

2m11.2832.6

Université de Montréal

Le mécanisme de repliement du Domaine Liant Ras de Raf : implication de la relation « topologie native / mécanisme de repliement » des protéines chez la superfamille de l'ubiquitine.

par

Alexis Vallée-Bélisle

Département de chimie

Faculté des Arts et Sciences

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en Chimie**

Août 2000

© Alexis Vallée-Bélisle, 2000



QD

3

U54

2001

n. 010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le mécanisme de repliement du Domaine Liant Ras de Raf: implication de la relation « topologie native / mécanisme de repliement » des protéines chez la superfamille de l'ubiquitine.

présenté par :
Alexis Vallée-Béliele

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Lafleur	président-rapporteur
Stephen Micknick	directeur de recherche
Jeffrey Keillor	membre du jury

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

Les dernières avancées dans l'étude du repliement des protéines suggèrent que la topologie native des protéines détermine en grande partie la vitesse ainsi que le mécanisme de repliement de celles-ci. Dans la présente étude, nous avons voulu approfondir cette relation au sein de la superfamille de l'ubiquitine.

En se basant sur les résultats publiés concernant le repliement de l'ubiquitine, nous avons voulu voir si le domaine liant Ras (DLR) de Raf, une protéine structurellement similaire à l'ubiquitine (même topologie) mais affectant une homologie de séquence avec cette dernière aussi petite que 11%, se replie via le même mécanisme. Deux observations expérimentales permettent de suggérer la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe lors du mécanisme de repliement de l'ubiquitine: 1) une déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états à basse concentration de Gdn-HCl à 25°C, corrélée à l'apparition d'un signal de fluorescence de type natif dissimulée dans le temps mort de l'appareil de mixage et 2) le retour d'une renaturation de type deux états suivant une diminution de la température (8 °C).

Malgré une différence de stabilité significative entre les deux structures (21,3 kJ/M pour le DLR de Raf comparativement à 29,3 kJ/M pour l'ubiquitine dans l'eau à 25°C), les vitesses de repliement du DLR de Raf et de l'ubiquitine extrapolées en absence de dénaturant se révèlent relativement similaires (respectivement 630 s⁻¹ et 1530 s⁻¹). Le degré de fermeture ou de compaction de l'état de transition des deux protéines se révèle identique, prenant une valeur de 0,68 sur une échelle relative à l'état natif (valeur de 1) et de l'état dénaturé (valeur de 0). De plus, tout comme l'ubiquitine, on observe l'apparition d'un signal de fluorescence de type natif dans le temps mort de l'appareil de mixage corrélée à une déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états lors de la renaturation de la protéine à faible concentration de Gdn-HCl. Cependant, malgré la similarité de la renaturation des deux protéines, deux expériences additionnelles effectuées sur le DLR de Raf permettent d'interpréter ces résultats à la lumière d'un modèle de

repliement via un intermédiaire tardif. Tout d'abord, des sauts de pH permirent l'étude du repliement du DLR de Raf en l'absence de dénaturant ceci rendant possible l'observation de la phase très rapide responsable du retour de 35% de la fluorescence native. La dépendance du dénaturant sur la vitesse de cette phase affecte les mêmes caractéristiques que celle de la transition « état dénaturé / état de transition de type deux états » observée à plus forte concentration de dénaturant : ceci permet de montrer que l'intermédiaire rapidement formé est ultérieur à l'état de transition de type deux états dans le profil de la réaction de repliement. Ainsi, à faible concentration de Gdn-HCl, une étape ultérieure à l'état de transition de type deux états et, indépendante de la concentration de dénaturant, devient limitant pour le retour de la fluorescence de type natif. L'absence apparente de l'intermédiaire tardif lors des expériences de dépliement suggère que les interactions créées lors de la seconde étape ne permettent pas d'augmenter de façon sensible la barrière de dépliement de la protéine laissant ainsi croire à un réarrangement local. La grande variation de fluorescence reliée à cette étape permet quant à elle de proposer que le réarrangement se situe en périphérie du tryptophane de la protéine. L'étude de l'effet de la température indique pour sa part que la phase très rapide de type deux états peut être résolue simplement en augmentant le temps de relaxation des transitions observées à l'aide d'une diminution de l'énergie cinétique du milieu réactif.

Ainsi, la similitude des résultats obtenus concernant le repliement de l'ubiquitine et du DLR de Raf permet d'appuyer la nature déterminante de la topologie native dans le type de mécanisme de repliement utilisé au sein de la superfamille de l'ubiquitine. De plus, l'apport d'expériences additionnelles proposées dans cette étude aura permis de poser un nouveau regard sur l'interprétation des premiers événements observés lors de la renaturation des protéines.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 GÉNÉRALITÉS	1
1.1.1 Structure des protéines.....	1
1.1.2 Pourquoi étudier le mécanisme de repliement des protéines?.....	5
1.1.3 Comment étudier le mécanisme de repliement des protéines?	6
1.1.4 Nature de la présente étude.....	7
1.2 ÉTAT DES ÉTUDES ACTUELLES : EXPÉRIENCES ET THÉORIES	8
1.2.1 Le mécanisme de nucléation-condensation ou nucléation étendue	10
1.2.2 La topologie native d'une protéine détermine en grande partie sa vitesse et son mécanisme de repliement.....	14
1.2.3 La formation rapide d'intermédiaire hydrophobe.....	15

1.3	OBJECTIF DE LA PRÉSENTE ÉTUDE : ÉTUDE DU MÉCANISME DE REPLIEMENT DU DLR DE RAF.....	20
1.3.1	<i>Critères de sélection du DLR de Raf.....</i>	21
1.3.2	<i>Évidences expérimentales suggérant l'importance de la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe pour le repliement de l'ubiquitine.....</i>	23
1.3.3	<i>Démarche scientifique et questions spécifiques</i>	24
CHAPITRE 2: CARACTÉRISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DU DLR DE RAF.....		25
2.1	EXPRESSION ET PURIFICATION	25
2.2	CARACTÉRISTIQUES SPECTRALES DE L'ÉTAT NATIF, DÉNATURÉ ET RENATURÉ DU DLR DE RAF...	26
2.2.1	<i>Spectroscopie de fluorescence.....</i>	26
2.2.2	<i>Spectroscopie RMN</i>	27
CHAPITRE 3: ÉTUDES D'ÉQUILIBRE.....		29
3.1	FLUORESCENCE : DÉNATURATION INDUITE PAR GDN-HCL.....	32
3.1.1	<i>Courbe d'équilibre.....</i>	32
3.1.2	<i>ΔG de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant.....</i>	34
3.2	RMN : DÉNATURATION INDUITE PAR GDN-HCL	35
2.2.2	<i>Spectroscopie RMN</i>	35
CHAPITRE 4: ÉTUDE CINÉTIQUE: A) SAUT DE DÉNATURANT		37
4.1	REPLIEMENT ET DÉPLIEMENT PAR SAUT DE DÉNATURANT À 25 °C À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE GDN-HCL.	41
4.1.1	<i>Repliement tri-phasique à 1M de Gdn-HCl.....</i>	43
4.1.2	<i>Dépendance de la concentration de Gdn-HCl sur la vitesse des 3 phases lentes.....</i>	45
4.1.3	<i>Dépliement monophasique.</i>	46

4.1.4	<i>Courbe de chevron de la phase rapide en fonction de la concentration de Gdn-HCl.....</i>	47
4.1.5	<i>Corrélation entre la déviation négative de la courbe de chevron avec l'apparition d'un signal de fluorescence au temps initial.....</i>	50
4.1.6	<i>Corrélation entre la déviation négative de la courbe de chevron et la variance de la fonction de la meilleure simulation appliquée à la trace cinétique.....</i>	52
CHAPITRE 5: ÉTUDE CINÉTIQUE : B) SAUT DE PH.....		55
5.1	COMPARAISON ENTRE LES ENSEMBLES DÉNATURÉS PAR ACIDE ET PAR GDN-HCL PAR MESURE DE LA VITESSE DE RENATURATION DES DEUX FORMES.....	56
5.2	REPLIEMENT SANS DÉNATURANT: PRÉSENCE DE DEUX TRANSITIONS DISTINCTES DANS LA PHASE RAPIDE. 57	
5.3	COURBE DE CHEVRON DU REPLIEMENT PAR SAUT DE PH: ANALYSE BIPHASIQUE VS ANALYSE MONOPHASIQUE DE LA PHASE RAPIDE.	59
5.4	VARIABILITÉ DES AMPLITUDES DES 2 TRANSITIONS OBSERVÉES DANS LA PHASE RAPIDE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE DÉNATURANT.....	59
5.5	SIGNAL DE FLUORESCENCE AU TEMPS INITIAL SUIVANT UNE ANALYSE MONOPHASIQUE ET BIPHASIQUE DE LA PHASE RAPIDE	62
CHAPITRE 6: EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LE REPLIEMENT DU DLR DE RAF.....		64
6.1	VARIATION DE LA VITESSE DES DIFFÉRENTES PHASES OBSERVÉES LORS DU REPLIEMENT DU DLR DE RAF EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.....	64

CHAPITRE 7: DISCUSSION	66
7.1 CARACTÉRISATION DU MÉCANISME DE REPLIEMENT DU DLR DE RAF	66
7.1.1 <i>Caractérisation spectroscopique</i>	66
7.1.2 <i>Études d'équilibre</i>	66
7.1.3 <i>Études cinétiques</i>	68
7.1.4 <i>Modèle proposé</i>	73
7.2 COMPARAISON DU MÉCANISME DE REPLIEMENT DU DLR DE RAF AVEC CELUI DE L'UBIQUITINE : MÊMES RÉSULTATS, DIFFÉRENTE INTERPRÉTATION	78
7.2.1 <i>La topologie native d'une protéine détermine en grande partie son mécanisme et sa vitesse de repliement</i>	78
7.2.2 <i>La déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états corrélée à l'apparition d'un signal de type natif dans le temps mort de l'appareil de mixage, à faible concentration de dénaturant, est attribuée à la présence d'un intermédiaire tardif</i>	80
7.2.3 <i>Implication de la présente étude</i>	82
CHAPITRE 8: CONCLUSION	84
CHAPITRE 9: MATÉRIELS ET MÉTHODES	85
9.1 PROVENANCE DES GÈNES	85
9.2 CLONAGE ET MUTATIONS.....	85
9.3 EXPRESSION ET PURIFICATION.....	87
9.4 RMN.....	88

9.5	SOLUTIONS DE GDN-HCL	89
9.5.1	<i>Courbe d'équilibre et saut de dénaturant</i>	89
9.5.2	<i>Saut de pH</i>	89
9.6	FLUORESCENCE (ÉQUILIBRE)	90
9.7	FLUORESCENCE (CINÉTIQUE).....	90
9.7.1	<i>Saut de dénaturant</i>	91
9.7.2	<i>Saut de pH</i>	91
9.8	ANALYSE DES DONNÉES CINÉTIQUES.....	92
9.8.1	<i>Analyse de la courbe d'équilibre</i>	92
9.8.2	<i>Analyse des traces cinétiques</i>	93
9.8.3	<i>Détermination des vitesses de repliement et de dépliement microscopiques à partir de la courbe de chevron</i>	94
9.8.4	<i>Détermination de la vitesse microscopique du réarrangement de l'intermédiaire.</i>	94
	RÉFÉRENCES.....	95
	REMERCIEMENTS.....	103

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Description sommaire des modèles « framework » et à intermédiaire hydrophobe pour le repliement des protéines.	9
TABLEAU II : Résumé des évidences expérimentales amenant à la formulation de la théorie de nucléation-condensation tiré de l'étude de CI2.....	11
TABLEAU III : Évidences expérimentales soutenant la nature « cul-de-sac » ou « artefact » des intermédiaires contre celles soutenant la nature obligatoire des intermédiaires pour diverses protéines.	20
TABLEAU IV : Stabilité, valeur de m et concentration de dénaturant au point milieu de dénaturation, C_m , tels que tirés de la courbe de dénaturation au Gdn-HCl.....	33
TABLEAU V : $k_{f_{H_2O}}$, $k_{d_{H_2O}}$, mf et md ainsi que le ΔG_{H_2O} et la valeur de m calculés à partir des paramètres cinétiques tirés de la courbe de chevron par analyse non-linéaire de moindre carré des valeurs expérimentales pour un modèle à deux états.	48
TABLEAU VI: Vitesses et amplitudes pour les trois phases observées lors de la renaturation des formes dénaturées par acide (pH) et par dénaturant (D) à 1M de Gdn-HCl, pH 5,0.	57
TABLEAU VII : Principales observations ayant mené à la formulation du mécanisme de repliement du DLR de Raf.	74
TABLEAU VIII : Principales caractéristiques communes au repliement du DLR de Raf et de l'ubiquitine et résultats additionnels obtenus pour le DLR de raf.	78

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structure primaire ou covalente des protéines.....	2
FIGURE 2 : Structures secondaire et tertiaire des protéines : l'hélice α et le feuillet β	4
FIGURE 3 : Profil énergétique des états natif, dénaturé et de transition pour un modèle de repliement à deux états (CI2).	10
FIGURE 4 : Profil énergétique et mécanisme de « nucléation condensation » pour une protéine se repliant via deux états	12
FIGURE 5: Corrélation entre la déviation négative de la vitesse de repliement et une perte de signal dans le temps mort de l'appareil de mixage à basse concentration dénaturant suggérant la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe.....	17
FIGURE 6 : Comparaison des profils énergétiques de réaction de repliement pour un intermédiaire de type « cul-de-sac » ou de type obligatoire.....	18
FIGURE 7: Structure du DLR de Raf ainsi que de l'ubiquitine	22
FIGURE 8 : Spectre d'émission des formes native et dénaturée du DLR de Raf..	27
FIGURE 9 : Spectre RMN des protons amines de la forme renaturée et native du DLR de Raf.....	28
FIGURE 10 : Dénaturation à deux états à l'équilibre des petites protéines globulaires...	30
FIGURE 11 : Variation de l'énergie de Gibbs des états natif et dénaturé ainsi que du ΔG de déplieement en fonction de la concentration de dénaturant.	31

FIGURE 12 : Dénaturation à l'équilibre du DLR de raf.	32
FIGURE 13 : ΔG de dépliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl.....	34
FIGURE 14 : Spectre RMN du proton amide du tryptophane du DLR de Raf à différentes concentration de Gdn-HCl..	36
FIGURE 15 : Expérience typique de saut de dénaturant pour l'étude du repliement et du dépliement d'une protéine	42
FIGURE 16 : Expérience de renaturation suivant une dilution allant de 4,0 M à 1,0 M de Gdn-HCl tel qu'enregistré par un spectromètre de fluorescence combiné à un « stopped flow »..	44
FIGURE 17 : Variation de la vitesse des trois transitions observées lors du repliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de dénaturant.....	45
FIGURE 18 : Expérience de dénaturation à l'aide d'une augmentation de la concentration de dénaturant allant de 0 M à 2,5 M de Gdn-HCl telle qu'enregistrée par un spectromètre de fluorescence combiné à un « stopped flow ».....	46
FIGURE 19 : Variation du logarithme naturel des vitesses de relaxation pour le repliement et le dépliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl: courbe de chevron.	47
FIGURE 20 : Vitesses de repliement et de dépliement intrinsèques telles qu'extrapolées de la région de type deux états de la courbe de chevron.	49

- FIGURE 21: Corrélacion entre la perte de signal au temps initial pour la renaturation du DLR de Raf et la déviation de la vitesse de repliement d'un système deux états à faible concentration de dénaturant.....51
- FIGURE 22 : Résiduels de traces cinétiques de renaturation (phase rapide) à différentes concentrations de dénaturant. 52
- FIGURE 23 : Corrélacion entre la déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états et la variance obtenue de la simulation de la trace cinétique.54
- FIGURE 24 : Simulation à simple et double exponentielles de la phase rapide pour la renaturation du DLR de Raf en absence de dénaturant 58
- FIGURE 25 : Variation du logarithme naturel des vitesses de relaxation observées lors des sauts de pH en fonction de la concentration de Gdn-HCl: courbe de chevron.60
- FIGURE 26 : Variation des amplitudes pour les phases rapide et très rapide telles que déterminées par la meilleure fonction de simulation à double exponentielles. 61
- FIGURE 27 : Intensité de fluorescence extrapolée au temps initial de la renaturation du DLR de Raf à différentes concentrations de dénaturant pour une analyse monophasique et biphasique de la phase rapide 63
- FIGURE 28 : Dépendance de la vitesse des différentes phases observées lors de la renaturation du DLR de raf en fonction de la température. 65
- FIGURE 29 : Profil énergétique des différents états identifiés lors du repliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl..... 77
- FIGURE 30 : Comparaison des profils énergétiques pour les modèles de repliement à intermédiaire tardif et à formation rapide d'intermédiaire hydrophobe 83

FIGURE 30 : Comparaison des profils énergétiques pour les modèles de repliement à intermédiaire tardif et à formation rapide d'intermédiaire hydrophobe	83
FIGURE 31: Stratégie de clonage du DLR de Raf.	86
FIGURE 32 : Gel Tricine-SDS-PAGE illustrant les différentes étapes d'expression et de purification du DLR de Raf.....	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	<i>ADN complémentaire</i>
CI2	<i>Inhibiteur de la Chymotrypsine 2</i>
DC	<i>Dichroïsme Circulaire</i>
DLR de Raf	<i>Domaine Liant Ras de Raf (résidus 55 à 132 de Raf, une protéine de 627 acides aminés)</i>
DO	<i>Densité Optique</i>
DTT	<i>DiThioThréitol : anti-oxydant utilisé pour éliminer la formation de pont disulfures entre les acides aminés cystéines.</i>
É.D., É.I. É.T., É.N.	<i>État dénaturé, état intermédiaire, état de transition, état natif.</i>
Gdn-HCl	<i>HydroChlorure de Guanidium</i>
IPTG	<i>IsoPropylThioGalactosidase : inducteur d'expression pour les gènes sous le contrôle d'un promoteur lac</i>
MBP	<i>Protéine liant le maltose (Maltose Binding Protein)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction : technique d'amplification d'ADN</i>
RMN	<i>Résonance Magnétique Nucléaire</i>
RMSD	<i>Écart à la moyenne des déviations (Root Mean Square Déviation)</i>
RPM	<i>Rotations Par Minute</i>
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis : technique de séparation de protéines selon le poids moléculaire.</i>
WASP	<i>Protéine du Syndrome Wiskott-Aldrich</i>

N.B. Par souci de clarté, certains termes anglophones spécifiques au domaine du repliement des protéines, seront associés à leur équivalent francisé par l'entremise de guillemets.

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 Généralités

1.1.1 Structure des protéines

Les protéines représentent une classe à part d'hétéro polymères linéaires non-répétitifs par l'aptitude qu'elles possèdent à adopter des structures tridimensionnelles ou conformations spécifiques grandement diversifiées dépendamment de leur composition en monomères. La structure covalente des protéines, la structure primaire, est déterminée par les différentes structures des 20 acides aminés (monomères) ainsi que par l'ordre selon lequel ils sont assemblés dans la chaîne linéaire à partir du code génétique. Tous les acides aminés ont en commun un atome de carbone central ($C\alpha$) auquel sont rattachés un atome d'hydrogène, un groupe aminé (NH_2) ainsi qu'un groupe carboxylique ($COOH$). C'est une chaîne latérale attachée au quatrième lien de valence du $C\alpha$ qui permet de distinguer chaque acide aminé. Dépendamment de la nature chimique de celle-ci, on peut regrouper les acides aminés en trois classes : les acides aminés à chaîne latérale hydrophobe (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Met, Trp), les acides aminés à chaîne latérale chargée (Asp, Glu, Lys, Arg, His) ainsi que les acides aminés à chaîne latérale polaire (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr). Les différents acides aminés sont assemblés à la suite les uns des autres lors de la synthèse de la protéine par la formation de liens peptidiques entre la fonction aminé et la fonction carboxylique de chaque résidu. On appelle ainsi polypeptide l'assemblage linéaire de plusieurs acides aminés (voir figure 1) [85].

La conformation d'une protéine, sa structure tertiaire, est quant à elle déterminée par tous les angles que prennent les liens simples de la structure. Dans les organismes vivants, l'obtention de la structure tridimensionnelle spécifique native de la protéine permet l'activation de la fonction de cette dernière. Malgré le fait qu'il existe une infinité de combinaisons possibles des vingt acides aminés (jusqu'à présent, quelques 500 000 sé-

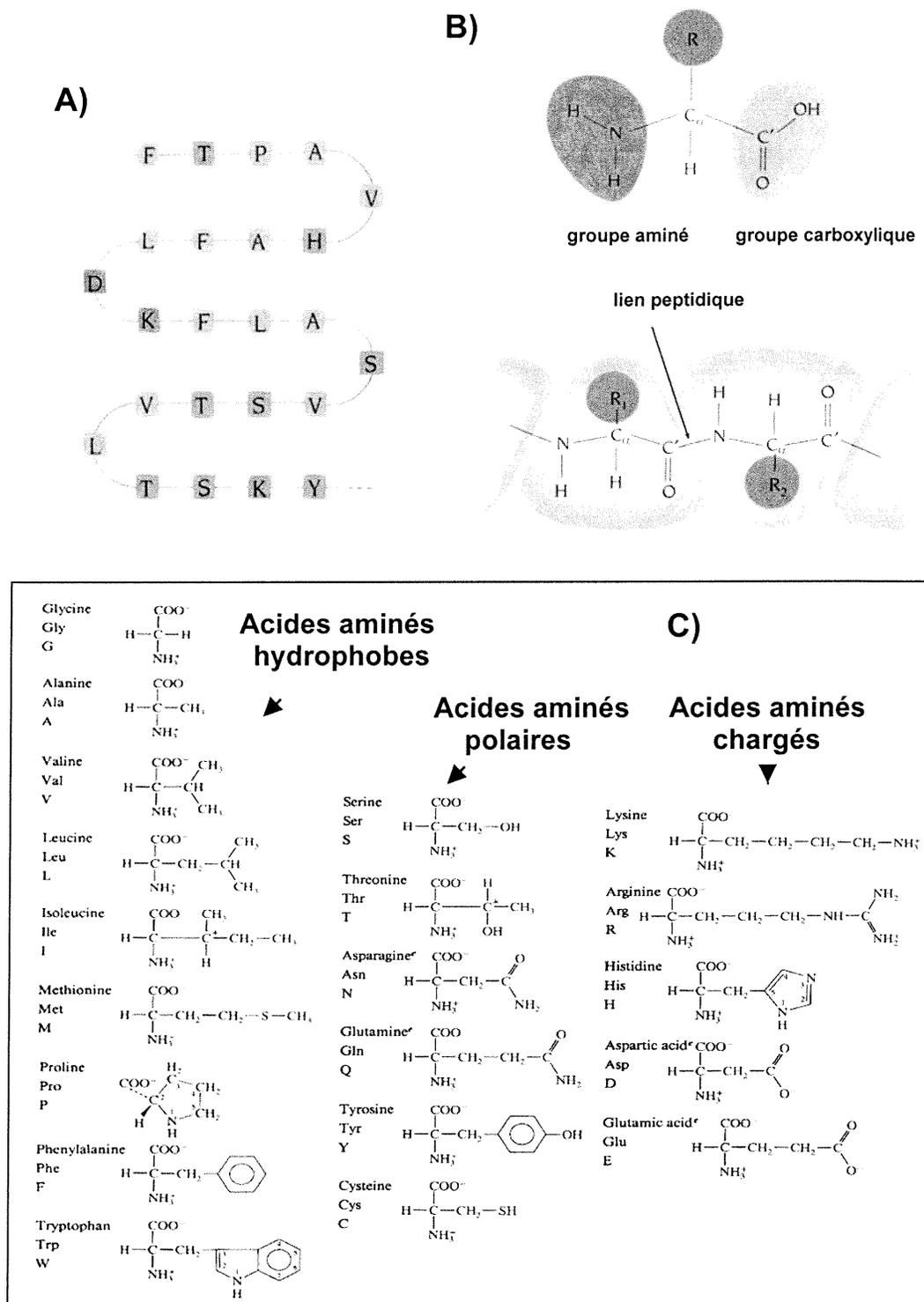


Figure 1 : Structure primaire ou covalente des protéines. A) Séquence linéaire d'acides aminés : le polypeptide [85]. B) Lien peptidique entre le groupe aminé et carboxylique permettant de lier les acides aminés . La chaîne principale (gris pâle) ainsi que les chaînes latérales (R gris foncé) y sont représentées [85]. C) Structures des 20 acides aminés classés selon la nature de leur chaîne latérale [86].

quences linéaires naturelles ont été déterminées) et que l'étude structurale de quelque 6000 protéines ait révélé une multitude de conformations distinctes, quelques traits caractéristiques structuraux propres aux chaînes polypeptidiques ont néanmoins pu être mis en valeur [85]. Dans un premier temps, l'intérieur des protéines apparaît comme étant en majorité constitué de résidus hydrophobes. La force motrice du repliement des protéines globulaires solubles semble donc consister en l'empaquetage des résidus hydrophobes à l'intérieur de la molécule laissant ainsi une surface moléculaire hydrophile et soluble. Toutefois, un problème majeur, relié à l'enfouissement des résidus hydrophobes dans la structure, consiste en la présence de la chaîne principale du polypeptide, hautement polaire et donc hydrophile, dans l'environnement immédiat de la chaîne latérale. Cette difficulté est résolue d'une manière élégante via la formation d'hélices α ainsi que de feuillets β , appelés structures secondaires, qui permettent de neutraliser l'effet hydrophile des fonctions aminés et carboxyliques de la chaîne principale via la formation de ponts hydrogènes entre ces dernières [85]. La grande majorité des structures protéiques sont en fait composées à partir de l'assemblage de ces différents motifs. On représente souvent les structures secondaires des protéines à l'aide d'une spirale (hélice α) et de flèches (brins de feuillets β) (voir figure 2). Dans la nature, certaines structures sont davantage représentées. Les séquences d'acides aminés sans homologie apparente entre elles mais qui adoptent des structures similaires sont regroupées en des superfamilles. On dit que deux protéines affectent la même topologie lorsqu'elles se composent des mêmes structures secondaires assemblées dans le même ordre.

Une des caractéristiques essentielles de la séquence primaire d'une protéine est qu'elle permet non seulement de déterminer la conformation finale du repliement mais également de retrouver celle-ci parmi une infinité d'autres conformations. Cette caractéristique fut pour la première fois mise en évidence par Anfinsen en 1973 suivant la découverte que de petites protéines peuvent être dénaturées *in vitro* de manière réversible [1] : le retour à l'état natif de la protéine, son état fonctionnel, pouvant se faire via le retrait du dénaturant chimique (pour une dénaturation chimique) ou par une diminution de la température (pour une dénaturation thermique). De nos jours, l'étude du repliement des

protéines procède encore via l'observation de la renaturation de la protéine suivant sa dénaturation par dénaturant, changement de pH ou température. Le nombre croissant de structures natives de protéines déterminées combiné à la mise au point de nombreuses techniques spectroscopiques sensibles et d'appareils de mixage rapide ont permis au cours des dernières années une véritable avancée dans l'étude des mécanismes de repliement des protéines.

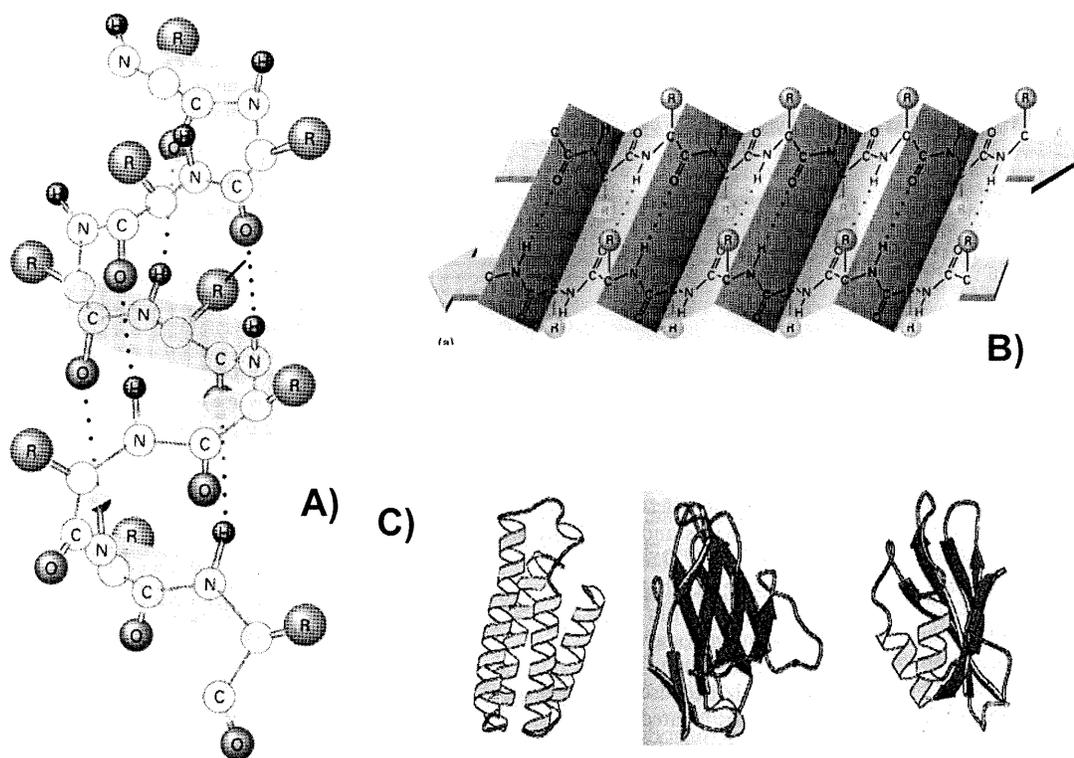


Figure 2 : Structures secondaires et tertiaires des protéines : A) l'hélice α , B) le feuillet β (tiré de [87]). Pour plus de simplicité, les chaînes latérales sont représentées par la lettre « R ». La formation des structures secondaires permet l'obtention de structures potentiellement hydrophobes en masquant les atomes hydrophiles de la chaîne principale. Ces motifs composent la majorité des structures protéiques. C) Exemples de structures protéiques tertiaires typiques (tiré de [88]). La représentation des hélices α et des brins β se fait respectivement à l'aide de spirales et de flèches.

1.1.2 Pourquoi étudier le mécanisme de repliement des protéines?

En 1968, Cyrus Levinthal pose les bases de son fameux paradoxe (paradoxe de Levinthal [2]) stipulant qu'une protéine, une fois synthétisée dans la cellule sous la forme d'une chaîne linéaire d'acides aminés, prendrait une éternité à trouver son état natif si elle ne biaisait pas sa recherche de l'état le plus stable. L'argument est simple: si chaque acide aminé peut adopter en moyenne 8 conformations, alors le nombre total de conformations pour une chaîne de 100 résidus s'élève à environ 8^{100} ce qui correspond à un ensemble beaucoup trop vaste pour permettre à une protéine de trouver, sans aide, son état natif dans un temps raisonnable. Ainsi, seule une recherche guidée peut permettre à une séquence d'atteindre rapidement sa forme finale. L'effort déployé par la communauté scientifique au cours des 30 dernières années dans l'étude du repliement des protéines fut ainsi dirigée vers l'élucidation du ou des mécanismes de repliement de ces chaînes linéaires d'acides aminés.

Bien que l'étude du mécanisme de repliement des protéines puisse être justifiée par la simple présence du paradoxe ainsi que par le pur plaisir que l'on éprouve à le confronter, beaucoup de domaines dépendent et bénéficient des études fondamentales effectuées dans cette discipline. On peut regrouper celles-ci sous trois thèmes de recherche:

1) Prédiction de structures à partir de la séquence linéaire d'acides aminés :

L'étude des contraintes qui forcent une séquence d'acides aminés à trouver rapidement sa structure native parmi une infinité d'autres permettra de mettre au point des algorithmes de recherche efficaces, basés sur des modèles simplifiés plus réalistes pour la prédiction de structures natives théoriques[3].

2) Design de nouvelles protéines: La caractérisation du rôle de chaque acide aminé d'une protéine fournit les outils essentiels au design rationnel de nouvelles protéines. Ex : protéines hyper stables (stables à hautes

températures), protéines solubles en solvants organiques, protéines perméables aux membranes plasmiques, protéines à nouvelles fonctions.

3) Compréhension des mécanismes biochimiques, maladies virales et génétiques et design rationnel de drogues : De plus en plus d'évidences suggèrent l'implication de changements conformationnels dans les processus de signalisation cellulaires : *Wasp*, *p21* ainsi que le facteur anti-sigma F1gM se replient de façon distincte en présence de leur partenaires de signalisation [4-6]. L'accumulation anormale en dépôt de certaines protéines fibrillaires (amyloïdes) endogènes ou infectieuses, associée à une anomalie de repliement, semble être à la base de nombreuses maladies dont l'Alzheimer, le Parkinson, la maladie d'Huntington ainsi que les encéphalopathies spongiformes transmissibles comprenant entre autres la maladie de la vache folle ainsi que la maladie de Creutzfeldt-Jakob pour n'en nommer que quelques unes [7]. La mutation d'un gène résulte quelques fois en une diminution de stabilité de la protéine qu'il encode causant ainsi une altération de sa fonction : le design rationnel de petites molécules stabilisant la structure mutée pourrait en théorie lui rendre sa fonction [8].

1.1.3 Comment étudier le mécanisme de repliement des protéines?

L'essence des études mécanistiques modernes sur le repliement des protéines consiste à déterminer la fonction et le rôle qu'occupe chaque résidu, chaque atome, d'une séquence d'acides aminés dans l'obtention de sa structure native. La procédure utilisée pour ce type d'expérience fait appel à la technique d'ingénierie de protéine qui permet l'expression recombinante de protéines mutantes par simple modification de l'ADN codant pour la protéine. Le rôle de chaque acide aminé peut être étudié en mesurant l'effet que produit le retrait d'un atome ou d'un petit groupe de sa chaîne latérale sur la stabilité des états natif, intermédiaire(s) (si présents) ainsi que sur la cinétique de repliement et de dépliement de la protéine (stabilité de l'état de transition de l'étape limitant) [9, 10]. Ceci

est effectué en remplaçant le résidu à l'étude par un acide aminé contenant un ou quelques atomes en moins que le premier. Ce type de mutation est mieux connu sous le nom de mutation non-disruptive [11]. Par exemple, un résidu leucine pourrait être varié en valine, alanine ou glycine ceci permettant le retrait successif de carbones de la chaîne latérale (voir figure 1C). L'importance cinétique d'un résidu peut être ainsi quantifiée à l'aide du ratio de la variation de l'énergie de l'état de transition de la réaction de repliement ($\Delta\Delta G^\ddagger$) sur celle de la forme native ($\Delta\Delta G^\ddagger/\Delta\Delta G$) suivant la mutation de l'acide aminé. Cette valeur, ϕ , généralement entre 0 et 1, donne une mesure de l'implication énergétique des atomes enlevés au sein de l'état de transition relativement à leur implication dans la forme native. Ainsi, pour un repliement sans intermédiaire, les résidus qui stabilisent autant l'état de transition que la forme native ont une valeur ϕ égale à 1. Ces derniers sont considérés comme formant toutes leurs interactions natives au niveau de l'étape limitant et donc acceptés comme étant les principaux acteurs dans la recherche de l'état final. Pour leur part, les résidus mutés qui n'ont comme seul effet que de déstabiliser la forme native sans affecter l'énergie de l'état de transition sont considérés comme n'ayant pas encore trouvé leur conformation native à l'étape limitant du repliement et donc comme ne participant pas au mécanisme de repliement. Ces derniers affectent ainsi une valeur de ϕ nulle.

1.1.4 Nature de la présente étude

La question posée dans la présente recherche est la suivante : est-ce que des protéines de structure similaire (même topologie) mais possédant des séquences d'acides aminés différentes (membres d'une superfamille) se replient selon le même mécanisme? À partir des résultats obtenus du laboratoire de H. Roder concernant le mécanisme de repliement de l'ubiquitine [12, 13], une protéine de 76 acides aminés contenant un feuillet β de cinq brins associé à une hélice α , nous avons voulu voir si le DLR de Raf, structurellement similaire à celle-ci mais possédant une homologie de séquence d'acides aminés de seulement 11% (8 acides aminés communs aux deux séquences), se replie via un mécanisme semblable. Les résultats tirés du laboratoire de Roder suggèrent la

formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe venant ainsi appuyer le modèle de repliement à trois états où la formation d'un intermédiaire stabilisé principalement par des contacts hydrophobes viendrait réduire l'espace conformationnel tôt lors du repliement de la protéine [12, 13]. Toutefois, l'interprétation de ces résultats nous plonge au coeur d'une controverse concernant la pertinence du mécanisme de repliement via l'intermédiaire hydrophobe - ce dernier modèle ayant essuyé de nombreuses critiques surtout depuis la mise à jour de nombreuses protéines se repliant via un mécanisme à deux états. Ainsi, la question spécifique posée dans ce travail, pour étudier la relation "topologie native / mécanisme de repliement" consiste à savoir si les résultats portant sur le repliement du DLR de Raf suggèrent également la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe.

1.2 État des études actuelles : expériences et théories

Suivant la formulation du paradoxe de Levinthal (voir plus haut "**Pourquoi étudier le mécanisme de repliement des protéines?**"), il devenait donc logique de stipuler que le repliement des protéines devait procéder via des voies définies de manière à simplifier la recherche de l'état le plus stable dans l'espace conformationnel. Deux modèles furent particulièrement populaires dans les années 70 et 80 pour rationaliser la stratégie de recherche de l'état natif : 1) le modèle "framework" ou diffusion-collision [14-17] ainsi que 2) le modèle de l'intermédiaire hydrophobe ("hydrophobic-collapse") [18, 19]. Puisque la majorité des protéines étudiées à cette époque exhibaient des intermédiaires apparents dans leur cinétique de repliement, il fut assumé que la présence de ceux-ci permettait sans doute de réduire l'espace conformationnel de recherche. Le tableau I retrace les principales étapes mécanistes de ces deux modèles.

Cependant, en 1991, la caractérisation du repliement rapide de CI2, une petite protéine de 64 acides aminés, montra, pour la première fois, qu'une protéine pouvait se replier sans la présence apparente d'intermédiaires [20, 21]. Ceci permit de simplifier la problématique du mécanisme de repliement en un modèle à "deux états" ("deux états" faisant référence au fait que l'on ne distingue que deux états durant la réaction de

repliement : l'état dénaturé ainsi que l'état natif -voir Fig. 3). Ainsi, les études sur le mécanisme de repliement de CI2 portèrent alors leur attention sur la caractérisation de l'état de transition,

TABLEAU I : Description sommaire des modèles « framework » et à intermédiaire hydrophobe pour le repliement des protéines.

Modèle « framework » ou Diffusion-collision	Modèle de l'intermédiaire hydrophobe
Formation indépendante de structures secondaires locales.	Formation rapide d'un état compact autour des résidus hydrophobes
Diffusion de ces structures, collision entre elles et association pour donner la structure tertiaire.	Réarrangement structural à partir de cet état à espace conformationnel réduit.

l'étape limitant de cette réaction à deux états (voir théorie de l'état de transition [22]). À l'aide de la technique d'ingénierie de protéines (voir plus haut : **comment étudier le mécanisme de repliement des protéines?**), le groupe d'Alan Fersht caractérisa l'état de transition du repliement de cette protéine au niveau de l'importance de chaque acide aminé dans la séquence [23]. Il mit ainsi à jour de nouvelles évidences expérimentales permettant de proposer un modèle de repliement appelé nucléation-condensation ou nucléation étendue [24]. Depuis, plus d'une vingtaine de protéines se repliant rapidement par un mécanisme à deux états furent mises en valeur [25] et le rôle des intermédiaires dans la recherche de l'état natif des petites protéines est devenu un sujet de vives controverses [26, 27].

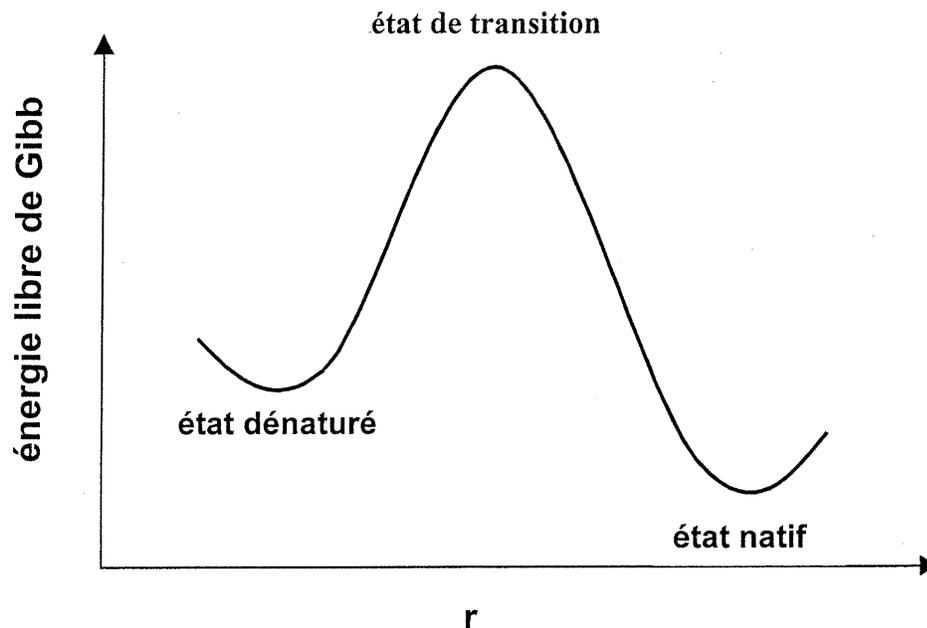


FIGURE 3 : Profil énergétique des états natif, dénaturé et de transition pour un modèle de repliement à deux états (exemple :CI2). r représente le déroulement du repliement de la protéine.

1.2.1 Le mécanisme de nucléation-condensation ou nucléation étendue

En déterminant la valeur ϕ de chaque résidus de la protéine (voir : “ **Comment étudier le mécanisme de repliement des protéines** ”), l'équipe du Dr. Fersht démontra que la formation des structures tertiaires et secondaires de CI2 se produit de façon parallèle lors du repliement [23]. Cette observation fut également appuyée par l'étude détaillée de la structure de fragments, plus ou moins grands, de la protéine qui ne présentèrent aucune formation de type natif sous les conditions normales de repliement [28, 29]. Finalement, l'étude de la forme dénaturée par RMN sous diverses conditions montra que CI2 se replie à partir d'un ensemble conformationnel dénudé de presque toute structure native [30].

D'après l'analyse des valeurs de ϕ pour CI2, il fut montré que la protéine se replie à partir d'un noyau ("nucleus") composé d'une région structurale continue, une hélice α , puis d'interactions de type natif provenant de régions distantes au niveau de la séquence. Ces résidus ont en commun une valeur ϕ élevée tout en étant contigus l'un à l'autre au sein de la structure native. L'utilisation du terme "nucléation étendue" fait référence au fait que les résidus à l'extérieur du noyau participent également à la stabilisation de l'état de transition, leur valeur ϕ diminuant à mesure qu'ils s'éloignent, structurellement, du noyau. On peut ainsi imaginer l'état de transition comme ressemblant à une forme native expansée et tordue dont le niveau de densité (inaccessibilité au solvant) augmente à mesure que l'on s'approche du noyau (voir figure 4). Enfin, l'expression "nucléation-condensation" illustre bien le mécanisme du modèle : la formation du noyau enchaînant avec la condensation de la structure tertiaire vers la forme native. Le tableau II résume les principaux résultats expérimentaux qui menèrent à la formulation du modèle de nucléation-condensation.

TABLEAU II : Résumé des évidences expérimentales amenant à la formulation de la théorie de nucléation-condensation tirées de l'étude de CI2

Évidences expérimentales	Apport au modèle
Absence d'accumulation d'intermédiaires	Études portées sur l'état de transition (étape limitant) pour résoudre le mécanisme de repliement de la protéine.
Les résidus qui stabilisent le plus l'état de transition sont adjacents structurellement dans la conformation native mais éloignés dans la séquence linéaire d'acides aminés.	Étape limitant : formation d'un noyau de type natif.
Au niveau de la structure native, plus on s'éloigne du noyau, moins les résidus sont impliqués dans la stabilisation de l'état de transition	L'état de transition ressemble à l'état natif étendu, ouvert dont la densité diminue allant du noyau vers l'extérieur.
Énergie de stabilisation des structures secondaires et tertiaires dans l'état de transition significativement plus basse que dans l'état natif.	Formation en parallèle des structures secondaires et tertiaires.

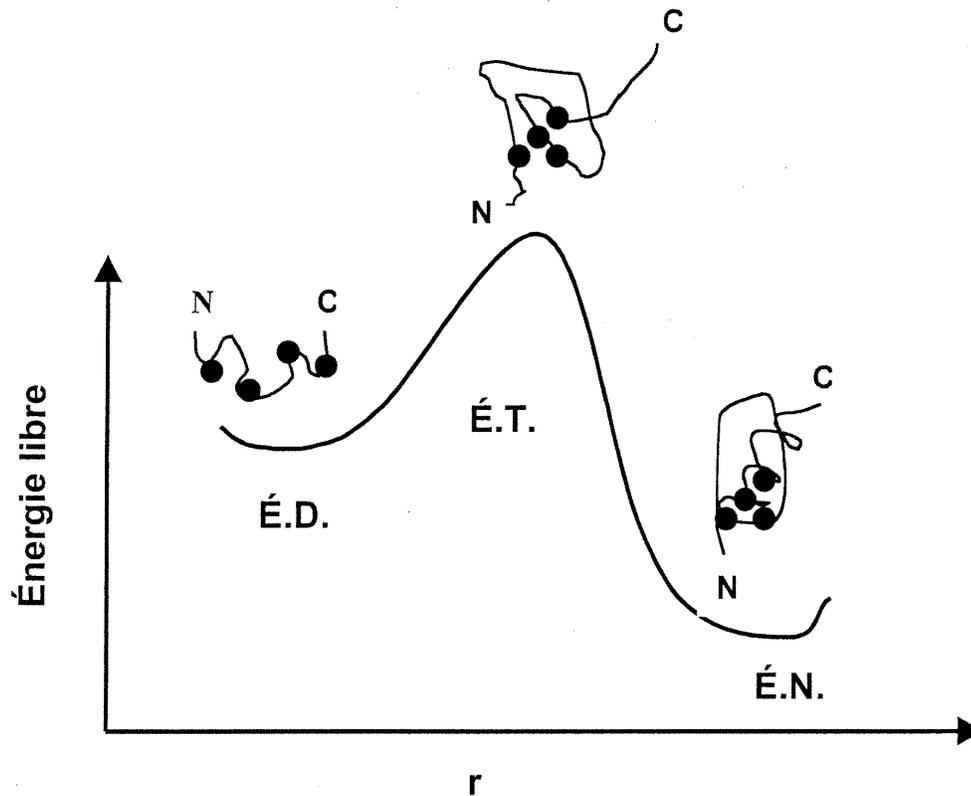


FIGURE 4 : Profil énergétique et mécanisme de « nucléation condensation » pour une protéine se repliant via deux états. Les cercles noirs représentent les résidus impliqués dans le noyau (résidus à valeur de ϕ élevée). L'état de transition (É.T.) affecte une forme native expansée et tordue dont le niveau de densité augmente à mesure que l'on s'approche du noyau . À noter l'assemblage de type natif du noyau lors de l'état de transition ainsi que la contiguïté de ces derniers au sein de la structure native (É.N.).

Il est intéressant de mentionner que de manière indépendante et presque simultanément, des simulations théoriques de repliement, basées sur des modèles simplifiés en treillis ("lattice simulation"), montrèrent que la formation d'un noyau spécifique étendu représente le mécanisme de repliement le plus efficace pour le repliement rapide de petites protéines [31].

Toutefois, toutes les protéines ne se replient pas qu'à partir d'un noyau étendu comme c'est le cas pour CI2. La protéine barnase, 103 résidus, étudiée également dans le laboratoire de Alan Fersht, se replie via un intermédiaire rapide, attribué à la préformation

de domaines structuraux (structures secondaires)[32]. Pour barnase, l'étape limitant du repliement consiste donc en une association de ces éléments de structures secondaires. Beaucoup de résidus sont alors fortement impliqués dans la stabilisation de l'intermédiaire ainsi que dans celle de l'état de transition (la valeur ϕ de ses résidus étant proche de 1). Cependant, les boucles reliant les différents éléments préformés, ne trouvent leur conformation finale qu'après l'état de transition : les résidus de ces dernières affectent ainsi une valeur ϕ nulle lorsque mutés. Ainsi, pour barnase, la stabilisation de l'intermédiaire et de l'état de transition se fait fortement via un grand nombre de résidus tandis que d'autres acides aminés ne participent tout simplement pas à la réduction de l'espace conformationnel de recherche. On se souviendra que l'état de transition de CI2, moins polaire que celui de barnase (résidus stabilisant fortement ou pas du tout), montre une belle gradation des valeurs ϕ allant de fortes, aux environs du noyau, à faible en s'éloignant de celui-ci.

Depuis les études effectuées sur CI2 et barnase, le repliement d'une dizaine de protéines fut caractérisé au niveau de l'implication de ces résidus dans la recherche de l'état natif (détermination des valeurs ϕ): certaines d'entre elles montrant un état de transition plus polaire, comme barnase, d'autres, davantage gradué, comme CI2 [11]. Jusqu'à présent, peu de généralités ont pu être tirées de l'analyse comparative de ces différents états de transition. Un certain fossé reste ainsi à franchir avant de pouvoir comprendre et traduire les stratégies de recherche de l'état final, utilisées par la nature, en algorithmes de recherche efficaces pour la prédiction de structures théoriques. Existe-t-il autant d'états de transition que de protéines? Est-il possible de prédire la position des résidus du noyau stabilisant l'état de transition à partir de la structure native d'une protéine? à partir de la séquence d'acides aminés? L'usage de modèles simplifiés peut-il reproduire de façon satisfaisante la subtilité conformationnelle et fonctionnelle de chaque acide aminé ? Autant de questions nous séparent encore du but fixé. Toutefois, dernièrement, une lueur de simplicité vint éclairer le regard posé sur la problématique. La mise au point d'une approche basée sur le concept de librairie mit en valeur la flexibilité d'une séquence pour l'obtention d'une structure suggérant ainsi que le mécanisme de repliement est relativement insensible aux détails des interactions inter atomiques.

1.2.2 La topologie native d'une protéine détermine en grande partie sa vitesse et son mécanisme de repliement

En 1995, le groupe dirigé par David Baker mit au point un essai de sélection basé sur le système de "phage display" [33, 34] permettant de récupérer d'une librairie de séquences codages dégénérées des protéines hautement mutées se repliant en une structure spécifique [35]. Bien que les mutants sélectionnés de la librairie pour deux types de protéines (domaine SH3 et protéine L) montrèrent tous une stabilité inférieure à la séquence de type sauvage, leur vitesse de repliement fluctua autour de la séquence parentale : la moitié des mutants se repliant plus rapidement, l'autre moitié plus lentement que celle-ci [36, 37]. Ces résultats suggèrent que la vitesse de repliement ne semble pas avoir été amplement optimisée par sélection naturelle puisqu'un moyen de sélection sans biais pour la vitesse de repliement (liaison à un ligand) a permis de mettre à jour des protéines mutantes se repliant plus rapidement que la séquence naturelle. Il semble donc que le mécanisme de repliement de ces deux protéines ne dépend pas de manière importante de la séquence d'acides aminés puisqu'une large perturbation de celle-ci a peu d'effet sur la vitesse de repliement.

Parallèlement aux études menées à partir de librairies, la comparaison des vitesses de repliement de protéines naturelles provenant de la même famille mena à des conclusions similaires. Par exemple, bien que les membres mésophile, thermophile ainsi que hyperthermophile de la famille de protéines de choc ("cold shock proteins") de *bacillus* (CspB) démontrent une grande différence de stabilité, leurs vitesses de repliement demeurent la même ainsi que le degré de compaction de leur état de transition (voir chapitre 4 « **degré de compaction de l'état de transition** » [38]. Même constat pour la famille des domaines SH3 [39-41]. Avec une résolution supérieure, les états de transition de deux homologues naturels du domaine SH3 (Src et spectrine) ainsi que ceux des protéines structurellement similaires, l'acylphosphatase musculaire (Acp) ainsi que le domaine d'activation de la procarboxypeptidase (Adah2) furent caractérisés par ingénierie de protéine. Malgré une homologie entre les domaines SH3 de seulement 30% ainsi qu'une homologie de séquence primaire aussi basse que 13% entre Acp et Adah2, il fut démontré que l'état de transition pour des structures similaires est similaire [42]. Combinées aux travaux effectués à partir des librairies dégénérées, les études menées

auprès d'homologues naturels et structurels suggèrent que la topologie des protéines est un facteur déterminant pour la vitesse et le mécanisme de repliement des protéines.

En reprenant un argument récent d'Alan Fersht [43], l'implication déterminante de la topologie dans le mécanisme de repliement chez les protéines découle de la nature même de l'état de transition. En effet, le modèle de nucléation étendu décrit l'état de transition comme ressemblant à l'état natif ouvert et tordu. Ainsi, il est à prédire que des protéines ayant des structures tertiaires similaires aient également des structures d'état de transition semblables et donc, le même mécanisme de repliement. Toutefois, cette relation "topologie native / mécanisme de repliement" demeure relativement peu vérifiée expérimentalement. Il est à mentionner que les mutants tirés des études de bibliothèques dégénérées conservent encore une homologie de la séquence primaire de plus de 50%, tandis que les homologues naturels de la famille CspB affectent une homologie de séquence de plus de 80%. Seules les études de repliement menées sur les domaines SH3 et les protéines Adah2 et AcP, par leur faible homologie de séquences (respectivement 30% et 13% d'homologie de la séquence), permettent vraiment de mitiger l'implication de la spécificité des acides aminés dans la recherche de l'état natif pour une structure donnée. Davantage d'études portant sur le repliement de protéines structurellement similaires aux séquences fortement distinctes sont ainsi requises dans le but d'approfondir cette relation "topologie native / mécanisme de repliement".

1.2.3 La formation rapide d'intermédiaire hydrophobe

La découverte de nombreuses protéines se repliant par un mécanisme à deux états a conduit à une remise en question, au cours de la dernière décennie, de l'importance des intermédiaires dans la recherche de l'état natif des petites protéines globulaires. En fait, la nature du débat consiste à déterminer si la formation d'états compacts, observée dans le temps de mixage de l'appareil lors d'expériences de repliement de plusieurs protéines, contribue à réduire l'espace conformationnel de recherche de manière à guider la séquence plus rapidement vers sa forme native [44-48]. On suspecte la présence d'intermédiaires

hydrophobes lorsqu'une perte significative de signal spectroscopique dans le temps mort de l'appareil de mixage est corrélée à une déviation négative de la vitesse de repliement d'un modèle à deux états à basse concentration de dénaturant (voir figure 5). L'interprétation du modèle à intermédiaire hydrophobe rationalise la non-dépendance de la vitesse de repliement au dénaturant (déviations négatives) en stipulant qu'elle découle de la nature même de la transition "intermédiaire hydrophobe → forme native" : l'atteinte de l'état de transition suivant l'intermédiaire hydrophobe étant insensible au solvant vu le degré de compaction avancé de ce dernier (voir chapitre 4 « **niveau de compaction de l'état de transition** »).

Les premiers arguments qui vinrent mettre en doute le rôle des intermédiaires hydrophobes découlent de la formulation du modèle de nucléation-condensation [45]. Il fut raisonné que l'accumulation d'intermédiaires, précédant l'étape limitant du repliement des petites protéines, n'aurait pas les avantages escomptés d'un point de vue cinétique mais bien un effet déstabilisant pour la forme native. En effet, la formation de structures stables de type natif avant l'état de transition limitant n'aurait pas pour effet de diminuer la barrière d'activation du repliement : les interactions présentes dans l'état de transition étant également présentes dans l'état intermédiaire. En fait, la formation de structures stables avant l'étape limitant du repliement réduirait plutôt la stabilité finale de la protéine. On rationalise cet effet par la diminution du nombre d'interaction stabilisantes formées suite à l'état de transition résultant ainsi en une diminution de l'énergie d'activation du dépliement de la protéine. De plus, la formation très rapide d'une structure compacte aurait sans doute comme conséquences d'entraîner la formation d'interactions non natives (intermédiaire cul-de-sac) qui auront à être brisées ultérieurement pour permettre le bon repliement de la séquence. Le cas extrême d'une formation d'intermédiaires « cul-de-sac » est représentée à la figure 6 par un mouvement rapide des protéines vers la gauche dans le profil de la réaction de repliement : le repliement correct de ces intermédiaires ne pouvant se produire que par un retour à la forme dénaturée par le bris des interactions de type non-natif (voir figure 6). Ces observations furent appuyées par des simulations théoriques qui montrèrent que le repliement de modèles simplifiés est généralement plus rapide et la forme native plus stable sans la présence d'intermédiaires [50, 51].

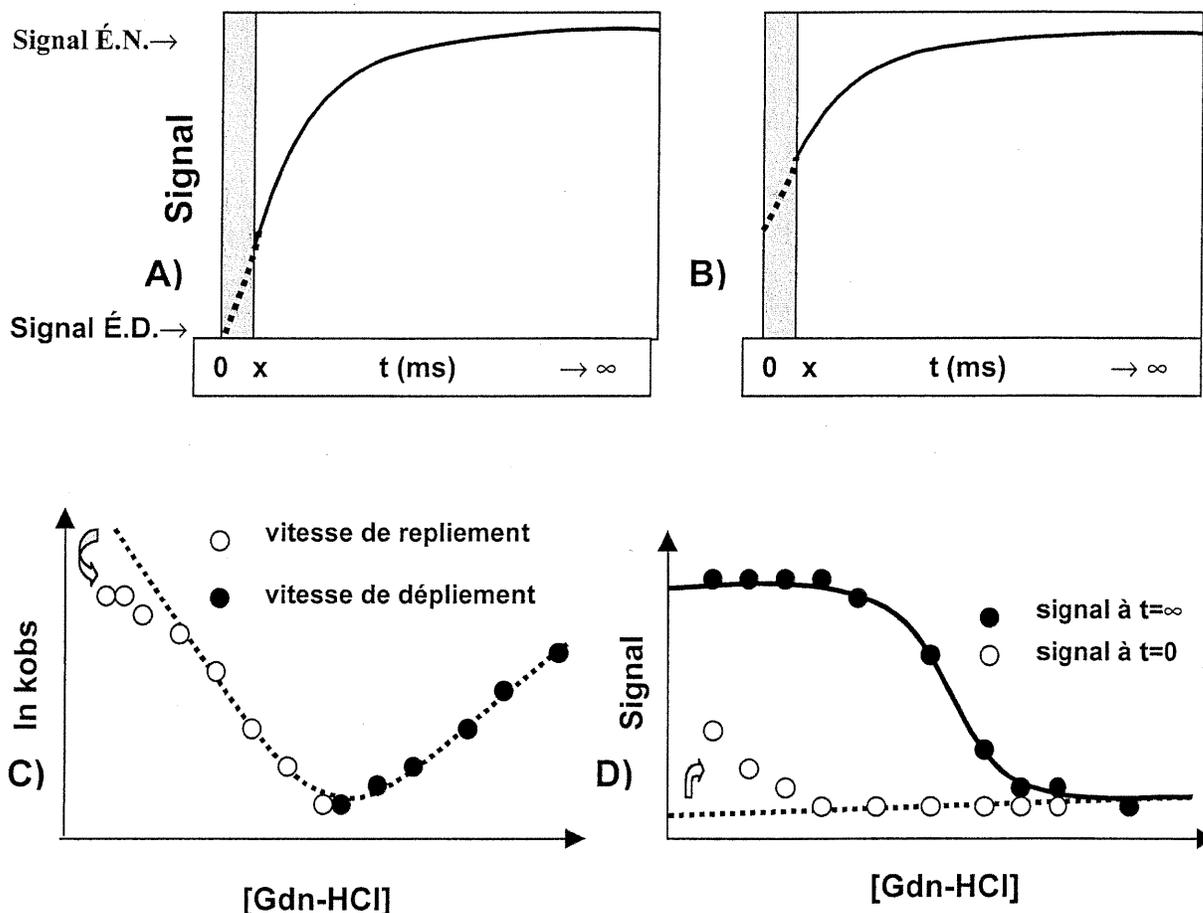


FIGURE 5 Corrélation entre la déviation négative de la vitesse de repliement et l'apparition d'un signal natif dans le temps mort de l'appareil de mixage à basse concentration de dénaturant suggérant la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe. A) Trace cinétique typique d'une transition à deux états : le retour du signal de la protéine native (Signal É.N.) se fait via une exponentielle simple à partir du signal attendu de l'état dénaturé (Signal É.D.). La région ombrée correspond au temps mort de l'appareil de mixage (0 à x ms); la ligne pointillée représente l'extrapolation de l'exponentielle au temps initial de la réaction. B) Trace cinétique typique d'une transition suggérant la présence d'un intermédiaire hydrophobe. Le retour du signal de la protéine native (Signal É.N.) se fait via une exponentielle simple à partir d'un signal initial plus élevé que celui de l'état dénaturé (Signal É.D.) . C) Courbe de chevron illustrant la déviation négative du logarithme naturel de la vitesse de repliement d'une protéine ($\ln k$) d'un système à deux états (ligne pointillée). D) Signal initial du repliement extrapolé au temps initial (O) plus élevé que celui de la forme dénaturée (ligne pointillée) à basse concentration de dénaturant. La ligne noire montre l'intensité du signal final de la transition et correspond à la courbe d'équilibre du système (voir [48]).

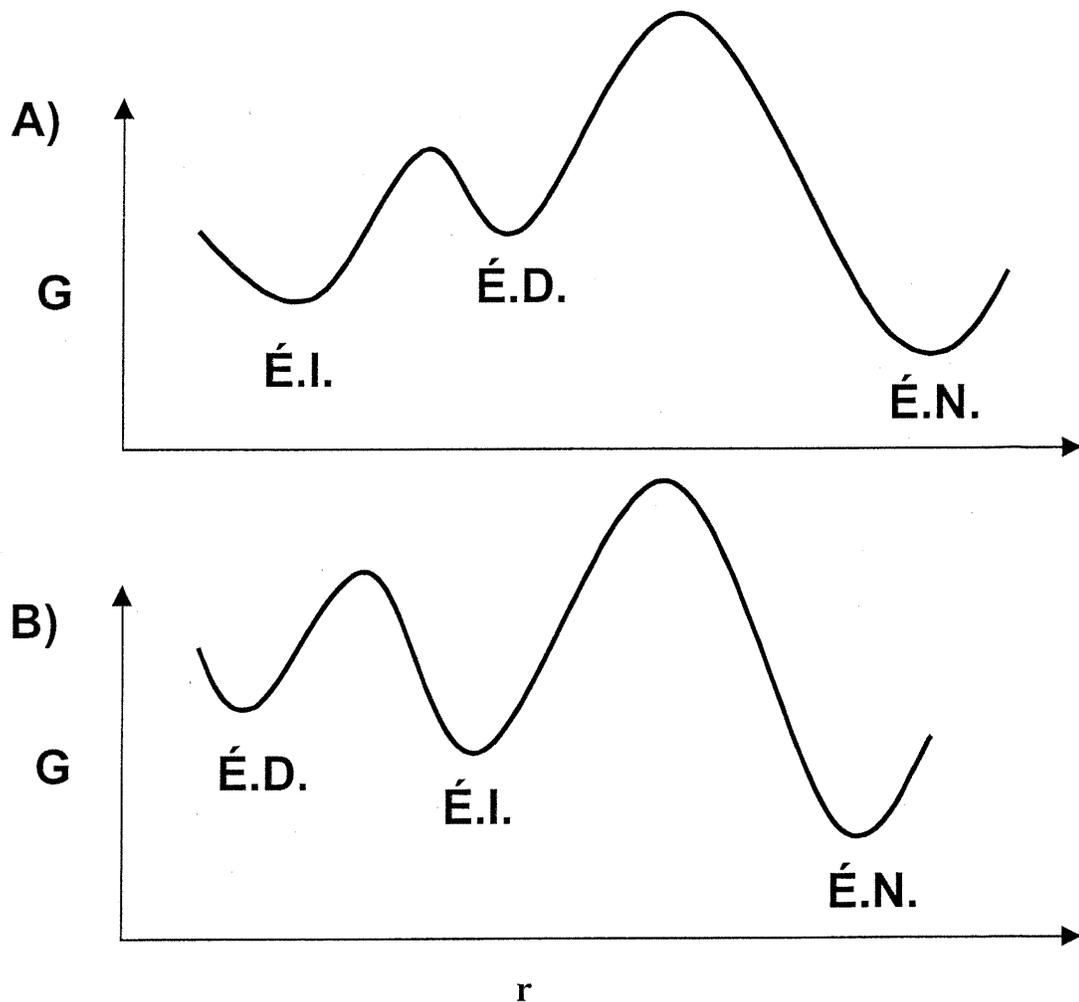


Figure 6 : Comparaison des profils énergétiques des réactions de repliement comprenant (A) un intermédiaire de type « cul-de-sac » ou (B) un intermédiaire de type obligatoire. « G » représente l'énergie libre de Gibbs tandis que « r » montre la progression du repliement. A) La formation rapide d'intermédiaires « cul-de-sac » suivant le transfert rapide de la protéine dénaturée vers un environnement natif est représentée à la figure 6 par un mouvement rapide des protéines vers la gauche dans le profil de la réaction de repliement. B) Dans un modèle à trois états (ex : intermédiaire hydrophobe) la formation de l'intermédiaire est obligatoire pour l'obtention de la conformation native finale.

Du côté expérimental, des évidences montrèrent la nature “ cul-de-sac ” de certains intermédiaires [52, 53] tandis que d'autres permirent d'associer le changement rapide de signal en D.C. à un simple artefact. C'est le cas pour l'apparition de signal en D.C. de type natif dans le temps de mixage de la réaction de repliement de la ribonucléase A qui fut, dans un premier temps, attribuée à la présence d'un intermédiaire obligatoire avant d'être finalement associée à l'effet du changement rapide de la concentration de dénaturant sur la forme dénaturée [54].

Toutefois, d'autres études, à l'inverse, tendent à démontrer la spécificité ainsi que l'importance de la formation rapide des intermédiaires hydrophobes lors de la recherche de l'état le plus stable. Au niveau de la spécificité de l'intermédiaire, l'apparition de structures secondaires de type natif fut observée à l'aide d'expériences cinétiques en D.C. dans le temps de mixage de l'appareil (<1ms) [55-57]. La formation rapide d'une structure compacte possédant une intensité de fluorescence de type natif fut identifiée par des expériences cinétiques de fluorescence [12, 58-60]. Certaines expériences de marquage par échange d'hydrogène (“ hydrogen-exchange labeling ”) sur les premiers événements du repliement de protéines montrant la formation rapide d'un intermédiaire mirent en évidence la formation de structures de type natif [60-62]. Le faible niveau de protection de la majorité des protons amines (absence de ponts hydrogènes) pour plusieurs de ces intermédiaires rapidement formés suggéra la nature hydrophobe des premiers événements [63-65]. De façon plus directe, la mise au point d'appareils de mixage haute vitesse a permis de résoudre la phase associée à la formation de certains intermédiaires. Ainsi, dans le cas du repliement du domaine B1 de la protéine G et du cytochrome c, il fut montré que l'intermédiaire se formait via un état de transition beaucoup trop haut en énergie pour représenter un simple phénomène de diffusion non spécifique [66, 67]. Finalement, des études d'ingénierie de protéine vinrent établir, dans le cas de l'ubiquitine, une corrélation positive entre la stabilité de l'intermédiaire et la vitesse de repliement de la protéine. À une fin comparative, le tableau III résume les diverses évidences expérimentales mettant en lumière la nature de la controverse entourant l'importance de la formation rapide des intermédiaires hydrophobes [13].

TABLEAU III : Évidences expérimentales soutenant la nature « cul-de-sac » ou « artefact » des intermédiaires contre celles soutenant la nature obligatoire des intermédiaires pour diverses protéines.

Évidences pour la présence d'intermédiaires de type « cul-de-sac » ou artefact.	Évidences pour intermédiaires obligatoires
Apparition de signaux de type natif (D.C., fluorescence) dans le temps mort de l'appareil de mixage attribué au changement de solvant.	Apparition de signaux de type natif dans le temps mort de mixage (< 1ms) en fluorescence et D.C..
Présence d'interactions non natives au sein de l'intermédiaire.	Présence de ponts hydrogènes spécifiques décelée par RMN pour certains intermédiaires (expériences d'échange d'hydrogène).
L'absence d'intermédiaires augmente la vitesse de repliement lors de simulations théoriques de modèles simplifiés en treillis.	Corrélation positive entre la stabilité de l'intermédiaire et la vitesse de repliement de la protéine.
	Barrière limitant de la phase rapide trop haute en énergie pour représenter un phénomène de diffusion non spécifique.

N.B. Ce tableau présente un sommaire représentatif d'évidences tirées de l'étude de différentes protéines. Il n'est présenté au lecteur qu'à titre indicatif dans le but d'illustrer la nature de la controverse entourant la présence des intermédiaires rapides.

1.3 Objectif de la présente étude : Étude du mécanisme de repliement du DLR de Raf.

L'intérêt lié à l'étude du mécanisme de repliement du DLR de Raf provient avant tout du fait qu'elle nous permet de confronter deux grands courants de pensée actuels dans le domaine du repliement de protéine. Dans un premier temps, si la relation " topologie native / mécanisme de repliement " permet de généraliser le concept de noyau étendu comme état de transition à l'ensemble des protéines (voir section 1.1.2), alors le

mécanisme de repliement du DLR de Raf devrait être similaire à celui de l'ubiquitine. Toutefois, le mécanisme de repliement de l'ubiquitine semble procéder via la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe spécifique, mécanisme controversé (voir section 1.1.3) [12, 13, 48]. Ainsi, il sera intéressant de voir si le repliement du DLR de Raf, tout comme l'ubiquitine, procède également via la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe.

1.3.1 Critères de sélection du DLR de Raf

Dans le but d'éprouver l'hypothèse soutenant la corrélation " topologie native / mécanisme de repliement " (voir section 1.2.2) chez la superfamille de l'ubiquitine, il s'avère important d'étudier le repliement d'une protéine très proche structurellement de l'ubiquitine mais dont la séquence d'acides aminés est, le plus possible, différente. Une recherche dans la banque de données FSSP mise au point par Holm et *al.* au laboratoire Européen de biologie moléculaire (EMBL) permet d'identifier les structures connues qui affectent la plus grande homologie structurelle avec l'ubiquitine par alignement de matrices de distances [68]. Quatre critères furent pris en considération pour la sélection de la protéine à étudier : le % d'identité entre les deux séquences d'acide aminé (< 15 %), l'écart à la moyenne des déviations de distances entre les carbones α correspondants des structures comparées (" RMSD " < 2,5 Å), le nombre d'acides aminés alignés (> 90%) ainsi que la présence d'un tryptophane pour permettre les études de fluorescence. Seul le Domaine Liant Ras de Raf répond à toutes ces conditions avec un " RMSD " de 2,2 Å pour 68 résidus, seulement 8 acides aminés conservés sur 76 tout en ayant un tryptophane largement enfouit au sein du coeur hydrophobe de la protéine. Ce domaine fut identifié récemment comme étant la région minimale de Raf, une protéine de 627 acide aminés, permettant de lier ras, une protéine clef dans une voie de signalisation permettant la prolifération cellulaire ainsi que la différenciation terminale d'une cellule [69-71]. La structure de ce domaine a été résolu en solution par RMN [72].

Comme l'ubiquitine, la structure du DLR de Raf est composée d'un feuillet β de cinq brins (une paire parallèle : brins 1 et 5 et trois autres antiparallèles : brins 1 et 2, 3 et 4, et 3 et 5), d'une hélice α de douze acides aminés située entre les brins 2 et 3 (résidus 78 à 89) ainsi qu'un petit tour d'hélice additionnel situé juste avant le dernier brin (résidus 118-121) (voir Figure 7). Seule la boucle reliant les feuilletts 3 et 4 du DLR de Raf se distingue de la structure de l'ubiquitine: la première affectant 7 résidus de plus que la deuxième (voir Figure 7). Le DLR de Raf existe sous la forme d'un monomère en solution tel que confirmé par son profil d'élution sur colonne d'exclusion ainsi que par l'étroitesse de ses pics sur un spectre RMN de protons. De plus, l'absence de ponts disulfure, de métaux ou de tout autre co-facteur externes fait du DLR de Raf un excellent modèle pour l'étude du repliement de protéine. Notons la présence de deux prolines au sein de la structure (dont une conservée chez l'ubiquitine) affectant chacune la conformation la plus stable (*trans*).

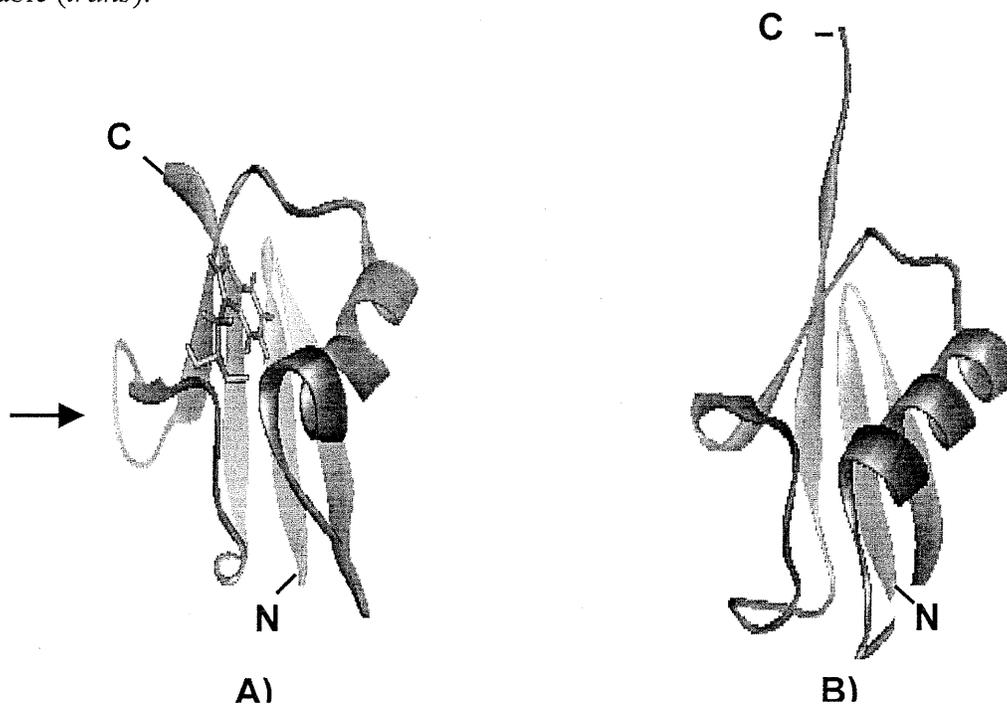


FIGURE 7: Structure du DLR de Raf (résidus 55 à 132) [72] (a) ainsi que de l'ubiquitine [84] (b). Le tryptophane (résidus 114) ainsi que les 7 résidus additionnels de la boucle du DLR de Raf (flèche) ont été mis en valeurs. Les extrémités amino-terminale (N) et carboxy-terminale (C) sont mises en valeur. La représentation des structures a été réalisé à l'aide du logiciel Molscript.

1.3.2 Évidences expérimentales suggérant l'importance de la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe pour le repliement de l'ubiquitine

Malgré le fait que l'on ne connaisse pas encore l'importance de la participation de chaque acide aminé dans la stabilisation de l'état de transition pour l'ubiquitine, quelques résultats suggèrent néanmoins l'importance de la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe pour atteindre rapidement l'état natif de cette protéine. Dans un premier temps, l'étude du repliement de la protéine à 25 °C a révélé une corrélation entre la déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états avec la disparition d'un signal de fluorescence dans le temps mort de l'appareil à faible concentration de dénaturant (transition très rapide)[12]. Le retour à un système de repliement à deux états à 8 °C sans perte de signal au temps zéro de la réaction de repliement suggère la nature hydrophobe de l'événement rapide observé dans le temps mort à 25 °C, l'énergie des contacts hydrophobes étant réduite à basse température. Toutefois, bien que la présence de l'intermédiaire ne soit pas remise en doute, son importance quant à la réduction de l'espace conformationnel de recherche de l'état natif reste à démontrer.

C'est à l'aide de la technique d'ingénierie de protéine que l'équipe du Dr. Roder corrobore la thèse du modèle à trois états pour le repliement de l'ubiquitine. En remplaçant l'acide aminé enfouit au centre de l'hélice α par des résidus à différent contenu hydrophobe (différents acides aminés ayant des chaînes latérales distinctes - type sauvage :Val; mutations : Ile, Leu, Ala et Gly), cette équipe mis en lumière une corrélation positive entre la vitesse de repliement, la stabilité de l'intermédiaire ainsi que la stabilité de l'état natif [13]. Cela suggère ainsi que l'intermédiaire est stabilisé par des contacts de type natif et que sa stabilisation augmente la vitesse de repliement de la protéine.

1.3.3 Démarche scientifique et questions spécifiques

L'hypothèse de la présente étude étant que le DLR de Raf devrait se replier selon le même mécanisme l'ubiquitine, nous modèlerons notre investigation à partir des études paru sur le repliement de celle-ci (voir sommaire du mécanisme de repliement de l'ubiquitine plus haut section 1.3.2). Les questions spécifiques posées pour l'étude du mécanisme de repliement du DLR de Raf seront ainsi :

Comme pour l'ubiquitine,

- 1) Observe-t-on à 25 °C une déviation de la linéarité de la courbe de chevron à basse concentration de dénaturant pour le repliement du DLR de Raf corrélé à une disparition de signal dans le temps mort de l'appareil suggérant la présence d'un intermédiaire rapide ?
- 2) Observe-t-on un retour de la linéarité de la courbe de chevron suite à une diminution de température suggérant ainsi la nature hydrophobe de l'intermédiaire?

Avant d'entreprendre l'étude cinétique du repliement du DLR de Raf, certains contrôles doivent être effectués. En ce sens, le **chapitre 2** présente la caractérisation de l'état renaturé du DLR de Raf par RMN précédée par la caractérisation fluorométrique de l'état dénaturé et natif du domaine. Le **chapitre 3** présente quant à lui l'étude de la dénaturation du DLR de Raf en équilibre telle qu'observée par fluorescence ainsi que par RMN. L'étude cinétique du repliement et dépliement de la protéine se retrouvera au **chapitre 4** ainsi qu'au **chapitre 5** tandis que l'effet de la température sur la vitesse de repliement de la protéine sera exposé au **chapitre 6**.

CHAPITRE 2

Caractéristiques spectroscopiques du DLR de Raf

Une protéine doit répondre à certains critères avant de voir son mécanisme de repliement étudié : 1) la séquence du gène codant pour celle-ci doit être disponible via un ADNc cloné ou synthétisé *in vitro* (cet ADN est nécessaire à la production de mutants); 2) ce gène doit pouvoir être exprimé dans un organisme hôte, préférablement *E. coli.*, via un plasmide contenant un promoteur inductible; 3) une procédure de purification doit permettre d'obtenir efficacement une quantité suffisante de protéines pures (>20 mg/L de culture bactérienne pour une protéine de moins de 100 acides aminés). 4) la dénaturation de la protéine doit être réversible et sa forme renaturée (forme dénaturée puis repliée), posséder une structure identique à la forme native; 5) les caractéristiques spectroscopiques des états natif et dénaturé de la protéine doivent être suffisamment distinctes pour permettre un suivi spectroscopique de la transition entre les états.

2.1 Expression et purification

L'expression recombinante et la purification du DLR de Raf, à l'aide de la protéine de fusion MBP, ont déjà été décrites dans la littérature [73]. Dans le but de simplifier le processus de purification, en évitant l'étape coûteuse de l'élimination de la MBP par une protéase, la séquence codant pour le DLR de Raf fut insérée dans une version modifiée de pQE-30 ne possédant pas de protéines de fusion (pour détails, voir la section Matériel et méthode : Clonage et mutations). L'expression de la protéine recombinante dans *E.coli.* fut effectuée sous la régulation transcriptionnelle d'un promoteur hybride " tac " suivant l'inactivation du répresseur Lac Iq par IPTG. Le protocole de purification tire avantage du haut point isoélectrique du domaine (pI= 8,9 : utilisation d'une colonne cationique à pH 8,0) ainsi que de sa petite taille (colonne à tamis moléculaire). Le résumé des différentes étapes d'expression et de purification menant à la production d'environ 40 mg/litre de culture du DLR de Raf est résumé à la figure 15 (voir Matériel et méthode : Expression et purification).

2.2 Caractéristiques spectrales de l'état natif, dénaturé et renaturé du DLR de Raf

La caractéristique spectroscopique la plus utilisée pour suivre une réaction de repliement est la fluorescence. La popularité de cette sonde provient du fait que les fluorophores naturels (tryptophane et tyrosine) sont très sensibles à la structure tertiaire de la protéine. La fluorescence possède souvent l'avantage d'une meilleure sensibilité structurale lorsque comparée aux longueurs d'ondes en D.C. spécifiques aux structures secondaires. Contrairement à l'ubiquitine, ces études pourront être effectuées à partir d'un tryptophane naturel, les études sur le repliement de l'ubiquitine ayant été faites à partir du mutant Phe45Trp. La prise d'un spectre de proton par RMN assurera la spécificité de la structure du DLR de Raf renaturée.

2.2.1 Spectroscopie de fluorescence

Pour qu'il s'avère utile pour suivre le repliement, le spectre de fluorescence du tryptophane dans le DLR de Raf doit être sensible à la structure générale de la protéine. Le spectre de fluorescence de la protéine sous la forme native, dans un tampon acétate, et sous la forme dépliée, dans 4M de Gdn-HCl, sont comparés dans la figure 8. On note une diminution marquée de l'intensité de fluorescence suivant le dépliement de la protéine d'environ 2,5 fois combinée à un déplacement du spectre vers le rouge de plus de 20 nm. Une différence de spectre effectuée entre la forme native et la forme dénaturée indique que la longueur d'onde qui expérimente la plus grande variation d'intensité de fluorescence entre les deux états se situe à 331 nm. C'est à cette longueur d'onde que les études d'équilibres seront menées. Les études cinétiques pourront tirer partie de la différence d'intensité de fluorescence entre les spectres d'émission des deux états puisque celles-ci nécessitent davantage de signal vu le temps d'intégration plus court de chaque mesure (50 μ s).

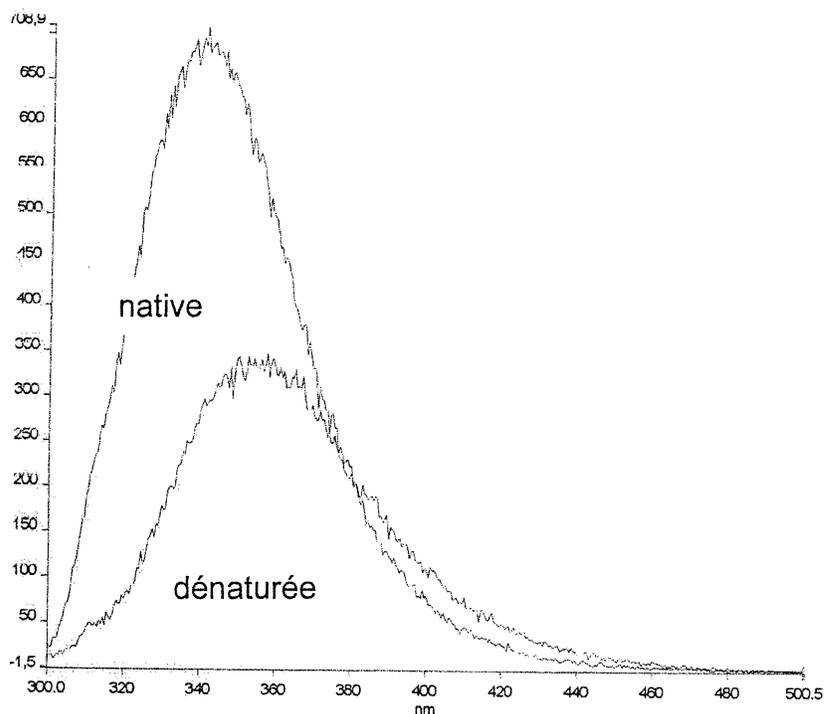


FIGURE 8 : Spectre d'émission de la forme native et de la forme dénaturée du DLR de Raf. La forme dénaturée fut induite à l'aide de dénaturant (4 M Gdn-HCl, 25 mM tampon acétate pH 5,0, 1 mM DTT) tandis que la forme native fut simplement tamponnée (25 mM tampon acétate pH 5,0, 1 mM DTT). L'ajout de DTT assure une condition réductrice empêchant la formation de ponts cystéines non spécifiques. La concentration de protéine est d'environ 3 μ M.

2.2.2 Spectroscopie RMN

Avant d'entreprendre la caractérisation du repliement d'une protéine, il est essentiel de s'assurer que la structure de celle-ci, lorsque repliée de façon *in vitro*, correspond bien à la forme native de la protéine purifiée de la bactérie. Le spectre RMN de proton du DLR de Raf présente une excellente dispersion des pics d'hydrogène attribuable à la grande différence d'environnement chimique des protons de la protéine au

sein de la structure [73]. La signature du spectre de proton est ainsi très sensible aux changements conformationnels, même mineurs. La figure 9 présente le spectre RMN des protons amines de la forme native et de la forme renaturée *in vitro* du DLR de Raf. La comparaison attentive des deux traces révèle que les protons de chacune des formes expérimentent exactement le même environnement chimique. Cette observation confirme ainsi que la forme renaturé *in vitro* de la protéine est bien dans la même conformation que la forme native de la protéine.

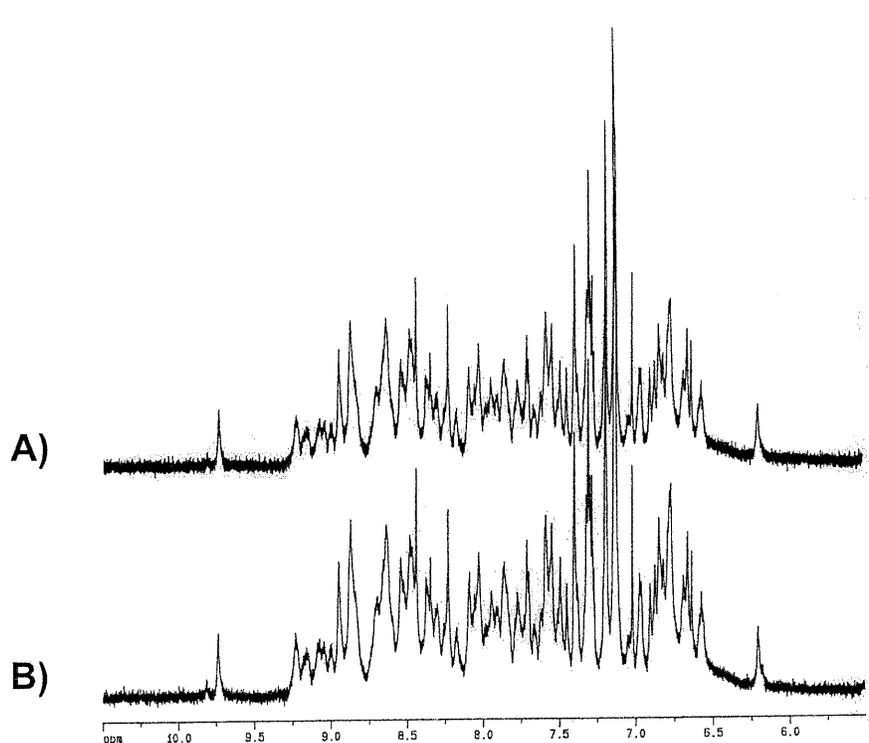


FIGURE 9 : Spectre RMN des protons amines de la forme renaturée (A) et native (B) du DLR de Raf. Les échantillons contiennent environ 1mM de protéines dans un tampon acétate de 10 mM à pH 5,0 et DTT à 0,1mM. La forme renaturée provient d'un échantillon de protéine dénaturé à 4M de Gdn-HCl puis renaturé à l'aide d'une série de dialyse. Chaque trace est une moyenne de 64 acquisitions.

CHAPITRE 3

Études d'équilibre

Une des principales applications du dénaturant dans l'étude du repliement des protéines est qu'il permet de déplacer l'équilibre existant entre la forme native et la forme dépliée en favorisant, de manière thermodynamique, le second état. La forte coopérativité à la base du phénomène de repliement des petites protéines globulaires (<100 acides aminés) permet rarement l'observation de plus de deux états à l'équilibre et ce pour toutes les concentrations de dénaturant : l'état natif ainsi que l'état dénaturé (voir Figure 10). Bien que l'état dénaturé soit en fait composé d'une infinité de conformations différentes en équilibre rapide avec elles-mêmes, on considère habituellement ce dernier comme une entité thermodynamique distincte puisque chaque molécule affecte le même espace conformationnel. Les protéines de l'ensemble dénaturé sont ainsi similaires thermodynamiquement en ce sens qu'elles possèdent toutes le même espace conformationnel. Expérimentalement, cette simplification est appuyée par le fait que l'énergie de dépliement des protéines dites à deux états varie de façon linéaire en fonction du dénaturant suggérant ainsi que l'énergie des états natif et déplié varie également de façon linéaire (voir Figure 11). L'homogénéité thermodynamique de l'état dénaturé simplifie l'analyse des courbes d'équilibre puisqu'il nous permet d'extrapoler d'une relation linéaire les valeurs thermodynamiques reliées au repliement en absence de dénaturant [74].

Les conditions utilisées pour l'étude du repliement du DLR de Raf seront les mêmes que celles employées pour les études de l'ubiquitine : 25 mM de tampon acétate pH 5,0 et 1 mM DTT. Le recours à un pH légèrement plus acide avait été rendu nécessaire lors des études de repliement de l'ubiquitine dans le but de simplifier le modèle de repliement de la protéine (communication personnelle H. Roder).

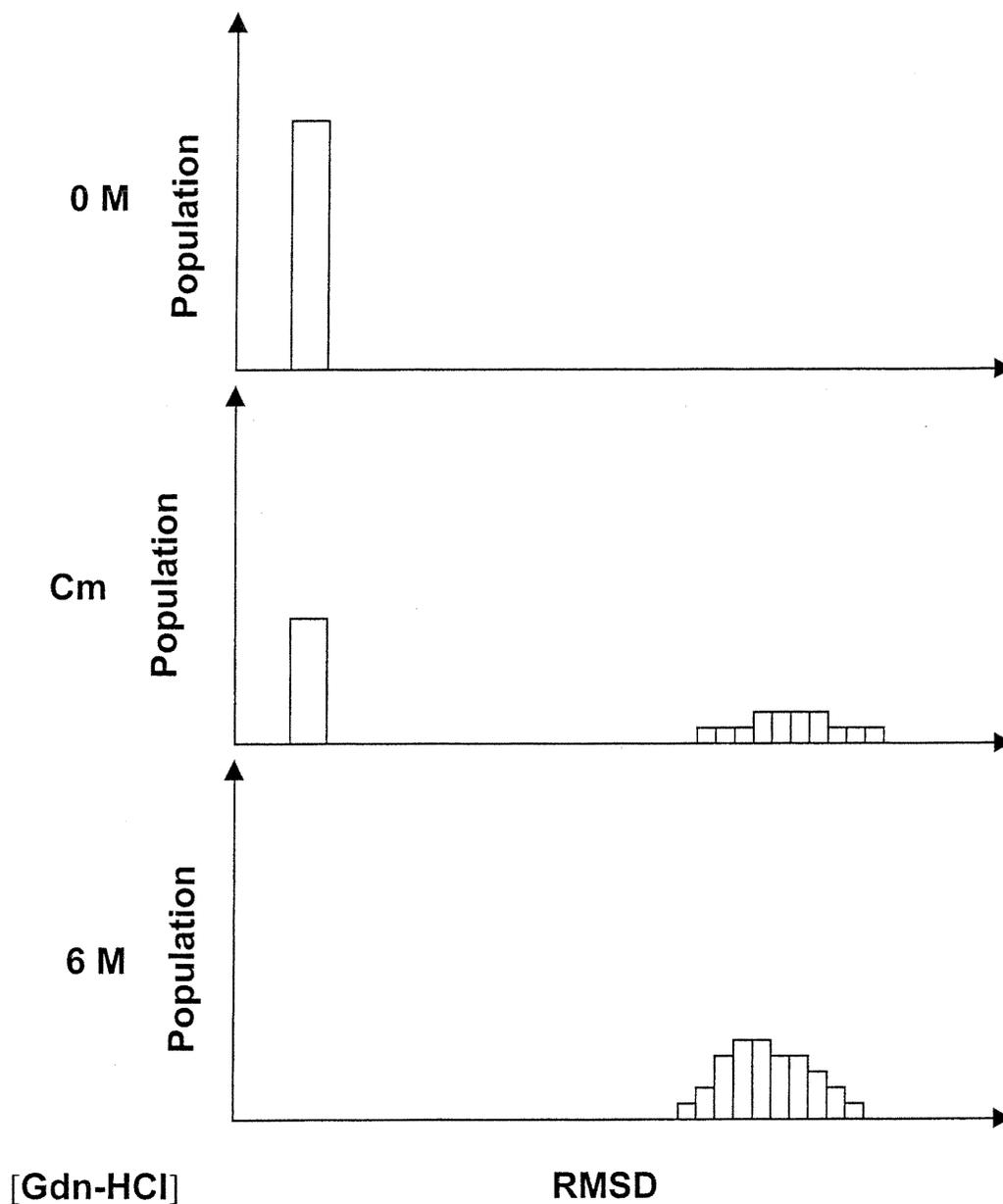


FIGURE 10 : Dénaturation à deux états à l'équilibre des petites protéines globulaires. 0, Cm et 6M représentent les concentrations en dénaturant où l'on retrouve les protéines respectivement sous la forme native, 50% native/ 50% dénaturée et dénaturée. L'état dénaturé représente en fait un ensemble hétérogène de structures dont le RMSD entre les carbones α de chaque molécules est très grand par rapport à celui de la structure native.

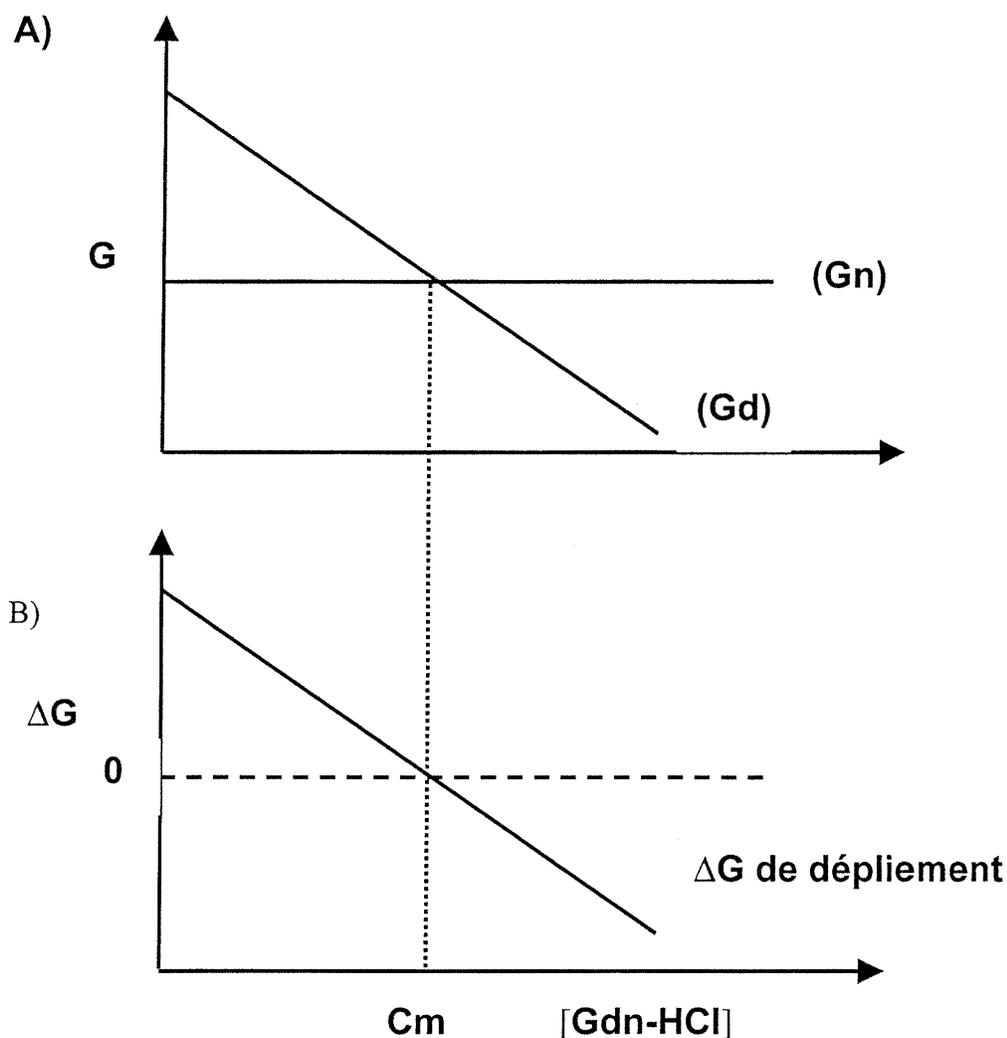


FIGURE 11 : Variation théorique de l'énergie de Gibbs de l'état natif (G_n), dénaturé (G_d) et de l'énergie de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant . A) Variation de l'énergie de Gibbs des états natif (représentée comme étant constante) et dénaturé d'une protéine. La valeur de la pente pour chaque état est proportionnelle aux nombres de résidus hydrophobes et hydrophiles neutres en contact avec le solvant [49]. B) Variation du ΔG de dépliement ($G_n - G_d$) en fonction de la concentration de dénaturant où à C_m , la concentration à laquelle on observe une population égale pour chaque un des états (50% native et 50% dénaturé), le ΔG de dépliement est nul. La linéarité du ΔG de dépliement des protéines à deux états suggère la présence de deux niveaux énergétiques distincts variant également de façon linéaire en fonction de la concentration de dénaturant. La pente de cette relation, la valeur m , est proportionnelle à la variation de surface exposée suite au dépliement de la protéine.

3.1 Fluorescence : dénaturation induite par Gdn-HCl

3.1.1 Courbe d'équilibre

L'énergie de dépliement peut être tirée de la courbe d'équilibre présentée à la figure 12 si l'on assume un modèle de repliement à deux états [78]. Dans un tel modèle, la population de protéines se retrouve dans un des deux états dépendamment de la concentration de dénaturant (voir figure 10), chacun des états ayant un spectre de fluorescence qui lui est propre. À partir de l'intensité de fluorescence de l'état natif et de celle de l'état dénaturé, qui varient toutes deux de manière linéaire en fonction de la concentration de dénaturant, la fraction de protéines repliées pour chaque valeur de fluorescence peut être facilement extrapolée. À partir de cette fraction, on peut connaître la constante d'équilibre du système à deux états ainsi que la différence d'énergie entre ces derniers, le ΔG de dépliement, pour chaque concentration de dénaturant. La

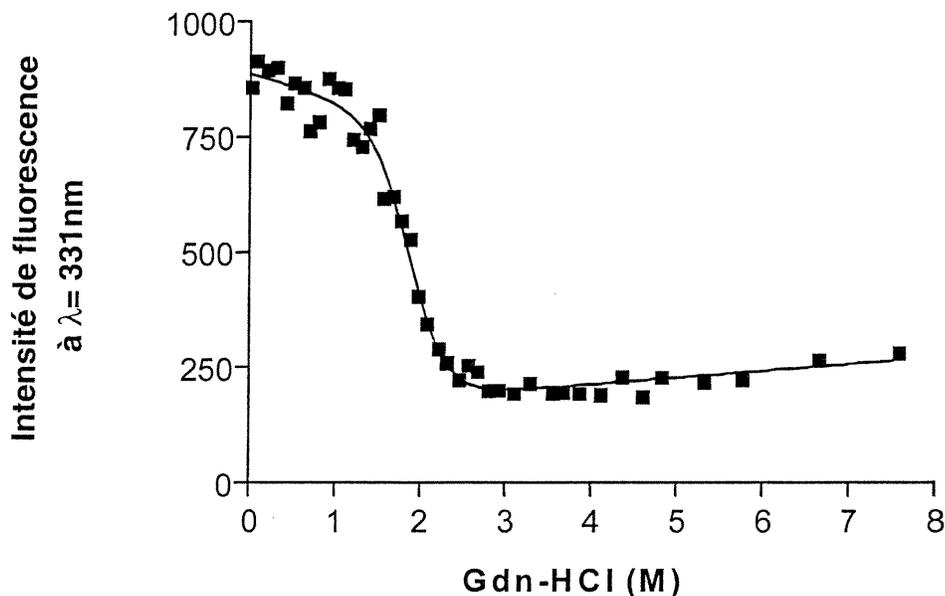


FIGURE 12 : Dénaturation à l'équilibre du DLR de Raf. Les données furent analysées à partir d'un modèle à deux états en tenant compte de la variation de l'intensité de fluorescence de chaque état en fonction de la concentration de dénaturant (voir équation 13 p. 92). La concentration de chaque échantillon est d'environ exactement $3 \mu\text{M}$.

valeur de la pente reliant le ΔG de dépliement à la concentration de dénaturant, la valeur m , est connue comme étant proportionnelle à la variation de surface exposée suite au dépliement de la protéine¹ (voir figure 11). L'équation (13) dans la section 9.8.1 exprime la relation mathématique qui donne l'intensité de fluorescence d'un système à deux états en fonction de ces différentes variables.

La figure 12 montre le changement d'intensité de fluorescence du DLR de Raf suivant sa titration à l'aide de Gdn-HCl. Une seule transition abrupte de l'intensité de fluorescence est observée entre l'état final et l'état initial. La ligne présentée dans cette figure représente la modélisation des valeurs d'intensités de fluorescence tirée de l'analyse non-linéaire de moindres carrés de la courbe faite à partir de l'équation 13. Le tableau IV présente les paramètres ΔG_{H_2O} , m et C_m retenus pour la meilleure simulation.

TABLEAU IV : Stabilité, valeur de m et concentration de dénaturant au point milieu de dénaturation, C_m , tels que tirés de la courbe de dénaturation au Gdn-HCl².

ΔG_{H_2O} (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_m (M)
21,3	11,3	1,89

²À 25°C dans un tampon d'acétate de sodium à pH 5,0. Le pourcentage d'erreur standard expérimental tel qu'estimé par la variation des valeurs expérimentales de la fonction retenue suite à la modélisation est de 7% pour la valeur m , de 2% pour C_m et de 6 % pour ΔG_{H_2O} .

¹ Il a été démontré que la solubilité des acides aminés hydrophobes et hydrophiles neutres est davantage favorisée dans des solutions contenant des dénaturants que dans l'eau. De plus, l'énergie libre de transfert des acides aminés hydrophobes de l'eau à des solutions dénaturantes est corrélée à leur surface moléculaire [88].

3.1.2 ΔG de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant

La figure 13 présente l'énergie libre de dépliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl déterminée à partir des valeurs de fluorescence de la zone de transition (1,55 à 2,45 M). Pour cet intervalle, la variation du ΔG de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant montre une relation linéaire.

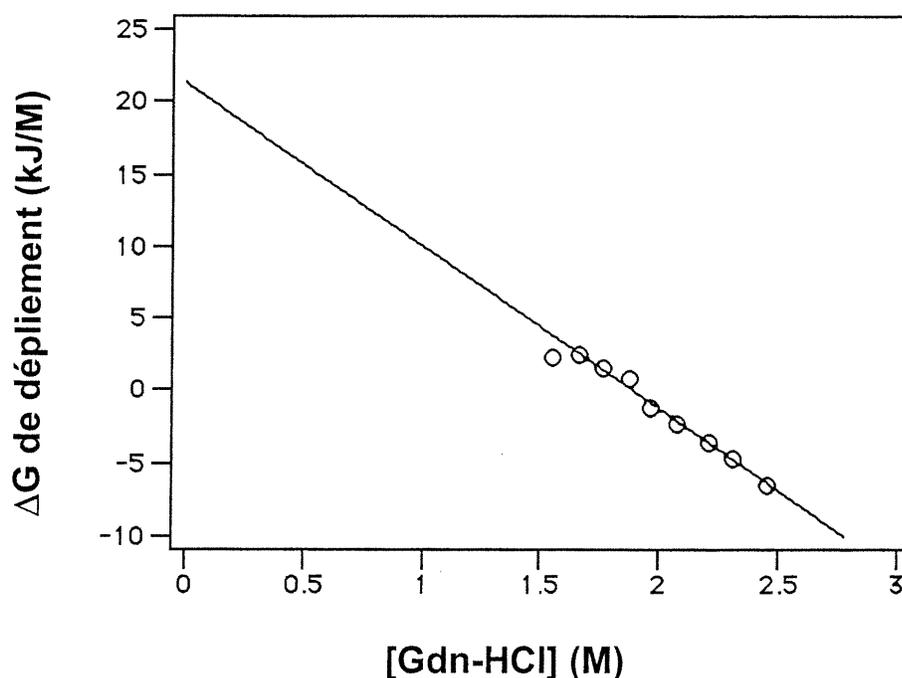


FIGURE 13 : ΔG de dépliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl tel que déterminé à partir des valeurs de fluorescence mesurées dans la zone de transition. La ligne solide représente la meilleure fonction obtenue de la modélisation à l'aide de l'équation 13. L'extrapolation linéaire de la droite à 0 M donne l'énergie de dépliement de la protéine à 0 M, ΔG_{H_2O} , la pente de la droite, la valeur m tandis que la concentration de dénaturant à $\Delta G=0$ représente le C_m .

3.2 RMN : dénaturation induite par Gdn-HCl

Dans le but de vérifier si la transition observée lors de la titration au dénaturant du DLR de Raf se déroule en absence d'intermédiaires et consiste en un processus global, le déplacement chimique de chaque proton de la protéine peut être observé dans la zone de transition.

2.2.2 Spectroscopie RMN

La figure 14 présente un spectre RMN du proton amide du tryptophane du DLR de Raf en fonction de la concentration de dénaturant. Le proton amide du tryptophane dans la forme native (A) ainsi que celui dans la forme dénaturée (C) de la protéine affectent tous deux un environnement chimique distinct l'un de l'autre (respectivement 9,74 ppm VS 10,14 ppm). Aux environs de la concentration de mi dénaturation (B : 2,0 M), deux populations de protons amides du tryptophane sont observées. Les déplacements chimiques des protons de ces dernières s'avèrent similaires à ceux des protons des populations natives et dénaturées (respectivement 9,80 ppm et 10,07 ppm). Cette observation est représentative de l'ensemble des protons du DLR de Raf dont l'intensité des pics natifs diminue de façon coopérative avec l'apparition des pics caractéristiques de l'état dénaturé aux environs du C_m (1,89 M).

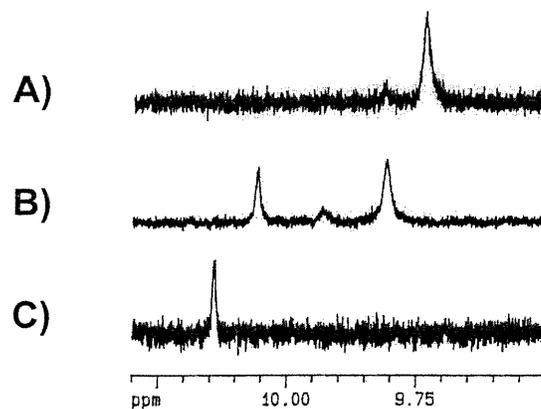


FIGURE 14 : Spectre RMN du proton amide du tryptophane du DLR de Raf à différentes concentration de Gdn-HCl. A) 0 M de Gdn-HCl, B) 2,0 M de Gdn-HCl ainsi que C) 3,2 M de Gdn-HCl. À noter que le déplacement chimique des pics se déplace vers la gauche en présence de Gdn-HCl. La différence entre le rapport signal/bruit de chaque échantillon est attribuable à la présence du Gdn-HCl qui diminue l'intensité du signal provenant de la protéine. Dans le but de minimiser cet effet, le nombre d'acquisitions accumulées varie pour chaque échantillon.

CHAPITRE 4

Étude cinétique: A) Saut de dénaturant

Deux critères sont à considérer lors de l'étude cinétique pour suggérer le modèle de repliement via un mécanisme à deux états. Dans un premier temps, le repliement de la protéine doit procéder via une simple exponentielle sans perte de signal dans le temps mort de l'appareil. Puis, la valeur m ainsi que le ΔG_{H_2O} déterminés à partir des expériences cinétiques doivent être les mêmes que ceux calculés à partir des expériences d'équilibre.

Repliement monophasique

Malgré la complexité inhérente au phénomène de repliement, plusieurs protéines atteignent leur conformation native sans l'observation d'intermédiaires. Cette réaction, la plus simple qui soit, peut être représentée par un modèle à deux états selon l'équation :



où D représente la forme dépliée de la protéine, N, la forme native tandis que k_f ainsi que k_d donnent respectivement les vitesses de repliement et de dépliement de la protéine. Expérimentalement, le retour à l'équilibre d'une réaction à deux états, suite à une perturbation, devrait procéder suivant la forme d'une simple exponentielle :

$$S(t) = A \exp(-k_{obs}t) + B \quad (2)$$

où $S(t)$ donne la valeur du signal à chaque temps t , A , l'amplitude de l'exponentielle, k_{obs} , la constante de vitesse observée (la somme de la vitesse de repliement et de

dépliement – voir section 9.8.3 : détermination de la vitesse de repliement et de dépliement, équation 14) tandis que B donne la valeur du signal au retour de l'équilibre. Un des principaux résultats suggérant la présence d'intermédiaires hydrophobes consiste en la perte d'un signal dans le temps mort de l'appareil laissant présager la présence d'une phase très rapide non résolue. À partir des valeurs de fluorescence de l'état dénaturé extrapolées à faible concentration de dénaturant, il sera possible de vérifier si l'exponentielle simple de la réaction de repliement couvre toute l'amplitude du signal de fluorescence attendu pour le retour à l'équilibre.

Il est à noter que les petites protéines qui possèdent des acides aminés prolines affichent généralement une cinétique de repliement multi-exponentielles bien qu'elles puissent toutefois se replier selon un mécanisme à deux états. Cette observation est attribuée au lent équilibre existant entre les conformations *cis* et *trans* du lien peptidique précédant le résidu proline sous la forme dénaturée. Ainsi, l'isomérisation de ce lien dans le conformère natif devient limitant lors de la réaction de repliement pour la population de protéines dénaturées ne se trouvant pas dans le bon conformère. De façon typique, 10 à 30 % de la population de ces liens se trouve sous la forme *cis* lorsque la protéine est dépliée. Toutefois,, plus de 90% des liens précédant les prolines au sein des protéines se trouvent sous la forme *trans*. C'est pour cette raison que l'étape limitante d'isomérisation des prolines lors du repliement n'affecte généralement qu'une faible proportion de la population des protéines étudiées. La vitesse de cette transition demeure de manière générale relativement insensible à la concentration de dénaturant et leur temps d'isomérisation s'étend généralement de 10 à 100 secondes. Bien qu'il soit essentiel de prendre en considération la présence de ces phases lors de l'analyse des traces de repliement, seul la phase rapide qui correspond au repliement de type deux états de la forme dénaturée dont les prolines se retrouvent sous la forme native est utilisée pour caractériser l'équilibre existant entre la forme native et celle dénaturée de la protéine. Le DLR de Raf possède 2 résidus prolines affectant tout deux la forme *trans* dans la structure native.

Valeur m et ΔG_{H_2O} mesurées de manière cinétique

Le second critère essentiel à la suggestion de la nature deux états d'une réaction de repliement consiste à démontrer que la valeur m ainsi que le ΔG_{H_2O} calculés à partir des expériences cinétiques sont les mêmes que ceux calculés à partir des expériences d'équilibre. La constante d'équilibre d'un système à deux états, la constante de dépliement, K_d , peut être exprimée en fonction des concentrations des populations natives et dénaturées ($[N]$ et $[D]$) ainsi qu'à l'aide des vitesses de repliement et de dépliement de la protéine (respectivement k_f et k_d) :

$$K_d = [N]/[D] = k_f / k_d \quad (3)$$

Ainsi, comme $\Delta G_d = -RT \ln K_d$ (où ΔG_d représente l'énergie de dépliement, R, la constante des gaz parfait et T, la température) , on peut déterminer les paramètres d'équilibre d'une protéine se repliant selon un modèle à deux états à partir des vitesses de repliement et de dépliement de celle-ci selon l'équation :

$$\Delta G_d = -RT (\ln k_f - \ln k_d) \quad (4)$$

La valeur de m, connue comme étant proportionnelle à la variation de surface nouvellement exposée suite au dépliement de la protéine, devrait également être similaire lorsque déterminée à partir des expériences cinétiques. On se souvient que le ΔG de dépliement d'une protéine à deux états, ΔG_d , varie de façon linéaire avec la concentration de dénaturant avec une pente de m (voir Figure 11 et 13) :

$$\Delta G_{dep.} = \Delta G_{H_2O} - m [D] \quad (5)$$

De façon analogue, le logarithme naturel des vitesses de repliement (k_f) et de dépliement (k_d) varient également de façon linéaire selon la concentration de dénaturant ($[D]$):

$$\ln k_d = \ln k_{d_{H_2O}} + m_d [D] \quad (6)$$

$$\ln k_f = \ln k_{f_{H_2O}} - m_f [D] \quad (7)$$

où m_d et m_f représente respectivement le valeur de la pente de cette variation. En combinant les équations 4 à 7, on obtient une relation générale donnant le ΔG de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant et des paramètres cinétiques sous la forme d'une équation linéaire :

$$\Delta G_{dep.} = -RT (\ln k_{f_{H_2O}} - \ln k_{d_{H_2O}}) + RT (m_f + m_d) [D] \quad (8)$$

À partir de l'équation 8 et de l'équation 5 on obtient les valeurs de m et d'énergie libre de dépliement à 0M à partir des paramètres cinétiques :

$$\Delta G_{H_2O} = -RT (\ln k_{f_{H_2O}} - \ln k_{d_{H_2O}}) \quad (9)$$

$$m = RT (m_f + m_d) \quad (10)$$

Niveau de compaction de l'état de transition

Les valeurs m_f et m_d tirées de la variation des vitesses de repliement et de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant dépendent directement de la nature de l'état de transition. Pour les expériences d'équilibre, la valeur m se révèle proportionnelle au degré d'ouverture de la protéine suivant sa dénaturation (ou au degré de fermeture suivant sa renaturation). De manière analogue, les valeurs m_f et m_d , quant à elles, sont respectivement proportionnelles à la différence d'ouverture entre l'état dénaturé et l'état de transition (m_f) et à la différence d'ouverture entre l'état de transition et l'état

natif (md). Il est donc logique pour un système à deux états que la somme de RT_{mf} et RT_{md} , représentant la somme du degré de fermeture des transitions $\text{É.D.} \rightarrow \text{É.T.}$ et $\text{É.T.} \rightarrow \text{É.N.}$, soit équivalente à la valeur m , elle-même proportionnelle au degré de fermeture de la transition $\text{É.D.} \rightarrow \text{É.N.}$ (équation 10). On utilise souvent le rapport RT_{mf}/m pour évaluer le niveau de fermeture ou niveau de compaction de l'état de transition relativement à celui de la forme native comparée à la forme dénaturée. Une valeur de compaction de l'état de transition égale à 1 signifie que le degré de fermeture de ce dernier est similaire à celui de l'état natif tandis qu'une valeur presque nulle indique qu'il ressemble davantage à l'état dénaturé.

4.1 Repliement et dépliement par saut de dénaturant à 25 °C à différentes concentrations de Gdn-HCl.

On étudie la cinétique de repliement et de dépliement d'une protéine à partir d'une perturbation de l'équilibre entre les états natif et dénaturé. La méthode la plus courante pour modifier cet équilibre consiste à effectuer un saut rapide de concentration de dénaturant. Ainsi, pour les expériences de repliement du DLR de Raf, un échantillon de protéine dénaturée dans 4,0 M de Gdn-HCl sera rapidement dilué à des concentrations plus faibles de dénaturant. Les expériences de dénaturation quant à elles seront effectuées en amenant un échantillon natif de protéine à des concentrations élevées de dénaturant. La figure 15 illustre une expérience typique de saut de dénaturant à l'aide du profil énergétique des états pour un modèle de repliement sans intermédiaires (l'état natif, l'état de transition ainsi que l'état dénaturé). L'énergie de l'état de transition est considérée comme variant de façon linéaire en fonction de la concentration du dénaturant. Puisque la variation d'énergie d'un état, en fonction de la concentration de dénaturant, est proportionnelle au nombre de résidus hydrophobes accessibles au solvant et comme le degré de fermeture de l'état de transition se situe entre ceux des formes native et dénaturée alors, la variation de l'énergie de l'état de transition en fonction de la concentration de dénaturant prendra une valeur intermédiaire à celle des 2 autres états. Cette caractéristique se reflètera par une diminution de la vitesse de repliement ainsi qu'une augmentation de la

vitesse de dépliement proportionnelle l'ajout de dénaturant attribuées respectivement à une augmentation ainsi qu'à une diminution de la barrière d'activation de la transition. On appelle courbe de chevron le graphique exprimant le logarithme des vitesses de repliement et de dépliement observées en fonction de la concentration de dénaturant.

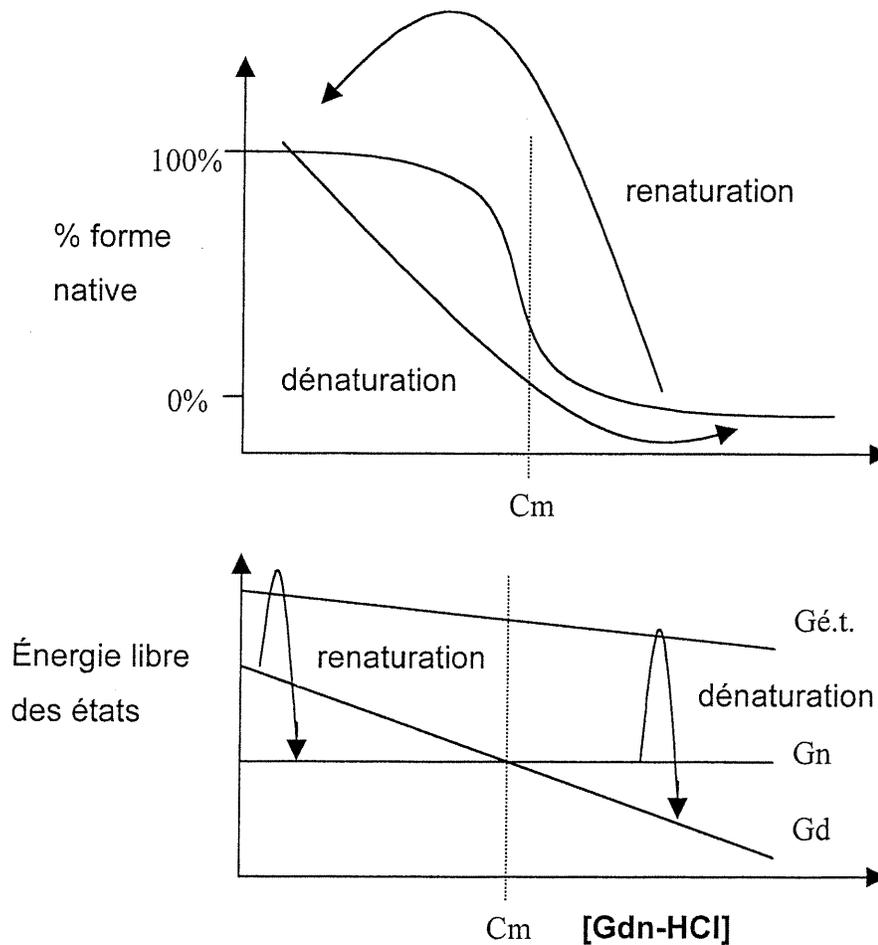


FIGURE 15 : Expérience typique de saut de dénaturant pour l'étude du repliement et du dépliement d'une protéine : courbe de chevron pour un modèle de repliement à deux états. Le graphique supérieur illustre le saut de dénaturant amenant la protéine d'un milieu natif à un milieu dénaturé et vice-versa. Le graphique central donne un exemple typique de la variation des énergies pour chacun des états (G_n , G_d ainsi que $G_{é.t.}$ étant respectivement l'énergie des états natif, dénaturé ainsi que de transition) en fonction de la concentration de dénaturant. Les flèches indiquent la transition attendue à faible ainsi qu'à forte concentration de dénaturant. On y note que la variation d'énergie des états dépend de leur degré de fermeture.

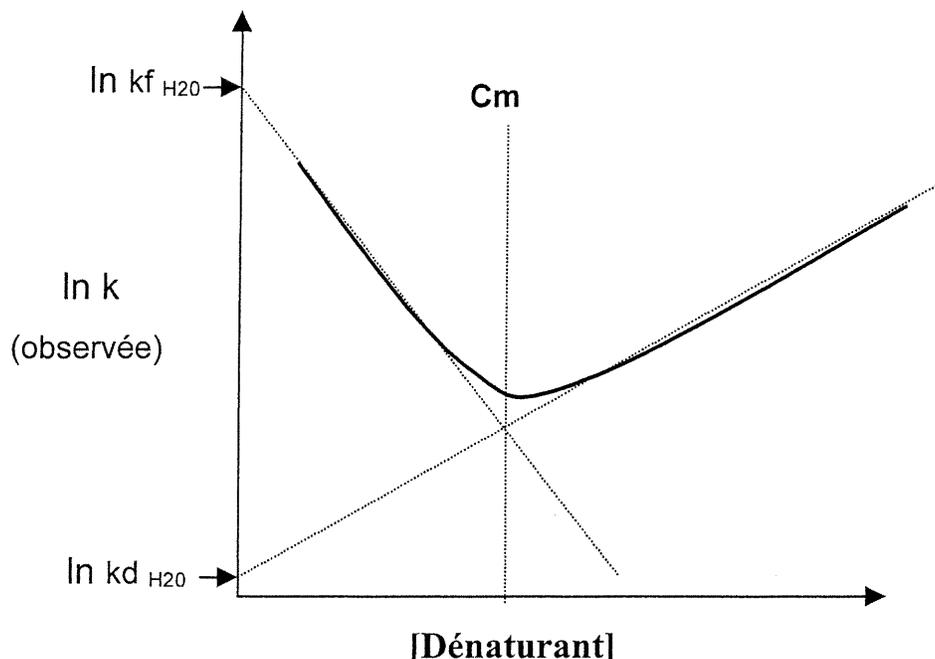


Figure 15 (suite) Le graphique ci-dessus, appelé courbe de chevron, donne le logarithme des vitesses observées pour le repliement ainsi que le dépliement de la protéine. L'extrapolation linéaire à 0 M des deux régions planes donnent les vitesses de dépliement et de repliement de la protéine en absence de dénaturant (équation 6 et 7). C_m donne la concentration de dénaturant à 50% de forme native et de forme dénaturée.

4.1.1 Repliement tri-phasique à 1M de Gdn-HCl

La différence d'intensité de fluorescence entre l'état natif et l'état dénaturé du DLR de Raf permet la caractérisation cinétique du repliement de la protéine à l'aide d'un spectromètre de fluorescence assemblé à un appareil de mixage rapide (« stopped flow »). Contrairement aux expériences d'équilibres, l'intensité de fluorescence du système sera quantifiée à l'aide d'un filtre laissant passer les longueurs d'ondes supérieures à 320 nm de manière à maximiser l'apport du signal. La figure 16 montre une expérience typique de renaturation au cours de laquelle un échantillon de protéines dénaturées à 4,0 M est rapidement dilué à 1,0 M à l'aide d'un mixage 1 :10. Une fonction à 3 exponentielles est

nécessaire pour rendre compte du retour à l'équilibre suivant la perturbation. La transition majeure, impliquant 77 % du signal, est la plus rapide à une constante de vitesse de $26,8 \text{ s}^{-1}$. Deux transitions mineures, 10% et 13% du signal, permettent un retour de l'intensité de fluorescence à des constantes de vitesse de $5,7 \text{ s}^{-1}$ et $0,24 \text{ s}^{-1}$ respectivement.

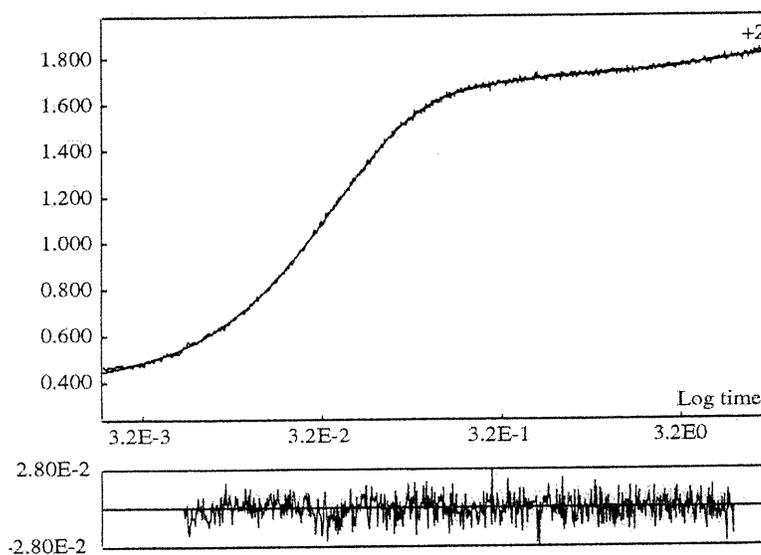


FIGURE 16 : Expérience de renaturation suivant une dilution allant de 4,0 M à 1,0 M de Gdn-HCl tel qu'enregistrée par un spectromètre de fluorescence combiné à un « stop flow ». L'échelle du temps est donnée sous la forme logarithmique. Les conditions finales de renaturation sont de 25 mM d'acétate de sodium, 1,0 M de Gdn-HCl, 1mM de DTT à 25°C . La ligne solide représente la fonction ayant la meilleure simulation (3 exponentielles : 77%, 10 % ainsi que 13% de l'amplitude totale de repliement relaxant respectivement à des constantes de vitesse de $26,8 \text{ s}^{-1}$, $5,7 \text{ s}^{-1}$ ainsi que $0,24 \text{ s}^{-1}$). La qualité de la simulation est représentée au bas de la figure par le résiduel de la fonction tel que calculé par analyse non linéaire de moindres carrés.

4.1.2 Dépendance de la concentration de Gdn-HCl sur la vitesse des 3 phases lentes.

La dépendance du dénaturant sur les vitesses de relaxation des trois phases est présentée à la figure 17. Dix expériences de renaturation furent menées à des concentrations finales de dénaturant allant de 0,39 M à 1,55 M. Seule la transition rapide (~77% d'amplitude) se révèle être sensible au dénaturant; les vitesses des deux transitions lentes et de faible amplitude restant relativement insensibles aux conditions finales de dénaturant. Ces dernières caractéristiques correspondent bien à la description thermodynamique entourant le phénomène d'isomérisation des prolines sous la forme dénaturée (voir chapitre 4 « **repliement monophasique** »). Le DLR de Raf possède en effet deux résidus prolines sous la forme *trans* susceptibles de limiter la vitesse de repliement lorsque présent sous le conformère *cis* dans la forme dénaturée. Notre attention sera donc portée sur la transition majeure de relaxation, la phase rapide, correspondant sans doute au repliement de la forme dénaturée dont les liens peptidiques précédant les 2 prolines affectent la forme *trans*.

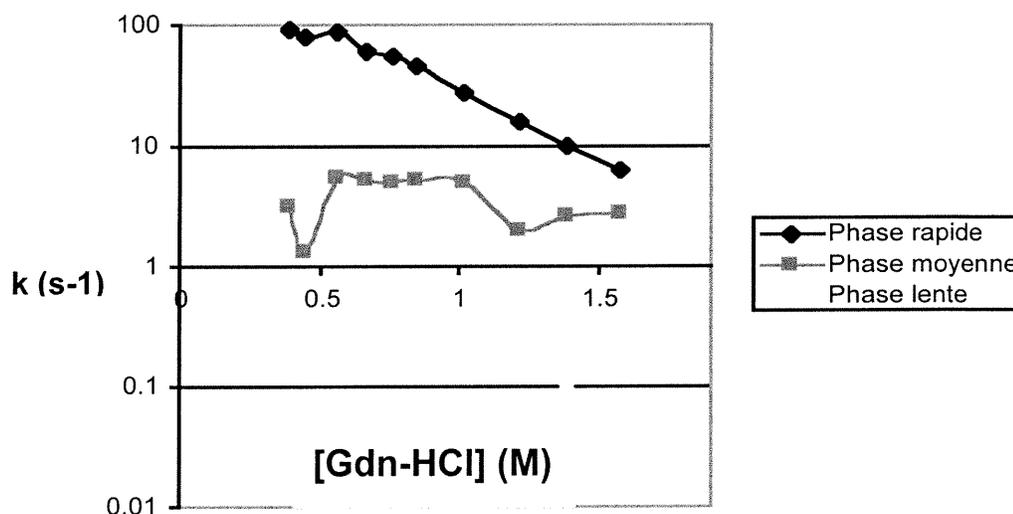


FIGURE 17 : Variation de la vitesse des trois transitions observées lors du repliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de dénaturant. Les conditions finales de chacun des échantillons est de 25 mM d'acétate de sodium pH 5,0 ainsi que de 1mM de DTT. La concentration finale de Gdn-HCl s'échelonne de 0,39 M à 1,55 M. L'amplitude de chacune des phases reste constante à +/-20% de variation.

4.1.3 Dépliement monophasique.

La figure 18 montre une expérience typique de dénaturation au cours de laquelle un échantillon de protéines natives à 0 M de Gdn-HCl est rapidement transféré à 2,5 M de Gdn-HCl à l'aide d'un mixage 1:10. Une fonction à 1 exponentielle est suffisante pour rendre compte du retour à l'équilibre suivant la perturbation. À cette concentration de dénaturant, la constante de vitesse observée du retour à l'équilibre est de $5,1 \text{ s}^{-1}$.

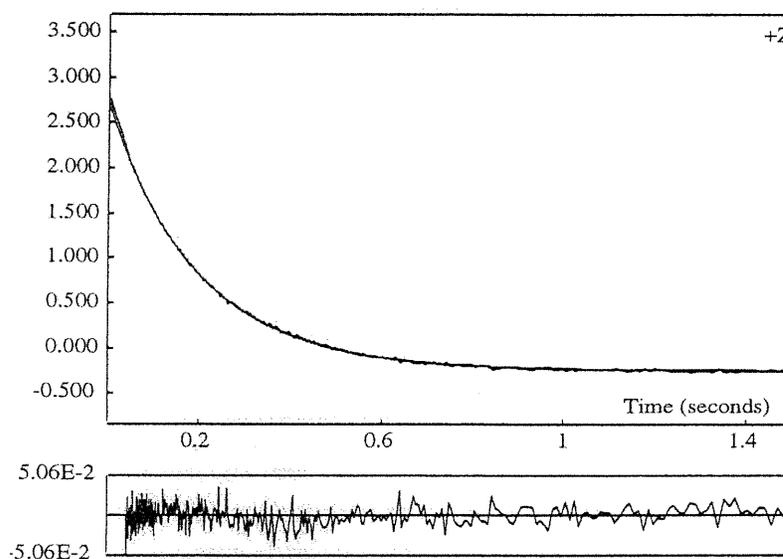


FIGURE 18 : Expérience de dénaturation suivant une dilution allant de 0 M à 2,5 M de Gdn-HCl tel le qu'enregistrée par un spectromètre de fluorescence combiné à un « stopped flow ». Les conditions finales de dénaturation sont de 25 mM d'acétate de sodium, 2,5 M de Gdn-HCl, 1 mM de DTT à 25°C . La ligne solide représente la fonction de la meilleure simulation (1 exponentielle : $5,1 \text{ s}^{-1}$). La qualité de la simulation est représentée par le résiduel de la fonction tel que calculé par analyse non linéaire de moindres carrés.

4.1.4 Courbe de chevron de la phase rapide en fonction de la concentration de Gdn-HCl.

La façon typique de représenter les vitesses de relaxation pour les expériences de repliement ainsi que de dépliement est sous la forme d'une courbe de chevron où les mesures expérimentales sont exprimées sur une échelle logarithmique en fonction de la concentration du dénaturant. À l'aide de ce graphique, il est alors simple d'extrapoler les vitesses de repliement et de dépliement à partir des vitesses de relaxation observées : la vitesse de relaxation observée étant la somme des vitesses de repliement et de dépliement à chaque concentration de dénaturant.

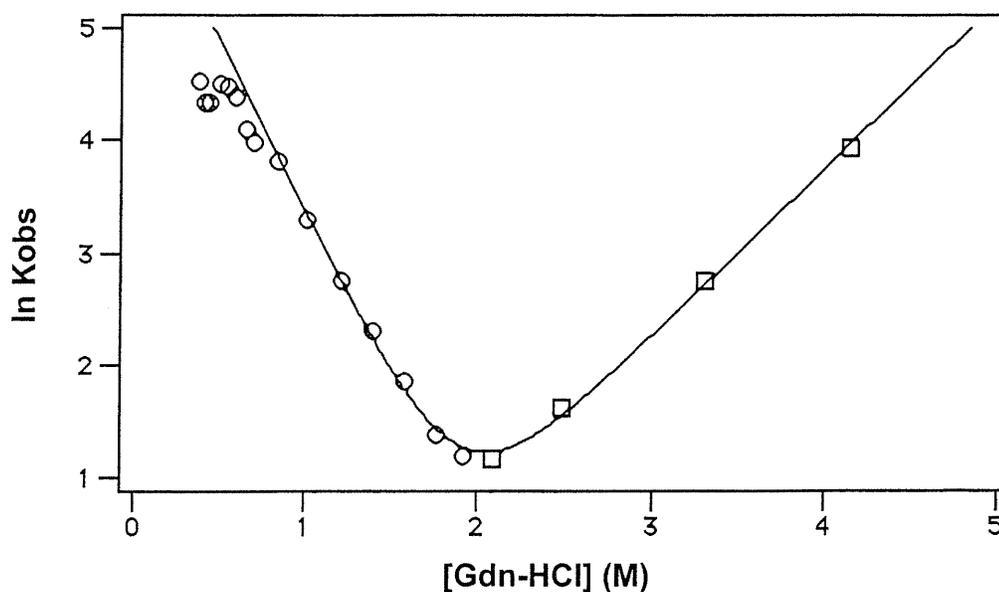


FIGURE 19 : Variation du logarithme naturel des vitesses de relaxation ($\ln k_{obs}$) pour le repliement et le dépliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl. : courbe de chevron. La ligne représente la fonction au meilleur pour un modèle de repliement à deux états pour l'intervalle de mesures allant de 0,84 M à 4,15 M (équation 14). Les cercles et les carrés représentent respectivement les vitesses de relaxation observées pour les expériences de renaturation et de dénaturation .

La courbe de chevron du DLR de Raf, présentée à la figure 19 possède l'allure typique en V attendue. À basse concentration de dénaturant, k_{obs} , la somme des vitesses de repliement et de dépliement, est dominée par la vitesse de repliement et ainsi diminue lorsque la concentration de Gdn-HCl augmente. La vitesse de dépliement domine, quant à elle, à plus forte concentration de dénaturant où k_{obs} augmente avec la concentration de Gdn-HCl. Dans la zone de transition (1,5 à 2,5 M), on remarque que les vitesses observées des expériences de dénaturation et renaturation affectent une valeur comparable. La ligne solide représente la fonction de la meilleure simulation pour un modèle de repliement à deux états (équation 14) pour l'intervalle de mesures allant de 0,84 M à 4,53 M (intervalle linéaire). À faible concentration de dénaturant ($< 0,84$ M), une nette déviation des valeurs de k_{obs} est observée par rapport au modèle à deux états pour les expériences de renaturation. Le tableau V donne les paramètres cinétiques retenus lors de l'analyse de régression non-linéaire: vitesses de repliement et de dépliement de la protéine en absence de dénaturant ainsi que les valeurs de m correspondants. La figure 20 présente les vitesses microscopiques de repliement et de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant (lignes solides) telles qu'extrapolées de la fonction de la meilleure simulation. Le point d'intersection des deux droites, situé à 1,88 M de Gdn-HCl, représente la concentration de dénaturant à laquelle la vitesse de repliement est égale à la vitesse de dépliement. C'est à cette condition que l'on devrait retrouver l'équilibre thermodynamique des deux populations ($\Delta G = 0$) pour un système à deux états.

TABLEAU V : $k_{f_{H_2O}}$, $k_{d_{H_2O}}$, m_f et m_d ainsi que le ΔG_{H_2O} et la valeur de m calculés à partir des paramètres cinétiques tirés de la courbe de chevron par analyse non-linéaire de moindre carré des valeurs expérimentales pour un modèle à deux états¹.

$k_{f_{H_2O}}$ (s ⁻¹)	$k_{d_{H_2O}}$ (s ⁻¹)	$RT*m_f$ (kJ m ⁻¹ M ⁻¹)	$RT*m_d$ (kJ m ⁻¹ M ⁻¹)	ΔG_{H_2O} cin. (kJ m ⁻¹)	m cin. (kJ m ⁻¹ M ⁻¹)
630	0.11	7,7	3.7	21,4	11,4

¹À 25°C dans un tampon d'acétate de sodium à pH 5,0. Les erreurs standard expérimentaux telles qu'estimées par la variation systématique des paramètres de la fonction de la meilleure simulation sont respectivement de 14% et de 19% pour les valeurs de $k_{f_{H_2O}}$ et $k_{d_{H_2O}}$ ainsi que de 4% pour les valeurs m_f et m_d .

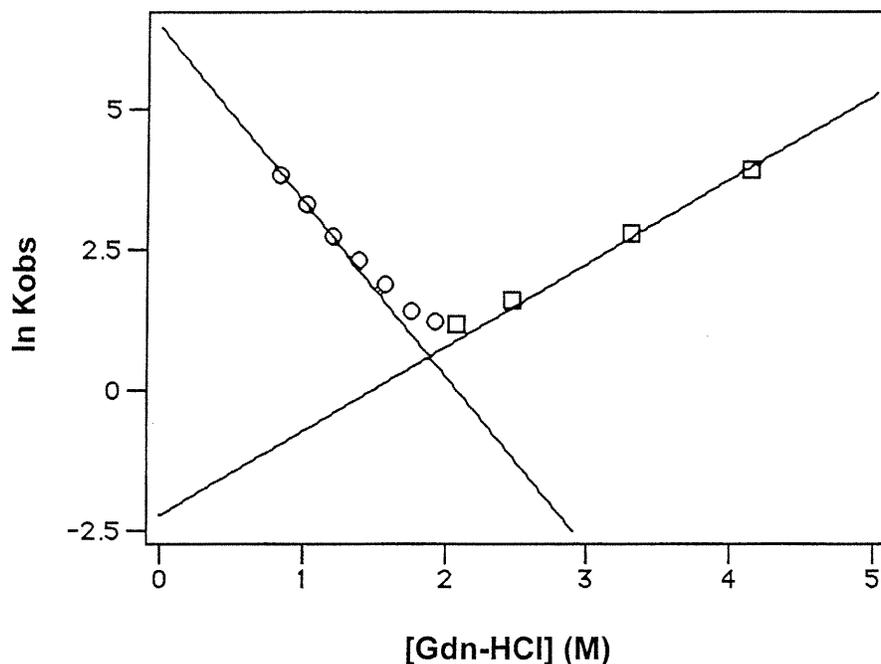


FIGURE 20 : Courbe de chevron du DLR de Raf dans la région de type deux états ($[\text{Gdn-HCl}] > 0,84 \text{ M}$) . Les droites représentent les vitesses de repliement et dépliement en fonction de la concentration de Gdn-HCl telles qu'extrapolées de l'analyse à deux états (équation 14 : voir tableau V). Les ordonnées à l'origine donnent respectivement les vitesses de repliement et dépliement en absence de dénaturant tandis que les pentes de ces droites représentent les valeurs m_f et m_d . À l'intersection des deux droites, la vitesse de repliement et celle de dépliement sont égales : cette concentration de dénaturant devrait correspondre au C_m d'un système à deux états.

Malgré la déviation négative de k_{obs} d'un modèle à deux états à basse concentration de dénaturant, les valeurs d'énergie de dépliement, de m et de C_m déterminées par expérience cinétique dans l'intervalle linéaire de la courbe de chevron ($[\text{Gdn-HCl}] > 0,84 \text{ M}$) correspondent remarquablement bien aux valeurs déterminées par les expériences d'équilibres ($\Delta G_{\text{H}_2\text{O}} = 21,3 \text{ kJ M}^{-1}$ et $m = 11,4 \text{ kJ m}^{-1} \text{ M}^{-1}$ $C_m = 1,89 \text{ M}$).

4.1.5 Corrélation entre la déviation négative de la courbe de chevron avec l'apparition d'un signal de fluorescence au temps initial.

La principale évidence expérimentale entourant l'énoncé du modèle de repliement via un intermédiaire hydrophobe provient de la mise en lumière d'une corrélation entre l'apparition de signaux de type natif au temps initial de la renaturation avec une déviation négative de la vitesse de repliement d'un modèle à deux états à faible concentration de dénaturant. Le graphique inférieur de la figure 21 présente les valeurs de fluorescence extrapolées au temps initial de la réaction de renaturation à différentes concentrations de Gdn-HCl. Pour un système à deux états, ces valeurs devraient correspondre aux intensités de fluorescence de l'état dénaturé à différentes concentrations de dénaturant. Puisque l'intensité de fluorescence de l'état dénaturé varie de façon linéaire en fonction du Gdn-HCl (voir figure 12 [$\text{Gdn-HCl}] > 3,0\text{M}$), les valeurs de fluorescence au temps initial devraient ainsi reproduire la même relation. Toutefois, les valeurs de fluorescence du départ apparaissent comme étant plus élevées que celles de l'état dénaturé à plus forte concentration de Gdn-HCl suggérant la présence d'une transition de l'état dénaturé à une forme plus fluorescente à un régime de vitesse trop élevé pour être observé. Le graphique supérieur de la figure 21 montre la section de la courbe de chevron correspondante de manière à mettre en valeur la corrélation entre la perte de signal au temps initial de renaturation ainsi que la déviation négative de la vitesse d'un système à deux états à ces concentrations de dénaturant.

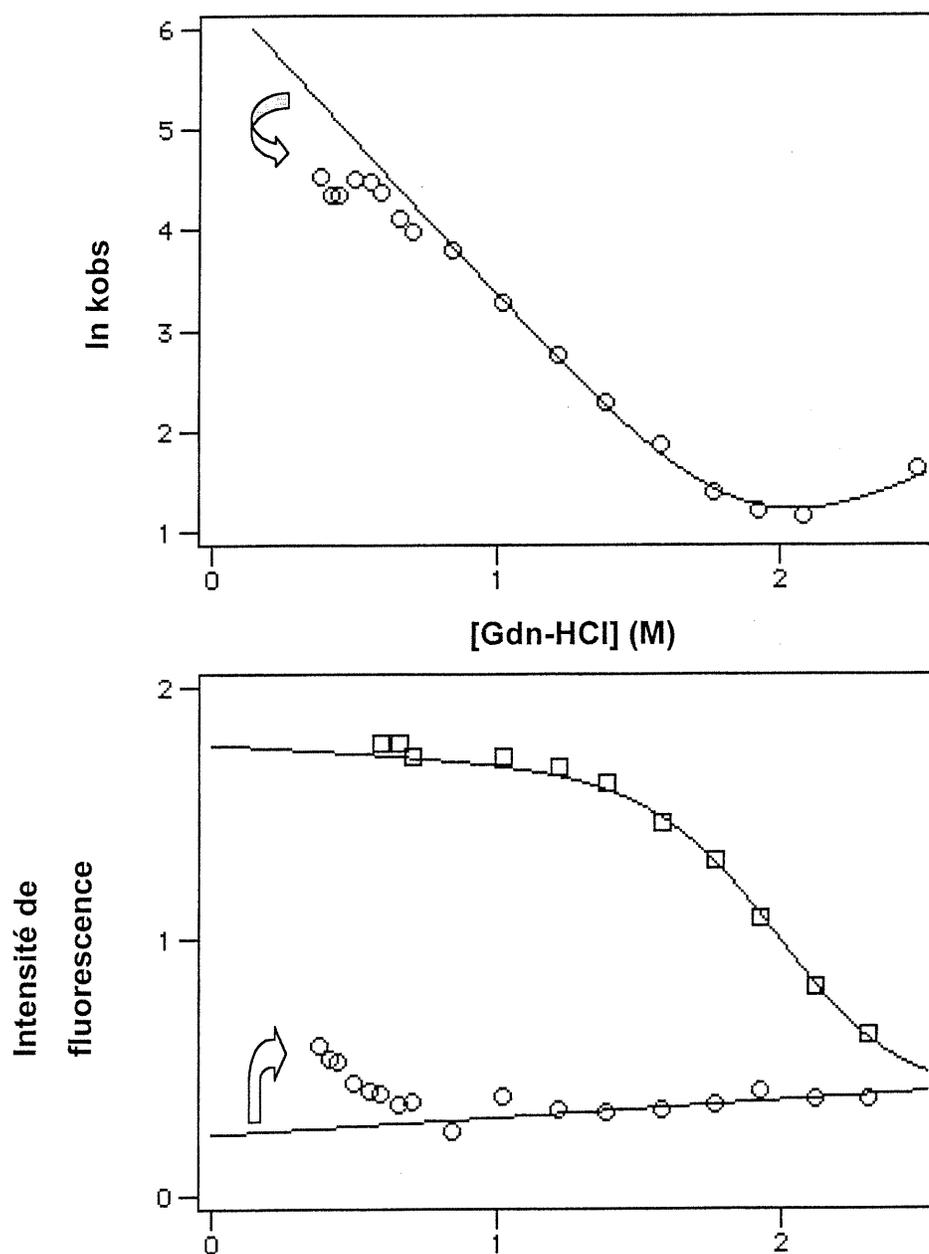


FIGURE 21 : Corrélation entre la perte de signal au temps initial pour la renaturation du DLR de Raf et la déviation de la vitesse de repliement d'un système deux états à faible concentration de dénaturant. Le graphique inférieur donne les valeurs de fluorescence extrapolées au temps initial de la réaction de repliement (cercles) ainsi que les valeurs de fluorescence au retour de l'équilibre (carré). Les lignes solides correspondent aux fonctions appropriées qui permettent la meilleure simulation; cercles : fonction linéaire pour l'intervalle 0,84 M à 2,35 M, carrés : courbe de dénaturation pour système à deux états (équation 13). Le graphique supérieur montre la région correspondante de la courbe de chevron. Les flèches mettent en valeur la corrélation.

4.1.6 Corrélation entre la déviation négative de la courbe de chevron et la variance de la fonction de la meilleure simulation appliquée à la trace cinétique.

La comparaison de la qualité de la simulation des différentes traces cinétiques conduit à une observation intéressante. On peut illustrer la qualité d'une simulation en représentant les écarts d'intensités de fluorescence de chaque mesures cinétiques par rapport à la valeur proposée par la fonction. On appelle cette représentation « résiduel de la fonction ». La figure 22 présente les résiduels des traces cinétiques pour 3 expériences de renaturation à basse concentration de dénaturant ($< 1,0$ M). On remarque que la qualité de la simulation de la phase rapide par une fonction exponentielle simple diminue à basse concentration de dénaturant suggérant ainsi la présence d'une autre phase.

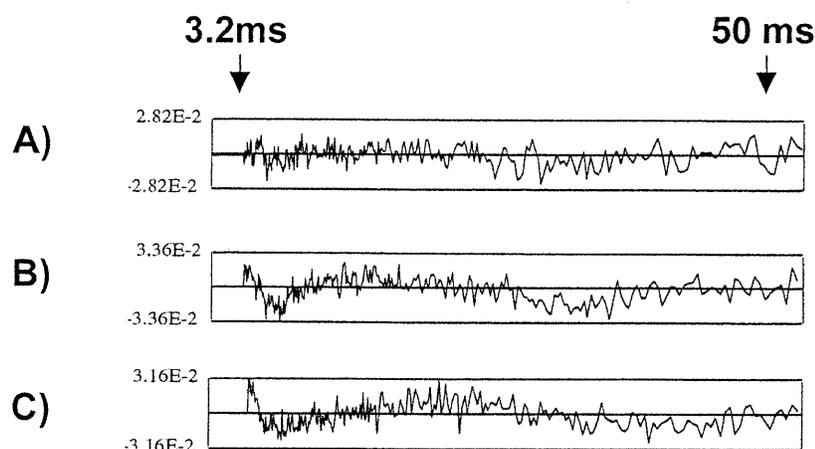


FIGURE 22 : Résiduels de traces cinétiques de renaturation (phase rapide) à différentes concentration de dénaturant. A) 1,0 M, B) 0,50 M et C) 0,39 M de Gdn-HCl. La fonction utilisée (simple exponentielle pour la phase rapide) fut optimisé par analyse de régression non-linéaire pour obtenir la meilleure simulation.

On peut également représenter la qualité de la meilleure simulation d'une trace en utilisant la variance normalisée des valeurs de fluorescence pour laquelle la fonction représente la moyenne. La figure 23 montre la variance obtenue pour la modélisation des traces cinétiques de renaturation pour l'intervalle de concentration de Gdn-HCl allant de 0,39 M à 2,18 M. La déviation de la vitesse de repliement d'un système à deux états à basse concentration de dénaturant semble ainsi corrélée à une réduction de la qualité de la meilleure simulation de la phase rapide. Une fonction à deux exponentielles fut également utilisée de manière à vérifier si la perturbation de la relaxation ne serait pas attribuable à la présence d'une autre transition. Cependant, bien que la modélisation à deux exponentielles se soit révélé davantage approprié pour les traces à plus faibles concentrations de Gdn-HCl ($< 0,50$ M), il s'avère peu reproductible.

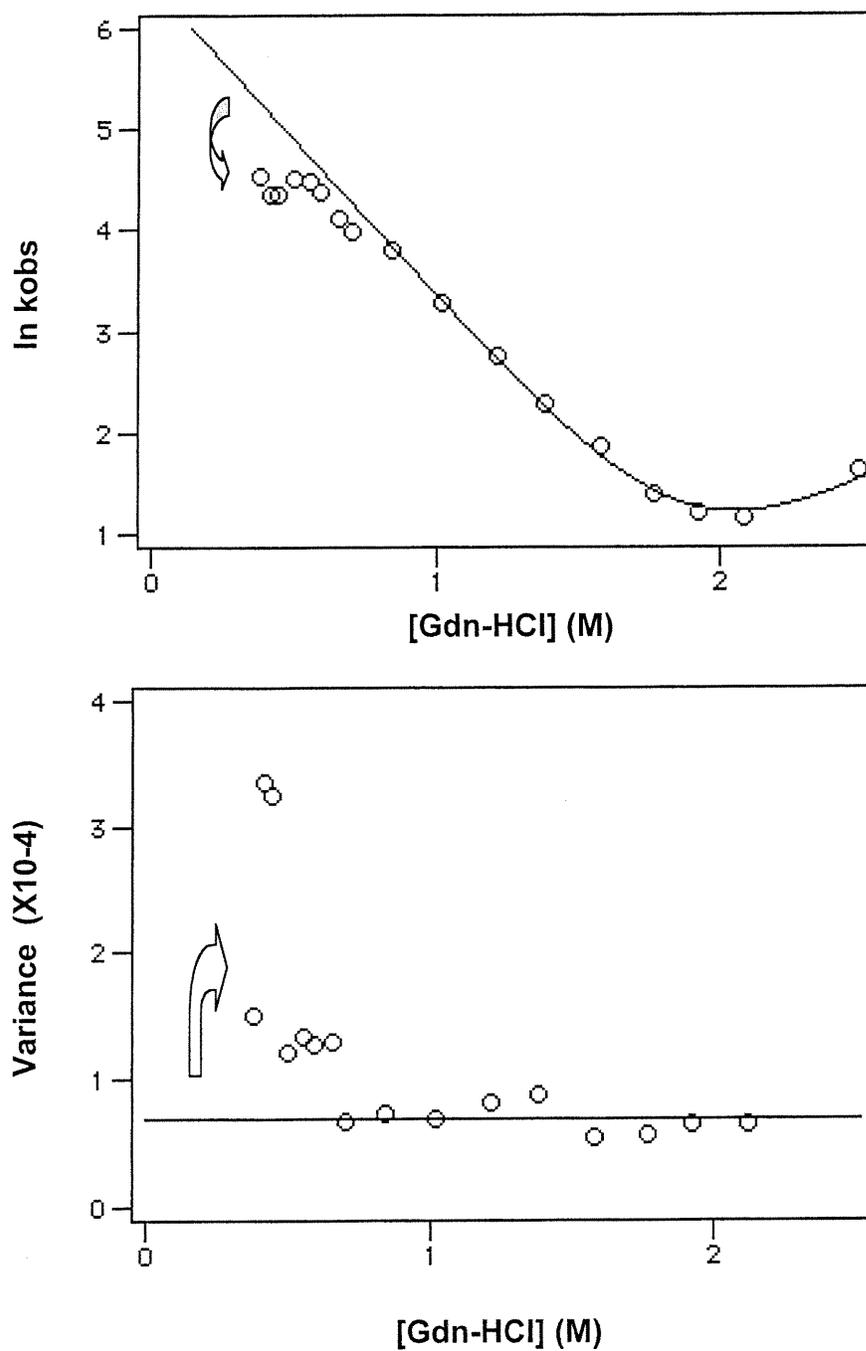


FIGURE 23 : Corrélation entre la déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états et la variance tirée de la fonction modélisant la trace cinétique. La ligne solide donne la valeur moyenne de la variance pour les traces cinétiques allant de 0,84 M à 2,18 M. Les flèches indiquent la dite corrélation.

CHAPITRE 5

Étude cinétique : B) Saut de pH

Une des limites imposée par la méthode de renaturation par saut de dénaturant est la présence minimale d'une certaine quantité de dénaturant au sein de la solution de repliement (~0,4 M de Gdn-HCl pour un mixage 1:10 d'une solution dénaturante à 4 M). Dans le cas de la renaturation du DLR de Raf, il serait avantageux de pouvoir étudier la cinétique de repliement de la protéine à des concentrations de Gdn-HCl inférieures à 0,39 M de manière à approfondir les corrélations entourant la déviation de la vitesse de repliement d'un système à deux états à basse concentration de dénaturant. Il existe des méthodes alternatives permettant d'induire la dénaturation réversible d'une protéine en l'absence de dénaturant. Parmi les plus utilisées, notons les conditions de température, de pression, d'acidité ainsi que d'alcalinité élevées. Les sauts de pH représentent une réaction de choix pour la présente étude puisqu'il font également appel à une réaction de mixage à haute vitesse de 2 solutions. En plus de permettre l'étude du repliement de protéines à basse concentration de dénaturant, les sauts de pH possèdent également l'avantage de pouvoir être effectués à partir de mixage 1 : 1 ceci permettant d'augmenter la concentration de la protéine finale ainsi que de diminuer le temps mort de l'appareil en employant une pression plus élevée lors du mixage des deux solutions [75].

Contrairement à la dénaturation par dénaturant qui procède par la stabilisation de l'état dénaturé via ses résidus hydrophobes, la dénaturation par pH implique, quant à elle, une déstabilisation de la forme native via l'ionisation des acides aminés de la protéine. La dénaturation acide est provoquée par la protonation des résidus aspartates, glutamates et les fonctions carboxyliques de la chaîne principale des acides aminés dont le pKa se situe entre 1,8 et 2,46. La dénaturation alcaline est induite par la déprotonation des résidus lysines, tyrosines, arginines et des fonctions aminés de la chaîne principale des acides aminés (pka 8,99 à 10,70). Malgré que le saut de pH ne soit utilisé que de façon

sporadique dans la littérature, il s'est cependant avéré utile pour l'étude de quelques protéines dont entre autre, CI2, FKBP ainsi que le cytochrome c [20, 57, 76].

5.1 Comparaison entre les ensembles dénaturés par acide et par Gdn-HCl par mesure de la vitesse de renaturation des deux formes.

Avant d'entamer l'étude de la renaturation du DLR de Raf par saut de pH, il est cependant essentiel de vérifier que le repliement de la protéine procède bien de façon analogue qu'elle soit renaturée à partir de la forme dépliée par dénaturant ou de celle dépliée par pH. Pour ce faire, trois expériences de renaturation seront menées dans des conditions natives similaires à partir des formes dénaturées par acide, par base ainsi que par dénaturant. La différence d'énergie entre l'état dénaturé et l'état de transition pour un modèle de repliement à deux états représente l'énergie d'activation de la réaction de repliement. Cette énergie d'activation, E_a , est liée à la vitesse de repliement, k , selon l'équation :

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (10)$$

où A est une constante mieux connue sous le nom de facteur de fréquence, RT étant le produit de la constante des gaz parfaits avec la température. On peut comparer de manière quantitative l'énergie des états dénaturés par différentes conditions (dénaturant, pH etc...) en comparant la vitesse de renaturation de ces différentes formes dans un même environnement en assumant que l'énergie de l'état de transition est indépendante de celle de la forme dénaturée et identique pour une même protéine dans les mêmes conditions de repliement.

Des expériences de renaturation ont été effectuées à partir des formes dénaturée par acide (pH 1,6), par base (pH 12,0) ainsi que par dénaturant (4,0 M de Gdn-HCl) dans

des conditions natives finales identiques (1,0 M Gdn-HCl, 25 mM tampon d'acétate de sodium pH 5,0 et 1mM DTT). De ces trois renaturations, celles provenant des formes dénaturées par acide et dénaturant affectent les trois phases caractéristiques décrites plus avant (section 4.1.1) tandis que celle provenant de la forme dénaturée par base apparaît lente et monophasique (données non présentées). Le tableau VI présente les vitesses de relaxations des trois phases tirées des expériences de renaturation à partir de l'état dénaturé par acide ou dénaturant. La comparaison du profil cinétique de ces 2 renaturations, par leur similitude, suggère que l'état dénaturé par acide et dénaturant s'avèrent tout deux similaires en énergie et affectent la même hétérogénéité de population. Cette observation rend possible l'utilisation de saut de pH pour l'étude de la corrélation entourant la déviation de vitesse d'un système à deux états à faible concentration de dénaturant.

TABLEAU VI: Vitesses et amplitudes pour les trois phases observées lors de la renaturation des formes dénaturées par acide (pH) et par dénaturant (D) à 1M de Gdn-HCl, pH 5,0.

	Phase rapide		Phase médiane		Phase lente	
	pH	D	pH	D	pH	D
Vitesse (s^{-1})	25,3	26,8	8,1	5,7	0.17	0.24
Amplitude	76%	77%	14%	10%	10%	13%

Le saut de dénaturant fut effectué à l'aide d'un mixage 1 :10 à partir d'un échantillon de protéine dénaturé à 4 M de Gdn-HCl tandis que le saut de pH fut effectué par un mixage de 1 :1 en tamponnant un échantillon de protéine à pH 1,6 à pH 5,0 (voir matériel et méthode).

5.2 Repliement sans dénaturant: présence de deux transitions distinctes dans la phase rapide.

À l'aide du saut de pH, il est désormais possible d'étudier la renaturation du DLR de Raf en absence de dénaturant. À partir de la forme dénaturée par acide de la protéine.

La phase rapide obtenue suivant la renaturation de la protéine à 0M de Gdn-HCl est cependant difficilement représentée à l'aide d'une simple exponentielle comme en témoigne le résiduel montré à la figure 24A (une phase de 94 s^{-1} d'amplitude 1,01) . Une fonction comportant 2 exponentielles semble, quant à elle, davantage appropriée pour représenter le phénomène de relaxation entourant la renaturation de la protéine à basse concentration de dénaturant (voir résiduel figure 24B) comme en témoigne sa variance, trois fois plus petite que celle obtenue de la fonction à une exponentielle. La fonction à double exponentielle suggère ainsi la présence d'une **phase très rapide** à 390 s^{-1} d'une

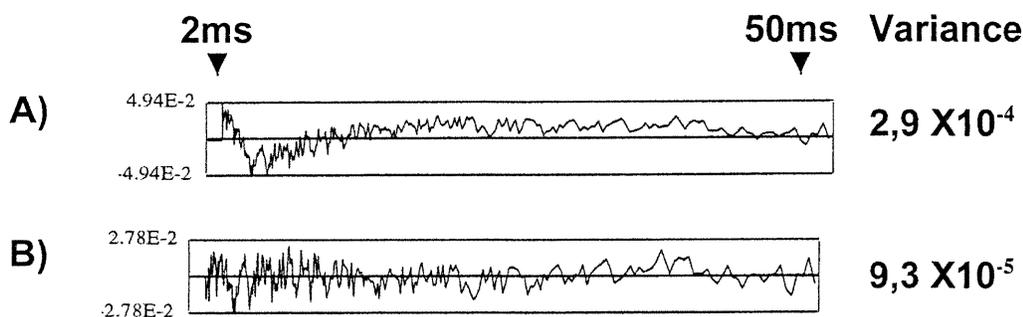


FIGURE 24 : Modélisation à simple (A) et double exponentielle (B) de la phase rapide pour la renaturation du DLR de Raf en absence de dénaturant (25 mM d'acétate de sodium à pH 5,0 avec 1mM DTT) . Les paramètres optimaux obtenus pour la fonction à simple exponentielle sont de 94 s^{-1} pour une amplitude de 1,01 tandis que ceux obtenus pour la fonction à 2 exponentielles sont de 390 s^{-1} pour la phase la plus rapide avec une amplitude de 0,43 et de 77 s^{-1} pour la seconde phase d'une amplitude de 0,80. La trace obtenu représente une moyenne de trois acquisitions. La concentration de protéine utilisée est d'environ 50 μM .

amplitude de 0,43 ainsi que d'une autre plus lente à 77 s^{-1} d'une amplitude de 0,80. À noter que la présence de la **phase très rapide** permet l'ajout d'un signal de fluorescence supplémentaire à la phase rapide lorsque comparé à l'amplitude obtenu de la fonction à une exponentielle (1,23 contre 1,01). Les sections qui suivent présentent la dépendance au Gdn-HCl de ces deux phases (appelées **phases très rapides et phases rapides**) à basse concentration de dénaturant ainsi que l'intensité de fluorescence au temps initial tirée de l'analyse biphasique de la phase rapide suivant une renaturation par saut de pH.

5.3 Courbe de chevron du repliement par saut de pH: analyse biphasique VS analyse monophasique de la phase rapide.

Les vitesses des deux phases rapides observées à basse concentration de Gdn-HCl par saut de pH (section 5.2) furent portées sur la courbe de chevron du DLR de Raf. La figure 25 présente les vitesses de relaxation observées pour la phase rapide lors des expériences de renaturation par saut de pH (25A : analyse monophasique, modélisation simple exponentielle ; 25B, analyse biphasique, modélisation double exponentielle) combinées à la courbe de chevron telle que déterminée par saut de dénaturant. L'analyse monophasique de la phase rapide révèle une déviation négative marquée de la vitesse observée d'un modèle à deux états (ligne solide) à basse concentration de dénaturant comme celle observée pour les sauts de dénaturant (figure 25A). Cependant, l'analyse biphasique de la même phase rapide suggère la présence d'une transition très rapide dont la vitesse de repliement, en fonction de la concentration de dénaturant, rappelle les caractéristiques énergétiques de la transition « état dénaturé / état de transition » (figure 25B). En effet, les vitesses observées pour cette **phase très rapide** révèlent une énergie d'activation ainsi qu'une valeur de m_f sensiblement similaire aux paramètres qu'affecterait la cinétique de renaturation du DLR de Raf pour un modèle à deux états (ligne solide). Cependant, la vitesse de la seconde phase, moins rapide, semble demeurer constante en fonction de la concentration de dénaturant. La fonction de la meilleure simulation à double exponentielle s'avère inutile à des concentration de Gdn-HCl plus élevée que 0,55M.

5.4 Variabilité des amplitudes des 2 transitions observées dans la phase rapide en fonction de la concentration de dénaturant.

L'influence du dénaturant sur l'amplitude des deux phases composant la phase rapide, tel que caractérisée à partir de la fonction de simulation à deux exponentielles, fut étudiée à basse concentration de dénaturant. La figure 26 présente l'amplitude obtenue pour chacune des 2 phases composant la phase rapide en fonction de la concentration de Gdn-HCl (analyse biphasique): la **phase rapide** et la **phase très rapide**.

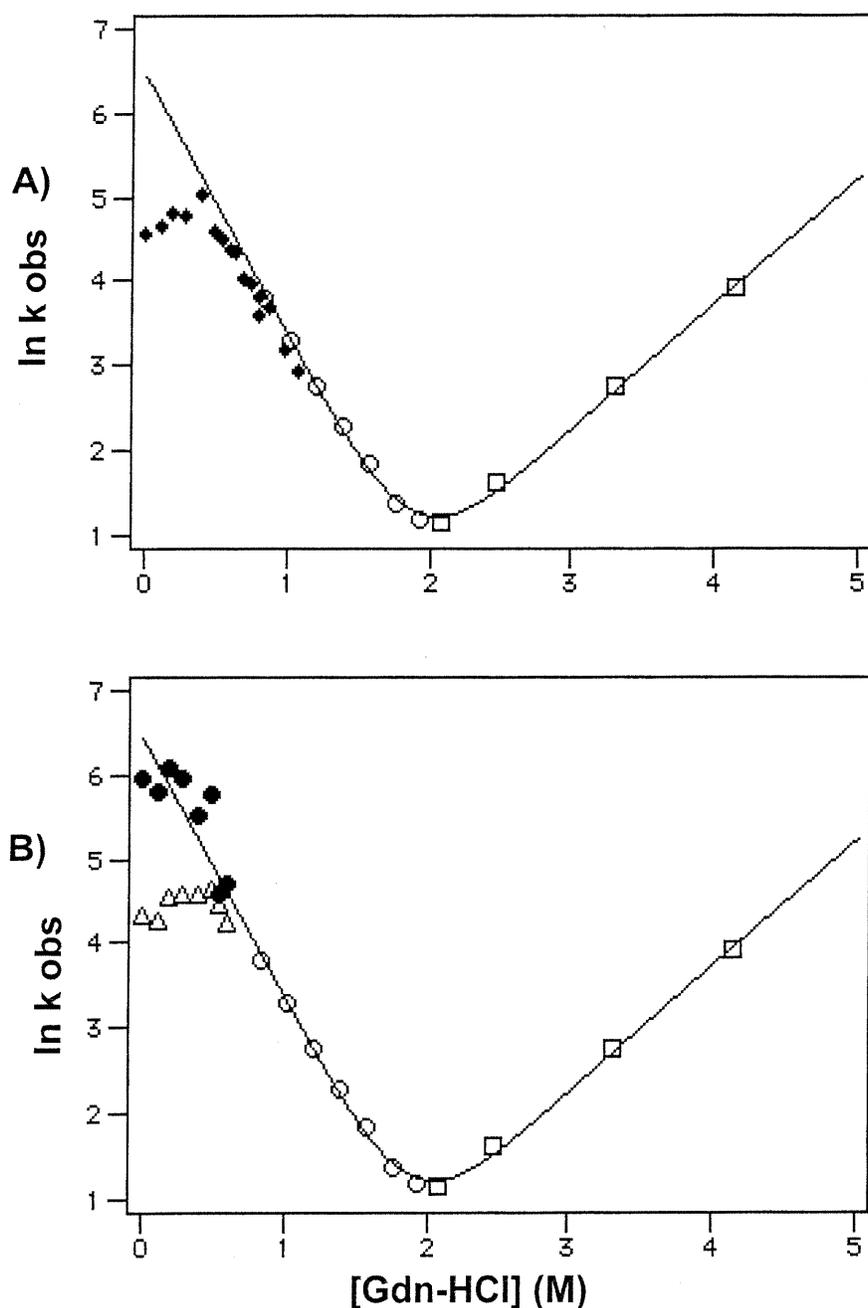


FIGURE 25 : Variation du logarithme naturel des vitesses de relaxations observées ($\ln k_{obs}$) lors des sauts de pH en fonction de la concentration de Gdn-HCl. A) Simulation à simple exponentiel de la phase rapide (\blacklozenge). B) Simulation à double exponentielle de la phase rapide : phases très rapide (\bullet) et rapide (\triangle). La courbe de chevron du DLR de Raf tirée des sauts de dénaturant est représentée par la ligne solide (vitesses observées de repliement (\circ) et de dépliement (\square) pour saut de dénaturant).

De manière générale, les amplitudes de chacune des deux phases semblent peu affectées par la concentration de dénaturant à faible concentration ($\leq 0,3$ M Gdn-HCl) affectant respectivement 40% et 60% (+/- 5 %) pour les phases très rapide et rapide. Toutefois, à plus forte concentration de dénaturant ($\geq 0,4$ M Gdn-HCl) celles-ci apparaissent moins constantes. Cette observation peut être attribuable à la convergence de la valeur des vitesses des deux phases qui se confondent aux abords de 0,60 M de Gdn-HCl. L'amplitude totale suivant l'analyse biphasique s'avère, quant à elle, supérieure à celle suggérée par l'analyse monophasique à basse concentration de dénaturant.

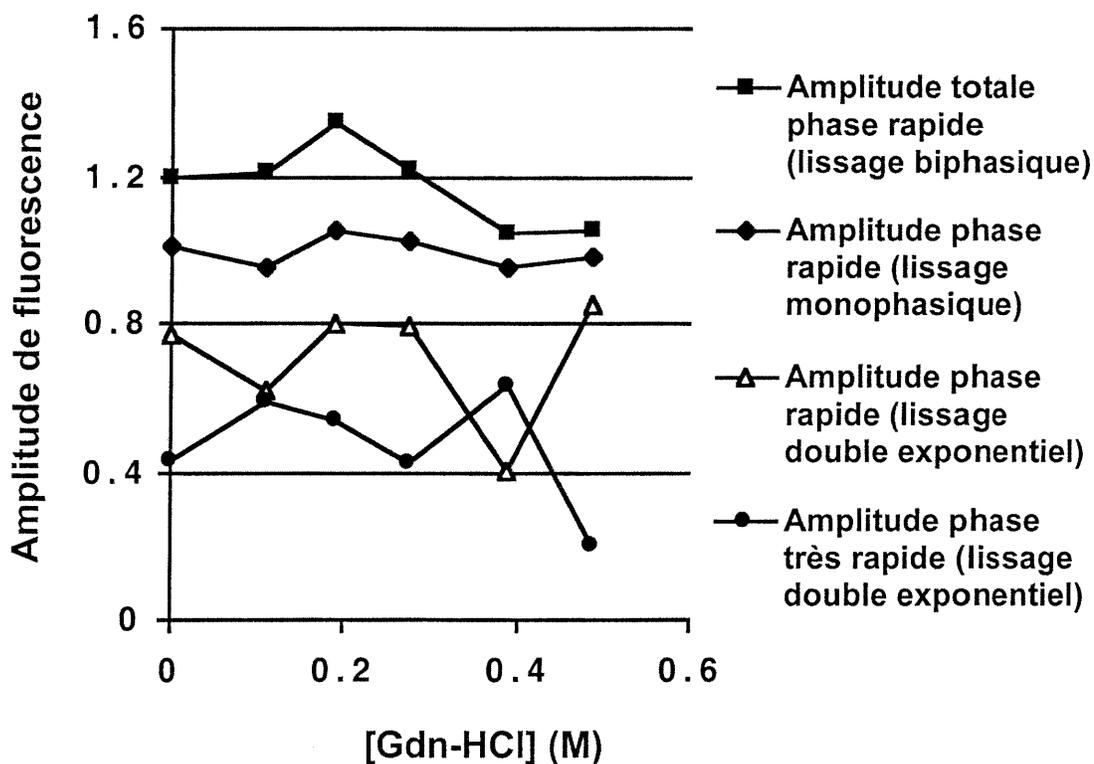


FIGURE 26 : Variation des amplitudes pour les phases rapide (Δ) et très rapide (\bullet) telles que déterminées par la meilleure fonction de simulation à double exponentielle. Les amplitudes totale de la phase rapide calculées par analyse monophasique (\blacklozenge) ainsi que par analyse biphasique (\blacksquare) sont également représentées.

5.5 Signal de fluorescence au temps initial suivant une analyse monophasique et biphasique de la phase rapide

L'analyse biphasique de la phase rapide suggère une amplitude de repliement supérieure à celle déterminée par la simulation monophasique (section 5.4). La figure 27 présente les valeurs de fluorescence extrapolées au temps initial de la réaction pour l'analyse monophasique (27A) et biphasique (27B) des traces de renaturation des expériences de saut de pH. L'analyse monophasique de la phase rapide révèle un signal de fluorescence au temps initial plus élevé que celui devant correspondre à l'état dénaturé à basse concentration de dénaturant ($\leq 0,30\text{M Gdn-HCl}$). Toutefois, l'analyse biphasique de la phase rapide permet d'extrapoler un signal au temps initial relativement similaire à celui de la forme dénaturé. Ainsi, la perte d'amplitude de fluorescence au temps initial de la réaction semble attribuable à la présence d'une phase très rapide dont l'énergie d'activation reflète bien celle de la transition « état dénaturé / état de transition ».

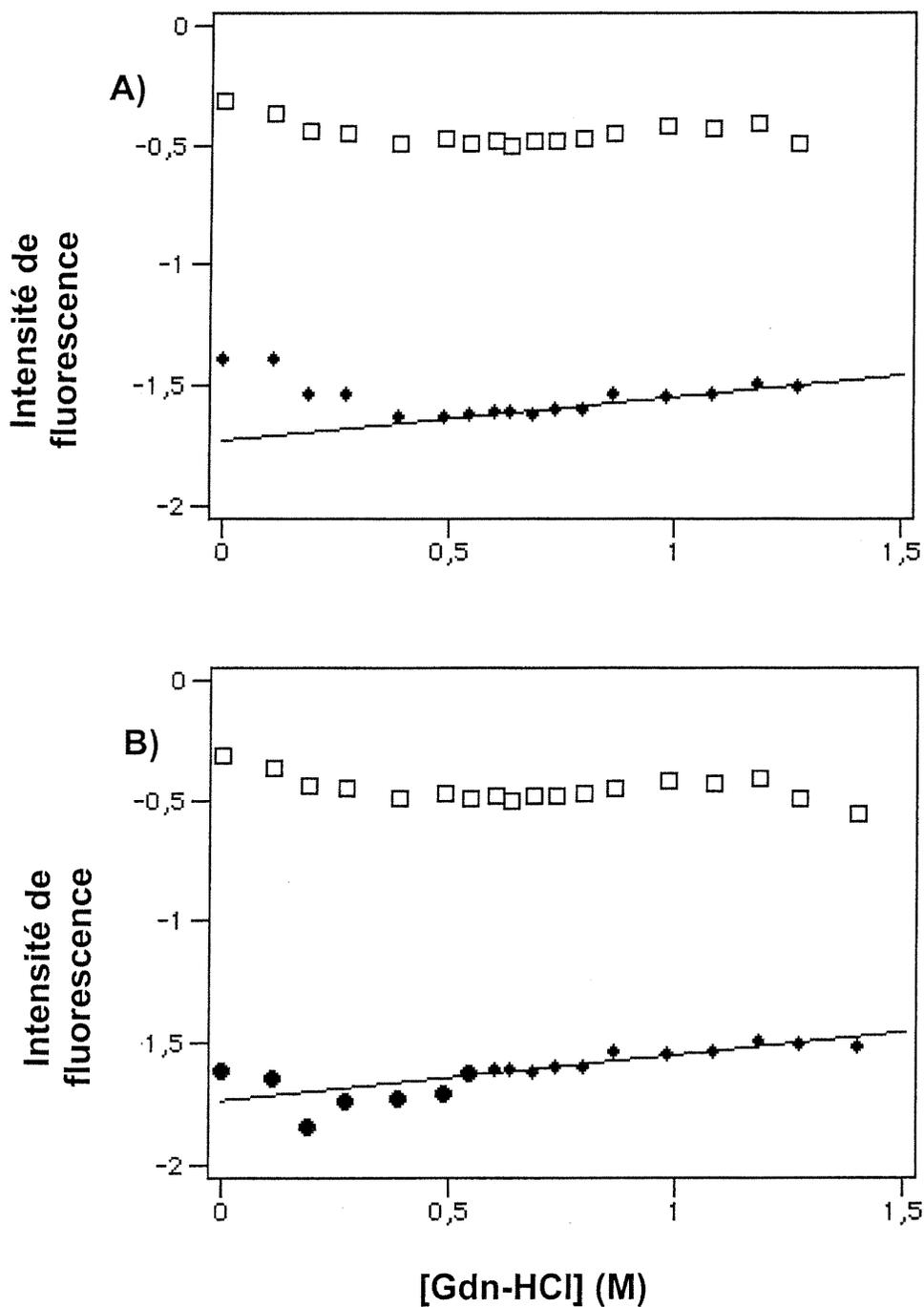


FIGURE 27 : Intensité de fluorescence extrapolée au temps initial de la renaturation du DLR de Raf à différentes concentrations de dénaturant pour une analyse monophasique (A : ◆) et biphasique de la phase rapide (B : ●). Les valeurs de fluorescence à équilibre sont représentées par des carrés ouverts. La ligne solide représente la meilleure simulation linéaire pour l'intensité de fluorescence de l'état dénaturé pour l'intervalle allant de 0,55 M à 1,40 M de Gdn-HCl.

CHAPITRE 6

Effet de la température sur le repliement du DLR de Raf

Les expériences effectuées sur le repliement de l'ubiquitine à 8°C permirent de mettre à jour une condition à laquelle la protéine se replie selon un mécanisme apparent à deux états [12]. La stabilisation de l'intermédiaire étant principalement attribuée à la force hydrophobe, l'effet de la température fut interprétée comme une condition permettant de déstabiliser celui-ci. La section qui suit présente des expériences de renaturation du DLR de Raf effectuées en absence de dénaturant (saut de pH) à différentes températures de manière à vérifier l'effet de celles-ci sur la vitesse des différentes phases observées.

6.1 Variation de la vitesse des différentes phases observées lors du repliement du DLR de Raf en fonction de la température.

La figure 28 présente l'effet de la température sur la vitesse des 4 phases observées lors de la renaturation du DLR de Raf (deux phases rapides et deux phases lentes associées aux prolines). Le fait marquant de cette figure consiste en la disparition de la phase très rapide avec l'augmentation de la température. Cette observation est sans doute attribuable à la limite de l'appareil de mixage qui comporte un temps mort de 2 ms. L'augmentation de la vitesse de la **phase très rapide** combinée à l'augmentation de celle de la **phase rapide** contribue à dissimuler la première dans le temps mort de l'appareil. Les amplitudes relatives des **phases très rapide** et **rapide** qui composent la transition principale restent très constantes en fonction de la température oscillant respectivement autour de 35% et 65% (+/-3% à $T \leq 25^\circ\text{C}$). À noter que les vitesses des deux phases lentes semblent davantage affectées par la diminution de la température ceci s'accordant bien avec les caractéristiques thermodynamiques prédites pour l'isomérisation *cis-trans* de prolines.

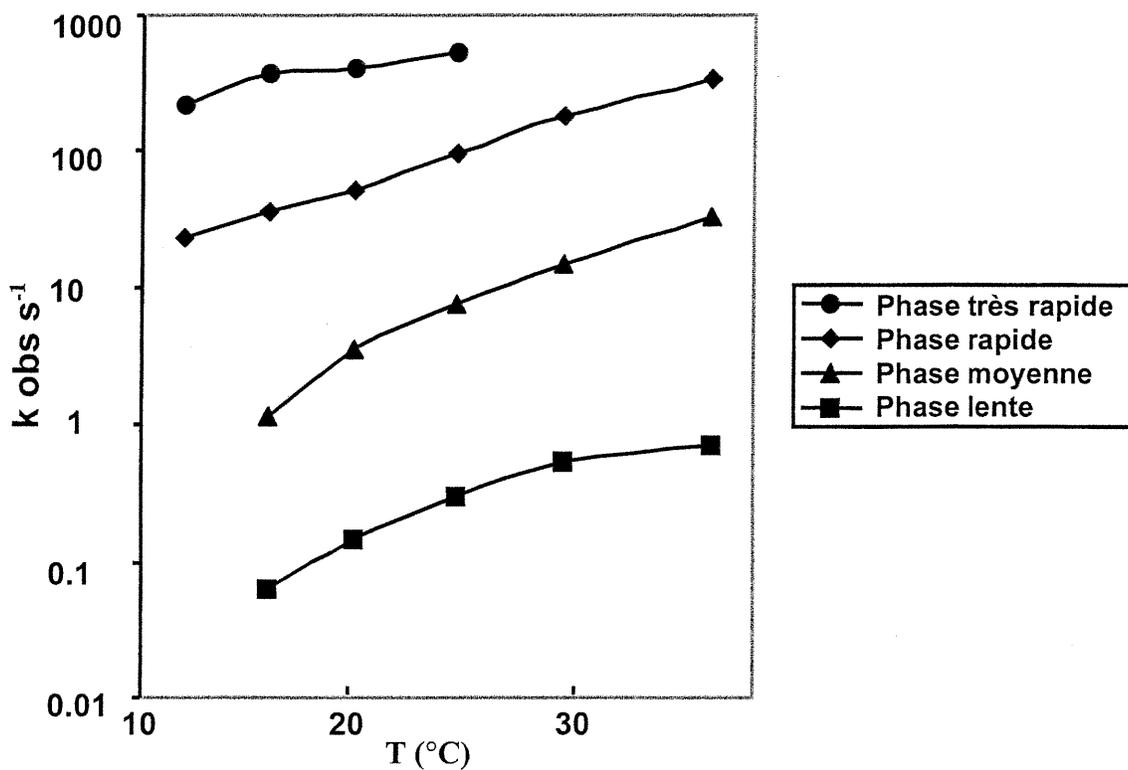


FIGURE 28 : Dépendance de la vitesse des différentes phases observées lors de la renaturation du DLR de Raf en fonction de la température. La renaturation fut effectuée par saut de pH dans une condition finale de 25 mM d'acétate de sodium pH 5,0 avec 1mM de DTT. Une simulation à double exponentielles fut utilisé pour décrire la phase rapide (phase très rapide et rapide).

CHAPITRE 7

Discussion

7.1 Caractérisation du mécanisme de repliement du DLR de Raf

7.1.1 Caractérisation spectroscopique

Le spectre de fluorescence du DLR de Raf se montre sensible aux changements conformationnels engendrés par la dénaturation de la protéine (figure 8). Les études d'équilibre et de cinétique portant sur le repliement de cette protéine pourront ainsi être suivies à l'aide de cette sonde. Le spectre RMN de proton de la forme renaturée est quand à lui identique à celui de la forme native, purifiée d'un environnement *in vivo* (figure 9). Ceci confirme que la renaturation *in vitro* du DLR de Raf mène également à la structure native de la protéine. La présence d'une sonde fluorescente sensible à sa structure combinée à la possibilité de pouvoir dénaturer la protéine de façon réversible fait du DLR de Raf un modèle de choix pour l'étude du mécanisme de repliement d'une protéine.

7.1.2 Études d'équilibre

La dénaturation au Gdn-HCl du DLR de Raf, observée l'aide de l'intensité de fluorescence et de la RMN apparaît comme procédant via deux états. La courbe d'intensité de fluorescence de la protéine en fonction de la concentration de dénaturant révèle une transition abrupte unique allant de l'intensité de fluorescence de l'état natif à celui de l'état dénaturé (figure 12). Cette transition se modèle bien à l'aide d'une analyse à deux états comme en témoigne la relation linéaire observée entre l'énergie de dépliement de la protéine et la concentration de dénaturant dans la zone de transition (figures 10 et 11). En

RMN, le spectre du proton amide du tryptophane pris au alentours du Cm de la protéine montre la présence de deux populations (figure 14). Les déplacements chimiques des protons de ces populations, 9,82 ppm et 10,08 ppm, affectent respectivement les caractéristiques de la forme native (9,73 ppm) et de la forme dénaturée (10,15 ppm) si on tient compte de l'augmentation du déplacement chimique causée par la présence du dénaturant. La disparition des pics natifs de la protéine au abord du Cm combinée à l'apparition des pics de type dénaturé suggèrent que la transition observée représente bien un phénomène global et coopératif (données non présentées).

Bien que la structure du DLR de Raf soit presque identique à celle de l'ubiquitine, son énergie de dépliement dans l'eau s'avère quelque 30% moins élevé que la seconde (21,3 kJ/M pour le DLR de Raf VS 29,3 kJ/M pour l'ubiquitine). Le DLR de Raf affecte toutefois une valeur de m supérieur à celle de l'ubiquitine (11,3 kJ mol⁻¹ M⁻¹ VS 8,0 kJ mol⁻¹ M⁻¹) suggérant ainsi qu'il expose davantage de surface suivant sa dénaturation. Cette dernière observation peut être attribuable à la présence d'un petit coeur hydrophobe additionnel propre au DLR de Raf centré autours du résidus leucine 101 situé dans la boucle (voir flèche dans figure 7). Bien que la fonction de cette particularité structurale n'ait pas été caractérisée, sa présence est peut être attribuable au fait que le DLR de Raf a évolué au sein de la protéine Raf qui compte plusieurs domaines structuraux. Pour sa part, la plus grande stabilité de l'ubiquitine n'est sans doute pas étrangère à sa fonction vu l'implication de cette dernière dans les processus de dégradation cellulaire prenant place sous des conditions déstabilisantes (chocs thermiques et autres facteurs de stress).

7.1.3 Études cinétiques

Repliement triphasique: présence d'isomérisations limitant de prolines (*cis* → *trans*).

Les expériences de renaturation effectuées à différentes concentrations de Gdn-HCl montrent toutes la présence de deux transitions à faible amplitude (10% et 13% du signal) ultérieures à la transition rapide principale avec des temps de relaxation respectifs de 175 ms et 4,2s (figures 16 et 17). Les caractéristiques thermodynamiques et cinétiques propres à ces phases nous laissent croire que nous sommes en présence du phénomène d'isomérisation de proline.

Dans un premier temps, les vitesses de ces transitions mineures ne se montrent pas sensibles à la concentration de dénaturant (figure 17). Cette caractéristique semble suggérer que l'étape limitant de ces transitions n'implique pas l'enfouissement de résidus hydrophobes. De plus, l'énergie d'activation de ces transitions semble davantage sensible à la température que celle des transitions principales (figure 28) tandis que leur amplitude (10% et 13%) est caractéristique de l'équilibre *cis-trans* retrouvé sous la forme dépliée pour des peptides modèles possédant des prolines (équilibre typique ~ 0,1 à 0,3). Le DLR de Raf possède 2 résidus prolines affectant la forme *trans* dans la structure native. La présence de deux phases lentes mineures était ainsi attendue lors de la renaturation du domaine. La vitesse de la phase la plus lente semble caractéristique d'une isomérisation typique (temps de relaxation habituel : 10 s à 100 s) tandis que celle de la phase médiane apparaît trop rapide. Toutefois, des mécanismes intramoléculaires permettant de catalyser l'isomérisation des prolines ont déjà été mis en valeur. La présence d'un résidu de charge positive dans l'environnement adjacent à la fonction carbonyle de la proline constitue un mécanisme potentiel pouvant guider l'isomérisation de la proline via une attraction de type charge-dipôle [77]. Un résidu histidine possédant une charge positive potentielle en condition native se trouve à proximité de la fonction carbonyle de la proline 93 au sein de la structure du DLR de Raf. Il est intéressant de mentionner que cette association « proline - résidu chargé » est également conservée à une position correspondante chez l'ubiquitine et que la vitesse d'isomérisation du lien précédant cette proline se révèle

« anormalement » rapide (temps de relaxation = 75 ms). Le mécanisme de catalyse intramoléculaire de l'isomérisation de la proline 93 du DLR de Raf est présentement à l'étude au sein de notre laboratoire.

Repliement à deux états à forte concentration de dénaturant (> 0,84 M Gdn-HCl).

Les deux principaux critères thermodynamiques caractérisant un mécanisme de repliement à deux états sont 1) l'estimation exacte des paramètres thermodynamiques du système à partir des vitesses de repliement et de dépliement et 2) l'estimation exacte du degré de fermeture de l'état natif (valeur de m déterminée par l'expérience d'équilibre) à partir de celui calculé pour l'état de transition (expérience cinétique). Sur la base de ces critères et si l'on interprète les deux phases lentes de la renaturation comme étant des isomérisations de prolines, les résultats cinétiques obtenus pour le DLR de Raf à des concentrations de Gdn-HCl supérieures à 0,84 M suggèrent que la protéine se replie selon un mécanisme à deux états.

Dans un premier temps, les logarithmes naturels des vitesses de relaxation tirées des expériences de renaturation et de dénaturation du DLR de Raf pour des concentrations de Gdn-HCl plus élevées que 0,84 M affectent bien la forme en V caractéristique d'un système à deux états (figure 19 et 17). Les paramètres thermodynamiques déterminés à partir des paramètres cinétiques pour un système à deux états correspondent bien à ceux déterminés par les expériences d'équilibre (respectivement 21,4 kJ M⁻¹ par rapport à 21,3 kJ M⁻¹ pour le ΔG_{H_2O} ; 11,4 kJ m⁻¹M⁻¹ comparativement à 11,3 kJ m⁻¹M⁻¹ pour la valeur de m ainsi que 1,88 M contre 1,89 M pour la valeur de C_m).

La forme en V de la courbe de chevron pour un système à deux états suggère la présence d'un état de transition unique dont l'énergie, plus élevée que celle des états natif et dénaturé, varie de manière linéaire en fonction de la concentration de dénaturant avec une pente m de valeur intermédiaire à celle des 2 autres états (figure 15). La valeur de m

pour un état étant proportionnelle au degré d'ouverture de ce dernier, on peut évaluer le degré d'ouverture ou de fermeture de l'état de transition d'une réaction à deux états relativement à celui de l'état natif à partir de la variation de l'énergie d'activation de la réaction de dépliement ou de repliement en fonction de la concentration de dénaturant (RT_{md} ou RT_{mf}). La valeur RT_{mf} / m représente ainsi le degré de fermeture de l'état de transition relatif à celui de l'état natif tandis que la valeur RT_{md} / m donne plutôt le degré d'ouverture de l'état de transition relativement à la forme dénaturée – m étant proportionnel au degré d'ouverture de l'état natif suivant sa dénaturation. La valeur RT_{mf} / m calculée pour le DLR de Raf est de 0,68. Cela signifie que l'état de transition du DLR de Raf à un niveau de compaction plus proche de l'état natif que de celui de l'état dénaturé. Il n'en est pas de même pour toutes les protéines, certaines affectant un degré de compaction plus proche de l'état dénaturé (0,39 pour le répresseur λ monomérique [78]) comparativement à d'autres montrant un degré de compaction presque similaire à la forme native (0,85 pour CspB [79]). Toutefois, de manière générale, le degré de compaction de l'état de transition reste relativement similaire pour des protéines homologues ayant des mécanismes de repliement similaires [38, 40]. En ce sens, il est intéressant de constater que le degré de fermeture de l'état de transition pour le DLR de Raf, 0,68, est le même que celui déterminé pour l'ubiquitine (0,68). Bien que cette similarité de compaction entre les deux états de transition ne permette pas de conclure que l'ubiquitine et le DLR de Raf affecte le même mécanisme de repliement, elle en suggère toutefois la possibilité.

Enfin, il est intéressant de mentionner que la différence de stabilité entre le DLR de Raf et l'ubiquitine provient avant tout d'une plus grande vitesse de dépliement de la forme native (plus de 250 X plus rapide dans le cas DLR de Raf en absence de dénaturant) plutôt que d'une diminution de la vitesse de repliement (seulement 2,4 X plus lente que l'ubiquitine en absence de dénaturant). Cette similarité des vitesses de repliement est d'autant plus significative que les vitesses de repliement des protéines de petites tailles (62 à 107 acides aminés) oscillent entre 5 ordres de magnitude, variant de $0,23 \text{ s}^{-1}$ à $88\,000 \text{ s}^{-1}$ [11]. La similarité des vitesses de repliement des deux protéines combinée à un niveau de compaction similaire des états de transition constituent autant d'observations suggérant un mécanisme de repliement similaire pour les deux protéines.

Déviation du modèle de repliement à deux états à basse concentration de dénaturant (saut de dénaturant).

Comme pour l'ubiquitine, les vitesses de relaxation observées pour les expériences de renaturation à des concentrations de Gdn-HCl inférieures à 0,84 M montrent clairement une diminution de vitesse par rapport au modèle à deux états (figure 19). Cette déviation négative de la vitesse semble corrélée à la perte de signal dans le temps mort de l'appareil de mixage (figure 21). Toutefois, dans le cas du DLR de Raf, cette perte de signal semble en plus être associée à une diminution de la qualité de la simulation pour la phase rapide ceci laissant présager la présence d'une phase additionnelle non résolue (figure 20 et 22).

Caractérisation d'une phase très rapide responsable de la perte de signal à basse concentration de dénaturant (saut de pH).

Dans le but de caractériser la transition additionnelle observée à basse concentration de Gdn-HCl lors des expériences de renaturation par saut de dénaturant, des expériences de renaturation par saut de pH furent entreprises. Ces dernières nous permettent d'envisager une meilleure résolution des événements rapides étant donné 1) le temps de mixage plus petit permis; 2) la possibilité de replier la protéine en absence de dénaturant et 3) la plus grande concentration de protéines utilisées.

À 1,0 M de Gdn-HCl, la renaturation de la forme dénaturée par acide du DLR de Raf se révèle identique à celle de la forme dénaturée par Gdn-HCl affectant les trois phases de relaxation caractéristiques observées lors des sauts de dénaturant (tableau V). Toutefois, la renaturation lente et monophasique de la forme dépliée par base ne semble pas procéder selon le même mécanisme.

La renaturation de la forme dépliée par acide en absence de dénaturant permet de séparer la phase rapide en deux transitions : une **phase très rapide** (390 s^{-1}) responsable du retour de 35% de l'intensité de fluorescence ainsi qu'une phase plus lente, appelée **phase rapide** (77 s^{-1}) responsable du retour de 65% de l'intensité de fluorescence (figure

24) L'amplitude de celles-ci semblent relativement constante en fonction de la concentration de Gdn-HCl (respectivement 40% et 60% +/-5% pour la **phase très rapide** et la **phase rapide**, voir figure 26) jusqu'à ce qu'elles se combinent au environ de 0,8 M (figure 25B) formant ainsi une phase rapide unique montrant une vitesse de relaxation typique d'un modèle à deux états (les deux phases lentes attribuées à la présence des prolines mises à part). L'extrapolation de la valeur de fluorescence au temps initial des expériences de renaturation à l'aide de l'analyse biphasique de la phase rapide suggère que la perte du signal de fluorescence à basse concentration de dénaturant est attribuable à la présence de la **phase très rapide** (figure 27). La vitesse de relaxation de cette phase, en fonction de la concentration de Gdn-HCl, semble toutefois arborer les caractéristiques cinétiques de la transition " état dénaturé- état de transition " telles qu'observées dans la région à deux états (figure 25 B). Ainsi, il semble que la difficulté de résolution de cette **phase très rapide** lors des expériences de saut de dénaturant soit liée à: 1) au temps mort élevé de l'appareil de mixage en mode asymétrique (1:10) ainsi qu'à 2) la proximité des temps de relaxation des deux phases aux plus faibles concentrations de dénaturant possible pour la renaturation de protéines provenant de la forme dénaturée par Gdn-HCl (~0,4M). La combinaison de ces deux facteurs contribue à dissimuler la **phase très rapide** rendant ainsi l'analyse monophasique de la trace de renaturation relativement convenable. Cette analyse de la trace de renaturation basée principalement sur transition indépendante de la concentration de dénaturant, la **phase rapide**, propose alors une extrapolation à la hausse des valeurs de fluorescence au temps initial de la réaction de repliement (figure 25A).

Effet de la température

L'étude de l'effet de la température sur les vitesses de relaxation des différentes phases en absence de dénaturant met également en relief la limite de résolution de l'appareil de mixage. D'une manière générale, l'augmentation de la température du système accélère les vitesses de relaxation observées lors des expériences renaturation. L'augmentation de la vitesse de la **phase très rapide** à des vitesses supérieures à 500 s^{-1} (à $T > 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $k_{\text{obs}} > 540 \text{ s}^{-1}$) a comme conséquence de concentrer sa trace cinétique dans

le temps mort de l'appareil (2 ms) provoquant ainsi la disparition d'un signal de fluorescence correspondant. La présence d'une seconde **phase rapide** à amplitude de fluorescence supérieure ne fait que mettre en valeur la perte de signal dans le temps mort de l'appareil puisque l'analyse monophasique de celle-ci mène obligatoirement à une estimation à la baisse de l'amplitude de la trace cinétique de renaturation. Ainsi, dans le cas du repliement du DLR de Raf, une diminution de la température mène à l'observation d'une phase se comportant selon les caractéristiques d'une transition " état dénaturé / état de transition à deux états" en rendant possible sa résolution grâce à une diminution de sa vitesse de relaxation. La température ne semble pas affecter l'amplitude relative **des phases rapide et très rapide** celles-ci étant respectivement responsables du retour de 65% et 35% +/- 3% de l'intensité de fluorescence native.

7.1.4 Modèle proposé

Les évidences expérimentales présentées plus avant suggèrent que le repliement du DLR de Raf procède via un mécanisme à trois états impliquant 1) la formation d'un intermédiaire tardif stable, ultérieure à l'état de transition de type deux états, suivi de 2) un réarrangement local en périphérie du tryptophane. Le tableau VII résume les principales observations ayant mené à la formulation de ce mécanisme.

Évidence pour la formation d'un intermédiaire tardif , ultérieure à l'état de transition de type deux états.

Le retour de l'intensité de fluorescence native en deux transitions ($\approx 40\%$ et 60% de l'intensité de fluorescence de la protéine native) lors des expériences de renaturation à faible concentration de dénaturant présente la preuve la plus tangible de la présence d'un intermédiaire. Toutefois, certaines précautions doivent être prises de l'avant dans l'interprétation de ces résultats.

TABLEAU VII : Principales observations ayant menées à la formulation du mécanisme de repliement du DLR de Raf.

Observations	Commentaires
<p>En présence de dénaturant ([Gdn-HCl] >0,84 M), repliement du DLR de Raf de type deux états.</p>	<p>Implique que les énergies d'activation de part et d'autre de l'état de transition sont de types 1) É.D →É.T. pour les expériences de repliement ainsi que 2) É.N.→É.T. pour les expériences de dépliement.</p>
<p>À basse concentration de dénaturant, retour de l'intensité de la fluorescence native en deux phases : une très rapide de type É.D.→ E.T. ramenant ≈ 40% de celle-ci suivie d'une seconde transition rapide, insensible à la concentration de dénaturant, responsable du retour de ~ 60% de la fluorescence native</p>	<p>Les caractéristiques cinétique de la phase très rapide suggèrent que celle-ci est de la même nature que la transition É.D.→É.T. observée à plus forte concentration de dénaturant sans toutefois mener à la forme native (formation d'un état fluorescent à 40% de l'intensité de la forme native) . L'apparition d'une seconde transition, moins rapide que la première, et insensible à la concentration de dénaturant (phase rapide) à basse concentration de Gdn-HCl suggère la présence d'une étape limitant ultérieure à la transition É.D.→É.T. et donc la présence d'un intermédiaire cinétique.</p>
<p>Amplitudes de fluorescence des deux phases rapides indépendantes des conditions de renaturation (température et [Gdn-HCl]).</p>	<p>Suggère que les deux phases rapides sont intrinsèques au repliement de la protéine et non reliées à la formation d'intermédiaires de type « cul-de-sac ».</p>

Un des inconvénients majeurs relié à l'utilisation de la fluorescence comme sonde pour détecter un changement de conformation au sein d'une structure est que l'analyse de résultats impliquant plus de deux états nécessite le recours à certaines hypothèses. Dans le cas qui nous intéresse, cette supposition consiste à déterminer si 1) la **phase très rapide** représente une transition impliquant 100% de la population de protéine vers un état émettant 40% de l'intensité de la forme native ou 2) une transition impliquant 40% des protéines vers la forme native. Deux arguments nous font croire à la première interprétation. Dans un premier temps, l'état dénaturé est généralement accepté comme étant un ensemble thermodynamique homogène composé d'une multitude de formes dénaturées en équilibre rapide entre elles (mis à part les isomères de prolines en équilibre lent). Ainsi, serait-il fort peu probable que 40% de la forme dénaturée se replie sous la forme native via un mécanisme à deux états tandis que le reste de la population se replie par un régime indépendant de la concentration de dénaturant! Il est toutefois possible d'envisager qu'un intermédiaire de type « cul-de-sac », émettant à la manière de la forme dépliée, puisse être rapidement formé à basse concentration de dénaturant suite au mixage et que son retour sous la forme native doive se produire via une cinétique plus lente. Cette interprétation est généralement justifiée par la nature artificielle des expériences de renaturation *in vitro* qui implique un transfert de la chaîne polypeptidique complète dans un environnement natif – le repliement *in vivo* se produisant via l'ajout consécutif des acides aminés. Toutefois, si cette explication s'avérait exacte, une variation de l'amplitude de cette phase serait sans doute observée suivant un changement des conditions de renaturation (température ou concentration de dénaturant) ce qui n'est pas le cas.

La portion gauche de la figure 29 présente le mécanisme de la formation de l'intermédiaire dont l'émission de fluorescence est à 40% de l'intensité de la forme native. À 1,0 M de Gdn-HCl, l'étape limitant de la réaction de repliement consiste donc en la formation de l'intermédiaire tandis qu'à plus faible concentration de dénaturant, la présence d'une étape limitant en aval de ce dernier est révélée par l'accélération dramatique de la vitesse d'apparition de l'intermédiaire. On qualifie de tardif l'intermédiaire cinétique observé lors du repliement du DLR de Raf puisque ce dernier est situé en aval de l'état de transition de type deux états (voir figure 6 et figure 30).

Réarrangement « état intermédiaire / état natif » localisé en périphérie du tryptophane.

L'accumulation de l'intermédiaire à faible concentration de dénaturant est attribuable à la présence d'une étape limitant située en aval de ce dernier dans le profil de la réaction de repliement. La nature de cet événement ne semble pas impliquer de variation majeure dans le degré d'ouverture de la protéine étant donné l'invariabilité de l'énergie d'activation de cette transition en fonction de la concentration de dénaturant (la valeur m de l'intermédiaire et de l'état de transition en aval de ce dernier étant similaire). La partie de droite de la figure 29 illustre le profil énergétique de ce réarrangement pour des concentrations de Gdn-HCl de 0 M et 1 M.

Un des résultats les plus surprenants liés à la présence de l'intermédiaire tardif est que ce dernier ne semble pas être détecté par les vitesses de relaxation de dépliement de la protéine. En effet, la grande similitude existant entre les paramètres thermodynamiques déterminés par les expériences d'équilibre et les expériences cinétiques indique que la barrière d'activation liée au dépliement de la protéine est caractéristique de la transition « forme native / état de transition à deux états ». Cette observation semble suggérer que la formation des contacts additionnels, liés au retour de 60% de l'intensité de la fluorescence, ne permet pas à la protéine d'augmenter la barrière d'activation de dépliement. Le dépliement de la forme native se comporte alors de la même manière que celui de la forme intermédiaire. Ainsi, malgré que la forme native comporte en réalité une énergie plus basse que celle de la forme intermédiaire à basse concentration de dénaturant, la figure 29 les positionne toutes deux à égale distance de l'état de transition deux états dans l'échelle énergétique. Le fait que la transition « état intermédiaire / état natif » se montre responsable du retour de la majeure partie de l'intensité de fluorescence de la forme native sans affecter la stabilité globale de la protéine suggère qu'elle implique sans doute un réarrangement localisé en périphérie du tryptophane de la protéine.

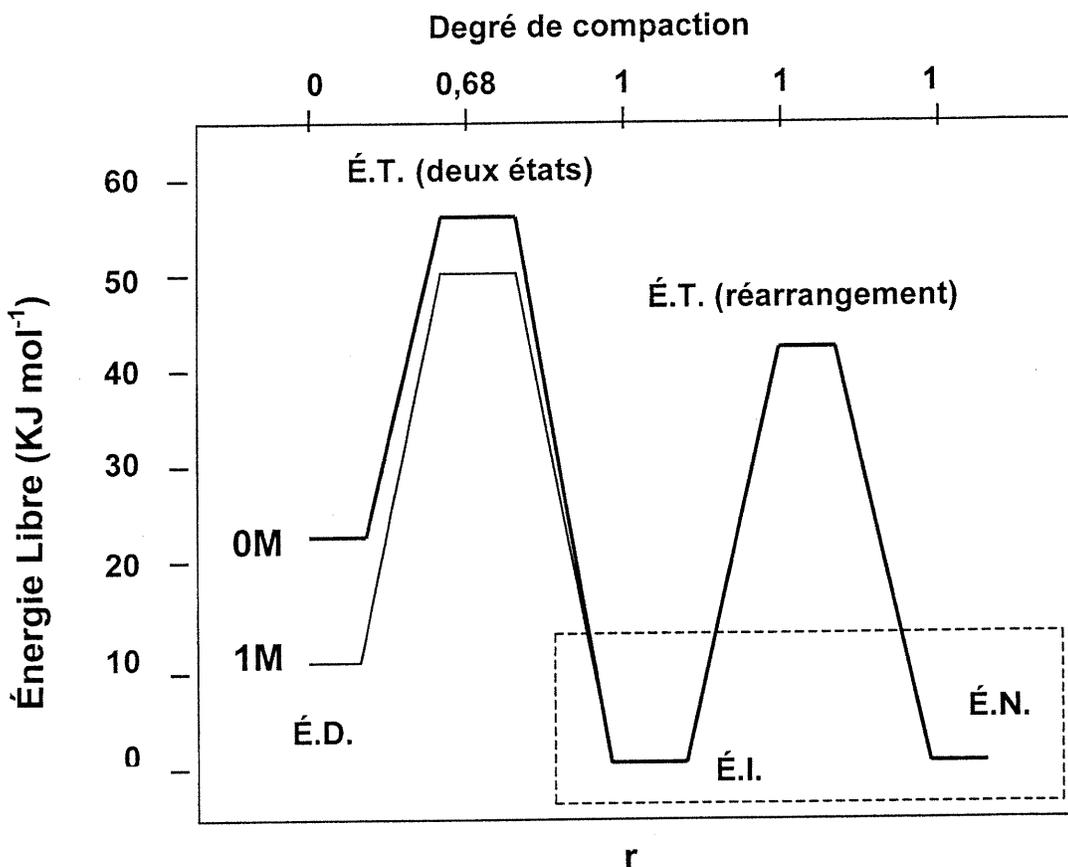


FIGURE 29 : Profil énergétique des différents états identifiés lors du repliement du DLR de Raf en fonction de la concentration de Gdn-HCl. La progression du repliement de la protéine est illustrée à l'axe des x par la variable « r » tandis que le degré de compaction de chaque état est indiqué au dessus de ceux-ci. Les valeurs d'énergie sont relatives à celle de l'état natif, considérée ici comme étant nulle et invariable en fonction de la concentration de Gdn-HCl. L'énergie de l'état dénaturé fut calculé à partir des paramètres d'équilibre tandis que l'énergie d'activation des transitions fut déterminée à partir des vitesses microscopiques en prenant comme valeur de facteur de fréquence, A , 10^{-9} s^{-1} (voir équation 10 et section 9.8.3-4). La ligne mince illustre le parcours énergétique du repliement de la protéine à 1M de Gdn-HCl où l'étape limitant de la réaction implique la formation de l'intermédiaire. La ligne grasse montre quant à elle le parcours énergétique du repliement de la protéine à 0M de Gdn-HCl où l'étape limitant de la réaction implique le réarrangement de l'intermédiaire. Bien que l'énergie de la forme native soit en fait inférieure à celle de forme intermédiaire à basse concentration de dénaturant, on les représente ici à un même niveau puisque les expériences de dénaturation ne montrent pas la présence de ce dernier (la boîte pointillée indique ici le caractère spéculatif de cette décision). À noter la variation d'énergie des différents états en fonction de la concentration de dénaturant inversement proportionnelle à leur degré de fermeture.

7.2 Comparaison du mécanisme de repliement du DLR de Raf avec celui de l'ubiquitine : mêmes résultats, différente interprétation.

En plus de mettre en valeur la relation « topologie native / mécanisme de repliement » chez la superfamille de l'ubiquitine, l'étude du mécanisme de repliement du DLR de Raf a également permis de mettre à jour une nouvelle interprétation de la corrélation « déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états avec la perte d'un signal dans le temps mort de l'appareil » observée à basse concentration de dénaturant lors de la renaturation de certaines protéines.

7.2.1 La topologie native d'une protéine détermine en grande partie son mécanisme et sa vitesse de repliement.

Malgré l'énorme divergence qui existe entre la composition en acides aminés des chaînes peptidiques du DLR de Raf ainsi que de l'ubiquitine, la similitude des résultats tirés des études de repliement de ces dernières semble suggérer qu'elles se replient selon un mécanisme commun. Cette observation consolide ainsi l'idée selon laquelle les détails atomiques de chaque acide aminé apparaissent peu déterminant dans le choix du mécanisme de repliement d'une chaîne peptidique : ce dernier étant davantage lié à la topologie générale de la protéine native. Le tableau VIII résume les principales caractéristiques expérimentales communes au repliement de l'ubiquitine ainsi que du DLR de Raf.

TABLEAU VIII : Principales caractéristiques communes au repliement du DLR de Raf et de l'ubiquitine et résultats additionnels obtenus pour le DLR de Raf.

Résultats communs au repliement du DLR de Raf et de l'ubiquitine [12]	Résultats additionnels obtenus pour le DLR de Raf
<p>1) À 25 °C, repliement de type deux états en présence de Gdn-HCl (DLR de Raf : > 0,84 M, ubiquitine : > 2,0 M), même degré de compaction de l'état de transition (0,68) et vitesse de repliement extrapolée à 0 M similaires (DLR de Raf : 630 s⁻¹, l'ubiquitine : 1530 s⁻¹).</p>	<p>1) La perte de signal dans le temps mort de l'appareil (la phase très rapide) est résolue à très faible concentration de dénaturant à l'aide de saut de pH et apparaît comme étant une transition de type É.D.→É.T. typique de la réaction à deux états..</p>
<p>2) À 25 °C, pour les expériences de saut de dénaturant, repliement en deux phases à faible concentration de dénaturant : phase très rapide, dissimulée dans le temps mort de l'appareil et phase rapide limitant insensible à la présence de dénaturant.</p>	<p>2) Une diminution de température permet de résoudre la phase très rapide présente dans le temps mort de l'appareil en augmentant son temps de relaxation .</p>
<p>3) La diminution de température permet d'observer une transition de type deux états à faible concentration de dénaturant.</p>	

7.2.2 La déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états corrélée à l'apparition d'un signal de type natif dans le temps mort de l'appareil de mixage, à faible concentration de dénaturant, est attribuée à la présence d'un intermédiaire tardif.

Les résultats obtenus suite à l'analyse du mécanisme de repliement du DLR de Raf concordent remarquablement bien à ceux tirés de l'analyse du repliement de l'ubiquitine. Toutefois, des expériences additionnelles effectuées sur le DLR de Raf permettent la proposition d'un modèle de repliement autrement différent que celui proposé pour l'ubiquitine. Le tableau VIII résume les résultats additionnels obtenus pour le DLR de Raf permettant la proposition du modèle de repliement via la formation d'un intermédiaire tardif.

Le résultat clef, qui suggère la présence d'un intermédiaire tardif dans le repliement du DLR de Raf, consiste en la résolution et la caractérisation de la **phase très rapide** dissimulée dans le temps mort de l'appareil de mixage lors des expériences de saut de dénaturant à 25 °C. Cette résolution fut rendue possible grâce 1) aux expériences de saut de pH ainsi qu'à 2) l'étude de l'effet de la température pour les expériences de renaturation en absence de dénaturant. Les sauts de pH permettent de résoudre la **phase très rapide** en rendant possible des conditions de renaturation qui offrent une claire séparation entre les temps de relaxation propres aux deux phases rapides (les deux phases étant indissociables à des concentrations de Gdn-HCl > 0,5 M). Ces expériences montrent en fait que la **phase très rapide** n'est rien d'autre que la transition de type deux états (É.D.→É.T.) menant à la formation d'une population émettant à 40% de l'intensité de la forme native (état intermédiaire). L'intermédiaire formé est alors de type tardif puisqu'il est généré ultérieurement à l'état de transition de la réaction à deux états (voir figure 6 et 30). Les études de renaturation à différentes températures permettent, quant à elles, de montrer qu'une diminution de température mène à la résolution de la **phase très rapide** via l'augmentation du temps de relaxation de celle-ci. Puisque les études portant sur

l'ubiquitine à 25 °C n'ont pas mené à la résolution de la **phase très rapide**, la perte de signal dans le temps mort de l'appareil à basse concentration de dénaturant fut attribuée à la présence d'un intermédiaire fluorescent en équilibre très rapide avec la forme dénaturée (voir figure 6 et 30). En présence de dénaturant (> 2 M de Gdn-HCl pour l'ubiquitine), le retour à un mécanisme apparent de type deux états fut alors interprété comme résultant de la déstabilisation de l'intermédiaire rapide. L'effet de la température sur le repliement de l'ubiquitine fut quant à lui seulement étudié à deux températures, 25 °C et 8 °C. Puisque la **phase très rapide** du repliement de l'ubiquitine est responsable du retour de la majorité de l'intensité de fluorescence de la protéine native, et comme la perte d'une amplitude dans le temps mort de l'appareil à 25 °C fut liée à la formation rapide d'un intermédiaire hydrophobe, alors la résolution d'une **phase très rapide** de type deux états à 8 °C suggéra aux auteurs qu'une diminution de la température résulte également en une déstabilisation de l'intermédiaire par rapport à la forme dénaturée et au retour apparent d'un mécanisme à deux états.

Dans le cas du DLR de Raf, la corrélation « déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états avec la perte d'un signal dans le temps mort de l'appareil » à basse concentration de dénaturant fut montrée comme étant liée à la présence d'un intermédiaire tardif. L'observation de cette corrélation expérimentale est en fait attribuable à 1) la limite de détection de l'appareil de mixage qui ne peut détecter la **phase très rapide** cette dernière ayant un temps de relaxation trop court (< 2 ms) et 2) une analyse monophasique de la phase rapide prenant seulement en considération la phase attribuée au réarrangement de l'intermédiaire ceci résultant en une estimation à perte de l'amplitude du signal observé lors de la renaturation à faible concentration de dénaturant. Ainsi, le lien additionnel effectué dans la présente étude est que la **phase très rapide** de type deux états observée à basse température est la même que celle menant à la formation de l'intermédiaire à 25 °C à basse concentration de dénaturant.

7.2.3 Implication de la présente étude

Une des plus importantes controverses liées à la problématique du repliement des protéines consiste à déterminer le rôle et l'importance de la formation rapide des intermédiaires hydrophobes dans la réduction de l'espace de recherche de la forme native. La présente étude permet en ce sens une importante percée puisqu'elle pose un regard nouveau sur une observation expérimentale attribuée auparavant à la présence d'intermédiaires hydrophobes. Ainsi, dans le cas du DLR de Raf, l'apparition d'un signal de fluorescence de type natif au temps initial de la réaction de repliement à faible concentration de dénaturant corrélée à une déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états, est interprétée à l'aide du modèle de l'intermédiaire tardif. La figure 30 illustre la différence inhérente aux deux interprétations en présentant les deux modèles à l'aide du profil énergétique de la réaction de repliement. En fait, la présence de l'intermédiaire cinétique observé lors du repliement du DLR de Raf peut-être interprété comme résultant d'une imperfection de la condensation de la structure suivant l'état de transition dans la voie de repliement de la protéine (modèle de l'intermédiaire tardif). Cette image offre un important contraste avec le rôle proposé pour l'intermédiaire hydrophobe quant à son implication dans la réduction de l'espace conformationnel tôt lors du repliement de la protéine (modèle de l'intermédiaire hydrophobe).

Dans un autre ordre d'idée, la démonstration de la présence d'intermédiaires tardifs dans le repliement de deux protéines de la superfamille de l'ubiquitine semble suggérer que le repliement de cette topologie ne puisse être effectué via une simple condensation de la chaîne polypeptidique vers son état natif (mécanisme de type deux états). Ce mécanisme contraste évidemment avec l'atteinte de la structure native en deux états pour de nombreuses autres petites protéines. L'implication de la topologie de la superfamille de l'ubiquitine quant à la présence du réarrangement suivant la condensation de la chaîne est présentement à l'étude au sein de notre laboratoire.

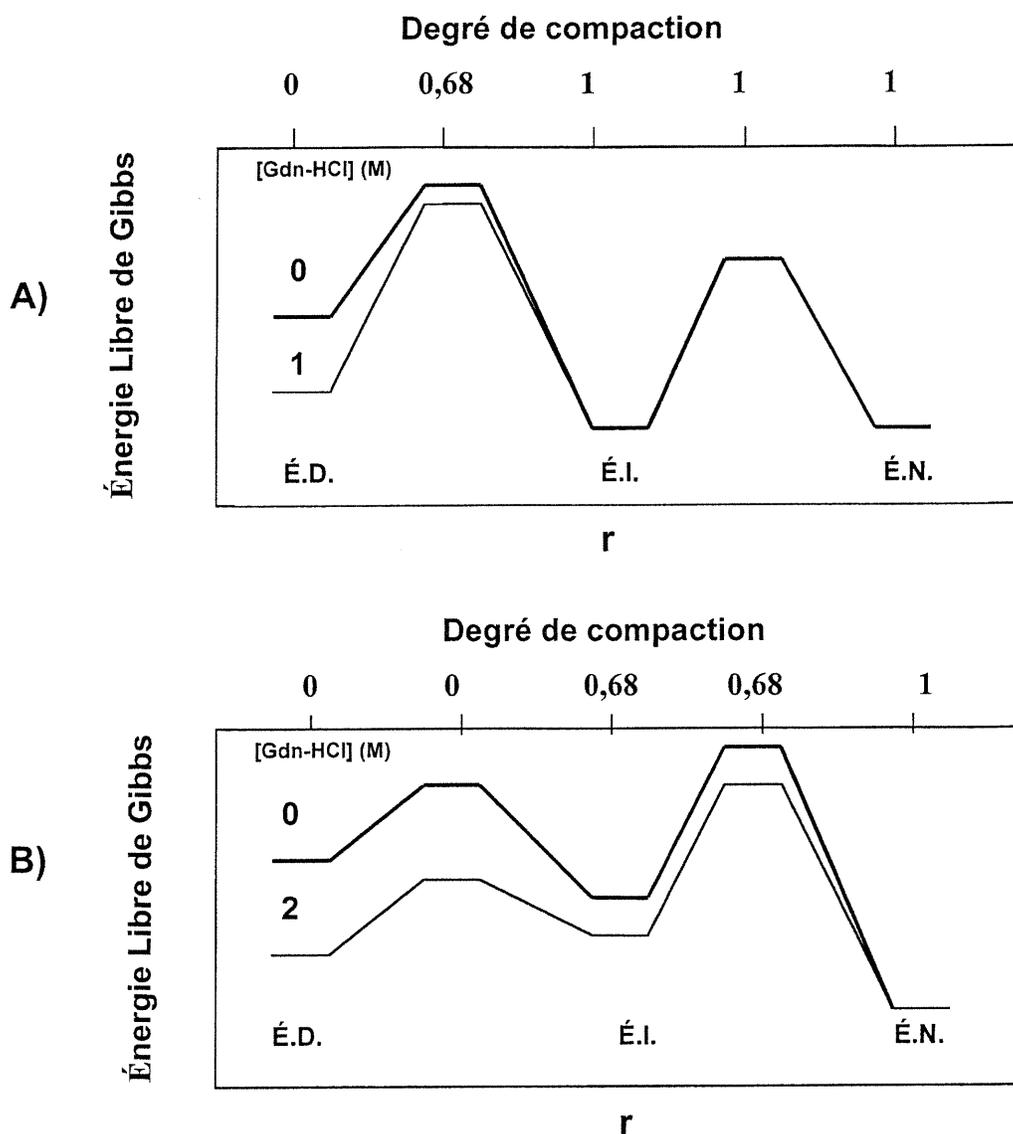


Figure 30 : Comparaison des profils énergétiques pour les modèles de repliement à intermédiaire tardif (A : DLR de Raf) et à formation rapide d'intermédiaire hydrophobe (B : ubiquitine [48]). Dans le modèle de l'intermédiaire tardif, la formation de l'intermédiaire se produit via la transition de type deux états tandis que le modèle de l'intermédiaire hydrophobe assume que cette transition s'effectue à un régime beaucoup plus rapide (trop rapide pour le temps de mixage du stopped flow). Les réarrangements, mineur pour le modèle de l'intermédiaire tardif (A : partie de droite) ainsi que majeur pour le modèle de l'intermédiaire hydrophobe sont invariables en fonction de la concentration de Gdn-HCl. Toutefois, la nature de ces intermédiaires diffère fortement par leur niveau de compaction.

CHAPITRE 8

Conclusion

L'étude du repliement du DLR de Raf a permis de mettre en valeur l'implication de la topologie native d'une protéine comme déterminant dans le mécanisme de repliement de cette dernière. En effet, malgré une identité de séquence presque nulle, l'ubiquitine et le DLR de Raf, structurellement similaires, affectent des caractéristiques de repliement presque identiques.

Toutefois, dans le cas du DLR de Raf, la corrélation observée entre la déviation négative de la vitesse de repliement d'un système à deux états et la perte de signal dans le temps mort de l'appareil de mixage à basse concentration de dénaturant fut interprétée comme résultant de la présence d'un intermédiaire tardif. Cette interprétation contraste avec celle proposée par le modèle de l'intermédiaire hydrophobe qui associe l'observation à un rôle de réduction de l'espace de recherche conformationnel. Ainsi, de manière imagée, l'intermédiaire observé lors du repliement du DLR de Raf épouse davantage l'image d'une rugosité présente dans l'entonnoir caractérisant la surface énergétique du mécanisme de repliement des protéines : le fond de l'entonnoir représentant l'énergie de la forme native.

Les conclusions tirées de l'étude du DLR de Raf présente un exemple classique où la comparaison de données et la confrontation de différents modèles mènent à la précision des interprétations de résultats expérimentaux et à la proposition de modèles plus généraux. La nature de l'intermédiaire tardif du DLR de Raf ainsi que l'implication de la topologie de la protéine en regard de sa présence est présentement à l'étude au sein de notre laboratoire.

CHAPITRE 9

Matériels et méthodes

9.1 Provenance des gènes

Le gène codant pour le DLR de Raf humain provient du laboratoire de David C. Fry du *Department of Oncology and Physical Chemistry, Roche Research Center, New Jersey, U.S.* (plasmide pDW333).

9.2 Clonage et mutations

Le gène codant pour le DLR de Raf fut amplifié par PCR [80] à l'aide des oligonucléotides 1 et 2 (1 :5' AGAGAGCGCATGCCCATGGGGAGCAACACTATCCGTGTTT 3', 2: 5' GAGAGAGCTAGCCTCGAGGAAATCTACTTGAA 3'-IDT, IA, E.U.), puis inséré via digestion avec les enzymes de restrictions *Nco 1* et *HindIII* (New England Biolab) dans un vecteur d'expression dérivé de pQE-30 (Qiagen) appelé pQE NXH. Le vecteur pQE NXH contient, entre autre, un site de digestion *Nco 1* à l'ATG initiateur de la traduction inductible à l'IPTG du plasmide - le site *Nco 1* original du plasmide ayant été enlevé à l'aide de l'enzyme Klenow (Pharmacia) puis réinséré via une PCR « méga primer » [81] à l'ATG à l'aide de l'oligonucléotide 3 (5'ATGCGATCCTCCCATGGTTAATTTCTCCTCT 3' -IDT) (voir Figure 31). Ainsi, le DLR de Raf (acides aminés 55 à 132) est exprimé avec une extension, en N terminal, de deux acides aminés (met-gly-DLR de Raf). Toutes les constructions furent vérifiées par séquençage d'ADN (MOBIX Central Facility, Ontario).

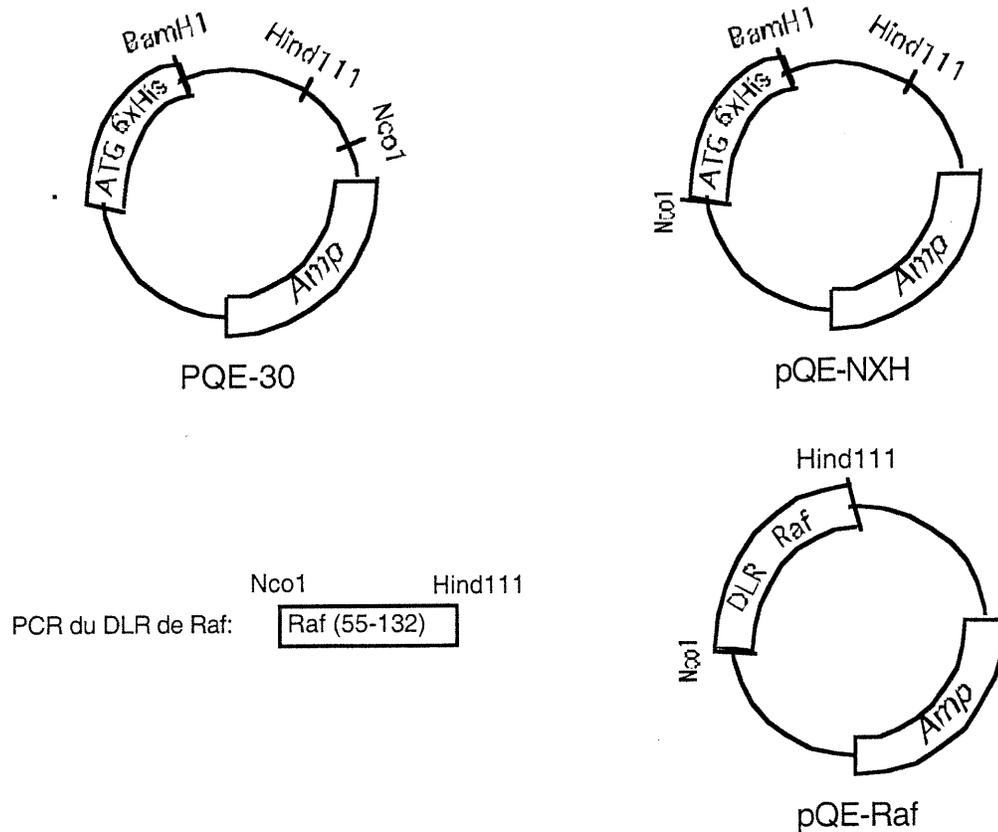


FIGURE 31 Stratégie de clonage du DLR de Raf. Le plasmide supérieur gauche représente le vecteur commercial pQE-30 de Qiagen. pQE-NXH est la version modifiée de pQE-30 sur lequel le site Nco1 fut re-localisé en amont de l'ATG initiateur. La figure en bas à gauche représente le fragment d'ADN obtenu suite à la PCR du DLR de Raf avec les oligonucléotides contenant les sites de restrictions Nco1 et Hind111 situés respectivement en amont et en aval du gène d'intérêt. pQE-Raf est le vecteur d'expression utilisé pour obtenir le DLR de Raf. Il provient de l'insertion du produit de PCR dans le vecteur pQE-NXH par les sites Nco1 et Hind111.

9.3 Expression et Purification

Pour l'expression recombinante du DLR de Raf, 1 litre de milieu TB (1,2% Bio Tryptone, 2,4% Extraits de levures, 0,4% glycérol, 0,1 M KPO_4 pH 6,0), contenant 100 ug/ml d'Ampicilline ainsi que 75 ug/ml de Kanamicyne, fut inoculé par 100 ml de cultures de nuit d' *E. coli*. BL21 (pRep4) transformée par le vecteur pQE-Raf, puis mis sous agitation (240 RPM) à 37° C. L'expression de la protéine fut induite par l'ajout de 1mM d'IPTG au moment où la croissance bactérienne était au milieu de sa phase logarithmique (D.O. du milieu à λ 600 \approx 0,7). Après cinq heures de croissance additionnelles, les bactéries furent culottées puis mise à -80°C pour la nuit (voir figure 32 : colonne A). Pour purifier le DLR de Raf, le culot de cellules fut suspendu dans le tampon A (tampon A : Tris 50 mM, 1mM DTT, pH 8,0) avec inhibiteur de protéase (PMSF 1,0 mM) sur glace, puis passé aux hautes fréquences (sonication) 3 X 30 s, par échantillon de 5 mL, à 4° C. L'extrait cellulaire résultant fut centrifugé à 4° C, 30 minute à 12 000 g. Le surnageant (voir figure 32 : colonne B) fut appliqué sur 15 mL de résine cationique (S sépharose -Pharmacia) équilibrée au tampon A dans une colonne de 2,5 cm X 15 cm (pI du DLR de Raf = 8,9). La protéine fut recueillie, en éluant par gradient de NaCl (15 mL par 50 mM), dans les fractions de 200 mM et 250 mM (\approx 30 mL de fraction contenant la protéine tel qu'observé par gel de protéine Tricine-SDS-PAGE – voir figure 32 : colonne D). La protéine fut concentrée par précipitation au sulfate d'ammonium (80% à 4°C) puis resuspendue dans le tampon B (tampon B : Acétate 25mM, 1 mM DTT, pH 5,0) dans le volume minimal (\approx 2,5 mL). Le concentré fut appliqué sur 150 ml de tapis moléculaire (Sephadex G50 -Pharmacia) préalablement équilibré au tampon B et les fractions recueillies par volume de 4 mL (débit : \approx 2 mL/min). Le DLR de Raf pur se retrouve typiquement dans les fractions allant de 25 à 30. La pureté de celles-ci fut confirmé par gel Tricine-SDS-PAGE (voir figure 32 : colonne E). La concentration de la protéine fut évaluée à partir de son absorption à $\lambda = 280$ nm selon la méthode de Gill et von Hippel [82] ($\epsilon = 5875 M^{-1}cm^{-1}$) puis l'échantillon gelé instantanément par azote liquide et entreposé à -80 °C. Un litre de culture bactérienne induite donne typiquement jusqu'à 30

mg de DLR de Raf. Le poids de la protéine sur gel ($> 3,4$ kDa, $< 14,3$ kDa) correspond bien à celui attendu (8,9 kDa).

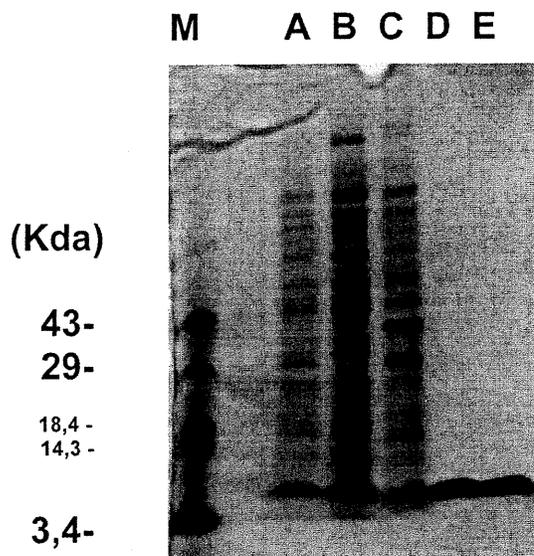


FIGURE 32 : Gel Tricine-SDS-PAGE illustrant les différentes étapes d'expression et de purification du DLR de Raf. Colonne M : marqueur de poids moléculaire; colonne A : extrait des bactéries induites; colonne B : extrait du surnageant; colonne C : protéines bactériennes non soluble ; colonne D : extrait de l'échantillon élué la colonne cationique; colonne E : extrait du DLR de Raf purifié (après le tamis moléculaire).

9.4 RMN

Tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DMX 600 MHz à 25 ° C en utilisant comme longueur d'onde porteuse celle du proton de l'eau (saturation). La longueur de l'impulsion fut déterminée pour chaque échantillon de manière à maximiser l'intensité de résonance des protons (rotation de 90° ~10 μ s). Avant de

transformer le FID, une fonction exponentielle de lissage (LB=75) fut appliquée de façon à maximiser le rapport signal/bruit. Les différents échantillons de RMN contenaient approximativement 1 mM de DLR de Raf dans 10 mM d'un tampon d'acétate deutéré (CD_3COOD – Cambridge Isotope Laboratories, Inc., É.U.) à pH 5,0, 0.1 mM DTT, 90% H_2O ainsi que 10 % D_2O (avec ou sans Gdn-HCl). Les échantillons furent concentrés par microfiltration (Ultrafree-15, Biomax 5kDa, Millipore).

9.5 Solutions de Gdn-HCl

9.5.1 Courbe d'équilibre et saut de dénaturant

Les solutions de Gdn-HCl à différentes concentrations furent préparées de façon volumétrique à partir de deux solutions parentes de 0 et 8 M de Gdn-HCl ultra pur (ICN, É.U.) contenant chacune 25 mM d'acide acétique. À partir de NaOH 5 N, chaque solution fut par la suite amenée à un pH de 5,0. Les concentrations exactes de dénaturant furent déterminées par mesure de l'indice de réfraction (réfractomètre) puis les solutions furent gelées instantanément à l'azote puis entreposées à $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pour éviter toute dégradation.

9.5.2 Saut de pH

Un soin particulier fut apporté à la préparation des solutions de Gdn-HCl allant servir à la renaturation par saut de pH de façon à assurer un pH constant pour toutes les concentrations de dénaturant. Les solutions de Gdn-HCl à différentes concentrations furent dans un premier temps préparées à partir de deux solutions parentes de 0 et 8M de Gdn-HCl sans tampon ajouté. Un poids d'acétate de sodium équivalent à 50 mM fut ensuite ajouté à chacune des solutions. Le volume de NaOH 5 N à ajouter à chaque solution fut déterminé sur une réplique de la solution finale après mixage approprié des

deux solutions à mélanger (solution finale = mixage 1 : 1 d'une solution à pH 1,6 avec 50 mM d'acétate de sodium+ dénaturant). Le volume de base à ajouter pour amener le pH de la solution finale à pH 5,0 fut ensuite ajouté à chaque solution tampon avant le début des expériences . Pour les expériences de renaturation effectuées à différentes températures, les solutions renaturantes furent préparées de façon analogue en manipulant chaque solution à la température désignée.

9.6 Fluorescence (équilibre)

Les mesures de fluorescence à équilibre furent prises à l'aide d'un fluoromètre de luminescence Perkin Elmer, modèle LS50B (cuvette 4 mm/10 mm). La longueur d'onde d'excitation, utilisée lors de la prise de spectre d'émission ainsi que pour les mesures à longueur d'onde fixe, fut 281 nm (bande passante de 2,5 nm et de 4 nm respectivement pour l'excitation et l'émission) . Les mesures d'intensité de fluorescence à longueur d'onde fixe furent effectuées à 331 nm (temps d'intégration = 10 sec.). 15 µl d'une solution du DLR de Raf à 200 µM (25 mM d'acétate de sodium pH 5,0 66mM de DTT) fut ajouté à chaque solution de Gdn-HCl (1 mL). Les solutions protéine/dénaturant furent pré-équilibrées 1h à 25 °C avant la prise des mesures.

9.7 Fluorescence (cinétique)

Toutes les cinétiques furent obtenus à l'aide d'un appareil de type « stopped flow » de la compagnie Applied Photophysics (R.U.), modèle SX.18MV (Stopped Flow Reaction Analyser), et les données analysées par le logiciel fournis par la plate-forme de travail de Applied Photophysics (Pro Kineticist version 1998). La cellule de réaction, les seringues ainsi que toutes les solutions furent maintenues à la température indiquée (25,0 °C +/- 0,1°C ou autre) à l'aide d'un bain d'eau circulant. Les mesures de fluorescence furent prises avec une longueur d'onde d'excitation de 281 nm (filtre passe bande :2 nm) tandis que l'émission était mesurée à partir d'un filtre éliminant les longueurs d'onde inférieures

320 nm. Typiquement, chaque trace cinétique est la moyenne de trois acquisitions de 1000 points disposés de manière logarithmique entre l'intervalle allant de 0 à 10 sec.

9.7.1 Saut de dénaturant

Les réactions de repliement par saut de dénaturant furent initiées en mélangeant 1 partie de protéine dépliée (300 μ M dans 4,25 M de Gdn-HCl, 25 mM acétate pH 5,0 et 5,5mM DTT) avec 10 parties de solution renaturantes de concentration croissante en Gdn-HCl (voir partie 8.5 Solutions de Gdn-HCl). Les concentrations finales de Gdn-HCl, après mélange, varient entre 0,385 et 5,0 M (tel que mesuré par calculs de dilution).

Les réactions de dépliement furent initiées en mélangeant 1 partie de protéine native (200 μ M dans 25 mM acétate pH 5,0 et DTT 5,5 M) avec 10 parties de solutions dénaturantes de concentration décroissante en Gdn-HCl (voir partie 8.7.1 Solutions de Gdn-HCl). Les concentrations finales de Gdn-HCl, après mélange, varient entre x et y M (tel que mesurées par calculs de dilution). Le temps mort de mélange pour les expériences de repliement ainsi que de dépliement pour mixage 1 :10 est de 3,2 ms tel que calculé par la réaction d'oxydation du tryptophane par le N-bromo-succinimide [83]

9.7.2 Saut de pH

Les réactions de repliement par saut de pH furent initiées en mélangeant 1 partie de protéine dépliée (100 μ M dans pH 1,6 et 2 mM DTT) avec 1 partie de solution renaturante à concentration croissante en Gdn-HCl (voir partie 8.7.2 Solutions de Gdn-HCl). Les concentrations finales de Gdn-HCl, après mélange, varient entre 0 M et 2,5 M (tel que mesuré par réfractométrie). Le temps mort de mélange pour les expériences de repliement pour mixage 1 :1 est de 2 ms tel que calculé par la réaction d'oxydation du tryptophane par le N-bromo-succinimide [83].

9.8 Analyse des données cinétiques

9.8.1 Analyse de la courbe d'équilibre

La courbe de transition à l'équilibre fut calculée par la méthode d'analyse non-linéaire de moindre carré à partir du signal de fluorescence en fonction de la concentration de dénaturant ([D]). L'équation 1 fut employée pour décrire la dépendance linéaire du ΔG de dépliement ($\Delta G_{dep.}$) de la protéine en fonction de la concentration de dénaturant :

$$\Delta G_{dep.} = \Delta G_{H_2O} - m [D] \quad (10)$$

ΔG_{H_2O} représente l'énergie de dépliement de la protéine en absence de dénaturant. On peut également associer la stabilité de la protéine à la concentration de dénaturant (C_m) nécessaire pour amener le système à deux états en équilibre ($\Delta G_{dep.}=0$) selon l'équation :

$$\Delta G_{dep} = m ([D]-C_m) \quad (11)$$

L'intensité de fluorescence de l'état natif (F_n) ainsi que celle de l'état dénaturé (F_d) furent assumées comme variant de façon linéaire avec l'ajout du dénaturant ($\alpha + \beta[D]$). Ainsi, l'énergie libre de dépliement (ΔG_{dep}) et la constante d'équilibre peuvent être déterminées à partir de l'intensité de fluorescence observée (F) ainsi que de celles attendues pour la forme native et dénaturé (F_n et F_d) selon l'équation 3.

$$K_e = (F_n - F) / (F - F_d) = \exp (-\Delta G_{dep} / RT) \quad (12)$$

L'équation 4 indique la valeur de fluorescence que prend un système à deux états en fonction de la concentration de dénaturant et des variables ci-haut mentionnées [20] :

$$F = \frac{\alpha_n + \beta_n[D] + ((\alpha_d + \beta_d[D]) \exp(m[D] - \Delta G_{H_2O})/RT)}{1 + \exp(m[D] - \Delta G_{H_2O})/RT} \quad (13)$$

où $\alpha_n + \beta_n[D]$ donne la variation de fluorescence de l'état natif en fonction de la concentration de dénaturant, $\alpha_d + \beta_d[D]$, la variation de fluorescence de l'état dénaturé en fonction de la concentration de dénaturant tandis RT est le produit de la constante des gaz avec la température du système en degré K.

9.8.2 Analyse des traces cinétiques

Les traces cinétiques furent analysées par le logiciel Pro Kineticist (version 1998), fournis par la plate-forme de travail de Applied Photophysics. La région de points correspondant au flux continu fut enlevée (0 à 3,2 ms pour mixage 1 :10 ainsi que 0 à 2,5 ms pour mixage 1 :1) et les premiers points ajustés à leur valeur absolue tel que calculé lors de la détermination du temps mort de l'appareil (2,5 ms = 2 ms pour mixage 1 :1 et 3,2 ms = 3,2 ms pour mixage 1 :10). Une fonction de simulation à simple exponentielle fut appropriée pour décrire les traces de dénaturation tandis que les expériences de renaturation nécessitèrent une fonction de simulation à 3 exponentielles (saut de dénaturant et saut de pH > 0,5M) et 4 exponentielles (saut de pH < 0,5M). L'optimisation de la simulation fut effectuée à l'aide de la méthode d'analyse non-linéaire de moindre carré.

9.8.3 Détermination des vitesses de repliement et de dépliement microscopiques à partir de la courbe de chevron.

Les vitesses de repliement de la phase rapide ainsi que les vitesses de dépliement en fonction de la concentration de dénaturant furent analysées à partir d'un modèle de repliement à deux états selon l'équation 3 :

$$\ln k_{obs} = \ln [k_{fH_2O} \exp(-mf[D]) + k_{dH_2O} \exp(md[D])] \quad (14)$$

La vitesse de relaxation observée, k_{obs} , est la somme des vitesses de repliement et de dépliement (k_f et k_d) à chaque concentration de dénaturant. Le logarithme de ces constantes de vitesse est assumé comme variant de façon linéaire en fonction de la concentration de dénaturant; les coefficients mf et md donnant respectivement la pente de cette variation. k_{fH_2O} ainsi que k_{dH_2O} sont les vitesses de repliement et dépliement de la protéine en absence de dénaturant.

9.8.4 Détermination de la vitesse microscopique du réarrangement de l'intermédiaire.

La vitesse microscopique du réarrangement de l'intermédiaire fut déterminée à partir des traces cinétiques obtenues des expériences de renaturation par saut de pH à basse concentration de dénaturant (< 0,4 M de Gdn-HCl) à partir d'une modélisation suivant le mécanisme à trois états: $D \rightarrow I \rightarrow N$. Cette modélisation fut effectuée à partir du logiciel « PC Pro-K 1996 » distribué par la compagnie Applied Photophysics. La fonction de simulation fut optimisée par intégration numérique à l'aide de l'algorithme de Marquardt-Levenberg.

RÉFÉRENCES

1. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; 181, 223-30.
2. Levinthal, C. *J. Chim. Phys* 1968; 65, 44.
3. Orengo, C.A., Bray, J.E., Hubbard, T., LoConte, L. & Sillitoe, I. Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins* 1999; 37, 149-70.
4. Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A. & Rosen, M.K. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 2000; 404, 151-8.
5. Daughdrill, G.W., Chadsey, M.S., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T. & Dahlquist, F.W. The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target, sigma 28. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4, 285-91.
6. Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I. & Wright, P.E. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93, 11504-9.
7. Rochet, J.C. & Lansbury, P., Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations [see comments]. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000; 10, 60-8.
8. Bullock, A.N., Henckel, J. & Fersht, A.R. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19, 1245-56.
9. Matouschek, A., Kellis, J., Jr., Serrano, L. & Fersht, A.R. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering [see comments]. *Nature* 1989; 340, 122-6.
10. Matouschek, A., Kellis, J., Jr., Serrano, L., Bycroft, M. & Fersht, A.R. Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature* 1990; 346, 440-5.
11. Fersht, A.R. *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding.*, W.H. Freeman and Company, New York, 1999.

12. Khorasanizadeh, S., Peters, I.D., Butt, T.R. & Roder, H. Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin. *Biochemistry* 1993; 32, 7054-63.
13. Khorasanizadeh, S., Peters, I.D. & Roder, H. Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3, 193-205.
14. Ptitsyn, O.B. [Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules]. *Dokl. Akad. Nauk. Sssr.* 1973; 210, 1213-5.
15. Ptitsyn, O.B. Kinetic and equilibrium intermediates in protein folding. *Protein Eng* 1994; 7, 593-6.
16. Kim, P.S. & Baldwin, R.L. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59, 631-60.
17. Karplus, M. & Weaver, D.L. Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci* 1994; 3, 650-68.
18. Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D. & Chan, H.S. Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci* 1995; 4, 561-602.
19. Ptitsyn, O. How molten is the molten globule? *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3, 488-90.
20. Jackson, S.E. & Fersht, A.R. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* 1991; 30, 10428-35.
21. Jackson, S.E. & Fersht, A.R. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 2. Influence of proline isomerization on the folding kinetics and thermodynamic characterization of the transition state of folding. *Biochemistry* 1991; 30, 10436-43.
22. Laidler, K.J. *Chemical Kinetics*, McGraw-Hill, New York, 1950.
23. Itzhaki, L.S., Otzen, D.E. & Fersht, A.R. The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J. Mol. Biol.* 1995; 254, 260-88.
24. Fersht, A.R. Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997; 7, 3-9.
25. Jackson, S.E. How do small single-domain proteins fold? *Fold. Des.* 1998; 3, R81-91.

26. Jennings, P.A. Speeding along the protein folding highway, are we reading the signs correctly? *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5, 846-8.
27. Yeh, S.R. & Rousseau, D.L. Hierarchical folding of cytochrome c. *Nat Struct Biol* 2000; 7, 443-5.
28. Itzhaki, L.S., Neira, J.L., Ruiz-Sanz, J., de Prat Gay, G. & Fersht, A.R. Search for nucleation sites in smaller fragments of chymotrypsin inhibitor 2. *J. Mol. Biol.* 1995; 254, 289-304.
29. De Prat Gay, G., Ruiz-Sanz, J., Neira, J.L., Itzhaki, L.S. & Fersht, A.R. Folding of a nascent polypeptide chain in vitro: cooperative formation of structure in a protein module. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92, 3683-6.
30. Tan, Y.-J. *Données non publiées.*
31. Abkevich, V.I., Gutin, A.M. & Shakhnovich, E.I. Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model. *Biochemistry* 1994; 33, 10026-36.
32. Fersht, A.R. The sixth Datta Lecture. Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase. *FEBS. Lett.* 1993; 325, 5-16.
33. Scott, J.K. & Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249, 386-90.
34. Smith, G.P. & Scott, J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993; 217, 228-57.
35. Gu, H., Yi, Q., Bray, S.T., Riddle, D.S., Shiau, A.K. & Baker, D. A phage display system for studying the sequence determinants of protein folding. *Protein Sci.* 1995; 4, 1108-17.
36. Riddle, D.S., Santiago, J.V., Bray-Hall, S.T., Doshi, N., Grantcharova, V.P., Yi, Q. & Baker, D. Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4, 805-9.
37. Kim, D.E., Gu, H. & Baker, D. The sequences of small proteins are not extensively optimized for rapid folding by natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998; 95, 4982-6.

38. Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R. & Schmid, F.X. Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5, 229-35.
39. Grantcharova, V.P. & Baker, D. Folding dynamics of the src SH3 domain. *Biochemistry* 1997; 36, 15685-92.
40. Plaxco, K.W., Gujjarro, J.I., Morton, C.J., Pitkeathly, M., Campbell, I.D. & Dobson, C.M. The folding kinetics and thermodynamics of the Fyn-SH3 domain. *Biochemistry* 1998; 37, 2529-37.
41. Viguera, A.R., Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L. & Serrano, L. Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition. *Biochemistry* 1994; 33, 2142-50.
42. Chiti, F., Taddei, N., White, P.M., Bucciantini, M., Magherini, F., Stefani, M. & Dobson, C.M. Mutational analysis of acylphosphatase suggests the importance of topology and contact order in protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6, 1005-1009.
43. Fersht, A.R. Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000; 97, 1525-9.
44. Baldwin, R.L. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold. Des.* 1996; 1, R1-8.
45. Fersht, A.R. Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92, 10869-73.
46. Creighton, T.E. How important is the molten globule for correct protein folding? *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22, 6-10.
47. Sosnick, T.R., Shtilerman, M.D., Mayne, L. & Englander, S.W. Ultrafast signals in protein folding and the polypeptide contracted state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1997; 94, 8545-50.
48. Roder, H. & Colon, W. Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997; 7, 15-28.
49. Kyte, J. *Structure in protein chemistry*. Garland publishing inc., New York & London 1995, p.445-48.

50. Gutin, A.M., Abkevich, V.I. & Shakhnovich, E.I. Is burst hydrophobic collapse necessary for protein folding? *Biochemistry* 1995; 34, 3066-76.
51. Mirny, L.A., Abkevich, V. & Shakhnovich, E.I. Universality and diversity of the protein folding scenarios: a comprehensive analysis with the aid of a lattice model. *Fold. Des.* 1996; 1, 103-16.
52. Sosnick, T.R., Mayne, L., Hiller, R. & Englander, S.W. The barriers in protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 1994; 1, 149-56.
53. Kiefhaber, T. Kinetic traps in lysozyme folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92, 9029-33.
54. Qi, P.X., Sosnick, T.R. & Englander, S.W. The burst phase in ribonuclease A folding and solvent dependence of the unfolded state [see comments]. *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5, 882-4.
55. Kuwajima, K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 1989; 6, 87-103.
56. Chaffotte, A.F., Guillou, Y. & Goldberg, M.E. Kinetic resolution of peptide bond and side chain far-UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme. *Biochemistry* 1992; 31, 9694-702.
57. Akiyama, S., Takahashi, S., Ishimori, K. & Morishima, I. Stepwise formation of alpha-helices during cytochrome c folding [see comments]. *Nat. Struct. Biol.* 2000; 7, 514-20.
58. Elove, G.A., Chaffotte, A.F., Roder, H. & Goldberg, M.E. Early steps in cytochrome c folding probed by time-resolved circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 1992; 31, 6876-83.
59. Park, S.H., O'Neil, K.T. & Roder, H. An early intermediate in the folding reaction of the B1 domain of protein G contains a native-like core. *Biochemistry* 1997; 36, 14277-83.
60. Jennings, P.A. & Wright, P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 1993; 262, 892-6.

61. Raschke, T.M. & Marqusee, S. The kinetic folding intermediate of ribonuclease H resembles the acid molten globule and partially unfolded molecules detected under native conditions [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1997 Jun;4(6):505]. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4, 298-304.
62. Sauder, J.M. & Roder, H. Amide protection in an early folding intermediate of cytochrome c. *Fold. Des.* 1998; 3, 293-301.
63. Roder, H., Elove, G.A. & Englander, S.W. Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature* 1988; 335, 700-4.
64. Roder, H. & Wuthrich, K. Protein folding kinetics by combined use of rapid mixing techniques and NMR observation of individual amide protons. *Proteins* 1986; 1, 34-42.
65. Udgaonkar, J.B. & Baldwin, R.L. NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 1988; 335, 694-9.
66. Park, S.H., Shastry, M.C. & Roder, H. Folding dynamics of the B1 domain of protein G explored by ultrarapid mixing. *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6, 943-7.
67. Shastry, M.C. & Roder, H. Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale. *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5, 385-92.
68. Gutte, B. & Merrifield, R.B. The synthesis of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 1971; 246, 1922-1941.
69. McCormick, F., Adari, H., Trahey, M., Halenbeck, R., Kothe, K., Martin, G.A., Crosier, W.J., Watt, K., Rubinfeld, B. & Wong, G. Interaction of ras p21 proteins with GTPase activating protein. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1988; 2, 849-54.
70. Egan, S.E. & Weinberg, R.A. The pathway to signal achievement. *Nature* 1993; 365, 781-3.
71. Satoh, T., Nakafuku, M. & Kaziro, Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 24149-52.
72. Emerson, S.D., Madison, V.S., Palermo, R.E., Waugh, D.S., Scheffler, J.E., Tsao, K.L., Kiefer, S.E., Liu, S.P. & Fry, D.C. Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. *Biochemistry* 1995; 34, 6911-8.

73. Scheffler, J.E., Waugh, D.S., Bekesi, E., Kiefer, S.E., LoSardo, J.E., Neri, A., Prinzo, K.M., Tsao, K.L., Wegrzynski, B., Emerson, S.D. & et, a. Characterization of a 78-residue fragment of c-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. *J. Biol. Chem.* 1994; 269, 22340-6.
74. Pace, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 1986; 131, 266-80.
75. Applied Photophysics. *SX.18MV Stopped-Flow Reaction Analyser User Handbook* Leatherhead, UK, 1998.
76. Main, E.R., Fulton, K.F. & Jackson, S.E. Folding pathway of FKBP12 and characterisation of the transition state. *J Mol Biol* 1999; 291, 429-44.
77. Texter, F.L., Spencer, D.B., Rosenstein, R. & Matthews, C.R. Intramolecular catalysis of a proline isomerization reaction in the folding of dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 1992; 31, 5687-91.
78. Huang, G.S. & Oas, T.G. Structure and stability of monomeric lambda repressor: NMR evidence for two-state folding. *Biochemistry* 1995; 34, 3884-92.
79. Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M.A. & Schmid, F.X. Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.* 1995; 2, 663-73.
80. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239, 487-91.
81. Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. & Bock, S.C. A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22, 2587-91.
82. Gill, S.C. & von Hippel, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in *Anal. Biochem.* 1990 Sep;189(2):283]. *Anal. Biochem.* 1989; 182, 319-26.
83. Peterman, B.F. Measurement of the dead time of a fluorescence stopped-flow instrument. *Anal. Biochem.* 1979; 93, 442-4.
84. Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Cook, W.J. Structure of ubiquitin refined at 1,8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1987, 194, 531-44.

85. Branden, C., Tooze, J. *Introduction to protein structure*, 2^d edition, Garland publishing, Inc., New York 1999 3-4.
86. Voet, D., Voet, J.G. *Biochemistry*, John Wiley & Sons , New York 1990, 60-1.
87. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. *Biologie moléculaire de la cellule*, traduction de la troisième édition américaine par Camille François, De Boeck Université s.a., 1997, 63-6
88. Orengo, C.A., Jones, D.T., Thornton, J.M. Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* 1994, 372, 631-4.

REMERCIEMENTS

Merci à Sylvie et Tan (RMN).

Merci à André (collecteur de fractions).

Merci au Professeurs Jeffrey Keillor et Michel Lafleur pour leur lecture attentive du présent document et leur suggestions avisées.

Merci à Jean-François et aux membres anciens et présents du laboratoire Michnick pour leur complicité professionnelle, relationnelle et se... !

Merci particulier à François-Xavier, Stéphanie et Ingrid (discussions, corrections, amitié!).

Merci à Stephen et Ingrid qui demeurent mes principaux modèles de réussite professionnelle.

Et le plus gros Merci revient à ma famille et à mes amis (ils savent qui ils sont). C'est votre présence qui me donne la confiance et la détermination nécessaire à la pratique de mes passions. Sans vous, rien de ceci n'aurait de sens. Je vous aime.