

Université de Montréal

**Recréer et comprendre les mécanismes de liaison des  
biomolécules à l'aide d'un modèle d'ADN**

par

Carl Prévost-Tremblay

Université de Montréal, département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en biochimie

Avril 2016

© Carl Prévost-Tremblay, 2016

## Résumé

La reconnaissance moléculaire joue un rôle central dans tous les processus biologiques ainsi que dans le développement de nouvelles biotechnologies. Depuis les 60 dernières années, deux mécanismes de reconnaissance moléculaire ont permis de décrire le couplage entre la liaison et le changement conformationnel observé chez les biomolécules. Le mécanisme par ajustement induit a lieu lorsque le ligand se lie à l'état inactif de la biomolécule et induit un changement de conformation vers la forme active. Le mécanisme par sélection conformationnelle, quant à lui, a lieu lorsque le ligand se lie directement à l'état spontanément actif de plus faible population et le stabilise, déplaçant ainsi la population de biomolécule vers cet état. Bien que nous connaissons des exemples de protéines qui fonctionnent selon chacun de ces mécanismes, nous ne comprenons pas encore les différences entre les performances de ces mécanismes ni les déterminants moléculaires qui leur donnent lieu. Une compréhension approfondie de ces mécanismes nous permettrait de mieux comprendre pourquoi certaines protéines ont évolué selon un mécanisme en particulier ainsi que de s'inspirer de ces mécanismes pour le développement de biotechnologies finement régulées.

Jusqu'à aujourd'hui, ces deux mécanismes ont exclusivement été étudiés dans le contexte des biomolécules naturelles, principalement des protéines, dont la complexité dynamique et structurale rend difficile la comparaison et la manipulation individuelle des différents paramètres thermodynamiques. Il est donc particulièrement ardu de caractériser le rôle de chacun de ces paramètres quant à la sélection et la performance de ces mécanismes. Pour contourner ces limitations expérimentales, nos travaux de recherche se sont intéressés à recréer ces mécanismes à l'aide d'interrupteurs d'ADN fluorescents pour lesquels il est possible de prédire et de modifier la structure et les propriétés thermodynamiques ainsi que d'en mesurer l'activation en temps réel. Ce faisant, il a été possible d'observer que le mécanisme par ajustement induit est obtenu lorsque le site de liaison est partiellement accessible dans l'état inactif. Nous avons aussi observé que ce mécanisme permet une activation et une désactivation jusqu'à 10 000 fois plus rapide que la sélection conformationnelle, qui par contraste, donne lieu à une activation plus lente ainsi qu'à un maintien prolongé de l'activation. Ces différences cinétiques suggèrent ainsi un rôle évolutif distinct pour chacun et laissent envisager des applications en biotechnologies pour l'optimisation de la cinétique.

**Mots-clés** : Ajustement induit, sélection conformationnelle, mécanismes de liaison, changement conformationnel, régulation, cinétique, thermodynamique, interrupteur d'ADN

## **Abstract**

Molecular recognition plays a central role in almost every biological and biotechnological process. Over the last 60 years, two molecular recognition mechanisms have been used to appropriately describe the coupling between binding and conformational change in biomolecules. The induced fit mechanism takes place when ligand binding to the inactive state of the biomolecule induces the conformational change leading to the active state. On the other hand, in the conformational selection mechanism, where active and inactive states exist in equilibrium, the ligand binds selectively to the active state of the biomolecule and shifts the equilibrium towards this state by stabilizing it. Even though these mechanisms have been widely studied, it is still unclear if they differ in performance or how each mechanism can be modulated. Such a fundamental understanding of the differences between these mechanisms would shed light on the reasons for an apparent selective pressure driving the use of a specific mechanism for a given biomolecule and would also allow us to engineer new biomolecules which would benefit from the strengths of these mechanisms.

To date, both mechanisms have been exclusively studied in the context of naturally occurring biomolecules, mainly proteins, whose structural and dynamic complexity as well as diversity seem to prevent comparison and manipulation of specific and individual thermodynamic parameters. Consequently, only little progress has been made towards characterizing the role of certain key thermodynamic parameters on the selection and performance of the mechanism. To circumvent this limitation, we have reproduced these mechanisms using simple fluorescent DNA constructs allowing for reliable prediction and variation of both structure and thermodynamics as well as real time monitoring of the activation process in presence of a DNA target. These DNA "switches" allowed us to determine that an induced fit mechanism occurs when the binding site is partially available in the inactive state and that this mechanism allows for a faster activation and deactivation (up to four orders of magnitude) compared to a conformational selection mechanism, which in contrast corresponds to a slower activation and deactivation, leading to a longer activation period. The observed kinetic differences between these mechanisms points towards potential uses for both in different areas of biotechnology as well as some rationale behind evolution favoring one mechanism over the other for a given protein.

**Keywords** : Induced fit, conformational selection, binding mechanism, conformational change, regulation, kinetics, thermodynamics, DNA switch

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 : Introduction.....	16
1.1 Évolution de notre vision de l'interaction entre biomolécules.....	16
1.1.1 Le modèle "clé-serrure".....	16
1.1.2 Le modèle de l'ajustement induit.....	17
1.1.3 Le modèle de sélection conformationnelle.....	19
1.2 Méthodes d'identification des mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle.....	20
1.2.1 Méthodes cinétiques pour l'identification du mécanisme.....	21
1.2.2 Schéma de liaison des mécanismes.....	33
1.2.3 Détermination du flux à travers chaque mécanisme.....	36
1.3 Rôle et performances des mécanismes.....	38
1.3.1 Spécificité de la reconnaissance par l'ajustement induit.....	38
1.3.2 L'ajustement induit accélère le repliement des protéines intrinsèquement désordonnées.....	40
1.3.3 Promiscuité de la reconnaissance par sélection conformationnelle et enjeux évolutifs.....	42
1.3.4 Limitations des connaissances et des méthodes actuelles.....	44
1.4 L'ADN comme système modèle pour l'étude des mécanismes de reconnaissance moléculaire.....	45
1.4.1 Survol de la structure de l'ADN.....	45

1.4.2 Stabilité de l'ADN et prédiction de structure .....	47
1.4.3 Systèmes dynamiques : les interrupteurs d'ADN.....	48
1.4.4 Les interrupteurs d'ADN comme système modèle pour l'étude de processus biochimiques complexes.....	50
1.5 Objectifs et hypothèses .....	54
Chapitre 2 : Méthodologie .....	56
2.1 Ingénierie, synthèse et purification d'oligonucléotides.....	56
2.2 Séquences des oligonucléotides utilisés.....	57
2.3 Courbes de dénaturation à l'urée.....	58
2.4 Cinétique des interrupteurs .....	59
Chapitre 3 : Résultats .....	61
3.1 Structure du modèle d'ADN.....	61
3.2 L'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) influence la cinétique d'activation.....	64
3.3 La différence de vitesse observée entre les boucles 1 et 13 résulte de l'utilisation de mécanismes différents.....	69
3.4 L'activation et la désactivation d'un interrupteur se font via le même mécanisme.....	72
3.5 La vitesse de l'ajustement induit est contrôlée par $K_D^{\text{off}}$ .....	75
Chapitre 4: Discussion .....	77
4.1 L'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) est un paramètre déterminant pour le mécanisme d'activation et de désactivation .....	77
4.2 Les différences cinétiques entre les mécanismes.....	79
4.2.1 Cinétique d'activation des deux mécanismes.....	80
4.2.2 Cinétique de désactivation des deux mécanismes .....	81
4.2.3 Comparaison cinétique des deux mécanismes.....	81
4.2.4 Cinétique des mécanismes : sommaire .....	83
4.3 Perspectives d'avenir pour l'étude de ces mécanismes à l'aide d'interrupteurs d'ADN... 84	
4.3.1 Étude des différents régimes cinétiques.....	84
4.3.2 Étudier la spécificité ou la sélectivité de chaque mécanisme .....	85
4.4 Applications de ces mécanismes en nanotechnologies.....	86
4.4.1 Utilisation de ces mécanismes dans le contexte des biosenseurs .....	87
4.4.2 Contrôle cinétique de la livraison de composés thérapeutiques .....	89

4.5 Rôle de ces mécanismes dans l'évolution naturelle des biomolécules.....	90
Conclusion .....	93
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Expressions des constantes de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) du modèle à trois états simplifié .....	i
Annexe 2 : Caractérisation de la phase cinétique rapide de l'interrupteur à boucle de 13 nucléotides. ....	iv

## Liste des tableaux

Table I. Relation entre $k_{\text{obs}}$ et les différents paramètres cinétiques et thermodynamiques de chaque mécanisme.....	32
---	----

## Liste des figures

Figure 1. Représentation du mécanisme de liaison par ajustement induit.....	18
Figure 2. Représentation du mécanisme de liaison par sélection conformationnelle.....	19
Figure 3. Approximation cinétique de pseudo-premier ordre.....	22
Figure 4. Schéma réactionnel de l'ajustement induit en pseudo-premier ordre.....	23
Figure 5. Schéma réactionnel de la sélection conformationnelle en pseudo-premier ordre.....	24
Figure 6. Simulation de la constante de vitesse observée en fonction de la concentration du réactif en excès pour le modèle de liaison par sélection conformationnelle.....	25
Figure 7. Relation entre la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) et la concentration de ligand pour différents mécanismes de liaison.....	28
Figure 8. Modèle à trois états simplifié des mécanismes d'activation par sélection conformationnelle et par ajustement induit.....	30
Figure 9. Schéma réactionnel à quatre états reliant les mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle.....	34
Figure 10. Le flux fractionnel à travers chaque mécanisme dépend des concentrations de ligand et de protéine.....	37
Figure 11. Schéma réactionnel de la polymérase d'ADN T7 et constantes de vitesse des étapes élémentaires pour l'incorporation d'un nucléotide correct ou incorrect.....	39
Figure 12. La promiscuité de la reconnaissance moléculaire résulte parfois de la diversité conformationnelle des protéines.....	43
Figure 13. Structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN).....	46
Figure 14. Régulation de la traduction par changement conformationnel d'un ARN messenger.....	48
Figure 15. Représentation schématique de l'activation d'une balise moléculaire.....	49
Figure 16. L'affinité, la plage dynamique et le bruit de fond d'un interrupteur moléculaire sont couplés à l'équilibre conformationnel.....	51
Figure 17. Effet de l'affinité de la cible sur la coopérativité de la liaison.....	52
Figure 18. Représentation schématique de l'interrupteur d'ADN utilisé pour recréer les mécanismes de liaison par ajustement induit et par sélection conformationnelle.....	63

Figure 19. Les interrupteurs à boucle de 1 et 13 nucléotides possèdent un équilibre conformationnel ( $K_S$ ) similaire.....65

Figure 20. Effet de l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{\text{off}}$ ) sur la cinétique des interrupteurs.....68

Figure 21. Effet du  $K_S$  sur la concentration à l'équilibre des états actifs et inactifs et sur la vitesse d'activation ( $k_{\text{obs}}$ ) des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides.....71

Figure 22. Effet de  $K_D^{\text{on}}$  sur les concentrations à l'équilibre des états actifs lié et non-lié ainsi que sur la vitesse de désactivation ( $k_{\text{obs}}$ ) des interrupteurs avec une boucle de 1 et 13 nucléotides.....74

Figure 23. Effet de la longueur de la boucle sur la cinétique d'activation des interrupteurs.....76

Figure A1. Relation entre les différents paramètres des deux phases cinétiques de la boucle 13.....V

## Liste des sigles

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : Adénosine monophosphate kinase

ATP : Adénosine triphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

DHFR : Dihydrofolate réductase

NADPH : Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate

ADN : Acide désoxyribonucléique

dATP : Désoxyadenosine triphosphate

dCTP : Désoxycytosine triphosphate

dGTP : Désoxyguanosine triphosphate

dTTP : Désoxythymidine triphosphate

qPCR : Méthode quantitative de la réaction en chaîne de la polymérase (*quatitative polymerase chain reaction*)

IDP : Protéine intrinsèquement désordonnée (*intrinsically disordered protein*)

CNBD : Domaine de liaison aux nucléotides cycliques (*cyclic nucleotide binding domain*)

SNP : Polymorphisme nucléotidique unique (*single nucleotide polymorphism*)

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (*high performance liquid chromatography*)

TCR : Récepteur des cellules *T* (*T-cell receptor*)

$k_L$  : Constante de vitesse de liaison

$k_{-L}$  : Constante de vitesse de dissociation

$k_L'$  : Constante de vitesse de liaison avec l'état inactif

$k_{-L}'$  : Constante de dissociation à partir de l'état inactif

$k_s$  : Constante de vitesse du changement conformationnel vers l'état actif

$k_{-s}$  : Constante de vitesse du changement conformationnel de retour vers l'état inactif

$k_s'$  : Constante de vitesse du changement conformationnel vers l'état actif en présence de ligand

$k_{-s}'$  : Constante de vitesse du changement conformationnel de retour vers l'état inactif en présence de ligand

$K_D^{\text{on}}$  : Constante d'équilibre de dissociation du ligand avec l'état actif

$K_D^{\text{off}}$  : Constante d'équilibre de dissociation du ligand avec l'état inactif

$K_S$  : Constante d'équilibre conformationnel

$K_S'$  : Constante d'équilibre conformationnel en présence de ligand

## Liste des abréviations

Éq. : Équation

*Je dédie ce mémoire à mon lecteur.*

*"What I cannot create, I do not understand."*

*-Richard Feynman*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude envers le professeur Alexis Vallée-Bélisle pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour avoir été si généreux de son temps et de son expertise. J'aimerais remercier mes collègues Arnaud Desrosiers et David Gareau pour leur assistance technique et pour ces innombrables échanges si enrichissants. Je remercie aussi Liliana Pedro pour son assistance organisationnelle ainsi que pour ses commentaires constructifs sur ce manuscrit. J'ai une pensée spéciale pour les professeurs qui ont contribué à mon cheminement et qui m'ont permis, directement ou indirectement, d'en arriver à la réalisation de ce mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents et amis pour leur support et leurs encouragements.

# Chapitre 1 : Introduction

Une condition essentielle au maintien de l'homéostasie est la capacité des cellules à détecter les signaux de leur environnement et à les intégrer dans une prise de décision moléculaire favorisant leur adaptation. Cette prise de décision, encodée dans un réseau complexe d'interactions moléculaire, requiert souvent une cascade d'événements de transduction du signal aboutissant à l'activation d'un effecteur dont la fonction permettra de retrouver un équilibre bénéfique pour le système. Par exemple, en présence de faibles niveaux d'énergie, la liaison de l'AMP à la protéine AMPK entraîne un changement de conformation de la protéine qui peut alors réguler positivement des processus menant à la production d'ATP pour ainsi retrouver un niveau d'énergie suffisant <sup>(1)</sup>. Nous savons depuis longtemps que ces changements conformationnels liés à la reconnaissance moléculaire jouent un rôle central dans la régulation des processus biochimiques de tous les organismes <sup>(2, 3)</sup>. Toutefois, notre compréhension fondamentale de ces mécanismes demeure très limitée <sup>(3)</sup>. En effet, il est encore très difficile de comparer expérimentalement ces mécanismes et de caractériser les différences entre leurs performances. Avec l'avènement de nouvelles approches expérimentales, nous croyons toutefois qu'il sera possible de recréer artificiellement ces mécanismes à l'aide d'un modèle simple pour ainsi nous permettre de mieux les étudier.

## 1.1 Évolution de notre vision de l'interaction entre biomolécules

### 1.1.1 Le modèle "clé-serrure"

La reconnaissance spécifique des biomolécules et la formations de complexes moléculaires précis jouent un rôle central dans d'innombrables processus biologiques, tels que la reconnaissance anticorps-antigène dans la réponse immunitaire, la catalyse enzymatique et le métabolisme ainsi que pour la transcription et la traduction. La première explication de la spécificité au niveau moléculaire, le modèle "clé-serrure", a été introduite par Emil Fischer en 1894. Pour expliquer la spécificité catalytique de l'enzyme invertase, qui hydrolyse les  $\alpha$ -glucosides mais pas leurs stéréoisomères  $\beta$ , et de l'enzyme emulsin, qui hydrolyse seulement les  $\beta$ -glucosides, Emil Fischer propose que les enzymes parviennent à reconnaître un substrat correct de la même façon qu'une clé qui peut seulement reconnaître la serrure correspondante

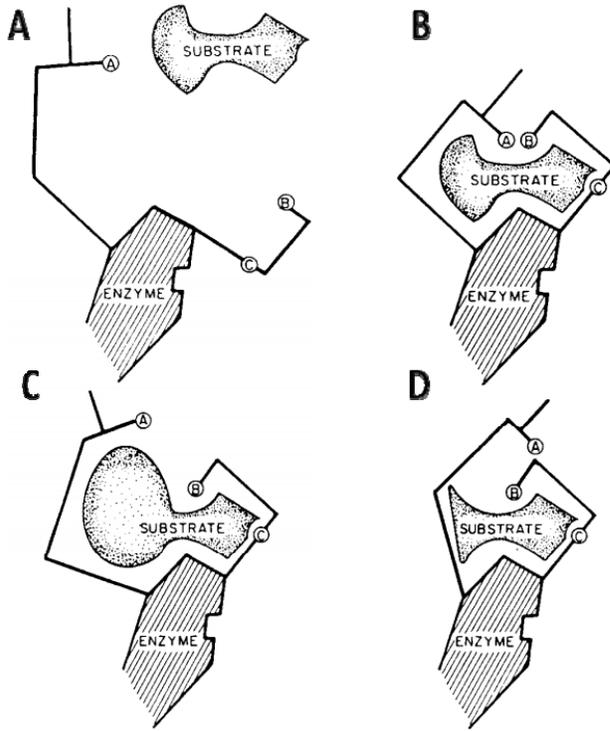
(4). Ce modèle propose que seulement le substrat possédant une géométrie et une distribution de charges parfaitement complémentaires au site actif d'une enzyme pourra s'y fixer et être bien positionné pour que les groupements fonctionnels de l'enzyme contribuent à la réaction (5).

Bien que ce modèle ait été suffisant pour la communauté scientifique de l'époque, il a dû être adapté au fil du temps pour expliquer certaines observations qui ne pouvaient être expliquées au départ. Cinquante ans plus tard, Linus Pauling propose que la surface de l'enzyme doit posséder une complémentarité optimale, non pas avec le substrat dans sa configuration fondamentale, mais plutôt avec le substrat dans son état de transition (6). Ce raisonnement était nécessaire pour expliquer la catalyse enzymatique, qui implique une stabilisation de l'état de transition et une diminution de la barrière d'activation. En suivant cette idée, William P. Jencks propose 20 ans plus tard qu'un anticorps reconnaissant un analogue de l'état de transition pourrait servir de catalyseur (7). Toutefois, ces anticorps catalytiques ne peuvent rivaliser avec les enzymes naturelles dont le pouvoir catalytique est de plusieurs ordres de grandeur supérieur (8). Cette différence de pouvoir catalytique s'explique en partie par le fait que, contrairement aux enzymes, les anticorps ne possèdent pas les changements conformationnels bénéfiques pour la catalyse (9). Ces découvertes ont été parmi les premières à mettre en valeur l'importance des changements conformationnels dans la fonction des biomolécules.

### **1.1.2 Le modèle de l'ajustement induit**

Une variation au modèle "clé-serrure" fut apportée par Daniel E. Koshland Jr. en 1958, soit celle de la théorie de l'ajustement induit (*induced-fit* en anglais) (10). C'est en réfléchissant au fait que les kinases doivent absolument empêcher les molécules d'eau d'entrer au site actif que l'idée lui est venue. En effet, comme l'eau est un nucléophile, tout aussi capable d'attaquer le phosphate gamma de l'ATP que le groupement OH du glucose, et est présente à une concentration de 55 M, l'eau comblerait rapidement n'importe quel site actif libre et compétitionnerait avec le glucose pour l'attaque nucléophile sur l'ATP, résultant en une perte massive d'énergie (10). Koshland souligne aussi que l'inhibition non-compétitive, où l'activité enzymatique est diminuée même si la liaison du substrat n'est pas affectée par la liaison de l'inhibiteur, ne peut pas être expliquée par le modèle "clé-serrure". Afin d'expliquer ces

phénomènes, il propose la théorie de l'ajustement induit, où la liaison avec le bon substrat entraîne un changement de structure de la protéine qui aligne correctement les acides-aminés catalytiques <sup>(11)</sup> (Figure 1).



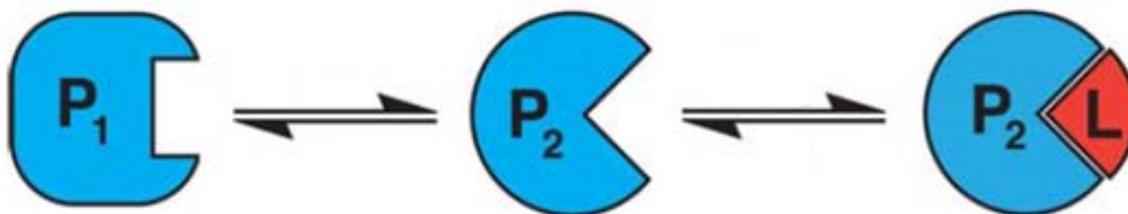
**Figure 1. Représentation du mécanisme de liaison par ajustement induit.** Les lignes noires représentent les chaînes de la protéine qui portent les groupements catalytiques *A* et *B* ainsi que le site de liaison *C*. **(A)** Substrat et enzyme dissociés. **(B)** Substrat et enzyme associés avec changement conformationnel de l'enzyme menant à l'alignement des résidus catalytiques *A* et *B* pour la réaction. **(C et D)** Mauvais substrat associé à l'enzyme menant à un alignement incorrect des résidus catalytiques. Figure tirée de <sup>(10)</sup>.

Comme au moment de la formulation de cette théorie il n'y avait aucune évidence directe d'un changement de structure induit par la liaison d'un substrat, ce modèle devait encore être validé. Pour ce faire, Koshland et Yankeelov proposent que, selon le modèle "clé-serrure", la liaison d'un substrat peut masquer un groupement chimique mais ne peut pas en exposer un qui n'est pas déjà exposé dans la structure de l'enzyme sans substrat, alors que selon le modèle de l'ajustement induit, cela est possible <sup>(12)</sup>. En utilisant l'enzyme phosphoglucomutase, ils ont montré qu'il y avait une augmentation de l'alkylation d'une cystéine par l'iodoacetamide seulement en présence du substrat approprié, le glucose phosphate <sup>(12)</sup>. Il s'agit donc d'une observation directe de ce changement de structure induit par le substrat qui permet d'exposer une cystéine.

De nos jours, grâce à la cristallographie, nous avons observé d'innombrables cas où la structure cristalline de l'enzyme en présence de substrat (ou ligand) est différente de celle en absence de substrat <sup>(13)</sup>. De plus, ce modèle de régulation a été élargi pour expliquer le comportement de biomolécules catalytiques et non-catalytiques <sup>(3)</sup>. Ces différences structurales en présence de ligand ont longtemps été utilisées pour justifier le fait que la liaison du ligand induise le changement de conformation, c'est à dire que ce changement de conformation survienne après la liaison du ligand, mais est-ce vraiment toujours le cas ?

### 1.1.3 Le modèle de sélection conformationnelle

Depuis la découverte de l'existence de multiples conformations pour une seule et même protéine et l'introduction du modèle énergétique en forme d'entonnoir <sup>(14)</sup>, le modèle de liaison par ajustement induit a été remis en question. En effet, l'hétérogénéité conformationnelle des protéines implique que l'observation de différences structurales entre la protéine liée et non-liée n'est pas suffisante pour affirmer que le ligand est nécessaire pour induire ce changement de conformation<sup>(3)</sup>. La question qu'il faut maintenant se poser est la suivante: le ligand induit-il le changement de conformation (ajustement induit) ou se lie-t-il préférentiellement à un état préexistant de haute énergie et le stabilise, résultant en un déplacement de la population vers cette dernière conformation (sélection conformationnelle) (Figure 2) ?



**Figure 2. Représentation du mécanisme de liaison par sélection conformationnelle.** La protéine  $P$  est en équilibre entre une conformation inactive ( $P_1$ ) et une conformation active ( $P_2$ ) en absence de ligand. La liaison du ligand ( $L$ ) avec l'état actif ( $P_2$ ) le stabilise et déplace l'équilibre vers cet état. Figure adaptée de<sup>(15)</sup>.

Auparavant, il était très difficile de caractériser la structure de conformations autres que la conformation majoritaire de plus faible énergie, les structures cristallines représentant une moyenne de l'ensemble conformationnel du cristal. Récemment, avec l'arrivée de techniques complémentaires, telles la diffraction de rayons-X en temps résolu (*time resolved*

*x-ray diffraction*), la résonance magnétique nucléaire (*RMN*), ainsi que la spectroscopie de molécules uniques (*single molecule spectroscopy*), il est désormais possible de révéler la présence de conformations de plus haute énergie (faibles populations) qui ressemblent à l'état lié même en absence de ligand <sup>(16-18)</sup>. Grâce au mécanisme de sélection conformationnelle, on a ainsi pu expliquer le comportement de certaines protéines pour lesquelles il est possible de déplacer l'équilibre vers la conformation active ( $P_2$ ) en absence de ligand à l'aide de mutations spécifiques <sup>(19)</sup>. Ces observations ont suscité un intérêt grandissant pour ce modèle et ont souvent été utilisées à titre de preuves pour affirmer que la protéine en question reconnaît son ligand par sélection conformationnelle <sup>(20)</sup>. Toutefois, il est maintenant clair que ni l'identification d'un état structurellement similaire à l'état lié en absence de ligand, ni l'identification d'une mutation qui favorise un tel état n'est une preuve suffisante pour confirmer le mécanisme de liaison d'une biomolécule <sup>(21)</sup>. En effet, même si un tel état ( $P_2$ ) existe au sein de l'ensemble conformationnel d'une protéine, il est possible que la liaison du ligand directement à cet état ne soit pas le chemin cinétiquement favorisé (par exemple si la concentration de cet état est trop basse). Il semble alors que le seul type d'approche qui permette d'identifier hors de tout doute le mécanisme de liaison relève de la cinétique <sup>(21)</sup>.

## **1.2 Méthodes d'identification des mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle**

Encore aujourd'hui, les méthodes expérimentales pour identifier les mécanisme de liaison des biomolécules font l'objet de nombreux débats. Comme mentionné précédemment, l'existence d'une conformation structurellement similaire à la forme liée (*bound-like*) a déjà été considérée comme une preuve suffisante pour affirmer que le mécanisme par sélection conformationnelle était utilisé <sup>(20)</sup>. Toutefois, plusieurs articles récents ont souligné le fait que la simple présence de cet état de plus haute énergie ne suffise pas à prouver que c'est cet état soit impliqué dans le chemin réactionnel menant à l'activation <sup>(21-23)</sup>. Par exemple, certaines protéines passent d'une conformation ouverte à une conformation fermée après liaison du ligand. Puisque ce changement de conformation implique ce qui s'apparente à la fermeture d'un couvercle au dessus du site actif, il est impossible que le ligand interagisse initialement avec l'état fermé, ce qui correspondrait au mécanisme par ajustement induit <sup>(24)</sup>. Comme il n'est pas possible de déterminer dans quel ordre se produisent les événements de liaison et de

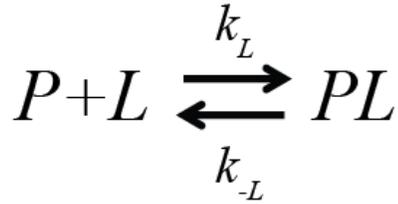
changement conformationnel à l'aide de structures statiques, en présence et en absence de ligand, les méthodes cinétiques semblent être une avenue de choix pour élucider ce mystère (21).

## **1.2.1 Méthodes cinétiques pour l'identification du mécanisme**

### **1.2.1.1 Distinction des mécanismes par variation de la concentration de chaque réactif en pseudo-premier ordre**

Une pratique courante pour l'étude cinétique de réactions de liaison (ordre 2) est de procéder aux expériences en présence d'excès d'un des deux réactifs. De cette façon, la concentration de l'espèce en excès peut être considérée comme constante et être incluse dans la constante de vitesse. L'équation de vitesse peut alors être exprimée en fonction de la concentration de l'espèce minoritaire seulement, ce qui en facilite l'intégration mathématique et l'analyse des données (Figure 3). Cette approximation peut aussi être utilisée en dehors de son cadre mathématique pour mettre en évidence une différence cinétique entre les deux mécanismes de liaison. Prenons par exemple une réaction de liaison entre la protéine  $P$ , avec une conformation inactive  $P_1$  et une conformation active  $P_2$ , et son ligand  $L$ . Le mécanisme de couplage entre le changement conformationnel et la liaison par ajustement induit peut être schématisé par un modèle à trois états (Figure 4).

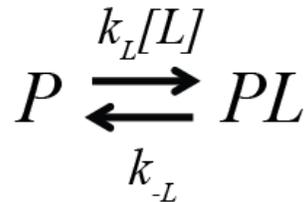
## Ordre 2



$$\frac{d[PL]}{dt} = k_L[P][L] - k_{-L}[PL]$$

*Impossible à intégrer directement*

## Pseudo-ordre 1 ( $[L] \gg [P]$ )



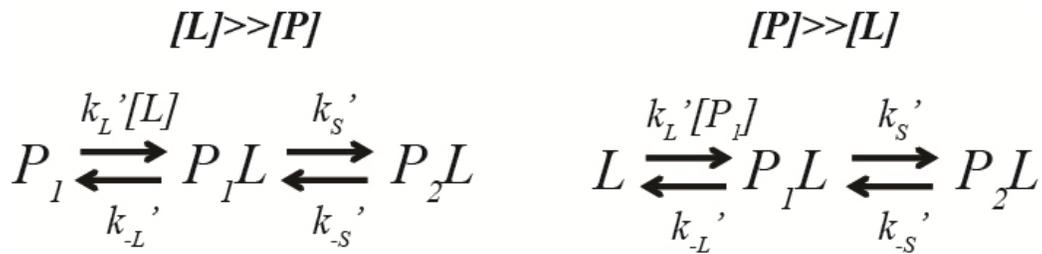
$$\frac{d[PL]}{dt} = k_L^*[P] - k_{-L}[PL]$$

$$[PL]_t = [PL]_{eq} (1 - \exp^{-(k_L^* + k_{-L})t}) \quad \text{Éq. 1}$$

$$k_{obs} = k_L^* + k_{-L} \quad \text{Éq. 2}$$

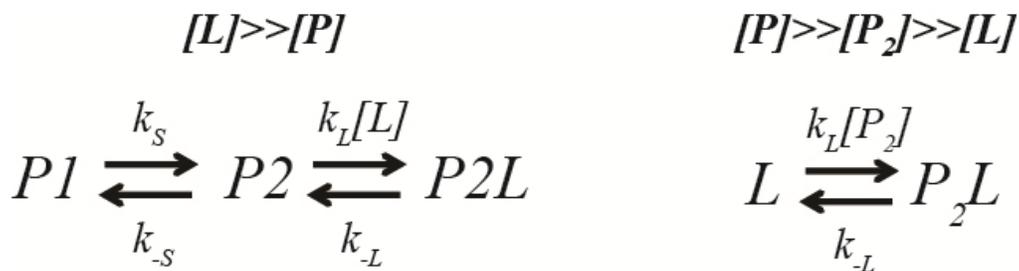
$$k_L^* = k_L[L]_{tot} \quad \text{Éq. 3}$$

**Figure 3. Approximation cinétique de pseudo-premier ordre. (Haut)** Schéma réactionnel et loi de vitesse pour un processus de liaison réversible d'ordre 2. Cette loi de vitesse ne peut être intégrée que sous certaines conditions, dont l'approximation de pseudo-premier ordre. **(Bas)** Schéma réactionnel et loi de vitesse intégrée pour un processus de liaison réversible de pseudo-premier ordre avec excès de le ligand  $L$  par rapport à la protéine  $P$ . Dans ces conditions, la loi de vitesse peut être intégrée de façon à exprimer la concentration du complexe lié  $[PL]_t$  en fonction de la concentration de ce complexe à l'équilibre  $[PL]_{eq}$ , des constantes de vitesses élémentaires  $k_L^*$  ( $k_L[L]_{tot}$ ),  $k_{-L}$  et du temps  $t$  <sup>(25, 26)</sup>. Les constantes  $k_L^*$  et  $k_{-L}$  sont contenues dans la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) <sup>(26)</sup>.



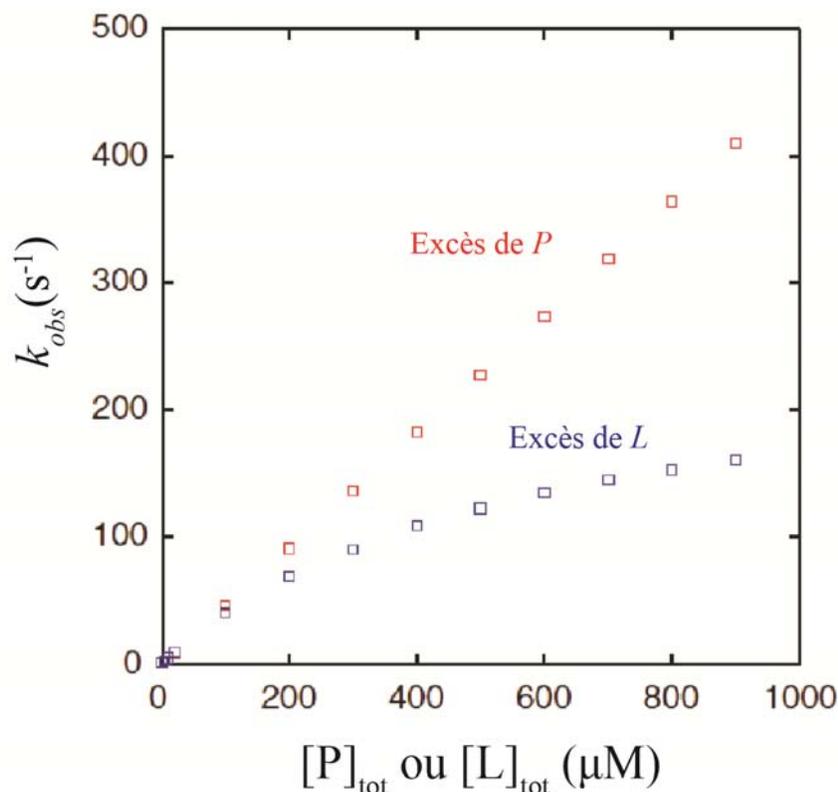
**Figure 4. Schéma réactionnel de l'ajustement induit en pseudo-premier ordre. (Gauche)** Schéma réactionnel pour la liaison de la protéine  $P$  avec un excès de son ligand  $L$ . **(Droite)** Schéma réactionnel pour la liaison de la protéine  $P$  en excès avec son ligand  $L$ . La protéine  $P$  possède une conformation inactive  $P_1$  et une conformation active  $P_2$  stabilisée par le ligand.

Une interprétation simple de ces schémas permet de constater qu'en raison de leur symétrie, peu importe si la protéine ( $P$ ) ou le ligand ( $L$ ) est en excès, une augmentation de la concentration du réactif en excès entraînera, dans les deux cas, une augmentation similaire de la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) pour la formation du complexe  $P_2L$  <sup>(27)</sup>. Cette constante de vitesse observée est obtenue par ajustement des données cinétiques expérimentales à l'équation 1. La constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) correspond à l'étape cinétiquement limitante, c'est à dire l'étape la plus lente entre la liaison ( $L + P_1 \leftrightarrow P_1L$ ) ou le changement conformationnel ( $P_1L \leftrightarrow P_2L$ ). La constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) varie linéairement avec la concentration du réactif en excès (équations 2 et 3) lorsque l'étape de liaison est cinétiquement limitante. Toutefois, à de hautes concentrations du réactif en excès, la réaction peut devenir cinétiquement limitée par le changement conformationnel, dont la vitesse ne varie pas avec la concentration de ligand ( $k_{\text{obs}} = k_S' + k_{-S}'$ ). Ceci entraînera la saturation de la constante de vitesse observée ce qui résultera en une courbe hyperbolique croissante de la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) en fonction de la concentration du réactif en excès (Figure 6, courbe bleue) <sup>(27)</sup>. Par contre, lorsqu'on applique cette analyse au modèle de liaison par sélection conformationnelle, une différence diagnostique peut être mise en évidence (Figure 5).



**Figure 5. Schéma réactionnel de la sélection conformationnelle en pseudo-premier ordre.** **(Gauche)** Schéma réactionnel pour la liaison de la protéine  $P$  avec un excès de son ligand  $L$  par sélection conformationnelle. **(Droite)** Schéma réactionnel pour la liaison de la protéine  $P$  en excès avec son ligand  $L$ . La protéine  $P$  est en équilibre entre une conformation inactive  $P_1$  et une conformation active  $P_2$ .

Dans le cas où la concentration du ligand  $L$  est en excès (figure 5, gauche), le mécanisme par sélection conformationnelle ne peut pas être distingué du mécanisme par ajustement induit. En effet, l'augmentation de la constante de vitesse observée en fonction de la concentration de ligand sera encore saturée à la vitesse du changement conformationnel lorsque cette étape sera cinétiquement limitante (c'est-à-dire lente). Une courbe hyperbolique croissante de la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) en fonction de la concentration de  $L$  sera obtenue <sup>(27)</sup>. Toutefois, lorsque la protéine  $P$  est en excès, il est possible que la conformation de plus haute énergie  $P_2$  soit aussi en excès par rapport au ligand, la réaction se comportera alors comme une simple réaction pseudo-premier ordre en une étape (sans changement conformationnel). Dans ce cas, le changement conformationnel n'est plus limitant puisque la totalité du ligand se lie directement à l'état de plus haute énergie  $P_2$  présent initialement. Un graphique représentant la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) pour la formation de  $P_2L$  en fonction de la concentration de la protéine  $P$  montrera alors une droite plutôt qu'une hyperbole (Figure 6, courbe rouge) <sup>(27)</sup>. Cette approche a été utilisée pour décrire le mécanisme de liaison par sélection conformationnelle d'un domaine PDZ mutant avec son peptide ligand <sup>(28)</sup>.



**Figure 6. Simulation de la constante de vitesse observée en fonction de la concentration du réactif en excès pour le modèle de liaison par sélection conformationnelle.** La courbe rouge montre une relation linéaire entre la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) et la concentration de la protéine  $P$  en excès. La courbe bleu montre que cependant, la relation entre  $k_{obs}$  et la concentration de  $L$  (ligand) est hyperbolique lorsque  $L$  est en excès pour le mécanisme par sélection conformationnelle. Figure adaptée de <sup>(27)</sup>.

Malgré la simplicité de cette approche, quelques limitations expérimentales y sont liées. Premièrement, bien que l'approximation de pseudo-premier ordre nécessite généralement une concentration au moins dix fois plus élevée du réactif en excès, il faut se rappeler que nous cherchons ici à avoir un excès de la conformation spontanément active de haute énergie ( $P_2$ ). Comme la fraction de l'ensemble conformationnel occupée par la conformation active est souvent inconnue, il est préférable d'utiliser les concentrations les plus élevées possibles <sup>(27)</sup>, ce qui peut parfois nécessiter un investissement important de ressources (en temps et argent). Deuxièmement, il est possible que certaines protéines peu solubles dans un tampon physiologique ne puissent être amenées à des concentrations assez élevées pour observer l'effet d'un excès de l'état de haute énergie <sup>(27)</sup>. Finalement, certaines transitions conformationnelles se font avec des constantes de vitesses très rapides ce qui rendrait difficile,

voire impossible, l'observation de la saturation de  $k_{obs}$  lorsque le changement conformationnel devient limitant <sup>(27)</sup>. Dans cette situation, la relation entre la constante de vitesse observée et la concentration de  $P$  ou  $L$  sera toujours linéaire même si la liaison ne procède pas par sélection conformationnelle.

### 1.2.1.2 Distinction des mécanismes par variation de la concentration de ligand lorsque le changement conformationnel est cinétiquement limitant

Une autre approche permettant de distinguer ces mécanismes est possible lorsque le changement conformationnel est cinétiquement limitant, même à des concentrations de ligand où la liaison n'est pas saturée <sup>(29)</sup>. Si l'étape de liaison est beaucoup plus rapide que le changement conformationnel, elle peut être considérée comme étant toujours à l'équilibre par rapport au changement conformationnel (approximation d'équilibre rapide). Ceci permet d'exprimer la vitesse du changement conformationnel en fonction de la concentration du complexe lié. Sous cette approximation, une différence importante apparaît entre les équations de vitesses de chaque mécanisme <sup>(29, 30)</sup>. Prenons encore l'exemple du modèle à trois états avec la protéine  $P$  qui possède une conformation inactive  $P_1$ , une conformation active  $P_2$  et un ligand  $L$ . Dans le cas de la sélection conformationnelle (figure 5, gauche) avec un changement conformationnel cinétiquement limitant, la cinétique d'approche de l'équilibre peut être décrite comme une réaction de pseudo-premier ordre (équations 1 à 3) où la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) décroît de façon hyperbolique en fonction de la concentration de ligand selon l'équation 4 (Figure 7, courbe A) <sup>(29, 30)</sup>. Cette relation cinétique a permis de décrire, entre-autres, le mécanisme par sélection conformationnelle de la phosphatase alcaline<sup>(31)</sup> et de la chymotrypsine<sup>(32)</sup>.

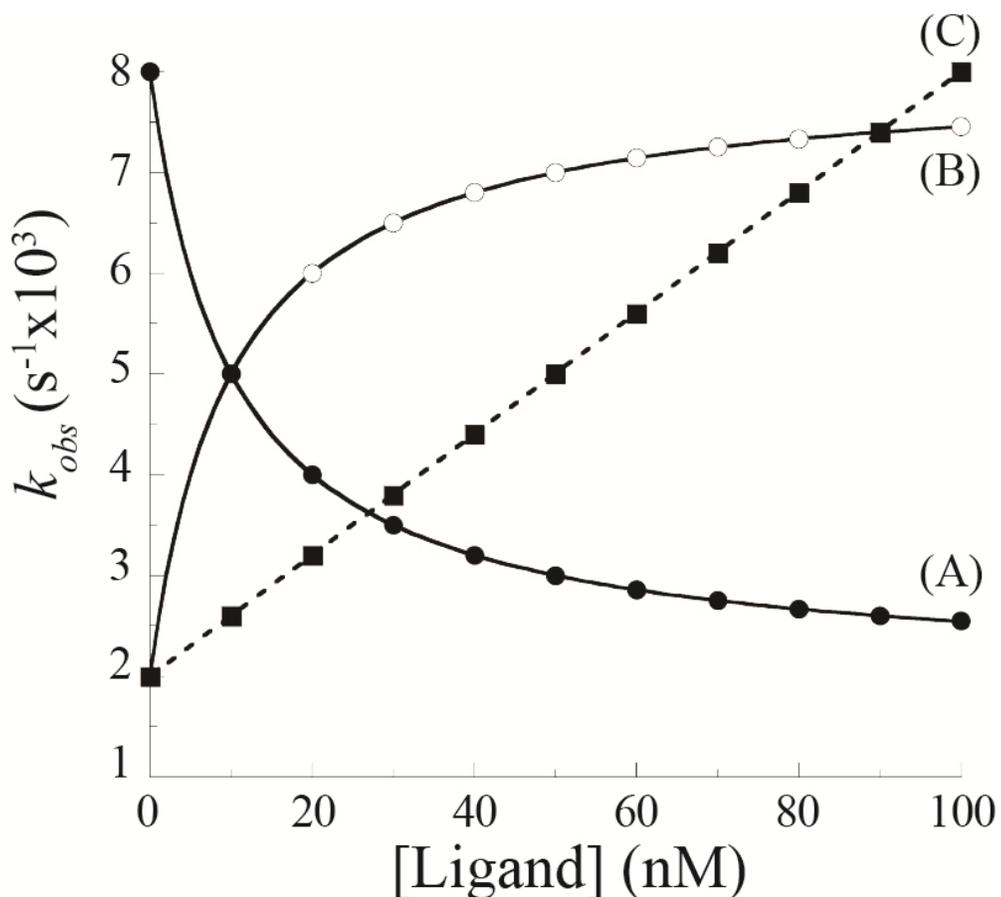
$$k_{obs} = k_s + k_{-s} \frac{K_D^{on}}{K_D^{on} + [L]} \quad \text{Éq. 4}$$

Dans cette équation,  $k_s$  représente la constante de vitesse du changement conformationnel spontané de la forme inactive vers la forme active ( $P_1 \rightarrow P_2$ ),  $k_{-s}$  représente le changement conformationnel inverse ( $P_2 \rightarrow P_1$ ) et  $K_D^{on}$  représente la constante de dissociation du ligand avec l'état actif  $P_2$  ( $K_D^{on} = [P_2][L]/[P_2L]$ ). Comme le terme  $K_D^{on} / (K_D^{on} + [L])$

représente la fraction non-liée de la forme active à l'équilibre ( $[P_2]/([P_2]+[P_2L])$ ), on constate que plus cette fraction est élevée (basse concentration de ligand), plus la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) sera élevée aussi. En effet, le changement conformationnel vers la forme inactive  $P_1$  ne pouvant se faire qu'à partir de l'état actif  $P_2$  non-lié, cette étape est ralentie par la présence du ligand qui diminue la fraction de  $P_2$  non-lié. Le contraire se produit lorsqu'on applique l'approximation d'équilibre rapide au modèle à trois états décrivant l'ajustement induit (Figure 4, gauche). L'approche de l'équilibre peut aussi être décrite comme une réaction de pseudo-premier ordre mais cette fois la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) augmente de façon hyperbolique en fonction de la concentration de ligand selon l'équation 5 (Figure 7, courbe B)<sup>(29, 30)</sup>. Cette relation cinétique a permis de décrire le mécanisme par ajustement induit de la polymérase d'ADN<sup>(33, 34)</sup> et de la liaison de l'héparine à l'antithrombine<sup>(35)</sup>.

$$k_{obs} = k_{-s}' + k_s' \frac{[L]}{[L] + K_D^{off}} \quad \text{Éq. 5}$$

Dans cette équation,  $k_s'$  représente la constante de vitesse du changement conformationnel de la forme inactive vers la forme active en présence de ligand ( $P_1L \rightarrow P_2L$ ),  $k_{-s}'$  représente le changement conformationnel inverse ( $P_2L \rightarrow P_1L$ ) et  $K_D^{off}$  représente la constante de dissociation entre le ligand et l'état inactif  $P_1$  ( $K_D^{off} = [P_1][L]/[P_1L]$ ). Comme ici le terme  $[L]/([L]+K_D^{off})$  représente la fraction liée de la protéine dans l'état inactif, on constate que la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) augmente en fonction de la concentration de ligand, contrairement au cas précédent. En effet, puisque le changement conformationnel cinétiquement limitant ( $P_1L \rightarrow P_2L$ ) se produit à partir de l'état inactif-lié, cette étape est plus rapide en présence de hautes concentrations de ligand.



**Figure 7. Relation entre la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) et la concentration de ligand pour différents mécanismes de liaison.** (A) Mécanisme de liaison en une étape sans changement de conformation ou mécanisme de liaison en deux étapes avec changement conformationnel rapide (■). (B) Mécanisme de liaison en deux étapes avec un changement conformationnel lent survenant après l'étape de liaison (ajustement induit) (○). (C) Mécanisme de liaison en deux étapes avec un changement conformationnel lent survenant avant l'étape de liaison (sélection conformationnelle) (●). Figure adaptée de <sup>(30)</sup>.

Bien que les changements conformationnels soient cinétiquement limitants dans le processus d'activation de plusieurs protéines <sup>(30)</sup>, il existe aussi des situations où l'étape de liaison ou de dissociation du ligand est cinétiquement limitante comparativement au changement conformationnel <sup>(36, 37)</sup>. Dans de telles situations, la cinétique d'activation correspond encore à une réaction en pseudo-premier ordre mais la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) varie linéairement avec la concentration de ligand (Figure 7 courbe C) <sup>(30)</sup>. Cette relation linéaire entre la concentration de ligand et  $k_{obs}$  ne permet pas d'identifier le mécanisme puisque cette relation correspond tout aussi bien à une réaction de liaison sans

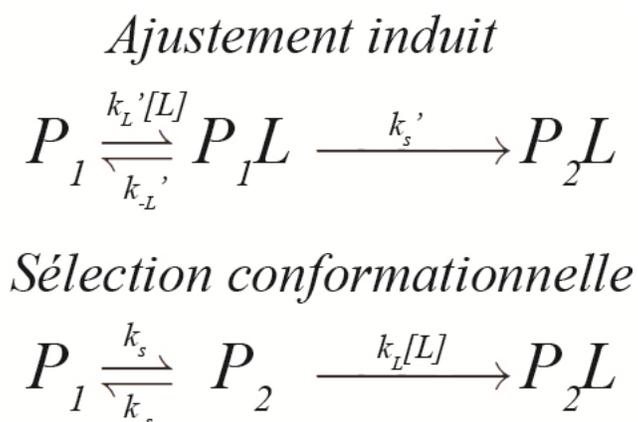
changement conformationnel <sup>(30)</sup>. De plus, bien qu'une courbe hyperbolique de  $k_{\text{obs}}$  qui décroît en fonction de  $[L]$  constitue une preuve irréfutable de l'utilisation du mécanisme par sélection conformationnelle, une courbe hyperbolique croissante de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de  $[L]$  ne prouve pas hors de tout doute que la liaison procède par ajustement induit <sup>(29)</sup>. En effet, à l'aide d'un modèle mathématique plus général, ne faisant pas intervenir l'approximation d'équilibre rapide, il a été possible de démontrer que le schéma réactionnel de la sélection conformationnelle (Figure 5, gauche) peut aussi donner lieu à une courbe hyperbolique croissante lorsque la dissociation du ligand est plus lente que la transition spontanée de la forme inactive à la forme active de la protéine ( $k_{-L} < k_s$ ) <sup>(29)</sup>.

Il est possible de vérifier si une courbe hyperbolique croissante de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de  $[L]$  représente bien le mécanisme par ajustement induit en caractérisant cette relation pour différents ligands. En effet, s'il s'agit du mécanisme par sélection conformationnelle, les constantes de vitesse ( $k_s$  et  $k_{-s}$ ) impliquées dans l'équilibre entre la forme inactive ( $P_1$ ) et la forme active ( $P_2$ ) sont indépendantes de l'événement de liaison (puisque le changement conformationnel se produit avant la liaison) <sup>(29)</sup>. Ce n'est effectivement pas le cas de l'ajustement induit où la liaison du ligand précède le changement conformationnel. Dans ce cas, la nature du ligand, et son affinité pour les différents états de la protéine cible, peut alors influencer les constantes de vitesse du changement conformationnel ( $k_s'$  et  $k_{-s}'$ ) qui se produit alors à partir d'un lié <sup>(38)</sup>. Par exemple, puisque le changement conformationnel se produit à partir de l'état lié, il est possible que le ligand puisse former des interactions supplémentaires avec l'état de transition impliqué dans le changement conformationnel, abaissant ainsi la barrière d'énergie entre les deux conformations et résultant en une accélération de la transition (augmentation de  $k_s$ ). Alternativement, il est aussi concevable que les interactions avec le ligand stabilisent davantage l'état inactif relativement à l'état de transition, résultant en un ralentissement du changement conformationnel (diminution de  $k_s$ ). Par conséquent, les valeurs de  $k_{\text{obs}}$  trouvées avec différents ligands pour l'asymptote à  $[L] = \infty$ , représentant  $k_s$  pour la sélection conformationnelle (éq. 4) et  $k_s' + k_{-s}'$  pour l'ajustement induit (éq. 5), devraient avoir la même valeur peu importe le ligand utilisé s'il s'agit de la sélection conformationnelle ( $k_s$  est indépendant de la nature du ligand), alors que la valeur de cette asymptote serait différente pour chaque ligand s'il s'agit de l'ajustement induit ( $k_s'$  et  $k_{-s}'$  dépendent de la nature du ligand)

<sup>(29)</sup>. Bref, il faut être prudent avant d'affirmer qu'une relation hyperbolique croissante entre  $k_{\text{obs}}$  et  $[L]$  correspond au mécanisme par ajustement induit.

### 1.2.1.3 Modèles cinétiques et identification des mécanismes par l'effet de l'équilibre conformationnel

Le mécanisme de liaison d'une biomolécule peut aussi être caractérisé en mesurant l'effet de l'équilibre conformationnel ( $P_1 \leftrightarrow P_2, k_s/k_{-s}$ ) sur la cinétique. Lorsque l'équilibre tend fortement vers le complexe actif lié, c'est à dire lorsque le complexe  $P_2L$  est très stable, la vitesse de retour vers l'état intermédiaire peut être négligée <sup>(39, 40)</sup> et le modèle à trois états de chaque mécanisme peut être simplifié (Figure 8).



**Figure 8. Modèle à trois états simplifié des mécanismes d'activation par sélection conformationnelle et par ajustement induit.** Dans ce modèle, la vitesse de retour vers l'intermédiaire est négligée ( $P_2L \rightarrow P_1L$  pour l'ajustement induit et  $P_2L \rightarrow P_2$  pour la sélection conformationnelle).

Une différence importante entre les équations cinétiques qui décrivent chaque mécanisme peut alors être mise en évidence en utilisant l'approximation d'état stationnaire. Cette approximation courante, utilisée entre-autres dans l'équation de Michaelis-Menten, implique que la concentration de l'état intermédiaire demeure près de zéro et ne varie pas durant l'approche de l'équilibre <sup>(41)</sup>. Pour que cette approximation soit valide dans la situation présente, il faut que la somme des vitesses à laquelle l'intermédiaire disparaît soit plus élevée que la vitesse à laquelle l'intermédiaire est formé ( $k_s' + k_{-L} \gg k_L[L]$  pour l'ajustement induit et  $k_L[L] + k_{-s} \gg k_s$  pour la sélection conformationnelle), ce qui semble en effet réaliste <sup>(39)</sup>. Dans

le cas de la sélection conformationnelle, il est évident que cette condition est satisfaite puisqu'il est nécessaire que l'état inactif soit plus stable que l'état actif en absence de ligand ( $k_s \gg k_s'$ ) pour donner lieu à une régulation efficace. Dans le cas de l'ajustement induit, cette condition est automatiquement satisfaite lorsque le changement conformationnel ( $P_1L \rightarrow P_2L$ ,  $k_s'$ ) est rapide comparativement aux événements de liaison ou de dissociation du ligand ( $k_L'$  et  $k_{-L}'$ ).

L'équation 6 décrit la constante de vitesse observée pour la formation du complexe  $P_2L$  à partir de  $P_1$  et de  $L$  par ajustement induit ( $k_{obs}^{AI}$ ) sous l'approximation d'état stationnaire (voir annexe 1 pour calcul) <sup>(15, 39)</sup>. La vitesse de formation du complexe actif  $P_2L$  peut être comprise simplement comme étant la vitesse de liaison du ligand avec l'état inactif ( $k_L'[L]$ ) multipliée par la probabilité (égale à au rapport de la vitesse dans une direction sur la somme des vitesses dans toutes les directions) d'effectuer le changement conformationnel vers le complexe actif plutôt que de dissocier ( $k_s'/(k_s'+k_{-L}')$ )<sup>(32)</sup>. Avec un changement conformationnel rapide ( $k_s' \gg k_{-L}'$ ) la somme  $k_s'+k_{-L}'$  est approximativement égale à seulement  $k_s'$  et l'équation se simplifie de façon à ce que la vitesse d'activation par ajustement induit ( $k_{obs}^{AI}$ ) soit approximativement égale à la vitesse de liaison de l'état inactif avec le ligand ( $k_L'[L]$ ) (équation 7). Dans ces conditions, la constante d'équilibre de dissociation entre l'état inactif et le ligand ( $K_D^{off}$ ) serait un paramètre thermodynamique déterminant pour la vitesse d'activation par ajustement induit puisque la constante cinétique  $k_L'$  y est liée (équation 12).

$$k_{obs}^{AI} = k_L'[L] \frac{k_s'}{k_s' + k_{-L}'} \quad \text{Éq. 6}$$

Si  $k_s' \gg k_{-L}'$  (changement conformationnel rapide) :

$$k_{obs}^{AI} = k_L'[L] \quad \text{Éq. 7}$$

L'équation décrivant la constante de vitesse observée pour la formation du complexe  $P_2L$  à partir de  $P_1$  et de  $L$  par sélection conformationnelle sous l'approximation d'état stationnaire ( $k_{obs}^{SC}$ ) est présentée ci-dessous (équation 8) <sup>(39)</sup>. La vitesse de formation du complexe actif  $P_2L$  correspond cette fois à la constante de vitesse du changement conformationnel spontané vers l'état actif ( $k_s$ ) multiplié par la probabilité de s'associer avec le ligand plutôt que de retourner vers l'état inactif ( $k_L[L]/(k_L[L]+k_s)$ ). Une simplification

additionnelle est possible lorsqu'on considère que le processus de relaxation conformationnelle de l'état excité  $P_2$  vers l'état fondamental  $P_1$  est plus rapide que l'événement de liaison ( $k_{-s} \gg k_L[L]$ ) <sup>(39)</sup>. La somme  $k_{-s} + k_L[L]$  peut être considérée comme approximativement égale à seulement  $k_{-s}$ . Il s'ensuit que la vitesse d'activation par sélection conformationnelle ( $k_{obs}^{SC}$ ) devient approximativement égale au produit de la constante d'équilibre conformationnel ( $K_S = k_s/k_{-s}$ ) et de la vitesse de liaison de l'état actif avec le ligand ( $k_L[L]$ ) (équation 9) <sup>(39)</sup>.

$$k_{obs}^{SC} = k_s \frac{k_L[L]}{k_L[L] + k_{-s}} \quad \text{Éq. 8}$$

Si  $k_{-s} \gg k_L[L]$  (changement conformationnel rapide) :

$$k_{obs}^{SC} = \frac{k_s}{k_{-s}} k_L[L] = K_S k_L[L] \quad \text{Éq. 9}$$

Une différence cinétique importante entre les deux mécanismes apparaît donc lorsque le changement conformationnel est rapide par rapport à la liaison ( $k_{-s} \gg k_L[L]$  et  $k_s' \gg k_{-L}'$ ) : la vitesse d'activation par sélection conformationnelle ( $k_{obs}^{SC}$ ) dépend de l'équilibre conformationnel en absence de ligand ( $k_s/k_{-s} = K_S$ , éq. 9) alors que la vitesse d'activation de l'ajustement induit ( $k_{obs}^{AI}$ , éq. 7) en est indépendante <sup>(15, 39)</sup>. Il est donc possible de différencier ces deux mécanismes par l'entremise de mutations loin du site de liaison (ou autres perturbations) qui affecteraient seulement l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) sans toutefois affecter l'interaction avec le ligand <sup>(15, 39)</sup>. En utilisant cette approche, il fut possible de déterminer que les domaines de liaison de nucléotides cycliques (CNBDs) se lient à l'AMPc par ajustement induit, puisque la vitesse cinétiquement limitante de l'étape de liaison n'est pas affectée par les mutations qui affectent l'équilibre conformationnel <sup>(42)</sup>.

Finalement, à l'aide de l'approximation d'état stationnaire et de ce modèle à trois états simplifié, il est aussi possible d'exprimer la relation entre les différents paramètres cinétiques et thermodynamiques impliqués dans ces mécanismes et les constantes de vitesses observées pour l'activation ou la désactivation de chaque mécanisme (Table I) <sup>(15, 39)</sup>. Dans le cas de la désactivation, les vitesses de disparition de la forme finale  $P_1$  sont négligées ( $k_L[L]$  pour l'ajustement induit et  $k_s$  pour la sélection conformationnelle) au lieu des vitesses de disparition de  $P_2L$ . Différentes expressions sont obtenues selon les vitesses relatives des étapes de

disparition de l'intermédiaire (correspondant à différents régime cinétiques). Il est a noter que dans toutes ces expressions, les constantes cinétiques élémentaires ( $k_L'$ ,  $k_L$ ,  $k_s'$ , etc.) ne peuvent pas être variées directement et sont liées aux constantes d'équilibre selon les équations 10-13.

**Table I. Relation entre  $k_{obs}$  et les différents paramètres cinétiques et thermodynamiques de chaque mécanisme.**

Mécanisme	Régime cinétique	$k_{obs}$ activation	$k_{obs}$ désactivation
<b>Ajustement induit</b>	Changement conformationnel rapide $k_s' \gg k_{-L}'$	$k_L'$	$k_{-L}' \times k_{-s}'/k_s'$
	Changement conformationnel lent $k_s' \ll k_{-L}'$	$k_s' \times k_L'/k_{-L}'$	$k_{-s}'$
<b>Sélection conformationnelle</b>	Changement conformationnel rapide $k_{-s} \gg k_L[L]$	$k_L \times k_s/k_{-s}$	$k_{-L}$
	Changement conformationnel lent $k_{-s} \ll k_L[L]$	$k_s$	$k_{-s} \times k_{-L}/k_L$

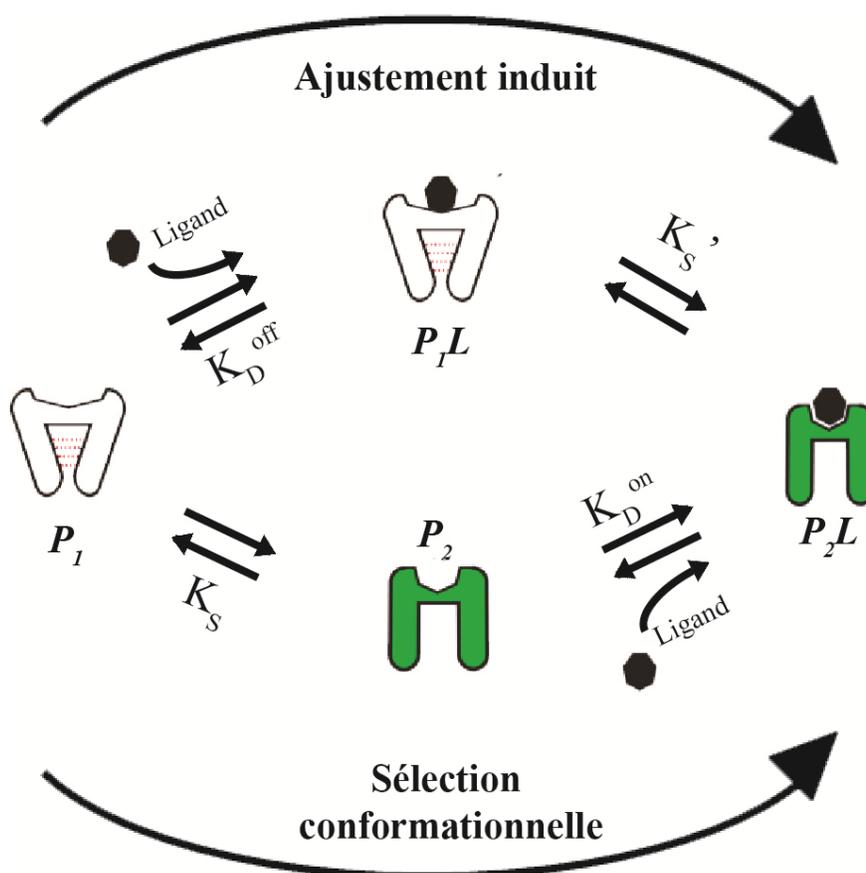
### 1.2.2 Schéma de liaison des mécanismes

Il y a toutefois une limitation commune à toutes les méthodes décrites jusqu'ici : ces méthodes considèrent que les deux mécanismes sont mutuellement exclusifs, c'est à dire qu'on considère qu'une biomolécule fonctionnant par ajustement induit ne peut pas explorer la conformation active en absence de ligand et qu'une biomolécule fonctionnant par sélection conformationnelle ne peut pas interagir avec le ligand dans sa conformation fondamentale. Il est cependant possible de relier ces deux mécanismes dans un même schéma réactionnel qui décrit une biomolécule ayant accès aux deux mécanismes (Figure 9). Ce schéma permet de décrire les deux mécanismes en fonction des quatre paramètres thermodynamiques: l'équilibre

conformationnel spontané ( $K_S$ ), l'équilibre conformationnel en présence de ligand ( $K_S'$ ), l'affinité du ligand pour l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) et l'affinité du ligand pour l'état actif ( $K_D^{\text{on}}$ ).

$$K_S = \frac{[P_2]}{[P_1]} = \frac{k_s}{k_{-s}} \quad \text{Éq. 10} \quad K_S' = \frac{[P_2L]}{[P_1L]} = \frac{k_{s'}}{k_{-s'}} \quad \text{Éq. 11}$$

$$K_D^{\text{off}} = \frac{[P_1][L]}{[P_1L]} = \frac{k_{-L'}}{k_L'} \quad \text{Éq. 12} \quad K_D^{\text{on}} = \frac{[P_2][L]}{[P_2L]} = \frac{k_{-L}}{k_L} \quad \text{Éq. 13}$$



**Figure 9. Schéma réactionnel à quatre états reliant les mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle.** Selon le mécanisme par ajustement induit (haut), le ligand (heptagone) se lie à l'état inactif ( $P_1$ ), donnant lieu à un intermédiaire inactif lié ( $P_1L$ ) avec une constante d'équilibre  $K_D^{\text{off}}$ . Cet intermédiaire est en équilibre avec la conformation active liée ( $P_2L$ ) selon la constante d'équilibre  $K_S'$ . Selon le mécanisme par sélection conformationnelle (bas), le ligand se lie directement avec l'état actif non lié ( $P_2$ ) avec une constante d'équilibre  $K_D^{\text{on}}$ . La biomolécule, en absence de ligand, est en équilibre entre une conformation inactive (blanc) et une conformation active (vert) selon la constante d'équilibre  $K_S$ .

Ce schéma illustre très bien pourquoi il est difficile, voire impossible, de différencier ces mécanismes avec des mesures à l'équilibre. En effet, les mesures à l'équilibre nous informent sur les concentrations relatives de  $P_1$  et  $P_2L$  et sur la constante d'équilibre globale entre ces deux conformations ( $K_{P_1 \leftrightarrow P_2L} = K_D^{\text{off}}/K_S' = K_D^{\text{on}}/K_S$ ) qui est indépendante du mécanisme emprunté <sup>(32)</sup>. Ce sont en effet les intermédiaires, et les barrières d'énergie qui leur sont associées, qui définissent ces mécanismes. C'est pourquoi les méthodes cinétiques, qui mesurent les barrières d'énergies entre les différents états à travers les constantes de vitesses <sup>(43)</sup>, sont importantes pour l'identification du mécanisme dominant.

Alors que la dépendance de  $k_{\text{obs}}$  par rapport à  $[L]$  semble permettre de différencier ces deux mécanismes dans plusieurs situations, un problème important lié à ce genre d'approche fait surface lorsqu'on considère le modèle général à quatre états qui relie les deux mécanismes (Figure 9). Puisque le mécanisme se définit par l'intermédiaire ( $P_2$  ou  $P_1L$ ) impliqué dans le chemin réactionnel, le mécanisme par sélection conformationnelle domine lorsque  $[P_2] \gg [P_1L]$  et le mécanisme par ajustement induit domine lorsque  $[P_1L] \gg [P_2]$ . Il est possible d'exprimer la relation entre le mécanisme de liaison et les différents paramètres thermodynamiques à l'aide de l'algèbre des cycles thermodynamiques introduit par Fersht <sup>(32)</sup>. Puisque le rapport  $[P_1L]/[P_2]$  définit la fraction des événements de liaison qui utilisent le mécanisme d'ajustement induit et que la constante d'équilibre globale entre deux états est indépendante du chemin (ou mécanisme) emprunté ( $K_{P_1 \leftrightarrow P_2L} = K_D^{\text{off}}/K_S' = K_D^{\text{on}}/K_S$ ), la relation suivante peut être établie.

$$\frac{[P_1L]}{[P_2]} = \frac{[L]}{K_D^{\text{off}} K_S} \quad \text{Éq. 14}$$

Cette équation montre que le mécanisme de liaison dominant pour un couple biomolécule-ligand peut dépendre des valeurs relatives de  $K_S$ ,  $K_D^{\text{off}}$  et  $[L]$  et même que les deux mécanismes peuvent contribuer simultanément, en différentes proportions, à l'activation de la biomolécule. Une concentration de ligand élevée, une affinité élevée de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$  bas) ou une haute stabilité de l'état inactif ( $K_S$  bas) favorisent donc un mécanisme par ajustement induit. Au contraire, en présence d'une faible concentration de ligand, d'une faible affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$  élevé) ou lorsque l'équilibre

conformationnel tend un peu plus vers la conformation active ( $K_s$  élevé), le mécanisme par sélection conformationnelle est favorisé. Ainsi, puisque la concentration de ligand peut influencer le mécanisme de liaison, il faut être prudent en invoquant la relation entre  $k_{obs}$  et  $[L]$  pour l'identification du mécanisme. Il est toutefois possible de s'affranchir de cette limitation en décrivant le mécanisme d'une biomolécule en termes de flux parallèles à travers ces deux mécanismes.

### 1.2.3 Détermination du flux à travers chaque mécanisme

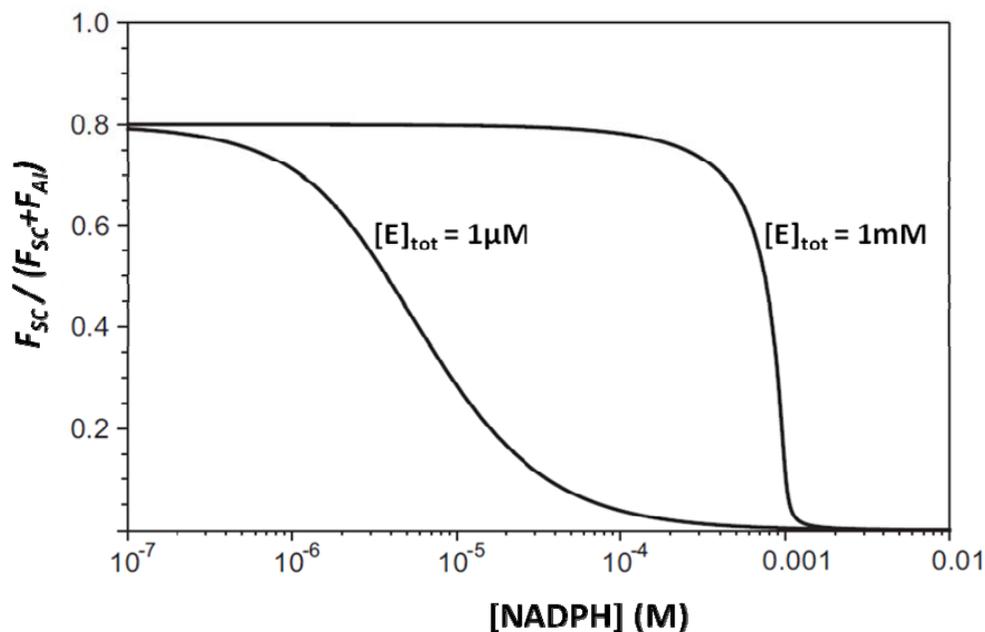
À partir du schéma reliant les deux mécanismes (Figure 9), il est possible de décrire la réaction en termes de flux à travers chacun des mécanismes. Le flux à travers un mécanisme donné correspond au nombre d'événements de liaison qui procèdent selon ce mécanisme dans un intervalle de temps défini. Pour calculer le flux à travers chacun des mécanismes, il est nécessaire de connaître les constantes de vitesses élémentaires ( $k_L$ ,  $k_L'$ ,  $k_s$ ,  $k_s'$ , Figure 9), ce qui peut représenter une difficulté importante. Pour l'instant, le meilleur moyen de déterminer ces paramètres semble être par *RMN* ou par une étude cinétique détaillée <sup>(44)</sup>. Le flux à travers chaque mécanisme est calculé à partir des expressions suivantes <sup>(44)</sup>.

$$F_{SC} = \left( \frac{1}{k_s[P_1]} + \frac{1}{k_L[L][P_2]} \right)^{-1} \quad \text{Éq. 15}$$

$$F_{AI} = \left( \frac{1}{k_L'[L][P_1]} + \frac{1}{k_s'[P_1L]} \right)^{-1} \quad \text{Éq. 16}$$

Où  $F_{SC}$  et  $F_{AI}$  représentent le flux à travers le mécanisme par sélection conformationnelle et le mécanisme par ajustement induit, respectivement. Cette analyse a été employée pour décrire le mécanisme de l'enzyme dihydrofolate réductase (*DHFR*), qui catalyse la réduction du dihydrofolate par le nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (*NADPH*). Les données obtenues montrent bien que le mécanisme varie en fonction de la concentration de ligand mais aussi en fonction de la concentration de la protéine (Figure 10) <sup>(44)</sup>. Le mécanisme par ajustement induit est favorisé lorsque la concentration de ligand augmente tandis que c'est le mécanisme par sélection conformationnelle qui est favorisé lorsque la concentration totale de la protéine augmente. L'effet de la concentration de ligand

correspond en effet à ce qui est prédit par l'équation 14. Cet effet peut aussi être expliqué simplement comme une conséquence du fait que l'état inactif doit avoir une plus faible affinité pour le ligand que l'état actif ( $K_D^{\text{off}} > K_D^{\text{on}}$ ) afin que la liaison favorise l'état actif. Il s'ensuit que lorsque la concentration de ligand augmente, la valeur de sa concentration va d'abord approcher la valeur du  $K_D$  de l'état actif ( $K_D^{\text{on}}$ ) et il ne pourra alors se lier qu'à cet état, ce qui correspond au mécanisme par sélection conformationnelle. En augmentant davantage la concentration de ligand, la valeur de sa concentration approchera éventuellement celle du  $K_D$  de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) et il pourra y avoir liaison du ligand directement avec l'état inactif de la protéine, il s'agit alors du mécanisme par ajustement induit. En ce qui a trait à l'effet de la concentration de protéine totale sur le choix du mécanisme, cela s'explique par le fait que l'augmentation de la concentration totale entraîne aussi une augmentation de la concentration de la forme spontanément active ( $P_2$ ), ce qui favorise la sélection conformationnelle.



**Figure 10. Le flux fractionnel à travers chaque mécanisme dépend des concentrations de ligand et de protéine.** Courbes représentant la fraction du flux total qui utilise le mécanisme de liaison par sélection conformationnelle ( $F_{sc}/(F_{sc}+F_{ai})$ ) en fonction de la concentration de ligand totale ( $[NADPH]$ ) pour deux concentrations de l'enzyme *DHFR* ( $[E]_{tot}=1 \mu\text{M}$  et  $[E]_{tot}=1 \text{mM}$ ). Figure adaptée de <sup>(44)</sup>.

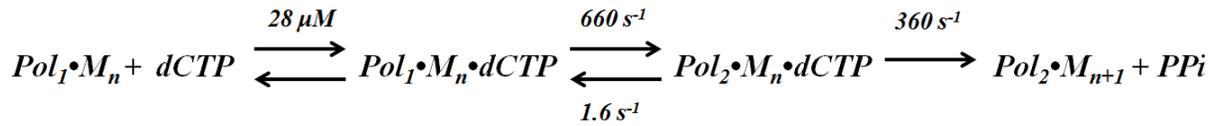
## 1.3 Rôle et performances des mécanismes

L'existence de deux mécanismes distincts pour contrôler l'activation d'une biomolécule à partir de la liaison d'un ligand nous amène à nous demander si une pression évolutive aurait favorisé l'utilisation de mécanismes spécifiques pour certaines protéines. Pour répondre à cette question, il faut se demander s'il y a des différences au niveau de la performance (spécificité, sensibilité, vitesses d'activation ou de désactivation) de chaque mécanisme, c'est à dire des avantages ou des inconvénients qui conviennent mieux à certaines protéines ou certaines fonctions qu'à d'autres. Bien que plusieurs travaux se sont penchés sur cette question, notre compréhension des différences entre les performances de ces mécanismes demeure limitée<sup>(3)</sup>. Une meilleure compréhension de ces mécanismes aurait un impact positif sur l'ingénierie *de novo* de protéines<sup>(3)</sup> ou autres biotechnologies. Nous allons ici discuter des travaux qui offrent des pistes intéressantes quant aux performances de chaque mécanisme.

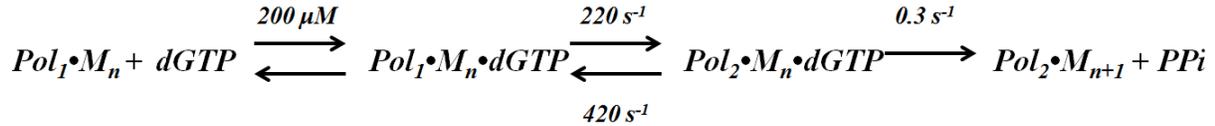
### 1.3.1 Spécificité de la reconnaissance par l'ajustement induit

La polymérase d'ADN T7, fonctionnant par ajustement induit<sup>(34, 45)</sup>, constitue un modèle puissant pour l'étude de la spécificité de ce mécanisme. En effet, une variété de substrats sont disponibles (*dATP*, *dCTP*, *dGTP*, *dTTP*) et la spécificité pour le bon substrat, c'est-à-dire celui qui pourra former une paire de bases de type Watson-Crick avec le brin matrice, est très élevée et ne peut pas être expliquée seulement par la faible différence d'énergie libre de liaison entre le bon et le mauvais substrat<sup>(46)</sup>. Les vitesses des étapes élémentaires dans le parcours réactionnel de l'incorporation d'un nucléotide par la polymérase d'ADN T7 ont pu être caractérisées par l'attachement d'un fluorophore sensible à la conformation<sup>(47)</sup>. Les différences de vitesses entre le bon et le mauvais substrat permettent de mieux comprendre les déterminants de la spécificité de l'ajustement induit. Le schéma réactionnel et les vitesses des étapes élémentaires sont présentés ci-dessous (Figure 11).

### Substrat correct (dCTP)



### Substrat incorrect (dGTP)



**Figure 11. Schéma réactionnel de la polymérase d'ADN T7 et constantes de vitesse des étapes élémentaires pour l'incorporation d'un nucléotide correct ou incorrect.** Dans ce schéma,  $Pol_1$  représente la conformation inactive de la polymérase,  $Pol_2$  représente la conformation active de la polymérase,  $M_n$  représente le brin d'ADN matrice avant incorporation du nucléotide,  $M_{n+1}$  représente le brin matrice après incorporation du nucléotide et  $PPi$  représente le pyrophosphate inorganique relâché. Le symbole  $\bullet$  représente une liaison non-covalente, dCTP représente le nucléotide correct et dGTP représente le nucléotide incorrect. Figure adaptée de <sup>(47)</sup>.

La spécificité de la polymérase d'ADN T7 est contrôlée par le rapport entre la vitesse de l'étape catalytique ( $Pol_2 \bullet M_n \bullet dNTP \rightarrow Pol_2 \bullet M_{n+1} + PPi$ ) et celle du changement conformationnel de retour vers la conformation inactive ( $Pol_1 \bullet M_n \bullet dNTP \leftarrow Pol_2 \bullet M_n \bullet dNTP$ ). En effet, en présence du bon substrat (dCTP), la vitesse de retour vers la conformation initiale  $Pol_1$  non-catalytique ( $1.6 s^{-1}$ ) est nettement inférieure à la vitesse de l'étape catalytique ( $360 s^{-1}$ ). La vitesse lente du retour vers l'état non-catalytique par rapport à l'étape de catalyse chimique fait en sorte que le bon substrat est engagé dans la réaction. Toutefois, dans le cas du mauvais substrat (dGTP), la vitesse de retour vers l'état non-catalytique est accélérée ( $420 s^{-1}$ ) et devient supérieure à la vitesse de l'étape catalytique ( $0.3 s^{-1}$ ) qui est diminuée. Dans ce cas, il est improbable que la réaction ait lieu car la polymérase retourne plus rapidement vers l'état inactif que la vitesse à laquelle elle catalyse la réaction.

La spécificité impressionnante de la polymérase d'ADN T7 est donc le résultat de deux facteurs. Premièrement, le mauvais substrat stabilise davantage l'état inactif  $Pol_1$  que l'état actif  $Pol_2$ , la polymérase est donc principalement en conformation inactive lorsque le mauvais ligand est lié. Cette stabilisation additionnelle de l'état inactif par rapport à l'état actif résulte aussi en une vitesse accrue du changement conformationnel de retour vers la forme inactive, qui devient alors plus élevée que la vitesse de la catalyse chimique <sup>(47)</sup>. Il en découle qu'il est

plus probable que le mauvais substrat induise un changement conformationnel vers la forme inactive plutôt que de continuer vers l'étape de catalyse chimique. Deuxièmement, il semble que la structure induite par le mauvais substrat soit différente de celle induite par le bon substrat <sup>(47)</sup>. En effet, cette différence de structure permettrait d'expliquer la différence entre les constantes catalytiques en présence d'un bon ou d'un mauvais substrat. De telles différences de structure ont pu être démontrées lors d'études de fluorescence <sup>(47)</sup> et d'études cristallographiques <sup>(48)</sup>.

Puisque l'impressionnante fidélité de la polymérase d'ADN T7 est en partie attribuable au fait qu'un mauvais ligand puisse stabiliser davantage la conformation inactive que la conformation active et accélérer le changement conformationnel de retour vers la forme inactive, il est possible de spéculer qu'un mécanisme par sélection conformationnelle ne pourrait pas rivaliser avec une telle spécificité. En effet, dans le cas de la sélection conformationnelle, le changement conformationnel se produit avant la liaison et est donc indépendant du ligand. Le ligand ne peut donc pas stabiliser davantage l'état inactif par rapport à l'état actif ou accélérer le changement conformationnel de retour. L'effet du ligand sur l'équilibre conformationnel ( $K_s$ ) par le mécanisme d'ajustement induit semble ainsi donner lieu à une spécificité élevée.

### **1.3.2 L'ajustement induit accélère le repliement des protéines intrinsèquement désordonnées**

Nous savons maintenant que certaines protéines existent dans un état intrinsèquement désordonnées, c'est-à-dire qu'elles ne se replient pas spontanément en conditions physiologiques <sup>(49)</sup>. Ces protéines intrinsèquement désordonnées (ou IDP pour *intrinsically disordered proteins*) ne se replient et n'assument leur fonction qu'après interaction avec leur ligand <sup>(49)</sup>. Il a été montré que la reconnaissance du ligand par les IDPs peut fonctionner par sélection conformationnelle, lorsqu'une faible population de la protéine adopte spontanément l'état replié qui est ensuite stabilisé par le ligand, ou par ajustement induit, lorsque des interactions initiales non-spécifiques (en absence de structure) mènent au repliement de la protéine <sup>(50)</sup>. Dans le cas de la reconnaissance par ajustement induit, un avantage cinétique a pu être révélé.

Il a été observé que le repliement des IDPs pouvait être accéléré par la présence du ligand comparativement au repliement spontané <sup>(38)</sup>. À l'aide de la sous-unité protéique intrinsèquement désordonnée de la RNase P bactérienne, dont le repliement implique un flux significatif à travers les deux mécanismes, il a pu être observé que le flux à travers l'ajustement induit est plus rapide à celui par sélection conformationnelle <sup>(23, 38)</sup>. En effet, la vitesse du changement conformationnel de la protéine liée au pyrophosphate est supérieure à celle de la protéine non-liée. Cet effet du ligand sur la vitesse de l'équilibre conformationnel peut être expliqué simplement à partir du schéma de liaison des deux mécanismes (Figure 9) et de la relation entre les différents paramètres thermodynamiques impliqués. Puisque la constante d'équilibre globale entre deux espèces d'un cycle thermodynamique doit être la même peu importe le chemin emprunté ( $K_D^{off}/K_S' = K_D^{on}/K_S = [P_1][L]/[P_2L]$ ) la relation entre le changement conformationnel spontané ( $K_S$ ) et celui en présence de ligand ( $K_S'$ ) peut être exprimée de la manière suivante (équation 17):

$$K_S' = K_S \frac{K_D^{off}}{K_D^{on}} \quad \text{Éq. 17}$$

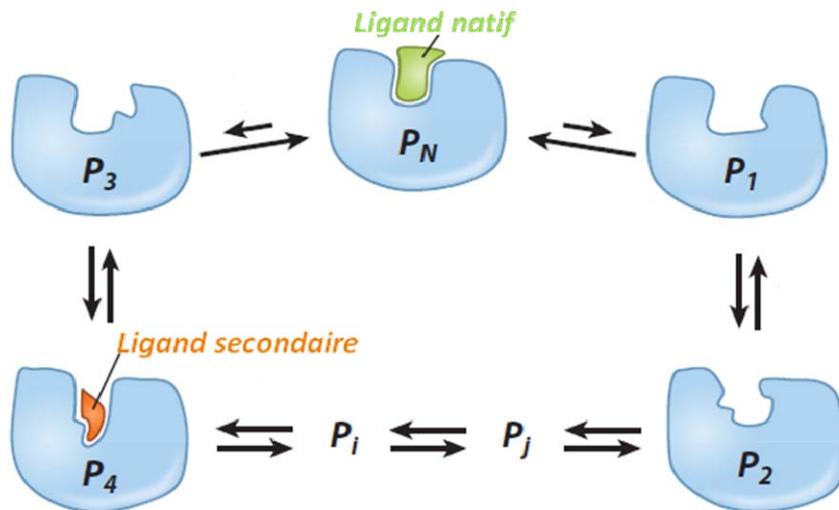
Ainsi, lorsque l'affinité pour le ligand dans l'état actif est plus élevée que l'affinité pour le ligand dans l'état inactif ( $K_D^{off} > K_D^{on}$ ), une condition essentielle pour que le ligand stabilise davantage l'état actif et permette l'activation, la valeur de la constante d'équilibre conformationnel en présence de ligand doit être supérieure à celle de l'équilibre conformationnel spontané ( $K_S' > K_S$ ). Comme ces constantes d'équilibre conformationnel sont égales au ratio des constantes de vitesses élémentaires ( $K_S' = k_s'/k_{-s}'$  et  $K_S = k_s/k_{-s}$ ), il s'ensuit qu'en présence de ligand, soit le changement conformationnel vers l'état inactif est ralenti ( $k_{-s}' < k_{-s}$ ) soit le changement conformationnel vers l'état actif est accéléré ( $k_s' > k_s$ ). Bien que cette relation semble être généralisable à n'importe quel changement conformationnel, elle n'a été observée expérimentalement que dans le contexte du repliement des IDPs.

### 1.3.3 Promiscuité de la reconnaissance par sélection conformationnelle et enjeux évolutifs

Bien que traditionnellement les enzymes naturelles sont représentées comme des catalyseurs très spécifiques, beaucoup d'enzymes possèdent une spécificité plus large qui leur permet de catalyser une réaction sur différents substrats à l'aide du même site actif. Par exemple, l'enzyme *exonucléase III* de la bactérie *E. coli* peut catalyser l'hydrolyse d'un 5'-phosphonucléotide à l'extrémité 3' d'un double-brin d'ADN mais peut aussi catalyser l'hydrolyse de nucléotides endommagés comme le 3'-phosphoglycolate qui résulte de dommages à l'ADN causés par les radicaux libres <sup>(51)</sup>. Dans certains cas, l'activité secondaire d'une enzyme peut être d'une nature chimique différente, c'est le cas de l'enzyme *tetrachlorohydroquinone dehalogenase* qui peut catalyser des réactions de déhalogénéation ou d'isomérisation de liens doubles <sup>(52)</sup>. Il existe aussi certains récepteurs qui sont capables d'intégrer la présence d'une impressionnante diversité de ligands en des réponses complexes impliquant l'activation de différents effecteurs <sup>(53, 54)</sup>. Finalement, la promiscuité de certaines protéines ne se limite pas seulement aux substrats physiologiques. Par exemple, certaines enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour la modifications de sucres ou d'huiles <sup>(55)</sup>. Les criblages à haut débit utilisés pour l'identification de nouveaux composés thérapeutiques sont aussi un exemple d'exploitation de la promiscuité artificielle.

Comment le même site actif d'une protéine est-il capable de lier différents ligands ou de catalyser différentes réactions sur différents substrats ? Cela demeure une question complexe mais dans plusieurs cas, il semble que la diversité conformationnelle des protéines ait un rôle important à jouer <sup>(56)</sup>. En effet, les différentes conformations présentes à l'équilibre permettraient d'interagir avec une variété de ligands ou des substrats différents (Figure 12) <sup>(56)</sup>. Par exemple, dans le cas des protéines avec un domaine PDZ, il a été montré que différents homologues de la protéine possèdent tous une structure très similaire mais une dynamique significativement différente <sup>(57)</sup>. Il a ainsi été observé que les homologues dont la forme non-liée est plus dynamique et flexible sont aussi ceux qui peuvent interagir avec un plus large éventail de ligands <sup>(57)</sup>. Cette corrélation entre la dynamique de l'état non-lié et la promiscuité, ainsi que d'autres études <sup>(53, 54, 56, 58)</sup>, suggèrent un rôle important de la sélection conformationnelle dans la promiscuité des interactions moléculaires. En effet, un changement

conformationnel de la forme non-liée semble devoir précéder l'événement de liaison d'un ligand alternatif, ce qui correspondrait au mécanisme par sélection conformationnelle <sup>(57)</sup>.



**Figure 12. La promiscuité de la reconnaissance moléculaire résulte parfois de la diversité conformationnelle des protéines.** La protéine  $P$  existe en un ensemble de différentes conformations à l'équilibre (notées  $P_1, P_2...P_j$ ). La conformation principale est la conformation native ( $P_N$ ) qui interagit avec le ligand natif. Une conformation secondaire alternative (par exemple  $P_4$ ) peut aussi interagir avec un ligand secondaire impliqué dans la régulation d'une fonction alternative. Figure adaptée de <sup>(52)</sup>.

La promiscuité moléculaire, résultant de la plasticité conformationnelle des biomolécules, pourrait aussi constituer un moteur évolutif important. Au même titre que la promiscuité moléculaire sert souvent de point de départ pour l'ingénierie de nouvelles enzymes par évolution dirigée, où il est question d'améliorer une activité catalytique secondaire à travers plusieurs cycles de criblage de mutants <sup>(59)</sup>, il est aussi possible que cette promiscuité soit un point de départ pour l'évolution naturelle de certaines biomolécules. En effet, il est possible qu'un nombre restreint d'enzymes aient été responsables de tout le métabolisme des bactéries ancestrales, chaque enzyme remplissant plusieurs fonctions, puis par le biais de duplications génétiques et de mutations, les différentes copies du gène se seraient spécialisées <sup>(60)</sup>.

### 1.3.4 Limitations des connaissances et des méthodes actuelles

Bien que notre vision du rôle et de la performance de ces mécanismes a fait beaucoup de progrès dans les deux dernières décennies, les méthodes d'investigation actuelles ne permettent pas de comparer ces mécanismes sur la base de leurs différentes propriétés. En effet, les performances de ces mécanismes ont surtout été étudiées de manière individuelle. Ceci est dû au fait qu'il est présentement très difficile de comparer expérimentalement la performance de ces mécanismes en raison de la complexité et de la diversité structurale et dynamique des biomolécules naturelles étudiées.

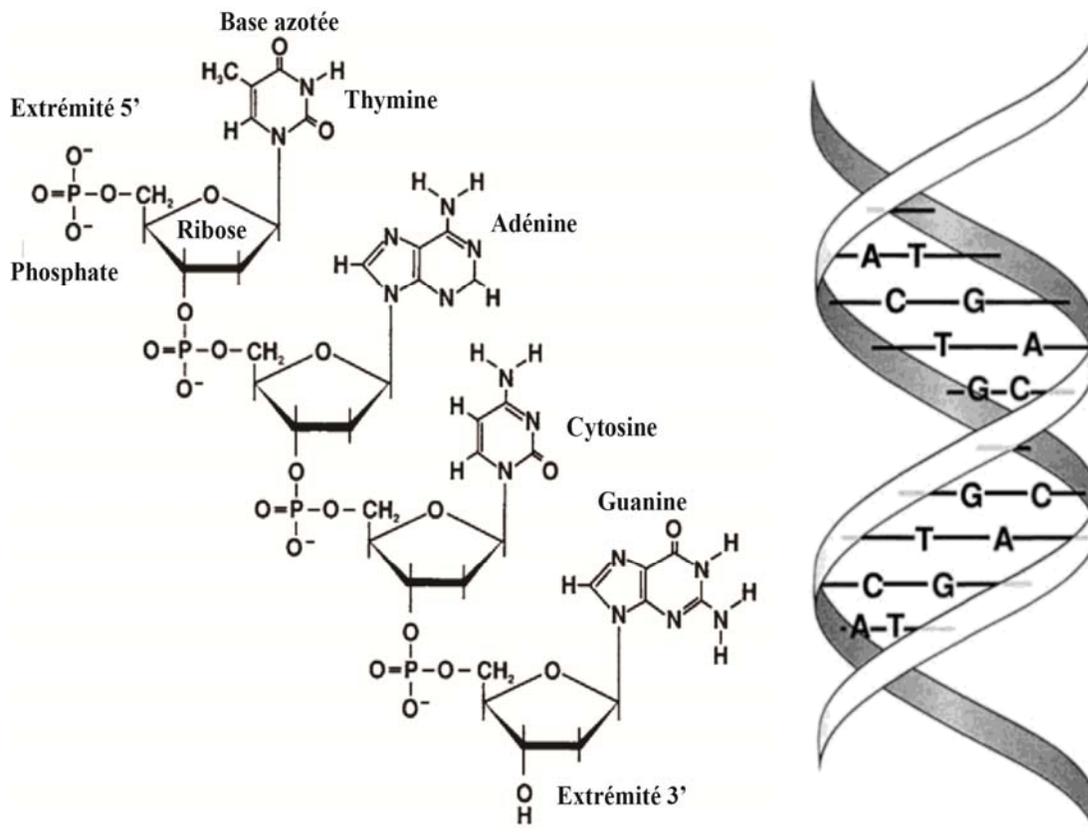
Afin de comparer directement la performance de ces deux mécanismes, il faudrait disposer de deux couples protéine-ligand qui ne diffèrent que par leur mécanisme d'activation et par le paramètre thermodynamique ( $K_S$  ou  $K_D^{\text{off}}$ , équation 14) responsable de cette différence. À première vue, il peut sembler possible que l'introduction de mutations loin du site de liaison, de manière à varier seulement l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ), permette d'obtenir une copie de la protéine originale activée par le même ligand mais selon le mécanisme alternatif. Toutefois, il y a un risque considérable que les mutations nécessaires à l'obtention d'une différence assez importante de  $K_S$  aient aussi pour conséquence de modifier significativement la structure globale de la protéine et du site de liaison, affectant du même coup  $K_D^{\text{off}}$  et/ou  $K_D^{\text{on}}$ . Alternativement, la mutation d'acides aminés au site de liaison risque davantage d'affecter simultanément  $K_D^{\text{off}}$ ,  $K_D^{\text{on}}$  et même  $K_S$  <sup>(61)</sup>. Les mêmes limitations sont présentes lorsqu'il s'agit d'identifier les paramètres qui contrôlent la performance d'un seul de ces mécanismes, sans comparaison avec le mécanisme alternatif. En effet, il est présentement très difficile de varier indépendamment les paramètres thermodynamiques des protéines puisqu'il est difficile de prédire et de comprendre l'effet véritable d'une mutation sur leur repliement ou leur dynamique <sup>(62)</sup>.

## **1.4 L'ADN comme système modèle pour l'étude des mécanismes de reconnaissance moléculaire**

Pour surmonter les limitations inhérentes à l'étude de ces mécanismes dans le contexte des protéines naturelles, il est nécessaire de se tourner vers un système plus simple. Au cours des 30 dernières années, l'ADN s'est révélé être un polymère très utile pour l'ingénierie de systèmes dynamiques capables de reconnaissance moléculaire <sup>(63)</sup>. En raison de son repliement simple et très bien caractérisé permettant l'ingénierie rationnelle <sup>(63)</sup>, l'ADN offre une avenue prometteuse pour la comparaison et la caractérisation de ces mécanismes d'un point de vue expérimental.

### **1.4.1 Survol de la structure de l'ADN**

L'ADN est un polymère dont l'unité de répétition, le nucléotide est composé de trois parties : une base, un sucre et un groupement phosphodiester (Figure 13). Le squelette de l'ADN est formé par l'enchaînement des sucres, le  $\beta$ -D-2-déoxyribose, reliés entre eux par un groupement phosphodiester attaché au carbones 3' du premier deoxyribose et au carbone 5' du deoxyribose adjacent. Il est à noter que les extrémités de la chaîne ne sont pas identiques chimiquement. Un brin d'ADN débute par un groupement phosphate à l'extrémité 5' (-PO<sub>4</sub>) et se termine par un groupement hydroxyl à l'extrémité 3' (-OH). Le troisième et dernier constituant d'un nucléotide est la base azotée. Dans l'ADN naturel, on retrouve quatre types de bases attachées au déoxyribose par le C1'. Les bases azotées sont responsables de l'auto-assemblage spécifique de l'ADN grâce aux différents patrons de donneurs et d'accepteurs de ponts hydrogènes exposés à leur surface. Ainsi, le patron de ponts hydrogènes donneur-accepteur (D-A) de la base adénine est complémentaire au patron A-D de la thymine et ne peut lier que cette base. De plus, le patron de ponts hydrogènes A-D-D de la guanine est seulement complémentaire au patron D-A-A de la cytosine. Les bases adénine et guanine sont composées de deux hétérocycles aromatiques conjugués et font partie de la catégorie des bases appelées purines. Les bases thymine et cytosine sont plutôt constituées d'un seul hétérocycle aromatique et font partie de la catégorie des pyrimidines, de taille moins importante que les purines.



**Figure 13. Structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN).** (A) Un brin d'ADN composé des bases thymine, adénine, cytosine et guanine reliés par un groupement phosphate entre les carbones 5' et 3' des désoxyriboses adjacents. (B) Représentation schématique de la double-hélice droite formée par deux brins d'ADN de séquences complémentaires.

Lorsque deux brins d'ADN de séquences complémentaires se trouvent ensemble en solution aqueuse à un pH se situant entre 2 et 12, ces deux brins vont se lier de manière anti-parallèle (par rapport aux extrémités 3' et 5') pour former une double hélice avec le squelette désoxyribose-phosphate vers l'extérieur et les paires de bases empilées vers l'intérieur (Figure 13). Toutefois, puisque ces deux brins portent plusieurs charges négatives qui entravent leur rapprochement, la présence de sels, plus précisément de cations tels que  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , est nécessaire à leur hybridation.

## 1.4.2 Stabilité de l'ADN et prédiction de structure

La double hélice d'ADN est un assemblage très stable. Les principales forces chimiques responsables de cette stabilité sont les ponts hydrogènes et l'empilement des bases, une force attractive polaire entre les cycles aromatiques <sup>(64)</sup>. Ces deux forces sont proportionnelles au nombre de paires de bases du duplex. Les contributions à l'énergie libre de chaque combinaison de paires de bases voisines ont été déterminées empiriquement et un modèle de prédiction de structure secondaire a pu être établi <sup>(65)</sup>. Ce modèle nommé "*nearest neighbor model*", ou "*modèle du plus proche voisin*", est utilisé entre autres par le programme de prédiction de structure *DNA-mfold* pour la prédiction de la structure secondaire la plus stable d'un brin d'ADN de séquence donnée ainsi que de son énergie libre <sup>(66)</sup>. Bien que ce programme ait été développé initialement pour prédire la structure secondaire de certains ARN au repliement complexe, il peut être tout aussi bien utilisé pour prédire la structure ainsi que l'énergie libre de liaison entre deux brins d'ADN. Cette énergie libre de liaison est liée à la constante d'équilibre de dissociation ( $K_D$ ) entre ces deux brins selon l'équation 18 et permet ainsi de calculer les concentrations de brins libres et de brins appariés (duplex) en fonction de la concentration totale de chacun selon l'équation 19. Ce dernier point est particulièrement utile lorsqu'il s'agit de concevoir un système d'ADN dynamique répondant à la présence d'un brin ligand, ce dont il sera question dans les prochaines sections. Dans ces équations,  $\Delta G$  représente l'énergie libre de Gibbs,  $R$  la constante universelle des gaz parfaits,  $T$  la température en Kelvin,  $[AB]_{eq}$  la concentration de duplex à l'équilibre,  $[A]_0$  et  $[B]_0$  la concentration totale des deux brins d'ADN.

$$\Delta G = -RT \ln(K_D) \quad \text{Éq. 18}$$

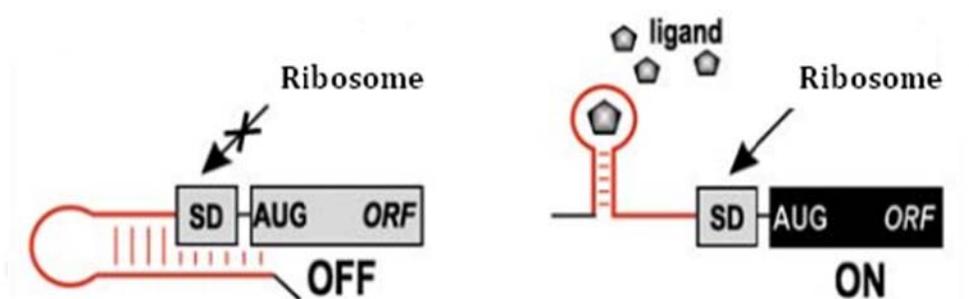
$$[AB]_{eq} = \frac{([A]_0 + [B]_0 + K_D) - \sqrt{([A]_0 + [B]_0 + K_D)^2 - 4[A]_0[B]_0}}{2} \quad \text{Éq. 19}$$

Bien que ce modèle de prédiction de structure soit d'une exactitude et d'une précision impressionnante, les paramètres concernant la prédiction de certaines structures secondaires, telles que les boucles ou des renflements (*bulges*), entre autres, demandent encore à être améliorés <sup>(65)</sup>. Il peut donc s'avérer nécessaire de valider expérimentalement la stabilité ( $\Delta G$  ou  $K_D$ ) d'un assemblage, surtout lorsque celui-ci comporte des boucles, des renflements ou

des structures plus complexes telles des triplexes ou des quadruplexes. L'énergie libre d'un assemblage d'ADN peut être mesurée expérimentalement par plusieurs méthodes simples <sup>(67-69)</sup>. Dans nos travaux, nous avons utilisé la méthode de dénaturation à l'urée puisque les valeurs de  $\Delta G$  obtenues à l'aide de cette méthode sont celles qui correspondent le mieux aux valeurs de  $\Delta G$  prédites par *mfold* (voir section 2.3 pour détails de la méthode).

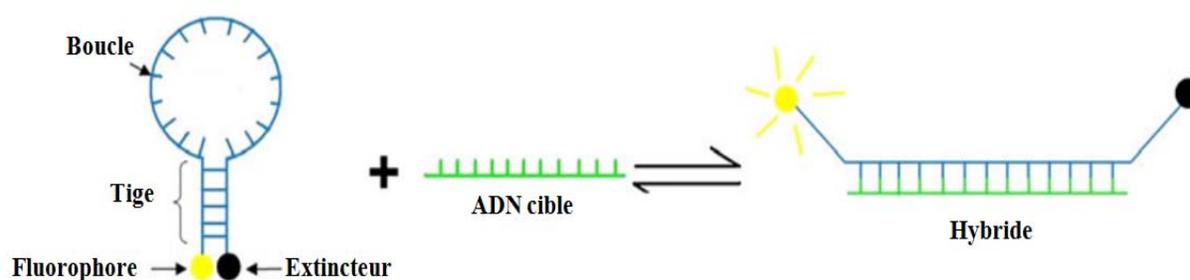
### 1.4.3 Systèmes dynamiques : les interrupteurs d'ADN

Tout comme les protéines, l'ADN peut aussi être utilisé pour sa capacité à changer de conformation. Grâce aux connaissances approfondies sur la structure et les propriétés thermodynamiques de l'ADN ainsi qu'à la simplicité des règles d'auto-assemblage de ce polymère, il est maintenant possible d'utiliser l'ADN pour l'ingénierie de systèmes dynamiques, où un changement de conformation préprogrammé répondant à la présence d'un ligand peut être couplé à la régulation d'une fonction. Cette capacité des acides nucléiques à changer de conformation n'est pourtant pas nouvelle puisqu'on trouve dans la nature certains ARN messagers au repliement complexe capables de changer leur conformation en réponse à la présence d'un ligand et d'ainsi réguler leur traduction (*riboswitch*) <sup>(70)</sup> (Figure 14).



**Figure 14. Régulation de la traduction par changement conformationnel d'un riborégulateur.** (Gauche) En absence de ligand, l'ARN riborégulateur adopte un repliement qui masque la séquence *Shine-Dalgarno* (SD) responsable de la liaison avec le ribosome ce qui résulte en une répression de la traduction. (Droite) Le ligand permet de stabiliser une structure alternative de l'ARN riborégulateur où la séquence *Shine-Dalgarno* est accessible et permet la traduction de l'ARN. Figure tirée de <sup>(70)</sup>.

Une des premières utilisations non-naturelles de l'ADN en tant qu'interrupteur moléculaire a été introduite en 1996 par le groupe de Fred Kramer et consiste en un simple brin d'ADN adoptant une structure en tige-boucle et pouvant signaler la présence d'un brin complémentaire (71). En présence de l'ADN cible de séquence complémentaire à la boucle, la cible et la boucle s'hybrident et la rigidité du complexe hélicoïdal formé entraîne la dissociation des extrémités complémentaires de la tige. Les extrémités complémentaires de la tige étant marquées avec un couple fluorophore et extincteur de fluorescence, leur dissociation résulte en une augmentation du signal fluorescent, ce qui permet la détection et la quantification de l'ADN cible (72) (Figure 15). Maintenant, ce type d'interrupteur d'ADN, appelé balise moléculaire (de l'anglais "*molecular beacon*"), est utilisé couramment pour la détection de mutations génétiques (*SNPs*), la détection du produit amplifié en *qPCR*, la détection de protéines interagissant avec l'ADN et même pour la livraison ciblée de composés thérapeutiques (73).



**Figure 15. Représentation schématique de l'activation d'une balise moléculaire.** L'hybridation d'un ADN cible de séquence complémentaire à la boucle entraîne l'ouverture de la tige et la séparation du fluorophore et de l'extincteur de fluorescence, résultant en l'émission d'un signal fluorescent. Figure adaptée de (74).

Depuis l'introduction des balises moléculaires et la démonstration que l'ADN pouvait être utilisé en dehors de son contexte génétique pour le développement de systèmes dynamiques, plusieurs architectures et applications intéressantes ont vu le jour. Parmi les plus remarquables, on trouve des systèmes capables d'intégrer la présence de multiples molécules différentes et d'émettre un signal seulement en présence de combinaisons spécifiques (75, 76), un processus de nature similaire à la logique booléenne des systèmes électroniques. On trouve aussi des systèmes de livraison ciblée d'agents thérapeutiques tels que des cages d'ADN capables de séquestrer des composés thérapeutiques et de les libérer seulement en présence

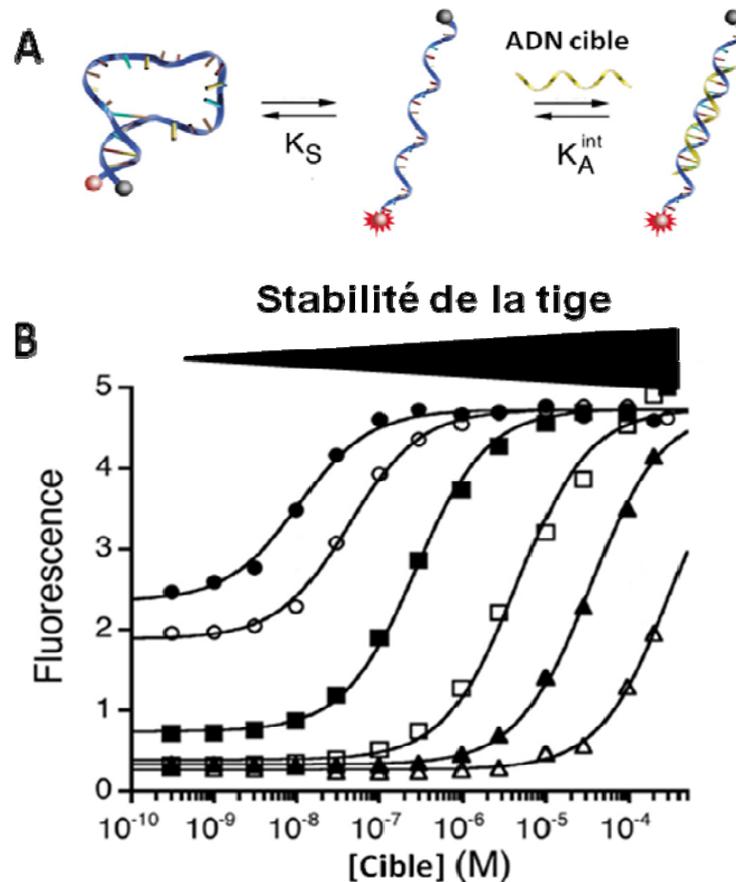
d'un ou d'une combinaison de biomarqueurs <sup>(77)</sup>. Bref, l'ADN est un polymère hautement versatile dont les applications technologiques sont en plein essor.

#### 1.4.4 Les interrupteurs d'ADN comme système modèle pour l'étude de processus biochimiques complexes

En plus de permettre le développement de diverses nanotechnologies, les propriétés structurales et dynamiques de l'ADN ainsi que la simplicité des règles d'auto-assemblage permettent de concevoir des systèmes simples pour recréer et étudier certains phénomènes biochimiques complexes. Comme mentionné précédemment, l'état actuel des connaissances sur la structure et la dynamique des protéines ne permet pas encore de varier indépendamment et rationnellement n'importe quel paramètre thermodynamique ou structurel de ce polymère <sup>(62)</sup>. L'effet de ces paramètres thermodynamiques sur des phénomènes biochimiques tels que la coopérativité, la plage dynamique de liaison, la sensibilité, l'amplitude d'activation ou les mécanismes de liaison, par exemple, est expérimentalement difficile d'approche dans le contexte des protéines, où ces mécanismes opèrent naturellement et conjointement. Par contre, l'ADN permet de recréer ces processus à l'aide de systèmes dont la simplicité rend possible l'exploration des enjeux thermodynamiques de manière expérimentale.

Par exemple, la relation entre l'équilibre conformationnel, l'affinité, la plage dynamique de liaison et le bruit de fond d'un interrupteur moléculaire a pu être caractérisée expérimentalement en modifiant la stabilité de la tige d'une balise moléculaire <sup>(69)</sup> (Figure 16). En effet, ce modèle a permis de montrer expérimentalement que l'affinité observée ( $K_D^{obs}$ ) et la plage dynamique d'un interrupteur biomoléculaire se déplacent à des concentrations de ligand plus élevées lorsque l'état inactif est stabilisé. En utilisant ce modèle, il fut possible de décrire quantitativement la relation entre l'affinité observée ( $K_D^{obs}$ ), l'affinité de l'état actif ( $K_D^{on}$ ) et l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) selon l'équation 20 <sup>(69)</sup>.

$$K_D^{obs} = K_D^{on} \frac{1 + K_S}{K_S} \quad \text{Éq. 20}$$

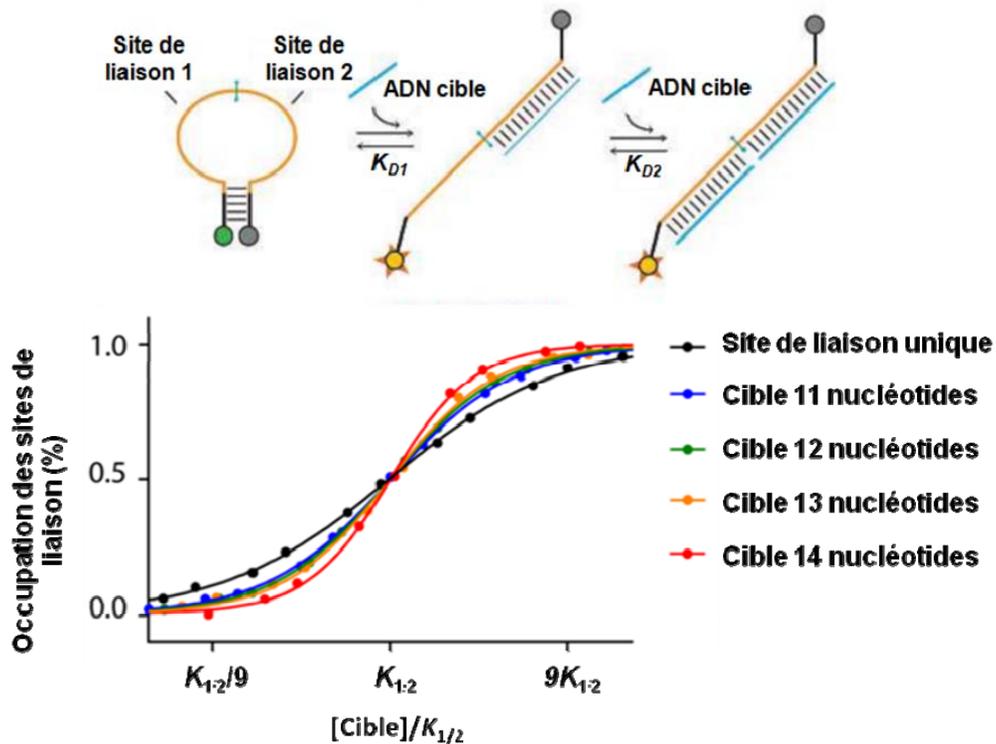


**Figure 16. L'affinité, la plage dynamique et le bruit de fond d'un interrupteur moléculaire sont couplés à l'équilibre conformationnel.** (A) Modèle à trois états de l'activation d'une balise moléculaire. La liaison d'un ADN cible permet de déplacer la population de la balise moléculaire vers la forme active fluorescente. (B) Activation relative (fluorescence) en fonction de la concentration de cible pour différentes stabilités de l'état inactif (tige) de la balise moléculaire. Figure adaptée de <sup>(69)</sup>.

De plus, ce modèle a permis de faire la lumière sur la relation entre le bruit de fond, ou l'activité basale, et la stabilité d'un interrupteur moléculaire. En effet, les systèmes avec un état inactif moins stable possèdent un signal élevé même en absence de ligand <sup>(69)</sup>. En plus d'introduire des concepts importants pour l'ingénierie rationnelle d'interrupteurs moléculaires, cette étude a permis d'approfondir notre compréhension des enjeux évolutifs des biomolécules naturels. Par exemple, cette relation entre  $K_S$  et  $K_D^{\text{off}}$  offre une stratégie pour diminuer l'affinité d'une biomolécule (augmenter  $K_D^{\text{obs}}$ ), afin d'être activé à une plus haute concentration de ligand, sans toutefois en affecter la spécificité <sup>(69)</sup>. En effet, le complexe actif-lié ne pourra être formé majoritairement que lorsque la concentration du ligand sera assez élevée pour

compenser la différence d'énergie libre entre l'état actif et l'état inactif. Ce lien entre l'équilibre conformationnel et l'affinité de liaison serait nécessaire pour expliquer le fait que les protéines intrinsèquement désordonnées possèdent une basse affinité mais une haute spécificité <sup>(78)</sup>.

L'effet des différentes constantes thermodynamiques sur la coopérativité allostérique a aussi été élucidé de manière expérimentale à l'aide d'un modèle d'interrupteur d'ADN. En utilisant un interrupteur d'ADN en forme de tige-boucle où la liaison d'un premier ligand stabilise la forme ouverte de plus haute affinité pour un second ligand, il fut possible de mesurer l'effet de l'équilibre conformationnel et de l'affinité intrinsèque sur la coopérativité de la liaison <sup>(79)</sup> (Figure 17).



**Figure 17. Effet de l'affinité de la cible sur la coopérativité de la liaison. (Haut)** Représentation schématique de l'activation de l'interrupteur d'ADN avec deux sites de liaison dans la boucle. **(Bas)** Courbes de liaison de l'interrupteur avec des cibles de différentes longueurs et différentes affinités. Figure adaptée de <sup>(79)</sup>.

Ainsi, il a été possible de déterminer qu'une coopérativité de liaison maximale est obtenue lorsque l'affinité pour le premier ligand est élevée (cible plus longue). L'utilisation de tiges de différentes stabilités a aussi révélé que la coopérativité augmente avec la stabilité de

l'état inactif <sup>(79)</sup>. En effet, puisque la coopérativité augmente en fonction de la différence d'énergie ou d'affinité entre les deux événements de liaison, un état inactif très stable diminue l'affinité du premier événement de liaison, qui doit payer énergétiquement pour le changement de conformation (selon l'équation 20), sans affecter l'affinité du deuxième ligand, puisque ce dernier se lie à l'état actif directement <sup>(79)</sup>. Les interrupteurs d'ADN permettent ainsi de modéliser certains phénomènes biochimiques complexes afin de mieux les étudier. Tel que mentionné précédemment, une compréhension approfondie des mécanismes biochimiques complexes permettra d'améliorer notre capacité à utiliser ces mécanismes pour l'ingénierie d'interrupteurs moléculaires plus performants. La coopérativité pourrait par exemple permettre de développer des biosenseurs pouvant mieux détecter de faibles changements de concentration d'un ligand <sup>(79)</sup>.

En résumé, les modèles d'ADN permettent de répondre à des questions fondamentales difficiles d'approche par les méthodes traditionnelles qui emploient des macromolécules naturelles, dont la complexité n'est pas encore totalement maîtrisée. Les réponses à ces questions fondamentales auront un rôle important à jouer pour améliorer la performance de nouvelles biotechnologies. En effet, l'évolution des biomolécules naturelles a généré un ensemble de mécanismes incroyablement efficaces et finement optimisés afin de supporter la vie d'organismes complexes. Bien que le niveau de sophistication de ces merveilles d'ingénierie nous échappe encore, nous avons de plus en plus d'outils pour les étudier et s'en inspirer pour développer nos propres technologies ou pour mieux comprendre comment les biomolécules naturelles fonctionnent. C'est dans cette optique que s'inscrit mon projet de recherche qui vise à recréer les mécanismes de liaison par ajustement induit et par sélection conformationnelle à l'aide d'un modèle simple d'ADN. Il sera ainsi possible d'extraire certains principes qui nous permettront de mieux comprendre le rôle de ces mécanismes chez les biomolécules naturelles et de les utiliser pour la mise au point de nouvelles technologies.

## 1.5 Objectifs et hypothèses

Comme mentionné précédemment, l'ADN permet de créer des interrupteurs moléculaires capables de reproduire des mécanismes biochimiques complexes des protéines. En raison de leur structure simple et prédictible, ces interrupteurs d'ADN nous permettent de contourner plusieurs limitations expérimentales rencontrées dans l'étude des mécanismes biochimiques chez les protéines. Ainsi, nous proposons d'étudier expérimentalement les différences cinétiques entre les deux mécanismes de régulation par liaison, l'ajustement induit et la sélection conformationnelle, à l'aide d'un système simple d'interrupteurs d'ADN.

L'objectif global de ce projet de recherche est de comparer pour la première fois les performances cinétiques des mécanismes d'activation par ajustement induit et par sélection conformationnelle à l'aide d'un modèle simple d'ADN. En raison de la diversité structurelle et thermodynamique des biomolécules naturelles, la comparaison directe de la cinétique de deux biomolécules qui ne diffèrent que par leur mécanisme d'activation n'a jamais été réalisée. Pour ce faire, il s'agit d'abord de créer un modèle d'interrupteur d'ADN permettant de varier indépendamment n'importe quel paramètre thermodynamique ou structurel. Ce modèle sera ensuite utilisé afin de créer une paire d'interrupteurs utilisant chacun un mécanisme différent et qui ne se distinguent l'un de l'autre que par un seul paramètre thermodynamique. Ceci permettra pour la première fois de comparer directement la cinétique de ces deux mécanismes sur la base d'une seule variable. Nous croyons que les deux mécanismes seront obtenus en variant seulement le degré d'accessibilité du site de liaison dans l'état inactif (variation de  $K_D^{\text{off}}$  seulement, équation 14). Un site de liaison partiellement accessible dans l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$  bas) devrait donner lieu au mécanisme par ajustement induit, où la liaison précède le changement conformationnel, alors qu'un site de liaison inaccessible dans l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$  élevé) devrait donner lieu au mécanisme par sélection conformationnelle, où le changement conformationnel précède la liaison. En effet, il fut observé que le mécanisme de reconnaissance moléculaire passe de la sélection conformationnelle à l'ajustement induit lorsque la concentration de ligand augmente <sup>(44)</sup>, plus précisément lorsque la concentration de ligand atteint 10% de la valeur de  $K_D^{\text{off}}$  (où environ 9% de l'état inactif est lié) <sup>(38)</sup>. Notre modèle pourrait ainsi permettre de valider ces conclusions en variant directement  $K_D^{\text{off}}$  et en caractérisant l'effet de ce paramètre sur le choix du mécanisme.

Ainsi muni d'un modèle de chaque mécanisme d'activation, il sera ensuite question d'explorer le mécanisme de désactivation correspondant à chacun. En d'autres mots, il sera question de vérifier si le même intermédiaire ( $P_1L$  ou  $P_2$ ) est utilisé pour les processus d'activation et de désactivation d'un interrupteur donné. Comme l'activation par sélection conformationnelle implique un intermédiaire où les interactions propres à l'état inactif doivent être perdues avant la liaison du ligand, ces deux types d'interactions semblent mutuellement exclusives et le même intermédiaire inactif non-lié ( $P_2$ ) serait aussi impliqué dans le processus de désactivation, donnant lieu à une désactivation par sélection conformationnelle. Dans le cas d'une activation par ajustement induit, l'intermédiaire impliqué dans ce processus conserve les interactions propres à l'état inactif pendant l'interaction initiale avec le ligand, les interactions propres à l'état inactif et les interactions avec le ligand ne semblent donc pas mutuellement exclusives et le même intermédiaire inactif lié ( $P_1L$ ) pourrait aussi être impliqué dans le processus de désactivation, donnant lieu à une désactivation par ajustement induit. Bien que ce lien entre le mécanisme d'activation et le mécanisme de désactivation d'un interrupteur n'ait jamais été caractérisé expérimentalement, ce sujet a toutefois été abordé de façon théorique dans un article affirmant qu'en raison du principe de balance détaillée, imposant que le flux à l'équilibre dans une direction du cycle thermodynamique soit égal au flux dans la direction opposée, l'ordre des événements doit être inversé lors du processus de désactivation <sup>(15)</sup>. Ainsi, il semble que le même intermédiaire et le même mécanisme serait utilisé autant pour l'activation que pour la désactivation d'un interrupteur donné. Notre modèle d'ADN sera donc utilisé pour caractériser expérimentalement le mécanisme de désactivation d'interrupteurs activés par ajustement induit ou par sélection conformationnelle ainsi que pour comparer la cinétique de ces processus.

Finalement, le modèle d'ADN sera utilisé pour identifier certains paramètres thermodynamiques qui contrôlent les vitesses d'activation et de désactivation de ces deux mécanismes. Sur la base des équations de vitesse qui décrivent le modèle théorique à trois états représentant chaque mécanisme (Figure 8 et Table I), nous croyons qu'il sera possible de modifier la vitesse d'activation par ajustement induit en variant l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}} = k_{-L}/k_L$ ) alors que la vitesse d'activation par sélection conformationnelle pourrait être modifiée en variant l'équilibre conformationnel de l'interrupteur ( $K_S = k_s/k_{-s}$ ). Notre modèle d'ADN pourrait ainsi démontrer expérimentalement, pour la première fois, quels

paramètres thermodynamiques contrôlent la cinétique de chaque mécanisme. Cette compréhension approfondie de la cinétique des mécanismes de reconnaissance moléculaire pourrait faciliter la conception d'interrupteurs moléculaires aux propriétés cinétiques optimales.

## Chapitre 2 : Méthodologie

### 2.1 Ingénierie, synthèse et purification d'oligonucléotides

Les séquences de tous les brins d'ADN utilisés ont été créées en s'assurant de minimiser la stabilité de toute structure secondaire simple-brin ( $\Delta G > -0.5\text{kcal/mol}$ ) ainsi que l'énergie libre de toute interaction bimoléculaire indésirable ( $\Delta G > -3\text{kcal/mol}$ ) puisque de telles structures peuvent affecter la cinétique<sup>(80)</sup>. Les prédictions de structure secondaire ou d'interactions bimoléculaires ainsi que les énergies libre correspondantes furent obtenues à l'aide du logiciel *mfold*<sup>(66)</sup>. Le calcul des constantes d'équilibre ( $K_s$  et  $K_D^{\text{on}}$ ) et des concentrations théoriques des formes simple-brin et double-brin est fait à l'aide des équations 18 et 19, respectivement. Dans ces équations,  $K_{eq}$  représente la constante d'équilibre,  $\Delta G$  représente l'énergie libre de Gibbs,  $R$  la constante universelle des gaz parfaits,  $T$  la température en Kelvin,  $K_D$  la constante d'équilibre de dissociation,  $[AB]_{eq}$  la concentration de duplexe à l'équilibre,  $[A]_0$  et  $[B]_0$  la concentration totale individuelle de chacun des deux brins d'ADN.

$$\Delta G = -RT \ln(K_{eq}) \quad \text{Éq. 18}$$

$$[AB]_{eq} = \frac{([A]_0 + [B]_0 + K_{eq}) - \sqrt{([A]_0 + [B]_0 + K_{eq})^2 - 4[A]_0[B]_0}}{2} \quad \text{Éq. 19}$$

Tous les oligonucléotides ont été synthétisés au laboratoire à l'aide d'un synthétiseur sur support solide *K&A Laborgeraete GbR H-8 DNA/RNA Synthesizer*. Les nucléotides phosphoramidites non marqués ainsi que les nucléotides phosphoramidites marqués *fluorescein (6-FAM)* ou *blackhole quencher (BHQ-1)* ont été achetés de *Biosearch Technologies* (Novato, CA). Les oligonucléotides non-marqués, possédant un groupement DMT en 5', sont purifiés sur colonnes de phase inverse *MicroPure II (BioSearch, Petaluma, CA)* selon les directives du fournisseur. Les oligonucléotides marqués (3' *BHQ-1* et 5' *6-FAM*)

sont d'abord clivés du support solide par traitement à l'ammoniac 30% durant la nuit puis purifiés par HPLC (*Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System, Agilent Technologies*) à l'aide d'une colonne *XBridge Oligonucleotide BEH C18, 130Å, 2.5µm, 4.6mmX50mm, 1/pkg (Waters, ONT, CA)*. Les concentrations des oligonucléotides ont été déterminées par mesures d'absorbance à 260 nm sur un appareil *Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, CA)* en utilisant le coefficient d'extinction molaire prédit par le logiciel *GenScript* ([http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer\\_calculation](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_calculation)).

## 2.2 Séquences des oligonucléotides utilisés

Les noms des différents brins boucles utilisés pour la variation de  $K_s$  sont notés avec  $-X$  lorsque le brin possède  $X$  nucléotides en moins par rapport aux brins boucles possédant le même  $K_s$  utilisés à la figure 20. De la même façon, les brins boucles avec la notation  $+X$  possèdent  $X$  nucléotides supplémentaires et complémentaires avec le brin rapporteur correspondant. Le brin rapporteur possède des nucléotides supplémentaires à chaque extrémité de façon à permettre d'augmenter le nombre de paires de bases avec le brin boucle en changeant seulement ce dernier. Puisque la boucle de 1 nucléotide originale possède presque la même longueur que la cible de 17 nucléotides utilisée pour les expériences de variation de  $K_s$ , la réduction du nombre de paires de bases entre le brin boucle et le brin rapporteur (augmentation de  $K_s$ ) est effectuée par échange réciproque de nucléotides entre les extrémités du brin cible et du brin boucle afin de conserver la complémentarité parfaite avec la cible tout en diminuant le nombre de paires de bases entre les brins boucle et rapporteur. Les cibles utilisées pour ces variants de la boucle 1 portent la même notation  $-X$  que la boucle 1 correspondante.

**Boucle 1 +2 :** 5' CCACGACACGAAGACGCCC 3'  
**Boucle 1 :** 5' ACACGACACGAAGACGCC 3'  
**Boucle 1 -2 :** 5' AGACGACACGAAGACGCG 3'  
**Boucle 1-3 :** 5' AGTCGACACGAAGACGCG 3'  
**Rapporteur 1 :** 5' 6-FAM - GTGTGGGCGTCTTGTGTCGTGGTGTG - BHQ-1 3'

**Boucle 7 +2 :** 5' CCATCCACGACACGAAGACGCCAATCC 3'  
**Boucle 7 :** 5' CATCCACGACACGAAGACGCCAATC 3'  
**Boucle 7 -2 :** 5' ATCCACGACACGAAGACGCCAATA 3'  
**Boucle 7 -3 :** 5' ATCCACGACACGAAGACGCCAAT 3'  
**Rapporteur 7 :** 5' 6-FAM - GTGTGGATTGGCGTTCGTGGATGGTGTG - BHQ-1 3'

**Boucle 10 +2 :** 5' CCTCGTCACGACACGAAGACGCCACTGAGC 3'  
**Boucle 10 :** 5' CTCGTCACGACACGAAGACGCCACTGAG 3'  
**Boucle 10 -2 :** 5' TCGTCACGACACGAAGACGCCACTGA 3'  
**Boucle 10 -3 :** 5' CGTCACGACACGAAGACGCCACTGA 3'  
**Rapporteur 10 :** 5' 6-FAM - GTGTGCTCAGTGGCCGTGACGAGGTGTG - BHQ-1 3'

**Boucle 13 +2 :** 5' CCCCTCATCCACGACACGAAGACGCCAAACTCCCC 3'  
**Boucle 13 :** 5' CCCTCATCCACGACACGAAGACGCCAAACTCCC 3'  
**Boucle 13 -2 :** 5' CCTCATCCACGACACGAAGACGCCAAACTCC 3'  
**Boucle 13 -4 :** 5' CTCATCCACGACACGAAGACGCCAAACTC 3'  
**Rapporteur 13 :** 5' 6-FAM - GTGTGGGGAGTTTGGTGGATGAGGGGTGTG - BHQ-1 3'

**Cible 17 :** 5' GCGTCTTCGTGTCGTG 3'  
**Cible 1 -2 :** 5' CGCGTCTTCGTGTCGTC 3'  
**Cible 1 -3 :** 5' CGCGTCTTCGTGTCGAC 3'  
**Cible 14 :** 5' GCGTCTTCGTGTCG 3'  
**Cible 13 :** 5' CGTCTTCGTGTCG 3'  
**Cible 12 :** 5' CGTCTTCGTGTC 3'  
**Cible 11 :** 5' GTCTTCGTGTC 3'

### 2.3 Courbes de dénaturation à l'urée

La détermination de la constante d'équilibre conformationnel ( $K_s$ ), représentée dans notre modèle par un équilibre de liaison entre les brins boucle et rapporteur, a été effectuée à l'aide de courbes de dénaturation. Pour ce faire, les brins boucle et rapporteur sont initialement dilués à une concentration de 100 nM dans un tampon 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 10 M urée, pH 7.0 frais du jour. La concentration d'urée est diluée par ajouts successifs d'une solution de 100 nM des brins boucle et rapporteur dans un tampon 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.0 sans urée. Pour chaque concentration d'urée, la fluorescence à l'équilibre du duplexe boucle-rapporteur est mesurée à l'aide d'un instrument *Cary Eclipse Fluorimeter* à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 480 nm et 517 nm, respectivement, avec une ouverture de fente de 5 nm. Les expériences sont effectuées à 37°C et les mesures sont prises à des incréments de 0.4 M d'urée en s'assurant que l'équilibre a été atteint, c'est-à-dire lorsque la fluorescence mesurée cesse de varier. Les données de fluorescence peuvent être converties en constantes d'équilibre observé ( $K_{obs}$ ) dans la zone de transition à partir des équations 21 à 23. Ces équations permettent d'extrapoler la fluorescence des états double-brin ( $f_{ab}$ ) et simple-brin ( $f_{sb}$ ) dans la zone de transition pour ensuite calculer le

rapport des concentrations à l'équilibre des brins liés et non-liés à partir des concentrations totales de chaque brin d'ADN ( $[A]_{tot}$  et  $[B]_{tot}$ ). Les valeurs de  $f_{db}$  et  $f_{sb}$  sont déterminées à l'aide des droites des plateaux double-brin et simple brin, respectivement. Les constantes  $f_{db}^{\circ}$  et  $f_{sb}^{\circ}$  représentent les ordonnées à l'origine des droites des plateaux double-brin et simple-brin, respectivement. Les constantes  $m_{db}$  et  $m_{sb}$  représentent les pentes des droites des plateaux double-brin et simple-brin, respectivement. Les constantes d'équilibre obtenues peuvent ensuite être converties en énergie libre observée ( $\Delta G_{obs}$ ) aux différentes concentrations de dénaturant ( $[D]$ ) à l'aide de l'équation 24. Puisque l'énergie libre de dénaturation varie linéairement en fonction de la concentration de dénaturant avec une pente  $m_G$  <sup>(68, 81)</sup>, il est possible d'extrapoler l'énergie libre de dénaturation en absence de dénaturant ( $\Delta G_{H2O}^{\circ}$ ) à l'aide de l'équation 25. Selon la méthode décrite par Santoro et Bolen <sup>(68)</sup>, adaptée ici pour un équilibre bimoléculaire, les équations 21 à 25 peuvent être combinées (équation 26) pour exprimer directement le signal de fluorescence ( $f_x$ ) en fonction de l'énergie libre de dénaturation en absence d'urée ( $\Delta G_{H2O}^{\circ}$ ). L'équation 26 est utilisée pour l'ajustement de courbes à l'aide du logiciel *KaleidaGraph version 4.1 (Synergy Software)*.

$$f_{db} = f_{db}^{\circ} + m_{db}[D] \quad \text{Éq. 21}$$

$$f_{sb} = f_{sb}^{\circ} + m_{sb}[D] \quad \text{Éq. 22}$$

$$K_{obs} = \frac{(f_{db} - f_x)[A]_{tot}[B]_{tot}}{(f_x - f_{sb})[A]_{tot}} \quad \text{Éq. 23}$$

$$\Delta G_{obs} = -RT \ln K_{obs} \quad \text{Éq. 24}$$

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{H2O}^{\circ} + m_G[D] \quad \text{Éq. 25}$$

$$f_x = \frac{[B]_{tot} (f_{db}^{\circ} + m_{db}[D]) + (f_{sb}^{\circ} + m_{sb}[D]) \exp \frac{(\Delta G_{H2O}^{\circ} + m_G[D])}{-RT}}{[B]_{tot} + \exp \frac{(\Delta G_{H2O}^{\circ} + m_G[D])}{-RT}} \quad \text{Éq. 26}$$

## 2.4 Cinétique des interrupteurs

Toutes les expériences cinétiques ont été réalisées à 37°C dans un tampon 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.0. Les données cinétiques sont obtenues en conditions de

pseudo-premier ordre avec des concentrations de 100 nM pour les brins boucle et rapporteur ainsi que 10  $\mu$ M du brin cible pour les expériences d'activation, sauf lorsqu'indiqué autrement. Les concentrations utilisées pour les expériences de désactivation sont de 100 nM du brin boucle (boucle 13 +2 et boucle 1 +2), 1  $\mu$ M du brin cible et 100 nM du brin rapporteur. Avant l'ajout de la cible (activation) ou du brin rapporteur (désactivation), le duplexe initial est chauffé jusqu'à 75°C puis lentement refroidi jusqu'à 37°C sur le cours d'une heure afin de briser toutes les structures secondaires indésirables et favoriser seulement la structure prédite de plus haute stabilité. La cinétique lente de l'interrupteur avec boucle de 1 nucléotide a été mesurée à l'aide d'un appareil *Cary Eclipse Fluorimeter* à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 480 nm et 517 nm, respectivement, en utilisant une ouverture de fente de 5 nm. La cinétique rapide des interrupteurs avec boucles de 7, 10 et 13 nucléotides a été mesurée à l'aide d'un appareil de mixage rapide de type *stopped-flow SX20 (Applied Photophysics, Surrey, UK)* à une longueur d'onde d'excitation de 480 $\pm$ 5 nm et en mesurant l'émission à toutes les longueurs d'ondes supérieures à 495 nm à l'aide d'un filtre optique. Les données de fluorescence sont converties en fractions inactives à l'aide de l'équation 27. Dans cette équation,  $FI_t$  représente la fraction inactive au temps  $t$ ,  $f_t$  représente la fluorescence au temps  $t$ ,  $f_{min}$  représente la fluorescence du contrôle sans brin boucle (fluorescence minimale correspondant à l'interrupteur 100% actif) et  $f_{max}$  correspond à la fluorescence du contrôle sans brin cible (100% inactif). Les courbes cinétiques sont analysées par ajustement des données expérimentales avec l'équation exponentielle (éq. 28) sauf dans le cas de l'interrupteur avec boucle de 13 nucléotides qui correspond à une cinétique bi-exponentielle (éq. 29). Dans ces équations,  $A$  représente l'amplitude,  $e$  représente la fonction exponentielle,  $k_{obs}$ ,  $k_1$  et  $k_2$  représentent les constantes de vitesse observées,  $t$  représente le temps et  $B$  est une constante qui représente la fraction de l'état initial restante à l'équilibre. L'ajustement des courbes est fait à l'aide du logiciel *KaleidaGraph version 4.1 (Synergy Software)*.

$$FI_t = \frac{f_t - f_{min}}{f_{max} - f_{min}} \quad \text{Éq. 27}$$

$$FI_t = Ae^{-k_{obs}t} + B \quad \text{Éq. 28}$$

$$FI_t = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} + B \quad \text{Éq. 29}$$

## Chapitre 3 : Résultats

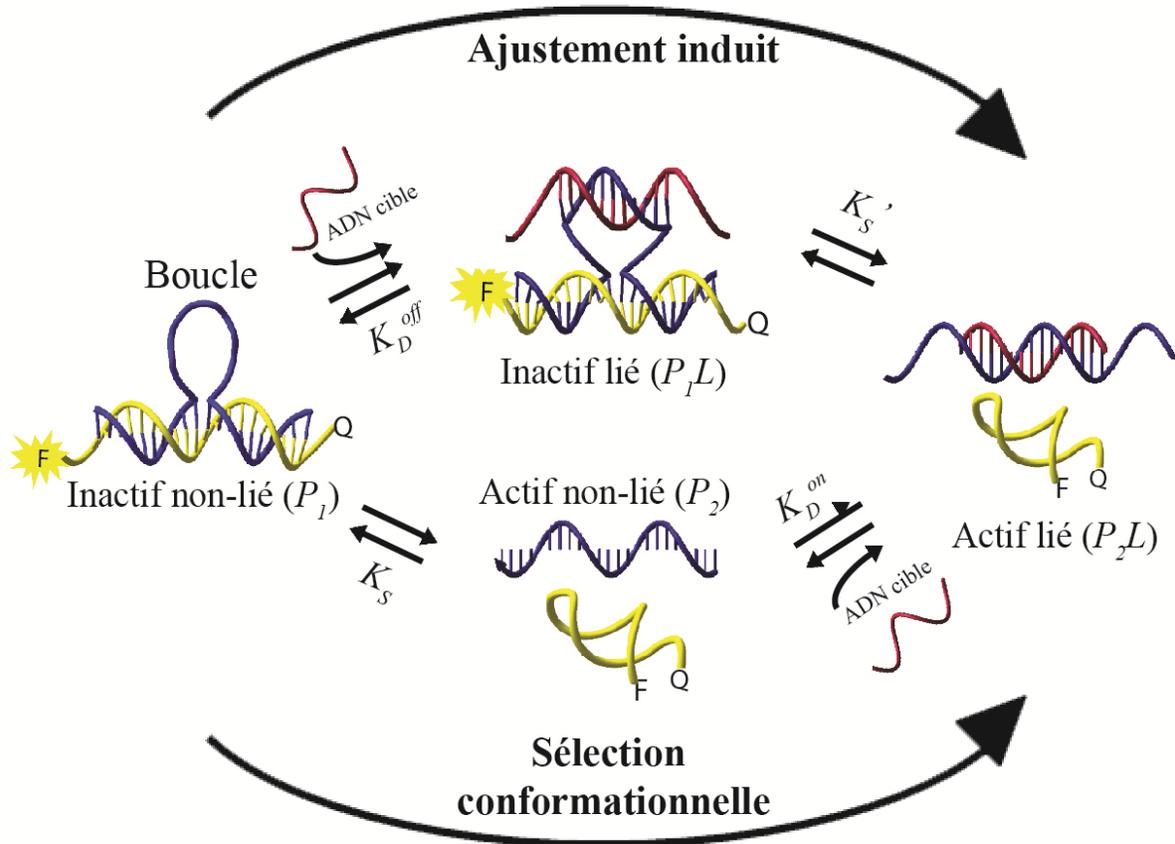
### 3.1 Structure du modèle d'ADN

Afin de comparer les performances cinétiques des deux mécanismes classiques d'activation par un ligand, nous avons mis au point un interrupteur d'ADN modulaire pouvant être activé par l'un ou l'autre des mécanismes en utilisant le même brin d'ADN cible. L'architecture modulaire utilisée (Figure 18) permet de varier indépendamment chaque constante thermodynamique ( $K_D^{\text{off}}$ ,  $K_D^{\text{on}}$ ,  $K_S$  et  $K_S'$ ) par de simples modifications de séquence des brins rapporteur (jaune), boucle (bleu) ou cible (rouge). En effet, l'affinité de l'état inactif de l'interrupteur pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$ ) est contrôlée par la boucle de longueur variable présente dans l'état inactif qui contient une partie de la séquence complémentaire au brin cible. Le nombre de nucléotides contenus dans cette boucle, dont la longueur varie entre 1 et 13 nucléotides, détermine le nombre de paires de bases maximal qui peuvent être établies entre la cible et l'interrupteur dans l'état inactif. L'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) entre les formes active (brin rapporteur libre) et inactive (duplex rapporteur-boucle) non-liées peut être modifié de façon très prédictible puisqu'il dépend principalement de la séquence complémentaire entre les brins rapporteur et boucle ainsi que de la contribution déstabilisante de la boucle. Ces paramètres sont assez bien caractérisés pour qu'un logiciel de prédiction de structure d'acides nucléiques, tel *mfold*, puisse en prédire l'énergie libre de liaison et la structure <sup>(65)</sup>. Cette constante d'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) entre les brins boucle et rapporteur, qui est en fait une constante d'équilibre de dissociation entre ces deux brins, peut être calculée à partir de l'énergie libre de liaison ( $\Delta G$ ) fournie par *mfold* à l'aide de l'équation 18. Dans notre modèle, l'équilibre conformationnel (unimoléculaire) est représenté par un équilibre de liaison (bimoléculaire) afin d'éviter la formation de dimères. En effet, pour qu'un interrupteur d'ADN possède un changement conformationnel unimoléculaire, la séquence de cet interrupteur doit comprendre un certain degré d'auto-complémentarité pour former une structure secondaire stable propre à l'état inactif. Cette auto-complémentarité peut aussi mener à la formation de dimères indésirables, dont la population au sein de l'ensemble conformationnel sera proportionnelle à la concentration d'interrupteur et à son degré d'auto-complémentarité. Notamment, un interrupteur unimoléculaire possédant une boucle interne de moins de quatre nucléotides dans l'état inactif ne pourrait pas être utilisé puisque la formation de ces structures

en épingle avec une boucles très courtes est particulièrement déstabilisante, le dimère serait alors favorisé <sup>(82)</sup>. Contrairement à un équilibre conformationnel unimoléculaire, la vitesse d'association des brins formant l'état inactif de l'interrupteur ( $k_s[\text{boucle}][\text{rapporteur}]$ ) ainsi que la fraction d'interrupteurs dans l'état inactif ( $([\text{boucle-rapporteur}]/([\text{boucle}]+[\text{boucle-rapporteur}]))$ ), en absence de ligand, dépendent de la concentration des deux brins d'ADN formant l'interrupteur. Les concentrations des brins boucle et rapporteur qui composent l'interrupteur sont donc maintenues constantes à travers toutes les expériences (100 nM) afin d'éviter l'introduction d'une variable supplémentaire dans notre système. La troisième constante thermodynamique de ce système, l'affinité de l'état actif pour la cible ( $K_D^{\text{on}}$ ), peut aussi être modifiée et prédite avec précision en utilisant *mfold*. Puisque  $K_D^{\text{on}}$  ne dépend que de la séquence parfaitement complémentaire entre la cible et le brin boucle, cette constante peut être variée simplement en modifiant la longueur du brin cible parfaitement complémentaire au brin boucle. La valeur de  $K_D^{\text{on}}$  peut aussi être calculée à partir de l'énergie libre de liaison ( $\Delta G$ ) fournie par *mfold* à l'aide de l'équation 18. Finalement, la quatrième et dernière constante thermodynamique,  $K_s'$ , l'équilibre conformationnel de l'interrupteur lié au brin cible, est un paramètre propre au mécanisme par ajustement induit qui résulte d'un  $K_D^{\text{off}}$  favorable à la liaison du ligand avec l'état inactif.  $K_s'$  constitue la variable dépendante de ce système et ne peut pas être modifié directement de manière indépendante. En effet, dans un cycle thermodynamique à quatre états et quatre constantes d'équilibre, seulement trois de ces constantes d'équilibre sont indépendantes <sup>(39)</sup>. La relation entre cette constante d'équilibre et les trois autres de ce cycle thermodynamique est décrite par l'équation 17.

L'activation de l'interrupteur, composé des brins boucle et rapporteur partiellement complémentaires, peut être mesurée en temps réel par spectroscopie de fluorescence grâce à un couple fluorophore (*carboxyfluorescein*) et extincteur de fluorescence (*Black Hole Quencher-1*) attachés aux extrémités 5' et 3' du brin rapporteur, respectivement. En effet, la liaison du brin cible au brin boucle, étant plus stable que le duplexe boucle-rapporteur, provoque un déplacement de la population d'interrupteurs de la conformation inactive non-liée (duplex boucle-rapporteur) vers la conformation active liée (duplex boucle-cible) (Figure 18). Ce changement de conformation donne lieu à une diminution du signal de fluorescence puisque la dissociation du brin rapporteur permet le rapprochement du fluorophore et de l'extincteur de fluorescence. En effet, lorsque le brin rapporteur est lié au brin boucle, il se

trouve dans une conformation étendue qui sépare le fluorophore et l'extincteur de fluorescence, tandis que lorsque le brin rapporteur est libre, l'affinité entre le fluorophore et l'extincteur de fluorescence <sup>(83)</sup> entraîne leur rapprochement et la diminution du signal de fluorescence.



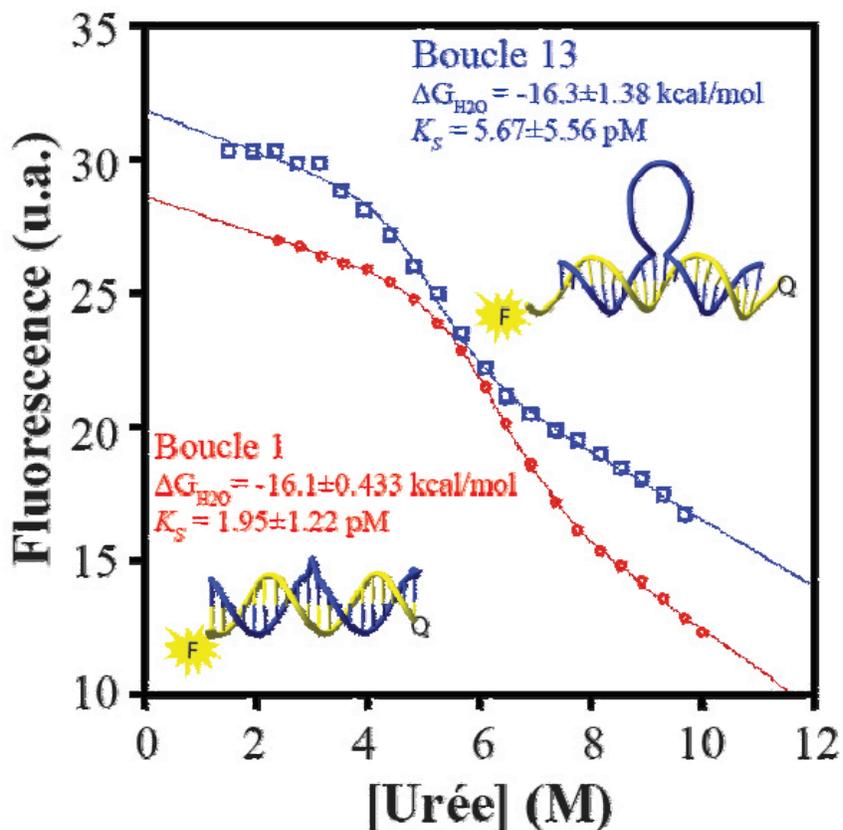
**Figure 18. Représentation schématique de l'interrupteur d'ADN utilisé pour recréer les mécanismes de liaison par ajustement induit et par sélection conformationnelle.** L'interrupteur est composé du brin boucle (bleu) partiellement complémentaire au brin rapporteur (jaune) portant une paire fluorophore (F) et extincteur de fluorescence (Q). Le duplexe boucle-rapporteur est en équilibre ( $K_S$ ) entre une conformation hybridée et fluorescente dite inactive non-liée ( $P_1$ ) et une conformation déshybridée non-fluorescente dite active non-liée ( $P_2$ ). Le brin boucle porte la séquence complémentaire au brin cible (rouge), ce qui définit l'affinité du brin boucle pour la cible ( $K_D^{on}$ ). Le degré de complémentarité entre la séquence complémentaire au brin cible portée par le brin boucle et la séquence du brin rapporteur définit la longueur de la boucle et l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{off}$ ). La liaison de la cible peut se faire avec l'état actif non-lié ( $P_2$ ), pour donner lieu à l'état actif lié ( $P_2L$ ) via un intermédiaire actif non-lié (sélection conformationnelle, flèche du bas), ou directement avec l'état inactif non-lié ( $P_1$ ), pour donner lieu à l'état actif lié ( $P_2L$ ) via un intermédiaire inactif lié ( $P_1L$ ) (ajustement induit, flèche du haut), où l'équilibre conformationnel est affecté par la présence du ligand ( $K_S'$ ). Les directions des flèches correspondent au processus d'activation. Les constantes thermodynamiques ( $K_D^{off}$ ,  $K_D^{on}$ ,  $K_S$  et  $K_S'$ ) sont décrites par les équations 10-13.

### 3.2 L'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) influence la cinétique d'activation

Afin de recréer les deux mécanismes de liaison à l'aide du modèle d'ADN décrit précédemment, nous avons créé deux interrupteurs d'ADN qui ne diffèrent que par la longueur de la boucle (différents  $K_D^{\text{off}}$ ). L'activation d'un interrupteur avec une boucle très courte, ne pouvant pas lier la cible, devrait nécessiter un changement conformationnel spontané (dissociation des brins boucles et rapporteurs) pour que la séquence complémentaire à la cible devienne accessible et que la liaison puisse avoir lieu (sélection conformationnelle). Au contraire, une longue boucle devrait permettre la liaison de la cible directement avec l'état inactif, favorisant ainsi un mécanisme d'activation par ajustement induit. Puisque la liaison de deux brins d'ADN requiert au moins sept ou huit nucléotides complémentaires et contigus pour obtenir une constante de dissociation dans l'ordre du bas micromolaire <sup>(84)</sup>, ordre de concentration de cible idéal pour nos mesures, nous avons choisi d'utiliser une boucle de seulement 1 nucléotide pour empêcher la liaison à l'état inactif (sélection conformationnelle) ainsi qu'une boucle de 13 nucléotides pour favoriser la liaison de la cible directement à l'état inactif (ajustement induit). En comparant la cinétique de deux interrupteurs qui ne diffèrent que par leur mécanisme de liaison (résultant d'une variation de  $K_D^{\text{off}}$  seulement), il sera possible de déterminer si ces mécanismes donnent lieu à des vitesses d'activation différentes.

Pour vérifier que les interrupteurs avec une boucle de 1 et 13 nucléotides ne diffèrent que par l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{\text{off}}$ ), nous avons mesuré l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) de ces interrupteurs de façon à s'assurer que ce paramètre ne constitue pas une variable additionnelle. En effet, la présence d'une boucle diminue la fiabilité des prédictions de *mfold* <sup>(65)</sup>, ce qui justifie le besoin d'une validation expérimentale. Les énergies libres prédites par *mfold* pour l'association des brins boucle et rapporteur sont de -16.21 kcal/mol et -16.38 kcal/mol pour les interrupteurs avec boucle de 1 et 13 nucléotides, respectivement, ce qui correspond à des  $K_S$  presque identiques de 3.7 pM et 2.9 pM, respectivement. Nous avons vérifié expérimentalement ces valeurs de  $K_S$  à l'aide de courbes de dénaturation à l'urée (Figure 19). L'analyse de ces courbes a permis de déterminer que l'énergie libre d'association entre les brins boucles et rapporteurs est de  $-16.19 \pm 0.4$  kcal/mol dans le cas de la boucle 1 et de  $-16.34 \pm 1.3$  kcal/mol dans le cas de la boucle 13, ce qui

correspond à des  $K_S$  de  $4.6 \pm 2.6$  pM et  $12.5 \pm 12.1$  pM, respectivement. Ces valeurs de  $K_S$  expérimentales presque identiques sont en accord avec les prédictions de *mfold*. À la lumière des prédictions et de la détermination expérimentale de  $K_S$ , nous savons que ce paramètre ne constitue pas une différence importante susceptible de résulter en un écart entre les vitesses d'activation des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides.



**Figure 19 : Les interrupteurs à boucle de 1 et 13 nucléotides possèdent un équilibre conformationnel ( $K_S$ ) similaire.** Courbes d'équilibre de dénaturation à l'urée pour les interrupteurs avec boucle de 1 (rouge) et 13 (bleu) nucléotides. Les énergies libres d'association en absence d'urée ( $\Delta G_{H_2O}$ ) calculées sont de  $-16.19 \pm 0.4$  kcal/mol pour la boucle 1 et  $-16.34 \pm 1.3$  kcal/mol pour la boucle 13, ce qui correspond à des valeurs de  $K_S$  de  $4.6 \pm 2.6$  pM et  $12.5 \pm 12.1$  pM, respectivement. Les coefficients de corrélation  $R^2$  obtenus pour l'ajustement des courbes sont de 0.9998 et 0.9981 pour la boucle 1 et la boucle 13, respectivement.

Tout comme  $K_S$ , l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{on}$ ) ne constitue pas une variable entre les deux interrupteurs. La valeur de  $K_D^{on}$  peut être prédite avec une bonne certitude par *mfold* puisqu'il s'agit d'un duplex parfaitement complémentaire. Puisqu'il s'agit de la même cible pour les deux interrupteurs (boucles de 1 et 13 nucléotides),  $K_D^{on}$  ne devrait être significativement différent. En effet, les énergies libres d'association prédites avec la

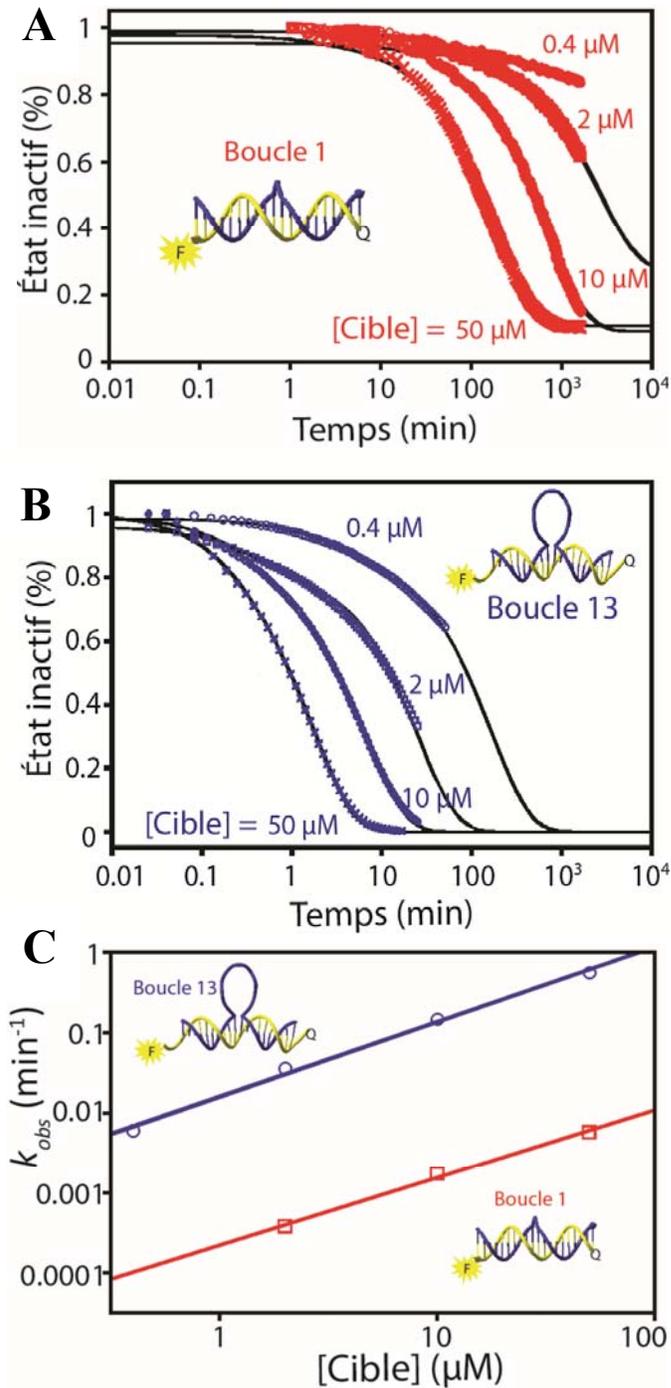
cible de 17 nucléotides sont de -21.70 kcal/mol pour la boucle 13 et -21.41 kcal/mol pour la boucle 1, correspondant à des  $K_D^{\text{on}}$  de 0.5 fM et 0.79 fM (équation 18), respectivement.

Afin de vérifier si une simple variation de l'affinité de l'état inactif pour la cible (longueur de la boucle,  $K_D^{\text{off}}$ ) nous permettrait de reproduire les deux mécanismes, nous avons comparé les vitesses d'activation des interrupteurs avec boucle de 1 et 13 nucléotides à différentes concentrations de cible. En effet, puisque les mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle font intervenir un intermédiaire différent, associé à des barrières d'activation différentes, il est attendu que ces mécanismes montrent des vitesses d'activation différentes. De plus, la variation de la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) en fonction de la concentration de cible peut permettre de différencier les deux mécanismes dans certains cas (voir sections 1.2.1.1 et 1.2.1.2).

Les résultats de la cinétique d'activation des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides (Figure 20, A et B) montrent bien une diminution du signal de fluorescence, correspondant à une diminution de la fraction d'interrupteurs inactifs. Les traces cinétiques de la boucle 1 sont bien représentées par des courbes exponentielles simples (Figure 20, A) alors que les traces de la boucle 13 sont mieux représentées à l'aide de courbes bi-exponentielles (Figure 20, B) composées d'une phase rapide minoritaire (~15% de l'amplitude totale) ainsi qu'une phase lente majoritaire (~85% de l'amplitude). La phase minoritaire semble représenter une conformation alternative de la boucle (Annexe 2). À des fins de comparaison, seulement la vitesse de la phase lente de la boucle 13 sera considérée puisqu'il s'agit de la phase principale. Les constantes de vitesses observées ( $k_{\text{obs}}$ ) pour l'activation de ces deux interrupteurs augmentent linéairement en fonction de la concentration de cible (Figure 20, C), ce qui est typique des réactions de liaison en pseudo-premier ordre avec un changement conformationnel rapide<sup>(85-88)</sup>. Cela indique donc que l'activation résulte bien de la liaison de la cible et que cette étape de liaison correspond à l'étape cinétiquement limitante. En effet, si le changement conformationnel (dissociation du duplex boucle-rapporteur) était cinétiquement limitant aux concentrations de cible utilisées, une relation hyperbolique entre  $k_{\text{obs}}$  et la concentration de cible serait observée<sup>(33-35)</sup>. La vitesse d'activation serait saturée à la vitesse du changement conformationnel. Conséquemment, la cinétique des deux interrupteurs dans les conditions utilisées semble seulement refléter l'étape de liaison de la cible, ou en d'autres mots, du ligand. Il ne sera donc pas possible d'observer l'effet du ligand sur l'équilibre

conformationnel ( $K_S$ ) dans ces conditions. De plus, bien que la relation entre  $k_{obs}$  et la concentration de ligand puisse permettre de différencier les deux mécanismes dans certaines situations (voir sections 1.2.1.1, 1.2.1.2 et Figure 7), la relation linéaire observée ici entre 400 nM et 50  $\mu$ M de ligand ne correspond à aucune de ces situations et ne nous permet pas de distinguer directement le mécanisme de couplage entre la liaison et le changement conformationnel de ces interrupteurs.

On observe tout de même une différence de vitesse entre ces deux interrupteurs à toutes les concentrations de cible utilisées. En effet, l'interrupteur avec une boucle de 13 nucléotides est activé environ deux ordres de grandeur plus rapidement à toutes les concentrations de cible (Figure 20, C), ce qui suggère qu'il est possible que ces deux interrupteurs utilisent chacun un mécanisme différent. En effet, comme le  $K_S$  de ces interrupteurs implique un équilibre conformationnel où 99.6% de la population est en conformation inactive aux concentrations utilisées (voir matériel et méthodes et équation 19), il semble logique que la vitesse supérieure de la boucle 13 soit le résultat d'un mécanisme par ajustement induit où le ligand se lie directement à l'état inactif de plus haute concentration. Toutefois, ce résultat ne permet pas d'écarter la possibilité que cette différence de vitesse soit le résultat d'une liaison lente avec l'état inactif de la boucle 1 (ajustement induit) en raison d'un  $K_D^{off}$  supérieur à celui de la boucle 13. En effet, bien qu'à l'équilibre un duplex contenant seulement une paire de base aurait une concentration tout à fait négligeable, hors-équilibre, cette paire de base unique semble pouvoir servir de prise initiale ou d'intermédiaire dans une réaction de déplacement de brin médié (*toehold strand displacement*)<sup>(89)</sup>. En résumé, dans les conditions expérimentales utilisées, l'étape de liaison avec la cible est cinétiquement limitante dans le processus d'activation et la différence de vitesse observée entre les boucles de 1 et 13 (différents  $K_D^{off}$ ) possédant le même  $K_S$  et le même  $K_D^{on}$  suggère, sans prouver hors de tout doute, l'utilisation de mécanismes différents.



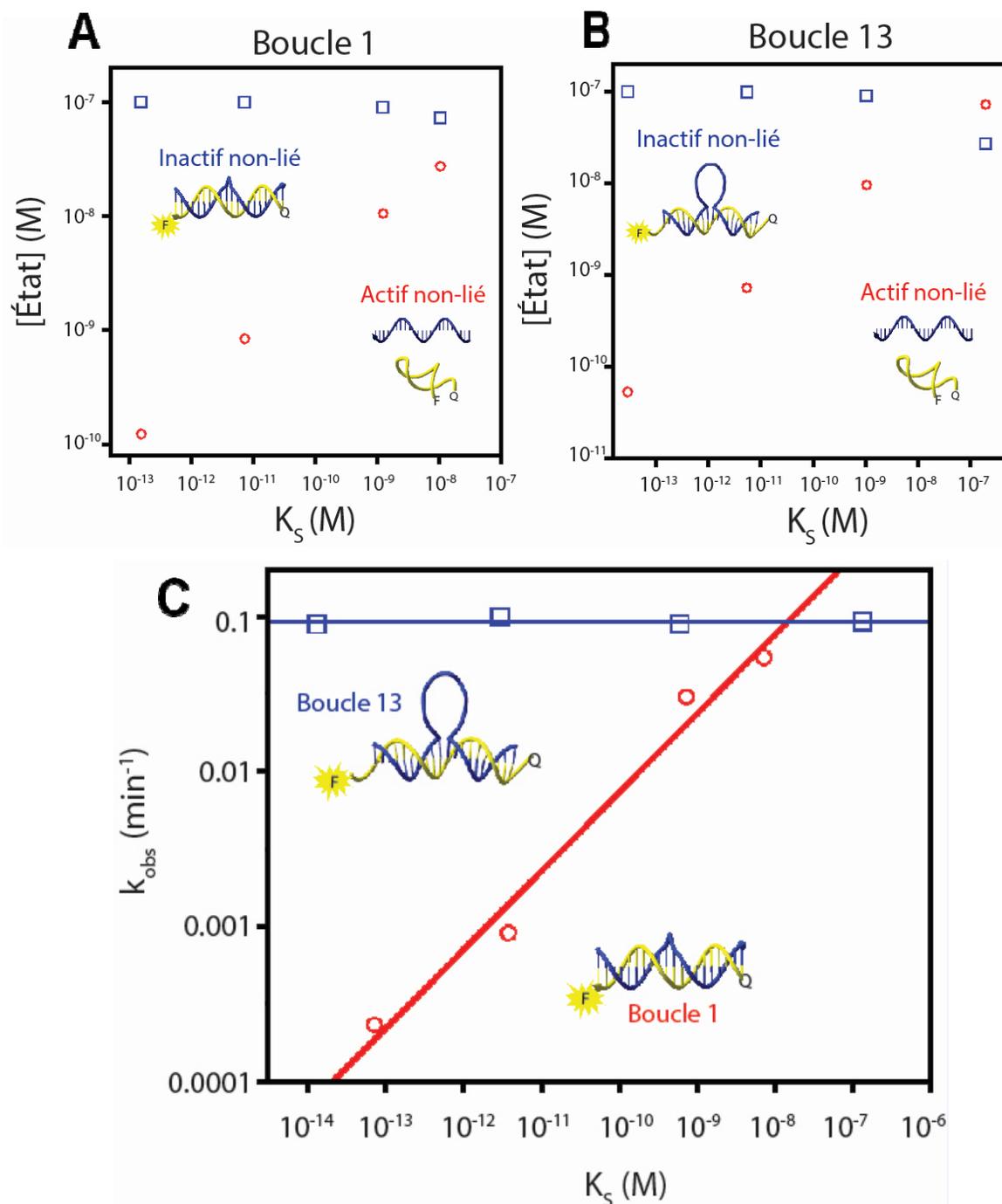
**Figure 20. Effet de l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{\text{off}}$ ) sur la cinétique des interrupteurs.** Cinétique d'activation des interrupteurs avec boucles de 1 (A) et 13 (B) nucléotides à différentes concentrations (400nM à 50 $\mu\text{M}$ ) de la cible de 17 nucléotides. Ces interrupteurs possèdent un équilibre conformationnel presque identique ( $K_S$ , Figure 19) et une même affinité de l'état actif pour la cible ( $K_D^{\text{on}}$ ). (C) Comparaison des constantes de vitesses de pseudo-premier ordre observées ( $k_{\text{obs}}$ ) pour les interrupteurs avec boucles de 1 (rouge) et 13 (bleu) nucléotides aux différentes concentrations de la cible de 17 nucléotides (400nM à 50 $\mu\text{M}$ ).

### 3.3 La différence de vitesse observée entre les boucles 1 et 13 résulte de l'utilisation de mécanismes différents

Pour vérifier si la différence de vitesse d'activation observée entre les interrupteurs avec boucle de 1 et 13 (Figure 20 C) résulte de l'utilisation de mécanismes différents, nous avons exploré l'effet de l'équilibre conformationnel ( $K_s$ ) sur la cinétique de chacun. Ainsi, nous avons synthétisé plusieurs variants des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides dont le nombre de paires de bases appariées dans l'état inactif a été altéré, modifiant ainsi l'équilibre conformationnel de ces interrupteurs ( $K_s$ ). En principe, il est possible de différencier ces deux mécanismes par l'effet de l'équilibre conformationnel ( $K_s$ ) sur la cinétique de chacun lorsque le changement conformationnel est rapide (voir section 1.2.1.3)<sup>(39)</sup>. En effet, une stabilisation de l'état inactif (diminution de  $K_s$ ) devrait ralentir l'activation par sélection conformationnelle (équation 9) alors que la vitesse d'activation par ajustement induit en serait indépendante (équation 7). L'effet de  $K_s$  sur la vitesse d'activation de ces mécanismes peut aussi être expliqué conceptuellement à partir du fait qu'en présence d'un changement conformationnel rapide par rapport à l'étape de liaison, les concentrations de l'état inactif non-lié et de l'état actif non-lié sont toujours à l'équilibre par rapport à l'étape de liaison. Puisqu'aux différents  $K_s$  utilisés, la concentration à l'équilibre de l'état inactif non-lié ne varie pas significativement (Figure 21, A et B, bleu), la vitesse de l'ajustement induit ne devrait donc pas varier puisque ce mécanisme implique la liaison de la cible directement avec l'état inactif. Au contraire, la concentration à l'équilibre de l'état actif non-lié varie sur environ trois ordres de grandeur pour la plage de  $K_s$  utilisée (Figure 21, A et B, rouge), la vitesse de la sélection conformationnelle devrait donc aussi varier puisque ce mécanisme implique la liaison de la cible directement avec l'état actif.

La cinétique d'activation de l'interrupteur avec une boucle de 13 nucléotides est effectivement indépendante de l'équilibre conformationnel ( $K_s$ ) alors que la constante de vitesse pour l'activation de l'interrupteur avec une boucle de 1 nucléotide augmente proportionnellement au  $K_s$  sur trois ordres de grandeur (Figure 21 C). Ces résultats sont en accord avec le modèle cinétique à trois états présenté à la section 1.2.1.3 où la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) pour l'activation par ajustement induit (Figure 21 C, bleu) est indépendante de  $K_s$  ( $k_s/k_{-s}$ ) (éq. 7) alors que  $k_{obs}$  pour l'activation par sélection

conformationnelle (Figure 21 C, rouge) varie proportionnellement à  $K_S$  (éq. 9), lorsque le changement conformationnel est rapide. Ces résultats nous permettent donc de conclure que la boucle de 1 nucléotide est activée par sélection conformationnelle alors que la boucle de 13 nucléotide fonctionne par ajustement induit, validant du même coup notre hypothèse voulant que l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$ ) soit un paramètre déterminant pour le mécanisme de liaison. De plus, en confirmant le mécanisme de ces interrupteurs, nous avons obtenu le premier résultat expérimental permettant de comparer directement la cinétique de ces deux mécanismes. En effet, la différence de vitesse observée entre les deux interrupteurs possédant un  $K_S$  similaire (Figure 20) peut maintenant être expliquée par l'utilisation de mécanismes différents. Ainsi, nous observons que lorsque l'étape de liaison avec la cible est cinétiquement limitante, le mécanisme par ajustement induit donne lieu à une activation beaucoup plus rapide que le mécanisme par sélection conformationnelle lorsque l'état inactif est très stable ( $K_S$  bas). Toutefois, cette différence de vitesse tend à diminuer avec l'augmentation de la vitesse de la sélection conformationnelle lorsque l'état inactif est déstabilisé (augmentation de  $K_S$ ) (Figure 21).



**Figure 21. Effet du  $K_S$  sur la concentration à l'équilibre des états actifs et inactifs et sur la vitesse d'activation ( $k_{obs}$ ) des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides. (A-B)** Concentrations théoriques de l'interrupteur dans la forme active non-liée (rouge) et inactive non-liée (bleu) en fonction du  $K_S$ . Les concentrations théoriques sont calculées à l'aide de l'équation 19 pour 100nM des brins boucle et rapporteur en utilisant les  $K_S$  déterminés en figure 19 ainsi que les prédictions de *mfold*. **(C)** Constantes de vitesses ( $k_{obs}$ ) pour l'activation des interrupteurs avec boucles de 1 (rouge) et 13 nucléotides (bleu) en fonction de l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ). Ces expériences ont été réalisées en présence de 10 $\mu$ M de la cible de 17 nucléotides.

### **3.4 L'activation et la désactivation d'un interrupteur se font via le même mécanisme**

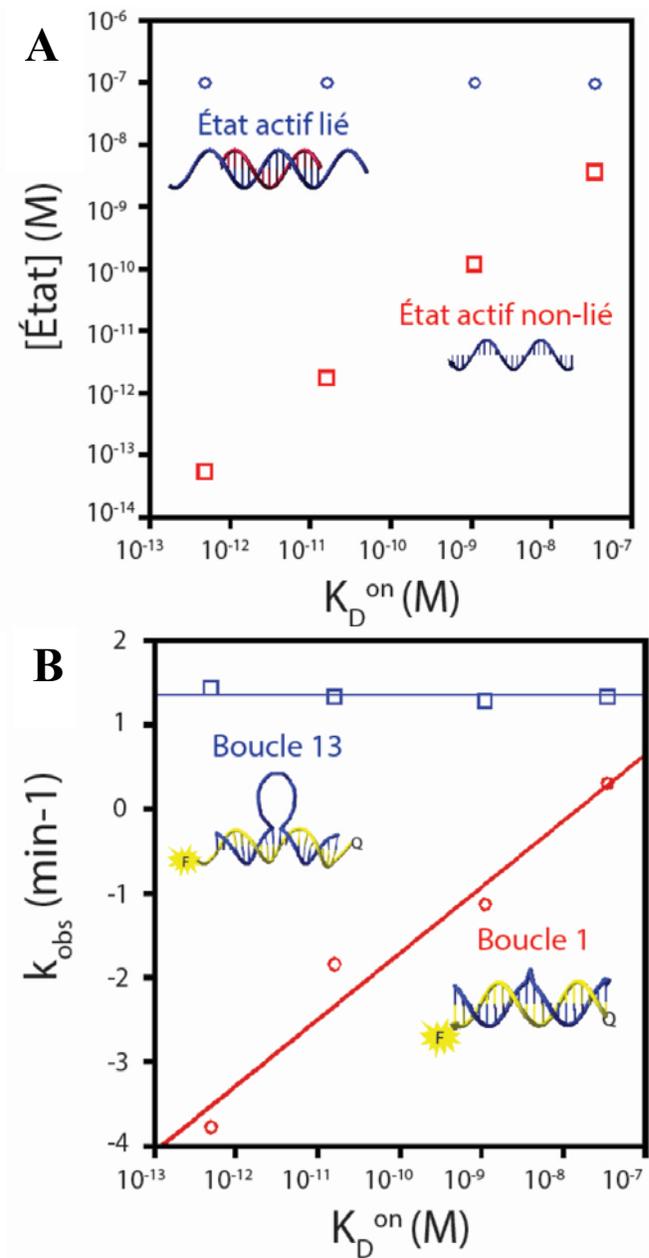
Ayant réussi à reproduire et caractériser les deux mécanismes d'activation par liaison des interrupteurs biomoléculaires, nous nous sommes alors intéressés à déterminer le mécanisme de désactivation de ces deux mêmes interrupteurs. Étant donné que l'activation d'un interrupteur fonctionnant par ajustement induit implique un intermédiaire où certaines interactions avec le ligand peuvent être établies, tout en maintenant les interactions propres à l'état inactif, ces deux types d'interactions ne sont pas mutuellement exclusives dans le cas de l'ajustement induit et peuvent donc coexister au sein d'un même intermédiaire. Il semble donc que lors de la désactivation d'un tel interrupteur, certaines interactions propres à l'état inactif pourraient être formées avant la dissociation du ligand, ce qui correspondrait encore au mécanisme par ajustement induit. Un intermédiaire inactif lié (Figure 18) pourrait donc être impliqué dans les deux directions. En ce qui a trait à l'activation par sélection conformationnelle, l'intermédiaire ne peut pas maintenir les interactions propres à l'état inactif de façon à permettre l'interaction avec le ligand. Dans ce cas, les interactions propres à l'état inactif et les interactions avec le ligand sont mutuellement exclusives. La désactivation d'un tel interrupteur pourrait donc nécessiter la dissociation spontanée du ligand préalablement à la formation des interactions propres à l'état inactif. Un intermédiaire actif non-lié (Figure 18) serait donc impliqué dans les deux directions. Le mécanisme d'activation et de désactivation serait donc le même pour un interrupteur donné puisqu'il s'agit du même intermédiaire dans les deux cas.

Pour valider cette hypothèse, nous avons procédé à la caractérisation du mécanisme de désactivation des interrupteurs avec boucles de 1 et 13 nucléotides. Afin de favoriser la désactivation des interrupteurs, l'énergie libre de l'état inactif non-lié (duplex rapporteur-boucle) doit être inférieure (plus stable) à l'énergie libre de l'état actif lié (duplex boucle-cible). Cette condition peut être satisfaite en utilisant une cible plus courte dont l'énergie d'hybridation avec le brin boucle est supérieure (moins stable) à l'énergie d'hybridation entre le brin boucle et le brin rapporteur. Dans ces conditions, l'ajout du brin rapporteur au duplex boucle-cible (actif lié, non-fluorescent) entraînera un déplacement de l'équilibre vers le duplex

boucle-rapporteur (inactif non-lié, fluorescent) plus stable, entraînant une augmentation de la fluorescence.

Afin de caractériser le mécanisme de désactivation de nos interrupteurs, nous avons mesuré leur vitesse de désactivation en présence de cibles dont la longueur varie entre 11 et 14 nucléotides (différents  $K_D^{on}$ ). Selon l'équation 19 et les valeurs de  $K_D^{on}$  prédites par *mfold*, en présence de ces différentes cibles, la concentration à l'équilibre de l'état actif non-lié varie sur plusieurs ordres de grandeur alors que la concentration de l'état actif lié ne varie pas significativement (Figure 22, A). La désactivation par ajustement induit devrait donc être indépendante de  $K_D^{on}$  puisque ce mécanisme implique la liaison du brin rapporteur directement à l'état actif lié (Figure 18), dont la concentration ne varie pas significativement. Au contraire, la désactivation par sélection conformationnelle devrait être ralentie lorsque  $K_D^{on}$  diminue puisque ce mécanisme implique la liaison du brin rapporteur avec l'intermédiaire actif non-lié (Figure 18), dont la concentration diminue proportionnellement à  $K_D^{on}$ . Cette relation entre  $K_D^{on}$  ( $k_{-1}/k_L$ ) et la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) pour la désactivation par sélection conformationnelle est aussi prédite par le modèle cinétique à trois états (Table 1) lorsque le changement conformationnel est lent (en conditions de désactivation : liaison du brin rapporteur plus lente que liaison du brin cible).

Comme attendu, seulement la vitesse de désactivation de la boucle de 1 nucléotide est influencée par l'affinité de l'état actif pour la cible ( $K_D^{on}$ ) (Figure 22 B). Ce résultat suggère donc que le brin rapporteur se lie au brin boucle dissocié (état actif non-lié) dans le cas de la boucle 1 (sélection conformationnelle) alors que dans le cas de la boucle 13, il se lie directement au duplex boucle-cible (état actif lié, ajustement induit). Ainsi, le même intermédiaire et le même mécanisme semblent être employés autant pour l'activation que pour la désactivation de nos interrupteurs. Nous observons encore une fois que la vitesse du mécanisme par ajustement induit (boucle 13) est supérieure à la vitesse de la sélection conformationnelle (boucle 1), surtout en présence d'une cible qui possède une haute affinité pour l'état actif ( $K_D^{on}$  bas). En effet, lorsque l'affinité de l'état actif pour le ligand augmente (diminution de  $K_D^{on}$ ), la désactivation par sélection conformationnelle est plus lente.



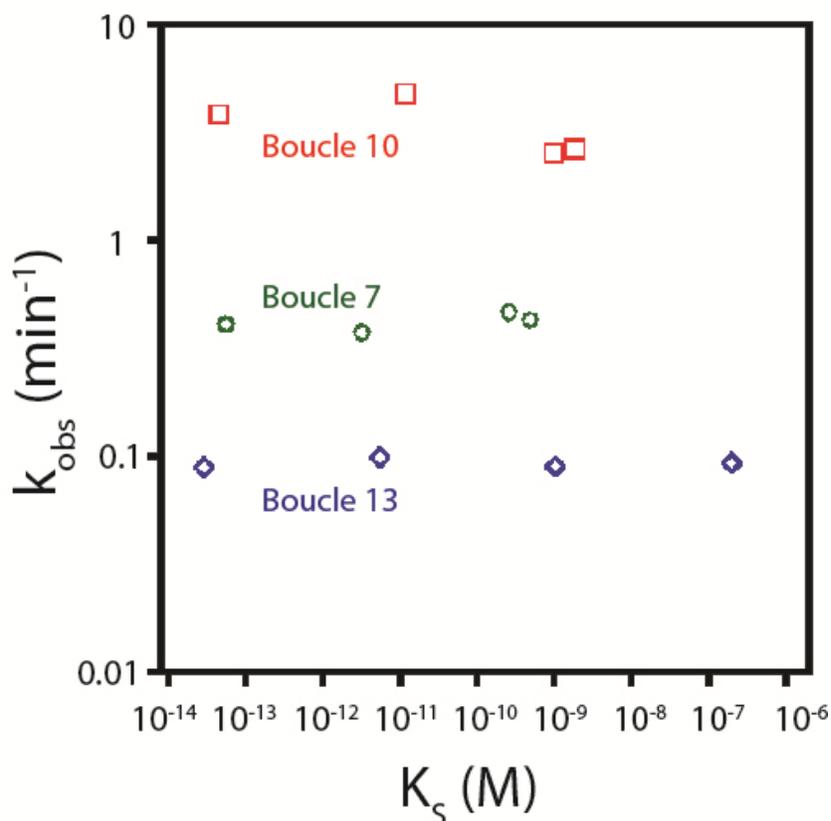
**Figure 22. Effet de  $K_D^{on}$  sur les concentrations à l'équilibre des états actifs lié et non-lié ainsi que sur la vitesse de désactivation ( $k_{obs}$ ) des interrupteurs avec une boucle de 1 et 13 nucléotides. (A) Concentrations théoriques de l'état actif lié (bleu) et de l'état actif non-lié (rouge) en fonction de l'affinité pour la cible ( $K_D^{on}$ ). Les concentrations théoriques sont calculées à l'aide de l'équation 19 pour 100nM du brin boucle et 1 $\mu$ M du brin cible en utilisant le  $K_D^{on}$  prédit par *mfold*. (B) Constantes de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) pour la désactivation des interrupteurs avec une boucle de 1 (rouge) et 13 nucléotides (bleu) en fonction de l'affinité prédite de l'état actif pour la cible ( $K_D^{on}$ ).**

### 3.5 La vitesse de l'ajustement induit est contrôlée par $K_D^{\text{off}}$

Nous savons maintenant qu'en présence d'un changement conformationnel rapide, la vitesse d'activation du mécanisme par sélection conformationnelle est contrôlée par l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) (Figures 20 et 21). Toutefois, le ou les paramètres qui contrôlent la vitesse d'activation de l'ajustement induit demeurent à caractériser expérimentalement. Afin de mieux comprendre la cinétique du mécanisme de liaison par ajustement induit, et de comprendre comment en moduler la vitesse d'activation, nous avons exploré l'effet de l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{\text{off}}$ ) sur la vitesse d'activation. En effet, comme l'étape de liaison avec la cible est cinétiquement limitante pour l'activation de notre modèle, la vitesse de liaison de la cible avec l'état inactif ( $k_L'$ ), un paramètre lié à l'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}} = k_{-L}/k_L'$ ), semble être le paramètre déterminant pour la vitesse d'activation par ajustement induit (équation 7). Ainsi, nous avons synthétisé des interrupteurs possédant des tailles de boucles différentes (boucles de 7 et 10 nucléotides), afin de modifier l'affinité de l'état inactif pour la cible ( $K_D^{\text{off}}$ ). En effet, une longueur de boucle inférieure devrait réduire le nombre de paires de bases pouvant être établies entre la cible de 17 nucléotides et l'interrupteur dans l'état inactif, augmentant ainsi la valeur de  $K_D^{\text{off}}$  et du rapport  $k_{-L}/k_L'$ . Il est donc attendu qu'une boucle plus courte diminue la vitesse d'activation par ajustement induit lorsque le changement conformationnel est rapide.

Afin d'observer l'effet de  $K_D^{\text{off}}$  sur la cinétique de l'ajustement induit, il est nécessaire de vérifier que les interrupteurs à boucle de 7 et 10 nucléotides fonctionnent aussi par ajustement induit. Des variants de  $K_S$  de chaque interrupteur ont donc été synthétisés pour déterminer le mécanisme de chacun (méthode identique à celle décrite à la section 3.3). La comparaison des vitesses d'activation de ces interrupteurs montre effectivement que tous fonctionnent par ajustement induit, puisque leurs vitesses d'activation ( $k_{\text{obs}}$ ) sont toutes indépendantes de l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) (Figure 23). On observe aussi que ces différentes longueurs de boucles montrent des vitesses d'activation différentes (Figure 23), ce qui indique que  $K_D^{\text{off}}$  contrôle effectivement la vitesse d'activation par ajustement induit, du moins, lorsque l'étape de liaison est cinétiquement limitante. Toutefois, il est surprenant de constater que la boucle de 13 nucléotides, possédant théoriquement la valeur de  $K_D^{\text{off}}$  la plus basse, est l'interrupteur activé le plus lentement. L'activation la plus rapide est observée dans

le cas de la boucle de 10 nucléotides alors que la boucle de 7 nucléotides est plus lente que cette dernière mais tout de même plus rapide que la boucle 13. Ces résultats suggèrent que l'effet de la taille de la boucle sur  $k_L'$  (et probablement  $K_D^{\text{off}}$  aussi) ne serait pas une fonction monotone du nombre de paires de bases avec la cible pouvant être établies dans l'état inactif.



**Figure 23. Effet de la longueur de la boucle sur la cinétique d'activation des interrupteurs.** Comparaison des constantes observées ( $k_{\text{obs}}$ ) pour l'activation des interrupteurs avec une boucle de 7 (vert), 10 (rouge) et 13 (bleu) nucléotides à différents  $K_S$ . Ces expériences sont réalisées en présence de 10  $\mu\text{M}$  de la cible de 17 nucléotides.

## Chapitre 4: Discussion

Le système dynamique d'ADN présenté ici a permis pour la première fois de recréer rationnellement les mécanismes de liaison par ajustement induit et sélection conformationnelle à l'aide de biomolécules artificielles. Tel que mentionné précédemment, la complexité structurelle et dynamique des biomolécules naturelles utilisées traditionnellement comme systèmes modèles a rendu très difficile la caractérisation de ces mécanismes et de leurs performances. Ainsi, au cours des 60 dernières années, relativement peu de données expérimentales sur la performance de ces mécanismes ont pu être obtenues. Dans la présente section, nous allons discuter des avancées qu'un tel système d'ADN pourrait engendrer et comparerons les données obtenues avec celles rapportées dans la littérature ainsi qu'avec les prédictions de modèles théoriques. Plus spécifiquement, les résultats obtenus avec notre modèle d'ADN seront d'abord utilisés pour faire le point sur le rôle de l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$ ) comme paramètre thermodynamique déterminant pour le choix du mécanisme d'activation. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus quant aux mécanismes de désactivation de nos interrupteurs seront discutés afin de vérifier si le même intermédiaire, et le même mécanisme, est utilisé autant pour l'activation que pour la désactivation d'un interrupteur donné. Finalement, à la lumière des résultats obtenus, l'effet des paramètres thermodynamiques  $K_S$ ,  $K_D^{\text{on}}$  et  $K_D^{\text{off}}$  sur la cinétique de ces deux mécanismes sera présenté et une comparaison cinétique de ces mécanisme pourra être établie.

### 4.1 L'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ) est un paramètre déterminant pour le mécanisme d'activation et de désactivation

Notre compréhension des facteurs qui déterminent le mécanisme de liaison des biomolécules a fait un bond important au cours des 7 dernières années. Entre les années 2009 et 2014, plusieurs travaux ont permis de révéler qu'une augmentation de la concentration de ligand favorise le mécanisme par ajustement induit au détriment du mécanisme par sélection conformationnelle<sup>(23, 44, 90)</sup>. C'est en 2015 que la cause de cette relation entre la concentration de ligand et le mécanisme a pu être démontrée expérimentalement. En effet, il fut observé que le mécanisme de liaison passe de la sélection conformationnelle à l'ajustement induit lorsque la concentration de ligand approche 10% de la valeur de l'affinité de l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$ ), c'est à

dire lorsque la liaison du ligand avec l'état inactif est possible (environ 9% de l'état inactif est lié). L'activation par ajustement induit requiert aussi que le ligand possède une meilleure affinité pour l'état actif que pour l'état inactif ( $K_D^{\text{off}} > K_D^{\text{on}}$ )<sup>(38)</sup>, sans quoi l'interrupteur demeurerait principalement dans l'état inactif lié. Cette observation a permis de révéler le rôle des affinités des différents états ( $K_D^{\text{on}}$  et  $K_D^{\text{off}}$ ) dans la sélection du mécanisme.

Les résultats obtenus avec nos interrupteurs d'ADN possédant des boucles de 1 ( $K_D^{\text{off}}$  élevé) et 13 nucléotides dans l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$  bas) montrent qu'en effet, pour une concentration de ligand fixe, une diminution de  $K_D^{\text{off}}$  seulement permet de changer le mécanisme de liaison de la sélection conformationnelle vers l'ajustement induit (Figure 21). De plus, dans notre modèle la liaison de la cible avec l'état actif est toujours favorisée puisque la cible peut faire 17 paires de bases avec l'état actif comparativement à un maximum de 13 paires de bases avec l'état inactif ( $K_D^{\text{off}} > K_D^{\text{on}}$ ). Nos résultats sont donc complémentaires à ceux rapportés précédemment où l'ajustement induit est favorisé aux concentrations de ligand supérieures à 10% de la valeur de  $K_D^{\text{off}}$ <sup>(38)</sup>. Nos résultats montrent aussi qu'il est possible d'employer ces concepts pour l'ingénierie rationnelle de biomolécules fonctionnant selon le mécanisme désiré.

Contrairement au processus d'activation, le rôle de ces mécanismes n'a jamais été étudié expérimentalement dans le contexte de la désactivation. Ce sujet a toutefois été abordé dans un article théorique affirmant qu'en raison du principe de l'équilibre détaillé, qui impose que le flux à l'équilibre dans une direction du cycle thermodynamique soit égal au flux dans la direction opposée, l'ordre des événements doit être inversé lors du processus de désactivation<sup>(15)</sup>. Il en découle que lorsque l'activation implique un changement conformationnel avant la liaison (sélection conformationnelle), la dissociation spontanée du ligand doit précéder le changement conformationnel lors de la désactivation. Il s'agit donc du même intermédiaire actif non-lié dans les deux directions. Il en va de même pour le mécanisme d'ajustement induit qui impliquerait alors un changement conformationnel vers la forme inactive avant la dissociation du ligand lors de la désactivation. Encore une fois il s'agirait du même intermédiaire inactif lié pour l'activation et la désactivation d'un tel interrupteur.

Ce lien entre les mécanismes employés pour l'activation et la désactivation d'un interrupteur a pu être observé et confirmé expérimentalement à l'aide de notre modèle d'ADN.

En effet, nous avons observé qu'un interrupteur possédant une affinité élevée pour le ligand dans la forme inactive ( $K_D^{\text{off}}$  bas, boucle de 13 nucléotides) est activé et désactivé au moyen d'un intermédiaire inactif lié, correspondant à l'ajustement induit. Similairement, un interrupteur ne pouvant pas interagir avec le ligand directement dans la forme inactive ( $K_D^{\text{off}}$  élevé, boucle de 1 nucléotide) est activé et désactivé au moyen d'un intermédiaire actif non-lié, correspondant à la sélection conformationnelle (Figure 22). Nos résultats suggèrent donc que  $K_D^{\text{off}}$  est un paramètre déterminant autant pour le mécanisme d'activation que pour le mécanisme de désactivation. Il semble donc que lorsque  $K_D^{\text{off}}$  est élevé, les interactions propres à l'état inactif ainsi que les interactions avec le ligand sont mutuellement exclusives, donnant lieu au mécanisme par sélection conformationnelle. Au contraire, lorsque  $K_D^{\text{off}}$  est bas, certaines interactions propres à l'état inactif et certaines interactions avec le ligand ne sont pas mutuellement exclusives, donnant lieu à un mécanisme d'ajustement induit.

## 4.2 Les différences cinétiques entre les mécanismes

L'étude de ces mécanismes dans le contexte des protéines ne permet pas encore de comparer directement les propriétés cinétiques de ces deux mécanismes. En effet, ceci nécessiterait par exemple deux couples protéine-ligand différents possédant les mêmes valeurs de  $K_S$  et de  $K_D^{\text{on}}$  mais un  $K_D^{\text{off}}$  différent, de manière à permettre d'isoler l'effet du mécanisme sur la cinétique. Il est aussi très difficile d'isoler l'effet des différents paramètres thermodynamiques ( $K_D^{\text{off}}$ ,  $K_D^{\text{on}}$  et  $K_S$ ) sur la cinétique d'un mécanisme puisque les mutations risquent d'affecter plus qu'un de ces paramètres <sup>(61, 62, 91)</sup>. Par conséquent, notre compréhension des différences fondamentales entre ces mécanismes et de leurs rôles dans l'évolution et l'ingénierie de biomolécules est encore limitée <sup>(3)</sup>. C'est pourquoi nous avons entrepris d'explorer les différences cinétiques entre ces mécanismes à l'aide d'un modèle d'ADN permettant un degré suffisant de programmabilité et de prédictibilité pour circonvenir aux limitations rencontrées chez les protéines. Ainsi, il fut possible de comparer la cinétique de ces mécanismes en fonction d'une seule variable, c'est à dire la taille de la boucle ( $K_D^{\text{off}}$ ), l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ), l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{\text{on}}$ ) ou la concentration de ligand, et ainsi de mieux comprendre les différences cinétiques entre ces deux mécanismes.

## 4.2.1 Cinétique d'activation des deux mécanismes

D'abord, nous avons observé que lorsque le changement conformationnel vers la forme active est rapide (Figure 20 C), l'équilibre conformationnel ( $K_S$ ) affecte seulement la vitesse d'activation par sélection conformationnelle (boucle 1) alors que la vitesse d'activation par ajustement induit (boucle 13) en est indépendante (Figure 21 C). Cette relation entre la vitesse d'activation et  $K_S$  n'avait jamais été observée expérimentalement mais était tout de même prédite par le modèle cinétique à trois états de chaque mécanisme (section 1.2.1.3, équations 6 et 8) <sup>(39)</sup>. De plus, encore selon ce modèle théorique, lorsque le changement conformationnel est rapide, la vitesse d'activation par sélection conformationnelle serait aussi proportionnelle à l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{on} = k_{-L}/k_L$ ) (éq. 9) alors que ce n'est pas le cas du mécanisme par ajustement induit dont la vitesse d'activation dépendrait seulement de l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{off} = k_{-L'}/k_{L'}$ ) (éq. 7). Il serait donc intéressant de vérifier expérimentalement si  $K_D^{on}$  affecte seulement la vitesse de la sélection conformationnelle simplement en mesurant la vitesse d'activation des boucles de 1 et 13 nucléotides en présence de cibles de différentes tailles. Notre modèle d'ADN a aussi permis d'observer que la longueur de la boucle (liée à  $K_D^{off} = k_{-L'}/k_{L'}$ ) contrôle la vitesse de l'ajustement induit (Figure 23), comme prédit par l'équation 7 ( $k_{obs} = k_{L'}$ ) <sup>(39)</sup>. Toutefois, il semble que  $k_{L'}$  ne soit pas une fonction monotone de la longueur de la boucle. En effet, bien que l'augmentation de la longueur de la boucle devrait augmenter son affinité pour la cible, en permettant d'établir plus de paires de bases dans l'état inactif, il est aussi envisageable qu'une augmentation correspondante de la flexibilité de la boucle lui permette d'adopter certains repliements ou d'établir certaines paires de bases internes qui entravent la liaison de la cible. C'est en effet ce que suggère la présence de deux phases cinétiques dans le processus d'activation de l'interrupteur à boucle de 13 nucléotides (Annexe 2). Puisque la phase cinétique lente représente la grande majorité du processus d'activation (plus de 85% de l'amplitude observée), cela suggère que la boucle de 13 nucléotides se trouve principalement dans une conformation repliée et plus difficilement accessible pour la cible. Un tel repliement de la boucle pourrait expliquer la vitesse réduite de la boucle 13 par rapport aux boucles de 7 et 10 nucléotides. Il serait possible de déterminer si un tel repliement de la boucle est présent et s'il affecte  $k_{L'}$  à l'aide d'une droite de  $k_{obs}$  en fonction de la concentration de cible pour les interrupteurs avec boucles de 7, 10 et 13 nucléotides. En effet lorsque l'étape de liaison est cinétiquement

limitante, la pente de la droite de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration de cible est égale à la vitesse de liaison de la cible ( $k_L'$ ) alors que l'ordonnée à l'origine est égale à la vitesse de dissociation de la cible ( $k_{-L}'$ ) (équations 2 et 3) <sup>(35, 88, 92)</sup>. Ainsi, il serait possible de déterminer expérimentalement les valeurs de  $k_L'$  pour les interrupteurs avec boucles de 7, 10 et 13 nucléotides afin de déterminer si la boucle de 13 nucléotides possède un  $k_L'$  inférieur, ce qui supporterait la présence de conformations repliées de la boucle de 13 nucléotides et pourrait expliquer la vitesse d'activation réduite de cet interrupteur.

#### 4.2.2 Cinétique de désactivation des deux mécanismes

En ce qui a trait aux mécanismes de désactivation, nous avons pu observer que la vitesse de désactivation par sélection conformationnelle (boucle 1) dépend de l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{\text{on}}$ ), alors que la vitesse de désactivation par ajustement induit (boucle 13) en est indépendante (Figure 22, B). Cette relation entre la vitesse de désactivation de chaque mécanisme et  $K_D^{\text{on}}$  ( $k_{-L}/k_L$ ) est aussi prédite par le modèle cinétique à trois états lorsque le changement conformationnel lent (Table I) <sup>(15)</sup>. Il serait possible de vérifier si le régime cinétique observé est limité par la vitesse du changement conformationnel (liaison du brin rapporteur) en mesurant la vitesse de désactivation à différentes concentrations du brin rapporteur. En effet, une relation linéaire entre  $k_{\text{obs}}$  et la concentration du brin rapporteur indiquerait que la dissociation de la cible est plus rapide que la liaison du brin rapporteur (changement conformationnel lent) <sup>(87, 88, 93)</sup>. Alternativement, il serait aussi possible de mesurer les constantes de vitesse de liaison et de dissociation des duplex boucle-cible et boucle-rapporteur à l'aide de courbes de chevron et ainsi d'identifier l'étape cinétiquement limitante <sup>(94)</sup>.

#### 4.2.3 Comparaison cinétique des deux mécanismes

Hormis les différences entre les paramètres qui contrôlent la vitesse de chaque mécanisme, une différence cinétique importante est observée lorsqu'on compare directement ces mécanismes en présence de paramètres thermodynamiques égaux. En effet, l'activation et la désactivation par ajustement induit semble être généralement plus rapide que par le mécanisme de sélection conformationnelle (Figures 20, 21 et 22). Nous avons d'ailleurs observé que cette différence de vitesse pouvait atteindre jusqu'à quatre ordres de grandeur

lorsqu'on compare la constante de vitesse observée pour l'activation de l'interrupteur avec une boucle de 10 nucléotides ( $k_{\text{obs}} = 3.8 \text{ min}^{-1}$ ) avec celle de la boucle de 1 nucléotide la plus stable ( $k_{\text{obs}} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) en présence de  $10 \mu\text{M}$  de la cible de 17 nucléotides. Dans le régime cinétique limité par la vitesse de liaison du ligand, la vitesse d'activation supérieure de l'ajustement induit résulte du fait que le ligand puisse se lier directement à l'état inactif de plus haute concentration. Au contraire, la liaison du ligand par sélection conformationnelle ne peut se faire qu'à partir de l'état spontanément actif de moindre concentration et est donc plus lente. Bien sûr, cette différence de vitesse entre les deux mécanismes s'amointri aux  $K_s$  plus élevés (conformation spontanément active plus abondante) mais cette augmentation de  $K_s$  vient nécessairement au prix d'un signal de fond ou d'une activité basale plus élevée <sup>(69)</sup>. En effet, il est souvent préférable pour un interrupteur moléculaire de posséder un équilibre conformationnel où la concentration de l'état spontanément actif est minime (faible  $K_s$ ), de façon à posséder une faible activité basale et permettre à une large population de la biomolécule de répondre à la présence de ligand en effectuant un changement conformationnel vers l'état actif <sup>(69, 95)</sup>. Le mécanisme d'activation par ajustement induit permettrait donc une activation plus rapide dans la plupart des cas. En ce qui a trait aux propriétés cinétiques de ces mécanismes en conditions de désactivation, la vitesse de désactivation supérieure de l'ajustement induit par rapport à celle de la sélection conformationnelle (Figure 22) pourrait résulter du fait que le changement conformationnel cinétiquement limitant puisse avoir lieu directement à partir de l'état actif lié de haute concentration plutôt qu'à partir de l'état actif non-lié de plus faible concentration.

Même si notre modèle expérimental d'activation ne représente que la situation où le changement conformationnel est rapide par rapport à l'étape de liaison, il semble que l'ajustement induit permette une activation plus rapide que la sélection conformationnelle même quand le changement conformationnel est cinétiquement limitant. Ceci peut être expliqué en comparant la relation  $k_{\text{obs}}^{\text{AI}} = k_s'/K_D^{\text{off}}$  (équivalent à  $k_s' \times k_L/k_{-L}$ ), qui décrit l'ajustement induit, avec la relation  $k_{\text{obs}}^{\text{SC}} = k_s$  qui décrit la sélection conformationnelle (Table I). En comparant ces expressions, il est possible de constater que l'ajustement induit est susceptible d'être plus rapide que la sélection conformationnelle si la vitesse du changement conformationnel de la forme inactive-liée vers la forme active-liée ( $k_s'$ , ajustement induit) est plus rapide que le changement conformationnel de la forme inactive non-liée vers la forme

active non-liée ( $k_s$ , sélection conformationnelle). En considérant la relation  $K_S' = K_S K_D^{\text{off}} / K_D^{\text{on}}$  (éq. 17) décrivant le cycle thermodynamique reliant les deux mécanismes, il est possible de constater que  $k_s'$  (ajustement induit) devrait effectivement être plus rapide que  $k_s$  (sélection conformationnelle). En effet, comme il est nécessaire que  $K_D^{\text{off}}$  soit supérieur à  $K_D^{\text{on}}$  pour que le ligand favorise thermodynamiquement l'état actif, il s'ensuit que  $K_S'$  est donc nécessairement supérieur à  $K_S$  selon la relation  $K_S' = K_S K_D^{\text{off}} / K_D^{\text{on}}$  (éq. 17). Étant donné que  $K_S = k_s / k_{-s}$ ,  $K_S' = k_s' / k_{-s}'$  et que  $K_S' > K_S$ , il est donc nécessaire que le ligand affecte l'équilibre conformationnel de la forme liée soit en augmentant la vitesse du changement conformationnel vers la forme active ( $k_s' > k_s$ ), ou en diminuant la vitesse du changement conformationnel inverse ( $k_{-s}' < k_{-s}$ ) ou en affectant les deux simultanément.

L'effet du ligand sur les vitesses du changement conformationnel fut étudié dans le cas de la sous-unité protéique P<sup>Pro</sup> de la RNase P, dont le mécanisme de couplage entre le repliement et la liaison de différents ligands, à des concentrations près du  $K_D$  apparent, correspond à l'ajustement induit<sup>(23, 38)</sup>. Dans le cas de cette protéine, il fut observé que l'effet de différents ligands sur l'équilibre conformationnel se manifeste principalement par une augmentation de  $k_s'$  par rapport à  $k_s$ <sup>(38)</sup>. Ainsi, le ligand est capable d'accélérer le changement conformationnel vers la forme active en diminuant la barrière d'énergie entre l'état déplié et l'état replié par une stabilisation de l'état de transition<sup>(38)</sup>. Le repliement de cette protéine par ajustement induit est donc plus rapide que par sélection conformationnelle.

#### 4.2.4 Cinétique des mécanismes : sommaire

En résumé, les mécanismes de liaison par ajustement induit et par sélection conformationnelle contrôlent la vitesse à laquelle une population de biomolécule dans un état sera déplacée vers un deuxième état plus stable en présence de ligand ou en absence de ligand. Les résultats obtenus à l'aide de nos interrupteurs d'ADN correspondent bien à ce qui est prédit par les modèles théoriques<sup>(15, 39)</sup> à propos de la relation entre les différentes constantes thermodynamiques et la vitesse de ces mécanismes. Plus spécifiquement, nous avons observé que lorsque le changement conformationnel est rapide, la vitesse d'activation par ajustement induit dépend de l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $k_L'$ , lié à  $K_D^{\text{off}}$  selon l'équation 12) alors que la vitesse d'activation par sélection conformationnelle dépend de l'équilibre conformationnel de l'interrupteur ( $K_S$ ). En conditions de désactivation, nous avons observé

que la vitesse de la sélection conformationnelle dépend de l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{on}$ ) alors que la vitesse de l'ajustement induit en est indépendante, ce qui correspondrait au régime cinétique limité par la vitesse du changement conformationnel. Finalement, notre modèle d'ADN a permis pour la première fois de comparer directement les vitesses de ces deux mécanismes, lorsque les paramètres thermodynamiques ne constituent pas une variable. Ainsi, il fut possible de déterminer que l'ajustement induit donne généralement lieu à des vitesses d'activation et de désactivation plus rapides comparativement au mécanisme par sélection conformationnelle. Ces différences cinétiques suggèrent que ces mécanismes pourraient être employés, autant par la nature que par ingénierie, pour optimiser les vitesses d'activation et de désactivation des biomolécules.

## **4.3 Perspectives d'avenir pour l'étude de ces mécanismes à l'aide d'interrupteurs d'ADN**

### **4.3.1 Étude des différents régimes cinétiques**

Tel que mentionné précédemment, les résultats obtenus jusqu'à présent pour l'activation nos interrupteurs d'ADN ne représentent que le régime cinétique où la liaison du ligand est cinétiquement limitante. Au contraire, les résultats obtenus pour la désactivation de nos interrupteurs semblent relever du régime cinétique où le changement conformationnel est cinétiquement limitant. Toutefois, la cinétique de ces processus dépendrait de paramètres thermodynamiques différents selon la nature du régime cinétique (Table 1) <sup>(15, 39)</sup>. Il serait possible d'explorer ces différents régimes cinétiques pour chaque mécanisme en modifiant légèrement le modèle d'ADN présenté.

Rappelons-nous d'abord que dans notre modèle d'ADN, le changement de conformation est représenté par l'étape d'association/dissociation des brins boucle et rapporteur alors que l'étape de liaison avec le ligand correspond aux processus d'association/dissociation de la cible (Figure 18). Il serait possible de ralentir la dissociation du duplexe boucle-rapporteur en augmentant le nombre de paires de bases ou la proportion de paires de bases G-C entre le brin boucle et le brin rapporteur <sup>(84)</sup>, alors que pour ralentir la vitesse d'association de ces brins, il serait possible d'utiliser un brin rapporteur pouvant adopter une structure secondaire stable (par exemple une structure en tige-boucle) lorsqu'il n'est pas lié au brin boucle. En effet, la présence de structures secondaires sur un brin d'ADN

diminue la vitesse d'hybridation de ce brin lorsque la structure secondaire n'est pas conservée dans le duplexe final <sup>(80)</sup>. Dans ces conditions, il serait possible d'étudier la cinétique d'activation de ces mécanismes en présence d'un changement conformationnel cinétiquement limitant. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'ajustement induit donne toujours lieu à une activation plus rapide que le mécanisme par sélection conformationnelle même lorsque le changement conformationnel est cinétiquement limitant. Similairement, il serait possible d'étudier la cinétique de désactivation de chaque mécanisme en présence d'une étape de liaison cinétiquement limitante en utilisant une cible plus longue (dissociation lente) pouvant adopter une structure secondaire stable (hybridation lente). Ainsi, il serait possible de vérifier si le mécanisme par ajustement induit donne aussi lieu à une désactivation plus rapide même lorsque l'étape de liaison avec la cible est cinétiquement limitante.

### **4.3.2 Étudier la spécificité ou la sélectivité de chaque mécanisme**

Le rôle de l'ajustement induit dans la spécificité enzymatique fait l'objet de discussions depuis déjà plus de 40 ans <sup>(96-98)</sup>. La spécificité enzymatique peut être décrite comme le rapport entre la vitesse de réaction pour un substrat correct, ou physiologiquement pertinent, par rapport à un mauvais substrat <sup>(97)</sup>. Il a été proposé que le gain en spécificité procuré par l'ajustement induit comparativement à une enzyme rigide, sans changement de conformation, soit le résultat de l'effet du ligand sur l'équilibre conformationnel ( $K_S'$ ) <sup>(47, 97)</sup> (voir section 1.3.1 pour un exemple). En résumé, le gain en spécificité permis par l'ajustement induit serait une conséquence du fait qu'un mauvais substrat puisse stabiliser davantage l'état inactif que l'état actif, ce mauvais substrat ne pouvant pas établir les interactions qui stabilisent spécifiquement l'état actif, et ainsi accélérer le changement conformationnel de retour vers la forme inactive <sup>(47, 99)</sup>. Il a aussi été proposé que ce gain en spécificité est seulement possible lorsque le changement conformationnel <sup>(97)</sup> ou l'étape de catalyse chimique <sup>(100)</sup> est cinétiquement limitante. Toutefois, encore très peu d'évidences expérimentales sont disponibles à ce sujet et la majorité de nos connaissances à ce sujet proviennent des modèles mathématiques.

Contrairement au rôle de ces mécanismes dans la spécificité enzymatique, leur rôle dans la sélectivité de liaison demeure inconnu. La sélectivité de liaison et la spécificité enzymatique sont deux paramètres différents. En effet, les enzymes fonctionnent hors-équilibre et leur spécificité correspond au rapport des vitesses de réactions pour deux substrats

différents. Toutefois, en ce qui concerne les récepteurs ou autres biomolécules sans activité catalytique, il peut être plus pertinent de considérer la sélectivité de liaison à l'équilibre qui se quantifie par le rapport des concentrations liées d'un substrat correct par rapport à un substrat incorrect et donc au rapport des constantes d'affinité observée de ces différents ligands <sup>(101)</sup>.

Dans les deux cas, notre modèle d'ADN pourrait permettre d'explorer et de comparer quantitativement la spécificité ou la sélectivité de chaque mécanisme. En effet, ceci pourrait être fait en comparant les vitesses d'activation (spécificité) ou les concentrations à l'équilibre de la forme active liée (sélectivité) en présence de cibles mutantes ou parfaitement complémentaires pour nos interrupteurs à boucle de 1 (sélection conformationnelle) et 13 nucléotides (ajustement induit). Il serait ainsi possible de mesurer l'effet des différentes constantes thermodynamiques ( $K_s$ ,  $K_s'$ ,  $K_D^{on}$  et  $K_D^{off}$ ) sur la spécificité ou la sélectivité de chaque mécanisme ainsi que l'effet de la position du mésappariement avec la cible. En effet, selon la position du nucléotide muté sur la cible, la mutation pourrait affecter soit  $K_D^{on}$  seulement, si la mutation se trouve hors de la région complémentaire avec la boucle, ou  $K_D^{on}$  et  $K_D^{off}$  simultanément, si la mutation se trouve dans la région complémentaire avec la boucle, et ainsi affecter différemment la spécificité ou la sélectivité. Par exemple, selon nos résultats, il est possible de spéculer que lorsque l'étape de liaison est cinétiquement limitante, l'ajustement induit pourrait offrir une spécificité accrue pour discriminer les cibles portant une mutation dans le région complémentaire avec la boucle (affectant  $K_D^{off}$ ).

La seule limitation apparente de notre modèle est qu'il ne serait pas possible d'explorer la spécificité enzymatique lorsque l'étape de catalyse est cinétiquement limitante étant donné que nos interrupteurs ne possèdent aucune activité catalytique. L'absence d'activité catalytique n'empêche cependant pas de caractériser la spécificité enzymatique lorsque l'étape cinétiquement limitante est le changement conformationnel ou la liaison de la cible, puisque dans ces situations, la vitesse de l'étape catalytique, bien qu'absente, serait égale à la vitesse de l'étape limitante, qui elle, peut être mesurée.

#### **4.4 Applications de ces mécanismes en nanotechnologies**

Bien que les mécanismes de couplage entre la liaison et le changement conformationnel mécanismes sont déjà utilisés par de nombreuses biomolécules issues

d'ingénierie, à l'insu des créateurs et des utilisateurs, leurs propriétés cinétiques sont rarement optimisées. Nous discuterons ici des avancées potentielles qu'une connaissance approfondie de ces mécanismes pourrait engendrer dans le développement de nanotechnologies.

#### **4.4.1 Utilisation de ces mécanismes dans le contexte des biosenseurs**

Les biosenseurs sont des dispositifs moléculaires capables de convertir la reconnaissance spécifique d'un analyte en un signal mesurable, permettant ainsi la détection de l'analyte. Par exemple, le modèle d'ADN faisant l'objet de ce mémoire est un biosenseur, toutefois le ligand d'ADN utilisé n'a aucune importance physiologique ou analytique. Un exemple notable de biosenseur est le glucomètre utilisé pour mesurer le taux de glucose sanguin chez les personnes diabétiques <sup>(102)</sup>. Les biosenseurs peuvent aussi être utilisés pour beaucoup d'autres applications diagnostiques et analytiques <sup>(103, 104)</sup>. Généralement, ils sont composés de deux éléments; un élément biochimique responsable de la reconnaissance spécifique de l'analyte, souvent une enzyme, un anticorps ou un oligonucléotide <sup>(105, 106)</sup>, ainsi qu'un élément senseur, souvent un fluorophore, une surface ou un substrat possédant des propriétés optiques ou électrochimiques <sup>(95, 107)</sup>, responsable de traduire cette reconnaissance moléculaire en un signal mesurable. Dans le cadre de cette discussion, nous considérerons seulement les biosenseurs où la reconnaissance moléculaire par l'élément biochimique implique un changement conformationnel, puisque les mécanismes à l'étude dans ce mémoire ne sont impliqués que dans cette situation.

Généralement, les biosenseurs utilisés pour des applications diagnostiques ou analytiques ont avantage à fonctionner le plus rapidement possible, toutefois, certains nécessitent des heures ou encore des jours avant de produire un résultat et il y a une demande pour des dispositifs qui fonctionnent dans l'espace de quelques minutes <sup>(108)</sup>. Selon nos résultats, le mécanisme d'ajustement induit serait le plus approprié pour le développement de biosenseurs rapides. Pour que de tels biosenseurs fonctionnent par ajustement induit, nos résultats indiquent que le site de liaison doit être partiellement accessible dans l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$  bas). Ce principe est facilement applicable lorsque l'élément de reconnaissance consiste en un oligonucléotide ou autre polymère conçu rationnellement.

En effet, beaucoup de biosenseurs rapides à base d'ADN rapportés dans la littérature, pouvant être activés en l'espace de quelques minutes, possèdent effectivement un site de

liaison dans l'état inactif. C'est le cas des balises moléculaires d'ADN (*molecular beacons*) qui reconnaissent un brin d'ADN complémentaire à l'aide d'une boucle dans l'état inactif<sup>(71, 109, 110)</sup> ou des biosenseurs d'ADN qui fonctionnent par déplacement de brin (*toehold mediated strand displacement*) où une extrémité simple-brin peut initier l'hybridation de la cible et le déplacement subséquent d'un brin rapporteur<sup>(111)</sup>. Nos résultats suggèrent aussi que la cinétique de tels biosenseurs fonctionnant par ajustement pourrait être accélérée en augmentant l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$ ), ce qui a déjà été montré dans le cas des biosenseurs d'ADN qui fonctionnent par déplacement de brin médié par un marche-pied<sup>(112)</sup>. Toutefois, cela ne semble pas être le cas des balises moléculaires dont la cinétique dépend de  $K_S$  (stabilité de la tige) et  $K_D^{\text{on}}$  (séquence complémentaire avec la cible). Il serait donc intéressant de déterminer le mécanisme de ces interrupteurs afin de déterminer s'il n'y aurait pas d'autres moyens d'en accélérer la cinétique encore davantage.

Au contraire, certains biosenseurs faits à partir d'aptamères montrent des cinétiques d'activation lentes qui peuvent prendre jusqu'à quelques heures pour générer un signal significatif<sup>(113, 114)</sup>. Puisque le changement conformationnel de ces aptamères est souvent obtenu par dépliage en présence d'un brin d'ADN complémentaire qu'il est possible de déplacer en présence de ligand, il est possible que cet état inactif déplié ne puisse pas interagir avec le ligand. De tels aptamères fonctionneraient alors par sélection conformationnelle, ce qui pourrait expliquer leur cinétique lente. Afin que ces aptamères puissent utiliser un mécanisme par ajustement induit et être activés plus rapidement, le repliement de leur site de liaison devrait être au moins partiellement conservé. Puisque la liaison entre un aptamère et son ligand dépend largement des régions apparaissant comme une boucle dans leur structure secondaire prédite<sup>(115, 116)</sup>, il semble préférable d'utiliser de plus petits brins d'ADN complémentaires qui ne s'hybrident qu'avec une extrémité de cette boucle. Ainsi, le repliement du site de liaison pourrait être partiellement conservé et la cinétique d'activation serait accélérée par l'utilisation du mécanisme d'ajustement induit. Alternativement, si cette stratégie ne permet pas l'utilisation du mécanisme par ajustement induit, il pourrait être possible d'accélérer la cinétique de ces aptamères fonctionnant par sélection conformationnelle en réduisant la longueur du duplexe formé avec le brin complémentaire (augmentation de  $K_S$ ).

#### 4.4.2 Contrôle cinétique de la livraison de composés thérapeutiques

La livraison de composés thérapeutiques (*drug delivery*) constitue un domaine de recherche et de technologies visant à créer des systèmes capables de transporter de façon sécuritaire des médicaments dans le corps afin d'atteindre l'effet thérapeutique ou de l'améliorer. Certains systèmes sont utilisés afin de cibler la relâche des composés thérapeutiques localement aux tissus concernés, diminuant ainsi les effets secondaires et, de ce fait, permettant d'augmenter la dose et l'indice thérapeutique <sup>(117)</sup>. D'autres systèmes ont pour but de contrôler la relâche des composés thérapeutiques dans le temps, de façon à en maintenir la concentration à l'intérieur de la fenêtre thérapeutique sur une période de temps prolongée et ainsi d'améliorer l'efficacité du traitement <sup>(118)</sup>. Puisque plus de 95% des composés thérapeutiques récemment découverts possèdent de mauvaises propriétés pharmacocinétiques <sup>(119)</sup>, le contrôle cinétique de la livraison de composés thérapeutiques représente un domaine prometteur pour l'amélioration de l'efficacité thérapeutiques des nouvelles molécules.

Comme les mécanismes d'ajustement induit et sélection conformationnelle peuvent contrôler la cinétique d'activation des biomolécules en réponse à la liaison d'un ligand, ils représentent une nouvelle avenue à explorer pour le contrôle cinétique de la livraison ciblée de composés thérapeutiques. En effet, la concentration d'un médicament peut être maintenue constante lorsque la vitesse de livraison est environ égale à la vitesse d'élimination par l'organisme <sup>(118)</sup>. Pour ce faire, il est généralement nécessaire de ralentir la vitesse à laquelle le composé actif est exposé à l'eau de l'environnement aqueux où se trouve le système de livraison <sup>(118)</sup>. Comme il est souvent désirable de relâcher lentement le composé thérapeutique, les dispositifs employés pour la livraison de composés thérapeutiques auraient probablement avantage à fonctionner par sélection conformationnelle.

Par exemple, une compréhension approfondie de la cinétique de ce mécanisme permettrait d'optimiser la cinétique de livraison de systèmes de cages d'ADN. Un tel système, où l'ouverture d'une cage d'ADN contenant un composé thérapeutique est contrôlée par la liaison d'un antigène, a été décrit par le groupe Church <sup>(77)</sup> et permet de relâcher le cargo seulement en présence de cellules spécifiques. Toutefois, la cinétique de ce dispositif ne fut pas étudiée. L'ouverture de la cage étant contrôlée par un aptamère dont la liaison avec le ligand (biomarqueur) compétitionne avec la liaison d'un brin complémentaire sur la face

opposée de la cage permettant de la tenir fermée, il est possible qu'un tel système fonctionne par sélection conformationnelle. En effet, il est très probable que le repliement intramoléculaire de l'aptamère soit perdu lorsque le brin complémentaire est lié, l'aptamère n'aurait donc pas suffisamment d'affinité pour l'antigène dans l'état inactif ( $K_D^{\text{off}}$  trop élevé) et le mécanisme par sélection conformationnelle serait employé pour la liaison avec l'antigène. La vitesse de liaison avec l'antigène, et l'ouverture de la cage, pourrait donc être contrôlée par l'équilibre conformationnel ( $K_s$ ) du double-brin avec l'aptamère, tel qu'observé avec notre modèle. Ainsi, en modifiant la longueur du brin complémentaire à l'aptamère, il serait possible d'ajuster la vitesse d'ouverture à la vitesse d'élimination du cargo pour une concentration d'antigène donnée.

## **4.5 Rôle de ces mécanismes dans l'évolution naturelle des biomolécules**

Puisque les mécanismes d'ajustement induit et de sélection conformationnelle possèdent des propriétés cinétiques différentes, il est fort probable que ces mécanismes aient chacun joué un rôle différent dans l'évolution naturelle des biomolécules <sup>(3)</sup>. En effet, l'activation et la désactivation rapide de l'ajustement induit en fait un mécanisme qui aurait pu être sélectionné pour des processus cellulaires où il est nécessaire de détecter et s'adapter très rapidement à des changements dans l'environnement. Au contraire, le mécanisme par sélection conformationnelle, supportant une activation et désactivation plus lente, aurait pu être sélectionné pour les biomolécules qui doivent maintenir leur activité plus longtemps. Il est toutefois important de mentionner que la sélection conformationnelle peut aussi donner lieu à une cinétique rapide, toutefois cela impliquerait un équilibre conformationnel où la concentration de l'état spontanément actif est significativement élevée, ce qui résulterait en une activité basale importante. Il est aussi possible pour l'ajustement induit de donner lieu à une cinétique lente, si la vitesse de liaison avec l'état inactif est très lente ou si la différence d'affinité pour le ligand entre l'état actif et inactif est très faible. Toutefois, ces exceptions ne seront pas considérées dans cette discussion.

Certains processus biochimiques ont avantage à être activés et désactivés rapidement et seraient ainsi sujets à une pression sélective favorable envers l'utilisation du mécanisme par

ajustement induit. Par exemple, cela pourrait être le cas du récepteur synaptique de l'acétylcholine, responsable de la transmission du signal des neurones moteurs aux muscles squelettiques<sup>(120)</sup>. En effet, il est très avantageux évolutivement pour un animal de réagir et de se déplacer rapidement. Ainsi, ce récepteur peut être activé rapidement en présence d'acétylcholine, avec une vitesse de  $30 \text{ ms}^{-1}$ , et désactivé presque aussi rapidement avec une vitesse de  $8 \text{ ms}^{-1}$ <sup>(121)</sup>. De plus, il est très probable que ce récepteur soit activé par ajustement induit puisqu'il possède un site de liaison pour l'acétylcholine accessible dans l'état inactif<sup>(122, 123)</sup>.

D'autre part, le besoin d'une cinétique lente pourrait aussi résulter en une pression sélective favorable envers la sélection conformationnelle. Par exemple, certains assemblages protéiques d'ordre supérieur nécessitent beaucoup de temps pour se former étant donné le nombre élevé de protéines et d'événements de liaison impliqués<sup>(124)</sup>. Ainsi, il est nécessaire que le complexe initiateur ait une durée de vie élevée pour que les événements de liaison subséquents aient lieu. Ceci serait rendu possible grâce à la désactivation ou dissociation lente par sélection conformationnelle. De plus, l'association lente de tels complexes, résultant possiblement aussi du mécanisme par sélection conformationnelle, permettrait de minimiser le bruit résultant de fluctuations transitoires des concentrations ou des conformations des différents ligands et permettrait aux cellules de répondre seulement lorsque la stimulation est forte et persistante<sup>(124)</sup>. Un exemple d'un tel processus est celui de l'activation des lymphocytes T par le récepteur des cellules T (*TCR*). Ce récepteur doit pouvoir distinguer une différence de seulement un acide aminé lorsqu'il entre en contact avec un antigène externe<sup>(125)</sup>. Pour exploiter cette infime différence d'affinité, correspondant à une différence de la durée d'activation du TCR, la formation complète du complexe de signalisation au TCR actif nécessite un long temps d'engagement qui est seulement possible en présence de ligands de plus haute affinité<sup>(125)</sup>. L'utilisation de ligands alternatifs, possédant une affinité légèrement inférieure, n'activent pas le TCR assez longtemps pour mener à la formation complète du complexe de signalisation<sup>(126)</sup>. Le fait que la vitesse de désactivation corrèle avec l'affinité pour le ligand suggère en effet qu'il pourrait s'agir du mécanisme par sélection conformationnelle.

Un autre exemple de l'importance d'une cinétique lente est celui de la régulation des protéases. Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de certains liens

peptidiques des protéines et des peptides <sup>(127)</sup>. Ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la digestion, l'endocytose, l'apoptose, la réponse immunitaire ainsi que la réparation et le développement des tissus <sup>(127)</sup>. Toutefois, l'activité de ces enzymes doit être très finement régulée pour prévenir les effets dommageables de la dégradation non-spécifique des protéines <sup>(128)</sup>. Une des stratégies employées par les cellules pour réguler l'activité des protéases implique la liaison durable avec des inhibiteurs <sup>(128)</sup>. En effet, la vitesse de dissociation de ces inhibiteurs est parmi les plus lente qu'on puisse trouver dans la nature, avec des demi-vies allant jusqu'à plus de 3 mois <sup>(129)</sup>. Il serait intéressant de caractériser le mécanisme de liaison entre ces inhibiteurs et leur protéases afin de déterminer si le mécanisme par sélection conformationnelle est réellement utilisé par la nature pour établir des complexes moléculaires avec une durée de vie élevée.

## Conclusion

En conclusion, nous avons présenté dans ce mémoire une étude des propriétés et des différences cinétiques entre les mécanismes classiques de reconnaissance moléculaire par ajustement induit et par sélection conformationnelle. L'ajustement induit a lieu lorsque le ligand se lie à l'état inactif et induit le changement conformationnel vers la forme active, alors que le mécanisme par sélection conformationnelle a lieu lorsque le ligand se lie directement à l'état spontanément actif et le stabilise. Ces mécanismes, responsables du couplage entre la liaison et le changement conformationnel des biomolécules et de la cinétique de ce processus, ont été étudiés exclusivement dans le contexte des biomolécules naturelles depuis les 60 dernières années. En raison de la complexité de ces biomolécules naturelles et des difficultés expérimentales résultantes, les performances de ces mécanismes sont demeurées relativement méconnues.

Afin de mieux caractériser ces mécanismes, nous avons eu recours à un modèle simple d'interrupteur d'ADN qui nous permet de varier indépendamment chaque paramètre thermodynamique du système. Ce modèle nous a permis de recréer le mécanisme par ajustement induit en utilisant un site de liaison partiellement accessible dans la conformation inactive, alors que le mécanisme par sélection conformationnelle a été obtenu lorsque ce même site de liaison était inaccessible dans l'état inactif. En étudiant le mécanisme de désactivation de ces interrupteurs, il fut possible de déterminer que l'activation et la désactivation d'un interrupteur donné se font via le même intermédiaire et le même mécanisme. Ces interrupteurs d'ADN nous ont aussi permis de mettre à l'épreuve les modèles théoriques qui décrivent la relation entre les différents paramètres thermodynamiques et les vitesses d'activation et de désactivation de ces deux mécanismes en présence d'un changement conformationnel rapide. Nos résultats, en accord ces modèles théoriques, ont permis de démontrer pour la première fois de manière expérimentale que la vitesse d'activation par ajustement induit dépend de l'affinité de l'état inactif pour le ligand ( $K_D^{\text{off}}$ ) alors que la vitesse d'activation par sélection conformationnelle dépend de l'équilibre conformationnel de l'interrupteur ( $K_S$ ). Il a aussi été possible d'observer que la vitesse de désactivation par sélection conformationnelle est influencée par l'affinité de l'état actif pour le ligand ( $K_D^{\text{on}}$ )

alors que la vitesse de l'ajustement induit en est indépendante. Finalement, notre modèle a permis pour la première fois de comparer directement la cinétique de ces deux mécanismes et de déterminer que l'ajustement induit donne lieu à des vitesses d'activation et de désactivation jusqu'à 10 000 fois plus rapides que le mécanisme par sélection conformationnelle. Cette différence cinétique entre ces deux mécanismes suggère une nouvelle piste pour mieux comprendre l'évolution naturelle des biomolécules et de leur mécanisme de régulation. De plus, notre étude permet également d'établir de nouveaux principes de design permettant de contrôler de manière rationnelle la cinétique de nouvelles biotechnologies.

## Bibliographie

1. Hardie DG. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & development*. 2011;25(18):1895-908.
2. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual review of biochemistry*. 1994;63(1):101-32.
3. Boehr DD, Nussinov R, Wright PE. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol*. 2009;5(11):789-96.
4. Stein RL. *Kinetics of enzyme action: essential principles for drug hunters*: John Wiley & Sons; 2011.
5. Holyoak T. Molecular Recognition: Lock-and-Key, Induced Fit, and Conformational Selection. In: Roberts GK, editor. *Encyclopedia of Biophysics*: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 1584-8.
6. Pauling L. Molecular architecture and biological reactions. *Chemical and engineering news*. 1946;24(10):1375-7.
7. Jencks WP. *Catalysis in chemistry and enzymology*: Courier Corporation; 1987.
8. Mader MM, Bartlett PA. Binding energy and catalysis: the implications for transition-state analogs and catalytic antibodies. *Chemical reviews*. 1997;97(5):1281-302.
9. Hilvert D. Critical analysis of antibody catalysis. *Annual review of biochemistry*. 2000;69(1):751-93.
10. Koshland DE. The key–lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1995;33(2324):2375-8.
11. Koshland Jr D. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1958;44(2):98.
12. Yankeelov Jr J, Koshland Jr D. Evidence for conformation changes induced by substrates of phosphoglucomutase. *J Biol Chem*. 1965;240:1593-602.
13. Gerstein M, Lesk AM, Chothia C. Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*. 1994;33(22):6739-49.
14. Frauenfelder H, Sligar SG, Wolynes PG. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*. 1991;254(5038):1598-603.
15. Weikl TR, Paul F. Conformational selection in protein binding and function. *Protein Sci*. 2014;23(11):1508-18.
16. Grant BJ, Gorfe AA, McCammon JA. Large conformational changes in proteins: signaling and other functions. *Current opinion in structural biology*. 2010;20(2):142-7.
17. Chaudhury S, Gray JJ. Conformer selection and induced fit in flexible backbone protein–protein docking using computational and NMR ensembles. *Journal of molecular biology*. 2008;381(4):1068-87.
18. Weiss S. Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. *Nature structural biology*. 2000;7(9):724-9.
19. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz R. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(7):4625-36.

20. Changeux J-P, Edelstein S. Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 biology reports*. 2011;3.
21. Dogan J, Jemth P. Only kinetics can prove conformational selection. *Biophysical journal*. 2014;107(8):1997-8.
22. Zhou H-X. From induced fit to conformational selection: a continuum of binding mechanism controlled by the timescale of conformational transitions. *Biophysical journal*. 2010;98(6):L15-L7.
23. Daniels KG, Tonthat NK, McClure DR, Chang Y-C, Liu X, Schumacher MA, et al. Ligand concentration regulates the pathways of coupled protein folding and binding. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(3):822-5.
24. Sullivan SM, Holyoak T. Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(37):13829-34.
25. Cornish-Bowden A. *Principles of enzyme kinetics*: Elsevier; 2014.
26. Mandic Z. *Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development*: IAPC Publishing; 2012.
27. Gianni S, Dogan J, Jemth P. Distinguishing induced fit from conformational selection. *Biophys Chem*. 2014;189:33-9.
28. Ivarsson Y, Travaglini-Allocatelli C, Jemth P, Malatesta F, Brunori M, Gianni S. An on-pathway intermediate in the folding of a PDZ domain. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(12):8568-72.
29. Vogt AD, Di Cera E. Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. *Biochemistry*. 2012;51(30):5894-902.
30. Tummino PJ, Copeland RA. Residence time of receptor– ligand complexes and its effect on biological function. *Biochemistry*. 2008;47(20):5481-92.
31. Halford S. *Escherichia coli alkaline phosphatase. An analysis of transient kinetics*. *Biochemical Journal*. 1971;125(1):319-27.
32. Fersht A. *Structure and mechanism in protein science*. Freeman, New York; 1999.
33. Boosalis MS, Petruska J, Goodman M. DNA polymerase insertion fidelity. Gel assay for site-specific kinetics. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(30):14689-96.
34. Washington MT, Prakash L, Prakash S. Yeast DNA polymerase  $\eta$  utilizes an induced-fit mechanism of nucleotide incorporation. *Cell*. 2001;107(7):917-27.
35. Olson S, Srinivasan K, Björk I, Shore J. Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Stopped flow kinetic studies of the binding interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(21):11073-9.
36. Coleman RA, Pugh BF. Slow dimer dissociation of the TATA binding protein dictates the kinetics of DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(14):7221-6.
37. De La Cruz EM, Wells AL, Rosenfeld SS, Ostap EM, Sweeney HL. The kinetic mechanism of myosin V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;13726-31.
38. Daniels KG, Suo Y, Oas TG. Conformational kinetics reveals affinities of protein conformational states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(30):9352-39.
39. Weikl TR, von Deuster C. Selected-fit versus induced-fit protein binding: kinetic differences and mutational analysis. *Proteins*. 2009;75(1):104-10.

40. Persson C, Wagner E, Nordström K. Control of replication of plasmid R1: formation of an initial transient complex is rate-limiting for antisense RNA--target RNA pairing. *The EMBO journal*. 1990;9(11):3777.
41. Fersht A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*: Macmillan; 1999.
42. Peuker S, Cukkemane A, Held M, Noé F, Kaupp UB, Seifert R. Kinetics of ligand-receptor interaction reveals an induced-fit mode of binding in a cyclic nucleotide-activated protein. *Biophysical journal*. 2013;104(1):63-74.
43. Bonnet G, Krichevsky O, Libchaber A. Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(15):8602-6.
44. Hammes GG, Chang YC, Oas TG. Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13737-41.
45. Wong I, Patel SS, Johnson KA. An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry*. 1991;30(2):526-37.
46. Joyce CM, Benkovic SJ. DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry*. 2004;43(45):14317-24.
47. Tsai Y-C, Johnson KA. A new paradigm for DNA polymerase specificity. *Biochemistry*. 2006;45(32):9675-87.
48. Beard WA, Wilson SH. *Structure and Mechanism of DNA Polymerase  $\beta$* . *Biochemistry*. 2014;53(17):2768-80.
49. Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition*. 2005;18(5):343-84.
50. Espinoza-Fonseca LM. Reconciling binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;382(3):479-82.
51. O'Brien PJ. Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chemical reviews*. 2006;106(2):720-52.
52. Tawfik OK, S D. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annual review of biochemistry*. 2010;79:471-505.
53. Deupi X, Kobilka BK. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology*. 2010;25(5):293-303.
54. Maudsley S, Martin B, Luttrell LM. The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;314(2):485-94.
55. Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;62(3):197-212.
56. Ma B, Shatsky M, Wolfson HJ, Nussinov R. Multiple diverse ligands binding at a single protein site: A matter of pre-existing populations. *Protein science*. 2002;11(2):184-97.
57. Münz M, Hein J, Biggin PC. The role of flexibility and conformational selection in the binding promiscuity of PDZ domains. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(11):e1002749.
58. Nussinov R, Ma B. Protein dynamics and conformational selection in bidirectional signal transduction. *BMC biology*. 2012;10(1):1.
59. Kuchner O, Arnold FH. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in biotechnology*. 1997;15(12):523-30.
60. Conant GC, Wolfe KH. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(12):938-50.

61. Luque I, Freire E. Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2000;41(S4):63-71.
62. Tokuriki N, Tawfik DS. Stability effects of mutations and protein evolvability. *Current opinion in structural biology*. 2009;19(5):596-604.
63. Vallée-Bélisle A, Ricci F, Plaxco KW. Engineering biosensors with extended, narrowed, or arbitrarily edited dynamic range. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(6):2876-9.
64. Martinez CR, Iverson BL. Rethinking the term “pi-stacking”. *Chemical Science*. 2012;3(7):2191-201.
65. SantaLucia Jr J, Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:415-40.
66. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3406-15.
67. Puglisi JD, Tinoco Jr I. Absorbance melting curves of RNA. *Methods in enzymology*. 1989;180:304-25.
68. Santoro MM, Bolen D. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl. alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*. 1988;27(21):8063-8.
69. Vallée-Bélisle A, Ricci F, Plaxco KW. Thermodynamic basis for the optimization of binding-induced biomolecular switches and structure-switching biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(33):13802-7.
70. Weigand JE, Suess B. Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*. 2009;85(2):229-36.
71. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*. 1996;14(3):303-8.
72. Tan W, Wang K, Drake TJ. Molecular beacons. *Current opinion in chemical biology*. 2004;8(5):547-53.
73. Li Y, Zhou X, Ye D. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;373(4):457-61.
74. Han S-X, Jia X, Ma J-l, Zhu Q. Molecular beacons: a novel optical diagnostic tool. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2013;61(2):139-48.
75. Kahan-Hanum M, Douek Y, Adar R, Shapiro E. A library of programmable DNazymes that operate in a cellular environment. *Scientific reports*. 2013;3.
76. Ma D-L, He H-Z, Chan DS-H, Leung C-H. Simple DNA-based logic gates responding to biomolecules and metal ions. *Chemical Science*. 2013;4(9):3366-80.
77. Douglas SM, Bachelet I, Church GM. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*. 2012;335(6070):831-4.
78. Dunker AK, Garner E, Guillot S, Romero P, Albrecht K, Hart J, et al., editors. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput*; 1998.
79. Simon AJ, Vallée-Bélisle A, Ricci F, Watkins HM, Plaxco KW. Using the Population-Shift Mechanism to Rationally Introduce “Hill-type” Cooperativity into a Normally Non-Cooperative Receptor. *Angewandte Chemie*. 2014;126(36):9625-9.
80. Gao Y, Wolf LK, Georgiadis RM. Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison. *Nucleic acids research*. 2006;34(11):3370-7.

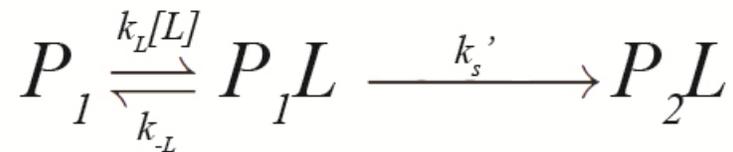
81. Pace CN, Scholtz JM. Measuring the conformational stability of a protein. *Protein structure: A practical approach*. 1997;2:299-321.
82. Gralla J, Crothers DM. Free energy of imperfect nucleic acid helices: II. small hairpin loops. *Journal of molecular biology*. 1973;73(4):497IN1503-502511.
83. Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic acids research*. 2002;30(21):e122-e.
84. Cisse, II, Kim H, Ha T. A rule of seven in Watson-Crick base-pairing of mismatched sequences. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(6):623-7.
85. Brady K, Abeles RH. Inhibition of chymotrypsin by peptidyl trifluoromethyl ketones: determinants of slow-binding kinetics. *Biochemistry*. 1990;29(33):7608-17.
86. Fox T, De Miguel E, Mort JS, Storer AC. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry*. 1992;31(50):12571-6.
87. Garland DL. Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin: evidence for ligand-induced conformational changes. *Biochemistry*. 1978;17(20):4266-72.
88. Wang L-H, Tsai A-L, Hsu P-Y. Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(18):14737-43.
89. Zhang DY, Winfree E. Control of DNA strand displacement kinetics using toehold exchange. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(47):17303-14.
90. Greives N, Zhou H-X. Both protein dynamics and ligand concentration can shift the binding mechanism between conformational selection and induced fit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(28):10197-202.
91. Colquhoun D. Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *British journal of pharmacology*. 1998;125(5):923-47.
92. Motulsky H, Christopoulos A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*: OUP USA; 2004.
93. Schreiber G. Kinetic studies of protein-protein interactions. *Current opinion in structural biology*. 2002;12(1):41-7.
94. Chan HS, Dill KA. Protein folding in the landscape perspective: Chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1998;30(1):2-33.
95. Vallée-Bélisle A, Plaxco KW. Structure-switching biosensors: inspired by Nature. *Current opinion in structural biology*. 2010;20(4):518-26.
96. Fersht A. Catalysis, binding and enzyme-substrate complementarity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 1974;187(1089):397-407.
97. Herschlag D. The role of induced fit and conformational changes of enzymes in specificity and catalysis. *Bioorganic chemistry*. 1988;16(1):62-96.
98. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*. 2002;102(12):4501-24.
99. Johnson KA. Role of induced fit in enzyme specificity: a molecular forward/reverse switch. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26297-301.
100. Post CB, Ray Jr WJ. Reexamination of induced fit as a determinant of substrate specificity in enzymic reactions. *Biochemistry*. 1995;34(49):15881-5.
101. James I, Goldstein A. Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. *Molecular pharmacology*. 1984;25(3):337-42.
102. Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*. 2008;108(2):814-25.

103. Mello LD, Kubota LT. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food chemistry*. 2002;77(2):237-56.
104. Dennison M, Turner AP. Biosensors for environmental monitoring. *Biotechnology advances*. 1995;13(1):1-12.
105. Mohanty SP, Kougiianos E. Biosensors: a tutorial review. *Potentials, IEEE*. 2006;25(2):35-40.
106. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. *Nature biotechnology*. 2003;21(10):1192-9.
107. Guo X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *Journal of biophotonics*. 2012;5(7):483-501.
108. Sandhu A. Biosensing: New probes offer much faster results. *Nature nanotechnology*. 2007;2(12):746-8.
109. Tsourkas A, Behlke MA, Rose SD, Bao G. Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucleic acids research*. 2003;31(4):1319-30.
110. Broude NE. Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*. 2002;20(6):249-56.
111. Zhang DY, Seelig G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nature chemistry*. 2011;3(2):103-13.
112. Srinivas N, Ouldrige TE, Sulc P, Schaeffer JM, Yurke B, Louis AA, et al. On the biophysics and kinetics of toehold-mediated DNA strand displacement. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(22):10641-58.
113. Chen J-W, Liu X-P, Feng K-J, Liang Y, Jiang J-H, Shen G-L, et al. Detection of adenosine using surface-enhanced Raman scattering based on structure-switching signaling aptamer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008;24(1):66-71.
114. Kolpashchikov DM, Stojanovic MN. Boolean control of aptamer binding states. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(32):11348-51.
115. Katilius E, Flores C, Woodbury NW. Exploring the sequence space of a DNA aptamer using microarrays. *Nucleic acids research*. 2007;35(22):7626-35.
116. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin M-H, Kinet J-P, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *The Journal of Immunology*. 1996;157(1):221-30.
117. Mills JK, Needham D. Targeted drug delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 1999;9(11):1499-513.
118. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*. 1999;99(11):3181-98.
119. Brayden DJ. Controlled release technologies for drug delivery. *Drug discovery today*. 2003;8(21):976-8.
120. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(1):22-54.
121. Colquhoun D, Sakmann B. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *The Journal of Physiology*. 1985;369(1):501-57.
122. Jackson MB. Dependence of acetylcholine receptor channel kinetics on agonist concentration in cultured mouse muscle fibres. *The Journal of physiology*. 1988;397:555.

123. Jackson MB. Perfection of a synaptic receptor: kinetics and energetics of the acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(7):2199-203.
124. Wu H. Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction. *Cell*. 2013;153(2):287-92.
125. Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*. 1997;6(4):361-9.
126. Kersh GJ, Allen PM. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(4):1259-68.
127. Doucet A, Overall CM. Protease proteomics: revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Molecular aspects of medicine*. 2008;29(5):339-58.
128. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(45):30433-7.
129. Janin J, Chothia C. The structure of protein-protein recognition sites. *J Biol Chem*. 1990;265.

## Annexe 1 : Expressions des constantes de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) du modèle à trois états simplifié

*Ajustement induit*



Les équations de vitesses correspondant à ce schéma sont :

$$\frac{d[P_1]}{dt} = -k_L[L][P_1] + k_{-L}[P_1L]$$

$$\frac{d[P_1L]}{dt} = k_L[L][P_1] - k_{-L}[P_1L] - k_s'[P_1L]$$

$$\frac{d[P_2L]}{dt} = k_s'[P_1L]$$

Approximation d'état stationnaire ( $k_s' + k_{-L} \gg k_L[L]$ ) :  $\frac{d[P_1L]}{dt} = 0$  donc  $\frac{d[P_2L]}{dt} = -\frac{d[P_1]}{dt}$  et

$[P_1L] = [P_1L]_{ES}$  est une constante

$$\frac{d[P_1L]}{dt} = k_L[L][P_1] - k_{-L}[P_1L]_{ES} - k_s'[P_1L]_{ES} = 0$$

$$k_L[L][P_1] = (k_{-L} + k_s')[P_1L]_{ES}$$

$$\frac{k_L[L]}{(k_{-L} + k_s')} [P_1] = [P_1L]_{ES}$$

Substitution de  $[P_1L]_{ES}$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = -k_L[L][P_1] + k_{-L}[P_1L]_{ES}$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = -k_L[L][P_1] + k_{-L} \frac{k_L[L]}{(k_{-L} + k_s')} [P_1]$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = \left( -1 + \frac{k_{-L}}{(k_{-L} + k_s')} \right) k_L[L][P_1]$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = \left( -\frac{k_s'}{(k_{-L} + k_s')} \right) k_L[L][P_1]$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = -\frac{k_L[L]k_s'}{(k_{-L} + k_s')} [P_1]$$

Le terme  $\frac{k_L[L]k_s'}{(k_{-L} + k_s')}$  ne contient que des constantes ( $[L] = [L]_{\text{tot}}$  est constant en pseudo-premier

ordre) donc  $k_{\text{obs}} = \frac{k_L[L]k_s'}{(k_{-L} + k_s')}$ .

Il reste à séparer les variables et intégrer en utilisant les intégrales standard

$$\int_0^t \frac{dx}{x} = \ln(x_t) - \ln(x_0) \text{ et } \mathcal{C} \int_0^t dx = \mathcal{C}t$$

$$-\frac{d[P_1]}{dt} = \frac{d[P_1]}{[P_1]} = -k_{\text{obs}} dt$$

$$\int_0^t \frac{d[P_1]}{[P_1]} = -k_{\text{obs}} \int_0^t dt$$

$$\ln [P_1]_t - \ln [P_1]_0 = -k_{\text{obs}} t$$

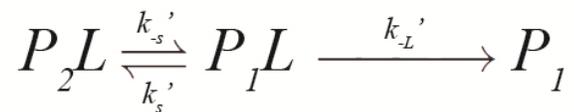
$$\ln [P_1]_t = \ln [P_1]_0 - k_{\text{obs}} t$$

$$[P_1]_t = [P_1]_0 \exp^{-k_{\text{obs}} t}$$

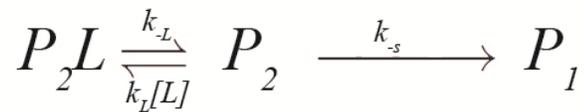
$$\text{où } k_{\text{obs}} = \frac{k_L[L]k_s'}{(k_{-L} + k_s')}$$

Les constantes de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) pour la désactivation par ajustement induit ainsi que pour les processus d'activation et de désactivation par sélection conformationnelle sont obtenues à l'aide du même développement que celui ci-haut à partir des schémas réactionnels suivants.

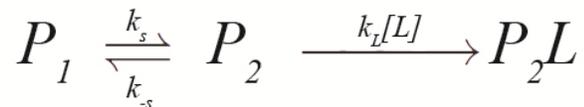
*Ajustement induit (désactivation)*



*Sélection conformationnelle (désactivation)*

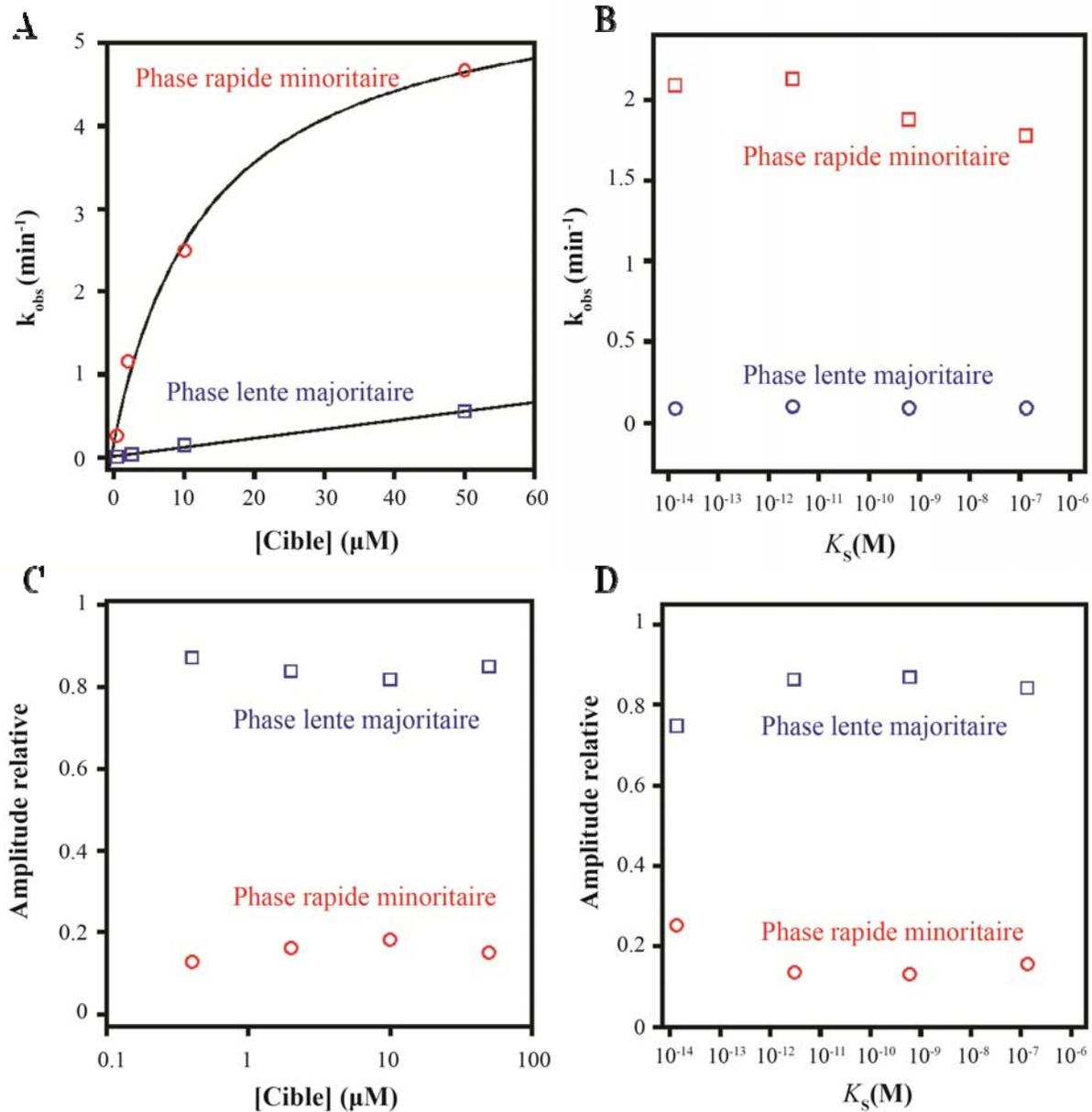


*Sélection conformationnelle (activation)*



## **Annexe 2 : Caractérisation de la phase cinétique rapide de l'interrupteur à boucle de 13 nucléotides.**

La cinétique d'activation de l'interrupteur avec une boucle de 13 nucléotides (Figure 20 B) est décrite par une courbe bi-exponentielle (équation 30) impliquant deux constantes de vitesse observées ( $k_{obs}$ ). Ainsi, la constante de vitesse de la phase représentant plus de 80% de l'amplitude de la réaction (Figure A1 C et D) fut choisie pour représenter l'activation de l'interrupteur. La constante de vitesse de cette phase majoritaire est lente comparativement à la constante de vitesse de la phase minoritaire (Figure A1 A et B). Cette phase lente majoritaire correspond à l'activation de l'interrupteur par le ligand dans un régime cinétique limité par la vitesse de liaison du ligand avec la boucle puisque la relation entre  $k_{obs}$  et la concentration de cible est linéaire (Figure A1 A). La phase rapide minoritaire semble aussi correspondre à l'activation de l'interrupteur par le ligand (dépend de la concentration de ligand) mais s'approche du régime cinétique limité par la vitesse du changement conformationnel de l'interrupteur. En effet, dans ce cas la relation entre  $k_{obs}$  et la concentration de ligand est hyperbolique (Figure A1 A). Aucune de ces deux phases cinétiques ne semble représenter l'interaction de la cible avec une forme globalement mal repliée de l'interrupteur, puisque dans ce cas l'augmentation de la stabilité de la conformation inactive (diminution de  $K_s$ ) en diminuerait la population et donc l'amplitude de la phase cinétique, ce qui n'est pas le cas (Figure A1 D). Il ne s'agit pas non plus d'une contribution de chaque mécanisme (par exemple 15% sélection conformationnelle et 85% ajustement induit ou l'inverse) puisque la constante de vitesse des deux phases est indépendante de l'équilibre conformationnel (Figure A1 B). Il est donc possible de spéculer que la phase rapide minoritaire représente une conformation alternative de la boucle qui serait plus accessible pour la liaison avec la cible. En effet, la boucle de 13 nucléotides étant plus longue et plus flexible que les autres, il est plus probable que cette boucle adopte une conformation secondaire importante.



**Figure A1. Relation entre les différents paramètres des deux phases cinétiques de la boucle 13.** (A) La relation entre la concentration de la cible de 17 nucléotides (400nM à 50μM) et la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) de la phase rapide est décrite par une courbe hyperbolique (équation 5) alors que la phase lente est décrite par une droite (équations 2 et 3). (B) La stabilité de l'état inactif ( $K_s$ ) n'a aucun effet sur la constante cinétique des deux phases. (C) L'amplitude relative des deux phases est indépendante de la concentration de cible. (D) L'amplitude relative des deux phases est aussi indépendante de la stabilité de l'état inactif. Les données de (B-D) correspondent à une concentration de 10μM de la cible de 17 nucléotides.