires peuvent avoir un rôle à jouer au cours du repliement de plusieurs protéines [25], mais leur caractérisation a quelque peu perdu de son importance relative au cours des années. L'apparition ou la disparition de certains intermédiaires peut dépendre des conditions expérimentales utilisées (salinité, pH, température) ou encore de certaines mutations dans la séquence, ce qui a remis en question l'importance de leur contribution aux mécanismes du repliement et la pertinence de les étudier.

1.5 L'état de transition

Suite à la découverte des protéines qui se replient selon un mécanisme en deux états, les études de repliement se sont concentrées vers la caractérisation de la structure de l'état de transition entre la forme dénaturée et la forme native. L'état de transition est une espèce conformationnelle instable possédant l'énergie libre la plus élevée de toutes les espèces retrouvées dans la voie de repliement. Il s'agit donc d'une barrière d'activation cinétique que doit franchir la protéine qui se replie. L'état de transition ne peut donc être observé directement ; la méthode d'ingénierie de protéine (*protein engineering*) est généralement utilisée pour déterminer approximativement la contribution de chaque résidu à sa structure [26-28]. Cette méthode nécessite la mutation successive des résidus de la protéine, pour mesurer la déstabilisation que cette mutation inflige à la structure native finale, ainsi qu'à l'état de transition. Le ratio entre l'énergie de déstabilisation de l'état de transition et celle de déstabilisation de la structure native représente la valeur ϕ (*phi-value*). Si cette valeur s'approche de 1, alors l'état de transition est énergétiquement aussi affecté par la mutation que l'état natif ; ceci implique que ce résidu en question contribue autant à la structure de l'état de transition qu'à celle de l'état natif ; il forme des contacts avec d'autres résidus, et sa mutation perturbe la structure issue de ces contacts. Si la valeur ϕ s'approche de 0, alors l'état de transition n'est que peu affecté par la mutation comparativement à l'état natif ; ce résidu ne contribue donc que peu ou pas du tout à la structure de l'état de transition comparativement à celle de l'état natif. En analysant quels résidus démontrent une grande contribution à l'état de transition, on arrive à dégager une image grossière de celui-ci. Les états de transition ressemblent souvent à un état natif tordu, peu rigide, faiblement empaqueté.

Il a été proposé que les résidus possédant une valeur ϕ élevée formaient un noyau de repliement (*folding nucleus*), c'est-à-dire un ensemble de résidus qui forment des contacts tôt dans le processus de repliement, avant l'état de transition, se servant des contacts et éléments de structures déjà formés comme d'un échafaudage pour en former des nouveaux, selon un processus hautement coopératif, mais non

hiérarchique. Après l'atteinte de l'état de transition, le reste de la protéine se replie alors rapidement autour de ce noyau et se condense vers la structure native. L'apparition des éléments de structure secondaire et tertiaire est proposée comme étant simultanée. Ce modèle, baptisé « nucléation-condensation », requiert la formation de contacts longue-distance, c'est-à-dire entre résidus éloignés dans la séquence, afin de stabiliser le noyau, ainsi que sur l'observation d'une seule étape coopérative au cours du repliement. Il s'agit donc d'un modèle qui propose que le repliement d'une protéine n'est pas un processus hiérarchique avec formation successive d'espèces à haute énergie jusqu'à l'atteinte d'un état de transition, mais plutôt l'atteinte, en une seule étape, d'une seule espèce à haute énergie, l'état de transition, suivie d'une condensation vers l'état natif [16, 29-31].

Se pose toutefois un problème avec le modèle de nucléation-condensation tel que proposé : le coût entropique pour former des contacts à longue distance est très élevé, et il est donc contre-intuitif que ceux-ci soient formés avant les contacts locaux. Il est rapidement apparu évident que les contacts locaux entre résidus de la chaîne polypeptidique étaient cruciaux pour le mécanisme de repliement.

1.6 La topologie et l'importance des contacts locaux.

Les recherches de plusieurs groupes, notamment celui de David Baker, ont récemment démontré une corrélation inverse entre l'ordre de contact de la protéine et sa vitesse de repliement. L'ordre de contact est un paramètre utilisé afin de mesurer la distance moyenne entre résidus qui se font contact dans la structure native de la protéine. C'est donc dire que plus une protéine possède une topologie native simple basée sur des contacts locaux faiblement séparés dans la séquence, plus elle se replie rapidement. Inversement, plus une protéine possède une topologie complexe avec des contacts longue-distance, plus elle se replie lentement [32-37]. Ainsi, il a été établi que c'est la topologie native à atteindre qui détermine le mécanisme qu'adopte la protéine pour se replier. L'importance des contacts locaux pour favoriser le

processus de repliement avait déjà été envisagé auparavant. Dans les années 70, Karplus et Weaver ont élaboré un modèle de repliement des protéines, baptisé « diffusion-collision » [38]. Dans ce modèle, très hiérarchique, des structures secondaires locales se forment d'abord (diffusion) et se rencontrent ensuite (collision) pour former la structure native.

Il est clair que cette vision, et celle du modèle « nucléation-consensation », sont en apparence contradictoires. Le repliement est-il un processus hiérarchique guidé par des interactions locales entre résidus, ou un processus non-hiérarchique de type « tout-ou-rien » basé à la fois sur des contacts locaux et non-locaux ? Des tentatives pour concilier les deux modèles ont été entreprises [39], mais ces tentatives n'introduisent-elle pas davantage de confusion que de clarté ?

1.7 L'état dénaturé : la pierre de Rosette tant attendue ?

S'il est une absence notoire dans les éléments étudiés dans les modèles énoncés ci-haut, c'est bien l'état dénaturé lui-même. L'état natif, les intermédiaires, l'état de transition sont des concepts relativement bien étudiés et documentés. Par contre, étudier la structure de l'état dénaturé par les méthodes conventionnelles d'analyse de structure implique certaines difficultés. Ils sont impossibles à cristalliser, et les analyses par résonance magnétique nucléaire produisent plus souvent des pics très faibles et peu nombreux qui témoigneraient d'une chaîne polypeptidique en conformations aléatoires (*random coil*). Il en est résulté qu'il a longtemps été assumé que l'état dénaturé était dépourvu de toute structure et que la chaîne polypeptidique fluctuait dans le solvant de façon aléatoire sans pratiquement aucune restriction conformationnelle.

Par contre, les indices qu'il ne saurait en être ainsi s'accumulent progressivement. Tout d'abord, il a été proposé que des restrictions conformationnelles devaient forcément exister dans l'état dénaturé en raison de collisions possibles entre chaînes

latérales des acides aminés [19-20, 40]. Il en résulte donc que, dans l'état dénaturé, la chaîne polypeptidique comporte déjà, selon sa séquence, des biais pour adopter certaines conformations favorables et des biais défavorables, résultant de contraintes stériques, pour les conformations interdites. Ces observations renforcent encore l'importance de l'information locale dans la séquence, et suggèrent un mécanisme de repliement hiérarchique initié par des événements locaux [41-42].

En second lieu, des études effectuées sur le domaine SH3 N-terminal de la protéine de drosophile drk (drkN-SH3), lequel est instable, ont démontré l'existence d'un état dénaturé compact en équilibre avec l'état natif, et ce en absence de dénaturant [43-45].



Cet état dénaturé (D_{eau} , présent en conditions natives) possède considérablement davantage de structure résiduelle que l'état dénaturé par de hautes concentrations de GdnHCl (D_{Gdn}), ce qui suggère que l'absence de structure détectée par R.M.N. dans les états dénaturés de plusieurs protéines est en fait un artefact qui n'est jamais retrouvé sous des conditions physiologiques, résultant des conditions expérimentales extrêmes nécessaires pour changer l'équilibre qui favorise normalement la forme native (N). Par contre, la forme D_{eau} n'est pratiquement jamais retrouvée à l'équilibre, car elle se replie spontanément et généralement rapidement vers la forme native N. Toutefois, puisque la forme native de drkN-SH3 n'est que marginalement stable par rapport à sa forme D_{eau} , il est possible d'étudier la structure de celle-ci à l'équilibre. Ceci suggère d'ailleurs que certains intermédiaires rapides hydrophobes décrits au cours du repliement de plusieurs protéines ne soient en fait qu'une transition entre la forme D_{Gdn} et la forme D_{eau} , la chaîne polypeptidique réagissant ainsi au brusque changement des conditions du solvant [46-48].

Ainsi, il apparaît qu'étudier l'état dénaturé des protéines puisse apporter beaucoup d'informations sur les événements subséquents du repliement. Si la chaîne

polypeptidique adopte d'elle même des structures et des conformations dans l'état dénaturé, bien qu'instables et fluctuantes, logiquement, celles-ci affecteront les événements subséquents du repliement, en favorisant certaines voies et en éliminant d'autres, permettant ainsi de résoudre le paradoxe de Levinthal [49-53]. Par exemple, il a été établi que la structure résiduelle présente dans l'état dénaturé de la protéine L était localisée surtout dans la région correspondant à la première structure en épingle-à-cheveux β (*β -hairpin*) [54-55]. L'analyse par valeurs ϕ de l'état de transition de cette protéine a confirmé que les résidus possédant une valeur ϕ élevée, donc structurés dans l'état de transition, étaient précisément situés dans le premier *β -hairpin* [56].

L'idée d'étudier les phénomènes locaux d'initiation du repliement avait déjà été proposée antérieurement [57-58]. Les récents progrès théoriques et expérimentaux laissent maintenant entrevoir des liens très clairs entre la structure résiduelle de l'état dénaturé, les sites d'initiation du repliement, les événements subséquents et la structure native de la protéine. Éventuellement, il se pourrait fort que l'étude et la modélisation de l'état dénaturé des protéines représentent la pierre de Rosette qui permette enfin de prédire plus efficacement leur structure [59].

2 – Buts et méthodologie de la présente étude

2.1 Le modèle proposé

La nature et la localisation des structures résiduelles dans l'état dénaturé dépend essentiellement de la séquence des acides aminés qui composent la protéine et de leurs propensions à adopter des conformations particulières [20]. Vu la nature fluctuante et hétérogène de l'état dénaturé, cette propension prendra la forme d'un biais statistique par lequel les conformations énergétiquement plus favorables seront plus hautement représentées à l'équilibre que les autres conformations théoriquement accessibles mais moins favorables. Ainsi, des mutations qui introduiraient des acides aminés possédant une plus haute propension à adopter une structure telle que présente dans l'état natif de la protéine accéléreraient le repliement, alors qu'à l'inverse des mutations qui diminueraient la propension à adopter une structure de type native nuiraient au repliement ou, dans les cas extrêmes, pourraient induire un mécanisme de repliement qui conduit à une nouvelle structure native. Les travaux du groupe de David Baker sur les domaines de liaison aux IgG des protéines G et L ont notamment permis d'illustrer clairement un tel concept : un changement dans la stabilité de certains éléments de structure secondaire locaux amène un net changement dans le mécanisme de repliement de la protéine [60-61].

Par contre, de telles mutations, même favorables de ce point de vue, peuvent également déstabiliser la forme native de la protéine, car il est reconnu que la séquence et la structure des protéines ont principalement été optimisées par l'évolution pour maximiser leur stabilité, et non leur vitesse de repliement [34]. Ainsi, des mutations qui stabiliseraient la structure de l'état dénaturé pourraient, par exemple, déstabiliser l'état natif en introduisant des contraintes stériques ou des cavités dans le noyau hydrophobe. Donc, malgré l'importance que semble avoir la structure de l'état dénaturé sur les événements initiaux et subséquents du repliement, simplement muter les résidus et en observer l'impact sur l'état dénaturé peut vraisemblablement introduire des biais dans les événements subséquents qui rendraient alors difficile l'interprétation des résultats.

Par contre, s'il pouvait être possible d'influencer localement la structure et les conformations de la chaîne polypeptidique sans changer la nature des acides aminés qui la compose, alors cette approche pourrait probablement conduire à des résultats beaucoup plus significatifs.

2.2 Les tours bêta : sites d'initiation du repliement ?

Les travaux des groupes de David Baker sur la protéine L [54-55, 61] et de Julie Forman-Kay sur drkN-SH3 [43-45] impliquaient tous des structures résiduelles de type *β -hairpin*. Des expériences de modélisation effectuées sur l'état dénaturé de certaines protéines [62-63] ont révélé que les tours β qui coiffent le sommet de ces structures seraient vraisemblablement des sites de nucléation, c'est-à-dire formés tôt dans le processus de repliement. Le reste du *β -hairpin* se formerait ensuite par formation coopérative des contacts hydrophobes et des ponts hydrogènes en amont du tour pour stabiliser la structure [64-66]. Ainsi, une approche qui permettrait de stabiliser la formation des tours β , et donc des *β -hairpin*, accélérerait vraisemblablement le repliement de la protéine, si le tour en question est un site de nucléation. Par contre, les effets de la stabilisation d'un tour β qui n'est pas un site de nucléation ne sont pas évidents : deviendraient-ils alors de nouveaux sites de nucléation ? Le repliement en sera-t-il perturbé par un phénomène de frustration et la structure native déstabilisée ? Produiront-ils une structure native nouvelle ? Mais d'abord, comment stabiliser la formation d'un tour β dans l'état dénaturé ?

2.3 Stabiliser la formation des tours bêta dans l'état dénaturé

Afin de vérifier la légitimité du modèle énoncé ci-haut (sous-section 2.1) et de confirmer le potentiel pouvoir de nucléation des tours β (sous-section 2.2), la stratégie employée pour la présente étude vise à évaluer l'impact d'une stabilisation

d'un tour β dans l'état dénaturé sur le mécanisme de repliement d'une protéine. Les tours β sont généralement des structures qui pointent à l'extérieur de la structure, vers le solvant. Le tour sera donc forcément composé de résidus qui ne forment que peu de contacts avec le reste de la protéine. Le cœur hydrophobe de la protéine ne sera pas touché par une éventuellement mutation du tour, donc les risques de déstabilisation majeure de l'état natif par ces mutations s'en trouvent fortement réduits.

Par contre, la méthode employée ne consistera pas à stabiliser le tour proprement dit par simple optimisation de sa séquence, tel qu'effectué précédemment par le groupe de David Baker [60-61], mais plutôt de carrément y insérer une tige-boucle très rigide sous la forme d'un peptide ultra-stable en conformation β -*hairpin* qui simulera alors la formation d'un tour serré et stable à cet endroit de la structure. Il en résultera une extension de la structure en β -*hairpin* loin à l'extérieur du noyau de la protéine, dans le solvant. Le peptide inséré devra être stable et en mesure de se replier de façon autonome, sans former de nouveaux contacts avec le reste de la protéine, et de conserver, ne serait-ce que partiellement, sa structure à de hautes concentrations de GdnHCl. Cette stratégie s'avère similaire à celle qu'ont utilisée Viguera et Serrano chez un domaine SH3 [67].

2.4 L'ubiquitine : une protéine idéale

La protéine choisie pour cette approche est l'ubiquitine de levure (yUbi). Il s'agit d'une petite protéine (76 acides aminés) impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, notamment le contrôle de la dégradation par le protéasome et le lysosome, l'internalisation de récepteurs et la régulation de la transcription [68-72, 112]. Elle comporte une structure et une topologie relativement simples avec une hélice α et un feuillet β composé de cinq brins (dont deux β -*hairpin*), et les propriétés de son très semblable orthologue chez les mammifères (3 acides aminés de différence seulement, pour une homologie de séquence de 96%) ont déjà été bien

caractérisées [73-79]. De plus, l'ubiquitine est une protéine très stable qui devrait relativement bien tolérer des mutations qui pourraient potentiellement déstabiliser sa structure native. Ainsi, il s'agit d'une candidate idéale pour ce genre d'étude.

3 - Résultats

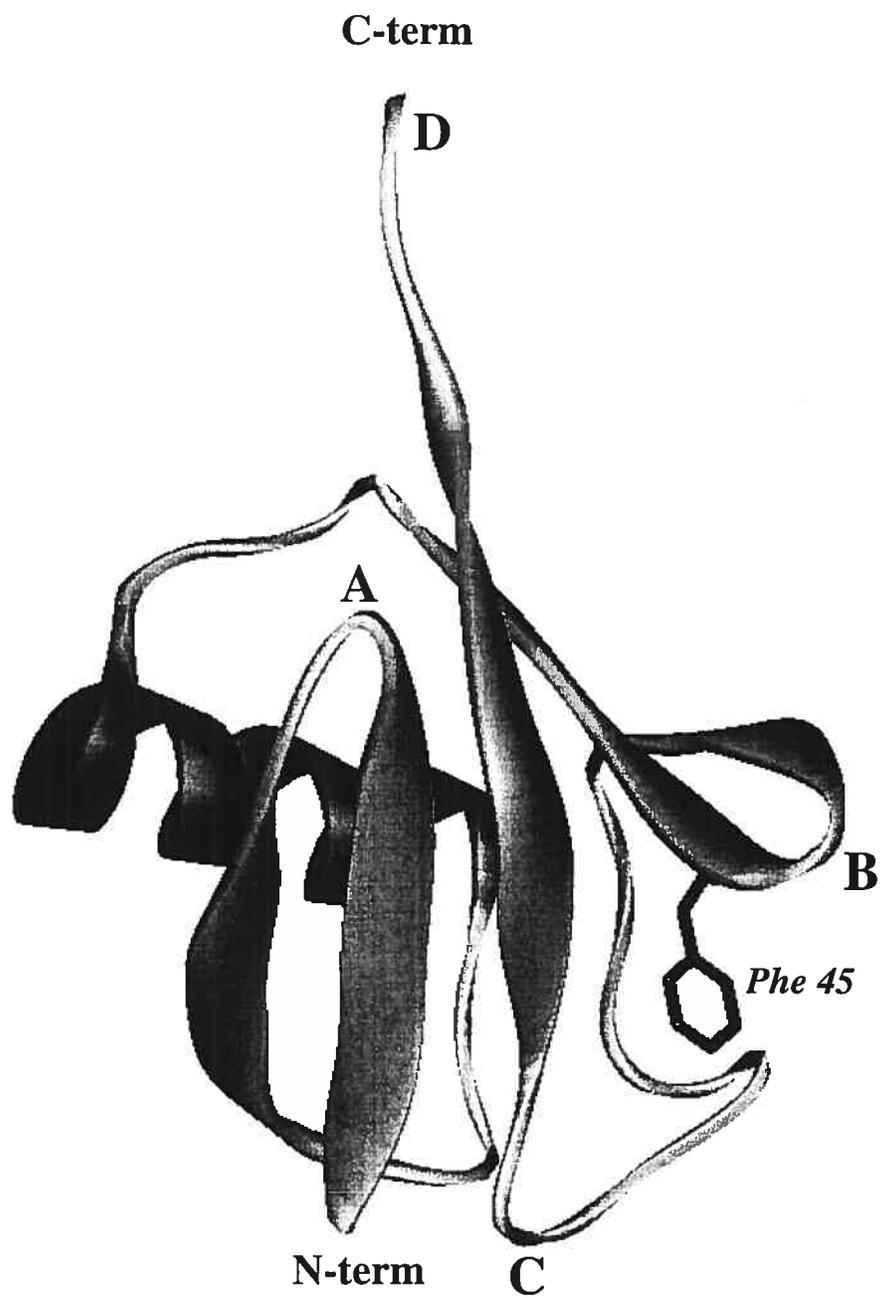
3.1 Insertion des peptides dans les tours bêta de l'ubiquitine de levure.

La stratégie utilisée prévoit l'insertion, dans l'ubiquitine de levure (yUbi), de peptides qui adopteront une conformation en tige-boucle rigide dans les tours β . Les peptides de type *tryptophan zipper* décrits par Cochran et coll. [80] s'avèrent idéaux pour ce type de stratégie. Il a été jugé préférable de maximiser la stabilité de la structure en tige-boucle insérée dans l'ubiquitine, afin de rendre cette région de la protéine plus résistante à la dénaturation et qu'elle demeure structurée en présence de GdnHCl. Ainsi, il a été décidé d'utiliser le peptide *trpzip2* (SWTWENGKWTWK), car il s'avère plus stable que le peptide *trpzip1* (SWTWEGNKWTWK). Le peptide *trpzip3* (SWTWEpNKWTWK), bien qu'encore plus stable que le *trpzip2*, comporte un résidu D-proline (p) qui rend impossible son expression dans un système bactérien.

Trois sites d'insertion potentiels ont été identifiés chez l'ubiquitine. Il s'agit (A) du tour β de type I coiffant la première structure en β -hairpin à l'extrémité N-terminale (résidus 7-10), (B) du tour β de type I' coiffant la seconde, plus petite structure en β -hairpin (résidus 45-48), ainsi que (C) du tour de type II situé entre l'hélice 3_{10} et le dernier brin β . Il a également été prévu d'insérer le peptide *trpzip2* dans un quatrième site (D), situé à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine, dans le but de démontrer que l'insertion de la tige-boucle rigide à l'extérieur de la structure n'affecte pas le repliement de cette dernière.

La figure 1 ci-dessous illustre la position des sites d'insertion dans la structure de l'ubiquitine.

Figure 1 - Visualisation des quatre sites d'insertion des peptides trpzip2 dans la structure de l'ubiquitine. Le site A correspond au tour du premier β -hairpin , le site B au tour du second β -hairpin, le site C au tour situé juste avant le dernier brin β et le site D est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. La position de la phénylalanine 45 (mutée en tryptophane chez le mutant yUbiF45W pour introduire une sonde fluorescente à l'intérieur de la structure) est illustrée. La figure a été générée à l'aide du logiciel Weblab View Lite 3.2 (1998, Accelrys, San Diego, CA).



Il était attendu que des schémas d'insertion trop rigides du peptide *trpzip2* dans l'ubiquitine amènent des perturbations locales qui gênent le repliement et la formation du tour et du β -*hairpin* au lieu de stabiliser leur formation. À l'inverse, un schéma d'insertion ne comportant pas assez de rigidité risquerait de ne pas mener aux objectifs attendus et de déstabiliser la formation du tour en introduisant un trop grand degré de liberté dans la chaîne.

Dans le but de pallier à ces éventualités, trois schémas d'insertion ont été planifiés pour les positions A, B et C. Pour chacune, le schéma premier a été conçu comme étant le plus rigide de tous, le troisième le moins, et le second en tant que compromis entre les deux. Par exemple, le premier schéma en position A (yUbi-A1) comporte la séquence WTWENGKWTW insérée entre la thréonine 7 et le lysine 11, le second (yUbi-A2) possède un résidu lysine supplémentaire pour accroître la flexibilité de la jonction entre le premier β -*hairpin* et le *trpzip2* (WTWENGKWTWK) et le troisième (yUbi-A3) comporte une glycine (WTWENGKWTWG). Ces schémas d'insertion ont tous été élaborés de façon à prévoir que les groupements indoles des tryptophanes soient situés à l'extérieur de la protéine dans la structure finale, afin de prévenir tout contact de ceux-ci avec d'autres résidus, un phénomène qui s'avérerait contraire aux objectifs de la stratégie. Finalement, le site D, en raison de sa localisation extérieure à la structure, à la suite des glycines 75 et 76, n'a nécessité qu'un seul schéma d'insertion (yUbi-D1). La liste complète des séquences pour chaque schéma d'insertion à chaque position est décrite dans le tableau 1.

Il est à noter que les résidus S et K situés aux extrémités du peptide ont été insérés, selon les dires des auteurs, davantage pour maximiser la solubilité du peptide que pour offrir une contribution significative à la structure [80]. Ainsi, plusieurs schémas d'insertion ne comportent ainsi pas de sérine N-terminale ou de lysine C-terminale, et il n'est pas attendu que ces absences gênent le repliement de la structure.

Un quatrième schéma a été planifié aux positions A, B et C pour insérer une boucle hyper-flexible G₅-S-G₅. À l'inverse du *trpzip2*, qui est une structure très stable et

rigide et dont la présence doit stabiliser la formation des tours, ces boucles riches en glycine ne devraient générer aucune structure stable, et donc fortement défavoriser la formation des tours et des structures en β -*hairpins*.

Par ailleurs, il a été convenu d'effectuer ces mutations à la fois sur l'ubiquitine de levure de type sauvage (F45) et sur une variante chez laquelle la phénylalanine 45 a été mutée pour un tryptophane (F45→W). Ce mutant a été initialement conçu et caractérisé [73-74] afin de permettre le suivi du repliement de la très similaire ubiquitine de mammifère (mUbi) par fluorescence. Devant la possibilité que les quatre tryptophanes du *trpzip2* soient incapables d'agir en tant que sondes fluorescentes qui soient sensibles au repliement en raison de leur localisation à l'extérieur de la structure, il a été décidé par prudence d'utiliser également le mutant F45W pour s'assurer d'avoir au moins une sonde fluorescente qui permette un suivi représentatif du repliement pour chaque mutant. Cette mutation n'a conduit, chez mUbi, qu'à une très légère baisse de stabilité ainsi qu'à une très faible perturbation de la structure fine de la protéine. Vu la très grande similarité entre mUbi et yUbi (seulement 3 acides aminés différents sur 76, tous pointant vers l'extérieur de la structure), il est attendu ce que cette mutation, chez yUbi, n'induisse que très peu d'effet sur la stabilité et la structure fine de la protéine.

Finalement, il est à noter que toutes les constructions réalisées comportent une séquence codant pour six résidus histidine à l'extrémité N-terminale de la protéine; ces résidus permettent une purification aisée et rapide des produits par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA-agarose.

Le tableau 1 ci-dessous indique la séquence de tous les mutants de yUbi qui ont été planifiés dans le cadre la présente étude.

Tableau 1 – Alignement des séquences des mutants de l'ubiquitine de levure qui ont été conçus pour la présente étude. Tous ces mutants ont été réalisés simultanément sur l'ubiquitine type sauvage (yUbi) et sur celle comportant la phénylanine 45 mutée en tryptophane (yUbiF45W). La position du résidu #45 est marquée d'un astérisque. La localisation des positions A, B, C et D est indiquée dans le haut du tableau. Les éléments de structure secondaire sont symbolisés comme suit : α pour les hélices α , β pour les brins β , 3_{10} pour les hélices 3_{10} et T pour les tours β . Les séquences correspondant au *trpzip2* sont indiquées en gras, et les séquences correspondant aux boucles flexibles G_5 -S- G_5 sont indiquées en italique.

Structure	<i>Position A</i>																						
	β	β	β	β	β	T	T	T															
Résidu #	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	-	-	-	-	-	-	
yUbi (F45W)	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	
yUbi-A1	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	-	-	W	T	W	E	N	G
yUbi-A2	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	-	-	W	T	W	E	N	G
yUbi-A3	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	-	-	W	T	W	E	N	G
yUbi-A4	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	-	-	G	G	G	G	G	S
yUbi-B1	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-B2	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-B3	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-B4	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-C1	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-C2	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-C3	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-C4	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-
yUbi-D1	M	H	H	H	H	H	H	G	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	-	-	-	-	-	-

Position A

Structure	<i>Position A</i>																								
	T	β	β	β	β	β	T	T	T	T							α	α	α						
Résidu #	-	-	-	-	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25					
yUbi (F45W)	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-A1	K	W	T	W	-	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-A2	K	W	T	W	K	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-A3	K	W	T	W	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-A4	G	G	G	G	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-B1	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-B2	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-B3	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-B4	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-C1	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-C2	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-C3	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-C4	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					
yUbi-D1	-	-	-	-	G	K	T	I	T	L	E	V	E	S	S	D	T	I	D	N					

Structure	<i>Position A</i>																		
	α	α	α	α	α	α	α	α	α					3_{10}	3_{10}	3_{10}	β	β	β
Résidu #	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
yUbi (F45W)	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-A1	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-A2	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-A3	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-A4	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-B1	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-B2	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-B3	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-B4	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-C1	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-C2	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-C3	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-C4	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I
yUbi-D1	V	K	S	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I

Position B

Structure	T	T	T												T	β	T	T	
Résidu #	*45*	46	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	49	50	51	52
yUbi (F45W)	W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-A1	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-A2	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-A3	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-A4	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-B1	F/W	-	-	-	W	T	W	E	N	G	K	W	T	W	K	Q	L	E	D
yUbi-B2	F/W	-	-	-	W	T	W	E	N	G	K	W	T	W	K	Q	L	E	D
yUbi-B3	F/W	-	-	T	W	T	W	E	N	G	K	W	T	W	K	Q	L	E	D
yUbi-B4	F/W	-	-	-	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	K	Q	L	E	D
yUbi-C1	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-C2	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-C3	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-C4	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D
yUbi-D1	F/W	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	L	E	D

Position C

Structure	T	T		3_{10}	3_{10}	3_{10}	3_{10}		T	T	T									
Résidu #	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi (F45W)	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-A1	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-A2	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-A3	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-A4	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-B1	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-B2	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-B3	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-B4	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	
yUbi-C1	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	-	-	-	W	T	W	E	N	G	K	W
yUbi-C2	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	-	-	-	W	T	W	E	N	G	K	W
yUbi-C3	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	-	W	T	W	E	N	G	K	W
yUbi-C4	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	-	-	G	G	G	G	G	S	G	G	G
yUbi-D1	G	R	L	I	S	D	Y	N	I	Q	K	E	-	-	-	-	-	-	-	-

*Position C**Position D*

Structure			T	β	β	β	β	β	β										
Résidu #	-	-	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	-	-	-	-	-
yUbi (F45W)	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-A1	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-A2	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-A3	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-A4	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-B1	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-B2	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-B3	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-B4	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-C1	T	W	-	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-C2	T	W	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-C3	T	W	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-C4	G	G	-	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	-	-	-	-	-
yUbi-D1	-	-	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G	T	W	T	W	E

<i>Position D</i>								
Structure								
Résidu #	-	-	-	-	-	-	-	-
yUbi (F45W)	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-A1	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-A2	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-A3	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-A4	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-B1	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-B2	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-B3	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-B4	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-C1	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-C2	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-C3	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-C4	-	-	-	-	-	-	-	Stop
yUbi-D1	N	G	K	W	T	W	K	Stop

3.2 Construction, expression et purification des mutants

Les insertions ont été réalisées par une stratégie de PCR sur vecteur entier, et le criblage des mutants positifs par un test d'induction et par séquençage tel que décrit dans le chapitre 5, section 5.2. Cette stratégie a été employée en raison de sa simplicité et du petit nombre d'étapes qu'elle nécessite pour produire les mutations.

Tel que l'indique le tableau 2, plusieurs constructions d'ADN n'ont toutefois pu être complétées, notamment la totalité de toutes celles comportant une insertion en position B, pour lesquelles la stratégie de PCR ne semble avoir généré aucun produit détectable, et ce malgré de multiples tentatives pour y parvenir. Il serait souhaitable d'optimiser les conditions, ou encore de considérer une autre stratégie de mutagenèse pour terminer la construction de ces mutants.

Certaines constructions ont été complétées avec succès (tel que confirmé par le séquençage de la séquence codante et du promoteur), mais aucun produit d'expression n'a été détecté. C'est notamment le cas de la construction yUbi-A4, pour laquelle les réactions de PCR, les criblages et le séquençage ont été répétés maintes fois, sans succès. La croissance des bactéries comportant cette construction ne semble pas avoir été inhibée par l'expression de la protéine, tel que jugé par comparaison de la concentration des protéines cellulaires (non-induites) contenues dans les gels SDS-PAGE des tests d'induction avec les concentrations de telles protéines chez les mutants identifiés comme positifs. L'insertion d'une boucle très flexible riche en glycines à cet endroit de la structure empêche manifestement l'expression normale du produit, mais apparemment sans être davantage toxique pour la cellule que ne le serait l'expression d'un mutant stable et soluble. Il est possible que la protéine résultant de cette mutation soit simplement trop instable pour être exprimée de façon soutenue sans s'agrèger en corps d'inclusion ou sans carrément être dégradée par des protéases.

Les mutants en position C exprimaient très faiblement, et se sont avérés en bout de ligne impossibles à purifier selon la technique décrite dans la section Matériels et méthodes (chapitre 5). Il est possible que l'insertion du *trpzip2* à cet endroit de la structure déstabilise fortement la protéine. Des précautions spéciales devront être prises pour parvenir à purifier efficacement ces mutants. Finalement, les mutants yUbi-A3 et yUbiF45W-A3, bien qu'exprimant correctement lors des tests d'induction et dont le séquençage s'est révélé tel qu'attendu, n'ont pas été purifiés en raison de contraintes logistiques. Il en résulte que seuls les mutants yUbi-A1, yUbiF45W-A1, yUbi-D1 et yUbiF45W-D1, en sus de yUbiF45W (sans insertion), ont été soumis à une caractérisation physique.

Tableau 2 – Sommaire récapitulatif des étapes de construction, d'expression, de purification et de caractérisation ayant été complétées pour chaque mutant d'ubiquitine qui avait été planifié. Les signes + signifient que cette étape a été complétée avec succès, les signes – signifient un échec et les colonnes vides signifient que les clones n'ont pas été soumis à cette étape. La colonne « PCR et ligation » indique si un produit de PCR a été obtenu et transformé avec succès chez E. Coli XL-1. La colonne « Exprimé » indique si un produit d'expression au poids moléculaire et au niveau d'expression attendus a été observé pour ce mutant suite à une induction-test à l'IPTG. La colonne « Séquençage » indique si au moins un des clones a été séquençé et si la séquence est telle qu'attendue. La colonne « Purifié » indique que ce mutant a été purifié avec succès en utilisant la résine Ni-NTA-agarose. Finalement, la colonne « Caractérisé » indique si ce mutant, une fois purifié, a été soumis à une caractérisation physique. Il est à noter que les constructions de tous les mutants ont été réalisées à la fois sur l'ubiquitine type sauvage (yUbi) et sur l'ubiquitine comportant un tryptophane interne (yUbiF45W).

Mutant	PCR et ligation	Exprimé	Séquencé	Purifié	Caractérisé
yUbi (F45W)	N/D	+	+	+	+
yUbi-A1	+	+	+	+	+
yUbi-A2	-				
yUbi-A3	+	+	+		
yUbi-A4	+	-	+		
yUbi-B1	-				
yUbi-B2	-				
yUbi-B3	-				
yUbi-B4	-				
yUbi-C1	+	± ^a	+	-	
yUbi-C2	+	± ^a	-		
yUbi-C3	-				
yUbi-C4	+	± ^a	-		
yUbi-D1	+	+	+	+	+

^a Les clones obtenus pour ces constructions expriment un produit possédant un poids moléculaire tel qu'attendu mais dont le niveau d'expression est beaucoup plus bas que ceux de yUbiF45W et des autres mutants positifs.

3.3 Caractérisation du système de référence : l'ubiquitine de levure F45W avec *his-tag*

Avant d'entreprendre la caractérisation des mutants, il importe d'abord de connaître les propriétés de l'ubiquitine de levure elle-même. L'ubiquitine de levure type sauvage ne comporte pas de sonde fluorescente qui permette de suivre le repliement ; le mutant pour lequel la phénylalanine 45 a été mutée en tryptophane (yUbiF45W) a donc été préféré. Le repliement de cette protéine a déjà été étudié et caractérisé [77], mais l'ubiquitine F45W utilisée pour les études antérieures ne comportait pas de résidus histidines (*6X-his-tag*) à l'extrémité N-terminale. Or, tous les mutants ici étudiés comportent ces résidus, pour fins de purification simplifiée par chromatographie d'affinité avec résine Ni-NTA-agarose. Dans le but d'évaluer l'impact que pourrait avoir la présence des histidines sur les propriétés de l'ubiquitine, et par incidence sur tous les mutants ici étudiés, il a été décidé de caractériser d'abord yUbiF45W² et de comparer cette caractérisation aux résultats antérieurs (yUbiF45W-his⁻).

Des études de repliement et de dénaturation au chlorure de guanidinium (*guanidine hydrochloride*, ou GdnHCl) ont été entreprises à l'aide d'un appareil de type *stopped-flow*, lequel permet d'étudier des réactions cinétiques grâce à un mixage rapide de petites quantités de réactifs. Les traces de fluorescence cinétique de chaque réaction ont ensuite été modélisées et manipulées mathématiquement, étapes en vertu desquelles il a été possible d'extraire les paramètres thermodynamiques, le tout étant décrit dans les sections 5.8 et 5.9 du chapitre 5 - Matériels et méthodes,.

Les figures 2 et 3 ci-dessous illustrent respectivement le comportement à l'équilibre et cinétique de yUbiF45W vs. YUbiF45W-his⁻ ainsi que leur modélisation selon un système dit en deux états, c'est-à-dire sans présence détectable d'intermédiaires

² Par soucis d'alléger la nomenclature, il convient de poser que toutes les protéines et mutants mentionnés dans le texte comportent les résidus histidines à leur extrémité N-terminale; seules les protéines clairement identifiées ainsi, par exemple yUbiF45W-his⁻, ne comportent pas ces résidus.

thermodynamiques ou cinétiques. Les paramètres physiques sont résumés dans le tableau 3. Il est notable que les paramètres thermodynamiques dérivés des paramètres à l'équilibre sont très similaires aux mêmes paramètres dérivés des expériences cinétiques chez yUbiF45W et chez yUbiF45W-his⁻. De plus, aucune déviation de la linéarité de la courbe de Chevron (figure 2) ni perte d'amplitude du signal dans le temps mort de l'appareil (données non-illustrées) n'ont été observées à basse concentration de GdnHCl, ce qui supporte bien l'utilisation d'un modèle de repliement à deux états [24].

D'autre part, il est manifeste que les données obtenues ci-dessus pour yUbiF45W diffèrent nettement de celles qui ont été obtenues antérieurement avec yUbiF45W-his⁻ [77]. Les figures 2 et 3 permettent d'illustrer clairement l'effet que peut avoir la présence du *his-tag* sur les propriétés physiques de la protéine, soit une stabilité réduite d'environ 20%, une vitesse de repliement en absence de dénaturant ($k_r(0)$) réduite de 58,3%, ainsi que d'une vitesse de dénaturation en absence de dénaturant ($k_d(0)$) accrue de 27,7%. Malgré ces effets, il a néanmoins été décidé de conserver ces histidines sur tous les mutants, car leur présence simplifie considérablement les procédures de purification des produits. De plus, les paramètres m_r^3 , m_d^4 et m^5 , ne sont que très peu affectés par la mutation, ce qui suggère que la déstabilisation observée n'est pas due à une perturbation de la structure ou à un changement du mécanisme de repliement.

³ m_r représente la pente de la relation linéaire entre la vitesse de repliement $k_r(x)$ et la concentration de dénaturant (x)

⁴ m_d représente la pente de la relation linéaire entre la vitesse de dépliement $k_d(x)$ et la concentration de dénaturant (x)

⁵ m représente la pente de la relation linéaire entre l'énergie libre que gagne la protéine en se repliant $\Delta G(x)$ et la concentration de dénaturant (x)

Figure 2 – Courbe d'équilibre de γ UbiF45W à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces cinétiques de dénaturation. Les données brutes ont été converties en fraction de la population de protéines qui est repliée tel que décrit dans la sous-section 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. La trace pleine représente la relation modélisée entre la fraction de γ UbiF45W repliée et la concentration de GdnHCl selon un système à deux états, alors que la trace pointillée indique à titre comparatif la relation correspondante pour γ UbiF45W-his⁻ [77].

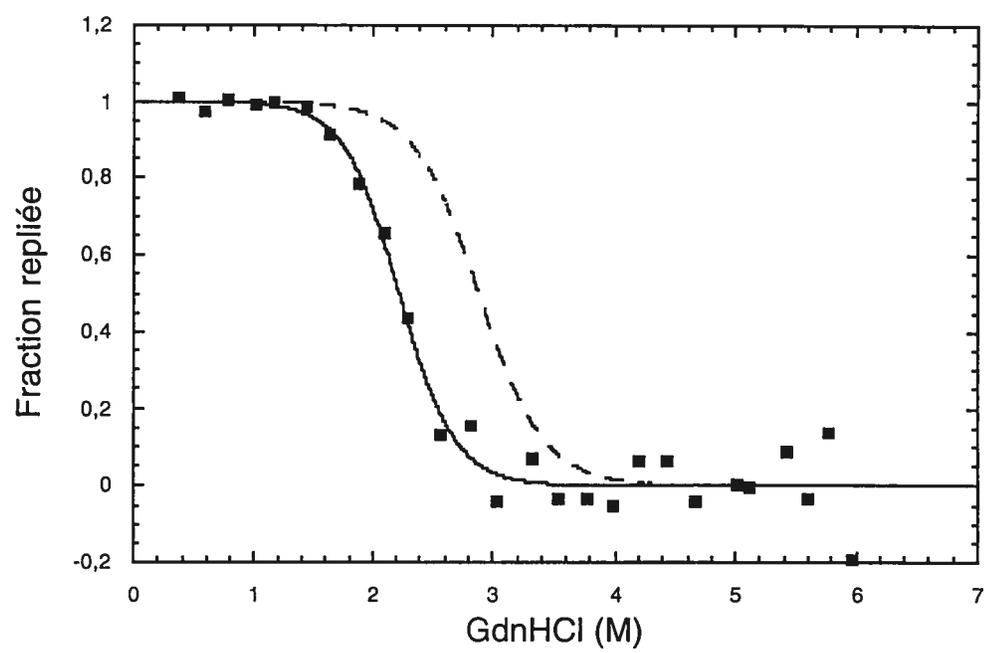


Figure 3 – Courbe de Chevron de γ UbiF45W à 298 K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les expériences de repliement ont généré des traces de relaxation cinétique en plusieurs phases exponentielles; deux phases mineures (\approx 1-5% et \approx 10-20% de l'amplitude totale) n'ont pas été indiquées afin d'alléger la figure. Le logarithme des constantes de vitesse de la phase principale de repliement (●; environ 75-85% de l'amplitude totale), ainsi que de la phase de dénaturation (■), ont été modélisés en fonction de la concentration de GdnHCl (trait plein) tel que décrit dans la sous-section 5.9.2 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Le trait pointillé indique à titre comparatif la relation obtenue antérieurement avec γ UbiF45W-his⁻[77].

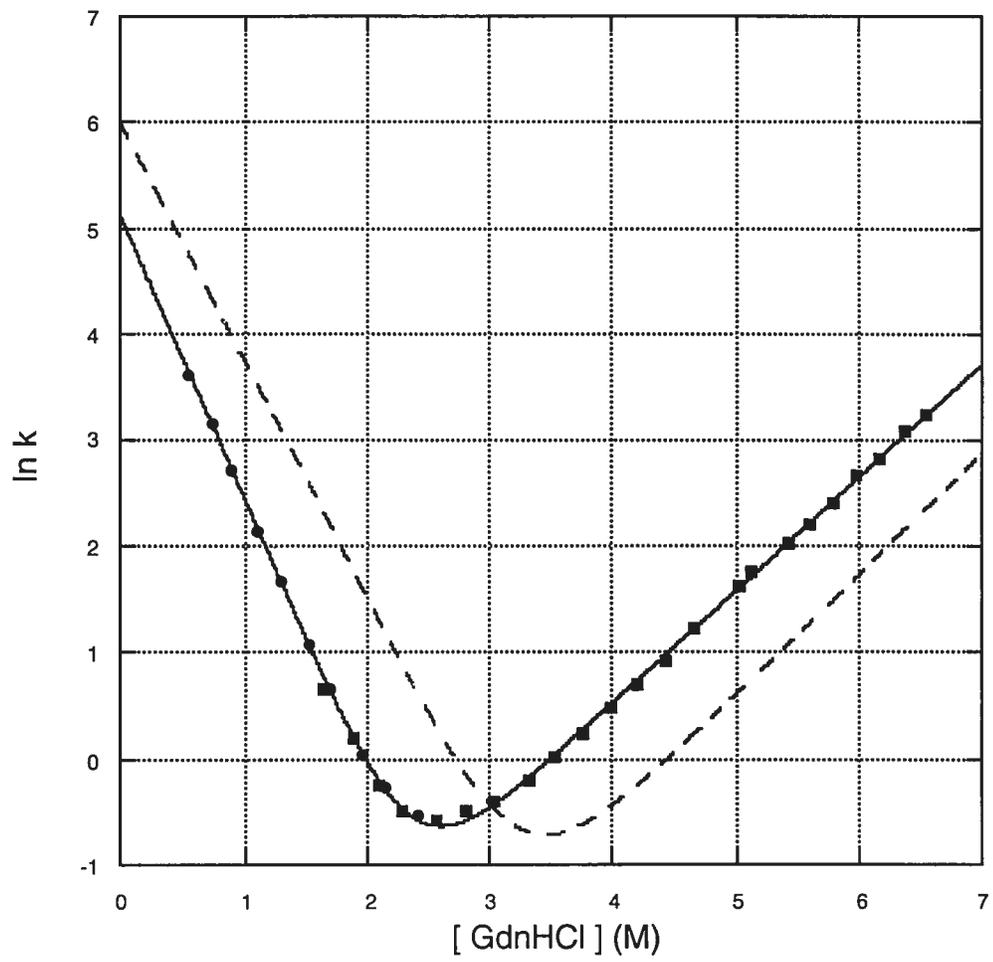


Tableau 3 – Résumé des propriétés thermodynamiques et cinétiques de yUbiF45W ainsi que de yUbiF45W-his⁻ à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les paramètres de yUbiF45W ont été dérivés des figures 2 (équilibre) et 3 (cinétique) tel que décrit dans les sous-sections 5.9.2 et 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Le paramètre $k_r(0)$ représente la constante de vitesse de repliement extrapolée en absence de dénaturant ; $k_d(0)$ représente la constante de vitesse de dépliement extrapolée en absence de dénaturant ; m_r représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de repliement et la concentration de dénaturant ; m_d représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de dépliement et la concentration de dénaturant ; $\Delta G(0)$ représente l'énergie libre que la protéine gagne à se replier en absence de dénaturant ; m représente la pente de la relation entre l'énergie libre que gagne la protéine à se replier et la concentration de dénaturant et finalement $C_{50\%}$ représente la concentration de dénaturant nécessaire pour dénaturer la moitié de la population de protéines.

	yUbiF45W, données cinétiques	yUbiF45W, données à l'équilibre	yUbiF45W-his, données cinétiques ^a	yUbiF45W-his données à l'équilibre ^a
k_r (0) ^b	$168,6 \pm 6,4 \text{ s}^{-1}$	-	$404,6 \pm 27,5 \text{ s}^{-1}$	-
k_d (0) ^b	$0,0238 \pm 0,0010 \text{ s}^{-1}$	-	$0,0066 \pm 0,0015 \text{ s}^{-1}$	-
m_r	$-2,698 \pm 0,026 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-	$-2,256 \pm 0,038 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-
m_d	$1,065 \pm 0,009 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-	$1,127 \pm 0,045 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-
$\Delta G(0)$ ^b	$-21,96 \pm 0,20 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-23,72 \pm 3,49 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-27,22 \pm 0,75 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-26,67 \pm 0,62 \text{ kJ mol}^{-1}$
m	$9,33 \pm 0,09 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$10,67 \pm 1,57 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$8,39 \pm 0,21 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$9,43 \pm 0,22 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$
$C_{50\%}$	$2,35 \pm 0,04 \text{ M (GdnHCl)}$	$2,22 \pm 0,65 \text{ M (GdnHCl)}$	$3,24 \pm 0,17 \text{ M (GdnHCl)}$	$2,83 \pm 0,13 \text{ M (GdnHCl)}$

^a tiré de Vallée-Bélisle A., Turcotte J.F. et Michnick, S.W., manuscrit soumis à J.Mol. Biol.

^b La valeur 0 entre parenthèses indique qu'il s'agit d'un paramètre dont la valeur a été extrapolée à l'origine, c'est à dire en absence de dénaturant.

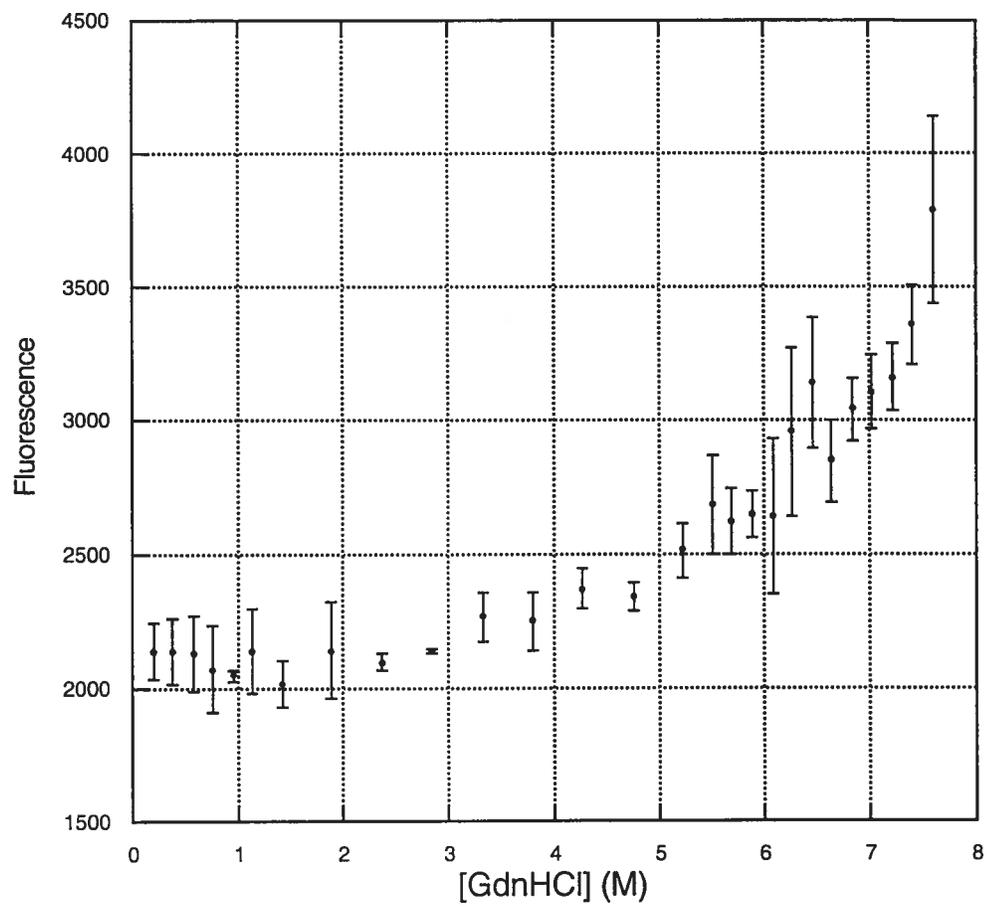
3.4 Caractérisation du peptide *trpzip2*

Avant de débiter l'analyse des mutants, il convient également de connaître les propriétés physiques du peptide *trpzip2*. Cochran et collaborateurs [80] ont étudié le comportement du peptide à l'aide de variations de température en utilisant le dichroïsme circulaire comme sonde, mais les études du présent projet sur les mutants d'ubiquitine ont toutes été planifiées et réalisées par dénaturation chimique au GdnHCl en à partir d'une sonde fluorescente.

Il a donc d'abord été entrepris de caractériser la fluorescence du *trpzip2*, en présence de concentrations croissantes de GdnHCl. Il était anticipé que le repliement et la dénaturation d'un peptide aussi court que *trpzip2* à 298 K, la température à laquelle ont été effectuées toutes les expériences cinétiques et thermodynamiques, s'avère être un phénomène trop rapide pour être analysé par *stopped-flow*, lequel comporte une limite de détection pour des réactions dont les constantes de vitesse avoisinent le 500 s^{-1} . Zagrovic et collaborateurs ont récemment modélisé le repliement d'un ensemble dénaturé de peptides *trpzip1*, au cours de laquelle les molécules ont atteint une structure quasi-native en quelques nanosecondes seulement, ce qui impliquerait des constantes de vitesse de l'ordre des $1\,000\,000 \text{ s}^{-1}$ [111] ! Seules des études à l'équilibre ont donc été effectuées sur ce peptide, en utilisant un lecteur de plaques à 96 puits équipé d'un fluorimètre.

La figure 4 ci-dessous illustre la variation de l'intensité de fluorescence brute du *trpzip2* selon la concentration de GdnHCl. Il est manifeste que le comportement observé ne permet pas de modéliser les données selon l'équation (6), ni de transformer les données en fraction de protéines repliées selon les équations (9) et (10) (voir la sous-section 5.9.3). Il n'est possible de déceler sur cette figure aucun niveau basal de fluorescence (plateau), ni transition d'allure sigmoïde pourtant caractéristique d'un processus de repliement coopératif. De plus, les écarts-types sur les valeurs obtenues sont particulièrement élevés, ce qui rend ces données encore davantage imprécises et difficiles à analyser.

Figure 4 – Données brutes de fluorescence du peptide *trpzip2* en fonction de la concentration de GdnHCl à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les mesures ont été prises en triplicate et les barres d'erreur représentent les écarts-types.



Il pourrait être possible que la hausse progressive de l'intensité de fluorescence lorsque la concentration de GdnHCl augmente représente le début d'une incomplète transition d'allure sigmoïde. Il n'est toutefois pas envisageable de vérifier cette hypothèse (à 298K), car les solutions de GdnHCl ne peuvent être concentrées à plus de 8M. Utiliser une température expérimentale plus élevée pourrait potentiellement permettre de réduire la stabilité du *trpzip2* et donc de déplacer vers une plus basse concentration de GdnHCl (vers la gauche sur la figure) une hypothétique transition, mais tel que démontré par Cochran et coll., ce peptide est très résistant à la chaleur, exhibant un T_m de 345 K [80].

Alternativement, la figure 4 pourrait laisser entendre qu'il est fort possible que le patron de fluorescence simultanée de quatre tryptophanes ne soit pas une sonde idéale pour étudier le repliement du *trpzip2*, générant des niveaux de fluorescences complexes ou irréguliers, qui ne permettent pas de détecter une transition entre formes native et dénaturée du peptide. Il ne pourrait également pas être exclu que les phénomènes observés puissent témoigner d'une relation non linéaire entre la concentration de dénaturant et la fluorescence du peptide.

Afin de contourner les problèmes associés à la fluorescence, de concises études à l'équilibre par dichroïsme circulaire ont été tentées à l'aide d'un spectropolarimètre, et les résultats bruts illustrés dans les figures 5 et 6. Bien que le nombre restreint de mesures incite à la prudence dans l'interprétation des résultats, il ne semble pas y avoir davantage de transition nette détectée par dichroïsme circulaire que par fluorescence. Ni la variation de l'ellipticité molaire à 229nm [80], ni le déplacement du maximum d'activité optique n'ont révélé une quelconque abrupte transition, tout comme les résultats de fluorescence.

Devant de tels résultats, il convient donc de déduire que le comportement observé est probablement dû à une augmentation progressive de la population de molécules *trpzip2* dénaturée par la concentration croissante de GdnHCl (ce qui correspondrait à une transition très large et peu coopérative).

Figure 5 – Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain du peptide *trpzip2* (10 μM) à différentes concentrations de GdnHCl, dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 à 294 K. Les spectres représentent une moyenne de 15 acquisitions. Les concentrations en GdnHCl correspondant à chaque spectre sont indiquées à côté des maxima d'activité optique (traits verticaux).

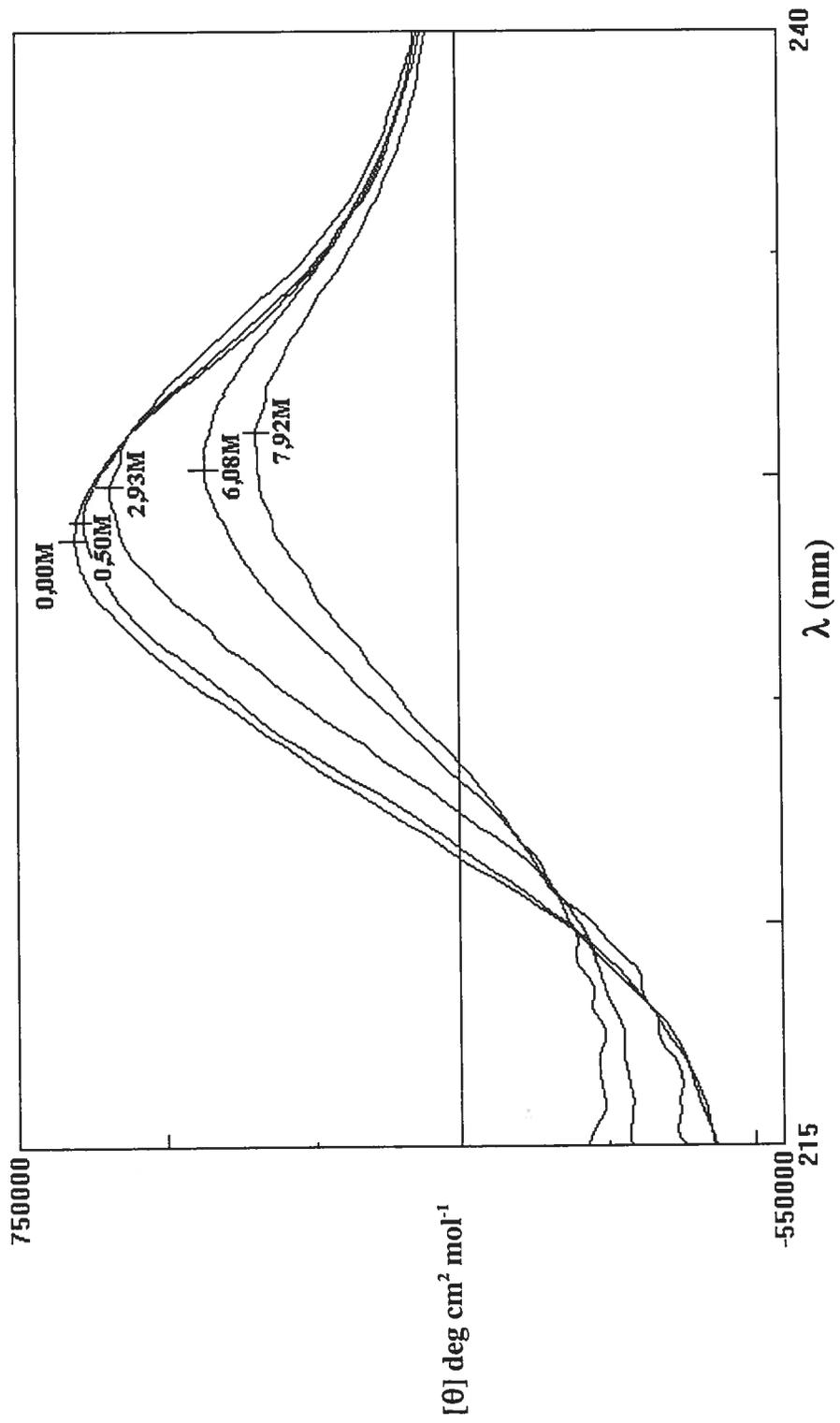
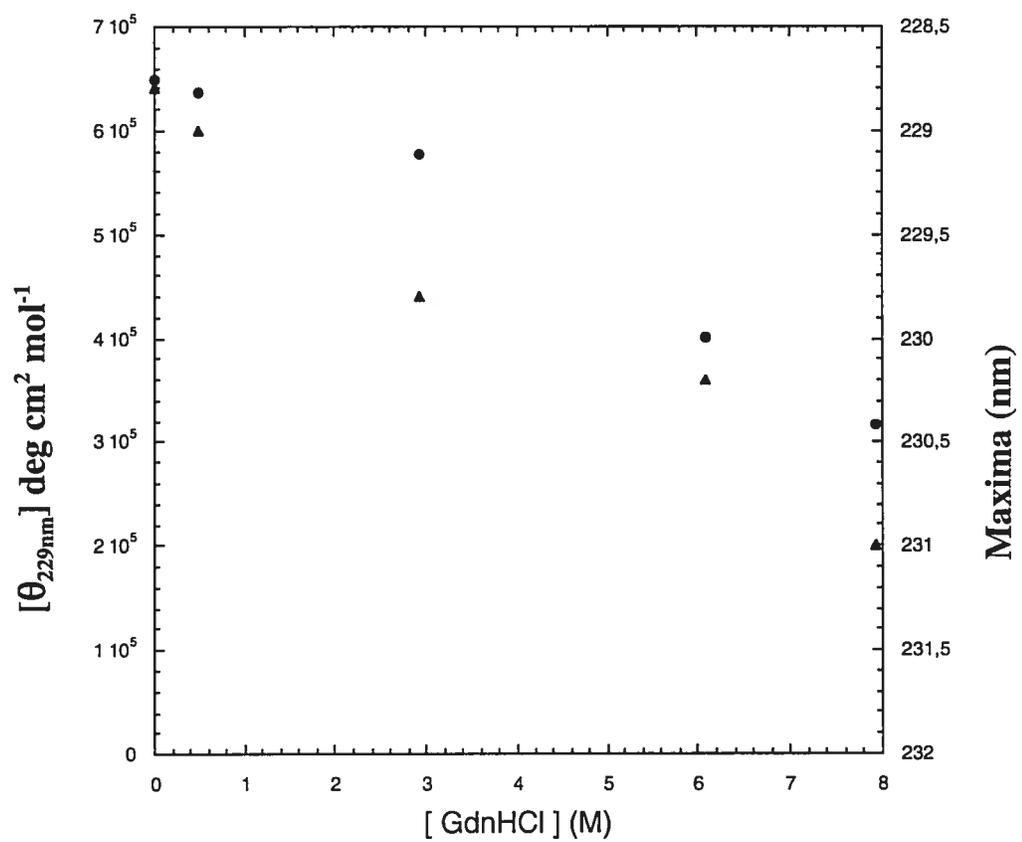


Figure 6 – Ellipticité molaire (●, axe de gauche) et longueur d'onde correspondant au maximum d'activité optique (▲, axe de droite) du peptide *trpzip2* (10 μ M) en fonction de la concentration de GdnHCl, dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 à 294 K.



3.5 Effet de l'insertion du *trpzip2* à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine : caractérisation des mutants yUbiF45W-D1 et yUbi-D1

Afin de confirmer la validité de la stratégie employée, il convenait de s'assurer d'abord que l'insertion du *trpzip2* à l'extérieur de la structure de l'ubiquitine n'affecte pas son repliement avant d'étudier l'impact d'une insertion dans la structure elle-même. Des expériences de repliement et de dénaturation sur un appareil de type *stopped-flow* ont ainsi été réalisées sur les mutants yUbiF45W-D1 et yUbi-D1, qui comportent le peptide inséré à leurs extrémités C-terminales. Ces expériences ne diffèrent en rien de celles qui ont été effectuées afin de caractériser le repliement de yUbiF45W (voir la sous-section 3.3 ci-haut).

Le mutant yUbiF45W-D1 comporte un tryptophane interne, lequel permet de détecter aisément la transition entre les formes natives et dénaturées de la protéine. Il est certain que les quatre tryptophanes du *trpzip2* contribuent à l'intensité de fluorescence totale du signal observé par le photomultiplicateur du *stopped-flow* en augmentant les niveaux de fluorescence basaux des états natifs et dénaturés. Par contre, il ne pouvait pas être exclu que ces tryptophanes externes soient insensibles à une quelconque transition du reste de la structure. Ne pouvait également pas être écartée l'hypothèse, bien qu'improbable, que le repliement du *trpzip2* lui-même, de façon distincte du reste de la protéine, puisse être observé par ces tryptophanes. Si ces hypothèses s'étaient avérées exactes, la relaxation suivant les sauts de dénaturants aurait pu générer des traces correspondant à des phénomènes parallèles suivis simultanément par plusieurs sondes fluorescentes, ce qui aurait pu fortement compliquer la modélisation et l'analyse.

Par contre, cette possibilité ne s'est pas confirmée, et les traces de relaxation pour le repliement et la dénaturation ont été très semblables à celles qui ont été observées pour yUbiF45W, et ont pu très aisément être modélisées selon l'équation générale (1) (voir la sous-section 5.9.1). Il est par contre à noter que les intensités de

fluorescences extrapolées à un temps infini sont considérablement plus intense pour yUbiF45W-D1 que pour yUbiF45W, surtout à haute concentration de GdnHCl, alors que la protéine est complètement dénaturée. Ceci est dû au bruit de fond que génère la fluorescence des quatre tryptophanes du *trpzip2*. La soustraction des niveaux de fluorescence de base des états dénaturés et natifs de chaque protéine par l'équation (9) permet néanmoins la conversion des données brutes de fluorescence en fraction de protéine repliée en fonction de la concentration de dénaturant, ce qui permet une comparaison aisée entre les comportements à l'équilibre des deux protéines.

Les résultats ont été ensuite transformés et modélisés, tel que décrit dans la section 5.9, pour correspondre à un modèle à deux états. L'aboutissement de ces transformations est illustré dans les figures 7 et 8 ainsi que dans le tableau 4, qui résume les paramètres physiques de yUbiD45W-D1 et les compare à ceux de yUbiF45W.

Figure 7 – Courbe d'équilibre de yUbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces de relaxation cinétique de dénaturation. Les données brutes ont été converties en fraction de la population de protéines qui est repliée tel que décrit dans la sous-section 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. La trace pleine représente la relation modélisée entre la fraction de yUbiF45W-D1 repliée et la concentration de GdnHCl selon un système en deux états, alors que la trace pointillée indique à titre comparatif la relation correspondante pour yUbiF45W, tel qu'obtenu dans la figure 2. Cette trace s'avère pratiquement impossible à distinguer de celle obtenue ici pour yUbiF45W-D1.

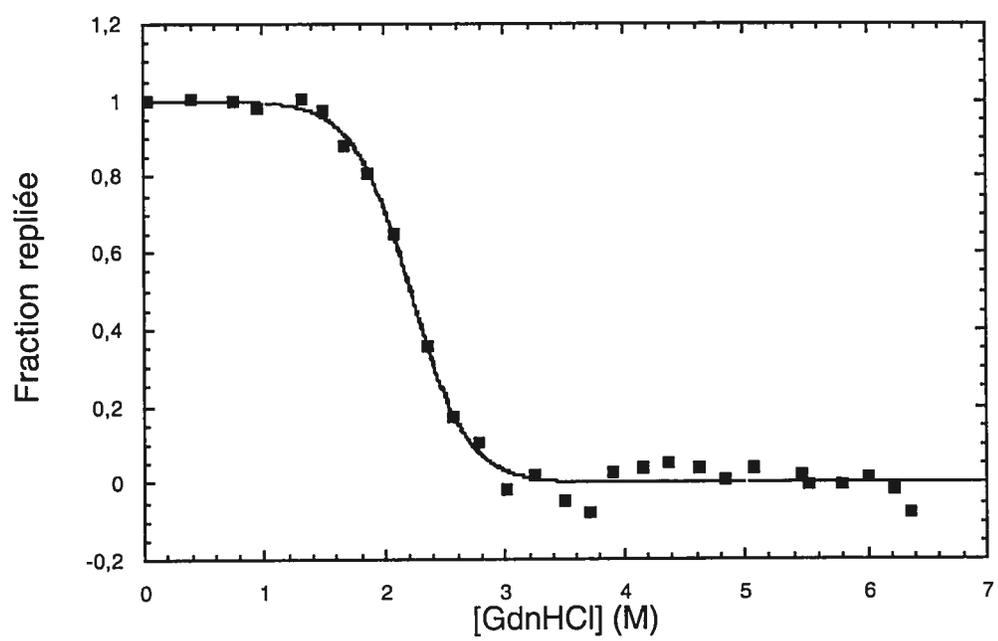


Figure 8 – Courbe de Chevron de γ UbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les expériences de repliement ont généré des traces cinétiques contenant plusieurs phases; deux d’entre elles, possédant une faible amplitude, soient respectivement 1-5% et 10-20% de l’amplitude totale de la relaxation, n’ont pas été indiquées dans la figure par souci de clarté. Les constantes de vitesse de la phase principale de repliement (●, 75-85% de l’amplitude totale) et de la dénaturation (■) ont été modélisées en fonction de la concentration de GdnHCl selon un système en deux états (trait plein), tel que décrit dans sous-section 5.9.2 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Le trait pointillé indique à titre comparatif la relation obtenue avec γ UbiF45W ne comportant pas de *trpzip2* tirée de la figure 3.

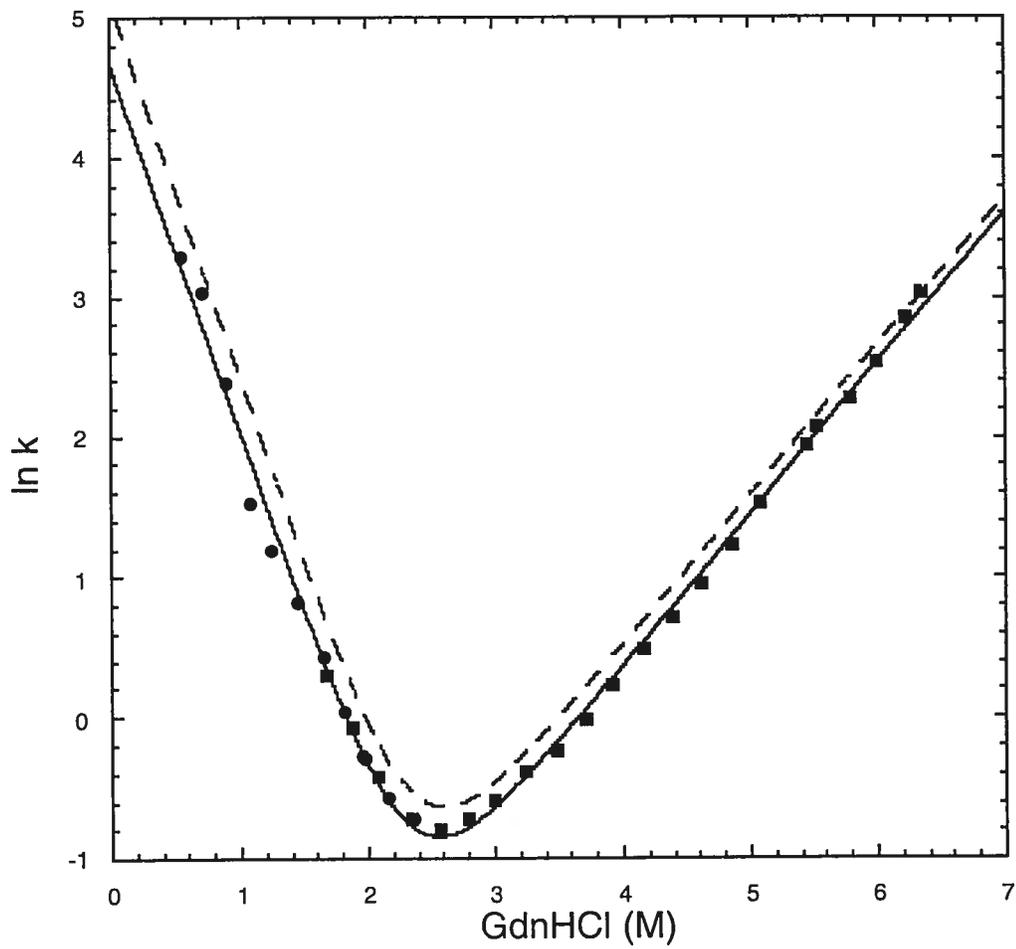


Tableau 4 - Résumé des propriétés biophysiques de yUbiF45W-D1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les paramètres pour yUbiF45W ont été indiqués à titre comparatif et sont tirés du tableau 3. Les paramètres de yUbiF45W-D1 ont été dérivés des figures 7 (équilibre) et 8 (cinétique), tel que décrit dans les sous-section 5.9.2 et 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Le paramètre $k_r(0)$ représente la constante de vitesse de repliement extrapolée en absence de dénaturant ; $k_d(0)$ représente la constante de vitesse de dépliement extrapolée en absence de dénaturant ; m_r représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de repliement et la concentration de dénaturant ; m_d représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de dépliement et la concentration de dénaturant ; $\Delta G(0)$ représente l'énergie libre que la protéine gagne à se replier en absence de dénaturant ; m représente la pente de la relation entre l'énergie libre que gagne la protéine à se replier et la concentration de dénaturant et finalement, $C_{50\%}$ représente la concentration de dénaturant nécessaire pour dénaturer la moitié de la population de protéines.

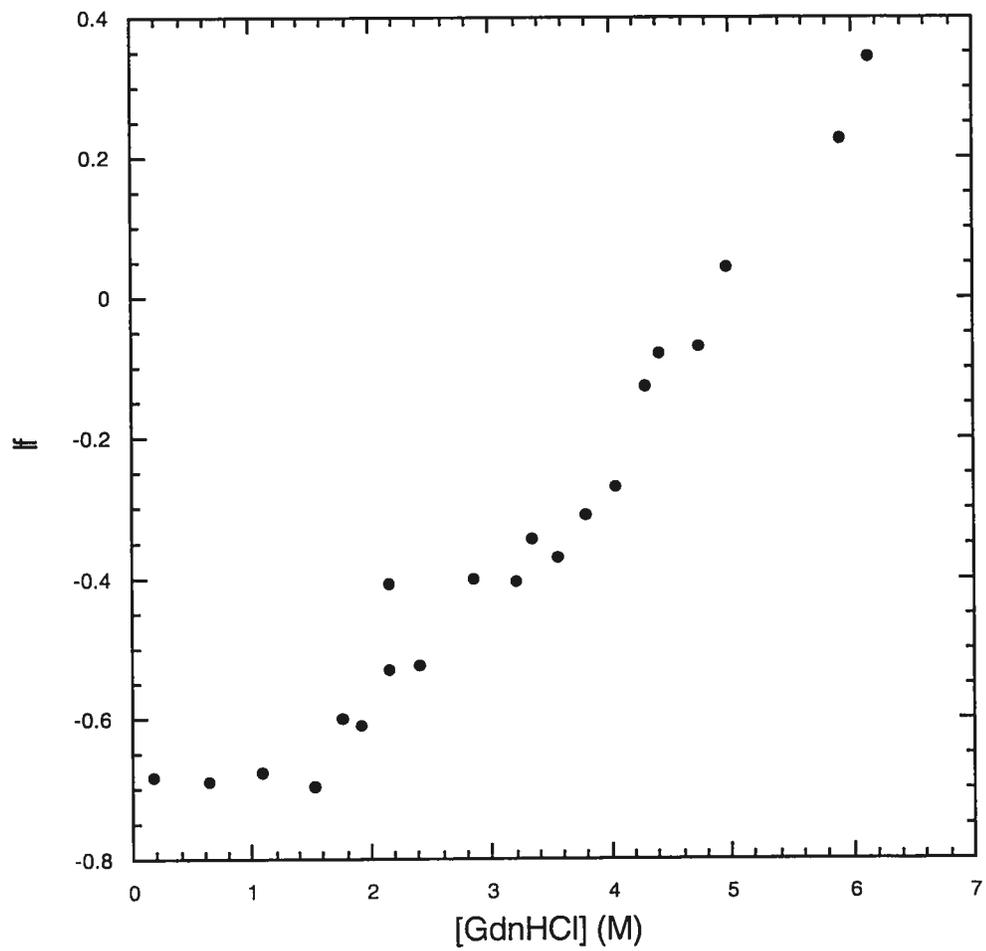
	yUbiF45W-D1, données cinétiques	yUbiF45W-D1, données à l'équilibre	yUbiF45W, données cinétiques	yUbiF45W, données à l'équilibre
$k_t(0)^b$	$105,6 \pm 8,8 \text{ s}^{-1}$	-	$168,6 \pm 6,4 \text{ s}^{-1}$	-
$k_d(0)^b$	$0,0190 \pm 0,0018 \text{ s}^{-1}$	-	$0,0238 \pm 0,0010 \text{ s}^{-1}$	-
m_t	$-2,628 \pm 0,057 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-	$-2,698 \pm 0,026 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-
m_d	$1,082 \pm 0,020 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-	$1,065 \pm 0,009 \text{ s}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	-
$\Delta G(0)^b$	$-21,35 \pm 0,45 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-23,68 \pm 1,64 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-21,96 \pm 0,20 \text{ kJ mol}^{-1}$	$-23,72 \pm 3,49 \text{ kJ mol}^{-1}$
m	$9,20 \pm 0,19 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$10,71 \pm 0,74 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$9,33 \pm 0,09 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$	$10,67 \pm 1,57 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ mol (GdnHCl)}^{-1}$
$C_{50\%}$	$2,32 \pm 0,10 \text{ M (GdnHCl)}$	$2,21 \pm 0,31 \text{ M (GdnHCl)}$	$2,35 \pm 0,04 \text{ M (GdnHCl)}$	$2,22 \pm 0,65 \text{ M (GdnHCl)}$

^b La valeur 0 entre parenthèses indique qu'il s'agit d'un paramètre dont la valeur a été extrapolée à l'origine, c'est à dire en absence de dénaturant.

Il ressort clairement de ces résultats que l'insertion du *trpzip2* à l'extrémité C-terminale ralentit légèrement la vitesse de repliement de la protéine, mais la vitesse de dénaturation s'en trouve également réduite du même facteur, ce qui produit une stabilité pratiquement inchangée. Tel qu'observé dans les figures 8 et 9 et le tableau 3 respectivement, les courbes de Chevron de yUbiF45W et de yUbiF45W-D1 sont très semblables, leurs courbes d'équilibre totalement superposables et leurs paramètres thermodynamiques identiques. De ceci il est possible de tirer deux conclusions : 1) l'insertion du peptide *trpzip2* à l'extrémité C-terminale n'affecte que légèrement les vitesses de repliement et de dénaturation de la protéine, n'affecte ni sa stabilité, ni ses valeurs m , m_r et m_d , et ne perturbe pas son mécanisme de repliement ; 2) la transition observée par le photomultiplicateur à fluorescence du *stopped-flow* témoigne bien uniquement d'une transition de l'ubiquitine elle-même, détectée par le tryptophane 45, et non des phénomènes liés au repliement du *trpzip2* en tant qu'entité distincte.

Il était donc légitime de s'attendre à ce que pour le mutant yUbi-D1, lequel ne comporte pas de tryptophane 45, il soit impossible d'observer une quelconque transition entre les formes dénaturée et native. Contrairement à ces attentes, une variation d'intensité de fluorescence a été observée pour les expériences de repliement et de dénaturation, mais elle s'avère très faible, complexe et difficile à modéliser selon l'équation générale (1). Les très faibles amplitudes des relaxations observées, le bruit très important qui découle de la faiblesse du signal, la difficulté conséquente à déterminer efficacement le nombre de phases (n) observées (à la fois pour les expériences de dénaturation et de repliement) ainsi que les amplitudes à signes opposées entre certaines phases empêchent le tracé d'une courbe de Chevron. Par contre, les intensités de fluorescence au temps infini (à l'équilibre) peuvent néanmoins être extraites des traces. Ces données brutes sont illustrées dans la figure 9 ci-dessous, et il n'a pas été possible de les modéliser selon les équations (6), (7), (9) et (10) en courbe d'équilibre à deux états.

Figure 9 – Intensités de fluorescence extrapolées au temps infini des traces cinétiques de dénaturation de γ Ubi-D1 en fonction de la concentration de GdnHCl, à 298 K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0.



Quelle est donc l'origine de la variation de signal observée, aussi faible soit-elle ? Deux sources de fluorescences sont possibles : la tyrosine 59, et les quatre tryptophanes du *trpzip2*.

Des expériences réalisées antérieurement sur l'ubiquitine de mammifères en utilisant la fluorescence de la tyrosine 59 ont effectivement révélé une faible transition entre les formes native et dénaturée de la protéine [79]. Par contre, dans la structure native, la tyrosine 59 est située à moitié exposée au solvant ; elle se trouve donc à être une piètre sonde fluorescente, qui ne peut témoigner efficacement de la formation du cœur hydrophobe de la protéine, contrairement au tryptophane 45 qui, à défaut d'être situé complètement dans le cœur hydrophobe de la protéine, possède néanmoins une chaîne latérale qui y pointe directement. De plus, l'intensité de fluorescence de la tyrosine 59 chez l'ubiquitine se révèle très sensible au pH entre 3 et 5, ce qui pourrait signifier que les imprécisions observées dans les traces de fluorescence soient dues à un contrôle insuffisant du pH des échantillons protéiques et des solutions de GdnHCl, malgré les précautions qui ont été prises en ce sens.

Par ailleurs, le maximum d'émission pour la tyrosine est 303 nm ; les expériences de *stopped-flow* ayant toutes été réalisées en utilisant un filtre qui coupe les longueurs d'onde inférieures à 320 nm, la majorité du signal de fluorescence émis par la tyrosine 59 se trouve donc éliminée par le filtre. Il est donc fort logique et probable que la variation de signal observée provienne de la tyrosine 59, mais que celui-ci soit trop faible et imprécis pour obtenir des traces claires. Une telle variation de fluorescence impliquant la tyrosine 59 devrait logiquement être observable également chez yUbiF45W et yUbiF45W-D1, mais le signal relié à celle-ci est probablement noyé par celui beaucoup plus intense émanant du tryptophane 45.

Par ailleurs, Briggs et Roder ont publié en 1992 que la formation de la boucle périphérique contenant la tyrosine 59 survenait après la phase majeure et coopérative de repliement de la structure [78]. Ceci pourrait également expliquer pourquoi les données de la figure 9 sont difficiles à modéliser; les événements relatifs à la

variation d'insensibilité de fluorescence de la tyrosine 59 pourraient très bien ne pas être indicatifs d'une transition de la structure globulaire de la protéine, la formation de la boucle et du reste de la structure n'étant pas simultanés.

3.6 Effet de l'insertion du peptide *trpzip2* au sommet du premier *beta-hairpin* de l'ubiquitine : caractérisation des mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1

Les mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 comportent le peptide *trpzip2* inséré au sommet du premier *β-hairpin*. Ceux-ci ont été soumis aux mêmes expériences que pour yUbiF45W, yUbiF45W-D1 et yUbi-D1 et les résultats sont illustrés dans les figures 10 (équilibre), 11 (cinétique) ainsi que dans le tableau 5.

Par contre, bien que les traces de fluorescence cinétique aient dans tous les cas pu être modélisées selon l'équation générale (1), les données obtenues sont nettement plus imprécises que celles obtenues pour yUbiF45W et pour yUbiF45W-D1, surtout dans les premières millisecondes des réactions. Des signaux erratiques et irréguliers, voire carrément aléatoires y sont alors observés, ce qui amène à penser qu'il s'agit de défaillances techniques du mécanisme de l'appareil. Il en résulte une grande difficulté à modéliser la phase très rapide du repliement pour les basses concentrations de GdnHCl, car les réactions observées s'approchent de la limite de détection de l'appareil.

Il est d'ailleurs possible d'observer une déviation de la linéarité parfaite de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de repliement et la concentration de GdnHCl pour des concentrations inférieures à 1M (*rollover*) sur la courbe de Chevron de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 (figure 11). Ces points, bien qu'illustrés dans la figure 11, n'ont d'ailleurs pas été considérés pour la modélisation selon l'équation (2) pour le tracé de la courbe de Chevron. Les travaux de Krantz et Sosnick ont démontré que chez l'ubiquitine de mammifère F45W, la déviation de la linéarité de

la courbe de Chevron, de même que la perte d'amplitude du signal à faible concentration de dénaturant, phénomènes d'abord observés par Khorasanizadeh et coll. [75], étaient en fait imputables au temps mort trop long de leur appareil de *stopped-flow*, ce qui empêchait de distinguer les phases très rapides du repliement [76]. Or, les imprécisions ici observées ont justement empêché la modélisation des premières millisecondes de la réaction, ce qui revient donc à considérablement augmenter le temps mort, abaisser par conséquent la limite de détection de l'appareil et ainsi suggérer probablement à tort la présence d'un intermédiaire de repliement, car les phases rapides à amplitude importante sont alors perdues dans le temps mort. Par contre, il est presque certain que si les traces obtenues avaient été plus précises, ou alternativement si un appareil comportant un temps mort plus petit avait été utilisé pour ces expériences, il aurait été possible de décomposer la phase très rapide du repliement en deux phases (ou plus), l'une plus lente avec plus faible amplitude, et l'autre rapide qui aurait parfaitement épousé la relation linéaire entre k_r et la concentration de GdnHCl prévue par l'équation (2).

Il est par ailleurs surprenant de constater que même sans tryptophane en position 45 chez le mutant yUbi-A1, suivre efficacement et précisément le repliement est possible en utilisant la fluorescence des tryptophanes du *trpzip2*, et ce malgré leur position à l'extérieur de la structure. Ceci est d'autant plus surprenant que chez le mutant yUbi-D1, ces tryptophanes extérieurs sont incapable de détecter la transition. Il est possible qu'un phénomène de FRET entre les tryptophanes et la phénylalanine 4 située à proximité soit à la source de cette sensibilité des tryptophanes. Les états natifs et dénaturés du mutant yUbiF45W-A1 possèdent bien entendu des niveaux de fluorescence basaux plus élevés que ceux de yUbi-A1 en raison du tryptophane additionnel; toutefois, si ce n'est de cette différence, les traces de fluorescence pour yUbiF45W-A1 sont très semblables à celles de yUbi-A1, et ce malgré la présence d'une seconde sonde fluorescente située à un endroit différent de la structure. Ce tryptophane additionnel aurait pu fortement complexifier l'analyse ; or il n'en fut rien. Si deux phénomènes distincts ont possiblement pu être suivi par l'utilisation conjointe des deux sondes situées à deux endroits différents, ces phénomènes sont

vraisemblablement simultanés, ce qui affirme la légitimité d'utiliser un modèle cinétique en deux états, et indique que le repliement du *trpzip2* se fait de façon concertée avec le reste de la protéine.

Tel qu'illustré dans les figures 10 et 11 ainsi que dans le tableau 5, l'insertion du peptide *trpzip2* en position A entraîne une spectaculaire augmentation d'un facteur de 11 de la constante de vitesse de repliement de l'ubiquitine en absence de dénaturant ($k_f(0)$) ainsi qu'une nette augmentation d'environ 15 à 25% de sa stabilité ($\Delta G(0)$) par rapport à yUbiF45W sans *trpzip2*.

Figure 10 – Courbe d'équilibre de yUbi-A1 (●, trait plein) et yUbiF45W-A1 (○, petits pointillés) à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, tirée des intensités de fluorescence extrapolées à l'infini des traces de relaxation cinétique de dénaturation. Les données brutes ont été converties en fractions de la population de protéines qui est repliée tel que décrit dans la sous-section 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Les traces représentent la relation modélisée entre la fraction de chaque protéine repliée et la concentration de GdnHCl selon un système en deux états. La trace à gros pointillés indique à titre comparatif la relation obtenue pour yUbiF45W tirée de la figure 2.

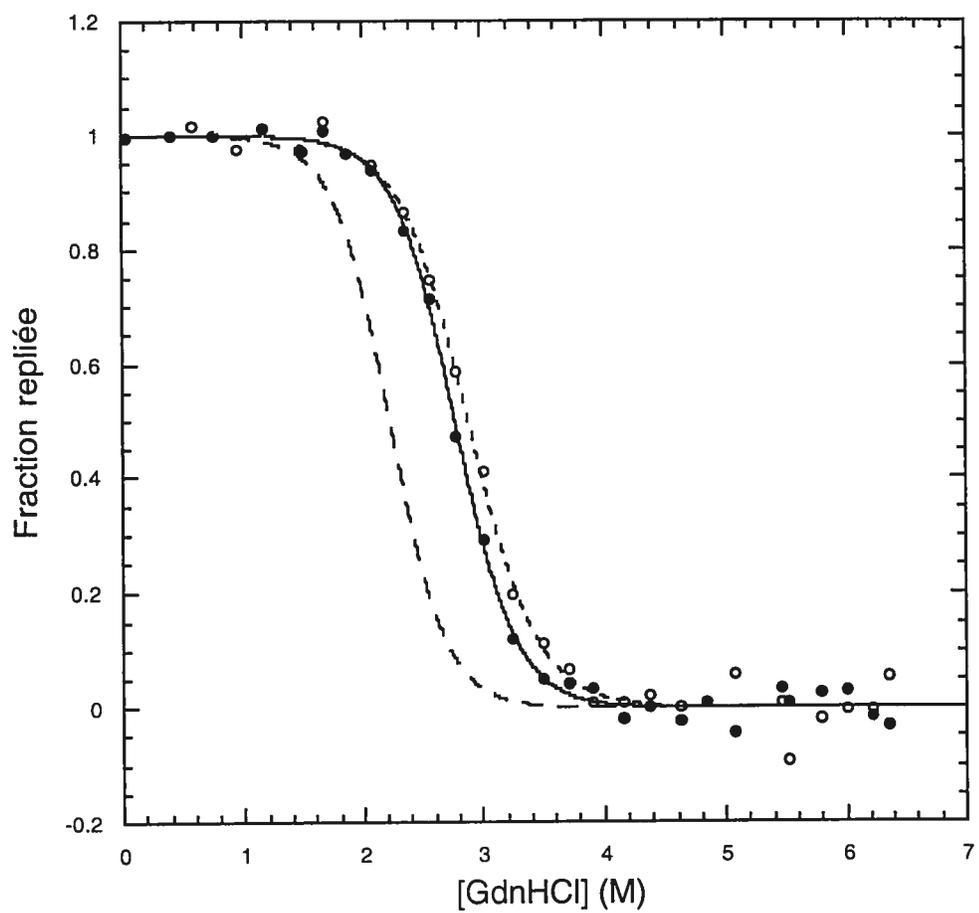


Figure 11 – Courbe de Chevron de yUbi-A1 (symboles pleins, trait plein) et yUbiF45W-A1 (symboles vides, petits pointillés) à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les expériences de repliement ont généré des traces de relaxation cinétique comportant plusieurs phases; trois d'entre elles, possédant de faibles amplitudes dont le total représente moins de 40% de l'amplitude totale de la relaxation, n'ont pas été indiquées dans la figure par souci de clarté. Les constantes de vitesse de la phase principale de repliement (cercles) et de dénaturation (carrés) ont été modélisées en fonction de la concentration de GdnHCl selon un système en deux états, tel que décrit dans la sous-section 5.9.2 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Il est à noter que les points correspondant à une concentration de GdnHCl inférieure à 1M n'ont pas été modélisés car ils représentent une déviation de la linéarité. Le trait à gros pointillé indique à titre comparatif la relation obtenue avec yUbiF45W ne comportant pas de *trpzip2* tirée de la figure 3.

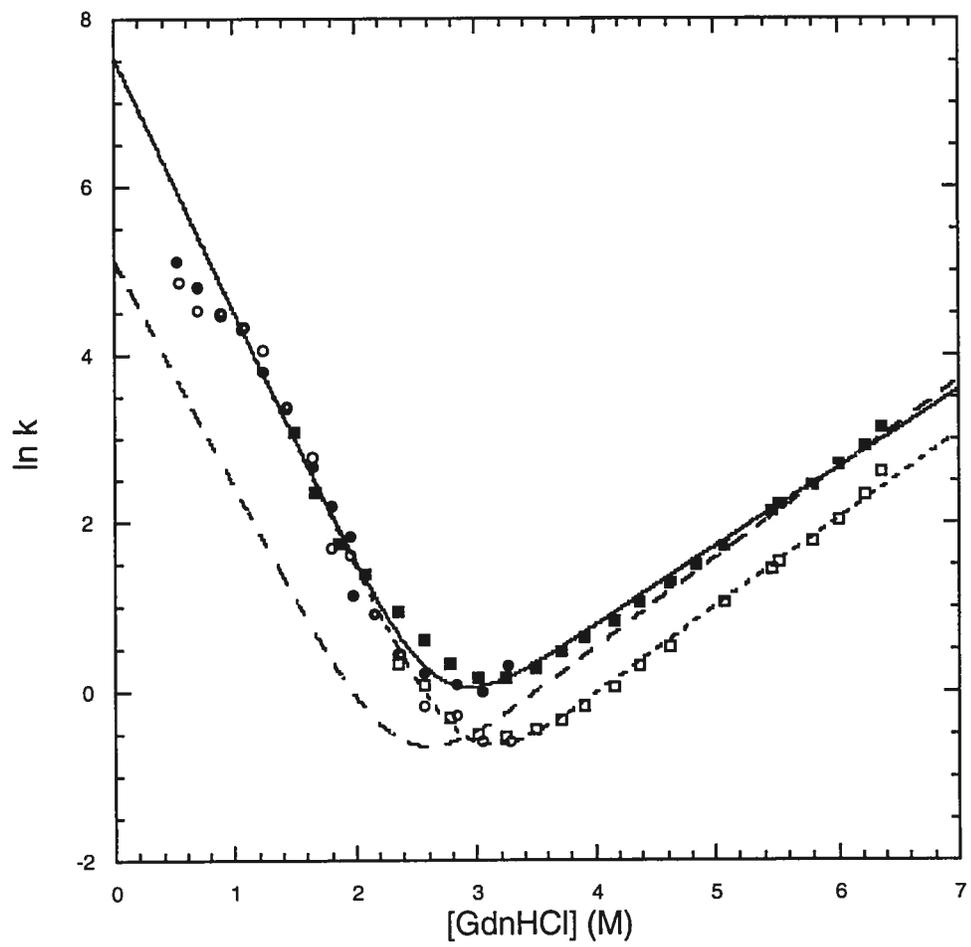


Tableau 5 - Résumé des propriétés thermodynamiques et cinétiques de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 à 298K dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0. Les paramètres pour yUbiF45W ont été indiqués à titre comparatif et ont été tirés du tableau 2. Les paramètres de yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 ont été dérivés des figures 10 (cinétique) et 11 (équilibre) tel que décrit dans les sous-sections 5.9.2 et 5.9.3 du chapitre 5 - Matériels et méthodes. Le paramètre $k_r(0)$ représente la constante de vitesse de repliement extrapolée en absence de dénaturant ; $k_d(0)$ représente la constante de vitesse de dépliement extrapolée en absence de dénaturant ; m_r représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de repliement et la concentration de dénaturant ; m_d représente la pente de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de dépliement et la concentration de dénaturant ; $\Delta G(0)$ représente l'énergie libre que la protéine gagne à se replier en absence de dénaturant ; m représente la pente de la relation entre l'énergie libre que gagne la protéine à se replier et la concentration de dénaturant et finalement $C_{50\%}$ représente la concentration de dénaturant nécessaire pour dénaturer la moitié de la population de protéines.

yUbi-A1,		yUbi-A1,		yUbiF45W-A1,		yUbiF45W-A1,	
données cinétiques	données à l'équilibre	données cinétiques	données à l'équilibre	données cinétiques	données à l'équilibre	données cinétiques	données à l'équilibre
k_t (0) ^b	1886 ± 384 s ⁻¹	-	-	1879,9 ± 287,8 s ⁻¹	-	-	-
k_d (0) ^b	0,0509 ± 0,0086 s ⁻¹	-	-	0,0152 ± 0,003 s ⁻¹	-	-	-
m_r	-3,028 ± 0,057 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-	-3,030 ± 0,082 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-	-
m_d	0,939 ± 0,035 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-	1,039 ± 0,038 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-	-
$\Delta G(0)^b$	-25,89 ± 0,97 kJ mol ⁻¹	-27,45 ± 1,20 kJ mol ⁻¹	-	-28,91 ± 0,88 kJ mol ⁻¹	-25,20 ± 1,51 kJ mol ⁻¹	-	-
m	9,83 ± 0,23 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	9,90 ± 0,43 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	10,08 ± 0,30 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	8,74 ± 0,52 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-
$C_{50\%}$	2,63 ± 0,16 M (GdnHCl)	2,77 ± 0,24 M (GdnHCl)	-	2,87 ± 0,17 M (GdnHCl)	2,88 ± 0,34 M (GdnHCl)	-	-

yUbiF45W,		yUbiF45W,	
données cinétiques	données à l'équilibre	données cinétiques	données à l'équilibre
k_t (0) ^b	168,6 ± 6,4 s ⁻¹	-	-
k_d (0) ^b	0,0238 ± 0,0010 s ⁻¹	-	-
m_r	-2,698 ± 0,026 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-
m_d	1,065 ± 0,009 s ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-	-
$\Delta G(0)^b$	-21,96 ± 0,20 kJ mol ⁻¹	-23,72 ± 3,49 kJ mol ⁻¹	-
m	9,33 ± 0,09 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	10,67 ± 1,57 kJ mol ⁻¹ mol (GdnHCl) ⁻¹	-
$C_{50\%}$	2,35 ± 0,04 M (GdnHCl)	2,22 ± 0,65 M (GdnHCl)	-

^b La valeur 0 entre parenthèses indique qu'il s'agit d'un paramètre dont la valeur a été extrapolée à l'origine, c'est à dire en absence de dénaturant.

D'autre part, ces résultats révèlent une stabilité et une $C_{50\%}$, qui, bien que très semblables, sont légèrement supérieurs chez yUbiF45W-A1 comparativement à yUbi-A1, inversement à ce qui avait été observé pour mUbiF45W vs mUbi [73]. Il est probable que de légères variations de structure fine induites par l'insertion du *trpzip2* puissent faire varier l'effet des mutations chez les différents ubiquitines. Il apparaît néanmoins que les paramètres thermodynamiques ($\Delta G(0)$ et m) ne sont que très légèrement affectés par la mutation F45→W chez yUbi-A1. Il est toutefois surprenant de constater que le $\Delta G(0)$ et le m tiré des traces d'équilibre de yUbiF45W-A1 sont inférieurs d'environ 14% aux mêmes paramètres issus des traces cinétiques. Il est possible que la difficulté à clairement définir les niveaux de fluorescence basaux des états natifs et dénaturés de yUbiF45W-A1 chez les données brutes de fluorescence à l'équilibre soit à l'origine de cette imprécision. Les données brutes de fluorescence extrapolées au temps infini sont par ailleurs disponibles en appendice IV.

Il est encore plus surprenant de constater que le comportement cinétique de yUbiF45W-A1 et celui de yUbi-A1 diffèrent significativement. La figure 10 et le tableau 5 révèlent des constantes de vitesse de repliement en absence de dénaturant ($k_r(0)$), ainsi que des pentes de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de repliement et de la concentration de dénaturant (m_r) pratiquement identiques entre les deux mutants, ce qui indique que la mutation F45→W n'affecte pas le repliement de yUbi-A1. Bien que les pentes de la relation entre le logarithme de la constante de vitesse de dénaturation et de la concentration de dénaturant (m_d) soient également très similaires, la constante de vitesse de dénaturation en absence de dénaturant ($k_d(0)$) de yUbi-A1 est presque trois fois supérieure à celle de yUbiF45W-A1. Cette observation explique pourquoi yUbiF45W-A1 apparaît plus stable que yUbi-A1 sur la courbe d'équilibre.

Khorasanizadeh et coll. ont caractérisé l'effet à l'équilibre de la mutation F45→W chez l'ubiquitine de mammifère [73] mais aucune étude ne semble avoir été publiée afin d'évaluer l'impact cinétique de la mutation, probablement en raison de la

difficulté d'étudier par fluorescence le repliement de l'ubiquitine en absence de tryptophane interne. La présence d'une sonde située à un autre endroit de la structure permet ici de réaliser cette comparaison, mais il est douteux que le résultat soit transposable chez yUbi et mUbi en raison de la perturbation probable qu'occasionne l'insertion du *trpzip2* chez la structure fine et chez les paramètres thermodynamiques de la protéine.

4 – Discussion

4.1 Succès de la stratégie de mutagénèse

Tel qu'illustré dans le tableau 2, la stratégie de mutagénèse employée nécessiterait certainement une certaine optimisation, car la construction de nombreux clones n'a pu être complétée. Ceci amène donc de sérieuses difficultés quant à savoir si les schémas d'insertion planifiés du *trpzip2* à chaque position, du plus rigide (1) au moins rigide (3) étaient appropriés et justifiés. Certes, l'insertion du peptide selon le schéma le plus rigide en position A (yUbi-A1) a produit des résultats significatifs (figures 10, 11 et tableau 5). Mais pour vérifier la justesse de l'élaboration des schémas, il aurait été intéressant de comparer les résultats de yUbi-A1 avec ceux des mutants yUbi-A2 et yUbi-A3, si ceux-ci avaient été caractérisés. Ces mutants comportent respectivement une lysine ou une glycine supplémentaire à la jonction du *trpzip2* avec le second brin β afin d'introduire un plus grand degré de liberté dans la chaîne polypeptidique. Quel aurait été l'effet de cette perte de rigidité dans l'insertion ? Une déstabilisation par rapport à yUbi-A1 en raison de la plus grande flexibilité de la chaîne polypeptidique dans le β -*hairpin*, ou à l'inverse une stabilisation en raison de perturbations moindres infligées à la structure du reste de la protéine en conséquence de ce gain de flexibilité ?

4.2 Les boucles riches en glycines : un contrôle négatif inapproprié

L'insertion de la boucle riche en glycine à la position A (mutant yUbiF45W-A4) s'est soldée par un effet beaucoup plus dramatique qu'escompté : la protéine est manifestement inexprimable. Il était certes attendu que cette insertion déstabilise fortement la protéine, car 1) notre hypothèse de départ, corroborée par de récents résultats [63], veut que les tours β soient des sites cruciaux pour l'initiation du repliement, et 2) il a préalablement été proposé que la formation du premier β -*hairpin* de l'ubiquitine soit une étape cruciale du mécanisme de repliement [81].

La déstabilisation observée ici dépasse par contre toutes les attentes : La bactérie semble incapable de produire la protéine, et ce malgré une séquence codante et un promoteur intact. En soi, ceci représente un indice supplémentaire, outre l'effet de l'insertion du *trpzip2* à cet endroit (mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1), de l'importance de conserver l'intégrité du premier β -*hairpin* pour assurer le repliement de l'ubiquitine.

Par contre, il serait néanmoins souhaitable de pouvoir physiquement observer et caractériser l'effet que peut avoir une simple déstabilisation, plus légère, de ce tour β sur le repliement et il est certain que, pour y parvenir, des mutations beaucoup moins drastiques devront être envisagées. Il serait possible de simplement muter deux (ou davantage) résidus du tour en glycines afin d'introduire un plus grand degré de liberté et d'augmenter l'entropie conformationnelle de la chaîne polypeptidique. Il serait également possible, à l'inverse, d'introduire des résidus qui possèdent de grandes restrictions conformationnelles et qui sont ainsi défavorisés dans les tours, telle la valine [20, 82-83].

Par ailleurs, l'insertion de la boucle riche en glycines en position C (yUbiF45W-C4) entraîne un effet beaucoup moins dramatique qu'en position A, bien que le produit lui-même s'avère difficile à purifier, tout comme les mutants yUbi-C1 et yUbiF45W-C1. Il est donc légitime de déduire que la formation de cette région de la protéine est beaucoup moins cruciale pour son repliement que ne peut l'être le premier β -*hairpin*.

4.3 Effet des résidus histidines

Le protocole de purification utilisé ici (décrit dans la section 5.3) requiert la présence d'une queue de six histidines à l'une des extrémités de la protéine pour une purification aisée en une seule étape sur une résine contenant de l'acide nitriloacétique (NTA) et des ions Ni^{2+} qui chélatent les histidines [84]. Il n'est pas étonnant que la présence de ces six histidines perturbe les propriétés physiques de la

protéine dans laquelle ils sont insérés, mais de constater une augmentation de la vitesse de dépliement couplée à une baisse simultanée de vitesse de dénaturation était plutôt inattendu, et il en résulte une considérable déstabilisation de la protéine à l'équilibre.

Il convient toutefois d'observer que, si le $\Delta G(0)$ et le $C_{50\%}$ sont tous deux affectés par la présence du *his-tag*, la valeur m ne change pas. Cette valeur représente la pente de la relation linéaire entre l'énergie libre que la protéine gagne à se replier et la concentration de dénaturant, et est significativement corrélée avec la surface que la protéine expose au solvant suite à la dénaturation [85]. De plus, on observe dans la courbe de Chevron (figure 11) des droites de repliement et de dénaturation de $yUbiF45W$ et $yUbiF45W\text{-his}^-$ qui sont pratiquement parallèles et possèdent des pentes m_d et m_r très semblables. Il en résulte que le ratio (m_r / m_d), une valeur qui correspond au degré d'ouverture de l'état de transition (symbolisée par β_T) [25], ne varie pratiquement pas entre $yUbiF45W$ et $yUbiF45W\text{-his}^-$. Il apparaît donc que le mécanisme interne de repliement de la protéine ne soit pas affecté par la présence du *his-tag*.

La cause de cette déstabilisation est donc extérieure à la protéine elle-même. Il faut d'ailleurs noter que les expériences ont toutes été réalisées dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0, car c'est dans ces conditions que plusieurs caractérisations antérieures du mécanisme de repliement de l'ubiquitine ont été réalisées [73-77]. Or, le pKa de l'azote 3 du cycle imidazole de l'histidine est 6,04 [86], ce qui signifie que dans les conditions expérimentales ici utilisées, les six résidus histidines seront chargés positivement. Il en résulte une très haute concentration effective de charges positives dans le solvant près de l'extrémité N-terminale de la protéine, ce qui entraîne alors une perturbation locale des propriétés du solvant qui déstabiliserait la formation de cette région de la protéine. Outre cet effet sur le solvant, les charges positives des histidines et de la lysine 63, située à proximité de l'extrémité N-terminale dans la structure native, subiront mutuellement une répulsion ; or la portion hydrophobe de cette lysine fait contact avec la chaîne hydrophobe de la

méthionine 1, et il est probable qu'une répulsion de la lysine 63 perturbe le *packing* serré dans cette région de la protéine, ce qui exposerait potentiellement des groupes hydrophobes au solvant et contribuerait également à diminuer la stabilité.

Les figures 10 et 11, le tableau 5, de même que des résultats publiés antérieurement [81], ont révélé l'importance de la région N-terminale de l'ubiquitine pour le maintien d'une stabilité optimale. Il serait donc légitime de tenter de placer les histidines à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine, laquelle comporte deux glycines qui sont situées à l'extérieur de la structure. Ceci pourrait potentiellement réduire la déstabilisation en plaçant les charges et la perturbation résultante du solvant plus loin du premier β -hairpin.

Malgré le fait que la présence de la queue d'histidines à l'extrémité N-terminale de la protéine engendre une déstabilisation de la structure native, l'intégrité du mécanisme de repliement propre à l'ubiquitine de levure ne semble néanmoins pas compromis. Puisque la présence des charges n'affecte pas le mécanisme de repliement, la protéine s'avère donc un bon modèle de départ pour l'insertion de *trpzip2*. Il aurait certes été très laborieux de purifier les mutants par un protocole multi-étapes classique, car si un tel protocole est bien défini pour l'ubiquitine elle-même [77], il en est tout autrement pour des mutants dont les propriétés n'ont pas encore été déterminées. De plus, ce protocole requiert, chez la protéine à purifier, une très haute stabilité, alors qu'il était attendu que plusieurs mutants possèdent une stabilité considérablement moindre que l'ubiquitine type sauvage en conséquence de l'insertion. Ceci constituait un autre incitatif à utiliser la purification par résine Ni-NTA-agarose et à donc à conserver ces résidus histidines.

Si une telle mesure s'était avérée absolument nécessaire, le clivage de la queue d'histidines par des protéases telles la thrombine ou le facteur Xa (sur colonne) aurait pu être envisagé. Cette mesure aurait toutefois nécessité une modification au vecteur d'expression afin d'y inclure les séquences de clivage consensus entre les histidines et la protéine (LVPR↓GS pour la thrombine, IEGR↓ pour le facteur Xa). De plus,

une étape additionnelle de purification aurait été nécessaire pour séparer la protéase de la protéine d'intérêt à la suite du clivage et pour changer le solvant par dialyse (ces protéases ne fonctionnent pas dans l'acétate de sodium à pH 5 et leur site actif est dénaturé en présence de 0,5M GdnHCl). Le clivage par un agent chimique oxydant tel le bromure de cyanogène (*cyanogen bromide* - CNBr) [113] ne nécessiterait qu'une modification très légère du vecteur afin d'y insérer une méthionine entre les histidines et l'ubiquitine, mais il semble contre-indiqué ici. En effet, ce réactif a également tendance à s'attaquer aux groupements indole tryptophanes et il cliverait probablement la méthionine 1 de l'ubiquitine. Enfin, un autre type de *tag* moléculaire qui aurait pu faciliter la purification, tel FLAG [114], aurait également pu accomplir un rôle similaire aux histidines sans pour autant introduire des effets de charge nuisibles dans le solvant, rendant ainsi le clivage superflu.

Par ailleurs, il faut remarquer que la diminution de la constante de vitesse de repliement consécutive à la présence des histidines n'apporte pas que des désavantages. L'accélération du repliement observé pour les mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 s'approche dangereusement de la limite de détection de notre appareil, et en absence de *his-tag*, ces vitesses de repliement auraient été encore plus rapides, donc perdues dans le temps mort. Pour cette raison, outre la simplicité du protocole de purification, la présence de ces résidus histidines s'avère donc souhaitable.

4.4 Comportement du peptide *trpzip2*

Les difficultés à étudier le repliement et la stabilité du peptide *trpzip2* en présence de GdnHCl suscitent beaucoup de questions quant à savoir si l'augmentation de la fluorescence est due à une dénaturation progressive ou simplement à un effet de solvant. Cochran et collaborateurs ont été aux prises avec un obstacle semblable au cours de leurs études de dénaturation thermique : une transition d'apparence très

large, mais il leur a néanmoins été possible de définir un niveau d'activité optique basal pour l'état dénaturé qui permettrait la modélisation selon l'équation d'une courbe d'équilibre semblable à l'équation (6) [80]. En effet, en utilisant deux peptides représentant chacun la moitié du *trpzip2* (SWTWEN et GKWTWK), lesquels sont incapables de se replier, il a été possible de tracer un niveau basal d'activité optique en fonction de la température pour le peptide dénaturé. Il serait sans doute possible de définir de manière similaire un niveau basal de fluorescence en fonction de la concentration de GdnHCl. Ceci permettrait de résoudre la nature de l'augmentation de fluorescence une fois pour toutes et, s'il était établi qu'il s'agit bien du signe d'une transition entre formes native et dénaturée, de modéliser la fluorescence selon les équations (6), (7) et (10) et de tracer une courbe d'équilibre du peptide.

D'autre part, les données de la figure 4 laissent entendre que le niveau de fluorescence basal de l'état dénaturé du peptide pourrait ne pouvoir être décrit par une simple relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la concentration de GdnHCl [87], contrairement à ce que supposent les équations décrites dans le chapitre 5 - Matériels et Méthodes. Il en résulterait une imprécision pour la modélisation des niveaux basaux des états dénaturés. Les données de fluorescence brutes extrapolées à l'infini des mutants comportant un *trpzip2*, modélisées selon les équations (6) et (7) (disponibles en appendice IV) démontrent la difficulté de modéliser précisément les niveaux basaux de ces protéines selon une relation linéaire de type $y = c + dx$. Un niveau de précision supplémentaire pourrait donc être gagné au niveau de la modélisation des paramètres thermodynamiques à l'équilibre s'il était possible de définir correctement la nature du niveau basal de fluorescence du *trpzip2* (inséré dans ces protéines) en fonction de la concentration de GdnHCl.

Considérant toutes ces difficultés liées à la fluorescence des tryptophanes, il convient de réfléchir quant à savoir si cette méthode était le meilleur choix de sonde pour suivre le repliement du *trpzip2* et, par conséquent, celui des mutants. Le dichroïsme circulaire (cinétique et à l'équilibre), tel qu'utilisé par Cochran et coll.

pour l'analyse des peptides [80] pourrait être une alternative intéressante, bien que cette technique soit typiquement moins sensible que la fluorescence et nécessite une concentration de protéine plus élevée, qui pourrait alors être sujette à des phénomènes d'agrégation. Des analyses par résonance magnétique nucléaire dynamique [88-90] pourraient également permettre le suivi du repliement à l'équilibre, et ce à des vitesses beaucoup plus rapides que celles détectables par des expériences cinétiques classiques en utilisant un appareil de *stopped-flow*. Il est même probable que cette technique permette le suivi des caractéristiques de repliement du *trpzip2* seul. Par contre, encore davantage que pour le dichroïsme circulaire, la résonance magnétique nucléaire est une technique peu sensible qui demanderait une très haute concentration de protéine et/ou de peptide. De plus, il serait nécessaire d'utiliser du solvant et du GdnHCl deutérés (^2H). Ces facteurs, en plus de la complexité d'analyse des signaux de résonance magnétique nucléaire, rendent la technique moins séduisante qu'elle ne le paraît au premier abord.

4.5 Légitimité d'utiliser un modèle en deux états

Il a été préalablement établi que le repliement de l'ubiquitine de levure F45W suivi par fluorescence du tryptophane peut être décrit selon un modèle en deux états [77], tout comme celle provenant du gène de mammifère [76]. L'observation de plusieurs phases exponentielles au cours du repliement ne doit pas nécessairement être interprétée comme étant un signe de la présence d'intermédiaires. En effet, au moins une de ces phases pourrait bien correspondre à un phénomène d'isomérisation de prolines (l'ubiquitine de levure en comporte 2, P37 et P38), par lequel une fraction de la population de protéines est incapable de se replier en raison d'un ou plusieurs liens peptidiques en conformation non-native. Bien que les liens peptidiques situés en amont des résidus prolines soient davantage susceptibles à contenir une haute population de conformères *cis*, les autres types de résidus peuvent également causer l'apparition de phases exponentielles additionnelles au cours du repliement [91-92], qui mènent alors à l'observation de phases exponentielles multiples. Ces phases

exponentielles possèdent une amplitude relativement faible (typiquement 5 à 10% de l'amplitude totale) comparativement à la phase principale, qui correspond à la transition en deux états.

Il faut également se rappeler que l'état dénaturé n'est pas un ensemble homogène totalement dépourvu de structure, tel qu'originellement proposé, mais plutôt un ou des ensembles de conformères semblables mais distincts en équilibre [43]. Cette hétérogénéité présente dans l'état dénaturé signifie que certaines populations de molécules emprunteront des voies de repliement distinctes vers le fond de l'entonnoir d'énergie libre (*folding free energy funnel*), ce fond (minimum d'énergie) correspondant à la forme native de la protéine [93]. Les techniques de suivi du repliement ici utilisées ne permettent pas d'observer le comportement individuel des molécules, mais uniquement de décrire le comportement global d'un ensemble de molécules. Si l'état dénaturé ne comporte qu'un seul ensemble de molécules groupées en conformères semblables en équilibre rapide sans haute barrière d'énergie entre eux, le comportement global au cours du repliement est alors relativement uniforme et une seule phase exponentielle peut alors être observée. Par contre, des molécules groupées en différents ensembles séparés par une barrière d'énergie libre relativement élevée (comme par exemple l'énergie d'activation nécessaire pour permettre la rotation d'un lien peptidique [92]) mèneront à l'obtention de phases exponentielles distinctes pour chaque ensemble. Cette multitude de phases ne correspond donc pas forcément à un intermédiaire présent dans l'entonnoir d'énergie, mais plutôt à une multitude de points de départs possibles de la réaction de repliement, conséquence de l'hétérogénéité de l'état dénaturé. Inversement, les phénomènes de dénaturation sont tous initiés à partir d'un ensemble de molécules très homogène, l'état natif de la protéine, et une seule phase exponentielle est alors observée.

Par ailleurs, il se pourrait que certains événements mineurs du repliement dans des sous-régions spécifiques de la protéine surviennent après la transition principale, tel que décrit précédemment [78], des phénomènes qui génèreraient donc des

hétérogénéités dans le processus de repliement lui-même après l'atteinte de l'état de transition, sans toutefois indiquer la présence d'un intermédiaire à proprement parler, ni désavouer le modèle en deux états du repliement global de la structure.

Alors qu'en est-il pour les mutants yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 ? L'application d'un modèle en deux états correspond-il à la réalité ? L'insertion du *trpzip2* ne risquerait-elle pas de mener à l'apparition d'un intermédiaire ? De tels signes (perte d'amplitude et déviation de la linéarité de m_T à basse concentration de GdnHCl) ont été observés, mais attribués à la perte des phénomènes rapides dans le temps mort de l'appareil [76]. Il semblerait donc que la présence d'intermédiaires n'a pas été détectée en suivant le repliement par les deux sondes utilisées (tryptophanes 45 et/ou tryptophanes du *trpzip2*).

Toutefois, tel que publié récemment [94], des effets de population peuvent déguiser la présence des intermédiaires selon la localisation dans la structure de la sonde fluorescente. Il serait donc prudent de confirmer l'absence d'intermédiaires chez yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 par une technique de suivi alternative, par exemple par dichroïsme circulaire, ainsi que d'utiliser un appareil comportant un temps mort plus court.

Finalement, il convient de noter que l'absence d'accumulation détectable d'intermédiaires de repliement ne signifie pas que de telles espèces sont inexistantes. De plus, il a été démontré que certaines protéines qui avaient préalablement été caractérisées comme se repliant selon un modèle en deux états camouflent en fait un intermédiaire faiblement peuplé difficile à détecter par des méthodes d'analyse conventionnelles [95].

4.6 Accélération et stabilisation de l'ubiquitine découlant de l'insertion du peptide *trpzip2* en position A : Comparaison avec les domaines SH3-Bergerac

La stabilisation et l'augmentation de la vitesse de repliement constaté chez les mutants possédant un *trpzip2* inséré dans le premier tour β est similaire à ce qui avait été observé par Viguera et Serrano avec le peptide BH8 dans un tour β chez un domaine SH3 (Bergerac). L'insertion de BH8 chez SH3 provoque toutefois l'apparition d'un intermédiaire *off-pathway*, lequel comporte un contact non-natif, impliquant l'isoleucine p2 avec un résidu du domaine SH3. Il en résulte donc une trappe cinétique, laquelle peut-être éliminée en mutant le résidu en alanine, ou encore stabilisée par l'addition de sulfate de sodium. Ce phénomène est décrit comme étant une « frustration » par laquelle des contacts non-natifs présents dans l'espace conformationnel accessible au cours du repliement induisent des imperfections dans l'entonnoir d'énergie libre. Il est à noter que l'isoleucine p2 est située à la base du peptide, près de la jonction entre BH8 et SH3. Les autres résidus du peptide ne forment des contacts qu'entre eux [67].

Viguera et Serrano ont interprété les résultats obtenus avec Bergerac-SH3 comme étant une extension et une stabilisation du *nucleus* de repliement par l'insertion du peptide dans un tour dont la formation avait été préalablement jugée comme une étape cruciale au repliement en raison de leur valeurs ϕ élevées [96-97]. Il en résulte donc, selon les auteurs, que la stabilité du *nucleus* et de la protéine native sont reliées directement à la propension des résidus insérés à former une structure de type *β -hairpin*. Mais le peptide conserve-t-il, ne serait-ce que partiellement, sa structure dans l'état dénaturé ? Il est fort probable que ce soit effectivement le cas, à en juger par le comportement de BH19 en solution [98].

Les résultats ici obtenus avec yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 sont encore plus spectaculaires que ceux obtenus avec Bergerac-SH3. Devant ce comportement, force

est de déduire que le premier β -*hairpin* de l'ubiquitine est, tout comme le tour chez Bergerac-SH3, un site de nucléation formé très tôt dans le processus de repliement. Ceci en soi n'est pas étonnant, puisque la stabilité de cette sous-région de l'ubiquitine avait déjà été démontrée [81, 99]. L'augmentation de la vitesse de repliement et de la stabilité de la protéine est directement reliée à la stabilité de la formation du *trpzip2*. Ceci est corroboré par le caractère coopératif du repliement des β -*hairpin* tel que déterminé par des modèles statistiques et expérimentaux [37, 65-66]. Le peptide BH19, duquel a été dérivé le BH8 que Viguera et Serrano ont inséré dans le domaine SH3, a été construit à partir de tables de propensions [82, 98]. Il est indéniable que la propension de cette structure à se replier en β -*hairpin* soit élevée, mais la population de peptide repliée dans l'eau a été estimée par les auteurs à environ 30%, contrairement au *trpzip2* qui, beaucoup plus stable, est complètement replié dans l'eau [80].

En fait, la stabilité du peptide *trpzip2* est telle qu'il est fort probable que même dans des conditions hautement dénaturantes (6M GdnHCl), la population de *trpzip2* conserve une haute proportion de molécules repliées ou à la limite partiellement repliées, tel qu'ont été interprétés les résultats de fluorescence du peptide à l'équilibre dans l'eau (figure 4). Cette sous-région de la protéine est donc hautement peuplée en structures quasi-natives au moment de l'initiation du processus de repliement. Par conséquent, la formation du premier β -*hairpin* de l'ubiquitine se trouverait fortement accélérée comparativement à l'ubiquitine type sauvage. Les traces de fluorescence cinétique de γ UbiF45W-A1 indiquent que le repliement de l'ensemble du noyau hydrophobe de la protéine (dans lequel est enfoui le tryptophane 45) et la formation du β -*hairpin* sont des phénomènes quasi-simultanés. L'accélération de la formation de cette structure se traduit ainsi par une accélération globale du mécanisme de repliement de tout le reste de la protéine, et non pas seulement de la région N-terminale. Ces observations expérimentales concordent bien avec le modèle de nucléation-condensation, où le repliement est un processus non-hiérarchique. Le β -*hairpin* N-terminal constitue probablement chez l'ubiquitine une plate-forme, un échafaudage à partir duquel le reste de la protéine s'appuie pour

se replier, par un mécanisme de nucléation-condensation [30]. En accélérant ou en stabilisant cette étape limitante, on facilite l'atteinte de l'état de transition et accélère le repliement de l'ensemble de la protéine.

Par contre, il est embarrassant de constater que cette observation ne s'aligne pas avec le modèle hiérarchique du repliement proposé dans l'hypothèse de départ [41-42]. En effet, aucun brusque élan initial de repliement (*burst phase*) ni intermédiaire cinétique n'est observé en conséquence de cette stabilisation du premier β -*hairpin*. L'accélération du repliement n'est pas simplement constatée à un niveau local, mais dans la totalité de la structure, tel qu'il est possible d'en juger par ces données. Toutefois, il est également possible que les deux sondes utilisées, soit le tryptophane 45 et les tryptophanes du *trpzip2* ne soient pas en mesure de détecter ce *burst phase* ; l'utilisation d'une autre sonde fluorescente, par exemple une mutation de la phénylalanine 4 en tryptophane (F4→W), située dans le premier β -*hairpin*, juste avant le tour, pourrait permettre de confirmer ou d'infirmier définitivement si un *burst phase* est présent dans cette sous-région de la protéine.

Par ailleurs, l'absence de trappes cinétiques observés chez yUbi-A1 et yUbiF45W-A1 indique que, contrairement à BH8 inséré dans le domaine SH3, aucune frustration issue de contacts non-natifs ne semble avoir été créée au point d'avoir un impact détectable sur le comportement cinétique de repliement de la protéine. Le mécanisme de repliement ne semble pas avoir été perturbé par l'insertion du *trpzip2* à cet endroit, il ne s'en est trouvé qu'accélééré et stabilisé.

Il serait tentant de prévoir l'effet que pourrait avoir l'insertion du *trpzip2* dans d'autres tours β , des tours qui ne sont probablement pas des sites d'initiation du repliement et/ou de nucléation, par exemple en position B et C. Stabiliser la formation d'une structure qui est formée tardivement dans le processus de repliement risque fort de perturber le mécanisme de repliement, d'en changer le site d'initiation et la structure de l'état de transition. Ceci pourrait également mener à la formation d'intermédiaires de repliement *on-pathway*, ou encore de trappes cinétiques par un

phénomène de frustration. Par contre, il est peu probable que le repliement et la topologie de la structure native en soient perturbés, tel qu'il est possible d'en juger d'après les résultats frappants obtenus par le groupe de David Baker avec les protéines G et L [60-61].

4.7 Importance des interactions aromatiques

La surprenante stabilité du *trpzip2* provient des interactions entre résidus aromatiques (π -stacking energy) et de la capacité que procure l'empilement des tryptophanes à cacher une grande surface ainsi qu'à désolvater la chaîne principale polypeptidique [80]. Vu la considérable énergie associée aux interactions de résidus aromatiques chez les peptides et donc, vraisemblablement chez les protéines, il est légitime d'avancer que de telles interactions pourraient jouer un rôle crucial dans le repliement de certaines protéines, car elles semblent beaucoup plus résistantes à la dénaturation thermique et au GdnHCl que ne le sont les interactions hydrophobes classiques (aliphatiques). Il semblerait que plusieurs éléments de structure native résiduelle dans l'état dénaturé de certaines protéines impliquent un ou plusieurs résidus aromatiques, particulièrement les tryptophanes [100-105]. De plus, outre les *trpzip*s, les plus petites protéines connues, les cages de tryptophanes (*Trp-cage*, 20 résidus), contiennent une grande proportion de tryptophanes qui interagissent avec des prolines, ce qui leur confère une stabilité exceptionnelle pour leur taille [106]. Par contre, avant de généraliser cette particularité des résidus aromatiques, il faut également noter qu'il existe également des résultats qui, à l'inverse, ne démontrent aucune structure résiduelle impliquant un ou des résidus aromatiques [107].

Le tryptophane semble par ailleurs former des interactions aromatiques beaucoup plus fortes que la phénylalanine. Cette particularité permet d'ailleurs de remettre en question l'effet de la mutation F45→W chez l'ubiquitine. Si, tel que présenté par Khorasanizadeh et collaborateurs, l'effet sur la stabilité et la structure native de la protéine semble minime [73], qu'en est-il de l'impact de cette mutation sur l'état

dénaturé ? Cette mutation d'un résidu aromatique pour un autre affecte-t-elle le mécanisme de repliement ? Ceci est difficile à démontrer car le repliement de l'ubiquitine type sauvage sans tryptophane est difficile à suivre par fluorescence. Par contre, les similarités observées entre yUbiF45W-A1 et yUbi-A1 (figures 10 et 11 et tableau 5) nous permettent d'en conclure que le mécanisme de repliement semble inchangé par la mutation, alors il est probable que la mutation de la phénylalanine en tryptophane n'affecte pas significativement la structure résiduelle présente dans l'état dénaturé de yUbi-A1. Par contre, il est intéressant de constater que la protéine contenant un tryptophane 45 est dénaturée plus rapidement que celle contenant une phénylalanine, ce qui témoigne de l'impact du changement de l'interaction aromatique dans l'état natif de la protéine.

4.8 Conclusion

Les travaux ci-présentés ont été effectués afin de démontrer l'impact que peut avoir sur le repliement de l'ubiquitine l'introduction de contraintes conformationnelles dans l'état dénaturé, sous la forme d'une structure autostable indépendante en β -*hairpin* dans les tours β de la protéine. Ces insertions entraînent une spectaculaire stabilisation et accélération du repliement lorsque réalisées dans le premier β -*hairpin* (yUbi-A1 et yUbiF45W-A1), mais les insertions dans les autres tours β (positions B et C) n'ont pas été complétées avec succès. Ceci est dommage car s'il avait déjà été prédit que le premier β -*hairpin* de l'ubiquitine est une sous-région importante du repliement et conservant une haute proportion de structure native dans l'état dénaturé, il était attendu qu'il en soit tout autrement pour les positions B et C. L'insertion des peptides dans ces tours, lesquels ne font vraisemblablement pas partie du noyau de repliement (*nucleus*), serait donc susceptible de mener à des résultats beaucoup plus spectaculaires que ceux ici présentés pour le premier *hairpin* (A), là où une simple accélération du repliement et stabilisation du *nucleus* sont constatées, de façon similaire à ce qu'ont obtenu Viguera et Serrano chez Bergerac-SH3 [67]. Il conviendrait également, afin de pousser plus loin ces études et de confirmer les hypothèses qui ont été avancées, outre de compléter les études sur les autres mutants qui avaient été planifiés, d'analyser la structure de ces mutants par résonance magnétique nucléaire, et d'effectuer des expériences cinétiques et à l'équilibre avec suivi par dichroïsme circulaire plutôt que par fluorescence. Éventuellement, il serait également souhaitable d'utiliser une approche similaire pour introduire des contraintes conformationnelles chez d'autres protéines afin de valider les résultats qui ont été et seront obtenus chez l'ubiquitine.

5 - Matériels et méthodes

5.1 Provenance des gènes

La séquence originale du gène de l'ubiquitine de levure (yUbi) est un don du Dr. Nils Johnsson (Max-Delbruck-Laboratorium, Köln, Allemagne). La mutation F45→W et l'insertion de cette séquence entre les sites uniques NcoI et HindIII d'un vecteur d'expression *pQE-32* (Qiagen, Valencia, CA) modifié ont été réalisées antérieurement par un étudiant du laboratoire du Dr. Stephen Michnick (Université de Montréal, Montréal, QC ; département de biochimie). Ce vecteur comporte une séquence codant pour 6 résidus histidine à l'extrémité 5' de la cassette d'expression pour fin de purification à l'aide de résine Ni-NTA-agarose (Qiagen, Valencia, CA). La carte de restriction et les séquences codantes des vecteurs contenant yUbi et yUbiF45W sont disponibles en appendice I et II respectivement.

5.2 Insertions des boucles dans la séquence de yUbi

Les insertions dans la séquence codant pour l'ubiquitine ont été réalisées par une stratégie de PCR sur le vecteur entier, suivie d'une ligation intramoléculaire à extrémités franches. Un premier oligonucléotide contient la séquence complémentaire à celle codant pour le peptide à insérer ainsi qu'une séquence s'appariant sur le brin codant du plasmide immédiatement en amont du site d'insertion (T_m estimé environ à 58°C). Les codons de la séquence à insérer ont été choisis en fonction de leur abondance dans le génome d'*E. Coli* de manière à maximiser l'expression de la protéine résultante. Un second oligonucléotide ne contenant pas d'insertion s'apparie quant à lui sur le brin anticodant du plasmide immédiatement en aval du site d'insertion (T_m estimé environ à 58°C). Les oligonucléotides (Integrated DNA Technology, Coralville, IA) ont été phosphorylés par de la T4 Polynucléotides Kinase (Fermentas, Hanover, MD) préalablement à l'étape de PCR, laquelle a été réalisée dans un appareil Mini-Cycler (MJ Research, Waltham, MA) pendant 16 à 18 cycles à l'aide de l'enzyme Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) en présence de DMSO 5%. La matrice originale a ensuite été digérée

par l'enzyme de restriction *DpnI* (Gm⁶ATC, New England Biolabs, Beverly, MA), qui ne digère que l'ADN méthylé. Le produit de PCR ainsi obtenu a été circularisé par T4 DNA Ligase (New England Biolabs Beverly, MA) et transformé dans des cellules *E. Coli* XL-1 Blue par électroporation et étalé sur un milieu LB-agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline en guise de marqueur de sélection pour le plasmide *pQE-32*. La stratégie est schématisée dans la figure 12 et les séquences des oligonucléotides nécessaires à chaque construction sont disponibles en appendice III.

Les clones ainsi obtenus ont ensuite été criblés par un test d'induction à l'IPTG 0,5 mM pendant 4 heures et les lysats cellulaires chargés sur gel Tricine-SDS-PAGE afin de confirmer l'expression d'un produit correspondant au poids moléculaire attendu, soit ceux combinés de l'ubiquitine ($\approx 7,6$ kDa) et du peptide *trpzip2* ($\approx 1,6$ kDa). Un exemple d'un tel criblage est illustré dans la figure 13 ci-dessous. L'ADN des clones ainsi identifiés comme positifs a ensuite été séquencé à l'aide d'un séquenceur à électrophorèse capillaire (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE) afin de confirmer la présence de la mutation.

Figure 12 – Stratégie de mutagénèse par laquelle les séquences correspondant aux peptides ont été insérés dans le gène de l'ubiquitine de levure. 1 - Phosphorylation des oligonucléotides ; 2 - PCR ; 3 - Digestion Dpn I (digère *pQE-32* méthylé) ; 4 - Ligation franche intramoléculaire du produit de PCR.

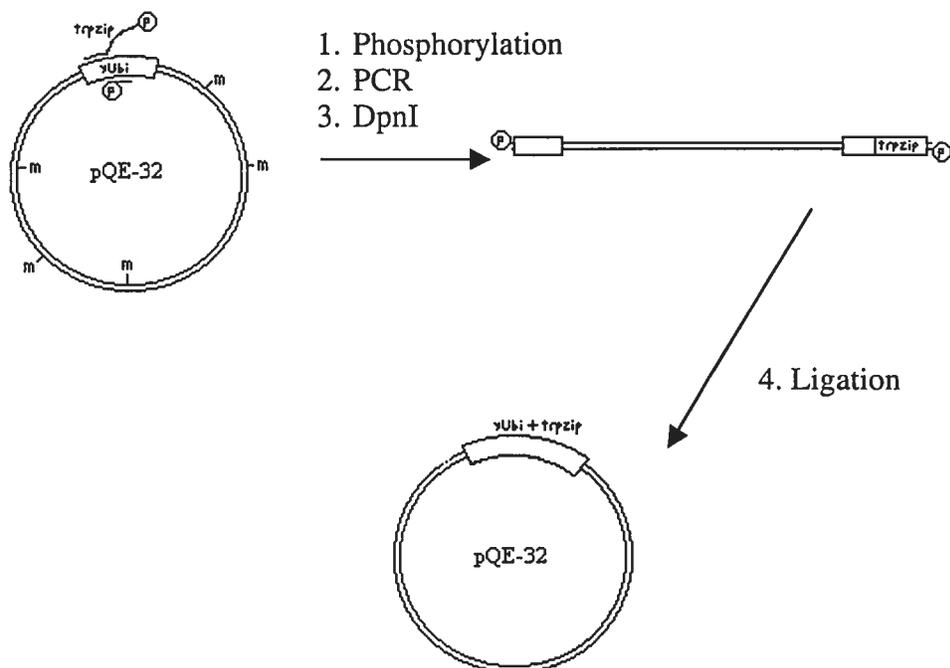
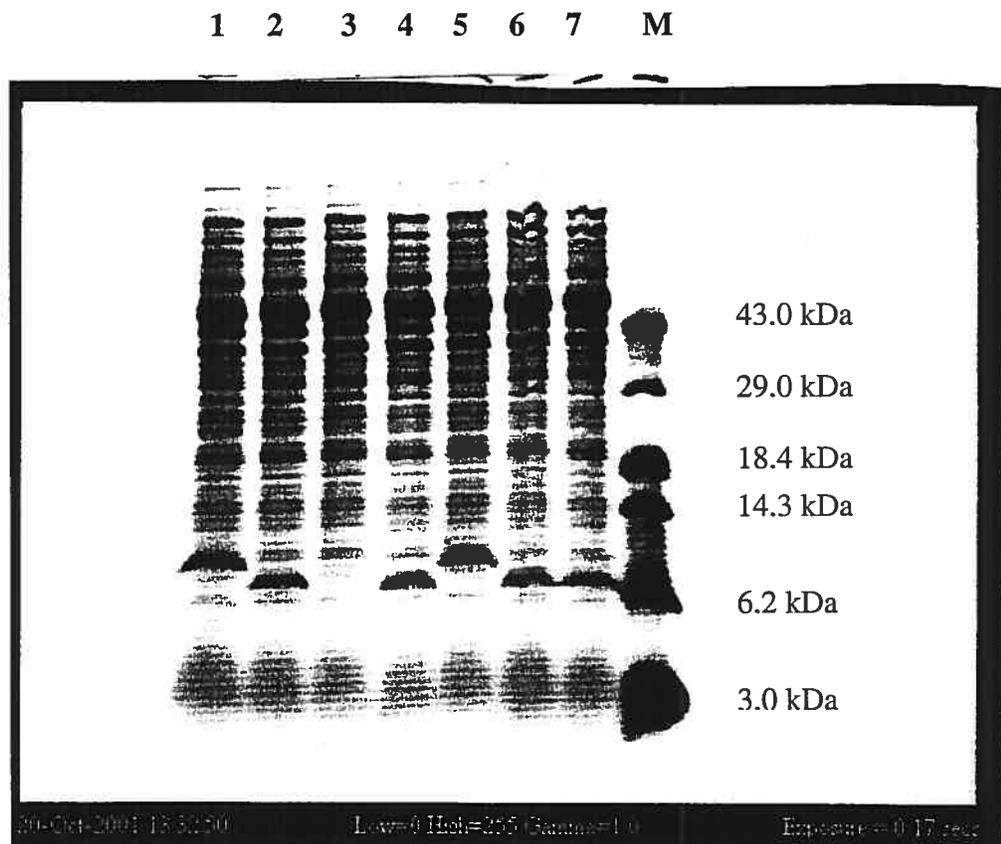


Figure 13 – Lysats cellulaires de bactéries XL-1 induites à l’IPTG 0,5 mM chargés sur gel tricine-SDS-PAGE 18% révélé au Bleu de Coomassie. Les puits 2, 4, 6 et 7 contiennent les lysats de clones qui expriment yUbiF45W (sans *trpzip2*), et représentent donc des contrôles négatifs. Les puits 1 et 5 contiennent les lysats de clones de la construction yUbiF45W-A1 qui expriment un produit qui possède un poids moléculaire plus élevé, soit ceux combinés de l’ubiquitine et du *trpzip2* ; ils représentent donc des clones positifs, qui ont subséquemment été séquencés. Le puit 3 contient le lysat d’un clone qui n’exprime aucun produit détectable, donc un clone négatif.



5.3 Expression et purification des mutants *yUbi-Trpzip2* en conditions natives et dénaturantes

L'expression de *yUbiF45W* ainsi que celles des mutants ont été réalisées à l'aide de cellules *E. Coli* BL21 (*pRep4*) dans 500 mL de milieu TB (1,2 % de bio-tryptone, 2,4 % d'extraits de levures, 0,4 % de glycérol et tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM pH 6,0) contenant 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline et 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamycine, avec agitation à 220 rpm à 37°C. Le milieu a d'abord été inoculé par 10 mL d'une culture de nuit puis les cellules mises en croissance jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6 (correspondant à la phase de croissance exponentielle). L'expression de la protéine a ensuite été induite par l'ajout de 0.5 mM d'IPTG au milieu pendant 4 heures. Les cellules ont subséquemment été concentrées par centrifugation et entreposées à -18°C jusqu'au lendemain.

Les cellules ont été resuspendues dans 20 ml de tampon de lyse (tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM et imidazole 20 mM) et soniquées 4 X 10 s par échantillons de 5 mL sur glace. Les acides nucléiques ont ensuite été digérés par l'ajout de DNaseI et de RNase A (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) et les échantillons cellulaires centrifugés à 10 000 rpm. Le surnageant a ensuite été divisé en deux parts égales, puis chacune mélangée à 1 ml de résine Ni-NTA-agarose (Qiagen, Valencia, CA) pendant 1h à 4°C et coulé sur une colonne à chromatographie. La colonne a ensuite été lavée par 10 volumes de tampon de lyse afin d'en retirer les protéines non liées à la résine.

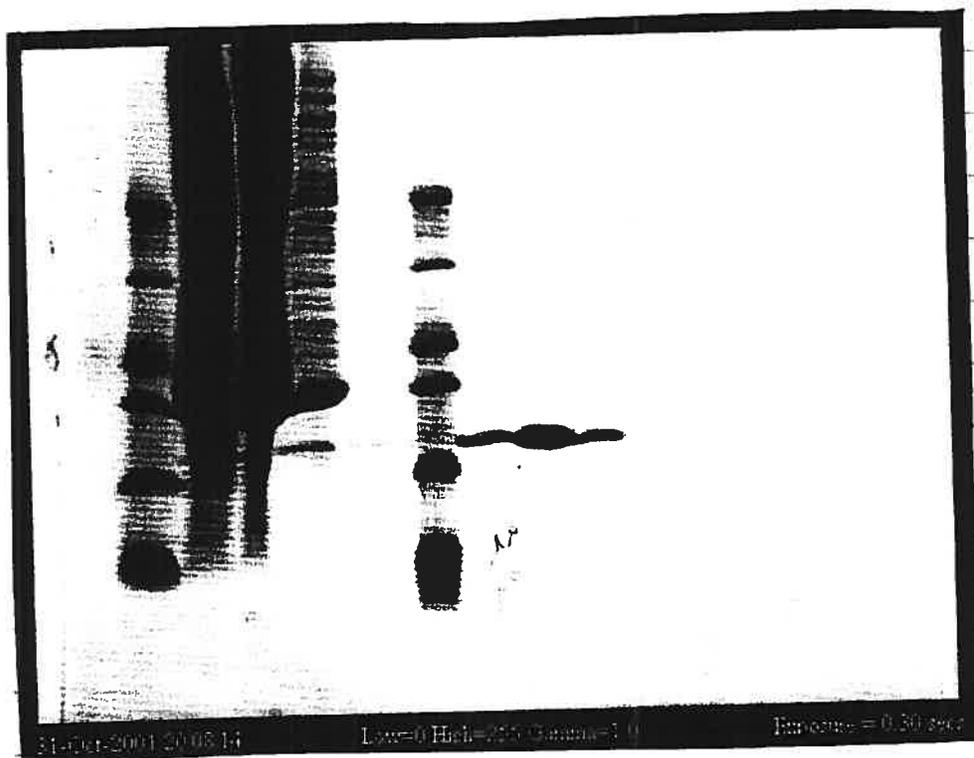
Les colonnes contenant la première moitié des échantillons ont ensuite été lavées par 2 volumes d'eau déionisée (conditions natives), et les colonnes contenant l'autre moitié par 2 volumes de GdnHCl 6,0 M (conditions dénaturantes). Les éluions en conditions natives ont été réalisées par fractions successives d'un volume d'acide acétique 25 mM (pH 3,2), tandis que celles en conditions dénaturantes l'ont été par des fractions d'un volume de GdnHCl 6,0 M avec acide acétique 25mM (pH 2,4). La figure 14 illustre la progression des étapes de purification. Les fractions d'éluion

contenant les protéines ont été regroupées et le pH ajusté à 5,0 par l'ajout de NaOH 5,0 M. La concentration en protéine a été estimée par spectrophotométrie selon la méthode de Gill et von Hippel [108] et subséquemment ajustée à environ 50 μ M. Une culture de 500 ml a généré typiquement environ 3 à 5 mg de protéines purifiées. La croissance de micro-organisme a été inhibée par l'ajout de 1 mM de NaN_3 aux échantillons, qui ont ensuite été conservés à 4°C en absence de lumière afin de prévenir leur photodégradation.

Figure 14 – Gel tricine-SDS-PAGE 18% révélé au Bleu de Coomassie qui illustre la progression des étapes de purification du mutant γ Ubi-A1 par chromatographie d'affinité avec résine Ni-NTA-agarose. Les puits 1 et 2 contiennent respectivement les lysats cellulaires avant et après leur mélange à la résine. Les puits 3 et 4 contiennent les produits recueillis des étapes de lavage de la colonne. Les puits 5 à 8 contiennent les produits d'élution à l'acide acétique. L'observation d'une seule et intense bande dans ces puits indique la présence d'un produit en quantité et pureté suffisantes pour des études cinétiques et thermodynamiques.

M 1 2 3 4 M 5 6 7 8

43.0 kDa
29.0 kDa
18.4 kDa
14.3 kDa
6.2 kDa
3.0 kDa



5.4 Provenance du peptide *trpzip2*

Environ 9 mg du peptide *trpzip2* lyophilisé (SWTWENGKWTWK ; synthétisé sur support solide) ont été obtenus de chez Genentech (San Francisco, CA), gracieusement du Dr. Andrea Cochran [80]. Le peptide a été dissout à des concentrations variant de 200 μM à 1 mM dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0 avec 1 mM de NaN_3 afin de prévenir la croissance de microorganismes. Cette solution stock a été conservée à 4°C en absence de lumière afin de prévenir toute photodégradation.

5.5 Préparation des solutions de GdnHCl

Les solutions de GdnHCl qui ont servi aux expériences de dichroïsme circulaire (sous-section 5.6), de fluorescence (sous-section 5.7) et de stopped-flow (sous-section 5.8) ont été préparées de façon volumétrique à partir de deux solutions-stock parentes contenant respectivement 0 M et 8 M de GdnHCl ultra-pur (ICN Biochemicals, Irvine, CA), ainsi que chacune 25 mM de tampon acétate de sodium pH 5,0 \pm 0,1 et 1 mM de NaN_3 (afin de prévenir toute contamination par des microorganismes). La concentration précise de chaque solution a été déterminée par réfractométrie [109]. Les solutions ont été conservées à température pièce jusqu'à utilisation pendant une durée n'excédant pas trois mois.

5.6 Dichroïsme circulaire à l'équilibre

Pour les expériences de dichroïsme circulaire, le peptide *trpzip2* a été amené à une concentration de 100 μM par dilution d'un volume de solution stock de peptide 1 mM (voir la section 4) dans 9 volumes de solution de GdnHCl (voir la sous-section 5.5) à concentrations variables. Les concentrations exactes de GdnHCl, après mélange, ont été calculées par réfractométrie [109].

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco 710 dans des cellules en quartz comportant un trajet optique de 0,1 cm à température pièce, soit 294K. Les traces obtenues par balayage de l'activité optique entre 200 et 270 nm représentent la moyenne de 15 acquisitions. Les données ont ensuite été transformées et analysées à l'aide du logiciel *J-700 for Windows Standard Analysis* v.1.10 (1994, Jasco Corp, Easton, MD), d'abord en réduisant le bruit par transformée de Fourier et en soustrayant le spectre du blanc, et ensuite en convertissant le signal en ellipticité molaire (θ).

5.7 Fluorescence à l'équilibre

Les expériences de fluorescence à l'équilibre avec le peptide *trpzip2* vs GdnHCl ont été conduites à l'aide d'un lecteur de plaque à 96 puits SpectraMax Gemini-XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) à $298,0 \pm 0,5$ K. Les échantillons de *trpzip2* ont été préparés par dissolution d'une part de solution stock (200 μ M) dans 19 parts de solutions de GdnHCl à concentrations variables, pour amener le peptide à une concentration finale de 10 μ M. Les concentrations exactes de GdnHCl, après mélange, ont été calculées par réfractométrie [109]. Ces échantillons ont ensuite été chargés en triplicata sur des plaques à 96 puits de type Microfluor 2 blanches (Dynex, Chantilly, VA). Les mesures ont été conduites avec excitation à 284 nm et suivi de l'intensité de fluorescence émise à 360 nm.

5.8 Fluorescence cinétique

Les expériences cinétiques de repliement et de dénaturation avec suivi par fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un appareil de type *stopped-flow* modèle SX.18MV (Applied Photophysics, Leatherhead, Surrey, R.U.). La température de la cellule, des tubes et des seringues a été maintenue à $298,0 \pm 0,1$ K par l'utilisation

d'un bain d'eau circulant. Les échantillons ont été excités par un faisceau monochromateur à la longueur d'onde correspondant au maximum du spectre d'excitation du tryptophane, soit 281,0 nm, avec une fenêtre d'ouverture de 2,3 nm. Les mesures de fluorescences ont été effectuées par intégration des longueurs d'ondes émises supérieures à 320 nm (à l'aide d'un filtre WG-320 éliminant les longueurs d'onde inférieures). Les traces acquises comportent chacune 1000 points distribués de façon logarithmiques entre 0 et 10 secondes, utilisant la fonction *oversample* de l'appareil, laquelle maximise les temps d'acquisition pour chaque point et réduit ainsi le bruit et les imprécisions de ceux-ci. Elles ont toutes été acquises en utilisant un ratio de mélange 1 : 10 et un *stop volume* de 200 μl . Chaque trace cinétique se trouve à être la moyenne d'au moins trois acquisitions.

5.8.1 Expériences de repliement

Pour chaque réaction de repliement (renaturation), une partie d'échantillons de protéines dénaturées ($\sim 50 \mu\text{M}$ dissoutes dans 6,0 M de GdnHCl, 25 mM de tampon acétate de sodium pH 5,0 et 1 mM NaN_3) a été mélangée à 10 parties de solutions natives à concentrations croissantes de GdnHCl (25 mM de tampon acétate de sodium pH 5,0 et 1 mM NaN_3). Les concentrations exactes de GdnHCl, après mélange, ont été calculées par réfractométrie [109].

5.8.2 Expériences de dénaturation

Pour chaque réaction de dénaturation (dépliement), une partie d'échantillons de protéines natives ($\sim 50 \mu\text{M}$ dissoutes dans 0,5 M de GdnHCl afin de prévenir toute agrégation, 25 mM de tampon acétate de sodium pH 5,0 et 1 mM NaN_3) a été mélangée à 10 parties de solutions dénaturantes à concentrations décroissantes de GdnHCl (25 mM de tampon acétate de sodium pH 5,0 et 1 mM NaN_3). Les concentrations exactes de GdnHCl, après mélange, ont été calculées par réfractométrie [109].

5.8.3 Temps mort de l'appareil

La détermination du temps mort de l'appareil a été réalisée selon la méthode décrite par Brisette et collaborateurs [110], par une réaction d'oxydation du N-acétyl-tryptophanamide par le N-bromo-succinimide. Celui-ci est de 3,5 ms.

5.9 Analyse des traces cinétiques

Les traces cinétiques de chaque expérience de repliement et de dénaturation ont été sauvegardées sous format ASCII. L'abscisse de chaque trace a été ajustée selon le temps mort de l'appareil (voir sous-section 5.9.3) et les données ont ensuite été transférées dans le logiciel d'analyse et de modélisation graphique KaleidaGraph v.3.5 (2000 ; Synergy Software, Essex Jct, VT) et portées graphiquement (intensité de fluorescence (I_f) en fonction du temps (t)).

5.9.1 Modélisation des traces cinétiques

Les traces cinétiques ont été modélisées selon l'équation générale à n phases (1) par la méthode d'analyse non-linéaire de moindre carré.

$$I_f(t) = \sum [A_n \exp (-k_n t)] + E_p \quad (1)$$

Le paramètre A_n représente l'amplitude de chaque phase, k_n la constante de vitesse de chaque phase et E_p l'intensité de fluorescence extrapolée à l'infini (point de convergence). Le nombre de phase (n) utilisé pour la simulation de chaque trace a été déterminé de manière empirique comme étant celui dont les résultats correspondent visuellement et statistiquement (minimisation de χ^2 et maximisation de R) le plus fidèlement à la trace de fluorescence observée. Les expériences de dénaturation ont typiquement nécessité une modélisation selon une seule phase (comportement mono exponentiel), alors que certaines expériences de renaturation en ont nécessité une quantité variant

d'une à quatre phases. Il est à noter que les traces à caractère ascendant nécessitent selon cette équation une amplitude (A_n) négative alors que les traces descendantes nécessitent une amplitude positive.

5.9.2 Courbes de Chevrons et analyse des paramètres cinétiques selon un modèle en deux états

Le logarithme des constantes de vitesse (k_n) a été porté graphiquement en fonction de la concentration de dénaturant (x) et modélisé selon l'équation suivante correspondant à une courbe de Chevron pour un système dit en deux états [Jackson S.E. et Fersht A.R. (1991), *Biochemistry* 30, 10428-10435] :

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln [k_r(0) \exp (m_r x) + k_d(0) \exp (m_d x)] \quad (2)$$

Cette équation permet d'extrapoler la vitesse de repliement et de dépliement de la protéine en absence de GdnHCl ($k_r(0)$ et $k_d(0)$ respectivement), ainsi que les paramètres m_r et m_d . Pour un système en deux états, il est possible, à partir de ces paramètres cinétiques, de dériver les paramètres thermodynamiques en utilisant les équations (3), (4) et (5) [24].

$$\Delta G(0) = -RT \ln (k_r(0) / k_d(0)) \quad (3)$$

$$m = RT (-m_r + m_d) \quad (4)$$

$$C_{50\%} = \ln [k_r(0) / k_d(0)] / (-m_r + m_d) \quad (5)$$

Ces trois paramètres correspondent respectivement à l'énergie libre que gagne la protéine à se replier en absence de dénaturant, au degré d'ouverture de la protéine suivant sa dénaturation et à la concentration de dénaturant nécessaire pour dénaturer 50 % de la population de protéines.

Il est à noter que dans le cas des traces qui ont nécessité l'utilisation de plusieurs termes exponentiels, un seul correspond généralement à la phase

dite « en deux états » du repliement, et seule la constante de vitesse propre à ce terme a été utilisée pour tracer la courbe de Chevron. Les autres phases ont généralement été omises des figures afin de les alléger.

5.9.3 Courbes d'équilibres et analyse des paramètres thermodynamiques

La modélisation des traces cinétiques selon l'équation (1) mène à l'obtention d'un paramètre qui correspond à l'intensité finale de fluorescence de la réaction extrapolée à l'infini (E_p). En modélisant cette intensité finale de fluorescence en fonction de la concentration de dénaturant (x), il est possible d'obtenir une courbe d'équilibre de repliement de la protéine. Une courbe d'équilibre pour un système en deux états peut être modélisée selon l'équation suivante :

$$E_p(x) = [(a + bx) + (c + dx) \exp (\Delta G(x) / RT)] / [1 + \exp (\Delta G(x) / RT)] \quad (6)$$

où

$$\Delta G(x) = \Delta G(0) + mx \quad (7)$$

Les paramètres $\Delta G(0)$ et m représentent respectivement l'énergie que la protéine gagne à se replier en absence de dénaturant ainsi que le degré d'ouverture de la protéine suivant sa dénaturation. De ceux-ci, on peut dériver la concentration de dénaturant nécessaire pour dénaturer 50% de la population de protéine ($C_{50\%}$) par l'équation suivante :

$$C_{50\%} = -\Delta G(0) / m \quad (8)$$

Par contre, les paramètres a , b , c et d sont des paramètres déterminés de façon empirique et qui ne servent essentiellement qu'à définir deux droites en tant que niveau de fluorescence basal des états natifs et dénaturés de la protéine d'intérêt. Afin de faciliter la comparaison entre les courbes d'équilibre des

différentes protéines d'intérêt, il convient d'éliminer le besoin pour ces paramètres empiriques en transformant les données brutes d'intensité de fluorescence en proportion de molécules qui sont repliées ($F(x)$) :

$$F(x) = \{ E_p(x) - [(c + dx) / (1 + \exp(-\Delta G(x) / RT))] \} / (a + bx) \quad (9)$$

La courbe d'équilibre peut alors être retracée en utilisant la proportion de molécule repliée ($F(x)$) en fonction de la concentration de dénaturant, en la modélisant selon l'équation suivante :

$$F(x) = \exp(-\Delta G(x) / RT) / [1 + \exp(-\Delta G(x) / RT)] \quad (10)$$

6 - Références

1. Bernal, J.D., Fankuchen I. et Perutz M.F. (1938), An X-Ray study of chymotrypsin and haemoglobin, *Nature*, **141**, 523-524.
2. Perutz, M.F. (1942), Crystal structure of oxyhaemoglobin, *Nature*, **150**, 324-329
3. Bragg, W.L. et Perutz, M.F. (1952), The structure of haemoglobin, *Proc. Roy. Soc. A*, **213**, 425-435
4. Pauling, L.P., Orey, R.B. et Branson, H.R. (1951), The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **37**, 205-210
5. Watson, J.D. and Crick, F.C. (1953), Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **171**, 737-738
6. Holm, L. et Sander, C. (1994), Searching protein structure databases has come of age, *Proteins*, **19**, 165-173
7. Perutz, M.F., *Protein structure. New Approaches to Disease and Therapy*, Freeman, New York, É.U., 1992
8. Vitkup, D., Melamund, E., Moulton, J. et Sander, C. (2001), Completeness in structural genomics, *Nature Struct. Biol.*, **8**, 559-566
9. Anfinsen, C.B. (1973), Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, **181**, 223-230
10. Baker, D. et Sali, A. (2001), Protein structure prediction and structural genomics, *Science*, **294**, 93-96

11. Pillardy, J., Czaplewski, C., Liwo, A., Lee, J., Ripoll, D.R., Kazmierkiewicz, R., Odziej, S., Wedemeyer, W.J., Gibson, K.D., Arnautova, Y.A., Saunders, J., Ye, Y.-J. et Scheraga, H.A. (2001), Recent improvement in prediction of protein structure by global optimization of a potential energy function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2329-2333
12. Bonneau, R., Tsai, J., Ruczinski, I., Chivian, D., Rohl, C., Strauss, C. et Baker, D. (2001), Rosetta in CASPIV : Progress in Ab initio protein structure prediction, *Proteins, Suppl. 5*, 119-126
13. Simons, K.T., Strauss, C. et Baker, D. (2000), Prospects for ab initio structure protein structural genomics, *J Mol Biol.*, **306**, 1191-1199
14. Simons, K.T., Bonneau, R., Ruczinski, I. et Baker, D. (1999), Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA, *Proteins, Suppl. 3*, 171-176
15. Kihara, D., Zhang, Y., Lu, H., Kolinski, A. et Skolnick, J. (2002), Ab initio protein structure prediction on a genomic scale : application to the *Mycoplasma genitalium* genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **30**, 5993-5998
16. Shakhnovich, E.I. (1997), Theoretical studies of protein-folding thermodynamics and kinetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 29-40
17. Dill, K.A. (1990), Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, **29**, 7133-7155
18. Lattman, E.E. et Rose, G.D. (1991), The protein-folding problem : the native fold determines the packing, but does packing determine the native fold ?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4195-4199

19. Ramachandran, G.N. et Sasisekharan, V. (1968), Conformation of polypeptides and proteins, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 283-438
20. Srinivasan, R. et Rose, G.D. (1999), A physical basis for protein secondary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14258-14263
21. Levinthal, C. (1968), Are there pathways for protein-folding ?, *J. Chim. Phys.*, **65**, 44-45
22. Schmid, F.X. et Baldwin, R.L. (1979), Detection of an early intermediate in the folding of ribonuclease A by protection of amide protons against exchange, *J. Mol. Biol.*, **135**, 199-215
23. Ikai, A. et Tanford, C. (1971), Kinetic evidence for an incorrectly folded intermediate in the refolding of denatured proteins, *Nature*, **230**, 100-102
24. Jackson, S.E. et Fersht, A.R. (1991), Folding of chymotrypsin inhibitor 2 : Evidence for a two-state transition, *Biochemistry*, **30**, 10428-10435
25. Jackson, S.E. (1998), How do small single-domain proteins fold ?, *Fold. Des.*, **3**, R81-R91
26. Fersht, A.R., Matouschek, A. et Serrano, L. (1992), The folding of an enzyme I : Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding, *J. Mol. Biol.*, **224**, 771-782
27. Fersht, A.R., Matouschek, A. et Serrano, L. (1992), The folding of an enzyme III : Structure of the transition state for unfolding of barnase analysed by a protein engineering procedure, *J. Mol. Biol.*, **224**, 805-818

28. Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., elMasry, N.F., Jackson, S.E. et Fersht, A.R. (1994), Structure of the transition state for folding/unfolding of chymotrypsin inhibitor 2 and its implication for mechanisms of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10422-10425
29. Itzhaki, L.S., Otzen, D.E. et Fersht, A.R. (1995), The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering method : Evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding, *J. Mol. Biol.*, **254**, 260-288
30. Fersht, A.R. (1997), Nucleation mechanisms in protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 3-9
31. Fersht, A.R. (1995), Optimization of rates of protein folding : the nucleation-condensation mechanisms and its implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10869-10873
32. Plaxco, K.W., Simons, K.T. et Baker, D. (1998), Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins, *J. Mol. Biol.*, **277**, 985-994
33. Baker, D. (2000), A surprising simplicity to protein folding, *Nature*, **405**, 39-42
34. Alm E. et Baker D. (1999), Matching theory and experiment in protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 189-196
35. Chiti, F., Taddei, N., White, P.M., Bucciantini, M., Magherini, F., Stefani, M. et Dobson, C. (1999), Mutational analysis of acylphosphatase suggests the importance of topology and contact order in protein folding, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1005-1009

36. Plaxco, K.W., Simmons, K.T., Ruczinski, I. et Baker, D. (2000), Topology, stability, sequence, and length: defining the determinants of two-state protein folding kinetics, *Biochemistry*, **39**, 11177-11183
37. Dinner, A.R. et Karplus, M. (2001), The roles of stability and contact order in determining protein folding rates, *Nature Struct. Biol.*, **8**, 21-22
38. Karplus, M. et Weaver, D.L. (1976), Protein folding dynamics, *Nature*, **260**, 404-406
39. Fersht, A.R. (2000), Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1525-1529
40. Pappu, R.V., Srinivasan, R. et Rose, G.D. (2000), Proc. Nat. Acad. Sci. USA **97**, 12565-12570
41. Baldwin, R.L. et Rose, G.D. (1999), Is protein folding hierarchic ? I. Local structure and peptide folding, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 26-33
42. Baldwin, R.L. et Rose, G.D. (1999), Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 77-83
43. Mok, Y.-K., Kay, C.M., Lay, L.E. et Forman-Kay, J. (1999), NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions., *J. Mol. Biol.*, **289**, 619-638
44. Mok, Y.-K., Elisseeva, E.L., Davidson, A.R. et Forman-Kay, J.D. (2001), Dramatic stabilization of an SH3 domain by a single substitution: roles of the folded and unfolded states, *J. Mol. Biol.*, **307**, 913-928

45. Tollinger, M., Skrynnikov, N.R., Mulder, F.A.A., Forman-Kay, J.D. et Kay, L.E. (2001), Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11341-11352
46. Chan, C.K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D.L., Eaton, W.A. et Hofrichter, J. (1997), Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1779-1784
47. Qi, P.X., Sosnick, T.R. et Englander, S.W. (1998), The burst phase in ribonuclease A folding and solvent dependence of the unfolded state, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 882-884
48. Sosnick, T.R., Shtilerman, M.D., Mayne, L. et Englander, S.W. (1997), Ultrafast signals in protein folding and the polypeptide contracted state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8545-8550
49. Myers, J.K. et Oas, T.G. (2001), Preorganized secondary structure as an important determinant of fast protein folding, *Nature Struct. Biol.*, **8**, 552-558
50. Baldwin, R.L. et Zimm, B.H. (2000), Are denatured proteins ever random coils ?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12391-12392
51. Plaxco, K.W. et Gross, M. (2001), Unfolded, yes, but random ? Never !, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 659-660
52. Ionescu, R.M. et Matthews, C.R. (1999), Folding under the influence, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 304-306
53. Uversky, V.N. et Fink, A.L. (2002), The chicken-egg scenario of protein folding revisited, *FEBS Lett.*, **515**, 79-83

54. Scalley, M.L., Nauli, S.N., Gladwin, S.T. et Baker, D. (1999), Structural transitions in the protein L denatured state ensemble, *Biochemistry*, **38**, 15927-15935
55. Yi, Q., Scalley-Kim, M.L., Alm, E.J. et Baker, D. (2000), NMR characterization of residual structure in the denatured state of protein L, *J. Mol. Biol.*, **299**, 1341-1351
56. Kim, D.E., Fisher, C. et Baker, D. (2000), A breakdown of symmetry in the folding transition state of protein L, *J. Mol. Biol.*, **298**, 971-984
57. Baldwin, R.L. (1986), Seeding protein folding, *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 6-9
58. Arcus, V.L., Vuilleumier, S., Freund, S.M., Bycroft, M. et Fersht, A.R. (1995), A comparison of the pH, urea, and temperature-denatured states of barnase by heteronuclear NMR: implications for the initiation of protein folding, *J. Mol. Biol.*, **254**, 305-321
59. Hammarström, P. et Carlsson, U. (2000), Is the unfolded state the Rosetta Stone of the protein folding problem ?, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **276**, 393-398
60. Nauli, S., Kuhlman, B. et Baker, D. (2001), Computer-based redesign of a protein folding pathway, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 602-605
61. Kuhlman, B., O'Neill, J.W., Kim, D.E., Zhang, K.Y. et Baker, D. (2002), Accurate computer-based design of a new backbone conformation in the second turn of protein L, *J. Mol. Biol.*, **315**, 471-477
62. Zagrovic, B., Sorin, E.J. et Pande, V. (2001), Beta-hairpin folding simulations in atomistic detail using an implicit solvent model, *J. Mol. Biol.*, **313**, 151-169

63. Nikiforovitch, G.V. et Frieden, C. (2002), The search for local native-like nucleation centers in the unfolded state of beta-sheet proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10388-10393
64. Dinner, A.R., Lazaridis, T. et Karplus, M. (1999), Understanding beta-hairpin formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9068-9073
65. Muñoz, V., Henry, E.R., Hofrichter, J. et Eaton, W.A. (1998), A statistical mechanical model for beta-hairpin kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5872-5879
66. Muñoz, V., Thompson, P.A., Hofrichter, J. et Eaton, W.A. (1997), Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation, *Nature*, **390**, 196-199
67. Viguera, A.-R. et Serrano, L. (2001), Bergerac-SH3: "frustration" induced by stabilizing the folding nucleus, *J. Mol. Biol.*, **11**, 357-371
68. Hicke, L. (1999), Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels, *Trends Cell Biol*, **9**, 107-112
69. Ben-Neriah, Y. (2002), Regulatory functions of ubiquitination in the immune system, *Nature Immunol.*, **3**, 20-26
70. Belz, T., Pham, A.D., Beisel, C., Anders, N., Bogin, J., Kwozynski, S. et Sauer F. (2002), In vitro assays to study protein ubiquitination in transcription, *Methods*, **26**, 233-244
71. Marx, J. (2002), Ubiquitin lives up to its name, *Science*, **297**, 1792-1794
72. Conaway, R.C., Brower, C.S. et Conaway, J.W. (2002), Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation, *Science*, **296**, 1254-1258

73. Khorasanizadeh, S., Peters, I.D., Butt, T.R. et Roder, H. (1993) Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin, *Biochemistry*, **32**, 7054-7064
74. Laub, P.H., Khorasadizadeh, S. et Roder, H. (1995), Localized solution structure refinement of an F45W variant of ubiquitin using stochastic boundary molecular dynamics and NMR distance restraints, *Protein Sci.*, **4**, 973-982
75. Khorasanizadeh S., Peters, I.D. et Roder, H. (1996), Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residue, *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 193-205
76. Krantz, B.A. et Sosnick, T.R. (2000), Distinguishing between two-state and three-state models for ubiquitin folding, *Biochemistry*, **39**, 11696-11701
77. Vallée-Bélisle, A., Turcotte, J.-F. et Michnick, S.W., Structurally related Raf RBD and ubiquitin proteins share similar folding mechanism despite unrelated amino acid sequences, *manuscrit soumis à J. Mol. Biol.*
78. Briggs, M.S. et Roder, H. (1992), Early hydrogen-bonding events in the folding reaction of ubiquitin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2017-2021
79. Jenson, J., Goldstein, G. et Breslow, E. (1980), Physical-chemical properties of ubiquitin, *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 378-385
80. Cochran, A.G., Skelton, N.J. et Starovasnik, M.A. (2001), Tryptophan zippers : stable, monomeric beta-hairpins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5578-5583

81. Zerella, R., Chen, P.Y., Evans, P.A., Raine, A. et Williams, D.H. (2000), Structural characterization of a mutant peptide derived from ubiquitin: implications for protein folding, *Protein Sci.*, **9**, 2142-2150
82. Hutchinson, E.G. et Thornton, J.M. (1994), A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins, *Protein Sci.*, **3**, 2207-2216
83. Guruprasad, K. et Rajkumar, S. (2000), Beta and gamma-turns in proteins revisited : a new set of amino acid turn-type dependent on positional preferences and potentials, *J. Biosci.*, **25**, 143-156
84. Hochuli, E., Dobeli, H. et Schacher, A. (1987), New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *J. Chromatogr.*, **411**, 177-184
85. Myers, J.K., Pace, C.N. et Sacholtz, J.M. (1995), Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.*, **4**, 2138-2148
86. Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H. et Jones, K.M., *Data for Biochemical Research (3rd ed)*, Oxford Science Publications, Oxford, R.U., 1986, 1-31
87. Ibarra-Molero, B., Loladze, V.V., Makhatadze, G.I. et Sanchez-Ruiz, J.M. (1999), Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability, *Biochemistry*, **38**, 8138-8149
88. Huang, G.S. et Oas, T.G. (1995), Submillisecond folding of monomeric lambda repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6878-6882

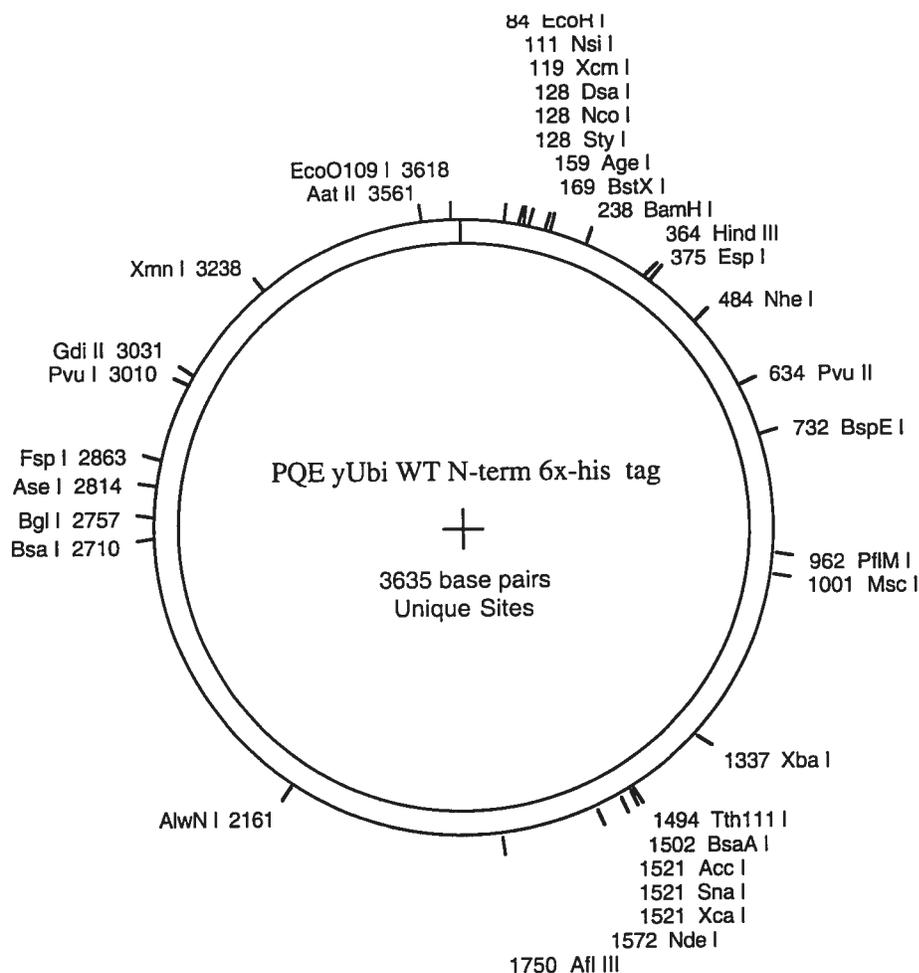
89. Ghaemmaghami, S., Word, J.M., Burton, R.E., Richardson, J.S. et Oas, T.G. (1998), Folding kinetics of a fluorescent variant of monomeric lambda repressor, *Biochemistry*, **37**, 9179-9185
90. Myers, J.K. et Oas, T.G. (1999), Contribution of a buried hydrogen bond to lambda repressor folding kinetics, *Biochemistry*, **38**, 6761-6768
91. Pappenberger, G., Aygün, H., Engels, J.W., Reimer, U., Fischer, G. et Kiefhaber, T. (2001), Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 452-458
92. Scherer, G., Kramer, M.L., Schutkowski, M., Reimer, U. et Fischer, G. (1998), Barriers to rotation of amide peptide bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5568-5574
93. Dill, K.A. et Chan, H.S. (1997), From Levinthal to pathways to funnels, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 10-19
94. Shimada, J. et Shakhnovich, E.I. (2002), The ensemble folding kinetics of protein G from an all-atom Monte Carlo simulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11175-11180
95. Teilum, K., Maki, K., Kragelund, B.B., Poulsen, F.M. et Roder, H. (2002), Early kinetic intermediate in the folding of acyl-CoA binding protein detected by fluorescence labeling and ultrarapid mixing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9807-9812
96. Grantcharova, V.P., Riddle, D.S., Santiago, J.V. et Baker, D. (1998), Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 714-720

97. Martínez, J.C. et Serrano, L. (1999), Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1010-1016
98. Ramírez-Alvarado, M., Blanco, F.J. et Serrano, L. (1996), De novo design and structural analysis of a model beta-hairpin peptide system, *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 604-612
99. Zerella, R., Evans, P.A., Ionides, J.M., Packman, L.C., Trotter, B.W., Mackay, J.P. et Williams, D.H. (1999), Autonomous folding of a peptide corresponding to the N-terminal beta-hairpin from ubiquitin, *Protein Sci.*, **8**, 1320-1331
100. Klein-Seetharaman J., Oikawa M., Grimshaw S.B., Wirmer J., Duchardt E., Ueda T., Imoto T., Smith L.J., Dobson C. et Schwalbe H. (2002), Long-range interactions within a nonnative protein, *Science*, **295**, 1719-1722
101. Kannan, N. et Vishveshwara, S. (2000), Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins, *Protein Eng.*, **13**; 753-761
102. Bhattacharyya, R., Samanta, U. et Chakrabarti, P. (2002), Aromatic-aromatic interactions in and around alpha-helices, *Protein Eng.*, **15**, 91-100
103. Koepf, E.K., Petrassi, H.M., Sudol, M. et Kelly, J.W. (1999), WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state, *Protein Sci.*, **8**, 841-853
104. Lumb, K.J. et Kim, P.S. (1994), Formation of a hydrophobic cluster in denatured bovine pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Biol.*, **236**, 412-420

105. Bowler, B.E., May, K., Zaragova, T., York, P., Dong, A. et Caughey, W.S.(1993), Destabilizing effects of replacing a surface lysine of cytochrome c with aromatic amino acids: implications for the denatured state, *Biochemistry*, **12**, 183-190
106. Neidigh, J.W., Fesinmeyer, R.M. et Andersen, N.H. (2002), Designing a 20-residue protein, *Nat. Struct. Bio.*, **9**, 425-430
107. Ferguson, N., Johnson, C.M., Macias, M., Oschkinat, H. et Fersht, A.R. (2001), Ultrafast folding of WW domains without structured aromatic clusters in the denatured state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13002-13007
108. Gill, S.C. et von Hippel, P.H. (1989), Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326
109. Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Meth. Enzymol.*, **131**, 266-280
110. Brisette, P., Ballou, D.P., Massey, V. (1989), Determination of the dead time of a stopped-flow fluorometer, *Anal. Biochem.*, **181**, 234-238
111. Zagrovic, B., Snow, C.D., Khaliq, S., Shirts, M.R., Pande, V.S. (2002), Native-like mean structure in the unfolded ensemble of small proteins, *J. Mol. Biol.*, **323**, 153-164
112. Mayer, R.J., Landon, M. et Layfield, R. (1998), Ubiquitin superfolders : intrinsic and attachable regulators of cellular activities ?, *Fold. Des.* 3(5), R97-R99
113. Rais-Beghdadi, C., Roggero, M.A., Fasel, N. et Reymond, C.D. (1998), Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 95-103

114. Knappik, A. et Pluckthun, A. (1994), An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the decrescendo and purification of recombinant antibody fragments, *Biotechniques* 17, 754-761

Appendice I



Carte de restriction du plasmide pQE-32 (modifié) utilisé pour effectuer les constructions d'ADN nécessaires à la conduite du projet

Figure générée l'aide du logiciel *DNA Strider 1.2*
Seuls les sites de restriction uniques sont indiqués.

Ce vecteur comporte une origine de réplication ColE1, un gène codant pour la β -lactamase (résistance à l'ampicilline), un site de liaison au ribosome, un promoteur T5, un opéron Lac ainsi qu'une séquence codant pour six résidus histidine à l'extrémité N-terminale de la cassette d'expression, laquelle est située entre les sites NcoI et HindIII et contient le gène codant pour l'ubiquitine de levure.

Appendice II

Séquence codante du vecteur pQE-32 modifié contenant le gène codant pour l'ubiquitine de levure type sauvage.

ATG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAC	CAT	GGT	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT
M	H	H	H	H	H	H	G	M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7
TTG	ACC	GGT	AAA	ACC	ATA	ACA	TTG	GAA	GTT	GAA	TCT	TCC	GAT	ACC
L8	T9	G10	K11	T12	I13	T14	L15	E16	V17	E18	S19	S20	D21	T22
ATC	GAC	AAC	GTT	AAG	TCG	AAA	ATT	CAA	GAC	AAG	GAA	GGG	ATC	CCT
I23	D24	N25	V26	K27	S28	K29	I30	Q31	D32	K33	E34	G35	I36	P37
CCA	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TTT	GCC	GGT	AAG	CAG	CTA	GAA	GAC
P38	D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	F45	A46	G47	K48	Q49	L50	E51	D52
GGT	AGA	ACG	CTG	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	CAG	AAG	GAG	TCC	ACC	TTA
G53	R54	T55	L56	S57	D58	Y59	N60	I61	Q62	K63	E64	S65	T66	L67
CAT	CTT	GTG	CTA	AGG	CTA	AGA	GGT	GGT	TAA	GCT	TAA			
H68	L69	V70	L71	R72	L73	R74	G75	G76	stop	A	stop			

Séquence codante du vecteur pQE-32 modifié contenant le gène codant pour l'ubiquitine de levure avec mutation F45W.

ATG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAC	CAT	GGT	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT
M	H	H	H	H	H	H	G	M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7
TTG	ACC	GGT	AAA	ACC	ATA	ACA	TTG	GAA	GTT	GAA	TCT	TCC	GAT	ACC
L8	T9	G10	K11	T12	I13	T14	L15	E16	V17	E18	S19	S20	D21	T22
ATC	GAC	AAC	GTT	AAG	TCG	AAA	ATT	CAA	GAC	AAG	GAA	GGG	ATC	CCT
I23	D24	N25	V26	K27	S28	K29	I30	Q31	D32	K33	E34	G35	I36	P37
CCA	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TGG	GCC	GGC	AAG	CAG	CTA	GAA	GAC
P38	D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	W45	A46	G47	K48	Q49	L50	E51	D52
GGT	AGA	ACG	CTG	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	CAG	AAG	GAG	TCC	ACC	TTA
G53	R54	T55	L56	S57	D58	Y59	N60	I61	Q62	K63	E64	S65	T66	L67
CAT	CTT	GTG	CTA	AGG	CTA	AGA	GGT	GGT	TAA	GCT	TAA			
H68	L69	V70	L71	R72	L73	R74	G75	G76	stop	A	stop			

Appendice III

Séquence des oligonucléotides utilisés pour les constructions d'ADN

Les régions qui s'apparient avec le vecteur sont indiquées en gras.

Oligonucléotide A1 (utilisé pour la construction yUbi-A1 et yUbiF45W-A1)

	M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7	W	T	W
Matrice 5'	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT	TGG	ACC	TGG
Oligo 3'	TAC	GTC	TAA	AAG	CAG	TTC	TGA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	5'

A1 = 5' CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AGT CTT GAC
GAA AAT CTG CAT 3' T_m = 58°C

Oligonucléotide A2 (utilisé pour la construction yUbi-A2 et yUbiF45W-A2)

	M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7	W	T	W
Matrice 5'	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT	TGG	ACC	TGG
Oligo 3'	TAC	GTC	TAA	AAG	CAG	TTC	TGA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	K
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA 3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT 5'

A2 = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AGT CTT
GAC GAA AAT CTG CAT 3' T_m = 58°C

Oligonucléotide A3 (utilisé pour la construction yUbi-A3 et yUbiF45W-A3)

		M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7	W	T	W
Matrice	5'	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	TAC	GTC	TAA	AAG	CAG	TTC	TGA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	G	
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	GGC	3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	CCG	5'

A3 = 5' GCC CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AGT CTT
GAC GAA AAT CTG CAT 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide A4 (utilisé pour la construction yUbi-A4 et yUbiF45W-A4)

		M1	Q2	I3	F4	V5	K6	T7	G	G	G
Matrice	5'	ATG	CAG	ATT	TTC	GTC	AAG	ACT	GGC	GGT	GGC
Oligo	3'	TAC	GTC	TAA	AAG	CAG	TTC	TGA	CCG	CCA	CCG

G	G	S	G	G	G	G	G	
GGT	GGC	AGC	GGC	GGT	GGC	GGT	GGC	3'
CCA	CCG	TCG	CCG	CCA	CCG	CCA	CCG	5'

A4 = 5' GCC ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC GCC AGT CTT
GAC GAA AAT CTG CAT 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide Agen (utilisé pour toutes les constructions en position A)

		K11	T12	I13	T14	L15	E16	V17		
Oligo	5'	AAA	ACC	ATA	ACA	TTG	GAA	GTT	G	3'
Matrice	3'	TTT	CGG	TAT	TGT	AAC	CTT	CAA	C	5'

Agen = 5' AAA ACC ATA ACA TTG GAA GTT G 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B1-F45W (utilisé pour la construction yUbiF45W-B1)

		D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	W45	W	T	W
Matrice	5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TGG	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	CCA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	K48	
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	5'

B1-F45W = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA ACC
GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B2-F45W (utilisé pour la construction yUbiF45W-B2)

		D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	W45	W	T	W
Matrice	5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TGG	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	CCA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	K	K48
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	AAA 3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	TTT 5'

B2-F45W = 5' TTT TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA
ACC GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B3-F45W (utilisé pour la construction yUbiF45W-B3)

		D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	W45	T	W	T
Matrice	5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TGG	ACC	TGG	ACC
Oligo	3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	CCA	TGG	ACC	TGG

W	E	N	G	K	W	T	W	K48
TGG	GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA 3'
ACC	CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT 5'

B3-F45W = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA GGT
ACC GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B4-F45W (utilisé pour la construction yUbiF45W-B4)

	D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	W45	G	G	G
Matrice 5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TGG	GGC	GGT	GGC
Oligo 3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	CCA	CCG	CCA	CCG

G	G	S	G	G	G	G	G	
GGT	GGC	AGC	GGC	GGT	GGC	GGT	GGC	3'
CCA	CCG	TCG	CCG	CCA	CCG	CCA	CCG	5'

B4-F45W = 5' GCC ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC GCC ACC
GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B1-WT (utilisé pour la construction yUbi-B1)

	D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	F45	W	T	W
Matrice 5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TTT	TGG	ACC	TGG
Oligo 3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	AAA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	K48	
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	5'

B1-WT = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AAA
GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 54^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B2-WT (utilisé pour la construction yUbi-B2)

	D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	F45	W	T	W
Matrice 5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TTT	TGG	ACC	TGG
Oligo 3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	CCA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	K	K48
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	AAA 3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	TTT 5'

B2-WT = 5' TTT TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AAA
GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' $T_m = 54^\circ\text{C}$

Oligonucléotide B3-WT (utilisé pour la construction yUbi-B3)

		D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	F45	T	W	T
Matrice	5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TTT	ACC	TGG	ACC
Oligo	3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	AAA	TGG	ACC	TGG

W	E	N	G	K	W	T	W	K48	
TGG	GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	3'
ACC	CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	5'

**B3-WT = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA GGT
AAA GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' T_m = 54°C**

Oligonucléotide B4-WT (utilisé pour la construction yUbi-B4)

		D39	Q40	Q41	R42	L43	I44	F45	G	G	G
Matrice	5'	GAT	CAA	CAA	AGA	TTG	ATC	TTT	GGC	GGT	GGC
Oligo	3'	CTA	GTT	GTT	TCT	ACC	TAG	AAA	CCG	CCA	CCG

G	G	S	G	G	G	G	G	G	
GGT	GGC	AGC	GGC	GGT	GGC	GGT	GGC	GGC	3'
CCA	CCG	TCG	CCG	CCA	CCG	CCA	CCG	CCG	5'

**B4-WT = 5' GCC ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC GCC AAA
GAT CCA TCT TTG TTG ATC 3' T_m = 54°C**

Oligonucléotide Bgen (utilisé pour toutes les constructions en position B)

		Q49	L50	E51	D52	G53	R54		
Oligo	5'	CAG	CTA	GAA	GAC	GGT	AGA	A	3'
Matrice	3'	TTT	CGG	TAT	TGT	AAC	CTT	T	5'

Bgen = 5' CAG CTA GAA GAC GGT AGA A 3' T_m=56°C

Oligonucléotide C1 (utilisé pour la construction yUbi-C1 et yUbiF45W-C1)

		T55	L56	S57	D58	Y59	N60	I61	W	T	W
Matrice	5'	AGC	CTG	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	TCG	GAC	AGA	CTA	ATG	TTG	TAA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	5'

C1 = 5' CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AAT GTT GTA
ATC AGA CAG GCT 3' **T_m = 58°C**

Oligonucléotide C2 (utilisé pour la construction yUbi-C2 et yUbiF45W-C2)

		T55	L56	S57	D58	Y59	N60	I61	W	T	W
Matrice	5'	AGC	CTG	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	TCG	GAC	AGA	CTA	ATG	TTG	TAA	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	S65
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AGC 3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TCG 5'

C2 = 5' GCT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA AAT GTT
GTA ATC AGA CAG GCT 3' **T_m = 58°C**

Oligonucléotide C3 (utilisé pour la construction yUbi-C3 et yUbiF45W-C3)

		S57	D58	Y59	N60	I61	Q62	K63	W	T	W
Matrice	5'	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	CAG	AAG	TGG	ACC	TGG
Oligo	3'	AGA	CTA	ATG	TTG	TAA	GTC	TTC	ACC	TGG	ACC

E	N	G	K	W	T	W	S65
GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AGC 3'
CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TCG 5'

C3 = 5' GCT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA CTT CTG
AAT GTT GTA ATC AGA 3' **T_m = 58°C**

Oligonucléotide C4 (utilisé pour la construction yUbi-C4 et yUbiF45W-C4)

		T55	L56	S57	D58	Y59	N60	I61	G	G	G
Matrice	5'	AGC	CTG	TCT	GAT	TAC	AAC	ATT	GGC	GGT	GGC
Oligo	3'	TCG	GAC	AGA	CTA	ATG	TTG	TAA	CCG	CCA	CCG

G	G	S	G	G	G	G	G	G	
GGT	GGC	AGC	GGC	GGT	GGC	GGT	GGC	GGC	3'
CCA	CCG	TCG	CCG	CCA	CCG	CCA	CCG	CCA	5'

**C4 = 5' GCC ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC GCC AAT GTT
GTA ATC AGA CAG GCT 3' T_m = 58°C**

Oligonucléotide Cgen (utilisé pour toutes les constructions en position C)

		T66	L67	H68	L69	V70	L71	R72	
Oligo	5'	ACC	TTA	CAT	CTT	GTG	CTA	AGG	3'
Matrice	3'	TGG	AAT	GTA	GAA	CAC	GAT	TCC	5'

Cgen = 5' ACC TTA CAT CTT GTG CTA AGG 3' T_m=60°C

Oligonucléotide D1 (utilisé pour les constructions yUbi-D1 et yUbiF45W-D1)

		L71	R72	L73	R74	G75	G76	T	W	T	
Matrice	5'	G	CTA	AGG	CTA	AGA	GGT	GGT	ACC	TGG	ACC
Oligo	3'	C	GAT	GCC	GAT	TCT	CCA	CCA	TGG	ACC	TGG

W	E	N	G	K	W	T	W	K	
TGG	GAA	AAC	GGC	AAA	TGG	ACC	TGG	AAA	3'
ACC	CTT	TTG	CCG	TTT	ACC	TGG	ACC	TTT	5'

**D1 = 5' TTT CCA GGT CCA TTT GCC GTT TTC CCA GGT CCA ACC ACC
TCT TAG CCG TAG C 3' T_m = 60°C**

Oligonucléotide Dgen (utilisé pour les constructions yUbi-D1 et yUbiF45W-D1)

		Stop	A	Stop	-	-	-	-	
Oligo	5'	TAA	GCT	TAA	TTA	GCT	GAG	CTT	G 3'
Matrice	3'	ATT	CGA	ATT	AAT	CGA	CTC	GAA	C 5'

Dgen = 5' TAA GCT TAA TTA GCT GAG CTT G 3' T_m=60°C

Appendice IV

Données brutes de fluorescence à l'équilibre

Intensités de fluorescence extrapolées au temps infini des traces cinétiques de dénaturation à 298K en fonction de la concentration de GdnHCl.

Toutes les réactions ont été réalisées dans du tampon acétate de sodium 25 mM pH 5,0.

yUbiF45W

