



**ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE
ET DE LA PRESSION SUR LA STRUCTURE ET LA
DYNAMIQUE DE L'INHIBITEUR DE LA TRYPSINE
PANCREATIQUE BOVINE. UNE ETUDE PAR
DIFFUSION DE NEUTRONS**

Marie-Sousai Appavou

► **To cite this version:**

Marie-Sousai Appavou. ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA PRESSION SUR LA STRUCTURE ET LA DYNAMIQUE DE L'INHIBITEUR DE LA TRYPSINE PANCREATIQUE BOVINE. UNE ETUDE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. <tel-00232529>

HAL Id: tel-00232529

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00232529>

Submitted on 1 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PARIS XI
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Ecole Doctorale : Innovation thérapeutique

THESE

Présentée pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Spécialité : Biophysique

par

Marie-Sousai APPAVOU

SUJET : ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA
PRESSION SUR LA STRUCTURE ET LA DYNAMIQUE DE
L'INHIBITEUR DE LA TRYPSINE PANCREATIQUE BOVINE.
UNE ETUDE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS

Soutenue le 06 Avril 2005 devant la commission d'examen

Mr Marc BEE	Rapporteur
Mme Marie-Claire BELLISSENT-FUNEL	Directeur de thèse
Mr Karel HEREMANS	Rapporteur
Mr Gaston HUI BON HOA	Examineur
Mr Joël JANIN	Président
Mr Joseph ZACCAÏ	Examineur

*A mon père qui aurait aimé lire ce manuscrit,
puisse-t-il être fier de moi.*

*A ma mère et à ma sœur qui m'ont énormément soutenu
et souvent supporté ma mauvaise humeur et qui ont eu
beaucoup de plaisir à me voir soutenir ce travail.*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire Léon Brillouin, unité mixte CEA-CNRS, au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay.

Je remercie la direction du laboratoire, Charles Henri De Novion, José Teixeira, Pierre Monceau, Michel Alba et Philippe Mangin pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie Karel Heremans et Marc Bée d'avoir eu la gentillesse d'accepter la tâche ingrate de rapporter sur mon manuscrit. Je remercie Joël Janin d'avoir accepté d'examiner mon travail lors de ma soutenance en tant que président de mon jury. Je remercie Joseph Zaccà et Gaston Hui Bon Hoa d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Ce travail de recherche a été effectué sous la direction de Marie-Claire Bellissent-Funel, directrice de recherche au C.N.R.S. Je lui serai éternellement reconnaissant de m'avoir fait entrer dans le monde de la recherche scientifique par la grande porte. Son enthousiasme et sa passion pour ce métier ont été très communicatifs. Je la remercie de m'avoir accompagné et encouragé durant la majorité des expériences : à Saclay, à Grenoble, à Jülich ou encore à Berlin. Je tiens à lui témoigner aussi ma gratitude pour le temps qu'elle m'a consacré pour l'aide à l'écriture des propositions d'expériences, des rapports d'expériences, des articles et, bien entendu, pour l'élaboration de ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble des personnes qui m'ont aidé dans la réalisation des expériences : à Saclay, Patrick Calmettes, José Teixera, Loïc Auvray, Didier Lairez, Vincent Thévenot pour les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles, Stéphane Longeville pour les expériences de diffusion de neutrons à écho de spins et pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté pour le calcul du facteur de forme de ma protéine. Rémi Khan, Jean-Marc Zanotti, Xavier Agostini et Patrick Baroni pour les expériences de diffusion quasiélastique de neutrons en temps de vol. A Grenoble : Marc Bée, Francesca Natali, Aurélie Vandeneide et Sébastien Vial pour les expériences de rétrodiffusion de neutrons, Marek Koza, Marie Plazanet, Steeve Jenkins et Stéphane Rols pour les expériences de diffusion quasiélastique de neutrons en temps de vol, Louis Melesi et Jean-François Chapuis pour l'aide qu'ils nous ont apportée pour les expériences en pression. A Jülich : Dietmar Schwahn pour les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles et à Berlin : Jörg Pieper et Alexandra Buschteiner

pour les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles et les expériences de diffusion quasiélastique de neutrons en temps de vol. Je remercie Gabriel Gibrat pour l'aide qu'il m'a apporté pour la réalisation et l'analyse de certaines expériences.

Je remercie Bruno Robert pour le temps et l'aide qu'il nous a consacrés pour la réalisation des expériences en spectroscopie Infrarouge au département des Sciences de la Vie du CEA de Saclay.

Je voudrais aussi témoigner ma reconnaissance à Gaston Hui Bon Hoa pour son investissement en temps et en matériel pour la réalisation des expériences de spectroscopie UV-visible en température et en pression dans l'unité INSERM U473 du Kremlin-Bicêtre.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire Léon Brillouin, autant pour leurs conseils avisés que pour les bons moments passés ensemble durant ces trois années : Ingo, Abdeslam, Bouchra, Caroline, Giulia, Stéphanie, Jérémie, Jérôme, Vania, Juan Pelta, Odile, les deux Karine, Fabrice, Jean-Pierre Cotton, Annie Brûlet, Sandra, Julian Oberdisse, Laurence, Jacques, Sophie, Géraldine, et Alain Lapp. Je remercie aussi Hakima, Pascale, Stéphane, Saad, Florence, Lydie, et Karine.

Je voudrais aussi remercier mesdames Chantal Marais, Claude Rousse, Christelle Filak, et Chantal Pomeau pour l'aide qu'elles m'ont apportée pour la partie administrative de ma thèse et surtout pour l'amitié qu'elles m'ont témoigné.

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles sur le spectromètre KWS-1 au Forschungszentrum de Jülich ont pu être réalisées grâce au soutien du programme « Jülich Neutrons for Europe ».

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles et de diffusion quasiélastique de neutrons sur le spectromètre NEAT (V3) au HMI à Berlin ont pu être réalisées grâce au soutien de l'«European Commission under the Access to Research of the Human Potential Programme».

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. Introduction à la technique de diffusion de neutrons.....	18
A. propriétés du neutron.....	18
B. Principe de la diffusion de neutron.....	19
1. le phénomène de diffusion.....	19
2. notion de vecteur de diffusion.....	20
3. Le pseudo-potential de Fermi	21
4. diffusion cohérente et diffusion incohérente	22
5. diffusion aux petits angles	26
6. Diffusion incohérente inélastique des neutrons.....	27
7. Formalisme de la diffusion aux petits angles.....	29
a) Diffusion par une solution idéale de macromolécules identiques	29
(1) Approximation de Guinier : rayon de giration.....	31
(a) L'intensité à l'origine	32
b) Cas de la diffusion par un mélange de macromolécules identiques en solution diluée.....	33
(1) Facteurs de forme des chaînes polymériques.....	34
(2) Loi de Debye	35
(3) Chaîne à longueur de persistance	36
c) Représentation de Kratky	39
d) Effet des interactions.....	40
e) Correction du facteur de forme par la concentration	42
8. Etude de la dynamique	43
a) Séparation des mouvements	43
(1) Facteur de structure dynamique incohérent dans le cas d'une seule espèce globulaire en solution	45
(a) Diffusion quasi-élastique	45
(b) Mouvements d'ensemble de la protéine.....	45
(c) Mouvements internes de la protéine.....	47
(2) Expression finale du facteur de structure dynamique incohérent.....	48
b) Analyse des données de diffusion quasiélastique de neutron par des modèles d'exponentielles.....	49
(1) Le modèle d'exponentielle simple.....	49
(2) Le modèle d'exponentielle étirée	50
(3) Le modèle de la somme d'exponentielles	50
(4) Définition de l'EISF.....	51
(5) Détermination expérimentale	51
9. Les spectromètres.....	52
a) Grandeurs caractéristiques.....	52
(1) Gamme en Q.....	52
(2) Gamme en énergie-résolution.....	52
b) Traitement des spectres	53
c) Spectromètre à temps de vol.....	55
d) Spectromètre à retrodiffusion	57
e) Modèle d'analyse	58
(1) Les mouvements dans les protéines.....	58
(2) Diffusion dans une sphère.....	60
(3) Résolution expérimentale.....	61
(4) Discussion du modèle	63

II. Caractéristiques des protéines	69
A. Introduction	69
B. Les états intermédiaires	69
C. Le repliement des protéines	74
D. L'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI	77
1. Description	77
2. Les études de dénaturation du BPTI	81
a) dénaturation chimique	84
b) dénaturation thermique	85
c) dénaturation par la pression	89
III. Influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI. Une étude par diffusion de neutrons aux petits angles et par spectroscopie UV-visible	102
A. Matériel et méthode	102
1. Préparation des solutions et spectromètres de DNPA.	102
B. Appareillage	103
C. Traitement des données expérimentales	105
1. Expression de l'intensité diffusée	105
2. Traitement des spectres bruts	106
3. Calibration absolue	107
4. Bruit de fond incohérent	107
D. Résultats des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles	110
1. Caractérisation de l'état natif. Facteur de forme théorique.	110
2. Caractérisation de l'état natif. Etude par diffusion de neutrons aux petits angles.	113
3. influence de la température sur le rayon de giration et les interactions	116
a) A température ambiante : caractérisation de l'état natif du BPTI en solution	117
b) Evolution du rayon de giration et des interactions en fonction de la température.	121
c) Evolution de la forme de la protéine en fonction de la température.	130
4. Etude de l'influence de la pression sur la structure du BPTI	136
a) Influence de la pression sur le rayon de giration du BPTI et sur l'intensité lorsque q tend vers 0.	136
b) Influence de la pression sur la forme du BPTI	142
(1) Résultats	142
(2) Discussion	146
E. Résultats des expériences par spectroscopie UV-visible	149
a) Mise en évidence de la β agrégation par la fixation de Rouge Congo	149
(1) Conditions expérimentales	149
(2) Résultats	150
(3) Discussion	158
b) Expériences par Absorption UV-visible en dérivées 4 ^{ème}	159
(1) Conditions expérimentales	159
(2) Résultats	160
(3) Discussion	167
F. Conclusion sur l'influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI en solution.	171

IV. Influence de la température et de la pression sur la dynamique du BPTI. Une étude par diffusion quasi-élastique de neutrons.....	177
A. Matériels et méthodes.....	177
1. Préparation des échantillons et traitement des données.....	177
a) Poudres hydratées.....	177
b) Solution.....	178
B. Etude de l'influence de la température.....	180
1. Etude à basse résolution.....	180
a) Cas des solutions.....	180
2. Etude à haute résolution.....	193
a) Etude d'une poudre hydratée de BPTI.....	194
b) Etude du BPTI en solution.....	200
C. Etude de l'influence de la pression.....	205
1. Etude a basse résolution.....	205
a) Analyse à l'aide d'une exponentielle étirée.....	207
b) Analyse à l'aide d'une somme d'exponentielles.....	209
2. Etude à haute résolution.....	216
CONCLUSION GENERALES ET PERSPECTIVES.....	220
BIBLIOGRAPHIE.....	230

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail de thèse a consisté en l'étude de l'influence de deux paramètres physiques, la température et la pression, sur la structure et la dynamique d'une protéine appartenant à la catalyse enzymatique : l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI.

1- Généralités sur les protéines

L'étude des protéines a été rendue nécessaire par le développement de la pharmacologie. En effet, les processus métaboliques permettant à l'homme de vivre se basent sur les réactions auxquelles participent les protéines.

Les protéines partagent un grand nombre de fonctions dans l'organisme.

Un certain nombre d'entre elles a un rôle structural. C'est le cas des filaments de spectrine¹ qui maintiennent les globules rouges dans la forme biconcave qui les caractérise, ou de la kératine² qui compose nos ongles et nos cheveux.

D'autres protéines ont le rôle indispensable de transporteurs comme la myoglobine et l'hémoglobine qui, en fixant l'oxygène de l'air via un atome de fer appartenant à un hème, le transporte de manière ciblée aux cellules concernées.

Des protéines dites membranaires peuvent avoir la fonction de canaux sélectifs, c'est le cas des ATPases pompes à protons, à potassium, à sodium ou à calcium³ ou encore de certaines glycoprotéines qui ne laissent passer que certains ions. L'aquaporine quant à elle est un canal sélectif à l'eau⁴.

Enfin, les enzymes constituent la partie des protéines qui permettent à des réactions chimiques de se dérouler dans des conditions thermodynamiquement non favorables.

Dans le cas des réactions enzymatiques, la recherche scientifique sur ce sujet énonça pendant longtemps une analogie avec un système clé-serrure où les réactifs tels que l'ATP ou d'autres protéines font office de clé et où l'enzyme, qui est aussi une protéine, joue le rôle de serrure. Cette vision implique un caractère fixe de la conformation tridimensionnelle des protagonistes des réactions enzymatiques ; mais récemment, on a montré que ce schéma n'était pas possible compte tenu de la vitesse très rapide de ces réactions : en effet, les deux macromolécules agissent comme une main entrant dans un gant, impliquant une exploration d'un certain nombre de conformations avant de s'adapter complètement.

En outre, dès leur formation à partir du ribosome en interaction avec l'ARN messager, les protéines n'adoptent pas immédiatement leurs structures fonctionnelles finales. D'autre part, leur fonctionnalité elle-même est régie par la conformation : pour la plupart des protéines, leur régulation résulte d'une modification structurale affectant le site actif. De plus, les protéines sont enclines à diffuser d'un compartiment à un autre tout en restant en proportion suffisante pour subvenir aux besoins de la cellule ; il en résulte un phénomène, dit « effet de cage », par lequel chaque protéine adapte sa structure pour pouvoir diffuser.

Donc les protéines voient leurs formes varier et l'étude des intermédiaires de repliements de ces molécules biologiques peut permettre de progresser notamment dans le domaine médical.

L'étude de l'influence de la température et de la pression sur les protéines a un intérêt pratique dans la mesure où ces deux paramètres sont employés pour la stérilisation et la bioconservation de produits dans l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. En effet, la pression voit son utilisation s'accroître d'année en année dans les processus de stérilisation en industrie agro-alimentaire. Au lieu de la stérilisation par les hautes températures qui peuvent affecter le goût, la couleur voire la texture d'un produit alimentaire à cause de la rupture de liaisons covalentes au niveau moléculaire, les hautes pressions sont de plus en plus utilisées car leur utilisation est plus douce et plus économique. La stérilisation par les hautes pressions peut, en effet, être appliquée à des températures inférieures à 100°C et seules les liaisons de faibles énergies sont affectées.

2- Généralités sur l'effet de la température

Certains organismes vivant dans les profondeurs océaniques, au voisinage des sources hydrothermales peuvent supporter des températures élevées de l'ordre de 60 à 100 °C et sont appelés organismes thermophiles comme *Pyrococcus abyssi* ou *Thermococcus fumicolans*.⁵

Dans l'industrie alimentaire, la température est employée de manières variées dans les processus de stérilisation⁶ : la pasteurisation permet l'élimination des micro-organismes dans les produits laitiers essentiellement. Le lait, par exemple, est chauffé à 72/85°C pendant 15 à 20 secondes, puis est refroidi immédiatement. La stérilisation simple procède différemment : le lait est chauffé à 80 °C pendant 3 à 4 secondes avant l'embouteillage à 65°C. Il est ensuite conditionné à l'air ambiant. Puis il subit une stérilisation proprement dite à 115°C pendant 20 minutes. Il est ensuite refroidi progressivement. Cette technique a pour conséquence une perte

moyenne de 20 % de la teneur initiale en vitamines du lait, une modification de la couleur et du goût. Le lait perd de sa blancheur et son goût se modifie pour prendre un « goût de cuit » dû à une réaction de Maillard. La stérilisation UHT (Ultra Haute Température) permet l'élimination des bactéries dans les produits par chauffage avec de l'air à 150°C durant 1 minute suivi d'un refroidissement immédiat.

L'augmentation de la température d'une solution protéique, augmente l'énergie de vibration et de rotation des molécules. Au delà d'une certaine amplitude, ces mouvements changent profondément les équilibres entre les interactions faibles qui donnent la stabilité à la conformation globulaire de la protéine. Les chaînes polypeptidiques se déplient et peuvent former un gel voire des agrégats par l'association des molécules entre elles. Enfin, la chaleur agit sur la capacité calorifique de la protéine sachant que la valeur de celle-ci est la plus petite lorsque la molécule est repliée dans son état natif.

3- Généralités sur l'effet de la pression

Les premiers travaux d'études de l'influence de la pression en biologie remontent à 1878. P. Bert⁷ décrit dans son ouvrage intitulé « *La pression barométrique* », certaines possibilités dans le domaine de la biotechnologie. En 1891, P. Regnard⁸, dans « *La vie dans les eaux* », montre qu'une pression de 1000 bar a une influence réversible sur les réactions enzymatiques au sein des bactéries. Mais ce fut P.W. Bridgman⁹ qui, en 1914, fut le premier à observer la coagulation de l'albumine, et donc sa dénaturation, sous une pression de 8000 bar. B.H Hite¹⁰ montre, la même année, la possibilité de prolonger la conservation des aliments par la destruction partielle des micro-organismes par les hautes pressions. La première formalisation des effets de la pression sur les réactions enzymatiques est due à K. Laidler¹¹ en 1951, et à la suite des travaux d'Eyring¹².

Des années 1960 à nos jours, de nombreuses protéines ont fait l'objet d'études de l'influence de la pression sur leurs structures : la ribonucléase A^{13,14,15,16}, la chymotrypsinogène^{17,18}, la myoglobine et d'autres protéines comportant une protoporphyrine ou hème^{19,20,21,22,23,24,25}, la sérum albumine bovine²⁶, le lysozyme^{27,28,29,30}, l' α -chymotrypsine³¹, la thermolysine³², la carboxypeptidase Y³³, le plasminogène³⁴, la trypsine pancréatique bovine³⁵, l'actine du muscle squelettique³⁶. Une grande partie de ces études a été citée dans des publications généralistes par Silva et Weber³⁷ en 1993, Prehoda et al³⁸ en 1997, Heremans et Smeller³⁹ en 1998, Mentré et Hui Bon Hoa⁴⁰ en 2000, et Heremans⁴¹ en

2004 pour la publication la plus récente. Une collection de revue éditée par Balny, Masson et Heremans⁴² dans *Biochemica et Biophysica Acta* en 2002 rassemble un large panel des études réalisées par de nombreuses techniques et sur de nombreuses protéines.

D'un point de vue biologique, l'influence de la pression sur les protéines est intéressante dans la mesure où les protéines peuvent, dans leur milieu physiologique, être soumises à des pressions allant de quelque millibar dans la circulation sanguine jusqu'à près de 1000 bar dans les profondeurs océaniques. Des organismes cellulaires dits barophiles peuvent supporter des pressions jusqu'à 500 bar comme *Bacillus licheniformis*.⁴³

D'autre part, la pression peut induire des chemins de dépliement des protéines différents de ceux induits par la température. La pression est un moyen de faire varier une seule variable : le volume réactionnel au lieu de deux lorsque l'on étudie l'effet de la température où à la fois ont lieu un changement du volume réactionnel et un changement dans l'énergie thermique. Sous l'effet de la pression, c'est l'eau d'hydratation à la surface des macromolécules qui se réorganise et cette réorganisation de l'eau autour des protéines induit, à partir d'une certaine valeur de la pression, une modification structurale. La réorganisation de l'eau surfaciale s'exprime par une augmentation de la densité.

Dans une réaction entre deux réactifs A et B qui donnent un produit C :



L'effet de la pression hydrostatique sur la constante d'équilibre K obéit au principe général de Le Châtelier :

$$\frac{\partial \ln K}{\partial P} = \frac{-\Delta V}{RT}$$

où P est la pression, ΔV est le changement de volume réactionnel, R est la constante des gaz parfaits et T est la température en Kelvin.

Le changement de volume réactionnel ΔV est défini comme la différence entre le volume molaire partiel de la protéine à l'état final et celui de la protéine à l'état initial. En d'autres termes, une augmentation de la pression hydrostatique induit un déplacement de la réaction vers la production de C si $\Delta V < 0$ et vers le maintien de l'état initial de la protéine si $\Delta V > 0$. ΔV est la force motrice résultant de l'effet de la pression.

3 a) Effets des hautes pressions hydrostatiques sur les interactions moléculaires :

En présence d'eau, les hautes pressions affaiblissent les liaisons ioniques et les interactions hydrophobes. Les molécules d'eau, sous l'effet de la pression, se réorganisent en une couche dense de solvation selon le principe de Le Châtelier. Il en résulte que les distances entre les groupes ionisés augmentent (cela concerne les groupes amines des résidus lysines, arginines et histidine, les groupes carboxyliques des résidus aspartate et glutamates et les groupes carboxyamides des résidus asparagines et glutamines). De la même manière, les distances entre les domaines apolaires augmentent par la réorganisation de l'eau en cages denses formées par liaisons hydrogène. Ces effets peuvent être observés à des pressions de quelques centaines de bar.

Sous de hautes pressions hydrostatiques, la surface des macromolécules au contact du solvant augmente et cette augmentation est corrélée avec une augmentation de l'hydratation macromoléculaire et d'une dissociation des assemblages macromoléculaires.

On a montré par R.M.N. que les liaisons hydrogène entre les groupes amides et carbonyles (NH...O=C) étaient légèrement raccourcies sous une pression de 2 kbar dans la majorité des protéines³⁹.

Ainsi, même en l'absence de molécules d'eau, les distances au sein d'une macromolécule peuvent être altérées par les hautes pressions et par conséquent les structures des protéines et notamment les structures secondaires, qui doivent leur formation aux liaisons hydrogène, sont aussi affectées par les hautes pressions.

3 b) Effets des hautes pressions hydrostatiques sur les protéines:

L'effet de la pression sur les molécules d'eau d'hydratation des macromolécules est réversible dans une gamme de pression modérée (de 0.1 à 2 kbar). Au delà, certaines protéines sont dénaturées de manière irréversible avec une transition depuis une forme globulaire native vers une forme de globule fondu pour aboutir à un état plus ou moins déplié.



Le globule fondu est hautement hydraté. Les mesures de sa compressibilité interne indiquent la présence d'eau fortement associée, plus dense, et moins compressible que l'eau volumique. Cependant, certaines protéines ne sont pas dépliées lorsqu'elles sont soumises à des pressions élevées jusqu'à 5 kbar, voire 14 kbar. C'est le cas du BPTI. Des structures secondaires persistent et les protéines ne peuvent être décrites comme des chaînes complètement dépliées.

4- Intérêts de la spectroscopie neutronique

Le repliement des protéines est encore mal connu à ce jour. L'utilisation de la diffusion de neutrons aux petits angles permet d'étudier ce phénomène par le biais de l'étude des états dénaturés des protéines. A l'aide de la théorie des polymères, on peut caractériser les états dénaturés des protéines.

Une fois la structure tridimensionnelle adoptée, divers mouvements à différentes échelles de temps existent au sein d'une protéine : depuis la femtoseconde pour les réarrangements électroniques, en passant de la picoseconde à la nanoseconde pour les fluctuations thermiques, à la milliseconde pour les changements conformationnels, de la seconde à la minute pour les cinétiques et les divisions cellulaires. Les protéines impliquées dans les processus catalytiques nécessitent une flexibilité interne. L'intérêt de l'utilisation de la diffusion de neutrons en dynamique est justifié par le fait qu'il est possible d'accéder à des temps du même ordre de grandeur que ceux des mouvements qui ont lieu dans les protéines depuis la libration des groupes enfouis (10^{-11} s à 10^{-9} s) jusqu'aux vibrations des atomes (10^{-14} s à 10^{-13} s) et à une échelle spatiale de 1 à 20 Å⁴⁴.

Des études structurales de solutions de protéines sous pression ont été réalisées en diffusion de neutrons.

Des études par diffusion de neutrons aux petits angles sur la metmyoglobine de cœur de cheval ont été menées par Loupiac et al⁴⁵ en 2002 afin d'observer l'influence de la pression jusqu'à 3000 bar sur le rayon de giration extrapolé à concentration nulle et les interactions intermoléculaires. Le volume spécifique molaire de la metmyoglobine en fonction de la pression a pu être déterminé par cette technique. Les auteurs ont montré que le rayon de giration de la metmyoglobine restait constant et que les interactions intermoléculaires étaient

toujours répulsives, entre la pression atmosphérique et 3000 bar. Mais la valeur du volume spécifique partiel de la protéine décroît de 5.4% dans cette gamme de pression.

Paliwal et al⁴⁶ ont aussi utilisé la diffusion de neutrons aux petits angles en plus de la simulation par dynamique moléculaire afin d'étudier l'influence de la pression jusqu'à 3000 bar sur la structure de la nucléase du staphylocoque et plus particulièrement sur la transition dépliement/repliement de la protéine. Les auteurs ont montré une augmentation du rayon de giration en deux étapes et une modification de la forme de la protéine qui devient moins compacte et est plus allongée que la structure native lorsque la pression est appliquée.

L'influence de la pression entre la pression atmosphérique et 900 bar sur la dynamique interne de la trypsine en solution⁴⁷ a été étudiée en 2000. Les auteurs ont montré une diminution du volume de diffusion des protons ainsi qu'un rétrécissement de la largeur du facteur de structure dynamique $S(q,\omega)$ indiquant un ralentissement de la dynamique interne de la trypsine. En 2003, Doster et Gebhardt⁴⁸ ont observé l'influence de la pression jusqu'à 7000 bar sur la dynamique interne de la myoglobine par diffusion quasiélastique de neutrons. Les auteurs ont observé un ralentissement de la dynamique avec une transition de la dynamique à partir de 3000 bar, pression à partir de laquelle la myoglobine ne conserve plus sa structure native.

5- Présentation du travail de thèse :

Notre travail de thèse est centré sur l'étude de l'influence de la température et de la pression sur la structure et la dynamique du BPTI en solution.

5 a) Description du système

L'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI⁴⁹ est une protéine impliquée dans la régulation de la catalyse enzymatique et est sécrétée dans les cellules acineuses du foie. Cette protéine a pour fonction d'inhiber la fonction d'une protéase : la trypsine, qui hydrolyse d'autres protéines en peptides et en acides aminés. Le BPTI se lie très étroitement à la trypsine en insérant la chaîne latérale de sa lysine 15 au niveau de son site actif, ce qui fait de cet inhibiteur un excellent analogue de substrat. La demi-vie de ce complexe trypsine – inhibiteur est de plusieurs mois⁵⁰. Le BPTI a une très forte affinité pour la trypsine parce que sa structure est presque parfaitement complémentaire de celle du site actif de la trypsine.

Le BPTI est une protéine globulaire composée de 58 résidus d'acides aminés et de masse moléculaire de 6500 Da. Elle fut isolée en 1936 par Kunitz et Northrup², ce qui lui valut le nom de réactif de Kunitz ou antiprotéase de type Kunitz. Sa structure tridimensionnelle à l'état natif est connue à haute résolution (1.5Å)⁵¹. Cette protéine possède six cystéines formant trois ponts disulfures notés [5-55], [14-38], et [30-51] et trois ponts salins (Asp50 - Lys46, Glu7 - Arg42, and Arg1 - Ala58)⁵² contribuant fortement à la très haute stabilité de la protéine.

L'intérêt d'étudier le BPTI réside dans le fait qu'il s'agit d'une protéine modèle largement étudiée par différentes techniques mais qui reste encore peu connue dans le domaine de la diffusion de neutrons. Cette protéine est utilisée dans de nombreux domaines comme la médecine où elle est employée à titre d'anticoagulant lors d'opérations chirurgicales ou encore pour le traitement de certaines maladies cardio-vasculaires (Trasylo1).

Les études structurales les plus récentes par diffusion de rayons X aux petits angles et cristallographie ont été menées par Cyril Hamiaux dans sa thèse⁵³ : il met en évidence que les trois formes cristallines différentes obtenues en présence de thiocyanate de potassium, de chlorure de sodium ou de sulfate d'ammonium, présentent un motif commun sous la forme d'un décimère de BPTI.

Les rares études du BPTI dans son état natif par diffusion de neutrons aux petits angles ont été réalisées par Budayova-Spano et al⁵⁴ en 2000. Le but était d'étudier la solubilité du BPTI dans l'eau lourde par rapport à sa solubilité en eau légère, étude faite par diffusion de rayons X par Lafont et al⁵⁵. On a montré que le BPTI était moins soluble dans D₂O que dans H₂O. D'autre part, des mesures en diffusion de la lumière ont montré que les interactions attractives entre les molécules de BPTI sont plus fortes dans D₂O qu'en H₂O. Le rayon de giration de la protéine observé en solution de D₂O avec 0.5 M NaCl est de 12 Å⁵³.

Les études du BPTI par diffusion inélastique de neutrons ont essentiellement été réalisées sur le spectromètre à temps de vol IN6 par Cusack, Smith et Karplus^{56,56,57,58,59}. Le but était d'analyser les résultats des expériences par le biais de calculs théoriques basés sur l'analyse en modes normaux du BPTI. Les premières études ont été publiées en 1986⁵⁷ et comparent les mesures de diffusion de neutrons en temps de vol aux calculs théoriques basés sur l'analyse en modes normaux sur une solution de BPTI dans la région des basses

fréquences (de 1 à 200 cm^{-1}). Une analyse en mode normal du BPTI a été associée à des résultats d'expérience de diffusion de neutrons en temps de vol dans la région des phonons afin de déterminer la dynamique vibrationnelle du BPTI. En 1988, Cusack et al⁵⁸ réalisent une étude de comparaison entre théorie et expérience sur une poudre de BPTI. Les résultats d'expérience de diffusion de neutrons en temps de vol et plus particulièrement les densités d'état généralisées ont été comparées avec deux calculs théoriques basés sur des analyses en modes normaux. Des travaux de Smith et al⁵⁹ concernent des scans élastiques en fonction de la température sur le spectromètre à temps de vol IN6 avec des poudres hydratées ($h=0.07$ à 0.20). Les auteurs ont montré que la dynamique était approximativement harmonique à basse température ou à basse hydratation et qu'il y avait une diffusion quasiélastique à haute température ou haute hydratation mais ils n'ont pas fait de mesures quasiélastiques. D'autre part, des scans inélastiques ont été réalisés par la même équipe⁶⁰ sur le spectromètre à temps de vol IN6 avec une solution de BPTI. Les auteurs se sont limités aux observations suivantes : dans un spectre en temps de vol, ils ont montré que la diffusion inélastique du BPTI, en solution, était similaire à celle de la poudre pour des temps de vol courts, c'est à dire pour des fréquences supérieures à 50 cm^{-1} . Ils ont observé une augmentation de la diffusion inélastique pour la solution de BPTI, pour des temps de vol longs, c'est à dire pour des fréquences inférieures à 50 cm^{-1} ; ce qui a été interprété en termes d'une augmentation des fluctuations atomiques.

Des études de la dénaturation du BPTI ont déjà été réalisées, les premières par Creighton⁶¹ : la réduction des ponts disulfures suffit à obtenir une chaîne dépliée. Les études les plus récentes^{61,62,63,64,65} ont montré que les agents chimiques dénaturants tels que l'urée et le chlorure de guanidinium n'avaient aucun effet. Même le chlorure de guanidinium, à forte concentration, ne dénature pas la protéine complètement. Seul le thiocyanate de guanidinium est capable de dénaturer le BPTI dans une gamme de concentrations raisonnables ($\sim 5 \text{ M}$)⁶². La dénaturation par la température du BPTI a été étudiée par microcalorimétrie différentielle⁶³ et par spectroscopie Raman⁶⁴ et les résultats ont montré qu'il faut une température voisine de 100°C pour dénaturer le BPTI. La dénaturation du BPTI en solution a été étudiée par infrarouge en fonction de la pression appliquée. On a montré qu'une pression de 2 kbar est nécessaire pour induire des changements au niveau des structures secondaires de la protéine. On a montré qu'en dessous de 15kbar il n'y avait pas de modifications significatives des structures secondaires⁶⁵. Mais d'autres expériences en infrarouge ont montré une transition vers 5,5 kbar⁶⁶. Des expériences de simulation par dynamique moléculaire (800 ps) sur le

BPTI dans l'eau ont été réalisées en appliquant des pressions jusqu'à 20 kbar⁶⁷. Les résultats ont montré une exposition au solvant des résidus appartenant au cœur de la protéine et une dénaturation des structures secondaires entre 10 et 15 kbar.

5b) Caractérisation de l'état natif du BPTI en solution.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à caractériser la structure de la protéine en solution dans son état natif. Nous avons procédé à des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles afin de déterminer le rayon de giration de la protéine native et de caractériser à température ambiante et à pression atmosphérique les interactions intermoléculaires.

5c) Caractérisation des états dénaturés du BPTI en solution.

- Influence de la température sur la structure

Une étude par diffusion de neutrons aux petits angles a été réalisée afin d'observer l'influence de la température sur la structure globale de la protéine en solution : d'une part sur son rayon de giration et sur sa forme, et d'autre part sur les interactions intermoléculaires.

- Influence de la pression sur la structure

Cette étude par diffusion de neutrons aux petits angles s'est poursuivie par l'observation de l'influence de la pression sur la structure globale du BPTI en solution : sur son rayon de giration et sur la forme de la protéine.

Nous avons effectué des expériences complémentaires en spectroscopie optique en l'absence et en présence de rouge Congo et en dérivée 4^{ème} en absorption UV-visible. Elles ont été effectuées en fonction de la température et de la pression afin d'observer l'influence de ces deux paramètres sur les structures secondaires du BPTI. D'autres expériences en infrarouge à transformée de Fourier, sur une solution de BPTI portée à haute température puis refroidie, nous ont permis de mettre en évidence des modifications au niveau des structures secondaires de la protéine.

- Influence de la température sur la dynamique

L'évolution du déplacement carré moyen du BPTI en poudre hydratée a été étudiée en fonction de la température et comparée à celle de la trypsine. L'évolution du déplacement carré moyen du BPTI en solution a aussi été étudiée en fonction de la température en absence et en présence de dénaturant chimique.

Les mouvements de diffusion globale et la dynamique interne du BPTI en solution ont été observés en fonction de la température par diffusion quasiélastique de neutrons. Nous avons décrit les mouvements internes 1) d'une part, à l'aide d'un modèle très simple de diffusion de particules dans une sphère, 2) d'autre part, nous avons obtenu l'évolution des temps de relaxation de ces mouvements en fonction de la température.

- Influence de la pression sur la dynamique

Les mouvements globaux et la dynamique interne du BPTI en solution ont été observés en fonction de la pression par diffusion quasiélastique de neutrons. Nous avons décrit les mouvements internes 1) d'une part, à l'aide d'un modèle très simple de diffusion de particules dans une sphère, 2) d'autre part, nous avons obtenu l'évolution des temps de relaxation de ces mouvements en fonction de la température.

-
- ¹ Byers T.Y., et Brandton D., *PNAS*, **82**, 1985, p 6153.
- ² Briki F., Busson B., Doucet J., *BBA*, **1429**, 1998, pp 57-68.
- ³ Pedersen P. L., et Carafoli E., *Trends. Biochem. Sci.*, **12**, 1987, pp 146-150 et pp 186-189.
- ⁴ Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P., *Science*, **256**(5055), 1992, pp 385-387.
- ⁵ Erauso G., Reysenbach A.L., Godfroy A., Meunier J.R., Crump B., Partensky F., Baross J.A., Marteinson V., Barbier G., Pace N., et Prieur D., *Archives on microbiology*, **160**, 1993, pp 338-349.
- ⁶ <http://www.lactel.fr/franc/nut/nutlait2.html/>
- ⁷ Bert P., *La pression barométrique*, Recherche de physiologie expérimentale G. Masson édition Paris, 1878.
- ⁸ Regnard P., *La vie dans les eaux*, 1891
- ⁹ Bridgman P.W., *J. Biol. Chem.*, **19**, 1914, pp 511-512.
- ¹⁰ Hite B.H., Giddings N.J., et Weakley Jr C.E, *West Virginia University Agricultural Experiment Stations bulletins*, **146**, 1914, pp 3-67.
- ¹¹ Laider K.H., *Arch Biochem.*, **30**(2), 1951, pp 226-236.
- ¹² Neville W.M. et Eyring H., *PNAS*, **69**(9), 1972, pp 2417-2419. Kamaya H., Ueda I., Moore P.S., et Eyring H., *Biochem. Biophys. Acta*, **550**(1), 1979, pp 131-137. Kaneshima S., Ueda I., Kamaya H., et Eyring H., *Biochem. Biophys. Acta*, **603**(2), 1980, pp 237-244.
- ¹³ Gill S.J., et Glogovsky R.L., *J. Chem. Phys.*, **69**, 1965, pp 1515-1519.
- ¹⁴ Brandts J.F., Oliveira R.J., et Westort C., *Biochemistry*, **9**, 1970, pp 1038-1047.
- ¹⁵ Zhang J., Peng X., Jonas A., et Jonas A, *Biochemistry*, **34**, 1995, pp 8631-8641.
- ¹⁶ Chatani E., Nonomura K., hayashi R., Balny C., et Lange R., *Biochemistry*, **41**, 2002, pp 4567-4574
- ¹⁷ Hawley S.A., *Biochemistry*, **10**, 1971, pp 2436-2442.
- ¹⁸ Wong P.T.T., Hermans K., *BBA*, **956**, 1988, pp 1-9.
- ¹⁹ Zipp A., Kauzmann W., *Biochemistry*, **12**(21), 1973, pp 4217-4227.
- ²⁰ Ogunmola G.B., Kauzmann W., et Zipp A., *PNAS*, **73**(12), 1976, pp 4271-4273.
- ²¹ Ogunmola G.B., Zipp A., Chen F., et Kauzmann W., *PNAS*, **74**(1), 1977, pp 1-4.

-
- ²² Lange R., Heiber-Langer I., Bonfils C., Fabre I., Negishi M., et Balny C., *Biophys. J.*, **66**, 1994, pp 89-98.
- ²³ Balny C., Hooper A.B., *Eur. J. Biochem.*, **176**, 1988, pp 273-279
- ²⁴ Dubins D.N., Filfil R., Macgregor Jr R.B., Chalikian T.V., *Biochemistry*, **42**, 2003, pp 8671-8678
- ²⁵ Vidugiris G.J.A., et Royer C.A., *Biophys. J.*, **75**, 1998, pp 463-470.
- ²⁶ Nyström B., Roots J., *J. Chem. Phys.*, **78**(6), 1983, pp 2833-2837.
- ²⁷ Nyström B., Roots J., *Makromol. Chem.*, **185**, 1984, pp 1441-1447.
- ²⁸ Samarasinhe S.D, Campbell D.M., Jonas A. et Jonas J. *Biochemistry*, **31**, 1993, pp 7773-7778.
- ²⁹ Royer C., Hinck A.P., Loh S ;N., Prehoda K.E., Peng X., Jonas J., et Markley J.L., *Biochemistry*, **32**, 1993, pp 5222-5232.
- ³⁰ Tedford L.A., Smith D., et Schaschke C.J., *Food Research Int.*, **32**, 1999, pp 101-106.
- ³¹ Rariy R.V., Bec N., Saldana J.L., Nametkin S.N., Mozhaev V.V., Klyachko N.L., Levasov A.V., et Balny C., *FEBS Letter*, **364**, 1995, pp 98-100.
- ³² Kunugi S., Kitayaki M., Yanagi Y., Tanaka N., Lange R., Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **248**, 1997, pp 567-574.
- ³³ Dumoulin M., Ueno H., Hayashi R., Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **262**, 1999, pp 475-483
- ³⁴ Kornblatt J.A., Kornblatt M.J., Clery C., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 1999, pp 120-126
- ³⁵ Ruan K., Lange R., Meersman F., Heremans K., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 1999, pp 79-85
- ³⁶ Ikeuchi Y., Susuki A., Oota T., Hagiwara K., Tatsumi R., Ito T., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2002, pp 364-371
- ³⁷ Silva J.L., et Weber G., *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 1993, pp 89-113
- ³⁸ Prehoda K.E., Mooberry E.S., et Markley J.L., *Prot. Dyn. Funct. And Design*, High Pressure Effects on Protein Structure, 1997.
- ³⁹ Heremans K., et Smeller L., *BBA*, **1386**, 1998, pp 353-370.
- ⁴⁰ Mentré P., et Hui Bon Hoa G., *Intern. Rev. Cyt.*, **201**, 2000, pp 1-84.
Effects of High Hydrostatic Pressures on Living Cells : A Consequence of the Properties of Macromolecules and Macromolecules-associated Water.

-
- ⁴¹ Heremans K., *High Pressure Research*, **24**(1), 2004, pp 57-66
- ⁴² Balny C., Masson P., et Heremans K., *BBA*, **1595**, 2002, pp 1-402.
- ⁴³ Balny C., *Bulletin de la Société Française de Biophysique*, **140**, 2003, pp 10-13.
- ⁴⁴ Mc Cammon and Harvey, *Dynamics of proteins and nucleic acids*, 1987.
- ⁴⁵ Loupiac C, Bonetti M, Pin S, Calmettes P, *Eur. J. Biochem.*, **269**(19), 2002, pp4731-4737.
- ⁴⁶ Paliwal A., Asthagiri D., Bossev D.P., Paulatis M.E., *Biophys. J.*, **87**(5), 2004, pp 3479-3492.
- ⁴⁷ Di Bari M., Deriu A., Filabozzi A., Andreani C., Di Venere A., et Rosato N., *Physica B*, **276-278**, 2000, pp 510-511.
- ⁴⁸ Doster W., Gebhardt R., *Chem. Phys.*, **292**, 2003, pp 383-387.
- ⁴⁹ Kunitz M., Northrop J.M., *The Journal of General Physiology*, 1936, pp 991-1007.
- ⁵⁰ Green N.M. et Work E., *Biochem. J.*, **54**, 1953, p 347
Vincent J.P. et Lazdunski M., *Biochemistry*, **11**, 1972, pp 2967-2977
- ⁵¹ Deisenhofer J. et Steigemann W., *Acta Cryst.*, **B31**, 1975, pp 238-250.
Wlodawer A, Nachman J, Gilliland GL, Gallagher W, Woodward C, *J.Mol.Biol.*, **198**, 1987, pp469-480.(pour la structure résolue à 1.7Å, utilisée dans les représentation et les simulations dans ce manuscrit).
- ⁵² Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003, pp137 –143
Brown L.R., De Marco A., Richarz R., Wagner G., Wüthrich K., *Eur. J. Biochem.*, **88**, 1978, pp 87-95
- ⁵³ Thèse de Cyril Hamiaux 2000 : Cristallogénèse du BPTI à pH acide. Etude des relations entre l'état d'association des molécules en solution et à l'état cristallin par diffusion et diffraction des rayons X.
Hamiaux C., Pérez J., Prangé T., Veessler S., Riès-Kautt M., et Vachette P., *J. Mol. Biol.*, **297**, 2000, pp 697-712.
- ⁵⁴ Budayova-Spano M., Lafont S., Astier J.P., Ebel C., et Veessler S., *J. of Cryst Growth*, **217**, 2000, pp 311-319.
- ⁵⁵ Lafont S., Veessler S., Astier J.P., et Boistelle R., *J. Cryst. Growth*, **173**, 1997, pp 132-140.
- ⁵⁶ Smith JC, Cusack S., Pezzeca U., Brooks., B., et Karplus M., *J. Chem. Phys.*, **85**(6), 1986, pp 3636-3654.
- ⁵⁷ Cusack S., Smith J.C., Finney J., Karplus M., et Trewhella J., *Physica B*, **136**, 1986, pp 256-259.

-
- ⁵⁸ Cusack S., Smith J.C., Finney J., Tidor B., et Karplus M., *J. Mol. Biol.*, **202**, 1988, pp 903-908.
- ⁵⁹ Smith JC, Kuczera K, Tidor B, Doster W, Cusack S and Karplus M, *Physica B* **156 & 157**, 1989, p 437.
- ⁶⁰ Smith JC, Cusack S, Tidor B and Karplus M, *J. Chem. Phys.*, **93**, 1990, pp 2974-2991.
- ⁶¹ Creighton T.E., *J. Mol. Biol.*, **87**, 1974a, b, et c, pp 563-624.
- ⁶² Chang J-Y et Ballatore A, *FEBS Letters*, **473**(2), 2000, pp 183-187.
- ⁶³ Makhatadze G.I., Kim K-S, Woodward C, et Privalov P.L, *Protein Science*, **2**, 1993, pp 2028-2036
- ⁶⁴ Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003,137 –143
- ⁶⁵ Goosens K, Smeller L, Frank J, Heremans K, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1996 , pp 254-262
- ⁶⁶ Takeda N, Nakano K, Kato M, Taniguchi Y, *Biospectroscopy*, **4**, 1998, pp 209-216
- ⁶⁷ Wroblowski B., Diaz J.F., Heremans K., et Engelborghs Y., *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* , **25**, 1996, pp 446-455.

CHAPITRE I

INTRODUCTION A LA TECHNIQUE DE DIFFUSION DE NEUTRONS

I.	Introduction à la technique de diffusion de neutrons	18
A.	propriétés du neutron.....	18
B.	Principe de la diffusion de neutron	19
1.	le phénomène de diffusion	19
2.	notion de vecteur de diffusion.....	20
3.	Le pseudo-potentiel de Fermi	21
4.	diffusion cohérente et diffusion incohérente.....	22
5.	diffusion aux petits angles	26
6.	Diffusion incohérente inélastique des neutrons.	27
7.	Formalisme de la diffusion aux petits angles.....	29
a)	Diffusion par une solution idéale de macromolécules identiques	29
(1)	Approximation de Guinier : rayon de giration.....	31
(a)	L'intensité à l'origine	32
b)	Cas de la diffusion par un mélange de macromolécules identiques en solution diluée.	33
(1)	Facteurs de forme des chaînes polymériques.....	34
(2)	Loi de Debye.....	35
(3)	Chaîne à longueur de persistance.....	36
c)	Représentation de Kratky	39
d)	Effet des interactions	40
e)	Correction du facteur de forme par la concentration.....	42
8.	Etude de la dynamique.....	43
a)	Séparation des mouvements	43
(1)	Facteur de structure dynamique incohérent dans le cas d'une seule espèce globulaire en solution.....	45
(a)	Diffusion quasi-élastique.....	45
(b)	Mouvements d'ensemble de la protéine.....	45
(c)	Mouvements internes de la protéine.....	47
(2)	Expression finale du facteur de structure dynamique incohérent	48
b)	Analyse des données de diffusion quasiélastique de neutron par des modèles d'exponentielles.	49
(1)	Le modèle d'exponentielle simple.....	49
(2)	Le modèle d'exponentielle étirée.....	50
(3)	Le modèle de la somme d'exponentielles.....	50
(4)	Définition de l'EISF.....	51
(5)	Détermination expérimentale.....	51
9.	Les spectromètres.....	52
a)	Grandeurs caractéristiques.....	52
(1)	Gamme en Q	52
(2)	Gamme en énergie-résolution	52
b)	Traitement des spectres	53
c)	Spectromètre à temps de vol.....	55
d)	Spectromètre à retrodiffusion	57
e)	Modèle d'analyse.....	58
(1)	Les mouvements dans les protéines.....	58
(2)	Diffusion dans une sphère.....	60
(3)	Résolution expérimentale.....	62
(4)	Discussion du modèle	63

I. Introduction à la technique de diffusion de neutrons

A. propriétés du neutron

Le neutron est une particule élémentaire de masse $m = 1.675 \cdot 10^{-27}$ kg découverte par James Chadwick en 1932. Il est électriquement neutre et peut ainsi pénétrer profondément la matière en interagissant avec les noyaux sans être influencé avec le nuage électronique comme c'est le cas avec les rayons X.

Sa longueur d'onde associée en angström (Å), donnée par la formule de De Broglie, est définie par :

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (1.1)$$

où h est la constante de Planck ($h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ J.s), m la masse du neutron en kg et v sa vitesse en m/s.

L'énergie du neutron, exprimée ici en joules correspond à l'énergie cinétique de la particule définie par :

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \quad (1.2)$$

où k est le nombre d'onde ($k = 2\pi/\lambda$).

En pratique, cette énergie s'exprime en électron volt (eV), sachant que $1 \text{ eV} = 1.602 \cdot 10^{-19}$ J.

Compte tenu de la relation (1.1) entre la longueur d'onde λ et la vitesse v , l'énergie s'exprime par la formule suivante :

$$E = \frac{h^2}{2m\lambda^2} \quad (1.3)$$

Il est alors possible d'écrire la relation entre la longueur d'onde et l'énergie :

$$\lambda \cdot \sqrt{E} = 0.286 \quad (1.4)$$

où λ est la longueur d'onde exprimée en Å et E l'énergie en électron Volt ou eV.

Les neutrons peuvent être thermalisés par un modérateur qui est une source à température variable et voient ainsi leur énergie modifiée. Pour l'étude de la matière condensée, on utilise les neutrons thermiques qui possèdent une énergie du même ordre de grandeur que l'énergie d'agitation thermique à 300 K soit environ 25 meV, leur vitesse moyenne est de 2200 m/s, et leur longueur d'onde moyenne est de 1.8 Å.

Le neutron possède un spin $s = \frac{1}{2}$, ce qui permet d'écrire une fonction d'onde de spin définie dans un espace à deux dimensions décrit par les vecteurs $|+\rangle$ et $|-\rangle$:

$$|\psi\rangle = a|+\rangle + b|-\rangle \quad (1.5)$$

Cette propriété permet de polariser les faisceaux de neutrons et d'analyser la polarisation des neutrons après que ceux-ci aient interagi avec l'échantillon. Cette propriété est notamment utilisée en diffusion par écho de spin de neutrons.

B. Principe de la diffusion de neutron

1. le phénomène de diffusion

Il consiste à envoyer sur un échantillon un faisceau monochromatique de neutrons, assimilée à une onde plane :

$$\psi = e^{i(kz - \omega t)} \quad (1.6)$$

Où k est la norme du vecteur d'onde \vec{k} avec $k = 2\pi/\lambda$, \vec{z} est la direction de propagation de l'onde, et ω est sa fréquence.

La quantité de mouvement des neutrons est :

$$\vec{p} = m\vec{v} = \hbar\vec{k} \quad (1.7)$$

Lors de l'interaction entre le faisceau incident de neutrons et l'échantillon, ce dernier se comporte alors comme une source en produisant une onde diffusée définie par :

$$\mathcal{Y}_{diff} = -f(\vec{k}, \vec{k}') \frac{e^{i(\vec{k}'\cdot\vec{r} - 2\vec{p}\cdot\vec{t})}}{r} \quad (1.8)$$

où $f(\vec{k}, \vec{k}')$, qui a la dimension d'une longueur, est l'amplitude de diffusion caractérisant la force de l'interaction neutron - noyau.

2. notion de vecteur de diffusion

Lorsque le détecteur est relativement loin de l'échantillon, l'onde diffusée peut être considérée comme une onde plane de vecteur d'onde \vec{k} . Il faut alors définir le vecteur représentant la différence entre le vecteur d'onde incident \vec{k} et le vecteur d'onde diffusé par l'échantillon \vec{k}' , appelé vecteur de diffusion \vec{q} tel que :

$$\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}' \quad (1.9)$$

et le transfert de moment est : $\hbar\vec{q}$.

Si l'échantillon est une particule fixe et unique, l'onde diffusée est sphérique et le processus de diffusion est élastique c'est à dire sans échange d'énergie. Alors $k = k'$ et le transfert de vecteur d'onde s'écrit :

$$q = 2k \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4p}{\hbar} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1.10)$$

Mais si l'échantillon est un ensemble de particules en mouvement, le changement d'énergie du neutron se définit par :

$$\hbar\mathbf{w} = E - E' = \frac{\hbar^2}{2m} (k^2 - k'^2) \quad (1.11)$$

et le transfert de moment associé se définit par :

$$q^2 = k^2 - k'^2 - 2kk' \cos \mathbf{q} = k^2 \left(2 + \frac{w_f}{w_i} \right) - 2k^2 \cos \sqrt{\frac{w_f}{w_i} + 1} \quad (1.12)$$

où w_i est l'énergie des neutrons incidents et w_f est l'énergie des neutrons diffusés.

Par convention, $w_f > 0$ lorsque le neutron cède de l'énergie à l'échantillon.

Le schéma d'une expérience de diffusion est représenté sur la figure 1 :

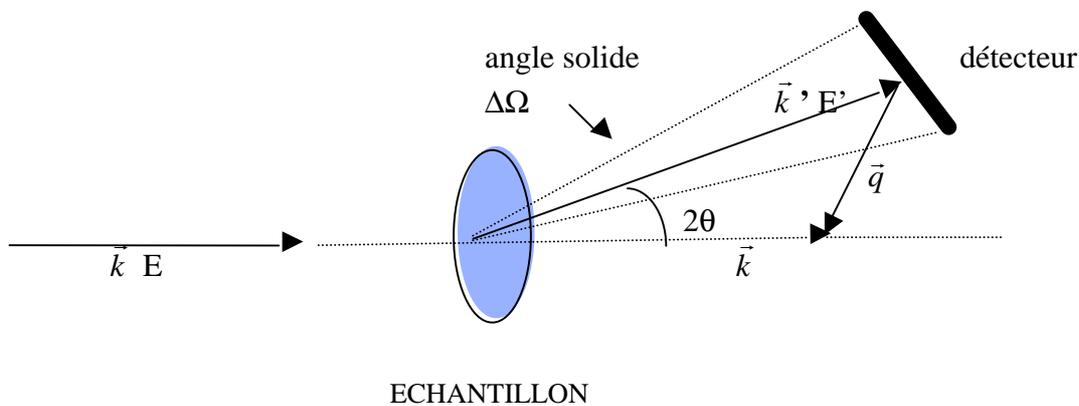


Figure I.1 Schéma d'une expérience de diffusion.

3. Le pseudo-potentiel de Fermi

Etant donné ses propriétés, le neutron interagit principalement avec les noyaux des atomes et ceci de deux manières différentes : par une interaction nucléaire et par une interaction magnétique. Dans le cas de l'interaction nucléaire, les forces mises en présence agissent sur des distances de l'ordre de grandeur de la taille du noyau, soit 10^{-4} Å. De plus la diffusion est isotrope. Le potentiel qui permet de décrire le phénomène de diffusion en tenant compte de ces conditions est le pseudo-potentiel de Fermi :

$$V(\vec{r}) = \frac{2p\hbar^2}{m_n} b_i \mathbf{d}(\vec{r} - \vec{R}_i) \quad (1.13)$$

où r définit la position du neutron, R_i la position du noyau et b_i est la longueur de diffusion ou longueur de Fermi de l'espèce i .

4. diffusion cohérente et diffusion incohérente

Le pseudo-potentiel de Fermi $V(\vec{r})$ ne dépend que de la longueur de diffusion b_i correspondant au terme $f(\vec{k}, \vec{k}')$ dans l'équation (1.8) caractérisant l'interaction neutron – noyau. Cette longueur de diffusion est caractéristique de chaque noyau et de chaque isotope d'un même élément.

La longueur de diffusion b est une grandeur indépendante de l'énergie du neutron mais qui varie en fonction du spin total du système constitué par le neutron et le noyau atomique¹. Le signe et la valeur de b varient de manière irrégulière en fonction du nombre atomique Z et de la masse atomique A . La partie imaginaire représente l'absorption, elle est souvent négligeable.

Comme le neutron peut avoir deux états de spin, ($+ 1/2$ ou $- 1/2$), un diffuseur de spin non nul, s , possède donc deux longueurs de diffusion différentes, b^+ et b^- , correspondant aux états ($s = + 1/2$ ou $s = - 1/2$) du système qui apparaissent de manière aléatoire. Il en résulte que la diffusion d'un neutron par un noyau atomique de spin $S \neq 0$ peut être caractérisée par une **longueur de diffusion cohérente**, b_{coh} , et une **longueur de diffusion incohérente**, b_{inc} telles que :

$$\begin{aligned} b_{coh} &= \langle b_i \rangle \\ b_{inc} &= \sqrt{\langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2} \end{aligned} \quad (1.14)$$

où $\langle b_i \rangle$ est la moyenne sur toutes les orientations possibles des spins nucléaires et sur les distributions éventuelles des isotopes i .

Pour être vraiment rigoureux dans la définition de la longueur de diffusion cohérente b_{coh} , il faut prendre en considération la probabilité pour le spin du noyau de l'élément diffuseur soit dans l'état $s = + 1/2$ ou $s = - 1/2$. En fait, cette probabilité est $\frac{s+1}{2s+1}$ pour $s = + 1/2$ et $\frac{s}{2s+1}$ pour $s = - 1/2$. Par conséquent :

$$b_{coh} = \langle b_i \rangle = \frac{s+1}{2s+1} b^+ + \frac{s}{2s+1} b^- \quad (1.15)$$

La longueur de diffusion varie donc d'un isotope à l'autre, et dépend de l'orientation du spin nucléaire, le neutron ne voit donc pas un potentiel de diffusion uniforme mais un potentiel qui change d'un atome à l'autre. Seul le potentiel moyen, proportionnel à $\langle b_i \rangle$, peut donner des effets d'interférence et donc une diffusion cohérente. L'écart par rapport au potentiel moyen est distribué de manière aléatoire et ne peut donner aucun effet d'interférence. Il conduit alors à une diffusion incohérente qui est proportionnelle à la déviation quadratique moyenne ($\langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2$).

Les longueur de diffusion, b_{coh} et b_{inc} sont reliées aux sections efficaces de diffusion cohérente et incohérente par les relations suivantes :

$$\begin{aligned} \mathbf{s}_{coh} &= 4\mathbf{p} \langle b_i \rangle^2 \\ \mathbf{s}_{inc} &= 4\mathbf{p} (\langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2) \end{aligned} \quad (1.16)$$

avec $\sigma_{totale} = \sigma_{coh} + \sigma_{inc}$

Les valeurs de longueurs de diffusion ont été déterminées expérimentalement et sont tablées. Il est intéressant de remarquer que les longueurs de diffusion de deux isotopes sont, en général, très différentes. La substitution isotopique est exploitée dans certaines expériences pour modifier l'intensité relative de diffusion des différents constituants d'un système sans en modifier significativement les propriétés chimiques.

Il est très important de remarquer les différences substantielles qui existent entre les sections de diffusion cohérente, \mathbf{s}_{coh} , et incohérente, \mathbf{s}_{inc} , de l'hydrogène (H) et du deutérium (D).

Pour l'hydrogène, dont le spin nucléaire est de 1/2,

$$b^+ = 1.01 * 10^{-12} \text{ cm} \quad \text{et} \quad b^- = -4.74 * 10^{-12} \text{ cm}$$

$$\sigma_{\text{coh}} = -1,76 \text{ barn} \quad \text{et} \quad \sigma_{\text{inc}} = 79,91 \text{ barn}$$

(1barn = 10^{-24} cm^2)

Par contre pour le deutérium, dont le spin nucléaire est 1,

$$b^+ = 0.951 * 10^{-12} \text{ cm} \quad \text{et} \quad b^- = 0.1 * 10^{-12} \text{ cm}$$

$$\sigma_{\text{coh}} = 5,60 \text{ barn} \quad \text{et} \quad \sigma_{\text{inch}} = 2,04 \text{ barn.}$$

La très forte diffusion incohérente de l'hydrogène est une propriété importante à prendre en compte lors des expériences. La diffusion par un **système hydrogéné** comme les protéines est dominée par la **diffusion incohérente** des atomes d'hydrogène. Ceci peut être mis à profit lors des études structurales aux petits angles et dans les études de dynamique visant à caractériser les mouvements individuels des atomes d'hydrogène si la molécule étudiée est dans un système totalement, ou très fortement, deutéré.

Une expérience de diffusion de neutrons consiste en la mesure de l'intensité I_f des neutrons diffusés par l'échantillon dans un élément d'angle solide Ω avec une énergie comprise entre E et $E \pm \Delta E$.

Cette intensité s'écrit :

$$I_f(q, \mathbf{w}) = I_0 \frac{d^2 \mathcal{S}(q, \mathbf{w})}{d\Omega d\mathbf{w}} \quad (1.17)$$

où I_0 est l'intensité incidente et $\frac{d^2 \mathcal{S}(q, \mathbf{w})}{d\Omega d\mathbf{w}}$ est la section efficace différentielle de diffusion du système.

Dans le cas simple d'un système constitué d'un seul type d'élément et de N diffuseurs, l'utilisation de la règle de Fermi¹, et du potentiel d'interaction de Fermi, conduit à l'expression suivante de la **section efficace différentielle** :

$$\left(\frac{d^2 \mathbf{s}}{d\Omega d\mathbf{w}} \right) = \frac{1}{N} \frac{k_i}{k_f} \frac{1}{2p\hbar} \sum_{jj'} \overline{b_j b_{j'}} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \exp(-iq\mathbf{R}_{j'}(0)) \exp(iq\mathbf{R}_j(t)) \rangle \exp(-i\mathbf{w}t) dt \quad (1.18)$$

où :

les crochets indiquent qu'une moyenne statistique est effectuée sur tout le système.

$\mathbf{R}_j(t)$ est l'opérateur de position de l'atome j à l'instant t

$b_j b_{j'}$ vérifie la relation :

$$\overline{b_j b_{j'}} = \langle b \rangle^2 + \mathbf{d}_{jj'} (\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2) \quad (1.19)$$

La section efficace différentielle de diffusion d'un système peut être décomposée en deux termes, le premier correspondant à la diffusion cohérente et l'autre à la diffusion incohérente^{1,2} :

$$\left(\frac{d^2 \mathbf{s}}{d\Omega d\mathbf{w}} \right) = \frac{k_f}{k_i} \frac{\mathbf{s}_{coh}}{4p} S(q, \mathbf{w}) + \frac{k_f}{k_i} \frac{\mathbf{s}_{inc}}{4p} S_{inc}(q, \mathbf{w}) \quad (1.20)$$

où $S_{inc}(q, \omega)$ et $S(q, \omega)$ sont les *fonctions de diffusion* ou *facteurs de structure dynamique* cohérente et incohérente respectivement, définies par :

$$\begin{aligned} S_{coh}(q, \mathbf{w}) &= \frac{1}{2p\hbar N} \int \exp(-i\mathbf{w}t) \sum_{jj'} \langle \exp(-q\mathbf{R}_{j'}(0)) \exp(iq\mathbf{R}_j(t)) \rangle dt \\ S_{inc}(q, \mathbf{w}) &= \frac{1}{2p\hbar N} \int \exp(-i\mathbf{w}t) \sum_j \langle \exp(-q\mathbf{R}_j(0)) \exp(iq\mathbf{R}_j(t)) \rangle dt \end{aligned} \quad (1.21)$$

Ces fonctions sont les transformées de Fourier en énergie des : *fonctions intermédiaires de diffusion* cohérente $I(q, t)$ et incohérente $I_{inc}(q, t)$:

$$\begin{aligned} I_{coh}(q, t) &= \frac{1}{N} \sum_{jj'} \langle \exp(-iq\mathbf{R}_{j'}(0)) \exp(iq\mathbf{R}_j(t)) \rangle \\ I_{inc}(q, t) &= \frac{1}{N} \sum_j \langle \exp(-iq\mathbf{R}_j(0)) \exp(iq\mathbf{R}_j(t)) \rangle \end{aligned} \quad (1.22)$$

Comme le montrent l'expression de la (1.19), la diffusion cohérente résulte des corrélations spatio-temporelles existant entre les atomes i et j . Par contre la diffusion incohérente provient des seules corrélations temporelles des diffuseurs.

Dans le cas le plus général où le diffuseur est une macromolécule constituée de plusieurs types d'atomes, l'équation (18) se généralise aisément en effectuant au préalable la somme sur tous les atomes constituant chaque molécule ²

5. diffusion aux petits angles

La diffusion des neutrons aux petits angles concerne les faibles valeurs du transfert de vecteur d'onde q . Elle est principalement utilisée pour étudier la structure d'objets de taille relativement importante, comme les macromolécules biologiques ou non. Cette diffusion peut être considérée comme élastique ($k_i = k_f$)³.

L'expression (1.20), devient :

$$\frac{d\mathbf{S}}{d\Omega} = \frac{1}{4\mathbf{p}} (\mathbf{s}_{inc} S_{inc}(q) + \mathbf{s}_{coh} S(q)) \quad (1.23)$$

avec
$$S(q) = I(q, t = 0) = \frac{1}{N} \sum_{i,j} \langle \exp(iqr_{ij}) \rangle \quad (1.24)$$

où
$$\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{R}_i(0) - \mathbf{R}_j(0).$$

et
$$S_{inc}(q) = 1 \quad (1.25)$$

Quand q tend vers zéro, la fonction de diffusion $S(q)$ tend vers N , et la fonction de diffusion incohérente est égale à 1. Suivant les valeurs du contraste entre la densité de longueur de diffusion du soluté et celle de l'ensemble des molécules de solvant (cette notion sera définie plus en détails dans la suite de ce chapitre) et des sections efficaces totales cohérente et incohérente, le terme $\sigma_{coh} S(q)$ peut devenir prépondérant. En fait, en diffusion aux petits angles, c'est la **diffusion cohérente** qui est observée.

La **diffusion cohérente**, intégrée sur toutes les énergies, a une distribution spatiale caractéristique de la distribution des atomes dans l'échantillon et donne des **informations sur la structure d'un composé**. Il est ainsi possible de déterminer la structure et la taille de la molécule, à basse résolution.

La **diffusion incohérente** intégrée sur toutes les énergies donne un **bruit de fond** constant en q , qui est proportionnel à la section efficace de diffusion incohérente. Sa valeur peut être calculée théoriquement pour chaque échantillon, connaissant le nombre d'hydrogènes qui y sont présents.

Pour **mesurer expérimentalement** le signal de diffusion aux petits angles, on mesure tous les neutrons qui sont diffusés dans un angle solide sans tenir compte de l'énergie échangée entre le neutron et le système diffuseur (approximation élastique). On suppose que $S(q) = S(q,0)$ c'est-à-dire que la moyenne d'ensemble de la structure coïncide avec la moyenne sur un temps infini.

6. Diffusion incohérente inélastique des neutrons.

Pour des macromolécules biologiques naturellement fortement hydrogénées, la section efficace de diffusion de l'équation (1.18) est dominée par la diffusion incohérente due aux atomes d'hydrogène qui ont une section efficace d'environ 40 fois supérieure à celle des autres atomes qui forment la molécule.

Habituellement on distingue trois régions dans un spectre de diffusion incohérente des neutrons, en fonction de l'énergie : le pic élastique, la diffusion quasi-élastique et la diffusion inélastique.(Figure I.2).

- Le pic élastique représente le nombre de neutrons qui ont traversé l'échantillon sans avoir échangé d'énergie ; il constitue en général la partie la plus intense du spectre.
- La diffusion quasi-élastique est due essentiellement aux mouvements de type diffusif.
- La diffusion inélastique provient des excitations vibrationnelles².

Il faut souligner que la séparation entre la région inélastique et la région quasi-élastique est très délicate. En effet, certains mouvements diffusifs peuvent être suffisamment rapides pour s'étendre jusque dans la région inélastique. Inversement, certains mouvements de vibration sont suramortis et sont alors détectés dans la région quasi-élastique.

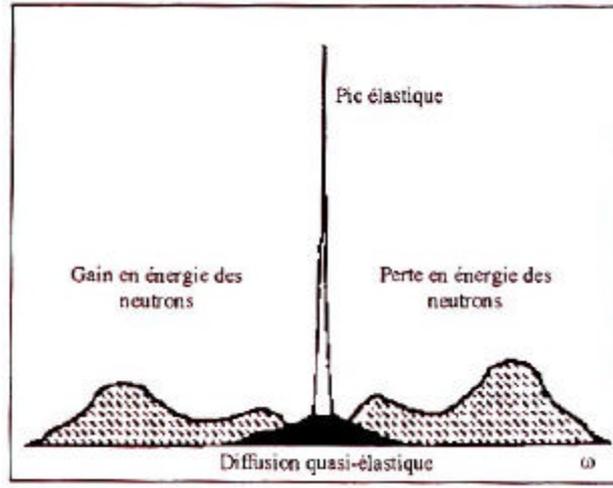


Figure I.2 : Représentation schématique des trois types de diffusion observés en diffusion incohérente élastique, quasi - élastique et inélastique de neutron⁴.

Fonction d'autocorrélation.

La fonction de diffusion incohérente $S_{inc}(Q, \omega)$ est la transformée de Fourier dans l'espace et dans le temps de la fonction d'autocorrélation de Van Hove¹ :

$$S_{inc}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int \exp(-i\mathbf{q}\mathbf{r}) \exp(-i\omega t) G_{inc}(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r} dt \quad (1.26)$$

où :

$$G_{inc}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{N} \sum_j \langle \mathbf{d}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j(0) + \mathbf{R}_j(t)) \rangle \quad (1.27)$$

$G_{inc}(\mathbf{r}, t)$ est la probabilité pour qu'une particule située à l'origine au temps $t=0$, se trouve au temps t dans la position \mathbf{r} . Cette grandeur permet de donner des informations directes sur l'évolution temporelle des positions des atomes, c'est à dire sur leur dynamique. Pour $t \rightarrow \infty$ la corrélation entre $\mathbf{R}(0)$ et $\mathbf{R}(t)$ devient indépendante du temps. Ainsi la relation (1.27) peut être écrite comme la somme de deux composantes :

$$\begin{aligned} G_{inc}(\mathbf{r}, t) &= G_{inc}(\mathbf{r}, \infty) + G'_{inc}(\mathbf{r}, t) \\ \lim_{t \rightarrow \infty} G'_{inc}(\mathbf{r}, t) &= 0 \end{aligned} \quad (1.28)$$

ce qui permet de séparer la partie élastique de la partie inélastique.

La fonction de diffusion incohérente peut par conséquent être divisée en deux parties :

$$S_{inc}(q, \mathbf{w}) = \int G_{inc}(r, \infty) \mathbf{d}(\mathbf{w}) \exp(-i\mathbf{q}\mathbf{r}) d\mathbf{r} + S'(q, \mathbf{w})_{ii} \quad (1.29)$$

Le premier terme est un pic de Dirac, il correspond au **pic élastique** dans la courbe de diffusion. Il a les dimensions d'un facteur de structure et est appelé '**facteur de structure élastique incohérent**' (EISF). Il décrit l'ensemble des positions que peut atteindre l'atome pendant un temps infini, par conséquent il donne des informations directes sur la **géométrie de l'espace accessible** à ce diffuseur. Donc l'existence d'un pic élastique traduit la présence d'un diffuseur dont les mouvements sont localisés dans l'espace. S'il n'y a pas de pic élastique, il s'agit d'un liquide².

Le second terme correspond à la **diffusion inélastique et quasi-élastique**, qui rend compte directement de la **dynamique** de la molécule.

7. Formalisme de la diffusion aux petits angles

a) Diffusion par une solution idéale de macromolécules identiques

L'étude des changements structuraux d'une macromolécule biologique entre l'état natif et les états dénaturés a été suivie par différentes techniques dont l'infrarouge, le dichroïsme circulaire et la diffusion de neutrons aux petits angles. Une molécule peut adopter toutes les orientations possibles lorsqu'elle est en solution⁵ la diffusion de neutrons aux petits angles permet de déterminer sa taille et sa forme et, dans certains cas, sa structure interne.

Considérons un ensemble N de macromolécules en solution. Comme elles peuvent y prendre toutes les orientations possibles, la diffusion est dite isotrope. Si le solvant est constitué de molécules de taille bien plus petite, il peut être considéré comme un milieu continu. Dans l'hypothèse d'une solution monodisperse idéale, c'est-à-dire pour laquelle les particules sont *identiques* et *sans interactions*, le soluté produit, par rapport au solvant, un excès de diffusion cohérente :

$$I_{coh}(q) = \frac{cM}{N_A} K^2 P(q) \quad (1.30)$$

où c est la concentration des macromolécules, M la masse molaire d'une macromolécule, N_A est le nombre d'Avogadro.

K est le contraste moyen de la molécule (par exemple une protéine) par rapport au solvant :

$$K = \sum_i b_{i(\text{protéine})} - b_{D_2O} * \bar{v}_{\text{protéine}} * \frac{M_{\text{protéine}}}{M_{D_2O}} * \rho_{D_2O} \quad (1.31)$$

Où : $\sum b_{i(\text{protéine})}$ est la somme des longueurs de diffusion cohérente des atomes de la protéine (en cm), b_{D_2O} est la longueur de diffusion cohérente de l'eau lourde (en cm).

Il s'agit de déterminer le contraste entre la densité de longueur de diffusion du soluté et celle de l'ensemble des molécules de solvant occupant le volume équivalent à celui de la protéine : dans notre cas, le soluté est la molécule de protéine et le solvant est le tampon. Dans le cas de la diffusion des neutrons par des protéines hydrogénées, le contraste est maximal quand le solvant est constitué à 100% d'eau lourde.

$$b_{D_2O} = 1.92 * 10^{-12} \text{ cm.}$$

$\bar{v}_{\text{protéine}}$ est le volume spécifique de la protéine (en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$),

$M_{\text{protéine}}$ est la masse molaire de la protéine (en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

et M_{D_2O} est la masse molaire du solvant (en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

$$M_{D_2O} = 20 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

ρ_{D_2O} est la densité du solvant (en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), $\rho_{D_2O} = 1.105 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

La figure 3 présente quelques exemples de densités de longueur de diffusion en fonction de la proportion d'eau lourde dans le solvant.

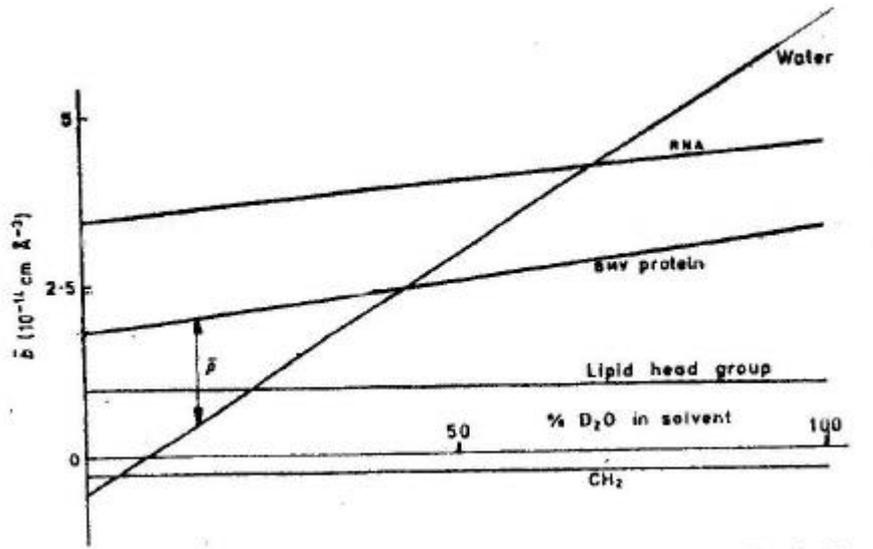


Figure I.3 : densité moyenne de longueur de diffusion \bar{b} de quelques molécules biologiques communes en fonction de la proportion de D_2O dans le solvant. ρ^- est le contraste⁵.

Enfin, $P(q)$, le facteur de forme de la molécule en solution, s'écrit :

$$P(q) = \langle |A(q)|^2 \rangle = \left\langle \left| \frac{1}{K} \int (\mathbf{r}(r) - \mathbf{r}_s) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle \quad (1.32)$$

$\langle \dots \rangle$ désigne la moyenne sur toutes les orientations de la molécule.

(1) Approximation de Guinier : rayon de giration

Aux faibles valeurs de q l'expression du facteur de forme se simplifie par l'approximation de Guinier :

$$P(q) \cong \exp[-(qR_g)^2/3] \quad (1.33)$$

où R_g est le rayon de giration de la macromolécule. Le domaine de validité de cette approximation dépend de la forme de cette dernière. Pour un objet compact il s'étend jusqu'à $q \cong R_g^{-1}$

Le rayon de giration est défini par l'expression :

$$R_g^2 = \frac{1}{KV_p} \int \langle \mathbf{r}(\mathbf{r}) - \mathbf{r}_s \rangle r^2 d\mathbf{r} \quad (1.34)$$

Le carré du rayon de giration est donc la moyenne des carrés des distances r entre chacun des atomes de l'objet et son centre de gravité, pondérés par le contraste. Ceci implique que les valeurs des rayons de giration ne seront pas exactement les mêmes si le rayonnement est constitué de neutrons ou de rayons X, dans la mesure où le contraste est différent dans les deux cas.

La valeur de R_g donne une estimation de la taille du diffuseur. Si ce dernier n'est pas homogène, son rayon de giration dépend du contraste.

(a) L'intensité à l'origine

Le second paramètre intéressant, des courbes de diffusion, qui peut être analysé avec profit est la valeur $I(0)$. Cependant puisque cette valeur ne peut pas être mesurée directement, il est nécessaire de faire une extrapolation à $q = 0$. L'intérêt de $I(0)$ résulte de sa liaison avec la masse moléculaire et le volume moléculaire⁵. Dans le cas d'une solution diluée, l'expression s'écrit⁶

$$I(0) = \frac{Mc}{N_A} \left(\sum_i b_i - \mathbf{r}_s v_p \right)^2 \quad (1.35)$$

où c désigne la concentration de la protéine, M la masse molaire, N_A le nombre d'Avogadro, le terme entre parenthèse est l'expression du contraste entre la molécule de protéine et le solvant avec v_p le volume spécifique de la protéine.

L'équation (33) suggère une méthode pour évaluer la valeur du volume spécifique de la protéine v_p à partir des données de diffusion en fonction de paramètres tels que la pression, dans le cas où la molécule étudiée a une compressibilité importante et dans une gamme de pression dans laquelle elle n'est pas dénaturée. La concentration de la solution peut être contrôlée aussi pour suivre d'éventuels phénomènes d'agrégation.

b) Cas de la diffusion par un mélange de macromolécules identiques en solution diluée.

Nous avons vu jusqu'à présent le cas simple de l'intensité diffusée par une solution idéale de particules identiques.

Dès lors où les échantillons sont soumis à des conditions de dénaturation, Il faut considérer au moins deux populations : la protéine native et la protéine complètement dépliée, et éventuellement des protéines dans des états intermédiaires. Les expressions de l'intensité diffusée doivent prendre en compte ces populations ; l'intensité diffusée s'écrit alors sous la forme :

$$I(q) = \sum f_i I_i(q), \quad (1.36)$$

Où les termes $f_i(q)$ sont les fractions des différentes populations, et les $I_i(q)$ les intensités de diffusion correspondantes.

Les quantités mises en jeu ci-dessus sont dépendantes du paramètre de dénaturation, par exemple la température T .

L'équation (1.36) peut être réécrite sous la forme :

$$I(q,T) = \sum f_i(T) I_i(q,T), \quad (1.37)$$

La détermination des courbes expérimentales $I(q,T)$ mesurées pour différentes valeurs du paramètre T permet d'obtenir des informations sur la structure des différents états en présence, à condition de séparer l'effet dû à la température dans les courbes de diffusion $I_i(q,T)$ de chacune des populations, c'est à dire à condition de mettre $I_i(q,T)$ sous la forme :

$$I_i(q,T) = K_i(T, v_{pi}) P_i(q), \quad (1.38)$$

où $P_i(q)$ est le facteur de forme et $K_i(T, v_{pi})$ le terme de contraste.

Par conséquent, l'expression (1.37) devient :

$$I(q,T) = \sum f_i(T) K_i(T, v_{pi}) P_i(q) \quad (1.39)$$

Si on suppose que les volumes spécifiques des différentes espèces ont des valeurs suffisamment proches pour que le terme de contraste puisse être considéré comme dépendant seulement de T, l'équation (1.39) devient :

$$I(q,T)/ I(0,T) = \sum f_i(T) P_i(q), \quad (1.40)$$

Le carré du rayon de giration mesuré à la température T est donc :

$$R_g^2(T) = \sum_i f_i R_i^2(T), \quad (1.41)$$

où R_i est le rayon de giration de l'espèce i.

(1) Facteurs de forme des chaînes polymériques

Pour un objet étendu (comme une protéine dénaturée), le domaine de validité de l'approximation de Guinier est tellement réduit qu'il est alors nécessaire de faire appel à une autre approximation (Debye).

Une protéine totalement dépliée peut être considérée comme un polymère dont les monomères sont les acides aminés constituant la chaîne polypeptidique, il est alors possible d'utiliser la théorie des polymères⁷ afin de décrire le comportement de cette chaîne car le spectre de diffusion d'une solution de protéines totalement dépliées est semblable à celui d'une solution diluée de polymères.

Dans ce paragraphe nous résumons quelques résultats de la théorie des polymères concernant en particulier le facteur de forme P(q).

Nous rappelons quelques concepts de base sur les polymères :

Un homopolymère est une molécule linéaire formée d'une série d'éléments chimiques identiques, les monomères. Un polymère en solution peut se comporter de différentes manières selon le type de solvant dans lequel il se trouve⁸.

- si les interactions polymère-polymère sont équivalentes aux interactions polymère-solvant, le polymère se trouve en solvant θ . Il peut adopter toutes les conformations statistiquement possibles et la distribution des monomères est gaussienne. Il se comporte alors comme une *chaîne gaussienne* ou *idéale* ;

- dans le cas où les interactions polymère-solvant sont privilégiées, le polymère est totalement solvato. Le polymère se trouve alors en bon solvant et ne peut plus adopter toutes les conformations qu'il aurait en solvant θ . Il se comporte alors comme une *chaîne à volume exclu*.
- dans le cas où les interactions intramoléculeaires sont privilégiées, le polymère se trouve en mauvais solvant. Il adopte alors une *conformation effondrée plus ou moins compacte*.

Une protéine est un hétéropolymère dont les monomères sont des résidus d'acides aminés. Nous pouvons considérer qu'en bon solvant les différences entre les divers résidus sont marginales et une protéine se comportera comme une *chaîne à volume exclu*. Par contre au voisinage du point θ et surtout en mauvais solvant, des interactions préférentielles entre certains résidus apparaîtront et la protéine ne se comportera plus comme un homopolymère.

(2) Loi de Debye

Le modèle gaussien est mathématiquement le modèle le plus simple. Une expression analytique, qui décrit le profil de diffusion pour une chaîne gaussienne a été déterminée par Debye⁹ :

Cette loi permet de déterminer le rayon de giration dans un domaine de vecteur de diffusion qui satisfait la relation $qR_g < 3$. Le facteur de forme $P(q)$ est donné par l'expression :

$$P_D(q) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + \exp(-x)] \quad (1.42)$$

où $x = (qR_g)^2$.

Cette loi peut également être appliquée pour déterminer le rayon de giration, pour des configurations à volume exclu¹⁰, puisque dans la zone de q explorée le comportement de la chaîne étendue par rapport à son solvant ne modifie pas l'allure de la courbe de diffusion.

(3) Chaîne à longueur de persistance

Lorsque $q \geq 3(R_g)^{-1}$ la fonction de Debye⁹ ne donne pas une représentation correcte du spectre de diffusion d'une chaîne polymérique réelle. Les modèles qui permettent de décrire la conformation moyenne d'une telle chaîne se classent naturellement en fonction de la résolution spatiale, q^{-1} .

A haute résolution, où les détails de la conformation et de la structure se révèlent, il est nécessaire de tenir compte des interactions existant entre différentes parties de la chaîne :

- les interactions à longue distance sont dues aux effets de volume exclu.
- En revanche, les interactions à courte distance résultent essentiellement d'un effet stérique, qui est la restriction à la rotation autour des liaisons de la chaîne principale.

La chaîne présente une rigidité locale qui est représentée par la longueur statistique b . La longueur statistique est la longueur minimale d'un segment dont l'une des extrémités peut prendre toutes les orientations possibles par rapport à l'autre. Elle permet de distinguer les polymères rigides des polymères flexibles à l'aide du rapport b/L , où L est la longueur de contour du filament. Une chaîne flexible correspond à $b/L \ll 1$ et une chaîne rigide à $b/L \gg 1$.

Si des Cloiseaux¹¹ en 1973 a donné une expression du facteur de forme d'une chaîne semi-flexible infiniment longue ($L/b \rightarrow \infty$), l'expression de Sharp et Bloomfield¹² :

$$P_{SB}(x) = P_D(x) + \frac{b}{L} \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) \exp(-x) \right] \quad (1.43)$$

où $P_D(x)$ est la fonction de Debye, $x = q^2 Lb/6$, est plus appropriée pour décrire une chaîne de longueur finie, comme une protéine dénaturée. Cependant ce résultat n'est valable que pour une **chaîne idéale** telle que $L/b > 10$ et $qb < 3,1$.

Le rayon de giration de la chaîne à longueur de persistance a été calculé par Benoit-Doty¹³ :

$$R_g^2 = b^2 \left[\frac{y}{6} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4y} - \frac{1}{8y^2} (1 - \exp(-2y)) \right] \quad (1.44)$$

$$y = \frac{L}{b}$$

Lorsque $qb > 3,1$ les difficultés théoriques deviennent trop importantes pour obtenir directement le facteur de forme d'une chaîne semi-flexible de longueur finie. En utilisant la méthode de Monte Carlo, Pedersen et Schurtenberger¹⁴ ont d'abord simulé les spectres de diffusion de telles chaînes, avec et sans volume exclu. Ils ont ensuite représenté les résultats des simulations par diverses expressions analytiques qui peuvent être utilisées pour interpréter les spectres expérimentaux. Les fonctions de diffusion sont approchées, aux petites valeurs de q , avec une chaîne gaussienne ou une chaîne à volume exclu, et se superposent avec une expression pour un *cylindre* pour les valeurs de q plus grandes. Avec ce modèle il est possible d'étudier la zone de q intermédiaire ($1/Rg < q < 1/a$ avec a la taille caractéristique d'un centre diffuseur), qui nous permet de mieux caractériser la conformation de la chaîne.

Les expressions correspondant à la 3^{ème} approximation de Pedersen et Shurtenberger (PS) sont les suivants :

- dans le cas d'**une chaîne idéale** l'expression (38) est utilisée pour les valeurs de q telles que $qb \leq 3.1$. Pour les valeurs supérieures, l'approximation suivante est utilisée :

$$P_{PS}(qL, qb) = \frac{a_1}{(qb)^{p_1}} + \frac{a_2}{(qb)^{p_2}} + \frac{P}{qL} \quad (1.45)$$

où $p_1 = 4,95$ et $p_2 = 5,13$ sont des constantes ajustées de telle sorte que l'expression décrive correctement le résultat des simulations. Par contre, les coefficients a_1 et a_2 doivent être calculés en imposant la continuité du facteur de forme,

$$P(qL, qb) = P_{SB}(qL, qb) + P_{PS}(qL, qb), \quad (1.47)$$

et de sa dérivée par rapport à q pour $q = 3,1b^{-1}$;

- dans le cas d'une **chaîne à volume exclu** (VE), l'expression (1.47) demeure valable lorsque $qb > 3,1$. Par contre, aux plus faibles valeurs de q , l'expression de Sharp et Bloomfield (SB) est modifiée de la manière suivante :

$$P_{SB,VE}(x) = P_{VE}(x) + a_4 \left(\frac{b}{L} \right)^{1+p_3} \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) \exp(-x) \right] \quad (1.48)$$

Maintenant, l'expression du rayon de giration est

$$R_g^2 = \frac{Lb}{6} \left[1 + \left(\frac{L}{3.12b} \right)^2 + \left(\frac{L}{8.67b} \right)^3 \right]^{(2n-1)} \quad (1.49)$$

où $v = 0,588$ est l'exposant de volume exclu. Le premier terme de l'expression (1.48) est

$$P_{VE}(x) = w(x) P_D(x) + [1 - w(x)] (C_1 x^{-1/v} + C_2 x^{-2/v} + C_3 x^{-3/v}) \quad (1.50)$$

où

$$w(x) = \frac{1}{2} \left[1 - \tanh \frac{x - C_4}{C_5} \right] \quad (1.51)$$

est une fonction de raccordement empirique. Dans les expressions précédentes les constantes numériques valent $a_4 = 3,06$, $p_3 = 0,44$, $C_1 = 1,220$, $C_2 = 0,4288$, $C_3 = -1,651$, $C_4 = 1,523$ et $C_5 = 0,1477$.

Enfin, que la chaîne présente ou non des interactions de volume exclu, il est nécessaire de tenir compte de ses dimensions transverses. En première approximation, ceci peut être fait en multipliant les expressions complètes des facteurs de forme précédents par celui de la section de la chaîne¹⁰. Si, en moyenne, la chaîne peut être considérée comme cylindrique le facteur de forme de sa section $P_s(q)$ est donnée par la fonction d'Airy :

$$P_s(q) = [2J_1(qR_c)/(qR_c)]^2 \quad (1.52)$$

où $J_1(y)$ est la fonction de Bessel du premier ordre et R_c le rayon transverse. Pour des valeurs de q suffisamment faibles, ce facteur de forme peut être décrit par une approximation de Guinier

$$P_S(q) \cong \exp[-(qR_{g,c})^2/2] \quad (1.53)$$

où $R_{g,c}$ est le rayon de giration de la section transverse de la chaîne¹⁰. Lorsque que cette dernière est cylindrique $(R_{g,c})^2 = (R_c)^2/2$.

c) Représentation de Kratky

Lors de l'étude des polymères, il est courant de présenter les courbes de diffusion dans la représentation de Kratky. Elle consiste à tracer la quantité $q^2 I(q)$ en fonction de q . Elle permet d'obtenir immédiatement des informations qualitatives sur la conformation de la chaîne en suivant la dépendance de l'intensité de diffusion en fonction du vecteur de diffusion.

En effet les courbes sont très différentes selon que le diffuseur est un globule compact ou une chaîne dépliée.

La courbe de diffusion d'un globule compact suit à grand q la loi de Porod (au moins approximativement) $I(q) \propto q^{-4}$.

En représentation de Kratky la courbe présente une décroissance hyperbolique en q^{-2} pour des valeurs de q suffisamment grandes¹⁵. La représentation de Kratky présente un pic, dont la position dépend de la valeur de R_g .

Pour une chaîne dépliée, la dépendance en q de l'intensité diffusée, en représentation de Kratky, est beaucoup moins rapide que pour un globule compact. Il n'apparaît plus de pic bien marqué. Toutefois il est difficile de donner des détails sur la nature de la chaîne simplement en observant l'allure de la courbe dans la représentation de Kratky, car elle dépend de plusieurs paramètres :

- de la valeur du rayon de giration, R_g ;
- de la présence ou l'absence d'interactions de volume exclu ;
- des valeurs de la longueur de contour, L , de l'élément statistique, b , et du rayon de giration moyen, $R_{g,c}$, de la section de la chaîne.

La valeur de cette dernière quantité dépend du contraste local entre la protéine et le solvant¹⁰.

Selon la conformation de la molécule et les valeurs de q , le tableau ci-dessous récapitule différents comportements caractéristiques de l'intensité diffusée par une molécule.

Chaîne idéale	$3(R_g)^{-1} < q < 2b^{-1}$	$q^2 I(q) = \text{cste}$
Chaîne à volume exclu	$3(R_g)^{-1} < q < 2b^{-1}$	$q^2 I(q) = q^{-0,3}$
Chaîne semi-flexible	$q > 2b^{-1} ; L \gg b$	$q^2 I(q) \propto qL^{-1} \exp[-(qR_{g,c})^2/2]$
Molécule globulaire compacte	$q \gg (R_g)^{-1}$	$q^2 I(q) \propto q^{-2}$

d) Effet des interactions

Les résultats précédents concernent des solutions idéales, c'est-à-dire pour lesquelles les particules peuvent être considérées sans aucune interaction entre elles.

En fait, une solution monodisperse réelle de particules sphériques de protéines doit être décrite comme la convolution entre la distribution des particules en solution $d(\mathbf{r})$ et la distribution du contraste $K(\mathbf{r})$ ¹⁶. L'intensité diffusée par une telle solution est alors le produit de l'intensité diffusée par une particule en solution idéale (*facteur de forme* $P(q)$) par le *facteur de structure de la solution* $S(q)$, qui tient compte de l'interaction entre les particules.

$$I(q, c) = \frac{cM}{N_A} K^2 P(q, 0) * S(q, c) \quad (1.54)$$

L'expression générale du facteur de structure est :

$$S(q, c) = 1 + \frac{cN_A}{M} \left\langle \int [g(\mathbf{r}) - 1] \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \right\rangle \quad (1.55)$$

où $\mathbf{r} = (\mathbf{r}_{0,1} - \mathbf{r}_{0,2})$ est le vecteur distance entre deux points particuliers des molécules 1 et 2.

Pour des molécules compactes, ces points sont, en général, choisis comme étant leurs centres de masse. $g(\mathbf{r})$ est la fonction de corrélation de paire correspondante.

$$\text{Lorsque } Q = 0, P(q,0) = 1$$

et

$$S(c,0) = 1 + \frac{cN_A}{M} \left\langle \int [g(\mathbf{r}) - 1] d\mathbf{r} \right\rangle = \frac{cRT}{M} \chi_T \quad (1.56)$$

où R est la constante des gaz parfaits et $K_T = (c \partial \mathbf{P} / \partial c |_{T,P})^{-1}$ est la compressibilité osmotique de la solution dont la pression osmotique est :

$$\mathbf{P} = (RT/M) c (1 + A_2Mc + A_3Mc^2 + \dots) \quad (1.57)$$

où A_2, A_3, \dots sont le second, le troisième, ... coefficients du viriel. Lorsque les interactions entre diffuseurs sont répulsives les coefficients du viriel sont positifs. Ils sont négatifs dans le cas contraire.

Les expressions (1.56) et (1.57) montrent alors que l'intensité cohérente diffusée vers l'avant en présence d'interactions, peut s'écrire de la manière suivante :

$$I_{\text{coh}}(0, c) = \frac{cM}{N_A} K^2 (1 + 2A_2Mc + 3A_3Mc^2 + \dots)^{-1} \quad (1.58)$$

A $Q \neq 0$ il est possible de mettre l'intensité diffusée par une solution de macromolécules sous la forme approchée, ce qui est vrai au premier ordre en Q^2

$$I_{\text{coh}}(q, c) \cong \frac{cM}{N_A} K^2 (1 + 2A_2Mc + 3A_3Mc^2 + \dots)^{-1} P(q, c) \quad (1.59)$$

où

$$P(q, c) \cong 1 - [qR_g(c)]^2/3 \quad (1.60)$$

est un facteur de forme apparent. $R_g(c)$ est le rayon de giration apparent que l'on mesure expérimentalement.

Son carré varie de la manière suivante avec la concentration :

$$[R_g(c)]^2 = (R_g(0))^2 (1 + 2B_2Mc + 3B_3Mc^2 + \dots)^{-1}. \quad (1.61)$$

où les coefficients B_2, B_3, \dots sont en général différents des coefficient du viriel. Ces résultats ne sont valables que pour de faibles valeurs de q , telles que $qR_g(c) \ll 1$.

e) Correction du facteur de forme par la concentration

En résumé les expression ci-dessus montrent que, si l'on veut obtenir le facteur de forme $P(q)$ d'une protéine en solution, à partir des mesures de l'intensité diffusée $I_{\text{coh}}(q)$ par la solution réelle (non idéale) il est nécessaire de tenir en compte du facteur de structure $S(q,c)$ de la solution.

Afin de relier $I_{\text{coh}}(q)$ et $P(q)$, Zimm¹⁷ a proposé l'approximation suivante :

$$\frac{cMK^2}{N_A I_{\text{coh}}(q, c)} \cong \frac{1}{P(q)} + 2A_2Mc + \dots \quad (1.62)$$

pour représenter le spectre de diffusion d'une solution de polymères. Au premier ordre en c , cette approximation semble justifiée si le polymère peut être décrit comme une chaîne aléatoire de dimension transverse nulle. Benoît et Benmouna¹⁸ ont tenté de démontrer sa validité à tous les ordres en c , mais leur démarche n'est pas convaincante.

L'approximation (1.62) implique que $B_2 = A_2$. Ceci est assez peu vraisemblable pour une chaîne réelle dont les dimensions radiales ne sont pas nulles. Nous avons donc modifié l'approximation de Zimm de la manière suivante :

$$\frac{cMK^2}{N_A I_{\text{coh}}(q, c)} \cong \frac{1 + 2A_2Mc + \dots}{1 + 2B_2Mc + \dots} \left[\frac{1}{P(q)} + 2B_2Mc + \dots \right] \quad (1.63)$$

afin que les comportements de l'intensité diffusée vers l'avant et du rayon de giration soient décrits par les expressions (1.58) et (1.61), respectivement.

8. Etude de la dynamique

Outre des renseignements statiques sur les protéines, la diffusion de neutrons permet d'explorer la dynamique de ces systèmes. Nous allons nous intéresser dans un premier temps à la diffusion incohérente qui renseigne sur la dynamique individuelle des atomes des protéines. Dans le cas classique, où le système contient un grand nombre d'atomes d'hydrogène, la diffusion incohérente est principalement due à ces atomes, comme nous l'avons exposé dans la partie concernant les sections efficaces de diffusion (Chapitre 1). Nous exposerons par conséquent les développements relatifs à une seule espèce de diffuseur. On rappelle alors que la fonction intermédiaire de diffusion incohérente s'écrit :

$$I_{inc}(\vec{q}, t) = \frac{1}{N} \sum_j \langle \exp(i\vec{q} \cdot \vec{R}_j(0)) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{R}_j(t)) \rangle \quad (1.64)$$

N désigne alors le nombre d'atomes d'hydrogène du système, et $\mathbf{R}_j(t)$ est l'opérateur position du diffuseur j au temps t .

a) Séparation des mouvements

Le vecteur position $\mathbf{R}_j(t)$ peut être décomposé en différentes contributions en fonction de la nature des mouvements de l'atome et de la molécule dans son ensemble. On distingue trois contributions principales :

- le déplacement du centre de masse de la molécule dans son ensemble $\mathbf{T}(t)$
- la rotation par rapport à un repère lié au centre de masse : $\mathbf{R}(t)$
- la vibration de l'atome autour de sa position d'équilibre : $\mathbf{v}(t)$

ainsi le vecteur position s'écrit :

$$\mathbf{r}(t) = \mathbf{T}(t) + \mathbf{R}(t) + \mathbf{v}(t) \quad (1.65)$$

Si maintenant on exprime ainsi chaque vecteur associé aux diffuseurs du système et si l'on fait l'hypothèse que les trois types de mouvements sont découplés, on sépare les différents termes et leur moyenne thermique. Ainsi :

$$I(\vec{q}, t) = \frac{1}{N} \sum_j \langle \exp(i\vec{q} \cdot (\vec{T}_j(t) - \vec{T}_j(0))) \rangle \langle \exp(i\vec{q} \cdot (\vec{R}_j(t) - \vec{R}_j(0))) \rangle \langle \exp(i\vec{q} \cdot (\vec{v}_j(t) - \vec{v}_j(0))) \rangle \quad (1.66)$$

En plus de l'hypothèse de découplage des mouvements, nous supposons que les opérateurs positions commutent, quel que soit le temps t , ce qui revient à nous placer dans une hypothèse de mécanique classique. La fonction intermédiaire de diffusion incohérente est donc le produit de trois contributions : un terme de vibration, un terme de rotation et un terme de translation. La fonction incohérente de diffusion, transformée de Fourier dans l'espace des temps de $I(\vec{q}, t)$ s'écrit donc comme le produit de convolution de trois termes :

$$S_{\text{inc}}(\vec{q}, \omega) = S_{\text{translation}}(\vec{q}, \omega) \otimes S_{\text{rotation}}(\vec{q}, \omega) \otimes S_{\text{vibration}}(\vec{q}, \omega) \quad (1.67)$$

Le terme vibrationnel est composé de deux contributions : une partie élastique et une partie inélastique :

$$S_{\text{vibration}}(\vec{q}, \omega) = e^{-2W_v(\vec{q})} [\delta(\omega) + S_{v,\text{inel}}(\vec{q}, \omega)] \quad (1.68)$$

Le facteur de Debye-Waller s'écrit aussi :

$$e^{-2W_v(\vec{q})} = e^{-\langle u^2 \rangle q^2 / 3} \quad (1.69)$$

$\langle u^2 \rangle$ désigne alors le déplacement carré moyen des atomes autour de leur position d'équilibre. La partie inélastique est la somme de pics de Dirac dus aux modes normaux de la molécule. Elle concerne les transferts d'énergie élevés. Dans la partie quasi-élastique, ce terme n'intervient en général que comme un bruit de fond pratiquement plat et non structuré. La fonction de diffusion incohérente devient :

$$S_{\text{inc}}(\vec{q}, \omega) = e^{-\langle u^2 \rangle q^2 / 3} (S_{\text{translation}}(\vec{q}, \omega) \otimes S_{\text{rotation}}(\vec{q}, \omega) + S_{v,\text{inel}}(\vec{q}, \omega)) \quad (1.70)$$

Dans la partie quasi-élastique, autour du pic élastique, qui correspond aux transferts d'énergie nuls, les termes rotationnel et translationnel vont contribuer au signal. C'est donc la partie quasi-élastique qui nous renseignera sur les mouvements diffusifs des atomes du système.

(1) Facteur de structure dynamique incohérent dans le cas d'une seule espèce globulaire en solution

(a) Diffusion quasi-élastique

Pour simplifier l'interprétation des données, il est indispensable de séparer les différents types de mouvements suivant les échelles de temps sur lesquels ils se produisent, et par conséquent de faire l'hypothèse que ces mouvements ne sont pas couplés. Entre d'autres termes, nous supposons que les mouvements de type vibrationnel, qui apparaissent dans l'échelle de la dizaine de femtosecondes, sont découplés des mouvements de type diffusif, qui ont des temps caractéristiques de l'ordre de la picoseconde. Ceci revient à considérer que le facteur de structure dynamique incohérent, $S_{inc}(q, \omega)$, est le produit de convolution des facteurs de structure correspondant aux deux types de mouvements, vibrationnel et diffusif :

$$S_{inc}(q, \omega) = S_{vib,inc}(q, \omega) \otimes S_{diff,inc}(q, \omega) \quad (1.71)$$

Dans la région quasi-élastique, qui est celle des mouvements de type diffusif, et qui, pour les échantillons en solution du type qui nous intéressent, correspond à des transferts d'énergie $|\Delta E| = \hbar\omega < 1 \text{ meV}$, l'influence de la convolution avec les excitations de vibration se résume essentiellement à un facteur Debye-Waller $DW = \exp(-\langle u^2 \rangle q^2 / 3)$, et à un bruit de fond supplémentaire indépendant de l'énergie, qui est dû aux mouvements vibrationnels de basse énergie. Dans ces conditions, le *facteur de structure dynamique incohérent dans la région quasi-élastique*, que nous cherchons ici à analyser, peut se mettre sous la forme :

$$S_{q.e.,inc}(q, \omega) = \exp(-\langle u^2 \rangle q^2 / 3) [S_{diff,inc}(q, \omega) + B(q)] \quad (1.72)$$

$S_{diff,inc}(q, \omega)$ provient des seuls mouvements de type diffusifs. et $\langle u^2 \rangle$ représente l'amplitude quadratique moyenne de vibration.

(b) Mouvements d'ensemble de la protéine

Dans une poudre de protéine hydratée, les macromolécules sont confinées, ce qui implique que la diffusion quasi-élastique de neutrons a son origine uniquement dans les mouvements internes de la protéine. Il n'en est pas de même dans une solution, où les protéines peuvent diffuser librement. Ce mouvement de diffusion brownienne influence le spectre de neutrons dans la région quasi-élastique en produisant un élargissement. Il est alors

nécessaire, pour obtenir la dynamique interne de la protéine, de déconvoluer le signal mesuré $S_{\text{diff,inc}}(q,\omega)$ de la fonction de diffusion $S_{\text{ens,inc}}(q,\omega)$ correspondant aux mouvements d'ensemble de la protéine. Ce découplage est raisonnable dans la mesure où les mouvements browniens des protéines (natives) interviennent dans la gamme de temps 0.05-1 ns, alors que sur un spectromètre en temps de vol nous pouvons détecter les mouvements internes qui ont des temps caractéristiques de l'ordre de quelques picosecondes.

L'équation de base qui gouverne les mouvements de diffusion continue est la loi de Fick :

$$\frac{dG_s(r,t)}{dt} = D_s \nabla^2 G_s(r,t) \quad (1.73)$$

où $G_s(r,t)$ est la probabilité pour une particule d'être en r à l'instant t , et D_s est le coefficient de diffusion.

Avec les conditions aux limites : $G_s(r,t) = \delta(r)$ à $t=0$, et $G_s(r,t) = 0$ quand $t \rightarrow \infty$, la solution de l'équation précédente est une gaussienne donnée par :

$$G_s(r,t) = \frac{1}{(4\pi D_s t)^{3/2}} \exp\left(-r^2 / 4D_s t\right) \quad (1.74)$$

Sa double transformée de Fourier (dans l'espace et le temps) est le facteur de structure dynamique incohérent :

$$S_{\text{inc}}(q,\omega) = L(q,\omega) = \frac{1}{\rho} \frac{\Gamma(q)}{\Gamma(q)^2 + \omega^2} \quad (1.75)$$

Le spectre de neutrons correspondant est une lorentzienne, dont la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(q)$ croît avec q suivant la loi : $\Gamma(q) = D_s q^2$.

La diffusion de translation globale des protéines dans la solution est régie par les équations précédentes. Le coefficient D_s de self-diffusion suit la loi d'Einstein, $D_s = k_B T / 6\rho R_H \mathbf{h}$, qui relie D_s au rayon hydrodynamique R_H de la protéine à la température T dans un solvant de viscosité η . Il faut ajouter au mouvement de translation celui de self-rotation, qui, pour une particule dense de forme sphérique, est caractérisé par le coefficient D_r qui suit la loi de Debye-Stokes-Einstein : $D_r = k_B T / 8\rho R_H^3 \mathbf{h}$. Il a été démontré¹⁹ que le mouvement de rotation de la particule en solution ne modifie pas le profil lorentzien de la fonction de diffusion, mais augmente seulement sa largeur à mi-hauteur. La fonction de diffusion $S_{\text{ens,inc}}(q,\omega)$ correspondant aux mouvements d'ensemble de la protéine est une lorentzienne $L_1(q,\omega)$ de demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_1(q) = D_{\text{app}} q^2$, avec un coefficient de

diffusion apparent D_{app} légèrement supérieur à D_s . Pour une protéine de 14 Å de rayon de giration, D_{app} a été trouvé sensiblement égal à 1.27 D_s .

Finalement, le facteur de structure dynamique incohérent correspondant aux mouvements diffusifs peut se mettre sous la forme :

$$S_{diff,inc}(q, \mathbf{w}) = L_1(q, \mathbf{w}) \otimes S_{interne}(q, \mathbf{w}) \quad (1.76)$$

où $S_{interne}(q, \omega)$ est la fonction de diffusion correspondant aux mouvements internes de la protéine.

(c) Mouvements internes de la protéine

Les mouvements diffusifs internes d'une protéine sont caractérisés par un confinement des diffuseurs dans un certain volume. En terme de fonction de diffusion, cela se traduit par la présence d'un pic purement élastique $A_0(q)\delta(\omega)$ dans la fonction de diffusion $S_{interne}(q, \omega)$, traditionnellement appelé EISF (elastic incoherent structure factor). La variation avec Q de l'intensité de ce pic dépend des *dimensions et de la forme du volume de confinement*. La partie quasi-élastique de $S_{interne}(q, \omega)$ dépend des *temps caractéristiques et des amplitudes de diffusion dans le volume de confinement*. Il est évident que l'expression de cette partie quasi-élastique est très compliquée, étant donné la diversité des mouvements diffusifs des atomes d'hydrogène, suivant leur position dans la macromolécule. Dans le but d'obtenir une description phénoménologique simple des mouvements internes, nous avons choisi de décrire la contribution quasi-élastique par une seule Lorentzienne $L_2(q, \omega)$. Il est clair que ceci constitue une approximation et que $L_2(q, \omega)$ représente une moyenne des différents types de mouvements diffusifs. Toutefois cette approximation est suffisante pour suivre les modifications de dynamique au cours du dépliement.

Le modèle choisi pour la fonction de diffusion correspondant aux mouvements internes est finalement :

$$S_{interne}(q, \mathbf{w}) = A_0(q)\mathbf{d}(\mathbf{w}) + (1 - A_0(q))L_2(q, \mathbf{w}) \quad (1.77)$$

(2) Expression finale du facteur de structure dynamique incohérent

En utilisant les équations (1.72), (1.76) et (1.77), on obtient l'expression suivante pour le signal de diffusion quasi-élastique mesuré expérimentalement sur une solution de protéine :

$$S_{q.e.,inc}(q, \omega) = \exp\left(-\langle u^2 \rangle q^2 / 3\right) \{L_1(q, \omega) \otimes [A_0(q)\mathbf{d}(\omega) + (1 - A_0(q))L_2(q, \omega)] + B(q)\} \otimes R(\omega) \quad (1.78)$$

où $R(\omega)$ représente la fonction de résolution de l'instrument mesurée sur l'échantillon de vanadium.

Deux remarques s'imposent : la première est que cette expression décrit bien le signal mesuré, à condition de négliger le terme de diffusion cohérente, ce qui est une approximation légitime puisque ce terme est faible devant la contribution incohérente. La seconde est que le signal mesuré ne comporte pas de pic élastique, puisque le terme $A_0(q)\delta(\omega)$ est convolué à la lorentzienne $L_1(q, \omega)$ décrivant les mouvements d'ensemble. Il est donc plus raisonnable dans le cas des protéines en solution de ne pas parler d'EISF, mais plutôt de pseudo-EISF $A_0(q)$, qui est en fait un EISF dans le référentiel de la protéine.

Expérimentalement, le signal de diffusion quasi-élastique incohérent est ajusté à l'expression (5.14), pour chaque valeur du transfert de moment q indépendamment. On obtient ainsi les quatre paramètres que nous avons introduit ci-dessus, c'est-à-dire :

- le déplacement quadratique moyen de vibration $\langle u^2 \rangle$,
- la demi-largeur $\Gamma_1(q) = D_{app}q^2$ de la lorentzienne "étroite" $L_1(q, \omega)$ qui décrit les mouvements d'ensemble des protéines, et qui permet d'atteindre le coefficient apparent D_{app} de self-diffusion,
- la demi-largeur $\Gamma_2(q)$ de la lorentzienne "large" $L_2(q, \omega)$ qui décrit les mouvements internes des protéines, et qui donne accès au temps de corrélation moyen de ces mouvements,
- le pseudo-EISF $A_0(q)$, dont la variation avec q donne des informations sur la quantité d'atomes d'hydrogène qui participent à la diffusion, et sur la nature des mouvements.

Cet ajustement ne nécessite pas l'introduction à *a priori* d'un modèle, ni pour le pseudo-EISF $A_0(q)$, ni pour la largeur $\Gamma_2(q)$ de la lorentzienne $L_2(q,\omega)$. Ce sont les variations avec q de ces deux grandeurs qui permettent de dire, à *posteriori*, si les mouvements internes suivent ou non un modèle théorique donné. Nous décrivons dans le paragraphe suivant les différents modèles de diffusion confinée qui sont les plus aptes à représenter la dynamique interne des protéines, et les expressions de $A_0(q)$ et de $\Gamma_2(q)$ qui sont caractéristiques de ces modèles.

Facteur de structure élastique incohérent (EISF)

b) Analyse des données de diffusion quasiélastique de neutron par des modèles d'exponentielles.

Expérimentalement (par méthode de temps de vol et de rétrodiffusion), on accède directement aux fonctions de diffusion $S(q,\omega)$. Pour obtenir les fonctions $I(q,t)$, il faut faire la transformée de Fourier des fonctions $S(q,\omega)$ expérimentales.

$$I(q,t)_{BPTI} = \int_{-\infty}^{+\infty} S(q,\omega)_{BPTI} e^{i\omega t} d\omega \quad (1.79)$$

La transformée de Fourier a été effectuée numériquement par MATLAB avec l'option Fast Fourier Transform.

Les spectres qui seront par la suite exploités pour l'analyse seront ceux obtenus de la manière suivante :

$$I(q,t)_{BPTI,normalisé} = \frac{I(q,t)_{BPTI}}{I(q,t=0)_{BPTI}} \quad (1.80)$$

(1) Le modèle d'exponentielle simple

Les spectres $I(q,t)$ obtenus sont ajustés par un modèle d'exponentielle simple :

$$I(q,t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau(q)}\right) \quad (1.81)$$

L'influence de la pression sur la dynamique globale du BPTI est comparée en traçant l'inverse du temps caractéristique τ en fonction du carré de vecteur d'onde.

(2) Le modèle d'exponentielle étirée

Avant de faire toutes analyse, il est important de préciser la pertinence et la signification de cette fonction dite de Kolhrausch-William-Watts²⁰.

L'ajustement des données est fait en utilisant une exponentielle étirée de la forme :

$$I(q,t)_{BPTI,normalisé} = \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right) \quad (1.82)$$

Où τ est le temps de relaxation du système et β est un exposant compris entre 0 et 1, rendant compte de la distribution des mouvements :

- si β tend vers 0, alors la distribution des mouvements est large et uniforme. $I(q,t)$ est la conséquence de la transformée de Fourier d'un spectre de $S(q, \omega)$ présentant une lorentzienne étroite. La dynamique du système est lente.
- si β tend vers 1, alors la distribution des mouvement est étroite ce qui correspond non plus à plusieurs mais à un seul temps caractéristique. $I(q,t)$ correspond à une exponentielle simple $I(q,t) = \exp(-t/\tau)$ conséquence de la transformée de Fourier d'un spectre de $S(q, \omega)$ présentant une lorentzienne large. La dynamique du système est rapide.

(3) Le modèle de la somme d'exponentielles

Nous avons analysé ces différentes décroissances de $I(q,t)$ par le biais d'une somme d'exponentielles, déduites de l'équation (1.78), qui tiennent compte de deux temps de relaxation τ_1 et τ_2 . τ_1 décrivant les mouvements globaux de la protéine dans la solution et τ_2 permettant d'observer la dynamique interne du BPTI.

$$I(q,t) = A_0 * \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + (1 - A_0) * \exp\left(-t * \frac{\tau_1 + \tau_2}{\tau_1 \tau_2}\right) \quad (1.83)$$

où A_0 est le pseudo facteur de structure élastique incohérent, τ_1 et τ_2 sont les deux temps de relaxation.

L'inverse du temps de relaxation τ_1 en fonction du carré de vecteur d'onde donne une évolution en Dq^2 où D est le coefficient de diffusion translationnelle de la protéine en solution.

(4) Définition de l'EISF

La fonction intermédiaire de diffusion incohérente peut s'écrire comme la somme d'un terme indépendant du temps et d'un terme temporel :

$$I_{inc}(\mathbf{q},t) = I_{inc}(\mathbf{q},\infty) + \Gamma_{inc}(\mathbf{q},t) \quad (1.84)$$

Le terme $I_{inc}(\mathbf{q},\infty)$ représente la transformée de Fourier dans l'espace de l'ensemble des positions possibles du système à l'équilibre, soit encore le facteur de forme au carré de l'espace accessible aux atomes du système. Il est appelé facteur de structure élastique incohérent, EISF (Elastic Incoherent Structure Factor). La fonction incohérente de diffusion, transformée de Fourier de $I_{inc}(\mathbf{q},t)$ s'écrit alors :

$$S_{inc}(\mathbf{q},\omega) = I_{inc}(\mathbf{q},\infty)\delta(\omega) + S_{qe,inc}(\mathbf{q},\omega) \quad (1.85)$$

$S_{inc}(\mathbf{q},?)$ se compose donc d'une partie purement élastique et d'un terme quasi-élastique qui contient toute l'information en énergie.

(5) Détermination expérimentale

La détermination expérimentale de l'EISF renseigne sur l'espace moyen de confinement des atomes d'hydrogènes de la protéine et ainsi sur la géométrie des mouvements de diffusion. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, l'intégrale sur l'énergie de la fonction incohérente de diffusion vaut 1. L'EISF est alors déterminé expérimentalement comme la fraction élastique des contributions élastique et quasi-élastique et donc comme le rapport de l'intensité élastique intégrée $I_{el}(q)$ et de la somme de la contribution élastique, $I_{el}(q)$, et quasi-élastique, $I_{qe}(q)$.

$$EISF = \frac{I_{el}(q)}{I_{el}(q) + I_{qe}(q)} \quad (1.86)$$

9. Les spectromètres

Dans cette partie nous présentons de manière succincte les caractéristiques des spectromètres que nous avons utilisés. Il ne s'agit pas ici de décrire le fonctionnement précis de chacun d'eux mais plutôt d'examiner les possibilités qu'offrent les appareils, les fonctions de diffusion auxquelles ils donnent accès et les imprécisions expérimentales qui résultent de leur utilisation. Nous allons nous attacher plus spécifiquement aux spectromètres qui permettent des mesures inélastiques, à savoir les spectromètres à temps de vol, à rétrodiffusion et à écho de spin de neutrons.

a) Grandeurs caractéristiques

Deux grandeurs principales déterminent le choix d'un spectromètre plutôt qu'un autre : la gamme en vecteur de diffusion accessible sur l'appareil et la gamme de transfert d'énergie. Il s'agit d'ailleurs souvent de faire un compromis entre ces deux grandeurs.

(1) Gamme en q

Elle est déterminée à la fois par la longueur d'onde du faisceau de neutrons incidents et par les angles des détecteurs par rapport à ce faisceau. Pour une distribution d'angles donnée, une courte longueur d'onde permettra d'accéder à des q plus grands. Il convient de remarquer que la plupart des spectromètres présente une distribution spectrale $\Delta\lambda/\lambda$ de l'ordre de 10%, ce qui entraîne une même incertitude sur la détermination de q , à laquelle s'ajoute l'incertitude due à la divergence du faisceau.

(2) Gamme en énergie-résolution

La résolution instrumentale définit la limite inférieure des transferts d'énergie accessibles sur l'appareil ou encore la limite supérieure des temps de corrélation des mouvements que l'on peut observer. Le choix de l'appareil est alors guidé par les mouvements que l'on veut observer et donc par leurs temps caractéristiques.

b) Traitement des spectres

Les spectres obtenus sur les spectromètres à temps de vol ou à rétrodiffusion sont tous traités de la même manière. Un ensemble de corrections est appliqué avant l'analyse. Le but final de ces traitements est d'obtenir la fonction de diffusion $S(q,\omega)$ propre à la protéine, une fois soustraites les contributions de la cellule vide et du tampon dans le cas d'une protéine en solution.

Fonction de diffusion $S(q,\omega)$

Traitement des échantillons en poudre hydratée

- soustraction : les spectres sont tout d'abord normés au moniteur, le nombre de neutrons incidents, afin de pouvoir les comparer. En effet le temps d'acquisition n'est pas le même pour tous les spectres, de plus le flux de neutrons sur l'échantillon peut varier. On soustrait aux spectres des échantillons, le spectre de la cellule vide qui les contient, en prenant en compte la transmission de la cellule vide et de l'échantillon. Il est aussi nécessaire de corriger les effets d'auto-écrantage dus à la variation d'épaisseur apparente de l'échantillon en fonction de l'angle de diffusion. Le programme **SOUSTR**, utilisé pour traiter les spectres obtenus sur Mibémol, effectue les soustractions et les corrections d'auto-écrantage.

- correction de l'efficacité des détecteurs : le vanadium est un diffuseur purement incohérent dans la fenêtre en q de Mibémol. La diffusion est donc théoriquement indépendante de q . On utilise alors le spectre du vanadium pour corriger de l'efficacité des détecteurs. De plus le vanadium est un diffuseur élastique ce qui permet d'utiliser son spectre comme résolution expérimentale.

- regroupement des spectres : afin d'améliorer la statistique, les 71 détecteurs du spectromètre Mibémol sont regroupés, en fonction de leur répartition angulaire, pour former 10 sous-spectres finaux. L'angle de diffusion que l'on associe à un sous-spectre est simplement la moyenne des angles des détecteurs qui ont été regroupés ensemble.

Traitement des échantillons de protéine en solution

Dans le cas des protéines en solution, il faut en plus de la cellule vide soustraire aux spectres de solution de protéines le spectre du tampon seul. Pour déterminer la proportion du spectre de diffusion du tampon à soustraire, on calcule le volume occupé par la protéine, à partir de la concentration et du volume spécifique de la protéine. Le volume des différents résidus enfouis a été calculé par Chothia²¹ à partir de 9 structures de protéine en utilisant la méthode développée par Richards²², méthode qui utilise des polyèdres de Voronoi pour entourer chaque atome et déterminer son volume. Cette méthode est notamment expliquée dans Gerstein et Chothia²³. Gerstein et Chothia²³ ont montré à partir de la structure à haute résolution de 22 protéines, et en utilisant la méthode des polyèdres de Voronoi que les résidus de surface présentent une augmentation de volume par rapport aux résidus enfouis. Une augmentation moyenne du volume de 4,5 % a été calculée pour les résidus dans une zone concave de la surface et de 10 % pour les résidus dans une zone convexe. De plus ils ont établi une répartition moyenne des résidus dans la protéine :

47% de résidus enfouis,
30 % de résidus de surface convexe
23 % de résidus de surface concave.

On prend en compte de plus le fait que la dynamique de l'eau à la surface de la protéine est différente de la dynamique de l'eau volumique. Le tampon est uniquement constitué d'eau volumique. Par conséquent la fraction d'eau surfacique ne doit pas être soustraite. A partir d'une hydratation d'environ 0,38 g/g, l'ajout d'eau ne représente qu'une dilution²⁴. Gerstein et Chothia²³ ont mesuré un volume pour l'eau surfacique de $V_{\text{eau surface}}=24 \text{ \AA}^3$, soit un volume inférieur d'environ 20 % à l'eau volumique. L'augmentation du volume massique de la protéine due à l'eau surfacique, v_{eau} , à prendre en compte est donc égale à :

$$v_{\text{eau}} = N \times V_{\text{eau surface}} / M_{\text{eau}}$$

le volume occupé par la protéine de masse $m_{\text{protéine}}$ est donc le produit $(v_{\text{prot}} + v_{\text{eau}}) \times m_{\text{protéine}}$, à soustraire au volume total de l'échantillon (protéine + tampon) pour obtenir uniquement le volume d'eau volumique.

Calcul de l'accessibilité du solvant

Nous disposons d'un outil pour connaître la répartition de l'eau à la surface de la protéine qui est l'accessibilité des chaînes latérales et du squelette à l'eau. Une procédure a été développée par Lee et Richards^{25,26,27}. La méthode est décrite en détail dans ces références. Succinctement, il s'agit à partir de la structure de la protéine (fichier pdb) d'obtenir l'accessibilité des différents atomes de la protéine. Pour cela un rayon de Van der Waals est attribué à chaque atome ou groupe d'atomes. L'eau est représentée par une sphère de rayon 1,4 Å. Un atome est accessible si l'eau peut entrer en contact avec sa sphère de Van der Waals. On définit aussi une accessibilité relative des résidus en comparant l'accessibilité du résidu X dans la protéine et dans le tripeptide Gly-X-Gly.

c) Spectromètre à temps de vol

Ce spectromètre permet de mesurer la fonction de diffusion $S(q,\omega)$. C'est le spectromètre qui a la moins bonne résolution parmi les spectromètres que nous avons utilisés. Il permet donc d'observer des phénomènes rapides, avec des temps caractéristiques de l'ordre de la picoseconde. Pour déterminer la fonction de diffusion, il faut pouvoir déterminer l'énergie incidente des neutrons E_i et l'énergie après diffusion E_f . La méthode utilisée est la méthode dite de « temps de vol ». Elle consiste à mesurer le temps mis par les neutrons pour parcourir une distance connue. Nous exposons le fonctionnement des spectromètres du type de Mibémol, spectromètre du réacteur Orphée du Laboratoire Léon Brillouin. Pour mesurer le temps de parcours du neutron, il faut définir un temps $t=0$; pour cela le faisceau monochromatique passe à travers un disque à fente tournant, appelé chopper. Seuls les neutrons qui passent à travers la fente arriveront sur l'échantillon. Ainsi la largeur de la fente et la vitesse de rotation du chopper définissent une bouffée de neutrons. On connaît le temps à partir duquel une bouffée sort du chopper ($t=0$) et on connaît la distance : chopper – échantillon - détecteurs. On dispose alors du temps $t = 0$, de la distance à parcourir et de l'énergie incidente ; on peut déterminer l'énergie du neutron diffusé qui arrive sur les détecteurs au temps t' .

La grandeur mesurée dans une expérience de temps de vol est le nombre de neutrons $\Delta n(t)$ diffusés pendant le temps T par l'échantillon, détectés dans le canal correspondant au temps de vol t et de largeur Δt , par un détecteur placé à un angle de diffusion θ et couvrant un angle solide $\Delta\Omega$:

$$\Delta n(t) = \Phi_0 T \Delta\Omega h A \frac{d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, t)}{d\Omega dt} \Delta t \quad (1.87)$$

- où :
- Φ_0 est le flux de neutrons incidents,
 - η l'efficacité du détecteur
 - A un facteur qui tient compte de l'absorption de l'échantillon
 - $\frac{d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, t)}{d\Omega dt}$ la section efficace de diffusion de neutrons en échelle de temps de vol

La mesure de $\Delta n(t)$ donne accès à la section efficace de diffusion en énergie $d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, \mathbf{w})/d\Omega dE$, définie au chapitre I, via la relation :

$$\frac{d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, \mathbf{w})}{d\Omega dE} = \frac{1}{\hbar} \frac{d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, t)}{d\Omega dt} \left(\frac{dt}{d\mathbf{w}} \right) \quad (1.88)$$

où $(dt/d\mathbf{w})$ peut être obtenue à partir de l'expression qui relie le temps de vol t d'un neutron, son énergie incidente $\hbar \mathbf{w}_0$, l'énergie $\hbar \mathbf{w}$ échangée avec l'échantillon, et la distance D séparant l'échantillon du détecteur :

$$t^2 = \frac{m_n D^2}{2\hbar(\mathbf{w}_0 - \mathbf{w})} \quad (1.89)$$

Grâce à une série de détecteurs disposés dans un domaine angulaire large, il est possible de reconstruire numériquement, à partir de $d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, t)/d\Omega dt$, la section efficace de diffusion $d^2 \mathbf{s}(\mathbf{q}, \mathbf{w})/d\Omega dE$, qui est la grandeur qui nous intéresse puisqu'elle est directement reliée au facteur de structure dynamique $S(\mathbf{q}, \omega)$ (voir chapitre I) par :

$$\frac{d^2 \mathbf{s}}{d\Omega dE}(\mathbf{q}, \mathbf{w}) = N \frac{\mathbf{s}}{4\mathbf{p}} \frac{k_f}{k_i} S(\mathbf{q}, \mathbf{w}) \quad (1.90)$$

où N est le nombre de diffuseurs de section efficace de diffusion \mathbf{s} .

La résolution de l'appareil est limitée par la monochromaticité du faisceau incident et la largeur finie de la fente qui laisse passer une bouffée de neutrons : cela implique une incertitude sur la définition du temps $t=0$ et donc sur l'énergie mesurée. Un schéma du spectromètre Mibémol indique les éléments fonctionnels du spectromètre (Figure I.4).

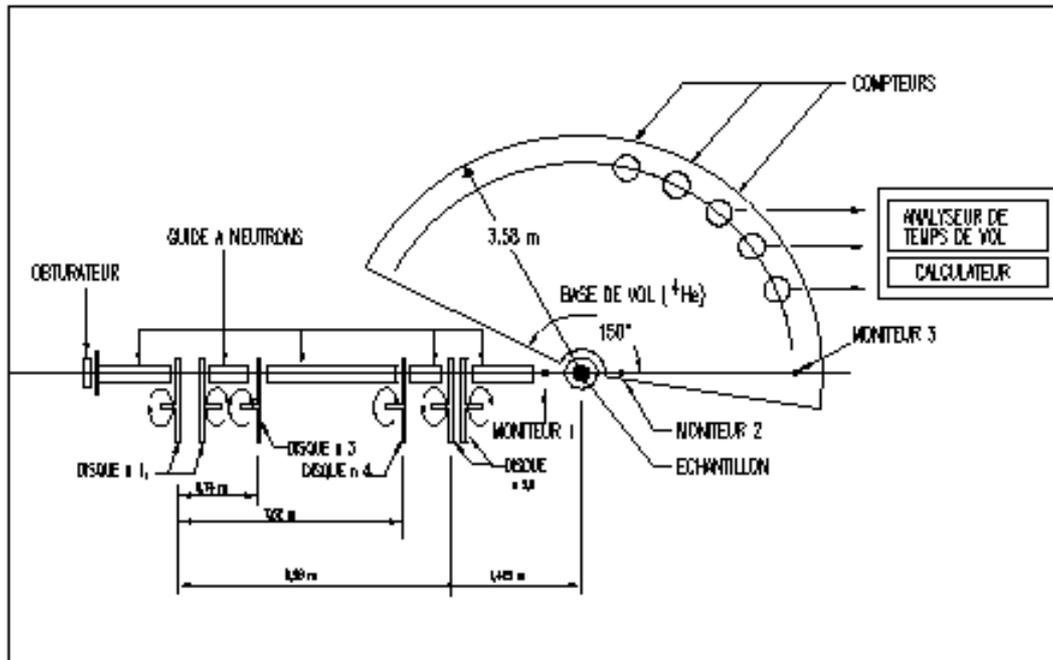


Figure I.4 : schéma du spectromètre à temps de vol MIBEMOL (LLB, Saclay).

d) Spectromètre à retrodiffusion

Les spectromètres à rétrodiffusion permettent de mesurer la fonction de diffusion $S(q, \omega)$. La résolution de ces appareils est meilleure que celles des spectromètres à temps de vol. Les temps accessibles sont de l'ordre de quelques dizaines de picosecondes. Le principe de cet appareil est que l'énergie diffusée, E_f , est fixe et connue, et on fait varier l'énergie incidente, E_i , de manière connue. Ceci à l'aide de monochromateurs cristallins. Le faisceau à la sortie du guide de neutrons est réfléchi par un cristal qui envoie un faisceau monochromatique de longueur d'onde définie par la relation de Bragg. Le faisceau est ensuite diffusé par l'échantillon sur des analyseurs cristallins qui rétrodiffusent alors les neutrons qui ont la bonne énergie E_f sur les détecteurs. On ne peut pas fonctionner en faisceau continu, car des neutrons peuvent arriver directement sur les détecteurs et sont alors comptés. On ajoute donc une méthode de temps de vol. Pour que la méthode de rétrodiffusion soit efficace les

détecteurs sont très proches de l'échantillon, tandis que les analyseurs doivent être plus éloignés. De cette manière, les temps de vol entre les neutrons rétrodiffusés et les neutrons directement diffusés sur les détecteurs sont très différents. C'est le principe du spectromètre IN 13 de l'ILL (figure I.5).

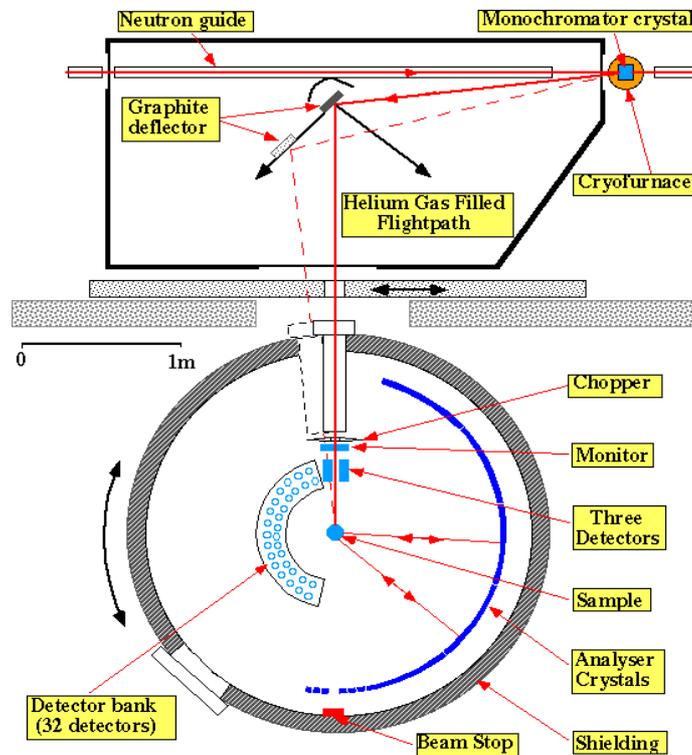


Figure I.5 :schéma du spectromètre IN13 de l'ILL

e) Modèle d'analyse

(1) Les mouvements dans les protéines

Les protéines présentent à la fois une diversité structurale et une diversité dynamique. Le grand nombre de résidus, la variété des chaînes latérales et la superposition des différents mouvements de ces groupes induisent un spectre dynamique particulièrement complexe (Tableau I.1). Des mouvements localisés, très rapides, aux mouvements de domaines plus lents, les temps caractéristiques de la dynamique interne des protéines couvrent 15 décades, de 10^{-14} à ~ 10 s. De plus chaque type de mouvements, suivant les interactions spécifiques dues à la structure, présente des variations tant dans l'extension spatiale que dans l'extension temporelle. Un atome proche du squelette de la protéine a des mouvements d'amplitude moindre qu'un atome à l'extrémité d'une longue chaîne latérale, par la simple augmentation

des degrés de liberté que permettent les liaisons covalentes C - C. De plus la rotation d'un méthyle de surface est plus fréquente que celle du même méthyle dans une partie enfouie de la protéine, du fait des interactions stériques différentes dans les deux cas.

Mouvements internes	Extension spatiale (en Å)	Amplitude (en Å)	Temps caractéristiques (en s)
Vibrations des atomes	2 – 5	0,01 – 0,1	10^{-14} à 10^{-13}
Vibrations élastiques d'un domaine globulaire	10 – 20	0,05 – 0,5	10^{-12} à 10^{-11}
Rotation des chaînes latérales de surface	5 – 10	5 – 10	10^{-11} à 10^{-10}
Libration de groupes enfouis	5 – 10	0,5	10^{-11} à 10^{-9}
Déplacement relatif de différents domaines	10 – 20	1 – 5	10^{-11} à 10^{-7}
Rotation de chaînes de taille moyenne enfouies	5	5	10^{-4} à 1
Transition allostérique	5 – 40	1 - 5	10^{-5} à 10

Tableau I.1 : quelques mouvements internes caractéristiques des protéines (d'après McCammon & Harvey²⁸)

Pour couvrir toute l'étendue spectrale de la dynamique interne des protéines, il faut recourir à un ensemble de techniques expérimentales. Certaines donnent des informations localisées et spécifiques, d'autres comme la diffusion de neutrons fournissent une information moyenne. Chacune des techniques couvre une gamme en temps différente et donc complémentaire ; le recoupement de ces différentes techniques permet d'accéder à l'ensemble de la dynamique d'une protéine. La spectroscopie infrarouge permet d'obtenir une information spécifique sur les modes vibrationnelles (10^{-14} s), donc la dynamique très rapide, des différents types de liaisons d'une protéine. La RMN donne-t-elle aussi une information localisée mais pour une gamme en temps différente : 10^{-11} à 10^{-8} s. La diffusion de neutrons, en fonction des spectromètres utilisés, couvre une gamme en temps comprise entre 10^{-14} s et 10^{-8} s. Cette technique permet en outre par l'étude de la dépendance en Q des mouvements de distinguer entre un mouvement de rotation, de translation, etc.²⁹.... L'information donnée est une information moyenne sur tous les atomes présents dans la structure. La partie quasi-

élastique des spectres, que nous avons plus spécifiquement étudiée, concerne la dynamique pour des temps compris entre 10^{-13} s à 10^{-10} s. Ce sont alors des mouvements de diffusion des atomes qui sont observés : rotations des méthyles, librations des chaînes latérales.

La plupart des expériences que nous avons menées pour l'étude de la dynamique à temps courts (ps) des protéines l'ont été par diffusion de neutrons sur des spectromètres à temps de vol ou à rétrodiffusion. La complexité dynamique des protéines ainsi que les techniques utilisées, obligent à choisir pour l'analyse des spectres des modèles moyens qui prennent en compte la diversité des mouvements, tant du point de vue dynamique que géométrique. Dans cette première partie nous présentons le modèle que nous avons adopté. Nous donnerons également les indications sur le traitement des données.

Nous avons utilisé pour l'analyse de la dynamique des protéines une méthode d'abord utilisée pour analyser la dynamique de l'eau à la surface de la C-phycocyanine³⁰ ainsi que pour l'analyse de la dynamique des protéines : pour la parvalbumine^{31,32}, la nucléase de staphylocoque³³, la bactériorhodopsine³⁴, la phosphoglycérate kinase³⁵, le centre réactionnel de *Rhodobacter sphaeroides*³⁶, ainsi que la néocarzinostatine³⁷.

(2) Diffusion dans une sphère

Volino et Dianoux³⁸ ont étudié, de manière générale, le cas de la diffusion d'une particule confinée dans une sphère de rayon a . Le facteur de structure élastique incohérent s'écrit de la façon suivante :

$$A_0(q) = \left[\frac{3j_1(qa)}{qa} \right]^2 \quad (1.91)$$

où j_1 est la fonction de Bessel sphérique du premier ordre et s'écrit : $j_1(x) = \frac{\sin x - x \cos x}{x^2}$

La Figure I.6 montre l'évolution de l'EISF en fonction du produit qa sans dimension. De plus la diffusion quasi-élastique est décrite dans ce cas de manière exacte par une somme infinie de lorentziennes dont les largeurs et les amplitudes dépendent des valeurs propres de l'équation de diffusion.

L'évolution de la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(q)$ de la composante quasi-élastique en fonction de q^2a^2 est donnée par la figure I.7. En pratique, du fait de la résolution

expérimentale finie et de la statistique expérimentale, on n'accède qu'à une lorentzienne moyenne $L(q, \omega)$ de demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(q)$.

$$L(Q, \omega) = \frac{1}{p} \frac{\Gamma(q)}{\Gamma(q)^2 + \omega^2} \quad (1.92)$$

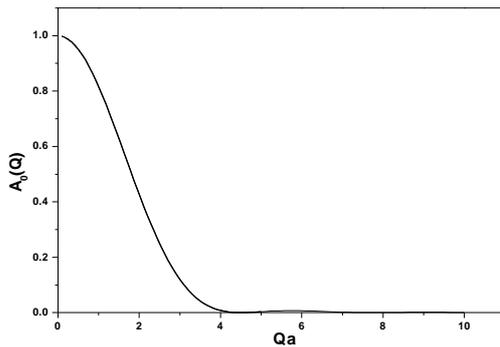


Figure I.6 : EISF pour une particule qui diffuse dans une sphère de rayon a.

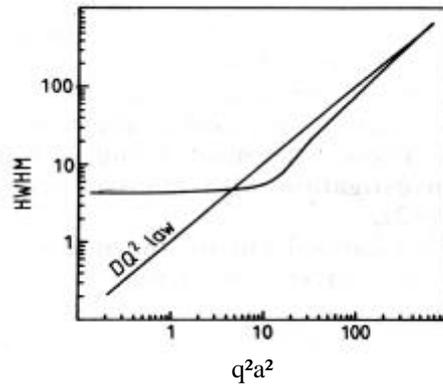


Figure I.7 : demi-largeur à mi-hauteur de la composante quasi-élastique pour une particule qui diffuse librement dans une sphère de rayon a avec un coefficient de diffusion D (d'après Volino et Dianoux³⁸)

le modèle prévoit que la largeur $\Gamma(q)$ reste constante, et égale à $4,33 \times D/a^2$, jusqu'à une valeur de q, telle que $q^*a = \pi$, puis suit une loi de diffusion en Dq^2 , où D est le coefficient de diffusion de la particule dans la sphère. La fonction de diffusion incohérente s'écrit alors :

$$S(q, \omega) = [A_0(q) \delta(\omega) + (1 - A_0(q)) L(q, \omega)] \times \exp(- \langle u^2 \rangle q^2 / 3) \quad (1.93)$$

Dans le cas d'une mesure sur un spectromètre, cette fonction de diffusion est convoluée par la résolution expérimentale de l'appareil.

(3) Résolution expérimentale

La fonction de diffusion écrite ci-dessus est convoluée par la résolution de l'appareil, $R(\omega)$. La résolution expérimentale et la statistique des mesures ne permettent pas de résoudre tous les mouvements diffusifs du système que l'on étudie. Il faut donc prendre en compte ces deux éléments pour le modèle d'ajustement des données.

1- Du fait de la résolution expérimentale finie, certains mouvements trop lents et qui par conséquent donnent lieu à un élargissement quasi-élastique plus étroit que la résolution de l'appareil ne seront pas détectables ; ceci implique que dans la fonction de diffusion il faut prendre en compte une partie constante, p , des atomes qui apparaîtront comme immobiles et contribueront au pic élastique.³⁰

2- Les mouvements très rapides donnent un élargissement quasi-élastique très large ; c'est alors la statistique expérimentale et le bruit de fond de l'appareil qui limitent la résolution de ces mouvements. Ces mouvements sont pris en compte par un bruit de fond plat, $B(q)$.

Ainsi la fonction de diffusion incohérente s'écrit :

$$S(q, \omega) = [\{p + (1-p)A_0(q)\} R(\omega) + (1 - p)(1 - A_0(q)) L(q, \omega) \otimes R(\omega)] \times DW + B(\omega) \quad (1.94)$$

Le terme de Debye-Waller, DW est égal à :

$$DW = \exp(- \langle u^2 \rangle Q^2 / 3) \quad (1.95)$$

L'EISF que l'on calcule comme le rapport de l'intensité élastique sur la somme des intensités élastique et quasi-élastique est égal à :

$$EISF = p + (1-p)A_0(q) \quad (1.96)$$

Ainsi les paramètres que l'on obtient à partir de l'analyse des données sont :

- $\langle u^2 \rangle$: le déplacement carré-moyen des atomes dans la partie inélastique du spectre de diffusion
- p : la proportion d'atomes qui paraissent immobiles à la résolution de l'expérience

- a : le rayon moyen de la sphère dans laquelle les atomes diffusent, déduit de l'ajustement de l'EISF
- Γ : la demi-largeur à mi-hauteur de la lorentzienne, dont l'évolution en fonction de q permet de calculer un rayon a et un coefficient de diffusion D . Elle renseigne surtout sur les temps caractéristiques des mouvements observés.

(4) Discussion du modèle

La diffusion de neutrons donne une information moyenne sur tout le système diffuseur, donc pour les protéines sur la dynamique de toute la protéine. De plus les atomes d'hydrogènes sont présents dans toute la structure de la protéine. Ainsi le spectre de diffusion rendra compte de tous les mouvements présents dans toute la protéine et accessibles à la résolution expérimentale. Or ces mouvements d'une part couvrent une gamme temporelle continue de la femtoseconde à la seconde (Tableau I.1). D'autre part la diversité des acides aminés implique une diversité de géométrie de mouvements, souvent couplés à d'autres mouvements. Une expérience de diffusion de neutrons à une résolution donnée permet d'accéder à la vision moyenne d'une partie de ces mouvements. Etant donné la complexité du système, il est impossible de paramétrer chaque mouvement. Aussi le modèle de diffusion dans une sphère modélise cette complexité par une valeur moyenne du rayon de la sphère. Il présente l'inconvénient de simplifier à l'excès le système mais permet d'obtenir de manière phénoménologique l'influence de paramètres comme l'hydratation, la température ou la pression.

-
- ¹ Squires G.L. Introduction to the theory of Thermal Neutron Scattering , *Cambridge University Press*. 1978
Lowesey S.M. Theory of neutron scattering from condensed matter. Oxford University Press Eds. 1984
- ² Bée M. Quasielastic neutron Scattering : Principles and applications in Solid State Chemistry, Biology, and Materials *Science*, *Adam Hilger, Bristol*. 1998
Nielsen A. Neutron and Synchrotron radiation for condensed matter studies. Les éditions de la Physique eds Baruchel 1993, p 3-33.
- ³ Feigin L. A. and Svergun D. I., Structure Analysis by Small angle X-ray and Neutron Scattering, *Plenum Press, New York and London*, 1989
- ⁴ Cusack S. Large Amplitude motion in biological systems. Hercules Book. Volume III application to soft condensed matter and biology. chapitre XVI. Les éditions de physique. 1989, pp 279-296
- ⁵ Jacrot B. The study of biological structures by neutron scattering from solution. *Rep. Prog. Phys* **39**, 1976, pp 911-935
- ⁶ Zaccai G. & Jacrot B. Small angle neutron scattering. *Ann. Rev. Biophys.. Bioeng.* **12**, 1983, pp 139-157.
- ⁷ thèse de Daniela Russo 2000: Etude structurale et dynamique de l'état natif et des états dénaturés de la néocarzinostatine, par microcalorimétrie différentielle, spectroscopies optiques et diffusion de neutrons et de rayons X
thèse de Véronique Receveur : Etude structurale et dynamique des états dénaturés de la phosphoglycérate kinase de levure par diffusion de neutrons et de rayons X
- ⁸ De gennes P.G. Scaling Concepts in Polymer Physics, *Cornell University Press London*. 1979
- ⁹ Debye, *J. Appl. Phys.*, **15**, 1944, pp 338-342
- ¹⁰ Rawiso M., Duplessix R. et Picot C., *Macromolecules*, **20**, 1987, pp 630-648
- ¹¹ Des Cloizeaux, *Macromolecules*, **6**, 1973, pp 403-407
- ¹² Sharp P., Bloomfield ,V. A, *Biopolymers*, **6**, 1968, p1201
- ¹³ Benoit-Doty . *J.Phys. Chem.* **57**, 1953, p 958:
- ¹⁴ Pedersen. J. S. et Schurtenberger P., *Macromolecules* **29**, 1996, pp 7602-7612.
- ¹⁵ Porod. G. *Koll. Z.* **124**, 1951, p 83
- ¹⁶ Vachette P., Small angle scattering by solution of biological macromolecules, *IOS press Amsterdam*, 1996

-
- ¹⁷ Zimm B. H., *J. Chem. Phys.*, **16**, 1948, pp 1093-1099
- ¹⁸ Benoît H. et Benmouna M., *Macromolecules* **17**, 1984, pp 535-540]
- ¹⁹ Perez J., J.M.Zanotti, D.Durand. Evolution of the internal dynamics of two globular Proteins from Dry Powder to solution. *Biophysical Journal* **77**, 1999, pp 454-469.
- ²⁰ Williams G. et Watts D.C., *Trans. Faraday Soc.*, **66**, 1970, pp 80-85.
- ²¹ C. Chothia, *Structural invariants in protein folding*, *Nature* **254**, 1975, pp 304-308.
- ²² F. M. Richard, *the interpretation of protein structures : total volume, group volume distributions and packing density*, *J. Mol. Biol.* **82**, 1974, pp 1-14.
- ²³ M. Gerstein & C. Chothia, *Packing at the protein-water interface*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1996, pp 10167-10172.
- ²⁴ J. A. Rupley & G. Careri, *Protein hydration and function*, *Adv. Prot. Chem.* **41**, 1991, pp 37-172.
- ²⁵ B. Lee & F. M. Richards, *The interpretation of protein structures : estimation of the static accessibility*, *J Mol Biol* **55**, 1971, pp 379-400.
- ²⁶ F. M Richards, *Areas Volumes, Packing and protein structure*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 1977, pp 151-176.
- ²⁷ F. M. Richards, *Calculation of Molecular volumes and areas for structures of known geometry*, *Methods in Enzymology* **115**, 1985, pp 440-464.
- ²⁸ J. A. McCammon & S. C. Harvey, *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press, 1987.
- ²⁹ M. Bée, *Quasi-elastic neutron scattering, principles and applications in solid state chemistry, biology and materials science*, Adam Hilger, Bristol, Philadelphia, 1988.
- ³⁰ M.-C Bellissent-Funel, J. Teixeira, K. F. Bradley & S. H. Chen, *dynamics of hydration water in protein*, *J. Phys I France* **2**, 1992, pp 995-1001.
- ³¹ J.-M. Zanotti, *Structure et dynamique de l'eau interfaciale. Rôle de l'eau d'hydratation dans la dynamique des protéines globulaires*, thèse de l'université Paris XI, 1997.
- ³² J.-M. Zanotti, M.-C Bellissent-Funel, J. Parello, hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and NMR : the case of the typical EF-Hand calcium-binding parvalbumin, *Biophys. J.* **76**, 1999, pp 2390-2411.
- ³³ J. C. Smith, A. Lamy, M. Kataoka, J. Yunoki, A.-J. Petrescu, V. Receveur, P. Calmettes & D. Durand, *Motions in native and denaturated proteins*, *Physica B* **241-243** 1998.

³⁴ V. Receveur, P. Calmettes, J. C. Smith, M. Desmadril, G. Coddens & D. Durand, *Picosecond dynamical changes on denaturation of yeast phosphoglycerate kinase revealed by quasielastic neutron scattering*, *Proteins : Struct., Funct. Genet.* **28**(3), 1997, pp 380-387.

³⁵ J. Fitter, S. A. W. Verclas, R. E. Lechner, H. Seelert & N. A. Dencher, *Function and picosecond dynamics of bacteriorhodopsin in purple membrane at different lipidation and hydration*, *FEBS Lett.* **433**, 1998, pp 321-325.

³⁶ A. Gall et al. *Monitoring the internal dynamics of the bacterial photochemical reaction centre.*

³⁷ D. Russo et al. *Proceeding ECNS'99*

³⁸ F. Volino, & A. Dianoux, *Neutron Incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry : general formalism and application to diffusion inside a sphere*, *J. Molecular Physics*, **41**, 1980, pp 271-279.

CHAPITRE II

CARACTERISTIQUES DES PROTEINES

II. Caractéristiques des protéines	69
A. Introduction	69
B. Les états intermédiaires	69
C. Le repliement des protéines.....	74
D. L'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI.....	77
1. Description.....	77
2. Les études de dénaturation du BPTI.....	81
a) dénaturation chimique	84
b) dénaturation thermique	85
c) dénaturation par la pression.....	89

II. Caractéristiques des protéines

A. Introduction

Les protéines sont synthétisées par l'ajout d'acides aminés sur le ribosome à partir de séquences spécifiques de l'ADN : les gènes. Une copie de ces gènes est transcrite par les ARN messagers. A ce niveau les ARN messagers sont traduits via le ribosome et des ARN de transfert qui vont apporter chacun des acides aminés correspondant à chacun des triplets de nucléotides des gènes codant pour les protéines : la séquence primaire de la protéine prend alors naissance. Dès leur formation à partir du ribosome, les protéines n'adoptent pas immédiatement leurs structures fonctionnelles finales et l'étude des intermédiaires de repliements de ces molécules biologiques permettrait d'acquérir un avantage considérable notamment dans le domaine médical. Par exemple, l'étude de maladie d'origine génétique produisant des protéines essentielles à l'organisme mais dont la structure tridimensionnelle ne correspond pas à des protéines fonctionnelles.

B. Les états intermédiaires

L'étude des intermédiaires de repliements des protéines nous oblige à avoir une connaissance bien précise de ce qui caractérise justement leur conformation tridimensionnelle :

- la structure primaire d'une protéine consiste en l'enchaînement successif des acides aminés qui la composent, la structure secondaire fait intervenir des forces d'interaction de courte portée obligeant certains segments à avoir une forme d'hélice α , de feuillet β , ou de coude. Ces interactions de courtes portées sont dues à des liaisons hydrogène entre les groupes carboxyliques et les amines des résidus. Chacune de ces structures secondaires présente des résidus d'acides aminés particuliers ; en effet certains résidus sont plus présents dans certains types de structures comme les hélices α tandis que d'autres sont d'avantage dans les feuillets β , le tableau IIa présente la fréquence d'apparition de différents acides aminés dans chaque type de structures secondaires dans les protéines.

A. Relative probabilities of amino acid residue occurrence in different globular protein secondary structures^a

Amino Acid	α Helix (P_α)	β Sheet (P_β)	Turn (P_t)	
Ala	1.29	0.90	0.78	Favor α helices
Cys	1.11	0.74	0.80	
Leu	1.30	1.02	0.59	
Met	1.47	0.97	0.39	
Glu	1.44	0.75	1.00	
Gln	1.27	0.80	0.97	
His	1.22	1.08	0.69	
Lys	1.23	0.77	0.96	
Val	0.91	1.49	0.47	Favor β sheets
Ile	0.97	1.45	0.51	
Phe	1.07	1.32	0.58	
Tyr	0.72	1.25	1.05	
Trp	0.99	1.14	0.75	
Thr	0.82	1.21	1.03	
Gly	0.56	0.92	1.64	Favor turns
Ser	0.82	0.95	1.33	
Asp	1.04	0.72	1.41	
Asn	0.90	0.76	1.23	
Pro	0.52	0.64	1.91	
Arg	0.96	0.99	0.88	

B. Chou–Fasman rules for prediction^b

1. Any segment of six residues or more, with $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$, as well as $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$, and not including Pro, is predicted to be α helix.
2. Any segment of five residues or more, with $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$, and $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$, is predicted to be β sheet.
3. Examine the sequence for tetrapeptides with $\langle P_\alpha \rangle < 0.9$, $\langle P_t \rangle > \langle P_\beta \rangle$. They have a good chance of being turns. The actual rules for predicting β turns are more complex, but this method will work in most cases.

^aData adapted from M. Levitt, *Biochemistry* (1978) 17:4277–4285.

^bAdapted with permission from P. Y. Chou and G. D. Fasman, *Biochemistry* (1974) 13:222–245. © 1974 American Chemical Society. The symbols $\langle P_\alpha \rangle$, $\langle P_\beta \rangle$, and $\langle P_t \rangle$ denote *average* values of these quantities in a region of the sequence.

Tableau IIa : fréquence d'apparition des différents acides aminés dans trois types de structures secondaires.

- La structure tertiaire est l'agencement des structures secondaires qui occupent des positions précises et systématiques dans la protéine considérée. Ces positions sont assujetties à la nature des résidus qui composent la protéine ; en effet, selon que le résidu est hydrophobe ou non, sa localisation sera au niveau du cœur de la protéine où il sera moins exposé au solvant ou à la surface de la protéine. Le tableau IIb présente les acides aminés et leurs hydrophobicités.

Amino Acid	Scale of Engelman, Steitz, and Goldman ^a	Scale of Kyte and Doolittle ^b
Phe	3.7	2.8
Met	3.4	1.9
Ile	3.1	4.5
Leu	2.8	3.8
Val	2.6	4.2
Cys	2.0	2.5
Trp	1.9	-0.9
Ala	1.6	1.8
Thr	1.2	-0.7
Gly	1.0	-0.4
Ser	0.6	-0.8
Pro	-0.2	-1.6
Tyr	-0.7	-1.3
His	-3.0	-3.2
Gln	-4.1	-3.5
Asn	-4.8	-3.5
Glu	-8.2	-3.5
Lys	-8.8	-3.9
Asp	-9.2	-3.5
Arg	-12.3	-4.5

^aData from Engelman, D. M., T. A. Steitz, and A. Goldman, *Annu. Rev. Biophys. & Biophys. Chem.* (1986) 15:321–353.

^bData from Kyte, J., and R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105–132.

Tableau Iib : hydrophobicité des acides aminés

- Enfin, la structure quaternaire est donnée par l'assemblage des structures tertiaires entre elles.

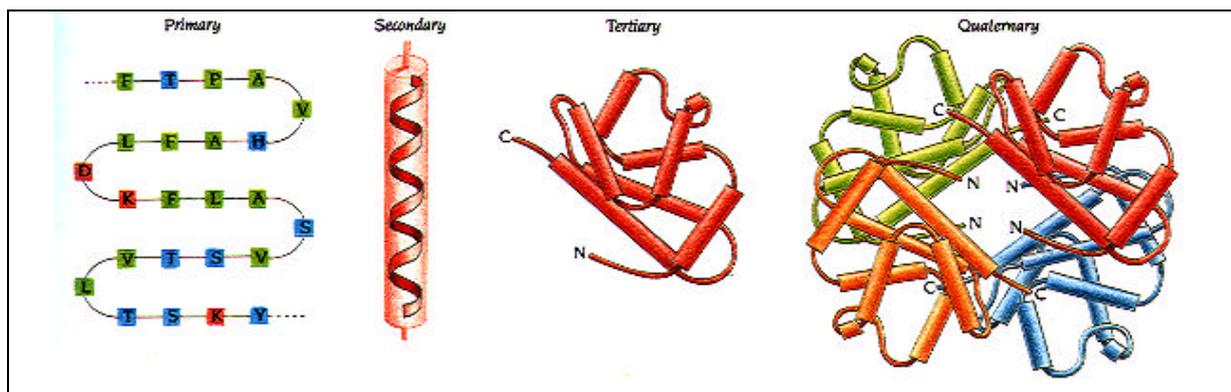


Figure II.1 : Hiérarchie des structures des protéines¹.

Dans les protéines, les structures secondaires les plus rencontrées sont les hélices, les feuillettes, les coudes et les structures aléatoires ou désordonnées. Mis à part ces dernières, ces structures doivent leur géométrie aux liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupes carboxyles de certains résidus et les groupes amines appartenant à d'autres.

Certaines différences apparaissent néanmoins entre structures de même type; ainsi pour les structures en hélices, il peut exister les hélices α , les hélices 3_{10} et les hélices π (figure II.2).

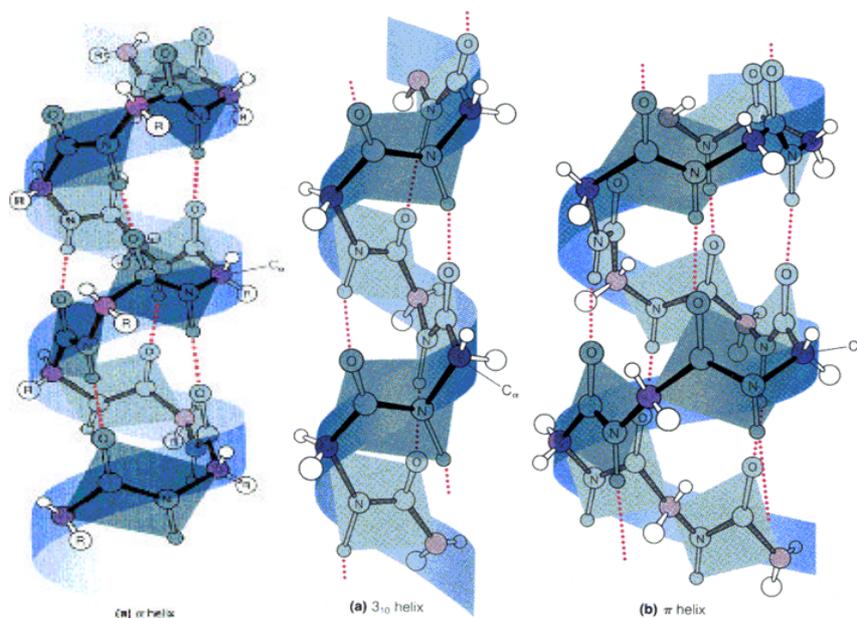
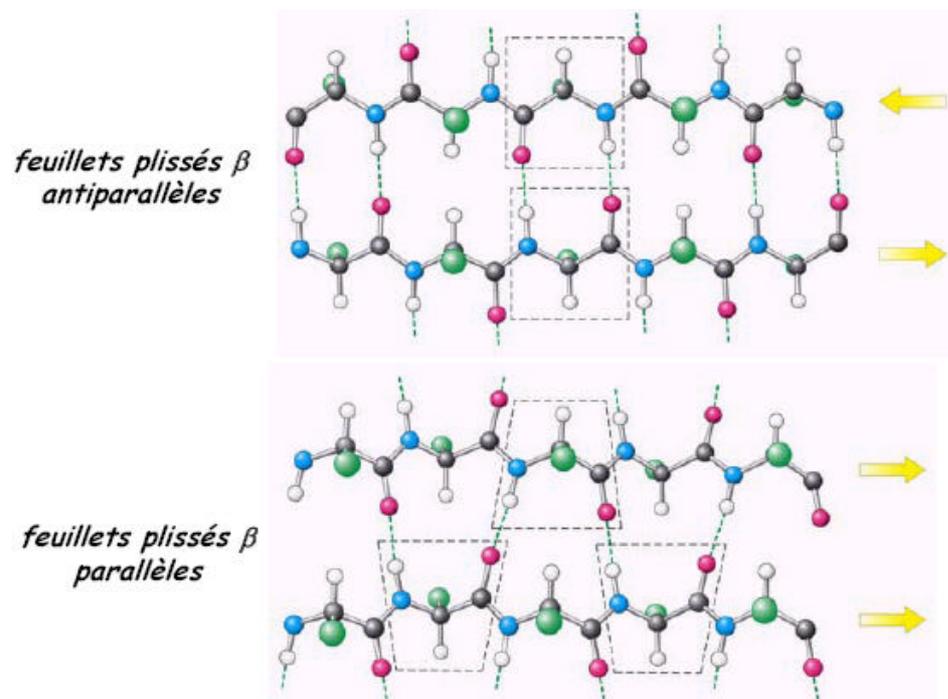


Figure II.2 : de gauche à droite une hélice α , une hélice 3_{10} , et une hélice π .

Les hélices α sont les structures hélicoïdales les plus rencontrées par rapport aux autres hélices, elles contiennent trois liaisons hydrogène par tour d'hélice. Plus en détails, les hélices α contiennent 3,6 amino-acides par tour d'hélice et un tour d'hélice a une longueur de 1,5 Å. le pas des hélices α est de 5,4 Å et chacune des liaisons hydrogène est formé entre un acide aminé i et un acide aminé $(i + 4)$. Les hélices 3_{10} comportent moins de liaisons hydrogène par tour d'hélice, deux en l'occurrence; avec un diamètre plus petit que celui des hélices α , leur pas d'hélice est plus grand ce qui rend cette structure plus fragile. Les hélices π sont plus rares encore et comportent un nombre plus important de liaisons hydrogène (trois à quatre) par tour d'hélice, d'autre part cette structure a un diamètre plus important que celui occupé par les autres types d'hélices.

De la même manière, des différences existent au sein des feuillets β : ils peuvent se présenter sous forme de feuillets β parallèles ou antiparallèles (figure II.3). A la différences des structures en hélices, les feuillets β sont formés par des liaisons hydrogène entre les brins. On n'a pas montré de différences en terme de stabilité entre les deux types de feuillets.



Les liaisons hydrogène interviennent enfin dans un autre type de structures secondaires appelées tours β qui permettent les changements de direction dans l'enchaînement des résidus d'acides aminés (figure II.4).

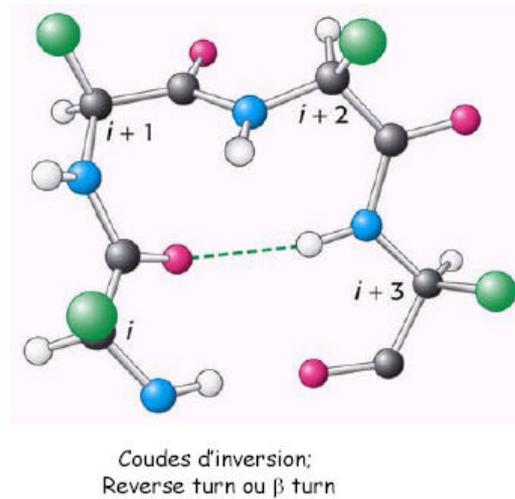


Figure II.4 : représentation d'un tour β

C. Le repliement des protéines

Le repliement et le dépliement des protéines passent par la modification de ces structures. A l'heure actuelle, l'étude de ces phénomènes est portée sur les structures secondaires et tertiaires.

Des modèles de repliement ont été élaborés depuis une trentaine d'années. Chacune des théories énoncées a contredit la précédente pour arriver, au cours des années 90, à deux visions principales :

- le modèle du chemin préférentiel passant par des intermédiaires. (appelé « old view »)
- le modèle de l'entonnoir : analogie de l'énergie de surface de la protéine. (appelé « new view »)

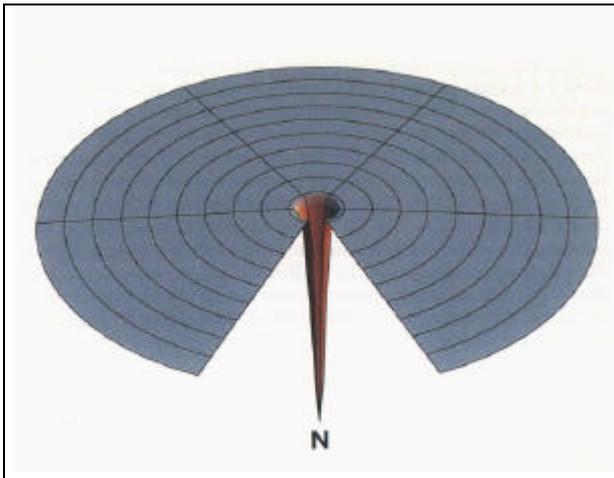


Figure II.5.a 'Paysage du terrain de golf de Levinthal. *N est la conformation native.*

Figure II.5.b *Le chemin préférentiel est une solution à la recherche au hasard. A représente la configuration dénaturée.*

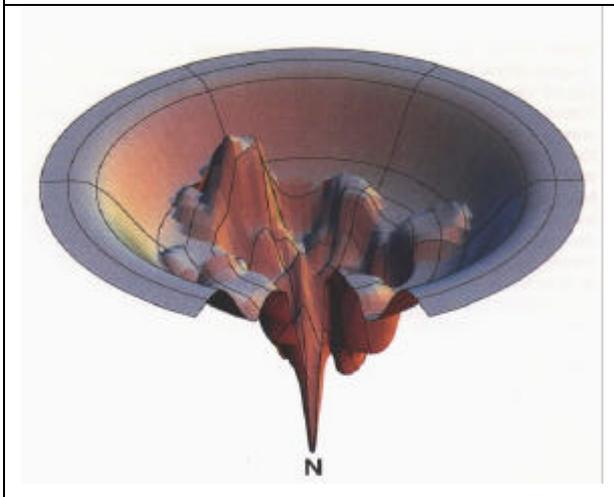
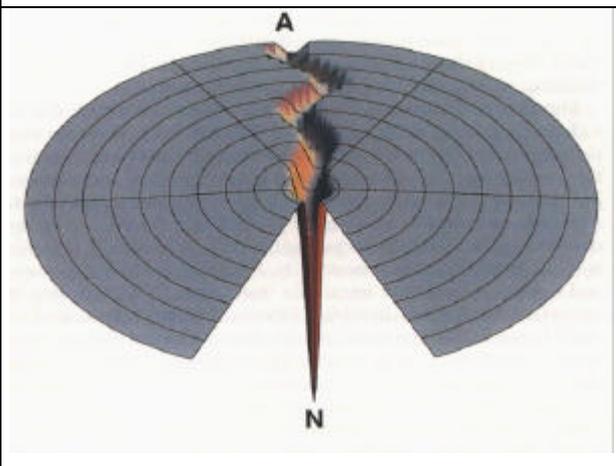


Figure II.5.c *Energie de surface avec des pièges cinétiques et barrières d'énergie. Dans cette représentation le repliement peut être multi-états.*

Plus en détails, la réaction de repliement implique, au minimum, deux états : l'état natif et l'état complètement dénaturé. L'état natif est caractérisé par son énergie libre : en effet, il s'agit, la plupart du temps, d'un état thermodynamiquement stable où l'énergie libre est minimum, ou encore par l'activité de la protéine et donc par la conservation de la structure tridimensionnelle grâce à laquelle elle est fonctionnelle. L'état complètement dénaturé est, par

conséquent, caractérisé par la perte de l'activité de la protéine et donc par la perte de sa structure tridimensionnelle.

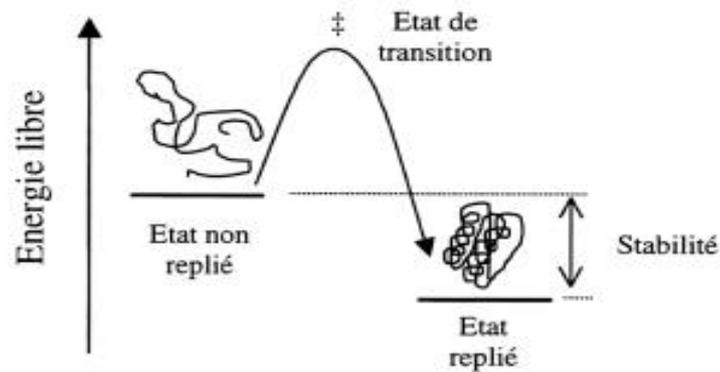
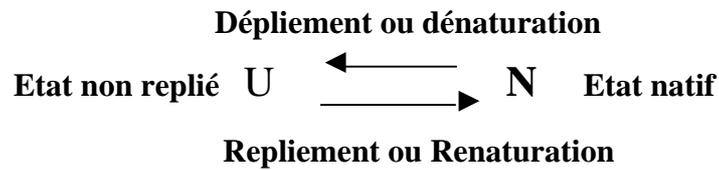


Figure II.6 : Schéma simplifié de la réaction de dénaturation-renaturation. Cette réaction passe par un état de transition caractérisé par une barrière d'énergie.

En 1968, Charles Tanford² fut parmi les premiers à étudier les états dénaturés. L'état complètement dénaturé a été identifié en tant que structure apériodique (ou 'random coil' en anglais), mais en fonction du type de dénaturant utilisé plusieurs états intermédiaires peuvent apparaître.

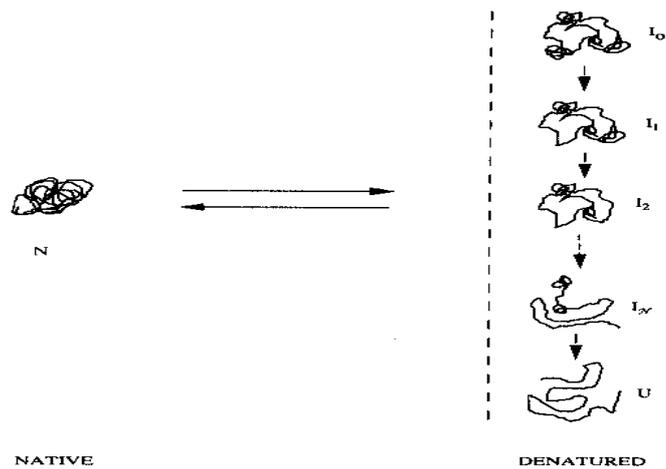


Figure II.7 : Schéma de la transition de dénaturation. A gauche est représenté la protéine native ; à droite sont représentées les conformations possibles de la protéine dénaturée. I_0 représente un état compact possible. U correspond à l'état complètement déplié.

Pour pouvoir observer les états intermédiaires de repliement de cette protéine, il est nécessaire de la dénaturer, c'est à dire appliquer des forces contrant celles qui maintiennent la conformation native de la protéine étudiée. Les moyens utilisés à cette fin sont :

- la dénaturation chimique grâce à l'urée, au chlorure de guanidinium³, ou au thiocyanate de guanidinium⁴.
- La dénaturation par la température⁵, les protéines peuvent être dépliées par la chaleur mais aussi par le froid, c'est ce qu'on appelle la « cold denaturation ».
- La dénaturation par la pression qui fait l'objet de ce travail et dont l'utilisation est mentionnée pour d'autres travaux dans l'introduction.

D. L'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI

1. Description

L'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI est une protéine appartenant à la catalyse enzymatique. Il est sécrété dans les cellules acineuses du foie.

Il s'agit d'une petite protéine composée de 58 résidus d'acides aminés et a une masse molaire de 6517 Da. Son point isoélectrique théorique est de 9,2 et son coefficient d'extinction molaire à 280 nm est $\epsilon_{280} = 0,786 \text{ L.g}^{-1}\text{cm}^{-1}$, son volume spécifique est de $0,730 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Elle fut isolée en 1936 par Kunitz et Northrup⁶, ce qui lui valut le nom de réactif de Kunitz ou antiprotéase de type Kunitz. Sa structure tridimensionnelle à l'état natif est connue à haute résolution (1.5Å)⁷.

Cette protéine a pour fonction d'inhiber la fonction de certaines protéases dites à sérine comme la trypsine qui hydrolysent d'autres protéines en peptides et en acides aminés. La trypsine, par exemple, hydrolyse les protéines du côté carboxylique (liaison CO) d'une lysine ou d'une arginine.

Le BPTI se lie très étroitement à la trypsine au niveau de son site actif en insérant sa lysine 15 au niveau du site catalytique avec une constante de dissociation de $6 \cdot 10^{-14}$ M, ce qui correspond à une demi-vie du complexe de 17 semaines à pH 8 et à 25°C⁸; ce qui fait de cet inhibiteur un excellent analogue de substrat. Des analyses par diffraction de rayons X ont montré que la chaîne latérale de la lysine 15 du BPTI se lie à la chaîne latérale de l'aspartate dans la poche oxyanionique de l'enzyme. La demi-vie de ce complexe trypsine – inhibiteur est de plusieurs mois. La trypsine agit aussi sur le BPTI mais la liaison peptidique entre la lysine 15 et l'alanine 16 de l'inhibiteur est clivée à une vitesse très lente. Le BPTI a une très forte affinité pour la trypsine parce que sa structure est presque parfaitement complémentaire de celle du site actif de la trypsine. La flexibilité limitée de l'inhibiteur dans le site de liaison contribue au blocage de la catalyse et exprime la très lente dissociation du complexe (figure II.8).

L'intérêt d'étudier le BPTI réside dans le fait qu'il s'agit d'une protéine modèle énormément étudiée par différentes techniques mais qui reste encore peu connue dans le domaine de la diffusion de neutrons. Cette protéine est utilisée dans de nombreux domaines comme la médecine où elle est employée à titre d'anticoagulant lors d'opérations chirurgicales ou encore pour le traitement de certaines maladies cardio-vasculaires (Trasylo).

Comme nous l'avons précédemment mentionné, l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine a été isolé pour la première fois par Kunitz et Northrop en 1936 : le pancréas est retiré immédiatement après l'abattage de l'animal et trempé une fois dans une solution glacée d'acide sulfurique 0.25 N afin de couvrir les glandes. La graisse et les tissus conjonctifs sont retirés et émincés dans un hachoir à viande pendant quelques heures. Trois litres de pancréas émincé sont suspendus dans six litres d'acide sulfurique 0.25 N à 5°C pendant 18 à 24 heures. La suspension subit alors une succession de filtration, resuspension dans une solution d'acide sulfurique 0.25 N glacé et précipitation par ajout de sulfate d'ammonium solide avant de produire un précipité d'environ 90 g contenant un mélange de

chymotrypsinogène, trypsinogène et d'inhibiteurs. Les trois protéines sont séparées par cristallisation suivant différentes conditions décrites dans ⁶.



Figure II.8 : complexe BPTI – Trypsine. A partir de 2PTC.pdb

Pour décrire cette protéine dans le détail, nous énumérons ci-dessous ses différentes structures en commençant par la structure primaire. La séquence en acides aminés du BPTI est la suivante :

1 R P D F C L E P P Y T G P C K A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A
 G G G G S S E E E E E E T T T T E E E E E E S S S S S S B S S H H H H H H H H H H

La première ligne est la séquence en acide aminé, la seconde indique l'appartenance des résidus aux différentes structures secondaires de la protéine, les couleurs qui surlignent les résidus indiquent la propriété de l'acide aminé. La description des codes couleurs et des structures secondaires est la suivante :

Aliphatique	G : hélice 310
Amine	S : courbure
Acide	E : brin bêta étendu
Basique	T : tour de liaison hydrogène
Soufre	B : résidu dans pont bêta isolé
Aromatique	H : hélice
Hydroxyle	

Ainsi, la séquence en acides aminés induit les structures secondaires qui composent la protéine. Dans le cas du BPTI, la protéine est composée d'une hélice 3.10 dès la partie N

terminale, de deux feuillets β vers le cœur de la protéine, et d'une hélice α en partie C terminale (figure II.9).

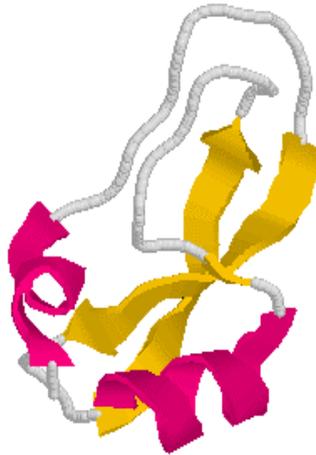


Figure II.9 : Représentation du BPTI à partir de 6PTI.pdb. En rose : structures en hélices, en jaune : feuillets β , en blanc : structures désordonnées.

Du point de vue de la structure tertiaire, le BPTI adopte un repliement en forme de poire grâce à la présence de trois ponts disulfures issus de l'association des résidus cystéines 5 et 55, 14 et 38, et entre les cystéines 30 et 51 et de trois ponts salins décrits sur la figure II.10 et le paragraphe suivant.

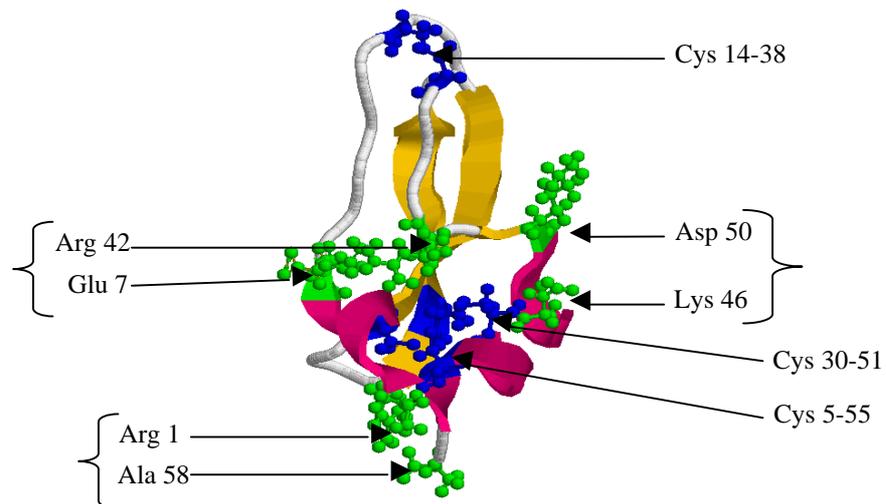


Figure II.10 : représentation du BPTI avec ses ponts disulfures en bleu et ses ponts salins (accolades) en vert

2. Les études de dénaturation du BPTI

Thomas E. Creighton a longtemps étudié le chemin de repliement de cette protéine en observant la séquence de formation de ces ponts disulfures⁹. La figure II.11 présente ce chemin de repliement.

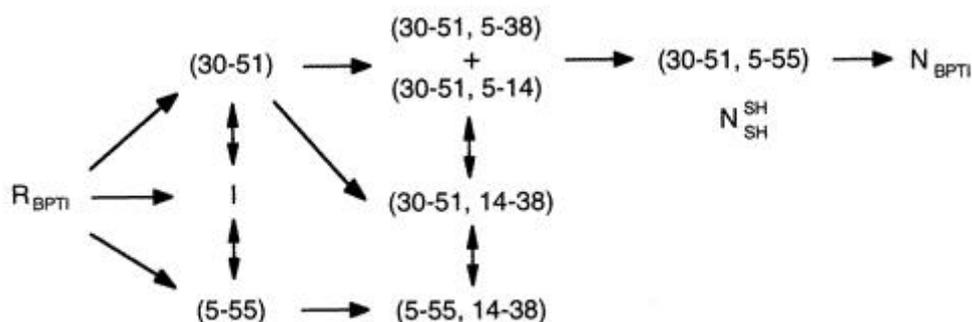


Figure II.11 : chemin de repliement basé sur la formation des ponts disulfures du BPTI⁸

La figure II.11 présente le chemin de repliement du BPTI en considérant la formation des ponts disulfures : dans un premier temps il existe un équilibre entre deux populations de BPTI partiellement replié, une population avec un pont entre les cystéines appartenant aux structures en hélices (5-55) et une autre avec un pont reliant l'un des feuillets β du cœur de la protéine avec l'hélice α N-terminal (30-51). Dans un second temps un équilibre rapide se met en place entre plusieurs formes de BPTI partiellement repliées aboutissant à une population majoritaire de BPTI possédant définitivement ses ponts (5-55) et (30-51). Enfin le troisième et dernier pont (14-38) est formé pour donner le BPTI dans sa conformation native.

Ces trois ponts disulfures confèrent au BPTI une stabilité importante face à l'action d'agent dénaturant, de la température et de la pression comme nous le verrons par la suite.

La figure II.12 représente le BPTI avec ses ponts disulfures.

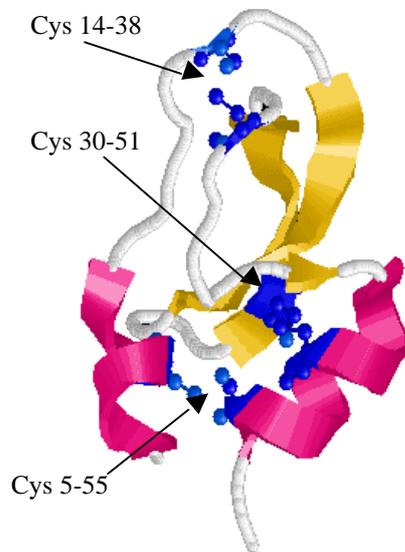


Figure II.12 : représentation du BPTI avec ses ponts disulfures annotés en bleu.

Il est à remarquer que la disposition de ces résidus cystéines et des ponts qu'ils forment bloque la protéine dans une conformation précise et n'offre, a priori, aucun degré de liberté. L'un des buts de ce travail de thèse est d'évaluer la dynamique du BPTI à l'état natif et dans les états dénaturés par l'action d'agent chimique, de la température et de la pression. Nous étudierons également la conformation de l'état natif en solution ainsi que les conformations des états dénaturés obtenus sous l'influence d'agent chimique, de la température et de la pression.

Rappelons la présence de trois ponts salins :

- entre les chaînes latérales de Asp50 et Lys46
- entre les chaînes latérales de Glu7 et Arg42
- et entre la chaîne latérale de Arg1 et la partie carboxy-terminale d'Ala58.

Bien qu'ils ne s'agissent pas de liaisons fortes comme pour les ponts disulfures, ces ponts salins limitent aussi la dynamique de la protéine. Des études par spectroscopie Raman ont fait état de la rupture de ces ponts salins aux alentours de 45 °C. La figure II.13 représente le BPTI avec ses ponts salins.

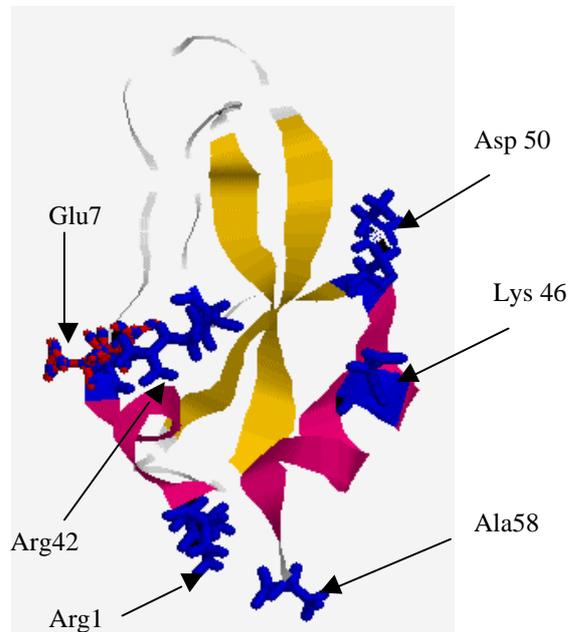


Figure II.13 : représentation du BPTI avec ses ponts salins annotés en bleu.

Le BPTI n'a pas de structure quaternaire mais des études récentes de cristallographie par rayons X ont montré la formation de décimères en conditions acide¹⁰.

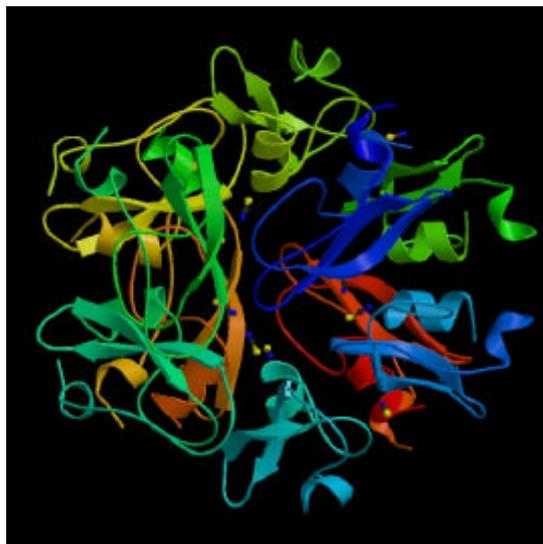


Figure II.14 : structure cristallographique d'un décimère de BPTI (1BHC.pdb)

a) dénaturation chimique

Des études de la dénaturation du BPTI ont déjà été réalisées : la réduction des ponts disulfures suffit à obtenir une chaîne dépliée. On a montré que les agents chimiques dénaturants tels que l'urée et le chlorure de guanidinium n'avaient aucun effet, même le chlorure de guanidinium à forte concentration ne dénature pas la protéine complètement. Seul le thiocyanate de guanidinium est capable de dénaturer le BPTI dans une gamme de concentrations raisonnables (~5 M)⁴. Dans le cas de notre étude, nous utiliserons le thiocyanate de guanidinium, la température et la pression.

La structure moléculaire du thiocyanate de guanidinium est décrite dans la figure II.15.

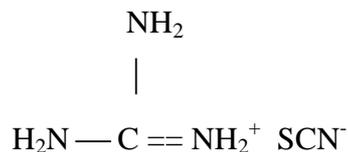


Figure II.15 : Structure moléculaire du thiocyanate de guanidinium

L'urée, le chlorure de guanidinium (GdmCl) et le thiocyanate de guanidinium (GdmSCN) provoquent une rupture des structures secondaires en entrant en compétition avec l'eau en tant que solvant environnant la protéine et avec les liaisons hydrogènes impliquées dans le maintien des structures secondaires ce qui permet de dévoiler le cœur hydrophobe des molécules fortement structurées.

Les expériences de dénaturation par le chlorure de guanidinium (GdmCl) ont montré qu'il faut environ 6 M de GdmCl pour obtenir une dénaturation complète de la plupart des protéines^{2,3}.

Dans le cas de la dénaturation du BPTI par différents dénaturants chimiques, seul le thiocyanate de guanidinium⁵ peut agir efficacement sur la protéine à des concentrations voisines de 4M, voire 3M si l'échantillon est porté à une température de 55 °C.

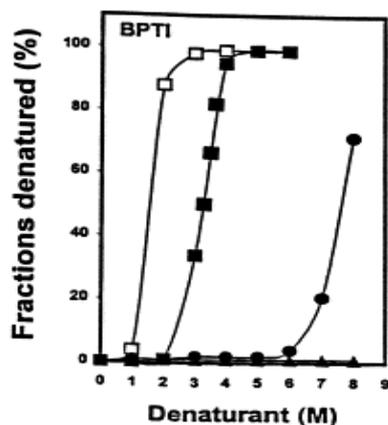


Figure II.16 : Dénaturation du BPTI (0.5mg/ml) en tampon Tris HCl 0.1 M pH 8.4 + 2-Mercaptoéthanol 0.25mM par des agents chimiques⁴.
 ▲ : Urée à 25°C, ●: GdmCl à 25°C, ■: GdmSCN à 25°C, □: GdmSCN à 55°C.

b) dénaturation thermique

La dénaturation par la température a été étudiée par calorimétrie différentielle⁵ et par spectroscopie Raman¹¹.

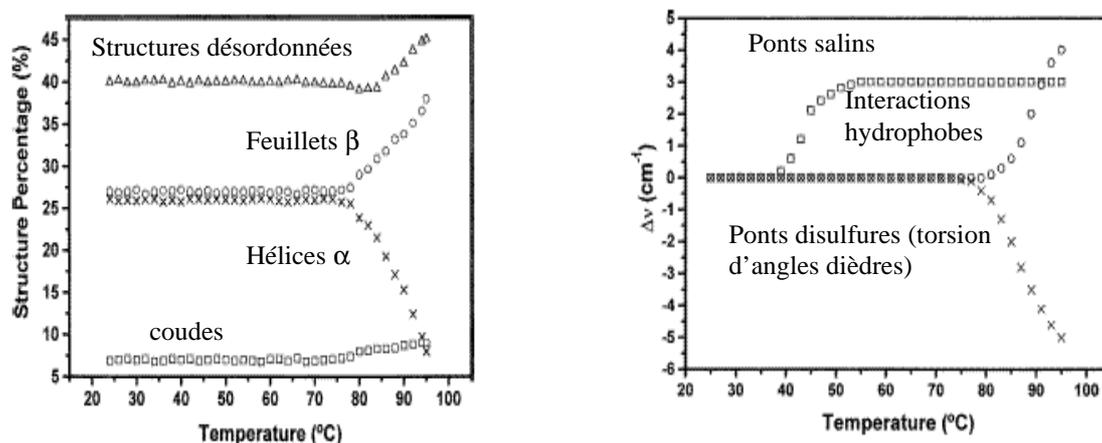
La dénaturation thermique du BPTI, en solution concentrée, a été étudiée par spectroscopie Raman entre 25 et 95°C puis après retour à 25°C⁷. Cette technique étudie les transitions vibrationnelles (déplacement en nombre d'ondes = 0 à 4000 cm⁻¹) à partir du processus de diffusion inélastique de la lumière.

Pour l'étude des protéines, la spectroscopie Raman permet de distinguer les structures secondaires comme les hélices α , les feuillets β , et les structures désordonnées ainsi que la conformation de ponts disulfures, les interactions hydrophobes et les ponts salins.

L'attribution des bandes Raman pour chacune de ces caractéristiques et leur évolution en fonction de la température pour le BPTI en solution sont résumées dans le tableau suivant :

$\nu(\text{structures désordonnées})$	1665 cm^{-1}	Structures désordonnées augmentent avec la température entre 60 et 80°C
$\nu(\text{feuillets } \beta)$	1674 cm^{-1}	Excès de feuillets β à 95°C qui ne disparaît pas totalement lors du retour à 25°C . → dénaturation irréversible
$\nu(\text{COO}^-) \rightarrow \text{ponts salins}$	1410 cm^{-1} et 1388 cm^{-1}	upshift → Rupture des ponts salins à 40°C
$\nu(\text{ponts salins impliquant résidus Arginine})$	1343 cm^{-1} -----→ et 1321 cm^{-1} -----→	Diminution intensité lorsque T augmente. Upshift lorsque T augmente. → Peu d'hélices α dans la protéine au départ mais perte flagrante après 80°C (*).
$\nu(\text{interactions hydrophobes}) = \nu(\text{CH})$	2933 cm^{-1} à 2937 cm^{-1}	Shift de 2933 cm^{-1} à 2937 cm^{-1} → Perte des interactions hydrophobes dès 75°C .
$\nu(\text{ponts disulfures}) = \nu(\text{SS})$	511 cm^{-1}	Modifications des angles de torsions des ponts disulfures à partir de 75°C

Tableau IIc : attribution des fréquences relatives aux structures secondaires et des interactions intramoléculaires des protéines¹¹.



Pourcentage des structures secondaires du BPTI en fonction de la température : Δ : désordonnées, \circ : feuillets β , \times hélices α , coudes.

Déplacements de fréquences (par rapport à 25°C) pour les bandes : $\nu_s(\text{COO}^-)$, \circ : $\nu(\text{CH})$, et \times : $\nu(\text{SS})$ du BPTI en solution 12 mM en tampon Na cacodylate (pH (6.5) en fonction de la température.

Figure II.17 : résultats issus d'expériences par spectroscopie Raman. A gauche : évolution de la proportion de structures secondaires du BPTI en fonction de la température, à droite : évolution de trois types d'interactions dans le BPTI en fonction de la température¹⁰.

Afin d'expliquer la perte flagrante des hélices α mentionnée dans le tableau III, les auteurs ont considéré des travaux antérieurs¹² (tableau Iic) faisant état de l'attribution de la bande localisée à 1343 cm^{-1} à la chaîne principale d'une hélice α ; plus précisément aux vibrations de :

- flexion de l'angle de valence de C-C α -H
- élongation de la liaison C-C α

Ces liaisons sont décrites dans la liaison peptidique représentée dans la figure II.18.

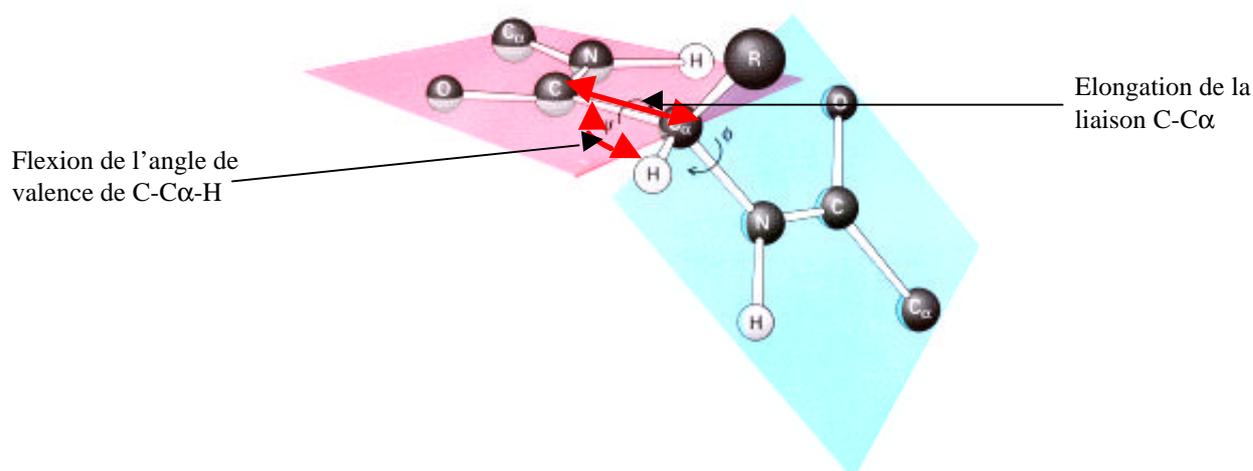
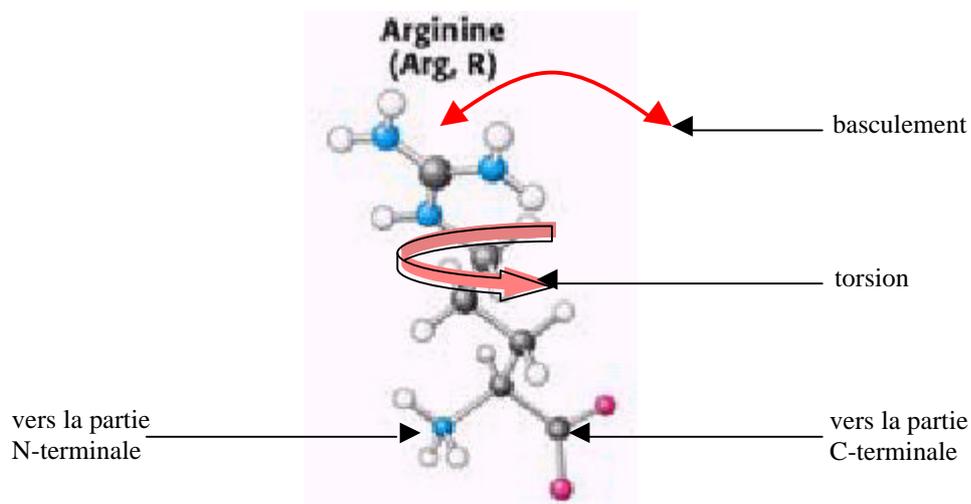


Figure II.18 : représentation d'une liaison peptidique. Chaque carbone α porte la chaîne latérale du résidu R d'acide aminé. Les flèches rouges indiquent les mouvements des liaisons au sein de la liaison peptidique.

Cependant, la disparition progressive de cette bande au fur et à mesure de l'augmentation de la température ne peut être attribuée à la seule diminution de la proportion d'hélices α puisque la bande amide I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) correspondant au signal de l'ensemble des structures secondaires est modifiée à partir de 75°C . Or la bande des hélices α située à 1343 cm^{-1} subit l'influence de la température dès 45°C .

Dans l'hypothèse où la disparition de cette bande est relative à la rupture de ponts salins dans la protéine, les auteurs ont recréé ces ponts dans une solution de sel de L-arginine acide L-glutamique (AGS), où leur proportion est dépendante de la concentration et de la température. Ce système présente lui même une bande proche de 1345 cm^{-1} , il est évident que cette bande correspond au signal des ponts salins impliquant les résidus arginines.

D'autre part la bande localisée à 1321 cm^{-1} peut correspondre à un recouvrement des vibrations de plusieurs chaînes latérales (torsion et basculement de groupe CH_2) de résidus



non-aromatiques comme les groupes guanidyles des résidus arginine (figure II.19). En effet, lorsque la température augmente, cette bande se déplace vers les plus hautes fréquences.

Figure II.19 : représentation du résidu arginine. Les flèches rouges indiquent les mouvements de la chaîne latérale.

Les résidus impliqués dans les ponts salins sont constitutifs des hélices α du BPTI, la diminution de la proportion de ce type de structure secondaire vers 95°C visible dans la bande amide I et surtout à 1343 cm^{-1} peut être en partie expliquée par la rupture des ponts salins qui intervient vers 45°C .

c) dénaturation par la pression

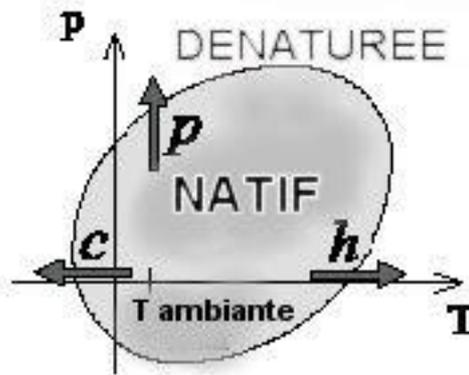


Figure II.20 : représentation schématique du diagramme de phase elliptique pression-température des protéines d'après Balny¹³. L'ellipse définit les gammes de température et de pression dans lesquelles la protéine est native. Les flèches notées c, h, p indiquent les chemins de dénaturation spécifiques connus comme la pression (p), le froid (c), et la chaleur (h).

Dans l'industrie agro-alimentaire, de nouvelles techniques sont utilisées dans les processus de stérilisation. Au lieu de la stérilisation par de très hautes températures qui peuvent affecter le goût, la couleur, voire la texture d'un produit du fait de la rupture de liaisons covalentes, l'utilisation de hautes pressions permet une stérilisation plus douce et plus économique puisqu'elle peut être appliquée à des températures inférieures à 100 °C et seules les liaisons faibles sont rompues.

D'autre part, la pression peut induire des chemins de repliement différents de ceux provoqués par les hautes températures.

A pression atmosphérique, les variables usuelles de dénaturation d'une protéine en solution sont la température et/ou le changement de la composition du solvant. Le principal désavantage de l'utilisation de la température comme moyen de dénaturation est que son action résulte à la fois d'un changement de volume et de l'énergie thermique. Il est difficile de distinguer la contribution de chacun de ces changements dans la modification de la structure d'une protéine. L'utilisation de la pression afin de dénaturer une protéine permet d'observer uniquement l'effet du changement de volume. Il est cependant important de noter que la pression peut affecter d'une manière plus ou moins importante le solvant et plus particulièrement le pH de celui-ci¹⁴ ; la pression influence le volume d'ionisation. Dans le cas de notre étude, le pH du tampon utilisé (tampon acide acétique deutéré 50mM en D₂O pD 4.5 avec 100 mM de (ND₄)₂SO₄) ne varie que très peu, de plus le BPTI n'est pas dénaturé dans cette gamme de pH.

De plus la pression agit sur l'eau qui va elle-même provoquer le dépliement des protéines.

Des études sur plusieurs protéines ont été réalisées auparavant : la première étude du changement de conformation induite par la pression a été effectuée sur le blanc d'œuf par Bridgman¹⁵. En 1963, la réversibilité de l'action de la pression sur la turbidité d'une solution de sérum albumine de cheval a été observée pour la première fois montrant ainsi que la pression ne conduisait pas à un dépliement définitif de certaines protéines¹⁶. Une analyse thermodynamique a été réalisée par Hawley¹⁷ et Zipp et Kauzmann¹⁸.

Silav et Weber¹⁹ ont résumé les effets de la pression sur la stabilité des protéines monomériques de la manière suivante :

- Des changements spectraux en UV-visible, en infrarouge, et par R.M.N. apparaissent dans une gamme de pressions restreinte de 0.5-1.5 kbar indiquant l'apparition d'une conformation de la protéine différente de celle de l'état natif avec un volume plus petit. La diminution de volume de la protéine solvatée est de l'ordre de 0.2 à 0.5 %.
- Les protéines présentent une transition conformationnelle réversible, visible d'après ces changements spectraux, jusqu'à des pressions hydrostatiques de l'ordre de 5 kbar, voire plus.
- La spectroscopie par fluorescence indique que dans les conformations générées par les hautes pressions, les résidus tryptophanes sont au contact d'un milieu présentant la polarité de l'eau.
- Les données hydrodynamiques montrent que les protéines conservent leurs formes globulaires.

Une interprétation possible de ces phénomènes est l'infiltration de l'eau dans les protéines à haute pression. Plus précisément, les liaisons hydrogène, qui contribuent au maintien des structures secondaires, sont déstabilisées par l'eau qui infiltre la protéine. Cette pénétration des molécules d'eau au sein de la molécule biologique conduit à une perte des structures secondaires et finalement au dépliement de la protéine.

Dans le cas du BPTI, on a montré par infrarouge que cette protéine présentait une très grande stabilité face à la haute pression. Les études de cet inhibiteur sous pression ont principalement été réalisées par FTIR^{20,21}, par R.M.N²¹⁻³⁰ et en simulation par dynamique moléculaire^{27,31,32}.

L'action de la pression au delà de 10 kbar induit aussi cette β -agrégation dans le BPTI. Des expériences de spectroscopie infrarouge¹⁹ ont montré que jusqu'à 7 kbar, 6 des 58 résidus d'acides aminés du BPTI, soit près de 10%, sont impliqués dans les feuillets β . Une augmentation de la pression jusqu'à 14 kbar conduit à une augmentation de cette proportion jusqu'à 40 %, correspondant ainsi à 23 résidus d'acides aminés faisant partie des structures en feuillets β . En ce qui concerne les autres structures secondaires, les hélices α voient leur proportion diminuer de 23 à 13 % lorsque la pression augmente de 1 bar à 14 kbar et les structures désordonnées sont encore plus influencées par la pression puisque de 35 % à pression atmosphérique, il n'en reste que 5 % à la plus haute pression appliquée. Une hypothèse a été émise dans ce travail selon laquelle, à 14 kbar, les boucles des résidus 7-17 et 36-46 sont transformées en feuillets β antiparallèles intramoléculaires.

Une autre étude plus récente par infrarouge²⁰ a montré que les structures secondaires de type hélice 3_{10} , tours β (1667 cm^{-1}), et hélices α (1655 cm^{-1}), plus exposées au solvant sont très légèrement réarrangées jusqu'à 5,5 kbar et les boucles des résidus 9-17 et 36-43 ne sont pas affectées par la pression jusqu'à cette valeur de pression. Mais une augmentation de la pression au delà de 10 kbar provoque une précipitation du BPTI probablement due à l'exposition des résidus hydrophobes appartenant aux feuillets β (1638 cm^{-1}) enfouis au niveau du cœur de la protéine. La figure II.21 présente l'évolution de la bande amide I caractéristique des structures secondaires en fonction de la pression.

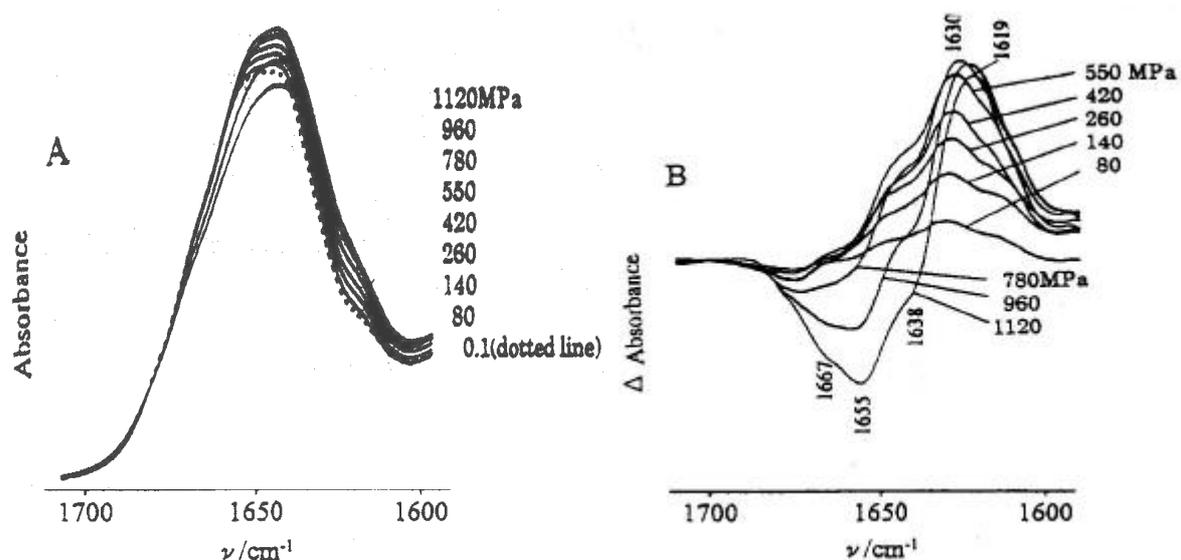


Figure II.21 : spectres “infrarouge” du BPTI en fonction de la pression.

A : spectres originaux, B: spectres “différence” ($\Delta\text{Abs}=\text{Abs}(P)-\text{Abs}(P = 1 \text{ bar})$).

D’après Takeda et al 1998²⁰.

Les expériences par R.M.N. ont permis d’observer l’influence de la pression sur la structure et sur la dynamique du BPTI. Une première étude par R.M.N. sous pression jusqu’à 1200 bar à 57°C a été réalisée par Wagner en 1980²² sur une solution de BPTI à 10mM (65mg/ml). Wagner a notamment porté son attention sur la région des résidus aromatiques dans les spectres R.M.N du proton. Le but a été de déterminer le volume d’activation ΔV à partir de la dépendance en pression de la fréquence de flip-flop k des résidus aromatiques du BPTI, c’est à dire la fréquence de rotation de l’anneau aromatique autour de l’axe formé par les carbonnes C_β et C_γ .

La relation entre ΔV et k est le principe de Le Châtelier :

$$\frac{\partial \ln k}{\partial P} = \frac{-\Delta V}{k_B T}$$

où P est la pression et k_B est la constante de Boltzmann.

Wagner a montré que lorsque la pression appliquée à une solution de 10mM de BPTI augmentait depuis la pression atmosphérique jusqu’à 1200 bar, le volume réactionnel de la phénylalanine 45 et de la tyrosine 35 augmente. Il interprète le flipping des résidus aromatiques comme étant dû à la création occasionnelle d’un espace plus important autour de ces résidus par le biais des fluctuations de la protéine.

Plus récemment en 1998, Li et al²³ ont montré, en observant le déplacement de la bande des liaisons N-H en R.M.N., sur une solution de BPTI à 10mM (soit 65 mg/ml) un raccourcissement réversible des liaisons hydrogène de l'ordre d'environ 1% entre les protons des groupes amides et les oxygènes des groupes carbonyles jusqu'à une pression de 2000 bar. Cette diminution de la distance H...O est plus évidente pour des structures plus exposées au solvant et dont la longueur est plus importante ; au niveau du tour β (résidus 27-29), de la partie périphérique des feuillets β (résidus 18 et 36) et au niveau des hélices (résidus 50,55 et 56). Et ce raccourcissement de la liaison hydrogène est moins flagrant pour des structures secondaires localisées au niveau du cœur de la protéine où la longueur des liaisons hydrogène est plus courte : notamment la partie interne des feuillets β (résidus 20-24), et au niveau des hélices (résidus 51-54). Pour les groupes amides des résidus de surface liés aux molécules d'eau d'hydratation de la protéine, les liaisons hydrogène sont particulièrement sensibles à l'action de la pression (résidus 3, 10-12, 19, 25, 32, 34, 41 et 57). La compression d'une molécule biologique intervient essentiellement, d'après les auteurs, au niveau des liaisons hydrogène et non seulement par la diminution du volume des cavités hydrophobes. Ils ont aussi montré que les protons des carbones C_α qui portent les chaînes latérales des différents résidus d'acides aminés et qui composent le squelette de la protéine subissaient aussi l'influence de la pression et que ce paramètre physique induisait par conséquent une modification dans les structures secondaires et tertiaires des protéines.

En 1999, Li et al²⁴ ont montré par effet NOE en R.M.N. que l'application d'une pression jusqu'à 2000 bar induisait un ralentissement de la diffusion globale de la protéine (10mM soit 65 mg/ml de BPTI) en solution d'un facteur 1,15 environ mais que cela était essentiellement dû à l'augmentation de la viscosité du solvant. La pression conduit en outre à une compaction de la structure tertiaire et à une modification des mouvements internes lents. La fréquence des mouvements de flip-flop des résidus tyrosine 35 et phénylalanine 45 est ralentie d'un facteur 10 à 100, équivalent au ralentissement produit par la baisse de température²⁵, et induit un volume d'activation important. Ces résultats confirment ceux présentés par Wagner en 1980.

Akasaka et al²⁶, en 1999, se sont penchés sur l'influence de la pression, jusqu'à 2000 bar, sur la structure du squelette du BPTI observée par le biais des déplacements chimiques de ¹⁵N des groupes amide en R.M.N sur une solution à 2mM, soit 13 mg/ml. L'ensemble de la protéine est affectée par la pression de manière hétérogène : les changements structuraux sont plus importants au niveau des hélices et des boucles qu'au niveau des feuillets β , ce qui

indiquent d'après les auteurs que les hélices et les boucles ont une plus grande compressibilité et des fluctuations de volumes plus importantes.

La dynamique interne du BPTI en solution (5mM, soit 32.5 mg/ml) a été comparée par Sareth et al²⁷ en 2000 entre 30 bar et 2000 bar par le biais de la relaxation de spin des ¹⁵N en R.M.N. Les auteurs ont montré que la dynamique interne, à l'échelle de la picoseconde à la nanoseconde, n'était pas affectée de manière significative dans cette gamme de pression. En particulier, ils montrent qu'une pression de 2000 bar n'affecte que très faiblement la dynamique au niveau des boucles du BPTI. La dynamique de la partie C-terminale n'est, elle, pas du tout affectée par la pression. Ce résultat confirme celui obtenu en simulation par dynamique moléculaire par Brunne et Van Gunsteren²⁸ en 1993.

Enfin l'étude la plus récente réalisée sur le BPTI en solution (10mM, soit 65 mg/ml) sous pression en R.M.N. est celle menée par Williamson et al²⁹ en 2003. Les auteurs ont pu déterminer la structure de la protéine à 2000 bar. Les différences structurales les plus évidentes par rapport à la structure du BPTI à 30 bar se situent dans la boucle définie par les résidus 10 à 16, proches de la lysine 15 qui constitue le site actif de l'inhibiteur, et par les résidus 38 à 42, proches des molécules enfouies dans la protéine. La structure globale de la protéine est affectée par une pression de 2000 bar puisque les auteurs observent une très faible augmentation du rayon de giration (10,89 Å à 30 bar et 10,94 Å à 2000 bar). Plus en détail, la forme de la protéine change sous la pression et adopte une conformation plus longue et plus fine ; en d'autres termes, le BPTI prend une forme plus ellipsoïdale lorsqu'elle est soumise à une pression de 2000 bar. Les auteurs ont, en outre, noté une grande compaction des cavités dans la protéine. Les boucles qui contiennent la lysine 26 et la cystéine 38 adoptent une nouvelle conformation induisant le changement dans la conformation globale de la protéine. La boucle qui contient la lysine 15 se replie dans la protéine. Les liaisons hydrogène voient leur longueur se raccourcir avec la pression mais avec une grande distribution de changement de longueurs dans la protéine (figure II.22).

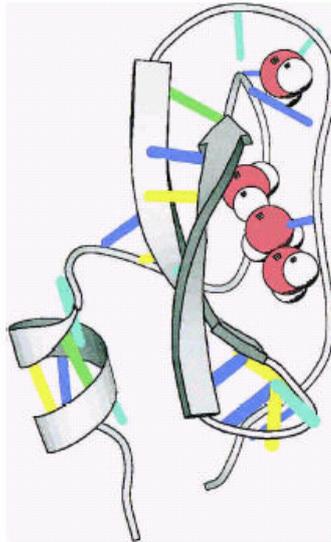


Figure II.22 : Changement dans les longueurs des liaisons hydrogène du BPTI sous pression. Les liaisons hydrogène sont indiquées par les traits épais colorés ; bleu foncé : plus court de plus de 0.1 Å, cyan : plus court de moins de 0.1 Å, jaune : plus long de plus de 0.1 Å, vert : plus long de moins de 0.1 Å. Figure produite par MOLSCRIPT³⁰

Les liaisons hydrogène dont les longueurs sont plus grandes à pression atmosphérique se raccourcissent plus que les liaisons dont les longueurs sont plus courtes. Cela a déjà été observé sur le lysozyme³¹. L'ensemble de ces résultats conduit à penser que la région la plus sensible à la pression, à savoir les boucles et notamment celle qui comporte le site actif du BPTI au niveau de la lysine 15, est la plus flexible. Cette flexibilité est nécessaire pour l'accomplissement du rôle d'inhibiteur de cette protéine. Il lui faut, en effet, pouvoir insérer rapidement cette lysine 15 dans les sites cryptiques catalytiques des protéases comme la trypsine.

Une expérience de simulation par dynamique moléculaire a été réalisée sur le BPTI dans l'eau sous pression³². On a montré que le rayon de giration d'une molécule de BPTI diminue de 2 % lorsque la pression passe de la pression atmosphérique à 10 kbar mais aucun dépliement de la protéine n'a été mis en évidence. La figure II.23 présente une vue de l'influence de la pression entre 1 bar et 10 kbar sur la forme globale de la protéine au cours de cette simulation.

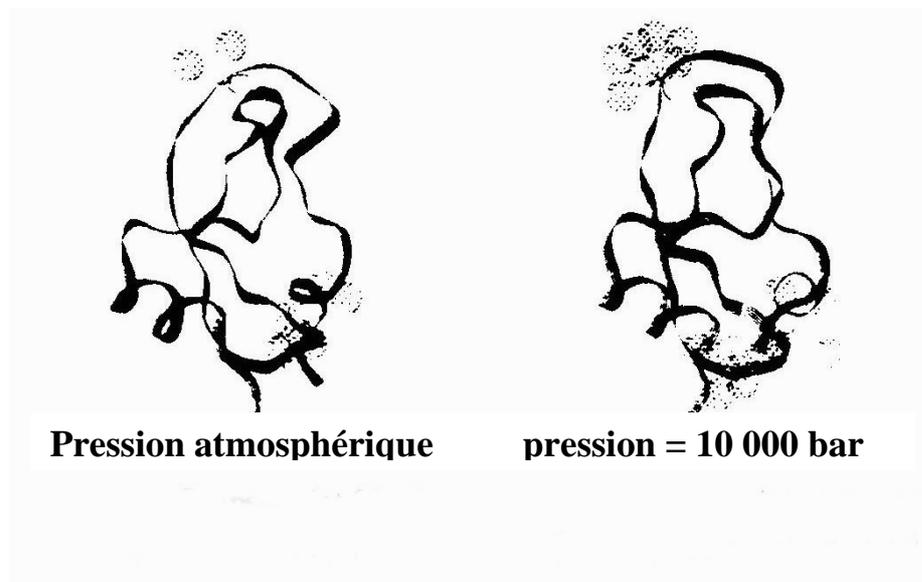


Figure II.23 : résultats instantanés de simulation à 50 ps du BPTI à pression atmosphérique (à gauche) et à 10 kbar (à droite). À partir de Kitchen et al 1992³¹

Une expérience plus récente de simulation par dynamique moléculaire sur le BPTI dans l'eau soumis à des pressions de 1, 10 000, 15 000 et 20 000 bar a été réalisée³³. Les résultats font état d'une perte de 60 % des feuillets β dès que la pression atteint 10 kbar mais les hélices α ne subissent l'effet de la pression qu'à partir de 15 kbar avec 40 % de perte. A partir de 15 kbar, le BPTI est majoritairement constitué de structures désordonnées. Les résultats de cette simulation n'ont indiqué aucune variation du volume du BPTI entre 1 bar et 20 kbar mais les auteurs interprètent cette évolution comme une augmentation du rayon de giration entre la pression atmosphérique (11.5 Å) et 15 kbar (11.75 Å) et un retour à la valeur initiale lorsque la pression atteint 20 kbar, la forme globale du BPTI n'est donc pas affectée par la pression. Il est cependant important de noter que cette variation du Rg n'est pas significative étant donné la taille initiale de la protéine.

La figure II.24 présente une vue de l'influence de la pression jusqu'à 15 kbar au cours de cette simulation. Ces résultats issus de la simulation sont en contradiction avec ceux obtenus expérimentalement par spectroscopie infrarouge. Il semblerait que la durée des simulations ne soit pas assez longue.

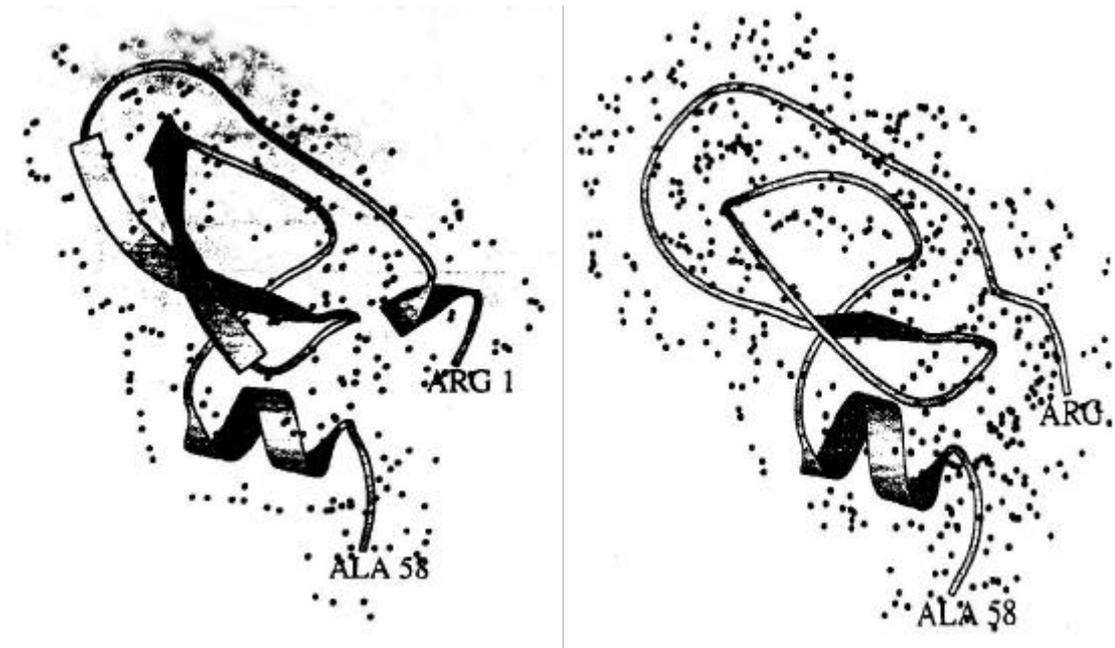


Figure II.24 : représentations de la structure de la chaîne principale du BPTI issue de simulation par dynamique moléculaire. D'après Wroblowski et al 1996³². A gauche : après 200 ps à pression atmosphérique, à droite : après 200 ps à 15 kbar.

-
- ¹ Branden C. et Tooze J., *Introduction to protein structure*, Garland Publishing, Inc New York and London, 1991.
- ² Tandford C. *Adv. Prot. Chem.*, **23**, 1968, pp 121-282
- ³ Tandford C. *Adv. Prot. Chem.*, **24**, 1970, pp 1-95
- ⁴ Chang J-Y et Ballatore A, *FEBS Letters*, **473**(2), 2000, pp 183-187
- ⁵ Makhatadze G.I., Kim K-S, Woodward C, et Privalov P.L, *Protein Science*, **2**, 1993, pp 2028-2036
- ⁶ Kunitz et Northrup, *J. Gen. Phys.*, **19**, 1936, p 991.
- ⁷ Deisenhofer J. et Steigemann W., *Acta Cryst.*, **B31**, 1975, pp 238-250.
Wlodawer A, Nachman J, Gilliland GL, Gallagher W, Woodward C, *J.Mol.Biol.*, **198**, 1987, pp 469-480. (structure du BPTI à 1.7 Å)
- ⁸ Vincent J.P. et Lazdunski M., *Biochemistry*, **11**, 1972, pp 2967-2977
- ⁹ Creighton T.E *Science* **256**, 1992, pp 111-114.
- ¹⁰ Hamiaux C., Pérez J., Prangé T., Veessler S., Riès-Kautt M., et Vachette P., *J. Mol. Biol.*, **297**, 2000, pp 697-712.
- ¹¹ Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003, pp137 –143
- ¹² Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *J. Raman Spectrosc.*, **29**, 1998a, pp 23–29
Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **37**, 1998b, pp 5654–5665
Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **38**, 1999, pp 4018–4027
Overman S.A., Aubrey K.L., Vispo N.S., Cesareni G., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **33**, 1994, pp 1037–1042
- ¹³ Balny C., Masson P., et Heremans K., *BBA*, **1595**, 2002, pp 1-402.
- ¹⁴ Neumann RC, Kauzmann W, et Zipp A *The Journal of Physical Chemistry*, **77**(22), 1973, pp 2687-2691
- ¹⁵ Bridgman PW, *J. Biol. Chem.*, **19**, 1914, pp 511-512.
- ¹⁶ Susuki K, Miyosawa Y, Susuki C, *Arch. Biochem. Phys.*, **101**, 1963, pp 225-228.
- ¹⁷ Hawley SA, *Biochemistry*, **10**, 1971, pp 2436-2442.
- ¹⁸ Zipp A, Kauzmann W, *Biochemistry*, **12**, 1973, pp 4217-4228.
- ¹⁹ Silva JL, Weber G, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 1993, pp 89-113.
- ²⁰ Goosens K, Smeller L, Frank J, Heremans K, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1996, pp 254-262

-
- ²¹ Takeda N, Nakano K, Kato M, Taniguchi Y, *Biospectroscopy*, **4**, 1998, pp 209-216
- ²² Wagner G, *FEBS Letters*, **112**(2), 1980, pp 280-284.
- ²³ Li H, Yamada H, Akasaka K, *Biochemistry*, **37**(5), 1998 pp 1167-1173.
- ²⁴ Li H, Yamada H, Akasaka K, *Biophys. J.*, **77**, 1999, pp 2801-2812.
- ²⁵ Wüthrich K., N.M.R. of proteins and nucleic acids. *John Wiley and Sons, New York.*, 1986.
- ²⁶ Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., et Woodward C.K., *Protein Science*, **8**, 1999, pp 1946-1953.
- ²⁷ Sareth S., Li H., Yamada H., Woodward C.K., et Akasaka K., *FEBS Letters*, **470**, 2000, pp 11-14.
- ²⁸ Brunne R.M. et Van Gunsteren W.F., *FEBS Letters*, **323**, 1993, pp 215-217.
- ²⁹ Williamson M.P., Akasaka K, Refae M., *Protein Science*, **12**, 2003, pp 1971-1979.
- ³⁰ Kraulis P.J. *J. Appl. Crystallog.*, **24**, 1991, pp 946-950.
- ³¹ Refae M, Akasaka K, et Williamson M.P. *J. Mol. Biol.*, **327**, 2003, pp 857-865.
- ³² Kitchen D.B., Reed L.H., et Levy R.M., *Biochemistry*, **31**, 1992, pp 10083-10093.
- ³³ Wroblowski B., Diaz J.F., Heremans K., et Engelborghs Y., *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* , **25**, 1996, pp 446-455.

CHAPITRE III

**INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA PRESSION SUR LA
STRUCTURE DU BPTI.**

**UNE ETUDE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES
ET PAR SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE.**

III. Influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI. Une étude par diffusion de neutrons aux petits angles et par spectroscopie UV-visible.....	102
A. Matériel et méthode.....	102
1. Préparation des solutions et spectromètres de DNPA.....	102
B. Appareillage	103
C. Traitement des données expérimentales.....	105
1. Expression de l'intensité diffusée	105
2. Traitement des spectres bruts.....	106
3. Calibration absolue	107
4. Bruit de fond incohérent.	107
D. Résultats des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles.....	110
1. Caractérisation de l'état natif. Facteur de forme théorique.....	110
2. Caractérisation de l'état natif. Etude par diffusion de neutrons aux petits angles....	113
3. influence de la température sur le rayon de giration et les interactions.....	116
a) A température ambiante : caractérisation de l'état natif du BPTI en solution	117
b) Evolution du rayon de giration et des interactions en fonction de la température.	121
c) Evolution de la forme de la protéine en fonction de la température.....	130
4. Etude de l'influence de la pression sur la structure du BPTI.....	136
a) Influence de la pression sur le rayon de giration du BPTI et sur l'intensité lorsque q tend vers 0.	136
b) Influence de la pression sur la forme du BPTI	142
(1) Résultats	142
(2) Discussion	146
E. Résultats des expériences par spectroscopie UV-visible	149
a) Mise en évidence de la β agrégation par la fixation de Rouge Congo.	149
(1) Conditions expérimentales.....	149
(2) Résultats.....	150
(3) Discussion	158
b) Expériences par Absorption UV-visible en dérivées 4 ^{ème}	159
(1) Conditions expérimentales.....	159
(2) Résultats	160
(3) Discussion	167
F. Conclusion sur l'influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI en solution.....	171

Les protéines sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés qui leur confèrent une structure tridimensionnelle précise pour chacune d'entre elles et leurs fonctions sont assujetties à cette structure. Leur synthèse s'effectue au niveau du noyau des cellules où elles apparaissent dans un premier temps à l'état de structure dite primaire : le repliement des protéines est encore mal connu à ce jour et l'utilisation de la diffusion de neutrons aux petits angles permet, lors de l'étude des états dénaturés des protéines, d'étudier ce phénomène en appliquant la théorie des polymères. Les interactions entre les molécules peuvent aussi être observées par cette technique.

III. Influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI. Une étude par diffusion de neutrons aux petits angles et par spectroscopie UV-visible.

A. Matériel et méthode

1. Préparation des solutions et spectromètres de diffusion de neutrons aux petits angles.

Le BPTI ou Aprotinine est fourni par Sigma-Aldrich (A-4129 : Aprotinin from bovine lung, affinity purified, lyophilized) et est utilisé sans autres formes de purification.

La poudre lyophilisée de protéine est solubilisée à hauteur de 100 mg/ml approximativement pendant une nuit sans agitation à température ambiante dans du tampon acide acétique deutéré 50 mM en D₂O avec 100 mM de (ND₄)₂SO₄ pD 4.5.

La solution est alors passée à travers un filtre 0.22 µm puis dialysée contre le tampon correspondant pour une durée minimum de 24 heures. Par la suite, la solution est centrifugée à 20000 G pendant 1 heure à 25°C afin d'éliminer d'éventuels agrégats, puis concentrée grâce à un dispositif d'ultrafiltration Centricon YM-3 afin d'obtenir la concentration la plus élevée possible (soit 85 mg/ml). La concentration est mesurée par spectroscopie UV-visible en tenant compte du coefficient d'extinction molaire du BPTI : $\epsilon(\text{BPTI}, \lambda = 280 \text{ nm}) = 0.786 \text{ ml.mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Dans le cas de l'étude par diffusion de neutrons aux petits angles, les différentes concentrations de solution de BPTI sont préparées directement dans les cellules et sont contrôlées par pesée. Nous avons mesuré les solutions de BPTI et le tampon dans des cellules Hellma QS100 de chemin optique de 5 mm. Nous avons aussi mesuré l'eau légère pour la

normalisation ainsi qu'une cellule vide ayant un chemin optique de 1 mm. La température à l'intérieur de la cellule est régulée par un bain thermostaté.

Les mesures en température ont été effectuées sur le spectromètre PACE ($\lambda = 8 \text{ \AA}$, $0.01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, $\lambda = 5 \text{ \AA}$, $0.04 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.4 \text{ \AA}^{-1}$) jusqu'à 85 °C et sur le spectromètre PAXE ($\lambda = 6 \text{ \AA}$, $0.06 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.4 \text{ \AA}^{-1}$) jusqu'à 95°C au Laboratoire Léon Brillouin du CEA de Saclay.

B. Appareillage

Les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA) ont, en majeure partie, été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin à l'aide du spectromètre PACE (Fig.III.1). L'intensité des neutrons diffusés est enregistrée par 30 détecteurs annulaires concentriques entourant un détecteur central servant à les centrer par rapport au faisceau incident et à mesurer l'intensité du faisceau transmis par l'échantillon. Deux configurations de l'appareil correspondant à deux résolutions différentes ($R=2\pi/Q_{\max}$), ont été employées pour déterminer la structure de la protéine dans l'état natif et les états dénaturés. Dans la première configuration, la longueur d'onde, λ , des neutrons incidents était égale à 8 Å, les diamètres des diaphragmes définissant la divergence du faisceau incident étaient $\Phi_1 = 7 \text{ mm}$ et $\Phi_2 = 10 \text{ mm}$ et la distance entre l'échantillon et le détecteur, D , était de 2.4 m. Dans ces conditions, les valeurs du transfert de nombre d'onde, Q , sont comprises entre $9,5 \cdot 10^{-3}$ et $0,1 \text{ \AA}^{-1}$. Dans la seconde configuration, $\lambda = 5 \text{ \AA}$, $\Phi_1 = 7 \text{ mm}$, $\Phi_2 = 16 \text{ mm}$ et $D = 0,95 \text{ m}$. Les valeurs de Q sont alors comprises entre $4 \cdot 10^{-2}$ et $0,4 \text{ \AA}^{-1}$.

La résolution $\Delta\lambda/\lambda$ est de l'ordre de 10%.

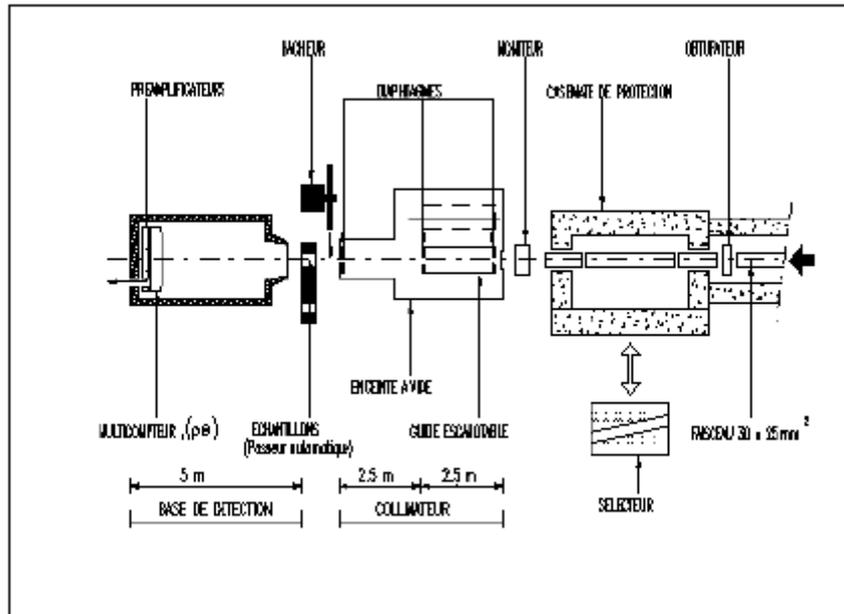


Figure III. 1 Schéma du spectromètre de diffusion PACE. Le faisceau incident est focalisé par deux diaphragmes espacés de 2.5 m, et de diamètres Φ_1 et Φ_2 . A la sortie du collimateur, le faisceau est diffusé par l'échantillon, puis traverse un tube à vide, avant d'arriver au détecteur. Ce détecteur est relié à un ordinateur qui comptabilise le nombre de neutrons détectés pour chaque angle de diffusion correspondant à chaque anneau.

Dans chaque configuration de l'appareil, nous avons mesuré successivement les spectres de diffusion de la solution de protéine et du tampon correspondant, de l'eau légère contenue dans une cuve de 1mm de trajet optique, et de la cuve vide. Aux plus petites valeurs de Q , la durée des mesures est d'environ 6 heures pour les échantillons et leurs tampons. Pour l'eau légère et la cuve vide, 3 heures suffisent amplement. Le bruit de fond ambiant, B'_{Amb} , a été déterminé en mettant un fort absorbant, constitué de cadmium et de carbure de bore, à la place de l'échantillon. L'intensité du faisceau transmis par chaque échantillon, I_{Ech} , a été déterminée avant et après la mesure de son spectre de diffusion. Afin de ne pas saturer le détecteur central, le faisceau incident était atténué par des plaques de Plexiglas placées avant le collimateur. Chaque comptage a duré environ cinq minutes. Par rapport à la cuve vide, la transmission d'un échantillon est :

$$T_{Ech} = I_{Ech} / I_{CV} \quad (3. 1)$$

C. Traitement des données expérimentales

1. Expression de l'intensité diffusée

L'intensité brute diffusée par un échantillon quelconque, composé de sa cuve et de son contenu, peut s'écrire :

$$I'_{\text{Cont+CV}}(\mathbf{I}, Q) = I_0(?) S \Delta\Omega C(?) T_{\text{Cont+CV}}(?) \times \quad (3.2)$$
$$\times [e_{\text{CV}} \times I_{\text{CV}}(? , Q) + e_{\text{Cont}} I_{\text{Cont}}(? , Q) + B'(Q)] + B'_{\text{Amb}}$$

où S est la section du faisceau incident d'intensité I_0 . $\Delta\Omega$ est l'angle solide de collection du détecteur et $C(\mathbf{I})$ son rendement pour des neutrons de longueur d'onde \mathbf{I} . e_{CV} est l'épaisseur des parois de la cuve et e_{Cont} son trajet optique interne, c'est à dire l'épaisseur de son contenu. $I_{\text{CV}}(\mathbf{I}, Q)$ et $I_{\text{Cont}}(\mathbf{I}, Q)$ sont les sections efficaces de diffusion, par unité de volume et d'angle solide, de la cuve vide et de son contenu. $B'(Q)$ est un bruit de fond provenant des 'ailes' du faisceau direct dues à une collimation imparfaite et à la diffusion par l'air au voisinage de l'échantillon. B'_{amb} est le bruit de fond ambiant. De la même manière, l'intensité diffusée par la cuve vide est :

$$I'_{\text{CV}}(? , Q) = I_0(?) S \Delta\Omega C(?) T_{\text{CV}}(?) [e_{\text{CV}} I_{\text{CV}}(? , Q) + B'(Q)] + B'_{\text{Amb}} \quad (3.3)$$

Il en résulte que la quantité I'_{Cont} , intensité diffusée par l'échantillon et définie par :

$$I'_{\text{Cont}}(? , Q) = \frac{I'_{\text{Cont+CV}}(? , Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{Cont+CV}}(?)} - \frac{I'_{\text{CV}}(? , Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{CV}}(?)} \quad (3.4)$$
$$= I_0(?) S \Delta\Omega C(?) e_{\text{Cont}} I_{\text{Cont}}(? , Q)$$

est indépendante des bruits de fond et représente la seule diffusion du contenu de la cuve, corrigée par la transmission.

Les spectres de l'eau et de la cuve vide permettent de corriger les spectres des échantillons et des variations de la réponse des divers détecteurs. En effet, aux petites valeurs de Q , l'intensité diffusée par l'eau légère

$$I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q) = \frac{I'_{\text{H}_2\text{O}+\text{CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{H}_2\text{O}+\text{CV}}(\lambda, Q)} - \frac{I'_{\text{CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{CV}}(\lambda, Q)} \quad (3.5)$$

$$= I_0(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) e_{\text{H}_2\text{O}} I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$$

est principalement d'origine incohérente et donc indépendante de Q . En général l'épaisseur de cet échantillon d'eau légère est fixée à 1 mm afin d'avoir une transmission de l'ordre de 0,5. La section efficace de l'eau légère $I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$ est mesurable, comme nous le verrons dans la suite ; Dans ces conditions, les équations (3.4) et (3.5) conduisent à la détermination de la grandeur $I_{\text{Cont}}(\lambda, Q)$ qui nous intéresse, à partir des mesures de $I'_{\text{Cont}+\text{CV}}(\lambda, Q)$, $I'(\lambda, Q)$ et $I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$

2. Traitement des spectres bruts

Les données expérimentales sont traitées selon la procédure habituelle, suggérée par les considérations précédentes et décrite par J.-P. Cotton², en utilisant le programme PASIDUR écrit par D. Lairez du Laboratoire Léon Brillouin. Pour chaque valeur de Q ce programme calcule la quantité suivante :

$$I_{\text{Prot}}(\lambda, Q) = \frac{I'_{\text{Sol}}(\lambda, Q) - I'_{\text{Tamp}}(\lambda, Q)}{I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)} \frac{1}{V} \frac{ds_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda)}{d\Omega} \Bigg|_{\text{Mes}} \quad (3.6)$$

qui représente la section efficace de diffusion par unité de volume et d'angle solide, de la protéine seule ;

$I'_{\text{Sol}}(\lambda, Q)$ et $I'_{\text{Tamp}}(\lambda, Q)$ sont donnés par l'expression (3.6) pour la solution de protéine et son tampon, respectivement. $V^{-1} ds_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda) / d\Omega \Big|_{\text{Mes}} = I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$ est la section efficace de diffusion de l'unité de volume de l'échantillon d'eau légère mesuré avec des neutrons de longueur d'onde λ .

3. Calibration absolue

Pour obtenir la valeur absolue de la section efficace de diffusion incohérente de l'échantillon d'eau légère, le détecteur est déplacé de façon à pouvoir mesurer le faisceau direct avec les mêmes détecteurs que ceux employés lors des mesures des intensités diffusées. Pour éviter la saturation de ceux-ci, le faisceau direct est préalablement atténué. Le facteur d'atténuation est obtenu en faisant le rapport de l'intensité diffusée par un matériau fortement diffusant, comme le graphite ou le Téflon, en absence et en présence de l'atténuateur, de cette manière nous avons pu estimer la section efficace de diffusion de l'échantillon d'eau légère de 1 mm d'épaisseur à 1.00 cm^{-1} à $I = 5 \text{ \AA}$ et à 1.16 cm^{-1} à $I = 8 \text{ \AA}$. Remarquons que la valeur calculée à partir des longueurs de diffusion atomiques n'est que de $0,43 \text{ cm}^{-1}$. La différence est due à la diffusion multiple et aux effets inélastiques³.

4. Bruit de fond incohérent.

Pour obtenir le spectre de diffusion cohérente d'un échantillon il est souvent nécessaire de corriger le résultat donné par l'expression (3.6) de la diffusion incohérente. Lorsqu'une protéine est mise en solution dans un tampon deutérié, un certain nombre N_H des atomes d'hydrogène qu'elle contient ne s'échangent pas contre les atomes de deutérium du milieu et donnent une contribution incohérente. Le bruit incohérent par unité de volume peut se mettre approximativement sous la forme :

$$BI = \frac{S_{inc}^H}{4p} \times N_H^{non-ex} \times moli \times N_A$$

où N_H est le nombre des hydrogènes non échangés, qui est égal à 340 pour le BPTI, et $moli$ est le nombre de moles par unité de volume, N_A le nombre d'Avogadro. A la concentration de 5 mg/ml la valeur ainsi calculée, du bruit incohérent est égale à $1.23 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$.

Mais pratiquement, même si de grandes précautions ont été prises lors de la préparation des échantillons en milieu deutéré, les échantillons restent sujets à de légères contaminations accidentelles. Ceci a pour conséquence que le bruit incohérent réel est en général supérieur au bruit théorique. Nous avons utilisé la loi de Porod afin d'effectuer une

correction correcte du bruit de fond. Systématiquement nous avons remarqué, sur la protéine native, qu'une soustraction du bruit de fond égal à deux fois et demie la valeur théorique est nécessaire pour que la loi de Porod soit satisfaite. La solution mère de protéine étant la même pour tous les échantillons, et ceux-ci étant toujours préparés dans les mêmes conditions, nous admettons que la même correction est valable pour les différentes concentrations en protéine.

Dans le cas de l'étude en pression, les mesures ont été effectuées sur le spectromètre NEAT au Hahn Meitner Institut à Berlin dans sa configuration de diffusion aux petits angles ($\lambda = 5.1 \text{ \AA}$, $0.005 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ et $\lambda = 2 \text{ \AA}$, $0.01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$) (Figure III.2)

Les mesures ont été réalisées avec la solution la plus concentrée (85 mg/ml) et le tampon introduits dans la cellule pression. Nous avons aussi mesuré l'eau légère dans une cellule « MIBEMOL » cylindrique avec deux cylindres concentriques permettant d'avoir une épaisseur d'échantillon de 1 mm.

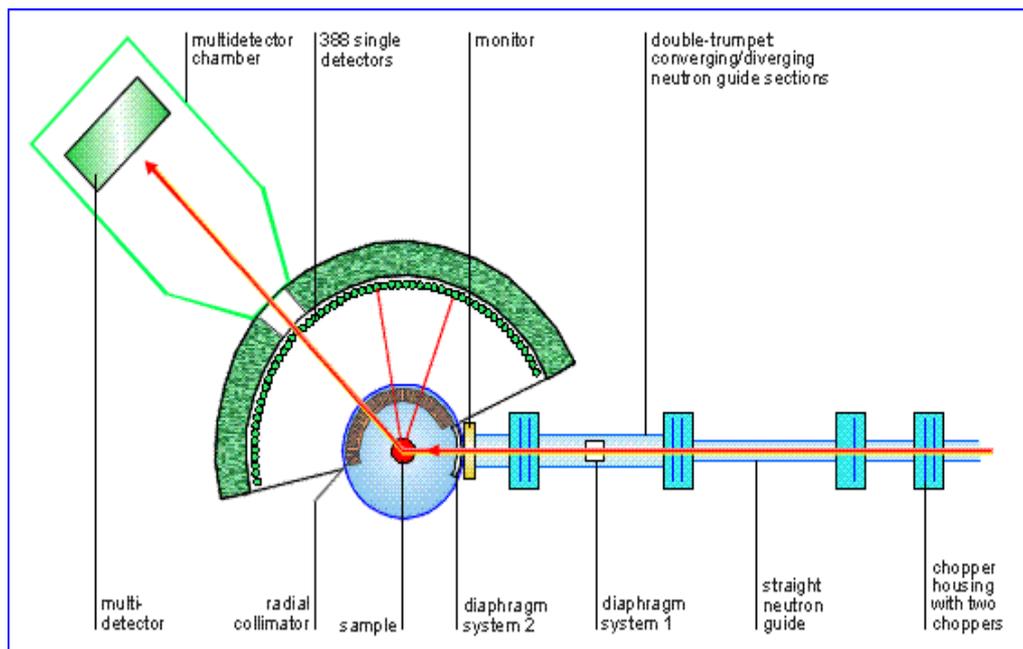


Figure III.2 : schéma du spectromètre de diffusion de neutrons NEAT (V3) du HMI à Berlin. Ce spectromètre permet de réaliser des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles et des expériences de diffusion quasiélastique et inélastique de neutrons

La cellule de pression (Figure III.3) est constituée d'un alliage Cu - Be (0.981-0.019) et peut contenir un volume total de 7.4 ml

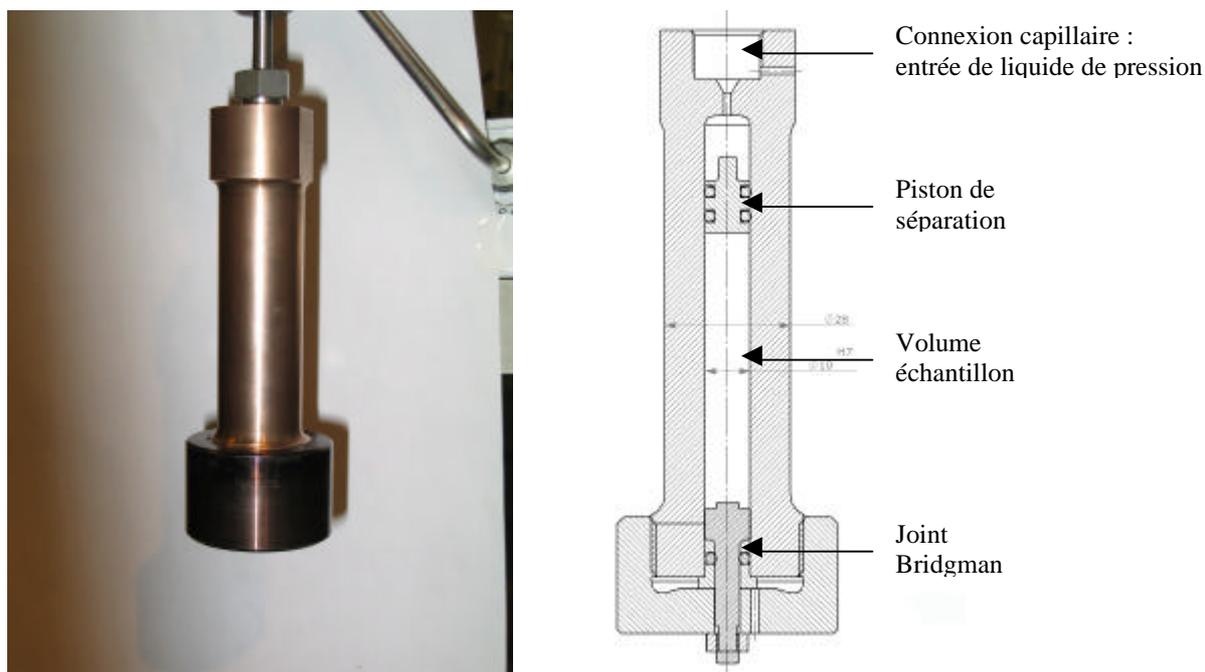


Figure III.3 : cellule pression Cu -Be. Le liquide de pression utilisé est préférentiellement de l'eau lourde. La pression maximale est de 6.2 kbar.

Les sections efficaces de diffusion de chacun des éléments constituant la cellule et de l'alliage de la cellule sont indiquées dans le tableau III.a.

Elément	σ_{coh} (barn)	σ_{inc} (barn)	σ_{abs} (barn) à $\lambda = 1.8 \text{ \AA}$
Cu	7.49	0.55	3.78
Be	7.63	$1.8 \cdot 10^{-3}$	$7.6 \cdot 10^{-3}$
Alliage	7.49	0.54	3.7

Tableau III.a : sections efficaces de diffusion pour chacun des constituants de la cellule et de l'alliage.

Un insert cylindrique de 5 mm de diamètre est préalablement introduit dans la cellule avant introduction des solutions, ceci dans le but de réduire la diffusion multiple due à l'échantillon. La figure III.4 présente la diffusion de la cellule vide et des échantillons sans aucune soustraction ni traitement des données.

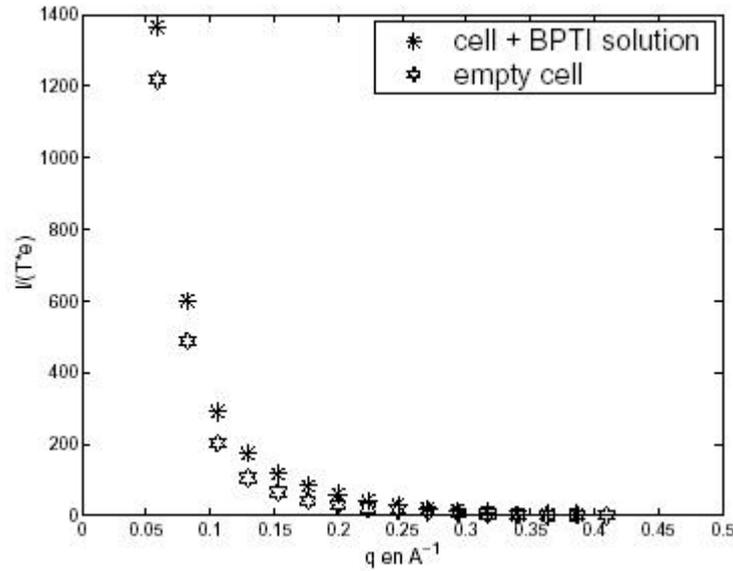


Figure III.4 : Spectres bruts de diffusion de neutrons aux petits angles pour la cellule pression vide (☆) et la solution de BPTI (*).

Le traitement des données s'effectue de la manière suivante :

$$I_{prot} = \frac{\frac{I_{solution}}{T_{solution}} - I_{CV}}{I_{H_2O}} - \alpha * \frac{\frac{I_{tampon}}{T_{tampon}} - I_{CV}}{I_{H_2O}} \quad (3.7)$$

où $I_{solution}$, I_{tampon} , I_{CV} sont les intensités diffusées respectivement par la solution de protéine, le tampon, et la cellule vide, I_{H_2O} est l'intensité de l'eau légère une fois soustraite de la cellule « MIBEMOL », $T_{solution}$ et T_{tampon} , sont les transmissions calculées respectivement pour la solution de protéine et le tampon, et α est un coefficient calculé sur la base du volume occupé par les molécules de protéine dans la solution.

D. Résultats des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles.

1. Caractérisation de l'état natif. Facteur de forme théorique.

La structure cristallographique du BPTI étant connue, il nous a été possible de calculer le facteur de forme de la protéine en considérant les atomes qui la composent et leurs positions. Pour cela nous avons utilisé le programme réalisé par Stéphane Longeville sur la base de l'expression du facteur de structure intramoléculaire selon Powles⁴ en milieu D₂O :

$$F(\vec{q}) = \frac{\sum_{j,j'} \left\langle b_j b_{j'} \frac{\sin(qr_{jj'})}{qr_{jj'}} \right\rangle}{\left(\sum_{j,j'} b_j b_{j'} \right)^2} \quad (3.8)$$

où b_j est la longueur de diffusion cohérente de l'atome j et $r_{jj'}$ est le module du vecteur $r_j - r_{j'}$.

Après avoir introduit le fichier 6PTI.PDB dans ce programme, nous avons extrait le facteur de forme du BPTI en tenant compte de l'hydratation par l'eau lourde. Les résultats de cette simulation sont représentés sur les figures III.5 à III.8 : la figure III.5 représente l'intensité diffusée normalisée à l'intensité lorsque q tend vers 0 en fonction du vecteur d'onde q . Cela a permis de définir le domaine de 0 à 0.4 \AA^{-1} dans lequel nous avons réalisé l'étude de la structure du BPTI.

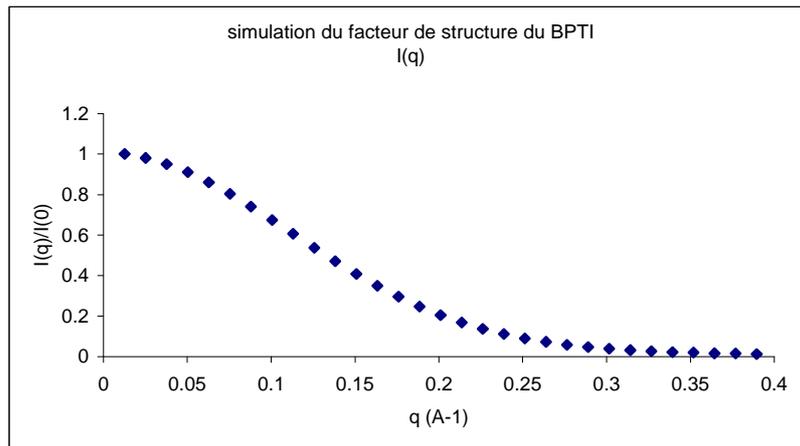


Figure III.5 : Intensité simulée normalisée en fonction du vecteur d'onde. La simulation est faite à partir de la structure cristallographique du BPTI (6PTI.pdb) en milieu D_2O .

A partir de cette représentation, il est possible, en traçant la représentation de Guinier : le logarithme de l'intensité en fonction de q^2 (figure III.6), d'extraire un rayon de giration de la protéine. Celui ci est de $R_g = 10,8 \text{ \AA}$, ce qui correspond à ce qui est indiqué dans la littérature⁵.

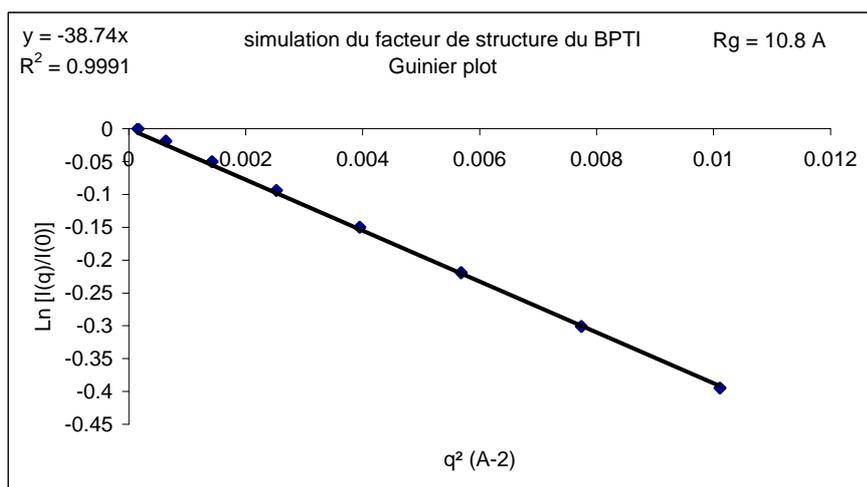


Figure III.6 : Logarithme de l'intensité simulée normalisée, en fonction du carré de vecteur d'onde. La simulation est faite à partir de la structure cristallographique du BPTI (6PTI.pdb).

Dans la représentation de Kratky : le carré du vecteur d'onde q^2 multiplié par l'intensité est porté en fonction de q (figure III.7), la forme de la courbe peut nous renseigner sur la forme globale de la protéine.

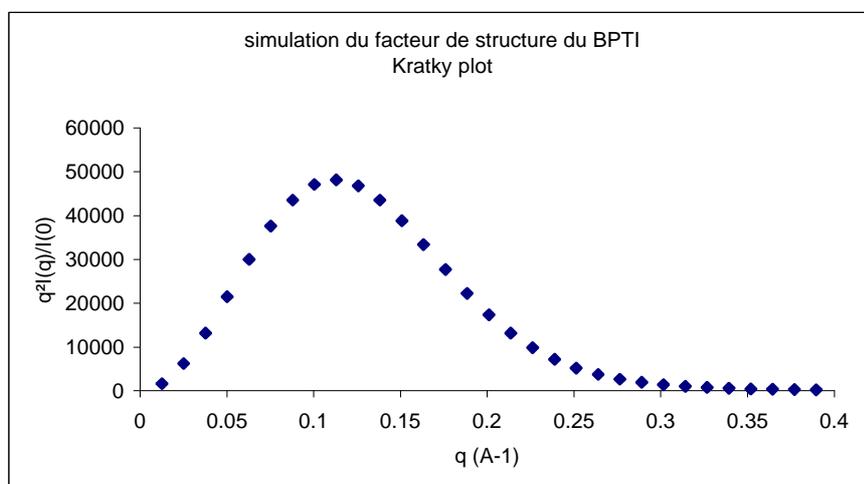


Figure III.7 : Représentation de Kratky : carré du vecteur d'onde multiplié par l'intensité, simulée, normalisée en fonction du vecteur d'onde. La simulation est faite à partir de la structure cristallographique du BPTI (6PTI.pdb).

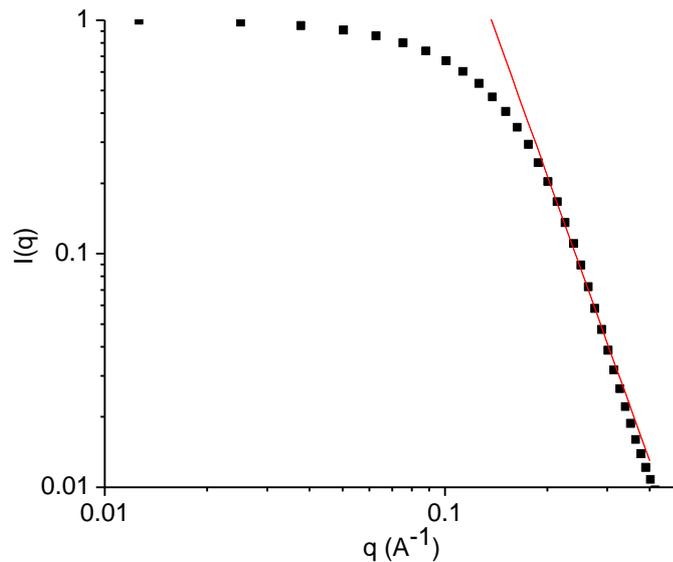


Figure III.8 : Représentation logarithmique de l'intensité simulée, normalisée, en fonction du vecteur d'onde. La simulation est faite à partir de la structure cristallographique du BPTI (6PTI.pdb). L'ajustement (en rouge) pour les valeurs de q supérieures à 0.1 \AA^{-1} est réalisé avec une fonction puissance.

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.8, la courbe a un profil correspondant à ce que l'on trouve pour les molécules globulaires compactes à savoir une décroissance en q^{-4} de $\text{Log}(I(q))$ en fonction de $\text{Log}(q)$ pour les grandes valeurs du vecteur d'onde ($q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$).

2. Caractérisation de l'état natif. Etude par diffusion de neutrons aux petits angles.

Afin de confronter théorie et expérience, nous avons réalisé des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles sur une solution de BPTI à 85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM dans D_2O avec 100 mM de sulfate d'ammonium. Les mesures ont été effectuées sur le spectromètre PACE du LLB à Saclay, ($\lambda = 6 \text{ \AA}$, distance échantillon - détecteur = 4.5 m pour $q_{\text{max}} = 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ et distance échantillon - détecteur = 0.9 m pour $q_{\text{max}} = 0.4 \text{ \AA}^{-1}$). Le spectre de l'intensité corrigée et normalisée selon l'équation (3.6) en fonction de q est représenté sur la figure III.9.

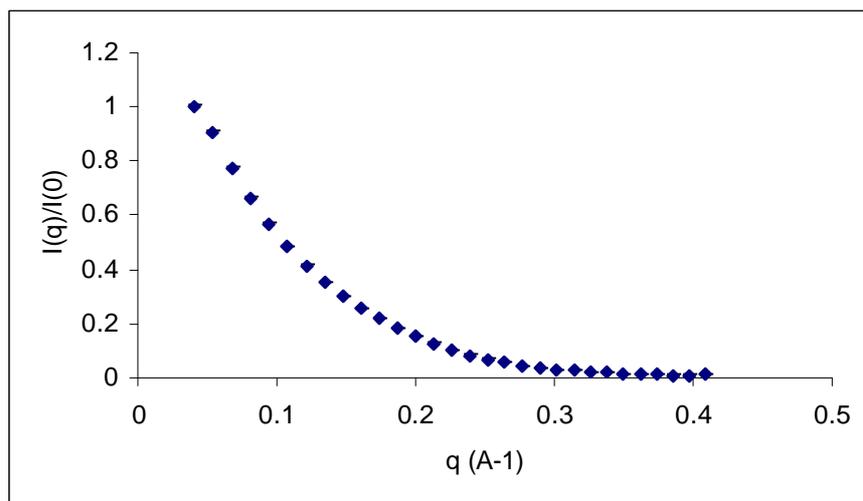


Figure III.9 : Intensité diffusée, corrigée et normalisée en fonction du vecteur d'onde pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon CD3COOD 50 mM dans D₂O avec (ND₄)₂SO₄ 100 mM (PACE, LLB).

Afin d'extraire le rayon de giration de la protéine, il nous faut nous placer dans le domaine de Guinier, tel que $qR_g < 1$. Nous représentons le logarithme de l'intensité en fonction du carré de vecteur d'onde (figure III.10).

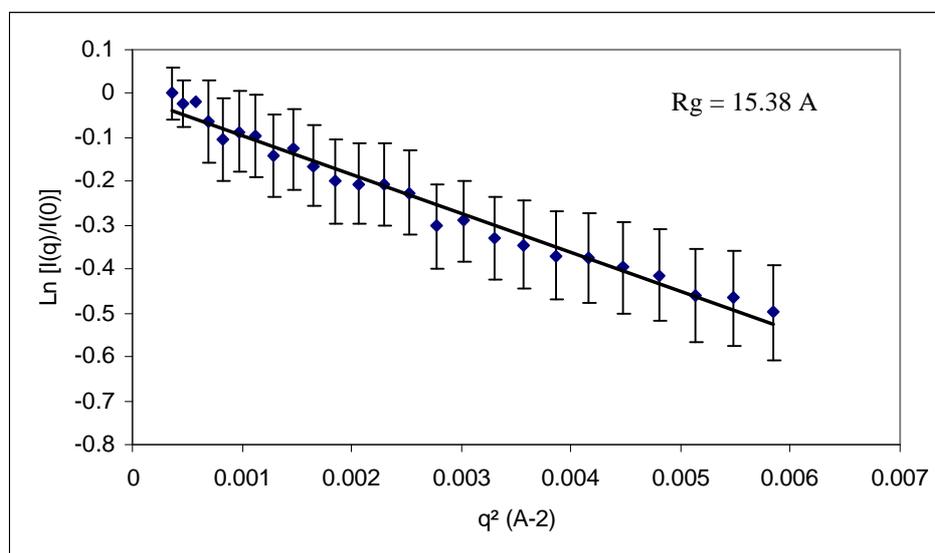


Figure III.10 : Logarithme de l'intensité diffusée, normalisée par l'intensité à la plus petite valeur de q , en fonction du carré de vecteur d'onde pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon CD₃COOD 50 mM en D₂O avec (ND₄)₂SO₄ 100 mM. (PACE, LLB)

Les points expérimentaux sont ajustés par une droite (figure III.9) dont la pente nous permet d'obtenir le rayon de giration :

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{q^2 R_G^2}{3} \quad (3.9)$$

Nous obtenons une valeur de rayon de giration $R_g = 15.4 \text{ \AA}$ plus importante que la valeur théorique $R_g = 10.8 \text{ \AA}$. Ceci est dû aux effets de concentration de la solution. Pour obtenir une valeur du rayon de giration de la molécule de BPTI, il faut procéder à des mesures des intensités en fonction de la concentration afin de pouvoir extrapoler le rayon de giration à concentration nulle.

A partir de la représentation de Kratky, $q^2 I(q)/I(0) = f(q)$, nous avons accès à la forme globale de la protéine (figure III.11).

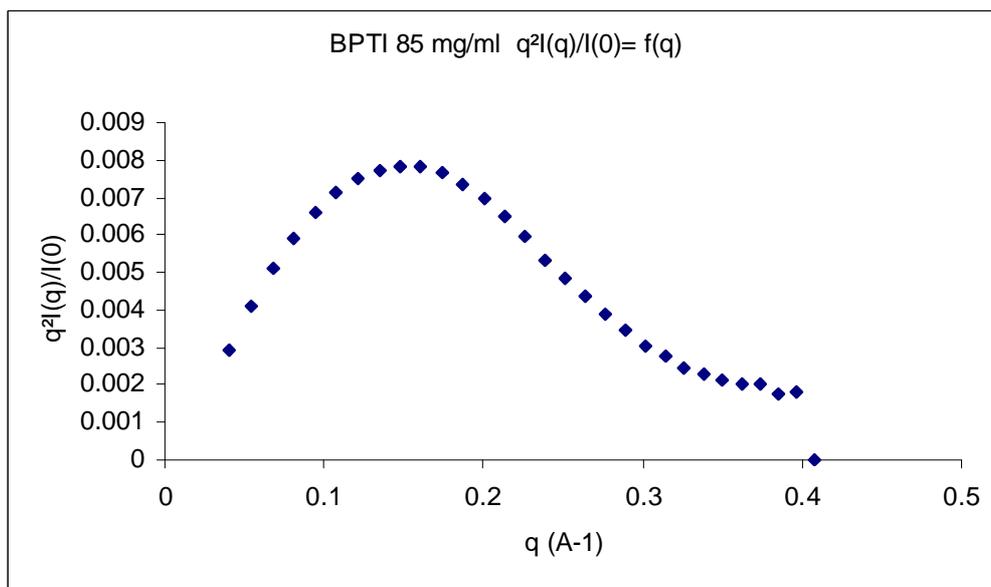


Figure III.11 : Evolution de $q^2 I(q)$ en fonction de q pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon CD3COOD 50 mM en D_2O avec $(ND_4)_2SO_4$ 100 mM. (PACE, LLB)
Représentation de Kratky.

L'évolution de la courbe $q^2 I(q)/I(0)$ en fonction de q (figure III.11) est caractéristique d'une forme globulaire compacte.

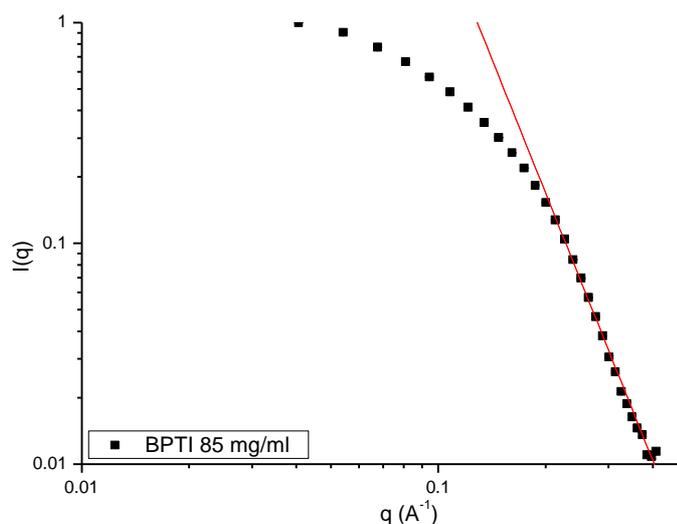


Figure III.12 : Représentation logarithmique de l'intensité diffusée, normalisée, en fonction du vecteur d'onde. pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon CD₃COOD 50 mM en D₂O avec (ND₄)₂SO₄ 100 mM. (PACE, LLB). L'ajustement (en rouge) pour les valeurs de q supérieures à 0.1 Å⁻¹ est réalisé avec une fonction puissance.

La figure III.12 représente le logarithme de l'intensité diffusée et normalisée pour une solution de BPTI concentrée. La courbe a un profil identique à celui issu de la simulation (figure III .8) et présente une décroissance en q^{-4} pour les grandes valeurs du vecteur d'onde ($q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$). Ce qui correspond à ce que l'on trouve pour les molécules globulaires compactes. D'autre part, nous pouvons constater l'absence d'oscillations caractéristiques d'interactions intermoléculaires, ce qui nous permet de dire que la solution est monodisperse.

3. Influence de la température sur le rayon de giration et les interactions

Nous avons effectué des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles afin de caractériser le BPTI en solution dans l'état natif et dans les conformations obtenues sous l'effet de la température. Il sera notamment question de comparer les rayons de giration extrapolés à concentration nulle pour chaque température et de rendre compte de l'effet de la température sur les interactions intermoléculaires.

a) A température ambiante : caractérisation de l'état natif du BPTI en solution

Nous avons réalisé une première série d'expériences de diffusion de neutrons aux petits angles afin de caractériser le BPTI en solution dans l'état natif. L'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde et de la concentration en BPTI est représenté sur la figure III.12. Un ajustement est effectué en appliquant l'approximation de Guinier :

$$I(q, c) = I(q = 0, c) * \exp\left(-\frac{q^2 * R_g^2}{3}\right) \quad qR_g \leq 1 \quad (3.10)$$

où $I(q=0,c)$ est l'intensité diffusée vers l'avant et R_g est le rayon de giration de la protéine.

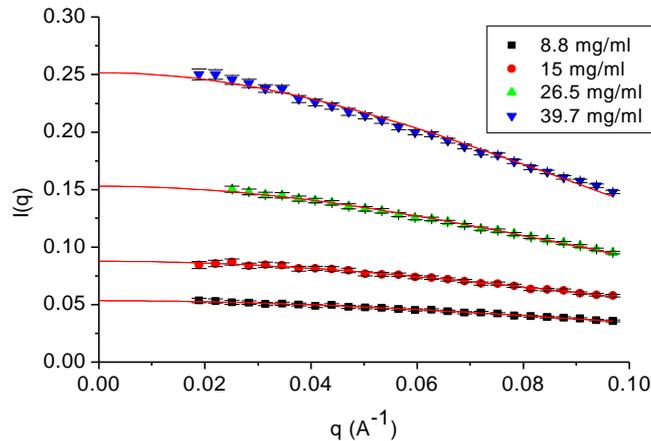


Figure III.12 : Intensité en fonction du vecteur d'onde pour une solution de BPTI à 22 °C. Ajustement par l'approximation de Guinier (3.10).

Nous pouvons remarquer que si l'ajustement par l'approximation de Guinier est très satisfaisant pour les plus basses concentrations ce n'est pas le cas à partir d'une concentration en BPTI de l'ordre de 40 mg/ml. Le rayon de giration obtenu à 40 mg/ml est un rayon moyen sur un ensemble de molécules proches les une des autres. Pour pouvoir être fixé sur la valeur correcte du R_g , et afin d'observer la dépendance du rayon de giration avec la concentration en protéine, nous avons tracé $1/R_g^2$ en fonction de c (figure III.13). Il nous est d'ailleurs possible d'extraire le coefficient B_2 à partir de la relation :

$$\frac{1}{Rg^2(c)} = \frac{1}{Rg^2(0)} (1 + 2B_2Mc + \dots) \quad (3.11)$$

où B_2 rend compte de la dépendance du rayon de giration par rapport à la concentration.

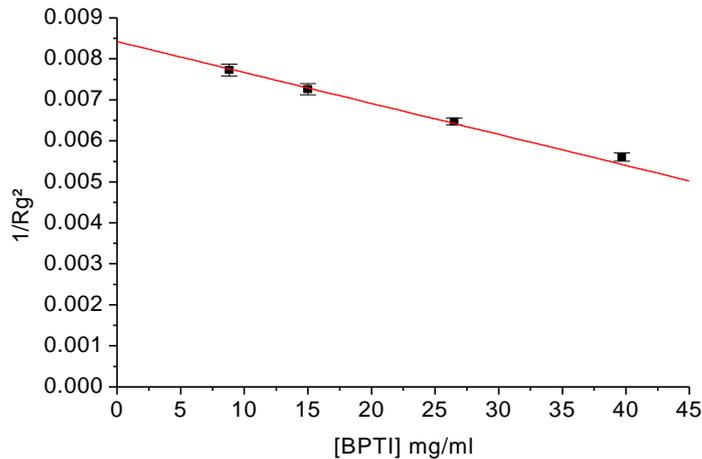


Figure III.13 : Inverse du carré du rayon de giration en fonction de la concentration en protéine pour une solution de BPTI à 22 °C.. Ajustement par la relation (3.11).

La figure III.13 nous montre que, lorsque l'on extrapole à concentration nulle, le rayon de giration est de $10.9 \pm 0.05 \text{ \AA}$. Cette valeur est quasiment identique à celle trouvée à partir de la simulation du facteur de forme et correspond aussi aux valeurs trouvées dans la littérature.

En ce qui concerne le coefficient B_2 , nous trouvons une valeur de :

$$B_2 = - 6.78 \pm 0.22 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$$

Comme nous pouvons le constater, B_2 a une valeur négative mais faible en valeur absolue, montrant que le rayon de giration n'est que peu affecté par la concentration jusqu'à 26.5 mg/ml.

Dans le but d'observer les interactions intermoléculaires, nous avons tracé $c/I(0)$ en fonction de c (figure III.14) où c est la concentration en protéine. Il nous est alors possible d'extraire le second coefficient du viriel A_2 à partir de la relation :

$$\frac{c}{I(0)} = \frac{N_A}{M \cdot K^2} (1 + 2 A_2 M c + \dots) \quad (3.12)$$

où N_A est le nombre d'Avogadro, M est la masse moléculaire de la protéine, et A_2 est le second coefficient du viriel qui rend compte des interactions intermoléculaires.

Si $A_2 > 0$, les interactions sont répulsives. Si $A_2 < 0$, les interactions sont attractives.

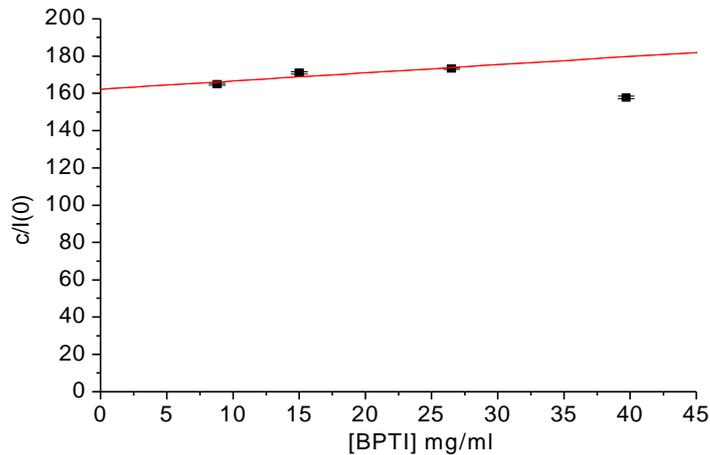


Figure III.14 : Inverse de l'intensité diffusée vers l'avant en fonction de la concentration en protéine pour une solution de BPTI à 22 °C. Ajustement par la relation (3.12).

Comme nous pouvons le constater sur la figure III.14, sur la base des trois concentrations les plus basses, le second coefficient du viriel est positif et sa valeur est très faible :

$$A_2 = 2.04 \pm 0.88 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2},$$

montrant qu'il y a très peu d'interactions et qu'elles sont de nature attractive.

En ce qui concerne la plus haute concentration utilisée lors de cette expérience, nous constatons que la valeur de $c/I(0)$ est inférieure à celles obtenues pour les autres concentrations. A la concentration de 39.7 mg/ml, des interactions attractives apparaissent, les molécules de BPTI sont plus proches les unes des autres, ce qui conduit à l'augmentation de la valeur du rayon de giration apparent.

Il est possible de faire une comparaison entre théorie et expérience en ce qui concerne le second coefficient du viriel. En effet, J. Des Cloiseaux et G. Jannink⁶ ont établi que pour

des macromolécules non chargées en solution et ayant un comportement de volume exclu, la relation entre A_2 et R_g est la suivante :

$$A_2 = 4\pi^{\frac{3}{2}}\psi N_A \frac{R_g^3(0)}{M^2} \quad (3.13)$$

où ψ est une constante universelle dépendant de la forme ou de la conformation de la molécule. Dans le cas des sphères dures (Yvon, 1966⁷ ; Douglas, 1985⁸):

$$\psi = \frac{4}{3\pi^{\frac{1}{2}}} \left(\frac{5}{3}\right)^{\frac{3}{2}} \cong 1.6186 \quad (3.14)$$

Si l'on considère le rayon de giration obtenu par la simulation du facteur de forme à partir de la structure cristallographique (6PTI.pdb), dont la valeur est de 10.8 Å, en appliquant la relation (3.13) on obtient une valeur de second coefficient du viriel de :

$$A_{2,theorique} = 6.255 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$$

Nous retrouvons une valeur de A_2 du même ordre de grandeur que celle obtenue expérimentalement. Le modèle utilisé ici pour calculer le second coefficient du viriel permet de préciser que dans le cas de nos expériences, les interactions coulombiennes répulsives, dues à la charge positive du BPTI (+ 4), sont écrantées par les contre ions présents dans le solvant, ce qui confirme le comportement de volume exclu. Ceci montre que les conditions expérimentales choisies, à savoir 50 mM de tampon acide acétique deutéré dans D_2O , pD 4.5, avec 100 mM de $(ND_4)_2SO_4$ permettent d'éviter des phénomènes d'interactions électrostatiques importantes dans une gamme de concentrations allant de 8.8 à 26.5 mg/ml.

b) Evolution du rayon de giration et des interactions en fonction de la température.

Après avoir caractérisé le BPTI en solution à l'état natif, nous avons procédé, pour les mêmes concentrations, à une étude en température par diffusion de neutrons aux petits angles sur le spectromètre PACE au LLB. Le but est d'observer une éventuelle modification du rayon de giration et d'étudier les interactions lorsque l'on porte une solution de BPTI à des températures comprises entre 22 °C et 85°C.

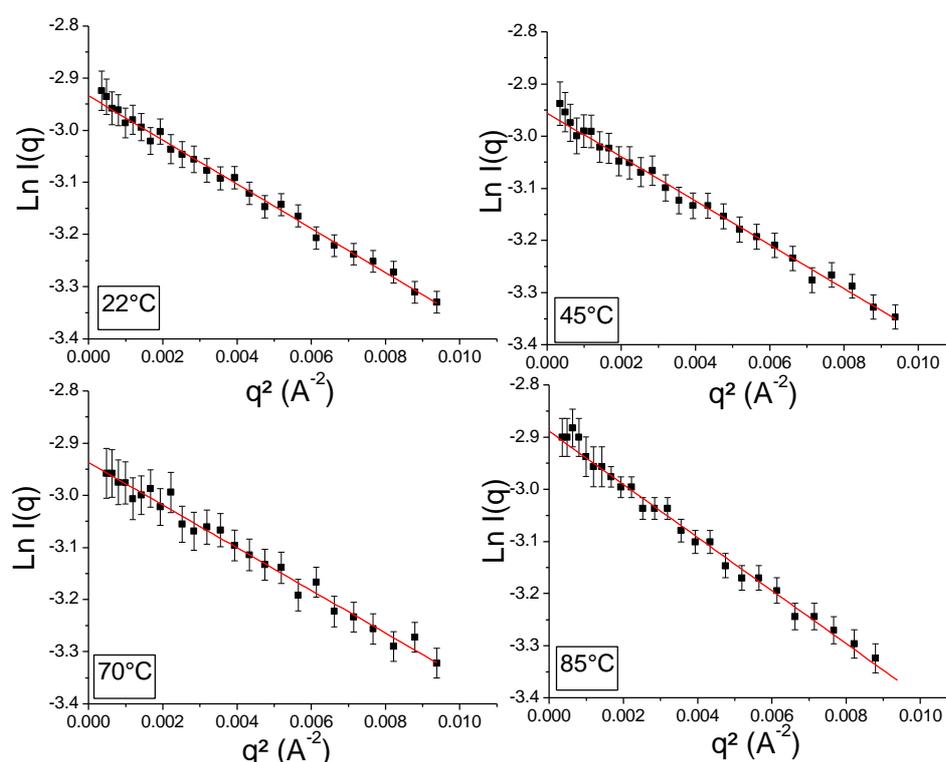


Figure III.15 : logarithme de l'intensité diffusée, corrigée et normalisée pour une solution de BPTI à 8.8 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM dans D₂O avec 100 mM de (ND₄)₂SO₄, pD 4.5, à différentes températures comprises entre 22 et 85°C. Ajustement par la relation (3.9) (chapitre III.D.3.a).

Sur la figure III.15 l'évolution de Ln I en fonction de q² (représentation de Guinier) est représentée. Le rayon de giration du BPTI ne présente pas de variation pour des températures comprises entre 22 °C et 70 °C et se maintient autour de 11,3 Å (tableau III.b). Lorsque l'échantillon est porté à une température de 85 °C, la valeur du rayon de giration augmente jusqu'à 12,3 Å. Ceci peut s'expliquer par une modification de la structure du BPTI et plus

précisément par un dépliement partiel de la protéine. Nous avons remarqué que, lorsque nous ramenons les échantillons à température ambiante après chaque montée en température, la protéine retrouve le rayon de giration de 11.3 Å. Ceci montre que l'influence de la température sur la structure globale du BPTI est réversible dans cette gamme de température.

Lorsque q tend vers 0 l'intensité ne varie pas entre 22 °C et 85 °C, montrant que l'augmentation du rayon de giration n'est pas le résultat d'une association de protéines.

Température	Rayon de giration
22°C	11.27 ± 0.23
45°C	11.24 ± 0.26
70°C	11.08 ± 0.33
85°C	12.35 ± 0.26

Tableau III.b: Rayon de giration du BPTI à 8.8 mg/ml en fonction de la température.

La figure III.16 représente l'inverse du carré du rayon de giration en fonction de la concentration en protéine.

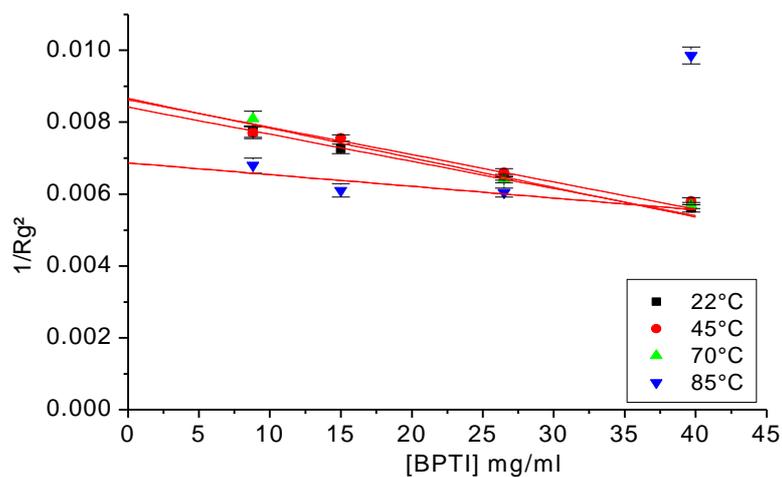


Figure III.16 : expérience de diffusion de neutrons aux petits angles pour des solutions de BPTI à différentes températures. Inverse du rayon de giration en fonction de la concentration en protéine. Ajustement par la relation (3.11) (chapitre III.D.3.a).

Température(°C)	Rg(0) (Å)	err Rg(0)	B ₂ (cm ³ .mol.g ⁻²)	err B ₂
22	10.89	0.06	-6.78E-04	2.24E-05
45	10.77	0.11	-6.68E-04	4.45E-05
70	10.75	0.19	-7.21E-04	6.30E-05
85	12.06	0.43	-3.60E-04	2.26E-05

Tableau III.c : récapitulatif des paramètres d'ajustement des points expérimentaux de la figure III.16.

La figure III.16 et le tableau III.c confirment que le rayon de giration du BPTI, à concentration nulle, est indépendant de la température entre 22 et 70 °C, étant donné les valeurs similaires de B₂ pour cette gamme de température; sa valeur est quasiment constante et voisine de 10.8 Å.

A 85,5 °C, le rayon de giration du BPTI extrapolé à concentration nulle augmente pour atteindre la valeur de 12 Å (tableau III.c) et sa dépendance en fonction de la concentration en protéine est très différente de celle observée pour les températures plus basses (figure III.16).

La question que nous nous posons alors est la suivante : quelle est l'influence de la température sur les interactions intermoléculaires ?

Pour cela nous avons tracé l'inverse de l'intensité diffusée vers l'avant I(0) divisée par la concentration en fonction de la concentration en protéine (figure III.17). En ajustant les points expérimentaux par la relation (3.12) (chapitre III.D.3.a) nous obtenons le second coefficient du viriel A₂. Nous constatons que celui-ci se maintient à une valeur de l'ordre de 10⁻⁴ entre 22 °C et 70 °C tandis qu'à 85.5 °C, sa valeur augmente d'un facteur 10 montrant ainsi que la température a un effet notable sur les interactions intermoléculaires à 85.5 °C.

Une remarque est à faire dans le cas de la figure III.17. Les ajustements ont été reportés dans le cas des trois concentrations les plus basses (8.8, 15 et 26.5 mg/ml) pour lesquelles les interactions sont répulsives (pente positive). Si la concentration en protéine excède 25 mg/ml la pente devient négative et par conséquent les interactions deviennent légèrement plus attractives.

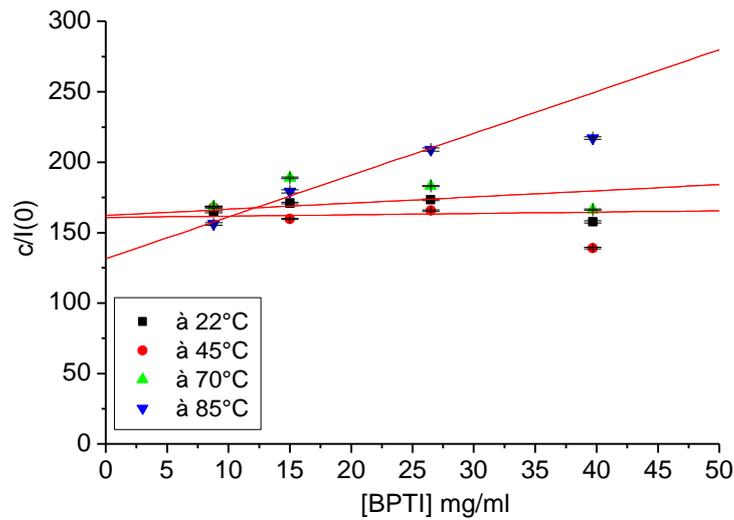


Figure III.17 : Inverse de l'intensité diffusée vers l'avant en fonction de la concentration en protéine pour des solutions de BPTI à différentes températures. Ajustement par la relation (3.12) (chapitre III.D.3.a).

Température	Contraste K (cm)	Coefficient du viriel A_2 ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$)
22°C	$2.89 \cdot 10^{10} \pm 2.95 \cdot 10^8$	$2.039 \cdot 10^{-4} \pm 8.792 \cdot 10^{-5}$
45°C	$2.86 \cdot 10^{10} \pm 7.28 \cdot 10^8$	$4.487 \cdot 10^{-4} \pm 2.798 \cdot 10^{-5}$
70°C	$2.56 \cdot 10^{10} \pm 1.38 \cdot 10^9$	$2.792 \cdot 10^{-4} \pm 4.301 \cdot 10^{-5}$
85°C	$3.17 \cdot 10^{10} \pm 4.02 \cdot 10^8$	$1.706 \cdot 10^{-3} \pm 2.132 \cdot 10^{-4}$

Tableau III.d : Contraste et coefficient du second viriel du BPTI en solution, extrapolés à $I(q=0)$ en fonction de la température.

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles, en fonction de la température, ont été complétées par des mesures à 95°C sur le spectromètre PAXE au LLB à Saclay. Les points expérimentaux ont pu être ajustés avec une meilleure précision par l'approximation de Guinier (Figure III.18). Les résultats, répertoriés dans le tableau III.e, font état d'une augmentation du rayon de giration de la protéine, extrapolé à concentration nulle (figure III.19) : nous trouvons une valeur de 13.3 Å.

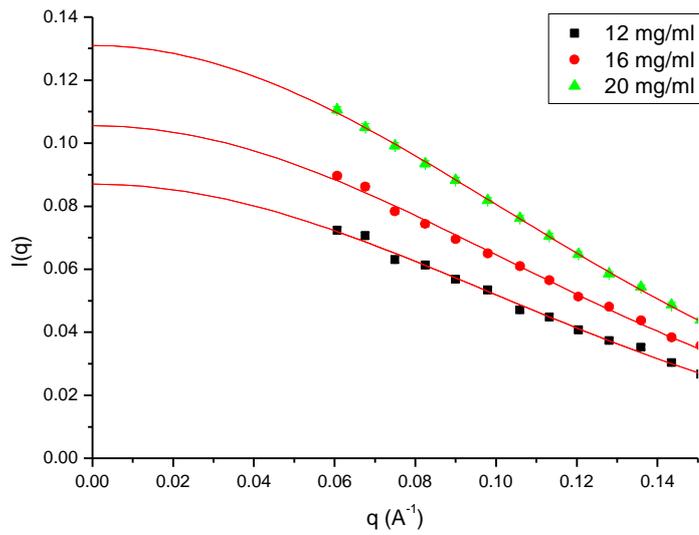


Figure III.18 : Intensité en fonction du vecteur d'onde pour une solution de BPTI à 95°C.
Ajustement par l'approximation de Guinier.

[BPTI] mg/ml	Intensité $I(0)$	Rayon de giration (Å)
12	0.0874 ± 0.001	12.63022 ± 0.21138
16	0.1053 ± 0.001	12.23344 ± 0.19564
20	0.1313 ± 0.002	12.15799 ± 0.06025

Tableau III.e : récapitulatif des paramètres d'ajustement des points expérimentaux de la figure III.18.

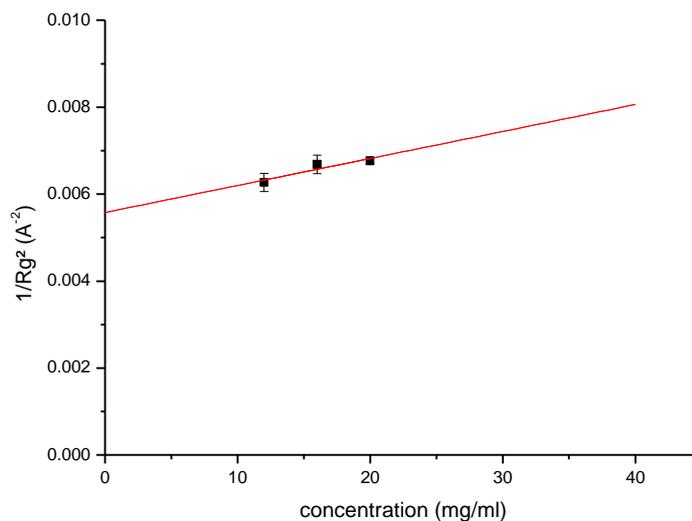


Figure III.19 : Inverse du rayon de giration en fonction de la concentration en protéine pour le BPTI en solution à 95°C. Ajustement par la relation (3.11) (chapitre III.D.3.a)

Température	Rg(0)(Å)	Coefficient du viriel B ₂ (cm ³ .mol.g ⁻²)
95°C	13.28 ± 0.38	8.5413 ⁻⁴ ± 3.8638*10 ⁻⁴

Tableau III.f : récapitulatif des paramètres d'ajustement des points expérimentaux de la figure III.19.

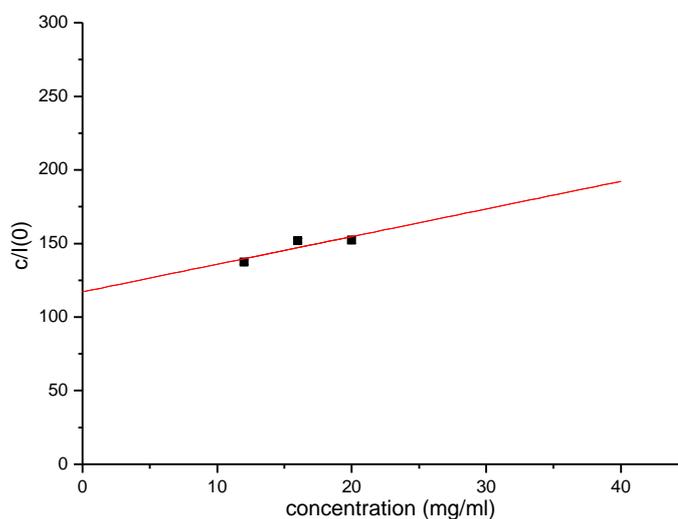


Figure III.20 : Inverse de l'intensité diffusée vers l'avant en fonction de la concentration en protéine pour le BPTI en solution à 95°C. Ajustement par la relation (3.12) (chapitre III.D.3.a).

Température	Contraste K (cm)	Coefficient du viriel A_2 (cm ³ .mol.g ⁻²)
95°C	$3.05 \cdot 10^{10} \pm 4.10 \cdot 10^8$	$1.231 \cdot 10^{-3} \pm 8.4907 \cdot 10^{-4}$

Tableau III.g : Contraste et coefficient du second viriel du BPTI en solution, extrapolés à $I(q=0)$ à 95°C.

L'inverse de l'intensité diffusée vers l'avant en fonction de la concentration en protéine lorsque les échantillons sont portés à une température de 95°C est présentée dans la figure III.20. L'ajustement par la relation (3.12) ne montre pas de variation importante du contraste par rapport aux plus basses températures. Le second coefficient du viriel A_2 permettant d'observer les interactions intermoléculaires, montre une influence de la température : les interactions répulsives sont accentuées par rapport à celles observées aux températures inférieures à 95°C.

Nous avons tenté d'extraire une valeur d'expansion thermique α_T telle qu'elle est définie par Heremans et Smeller⁹ en traçant l'évolution du volume spécifique de la protéine en fonction de la température. α_p est définie par :

$$\mathbf{a}_p = \frac{1}{V_p} \left(\frac{\partial V_p}{\partial T} \right)_p$$

où V_p est le volume spécifique de la protéine.

Le volume spécifique du BPTI à chaque température a été calculé à partir du contraste selon la relation (1.35).

La figure III.21 représente l'évolution du volume spécifique du BPTI en fonction de la température.

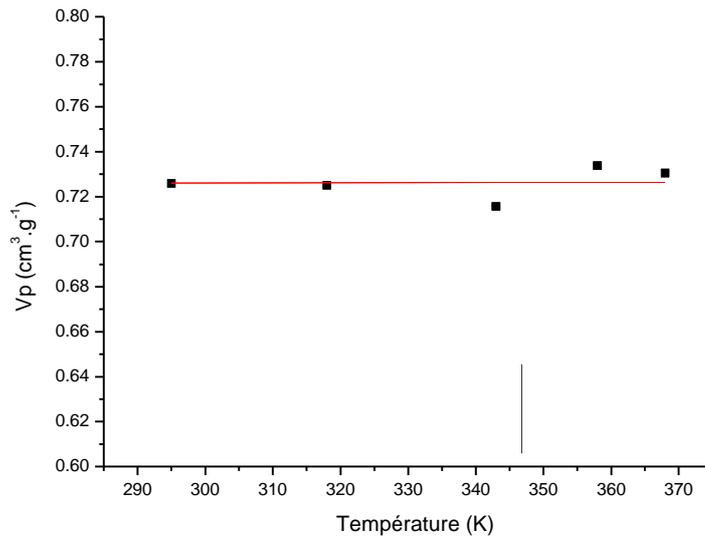


Figure III.21 : Evolution du volume spécifique du BPTI en fonction de la température.

L'ajustement des points expérimentaux est réalisé par une droite dont la pente nous a permis d'extraire une valeur de $\alpha_T = 90 \cdot 10^{-6} / \text{K}$, en accord avec les valeurs répertoriées par Heremans et Smeller en 1998⁹. En général, ces valeurs varient entre $40 \cdot 10^{-6}$ et $110 \cdot 10^{-6} / \text{K}$ pour les protéines.

Nous n'avons pas eu la possibilité de mesurer la solution une fois refroidie à température ambiante par manque de temps.

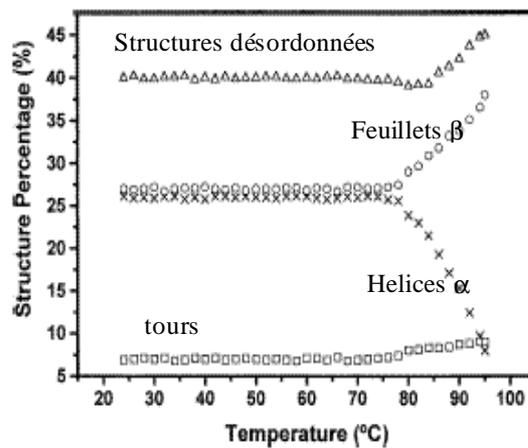
L'augmentation de la valeur du rayon de giration du BPTI à haute température peut s'expliquer par une modification au sein des structures secondaires de la protéine. En effet des expériences par spectroscopie Raman par Carmona et al¹⁹ ont montré une diminution évidente de la proportion d'hélices α . Nous montrons ainsi le dépliement de ces structures en hélices et l'acquisition de certains degrés de liberté pour certaines parties de structures désordonnées, permettant une augmentation du rayon de giration du BPTI à 95°C. De plus Carmona et al montrent un phénomène de β agrégation lorsque la protéine est soumise à une température supérieure à 80 °C : d'autres parties des structures désordonnées, proches des feuillets β préexistants, sont modifiées pour former des feuillets β .

Ce phénomène a déjà été observé pour l'amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer.

Dans le cas du BPTI, ce phénomène intervient lorsque l'inhibiteur est soumis à une forte température¹⁹, comme nous le rappellerons dans le paragraphe suivant, ou à une forte pression¹⁰.

Le paragraphe suivant présente des résultats de spectroscopie Raman⁹ issus de la littérature et permettant de confirmer ce phénomène de β - agrégation. Nous avons aussi réalisé des expériences en infrarouge afin de vérifier ce phénomène sur un échantillon préalablement chauffé.

La figure III.22 présente les résultats d'une expérience par spectroscopie Raman par Carmona et al⁹. Il s'agit de l'évolution de la proportion de structures secondaires en fonction de la température entre la température ambiante et 95°C.



Pourcentage des structures secondaires du BPTI en fonction de la température : Δ : désordonnées, \circ : feuillets β , \times hélices α , \square coudes.

Figure III.22 : Evolution de la proportion des principales structures secondaires du BPTI en fonction de la température. Expérience réalisée par spectroscopie Raman⁹.

Nous pouvons constater qu'à partir d'une température d'environ 80 °C, il y a une augmentation de la proportion de feuillets β , au détriment de celle des hélices α .

Lorsque l'échantillon étudié est refroidi à température ambiante, il reste un excès de feuillets β tandis que les hélices α sont partiellement repliées.

Ce phénomène a été confirmé par spectroscopie infrarouge sur des échantillons de BPTI en solution : l'un à température ambiante et l'autre chauffé à 95 °C, puis refroidi à 22°C. Les expériences ont été réalisées au département de biologie Joliot-Curie du C.E.A. de Saclay avec l'aide de Bruno Robert. Les résultats sont portés sur la figure III.23.

Nous observons une augmentation du signal caractéristique des feuilletts β au détriment de celui des structures désordonnées, mais nous constatons aussi que le signal concernant les hélices α reste quasiment inchangé entre les deux échantillons. Ceci est probablement dû à un repliement de ces structures secondaires lors du refroidissement de l'échantillon.

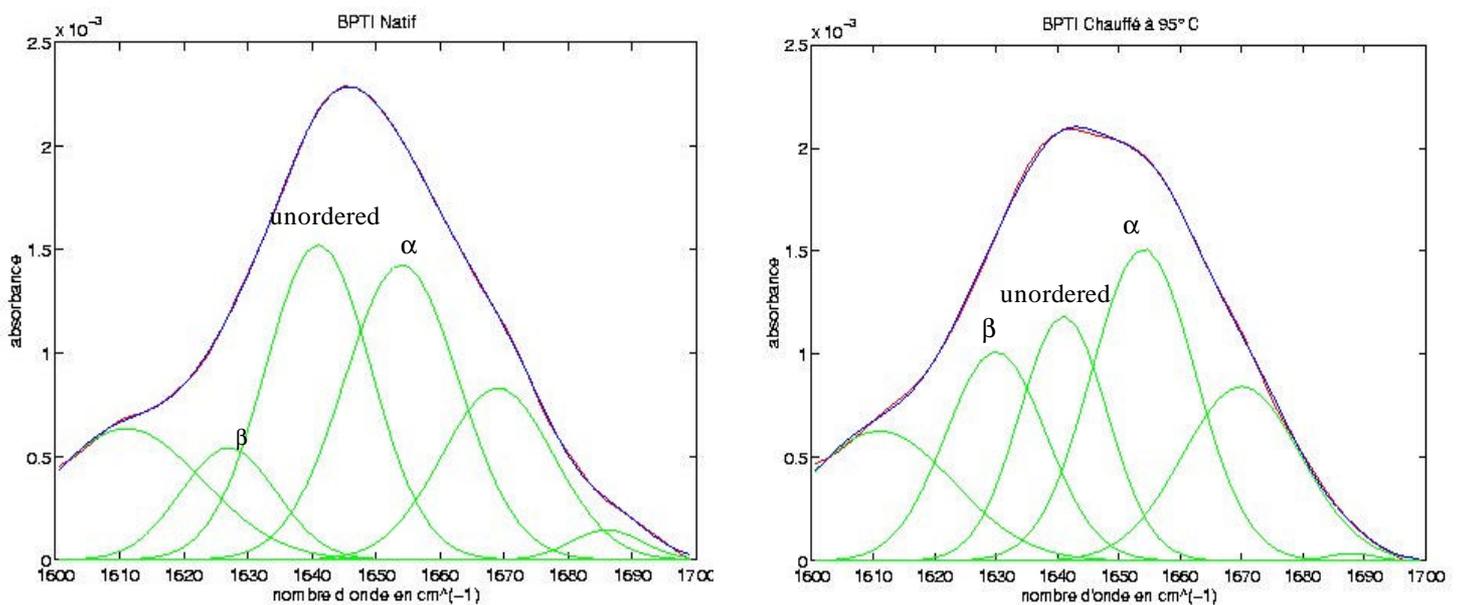


Figure III.23 : spectre infrarouge à transformée de Fourier, décomposé pour une solution de BPTI (85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM dans D₂O et 100 mM (ND₄)₂SO₄). A gauche : à l'état natif et à température ambiante, à droite : chauffé à 95 °C puis refroidi à température ambiante¹¹.

c) Evolution de la forme de la protéine en fonction de la température.

La protéine conserve-t-elle sa forme globulaire lorsqu'elle est soumise à de hautes températures ?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles jusqu'à des valeurs de q voisines de 0.4 \AA^{-1} . Dans une

représentation de Kratky (chapitre I.B.7.c) des données ($q^2I(q)$ en fonction de q), nous avons procédé à des ajustements par différents modèles.

Dans le cas du BPTI dans l'état natif, le meilleur ajustement des points expérimentaux a été réalisé avec un modèle d'ellipsoïde selon la relation :

$$q^2I(q) / I_0 = q^2 * \int_0^p d\mathbf{q} \int_0^{2p} d\mathbf{j} \left[\frac{3(\sin q' - q' \cos q')}{q'^3} \right]^2 \quad (3.15)$$

Avec

$$q' = q \sqrt{(a * \sin \mathbf{q} \cos \mathbf{j})^2 + (b * \sin \mathbf{q} \sin \mathbf{j})^2 + (c * \cos \mathbf{q})^2}$$

où θ et φ sont les angles d'orientation de l'ellipsoïde dans un repère sphérique (r , θ , φ), et a , b et c sont les axes de l'ellipsoïde décrits dans la figure III.24.

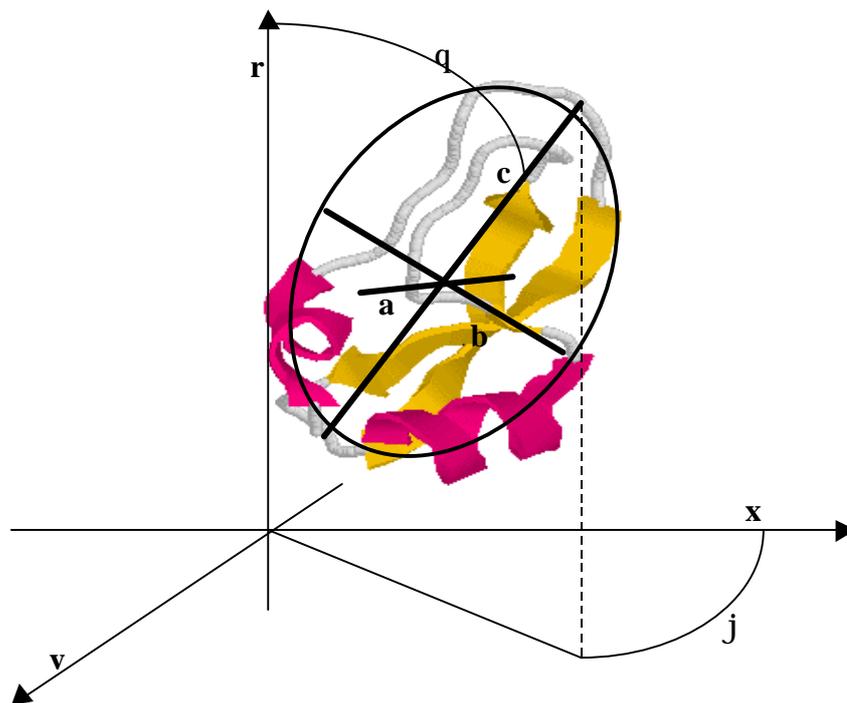


Figure III.24 : schéma de l'ellipsoïde appliqué au BPTI

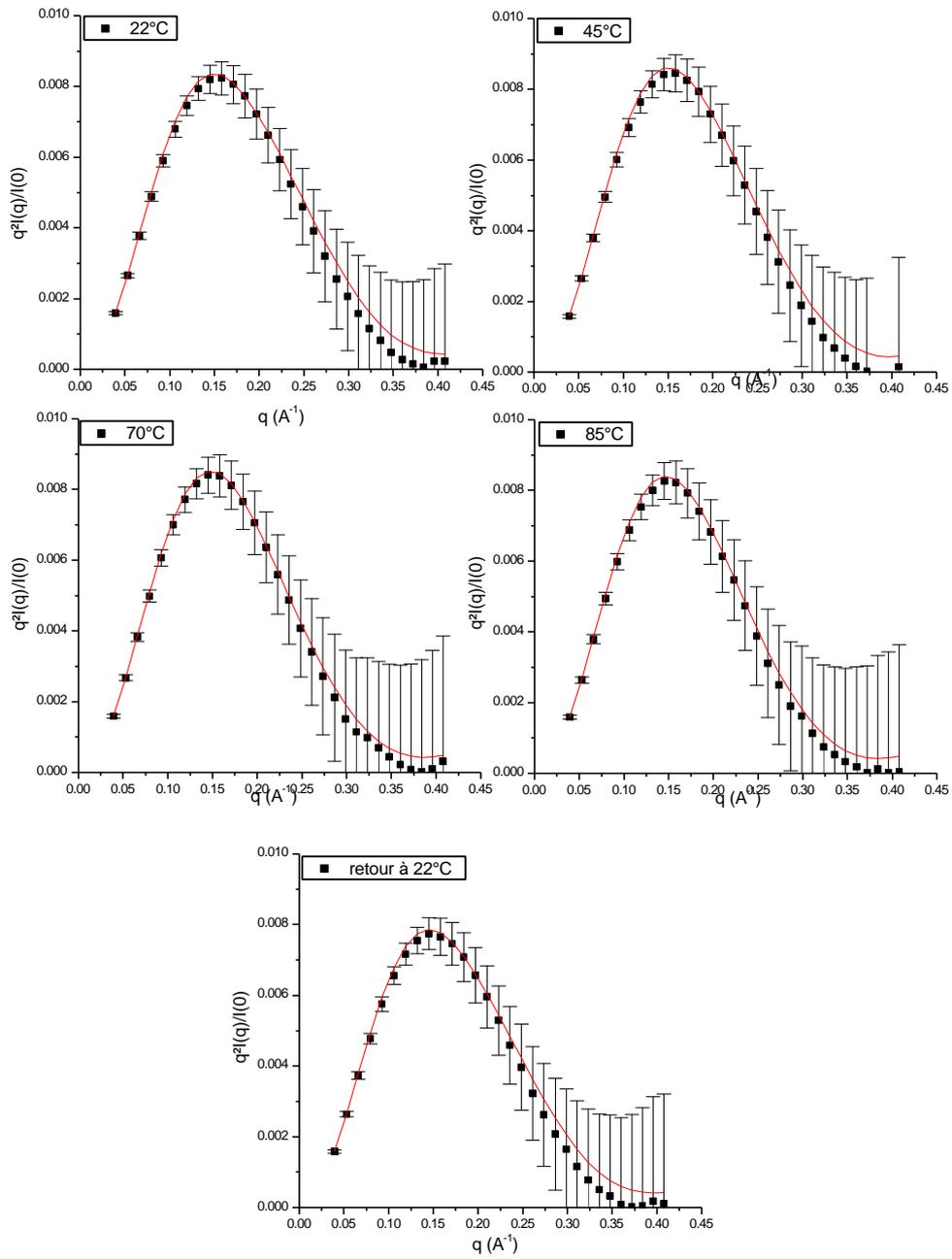


Figure III.25 : Représentation de Kratky et ajustement par un modèle d'ellipsoïde. Expérience de diffusion de neutrons aux petits angles sur le spectromètre PACE (LLB, Saclay) sur une solution de BPTI à 20 mg/ml entre 22°C et 85°C puis retour à 22°C.

température	axes de l'ellipsoïde			volume
	a	b	c	
22	23.5	10.4	10.4	10674.07
45	22.3	10.6	10.6	10572.97
70	21.9	10.9	10.9	11089.81
85	22.0	11.0	11.0	11318.63
retour	24.5	10.6	10.6	11705.6

Tableau III.h : récapitulatif des paramètres d'ajustements des points expérimentaux de la figure III.25. Les paramètres des axes a, b et c sont en Å et le volume en Å³.

Le volume indiqué dans le tableau III.j est calculé comme suit :

$$V = \frac{4}{3} * p * a * b * c$$

où a, b et c sont les axes de l'ellipsoïde.

Comme le montre la figure III.25, les barres d'erreurs aux grandes valeurs de q ne nous permettent pas d'évaluer précisément l'influence de la température entre 22°C et 85°C. Nous pouvons en tout cas constater la conservation de la forme ellipsoïdale lorsque l'échantillon est ramené à température ambiante. Le tableau III.h, indiquant les valeurs des paramètres obtenus après ajustement, permettent de calculer un volume pour la protéine : il apparaît une augmentation du volume de la protéine au fur et à mesure de l'augmentation de la température. Lorsque l'échantillon est refroidi à température ambiante, la protéine présente un volume plus important qu'au début de l'expérience. Cette influence de la température est donc irréversible dans cette gamme de température. La protéine n'est cependant pas dépliée à 85 °C.

Comme pour les expériences à plus basses températures, la gamme de vecteur de diffusion a été étendue jusqu'à 0.4 Å⁻¹ sur cet instrument (PAXE) afin de pouvoir étudier l'influence de la température jusqu'à 95°C sur la forme du BPTI en solution.

La figure III.26 représente la représentation de Kratky pour le BPTI en solution à température ambiante et la figure III.27 à 95°C. L'ajustement des points expérimentaux a été réalisé avec un modèle d'ellipsoïde.

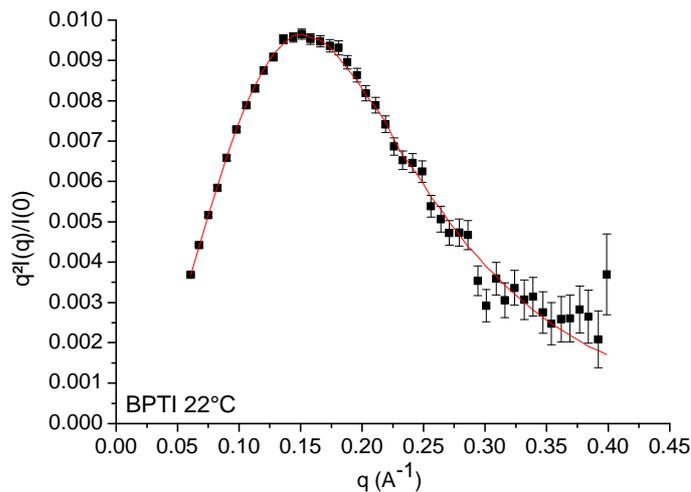


Figure III.26 : représentation de kratky et ajustement par un modèle d’ellipsoïde simple. Expérience de diffusion de neutrons aux petits angles sur le spectromètre PAXE (LLB, Saclay) sur une solution de BPTI à 20 mg/ml à température ambiante.

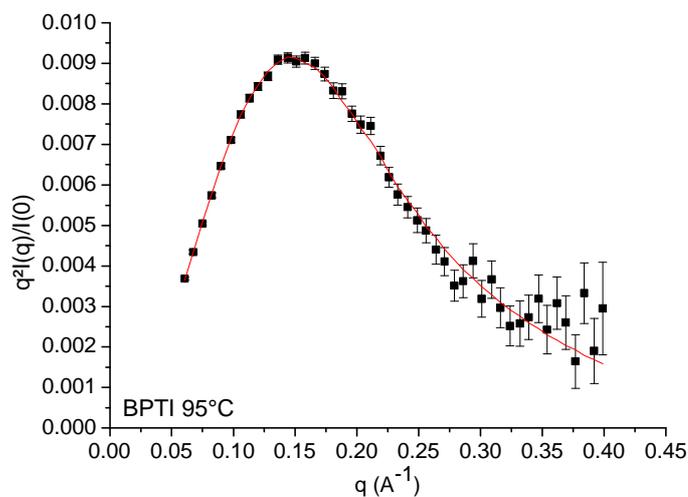


Figure III.27 : représentation de kratky et ajustement par un modèle d’ellipsoïde simple. Expérience de diffusion de neutrons aux petits angles sur le spectromètre PAXE (LLB, Saclay) sur une solution de BPTI à 20 mg/ml à 95°C.

Il nous alors été possible de calculer un volume et un rayon de giration du BPTI pour ces deux températures. Les valeurs sont reportées dans le tableau III.i.

Température	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volume (Å ³)	Rg (Å)
22°C	21.6 ± 0.1	13.8 ± 0.1	7.2 ± 0.1	8990	11.9
95°C	21.6 ± 0.1	14.7 ± 0.1	7.4 ± 0.1	9576	12.1

Tableau III.i : récapitulatifs des paramètres d'ajustement des points expérimentaux des figures III.26 et III.27.

A température ambiante, nous retrouvons une valeur de volume en accord avec celle donnée dans la littérature¹² ainsi qu'un rayon de giration cohérent avec celui trouvé dans le régime de Guinier pour cette concentration de 20 mg/ml de BPTI. La différence observée entre ces valeurs de paramètres et celles obtenues pour les plus basses températures est due à l'utilisation d'un modèle légèrement différent pour l'ajustement des points expérimentaux. Les points expérimentaux des résultats obtenus entre 22°C et 85°C (III.D.3.c) ont été ajustés avec un modèle d'ellipsoïde de révolution tandis que ceux présentés dans les figures III.26 et III.27 ont été ajustés avec un modèle d'ellipsoïde simple.

A 95°C, température pour laquelle la structure du BPTI est très affectée, nous constatons une dilatation dans la forme de la molécule car deux axes de l'ellipsoïde évoluent lorsque la solution de BPTI est portée à haute température. Cette influence de la température conduit à une augmentation de volume de près de 6.5% et d'une augmentation du rayon de giration. Ce phénomène peut s'expliquer par le dépliement partiel du BPTI au niveau des structures en hélices comme cela a été montré par spectroscopie Raman par Carmona et al en 2003¹. Les atomes de ces structures dépliées et ceux appartenant aux structures désordonnées dans leur voisinage acquièrent des degrés de liberté supplémentaires et peuvent occuper un volume plus important. La figure III.28 donne une idée de cette influence de la température sur la forme du BPTI.

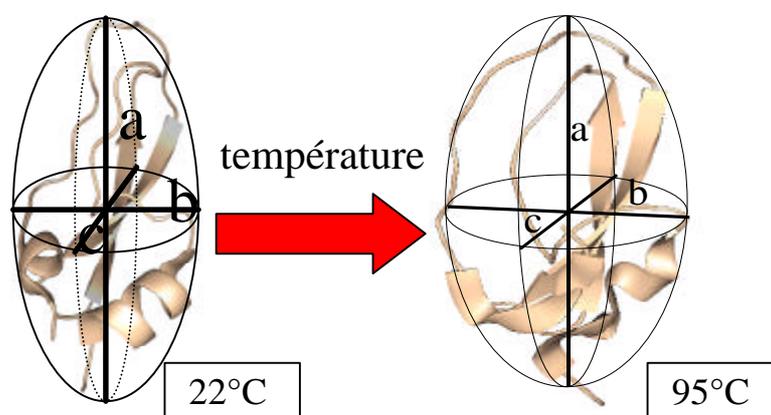


Figure III.28 : représentation imagée de l'influence de la température sur la forme du BPTI.

4. Etude de l'influence de la pression sur la structure du BPTI

a) Influence de la pression sur le rayon de giration du BPTI et sur l'intensité lorsque q tend vers 0.

Une solution concentrée de BPTI (85 mg/ml) a été étudiée par diffusion de neutrons aux petits angles sous pression sur le spectromètre NEAT au HMI à Berlin. La figure III.29 présente le logarithme de l'intensité diffusée en fonction du carré de vecteur d'onde q^2 pour des pressions allant de 1 bar à 6000 bar puis retour à 1 bar. Un ajustement est réalisé sur les points expérimentaux par le modèle de Guinier afin d'observer l'influence de la pression sur le rayon de giration de la protéine et sur l'intensité lorsque q tend vers 0.

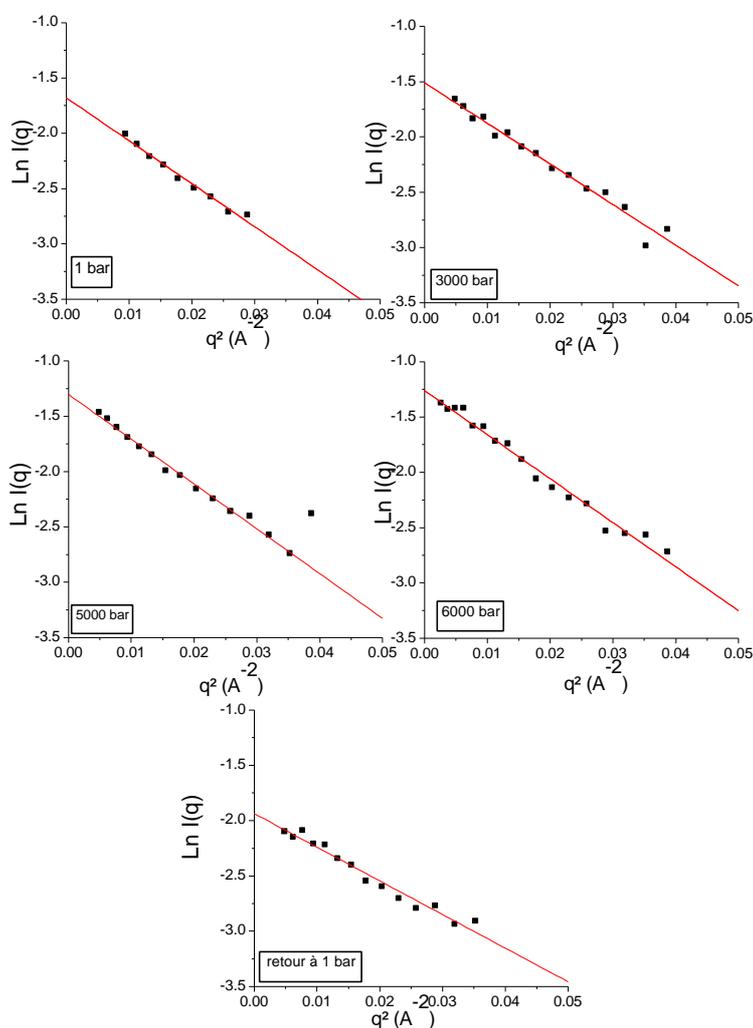


Figure III.29 : Logarithme de l'intensité en fonction de q^2 pour une solution de BPTI à 85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D_2O pD 4,5 et 100 mM $(ND_4)_2SO_4$.

Pression	I(q = 0) (u.a)	Rg apparent (Å)
1 bar	0.235 ± 0.020	15.318 ± 1.402
3000 bar	0.348 ± 0.025	15.182 ± 1.091
5000 bar	0.394 ± 0.007	14.969 ± 0.260
6000 bar	0.383 ± 0.022	13.814 ± 0.947
Retour à 1 bar	0.274 ± 0.024	14.980 ± 1.096

Tableau III.j : Intensité à $q = 0$ et rayon de giration du BPTI à 85 mg/ml en fonction de la pression.

Rayon de giration :

A pression atmosphérique, nous retrouvons un rayon de giration de 15.32 ± 1.4 Å propre au BPTI dans son état natif (chapitre III.D.2). Lorsque la pression augmente jusqu'à 3000 bar, ce rayon se maintient autour de 15.2 ± 1.0 Å. A cette valeur de la pression, la protéine ne subit pas de modifications évidentes de sa structure. A 5000 et 6000 bar, nous pouvons constater une diminution relativement importante du rayon de giration jusqu'à 13.8 ± 1.0 Å. Cette réduction du Rg peut être la conséquence d'un dépliement partiel de la protéine sous pression ; nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : la compaction du cœur hydrophobe de la protéine sous l'action de la pression comme cela a été montré par R.M.N. ou la pénétration de molécules d'eau lourde à l'intérieur de la protéine influençant par conséquent le contraste, d'autre part les structures situées à la périphérie du BPTI, notamment les boucles et les hélices α commenceraient à se déplier et présenter un contraste local moins important. Le résultat de ces changements conformationnels est un rayon de giration apparent plus petit qu'à l'état natif. Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique, on constate une diminution du rayon de giration. En effet, la valeur de ce rayon est de 15.0 ± 1.1 Å, ce phénomène peut s'expliquer par une modification des structures secondaires et notamment une transformation des structures désordonnées comme celles des boucles en feuillets β qui, à nombre égal d'acides aminés occupent un espace moins important.

Intensité lorsque q tend vers 0 :

Lorsque la pression passe de 1 bar à 6000 bar, l'intensité diffusée lorsque q tend vers 0 ($I(q=0)$), qui nous renseigne sur les interactions intermoléculaires, varie de manière significative. Entre 1 bar et 3000 bar, $I(q=0)$ augmente et passe de la valeur $I(0) = 0.235$ à 1 bar, à $I(0) = 0.348$ à 3000 bar. Il est possible qu'une compaction du cœur ait lieu à cette valeur de la pression, la densité de la protéine va donc augmenter provoquant ainsi une variation du volume spécifique du BPTI avec la pression.

Lorsque la pression atteint 5000 et 6000 bar, $I(q=0)$ augmente jusqu'à la valeur $I(0) = 0.390$. Ce phénomène peut s'expliquer de trois manières :

- soit le contraste entre la molécule et le solvant est modifié du fait de l'exposition au solvant de résidus qui étaient enfouis dans l'état natif.
- Soit un phénomène d'agrégation consécutif au dépliement des molécules de protéine a lieu.
- Soit une augmentation de la concentration en protéine du fait de l'augmentation de la pression a lieu. En effet, si $c(P)$ et $\rho_{D_2O}(P)$ sont, respectivement, la concentration en protéine en g/cm^3 et la densité du D_2O en g/cm^3 à la pression P , l'évolution de c en fonction de la pression, soit $c(P)$ s'exprime de la manière suivante¹² :

$$c(P) = \frac{c(0.1) * r_{D_2O}(P)}{r_{D_2O}(0.1)} \quad (3.16)$$

Où $c(0.1)$ et $\rho_{D_2O}(0.1)$ sont, respectivement, la concentration en g/cm^3 et la densité en g/cm^3 à pression atmosphérique.

Nous avons alors les concentrations rapportées dans le tableau III.k :

Pression (bar)	$\rho_{D_2O} (g/cm^3)^*$	[BPTI] (g/cm^3)
1	1.10534	$85 * 10^{-3}$
3000	1.22085	$93.88 * 10^{-3}$
5000	1.27372	$97.95 * 10^{-3}$
6000	1.29567	$99.63 * 10^{-3}$

Tableau III.k : dépendance de la concentration en BPTI en fonction de la pression

*à partir des travaux de P.W Bridgman¹³

Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique, $I(q=0)$ retourne à une valeur de $I(0) = 0.274$, soit légèrement plus élevé qu'au début de l'expérience. Ceci peut s'expliquer par :

- Une modification du contraste due à l'exposition des résidus enfouis lorsque l'échantillon a été soumis aux hautes pressions de 5 et 6 kbar.
- Une modification importante de la structure induite par les hautes pressions et conduisant à la compaction de la protéine.

Il est possible de calculer le contraste à partir de la valeur de l'intensité diffusée vers l'avant selon la relation :

$$I(0) = \frac{c * M_w}{N_A} * K^2$$

Il faut, pour cela faire, abstraction de la contribution du facteur de structure $S(q)$ dans l'intensité diffusée. En effet en régime concentré, cette intensité s'exprime comme :

$$I(q) = \frac{cM}{N_A} K^2 P(q) * S(q)$$

Il est possible d'obtenir ce facteur de structure $S(q)$ en posant le rapport entre l'intensité diffusée par le BPTI à haute concentration et l'intensité diffusée par le BPTI à basse concentration, puisqu'en régime dilué, ce facteur est suffisamment négligeable pour ne pas intervenir :

$$S(q) = \frac{I(q)[BPTI \text{ à } 85 \text{ mg / ml}]}{I(q)[BPTI \text{ à } 8.8 \text{ mg / ml}]}$$

La figure III.30 présente le facteur de structure du BPTI en solution à 85 mg/ml issu du rapport entre les intensités diffusées à haute et basse concentrations en cellule Hellma. Cette figure montre que $S(q)$ est très proche de 1 pour le BPTI en solution à 85 mg/ml. Il y a donc très peu d'interactions intermoléculaires. Les molécules de BPTI sont donc suffisamment éloignées les unes des autres à cette concentration et pression atmosphérique pour nous permettre de calculer le contraste entre le BPTI et le solvant et par conséquent d'évaluer l'effet de la pression sur le volume spécifique partiel de cette protéine.

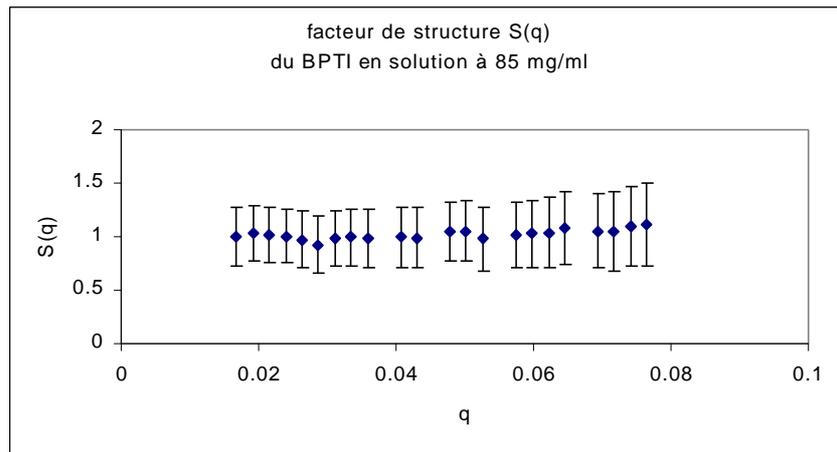


Figure III.30 : facteur de structure du BPTI en solution à 85 mg/ml.

On pose alors :

$$K = \sqrt{\frac{I(0) * N_A}{Mw * c}}$$

Et le volume spécifique peut alors se calculer suivant :

$$v_p = \frac{N_A \sum b_i(BPTI)}{Mw(BPTI) * (K + r_{solvant})}$$

Nous avons normalisé les valeurs de $I(0)$ par rapport à la valeur théorique de l'intensité diffusée vers l'avant. En tenant compte de la variation de la concentration en fonction de la pression, nous obtenons les valeurs de contraste et de volume spécifique du BPTI indiquées dans le tableau III.1 suivant :

Pression (bar)	Contraste K (cm)	Volume spécifique BPTI (cm ³ /g)
1	$2.891 * 10^{10}$	0.725
3000	$1.851 * 10^{10}$	0.691
5000	$1.929 * 10^{10}$	0.694
6000	$1.885 * 10^{10}$	0.692
Retour à 1 bar	$1.726 * 10^{10}$	0.686

Tableau III.1 : dépendance du contraste du BPTI par rapport au solvant en fonction de la pression.

Le tableau III.1 montre que la pression influence le contraste entre la protéine et le solvant et affecte la protéine et sa structure en diminuant de manière irréversible le volume spécifique du BPTI. A 6000 bar, la diminution du volume spécifique du BPTI est de l'ordre de 5.2 %. La protéine subit ainsi une compaction due à l'effet de la pression et sa forme doit, par conséquent, être modifiée. Une étude similaire sur la metmyoglobine¹² a montré une diminution de 5.4 % du volume spécifique de cette protéine lorsque la pression appliquée est de 3000 bar. Il apparaît donc que le BPTI est plus difficile à comprimer que la myoglobine.

Comme pour l'étude en température, nous avons tracé, dans la figure III.31, l'évolution du volume spécifique du BPTI en fonction de la pression appliquée afin d'extraire la compressibilité isotherme β_T qui s'exprime par :

$$b_T = \frac{-1}{V_p} \left(\frac{\partial V_p}{\partial P} \right)_T$$

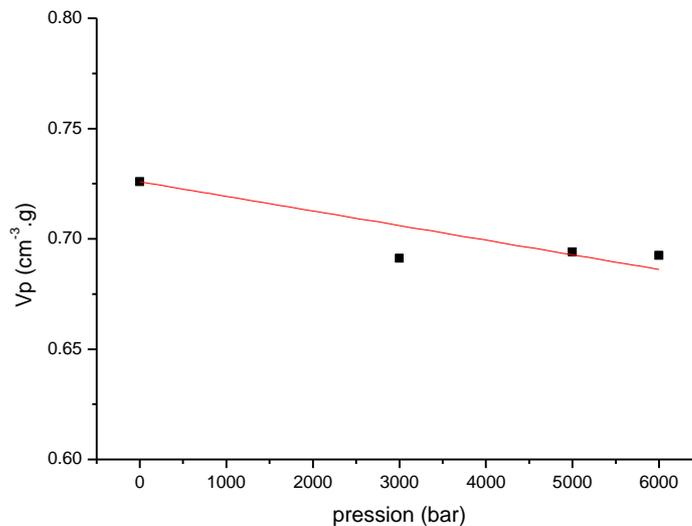


Figure III.31 : Evolution du volume spécifique du BPTI en fonction de la pression.

L'ajustement des points expérimentaux est réalisé par une droite dont la pente nous a permis d'extraire une valeur de $\beta_T = 4.81 \cdot 10^{-2} \text{ kbar}^{-1}$, en accord avec la valeur mentionnée par Kitchen et al en 1992¹⁴ et égale à $\beta_T \cong 4.5 \cdot 10^{-2} \text{ kbar}^{-1}$. Cette valeur expérimentale est issue d'expériences de vélocimétrie ultrasonique, réalisée par Gekko et Noguchi¹⁵ sur un certain

nombre de protéine, et extrapolé sur la base de leurs volumes spécifiques à pression atmosphérique et de leurs masses moléculaires par Kitchen et al pour le BPTI.

Ces résultats sont à prendre en compte de manière relative puisque les interactions intermoléculaires sont susceptibles d'être influencé par l'effet de la pression.

Il nous aurait fallu travailler en régime dilué avec plusieurs échantillons comme cela a été le cas pour l'étude en température afin d'obtenir précisément l'influence de la pression sur les interactions intermoléculaires selon la relation suivante.

$$I_{\text{coh}}(0, c) = \frac{cM}{N_A} K^2 (1 + 2A_2Mc + 3A_3Mc^2 + \dots)^{-1}$$

où c est la concentration en protéine, M sa masse moléculaire, N_A le nombre d'Avogadro, K le contraste entre la protéine et le solvant et A_2 le second coefficient du viriel.

b) Influence de la pression sur la forme du BPTI

Pour vérifier l'influence sur la forme du BPTI et notamment cette compaction observé dans le domaine de Guinier, il a été nécessaire d'étendre notre étude par diffusion de neutrons aux petits angles jusqu'à des valeurs de vecteur d'onde de 0.4 \AA^{-1} .

(1) Résultats

La figure III.32 représente $q^2I(q)/I(0)=f(q)$ pour la solution de BPTI entre la pression atmosphérique et 6000 bar.

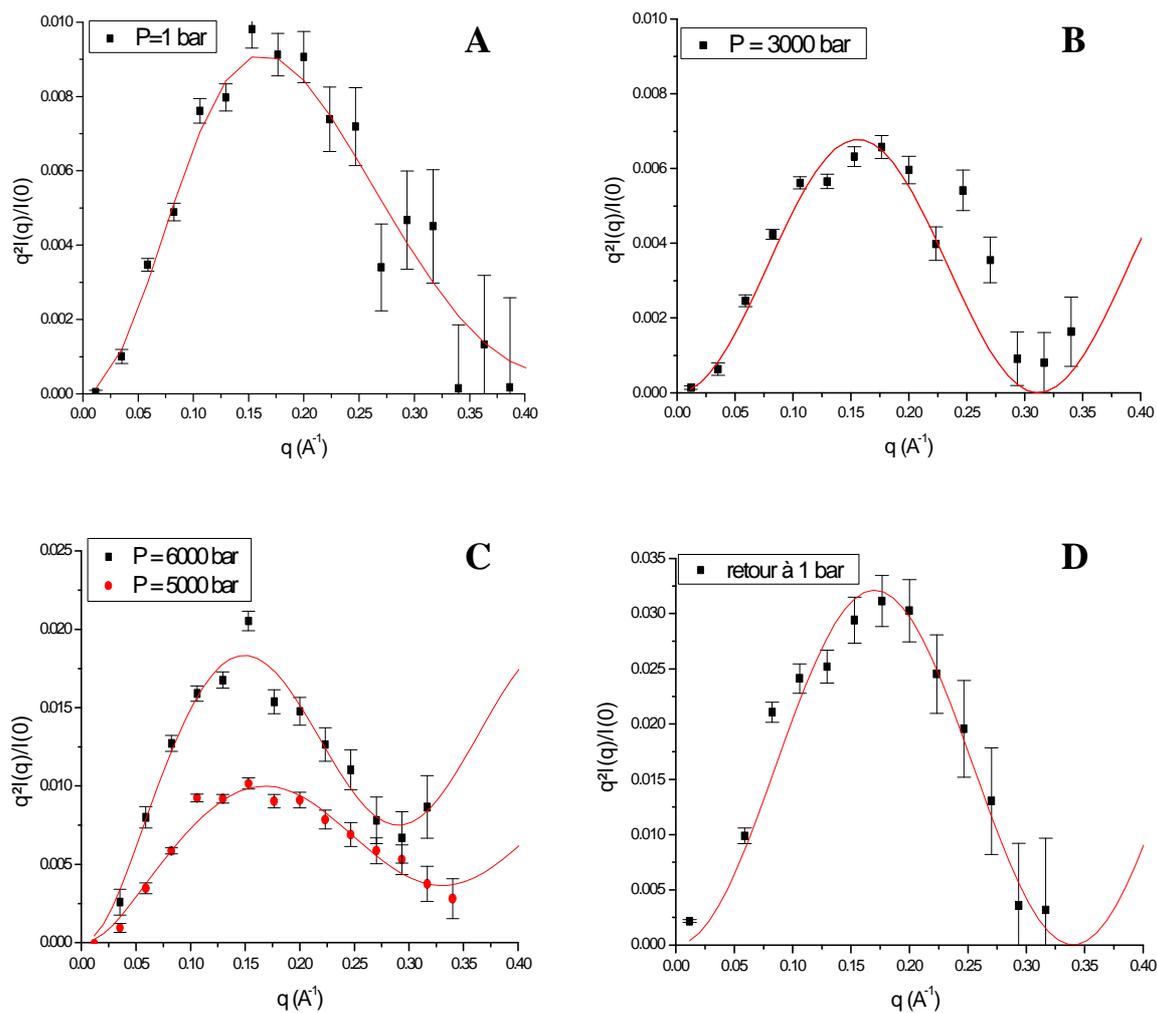


Figure III.32 : Représentation de Kratky ($q^2I(q)/I(0)=f(q)$) pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon acétique deutéré 50 mM en D_2O pD 4,5 avec 100 mM $(ND_4)_2SO_4$ entre la pression atmosphérique et 6000 bar, à température ambiante.

A pression atmosphérique (figure III.32.A), le meilleur ajustement des points expérimentaux a été réalisé avec un modèle d'ellipsoïde dont les paramètres sont :

$$a = 21.68 \text{ \AA},$$

$$b = 9.63 \text{ \AA},$$

$$c = 9.61 \text{ \AA},$$

ce qui donne un volume pour la protéine de $V = 8404.2 \text{ \AA}^3$, ces valeurs sont en accord avec celles observées lors de l'étude en température et surtout celles énoncées dans la littérature et notamment dans des expériences de simulation par dynamique moléculaire¹⁴.

En augmentant la pression jusqu'à 3000 bar, le spectre de $q^2I(q)$ en fonction de q est différent de celui à pression atmosphérique (figure III.32.B). En effet l'ajustement par le modèle de l'ellipsoïde ne donne pas satisfaction. Nous avons procédé à un ajustement par le modèle de la boule ou coquille sphérique décrite par la relation :

$$q^2I(q) = q^2 * \left(B + I_0 * \left[\frac{3J_1(qR)}{qR} \right]^2 \right)$$

Avec $J_1(qR)$ la fonction de Bessel sphérique d'ordre 1 qui s'écrit :

$$J_1(qR) = \frac{\sin(qR)}{(qR)^2} - \frac{\cos(qR)}{qR}$$

Où I_0 est l'intensité lorsque q tend vers 0 et R est le rayon de la sphère.

La figure III.32.B présente la représentation de $q^2I(q)/I(0)$ en fonction de q lorsque l'échantillon est soumis à une pression de 3000 bar. L'ajustement par le modèle de la coquille sphérique est en meilleur accord avec les points expérimentaux que l'ajustement par le modèle de l'ellipsoïde. Le BPTI se comporte donc, à 3000 bar, comme un globule compact de forme sphérique avec un rayon de sphère de $R = 12.3 \text{ \AA}$ ce qui correspond à un volume de $V = 7794.8 \text{ \AA}^3$.

Selon la relation ci-dessous, issue de la théorie des polymères,

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} * R$$

cette valeur de rayon de sphère de 12.3 \AA correspond à un rayon de giration R_g d'environ 9.5 \AA

En augmentant la pression jusqu'à 5000 et 6000 bar, la représentation de Kratky montre un profil différent de celui à pression atmosphérique et à 3000 bar. En effet, comme le montre la figure III.32.C, l'évolution de $q^2I(q)/I(0)$ en fonction de q présente à partir de 0.2 \AA^{-1} un profil différent de celui d'un ellipsoïde ou d'une coquille sphérique.

Dans l'hypothèse où la protéine se déplie, même partiellement, pour former une molécule possédant un cœur compact, assimilé à une sphère, entouré par une couronne de structures aléatoires assimilées à des chaînes gaussiennes, nous avons tenté de procéder à un ajustement par un modèle inspiré du modèle de micelle proposé par Pedersen¹⁶.

Ce modèle contient deux termes, $F_{Gaus}(q)$ qui est la fonction de Debye permettant de décrire une chaîne gaussienne et où R_2 est le rayon apparent de la chaîne.

$$\text{avec} \quad F_{Gaus}(q) = \frac{2}{q^4 * R_2^4} * (q^2 * R_2^2) - 1 + \exp(-(q^2 * R_2^2)) \quad (3.17)$$

Et $F_{Coquille}(q)$ qui est la fonction basée sur la fonction de Bessel sphérique d'ordre 1 permettant de décrire une coquille sphérique de rayon apparent R_1 .

$$\text{avec} \quad F_{Coquille}(q) = \left[\frac{3 * \sin(q * R_1) - (q * R_1) * \cos(q * R_1)}{(q * R_1)^3} \right]^2 \quad (3.18)$$

La fonction d'ajustement pour un modèle de micelle où p est la proportion des structures désordonnées dans la molécule, s'écrit de la manière suivante :

$$q^2 I(q) = q^2 * I(q=0) * (p * F_{Gaus}(q) + (1-p) * F_{coquille}(q)) + Bdf \quad (3.19)$$

D'après la figure III.32.C, lorsque la protéine est soumise à une pression de 5000 bar, elle ne possède plus sa structure native. A cette pression, l'ajustement par le modèle de la micelle conduit à un rayon de cœur sphérique de 13 Å et à des chaînes gaussiennes avec un rayon apparent voisins de 20 Å.

Lorsque la pression est portée à 6000 bar, le rayon du cœur sphérique augmente (14.9 Å) tandis que les chaînes gaussiennes présentent un rayon apparent plus important (18.5 Å).

Afin de vérifier la réversibilité de ce phénomène, la solution de BPTI est ramenée à pression atmosphérique puis observée par diffusion de neutrons aux petits angles. La figure III.32.D donne la représentation de Kratky après le retour de la solution à 1 bar.

Le modèle de la coquille sphérique semble mieux convenir que le modèle de l'ellipsoïde. Le résultat de l'ajustement donne un rayon de 12.5 Å. Le volume correspondant est de $V = 8181.2 \text{ \AA}^3$.

Pression	Forme de la protéine	Dimensions	Volume
1 bar	Ellipsoïde	a = 21.7 Å, b = 9.63 Å, c = 9.61 Å	8404.2 Å ³
3000 bar	Sphère	R = 12.3 Å	7794.8 Å ³
5000 bar	Micelle	R ₁ = 13.0 Å, R ₂ = 20.0 Å	
6000 bar	Micelle	R ₁ = 14.9 Å, R ₂ = 18.5 Å	
Retour à 1 bar	Sphère	R = 12.5 Å	8181.2 Å ³

Tableau III.m : récapitulatif des effets de la pression sur la forme du BPTI.

(2) Discussion

A pression atmosphérique, il nous est possible de superposer la représentation de Kratky de la simulation à partir de sa structure cristallographique sur les données expérimentales. (figure III.33).

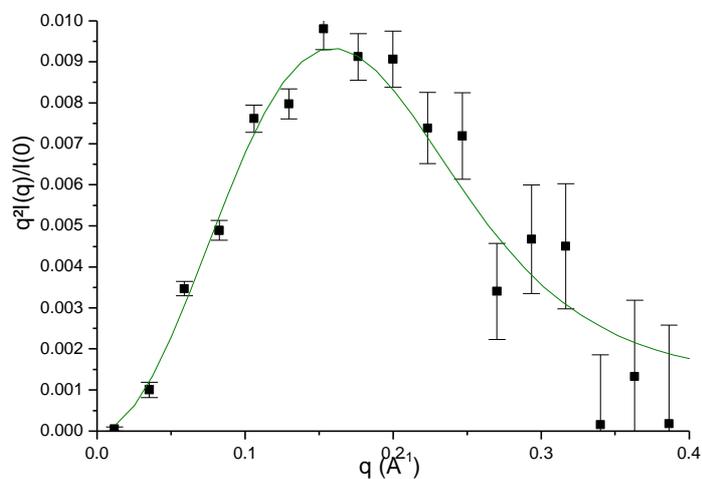


Figure III.33 : Représentation de Kratky ($q^2 I(q)/I(0)=f(q)$) pour une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D₂O pD 4,5 avec 100 mM (ND₄)₂SO₄ à pression atmosphérique. La ligne verte représente la représentation de Kratky issue de la simulation à partir de la structure cristallographique du BPTI (6PTI.pdb).

Cette correspondance entre théorie et expérience montre que le traitement des données a été satisfaisant. Le calcul du volume de la protéine à partir des valeurs des axes obtenues par l'ajustement par le modèle de l'ellipsoïde donne $V = 8404.2 \text{ \AA}^3$ et nous servira de référence par rapport aux autres valeurs de la pression.

A 3000 bar, nous observons une diminution du volume (7794.8 \AA^3) de la protéine ainsi que celle de la valeur de rayon de giration (9.5 \AA). Cette diminution de la taille du BPTI montre un phénomène de compaction de la protéine. Ce phénomène a déjà été décrit par des mesures de R.M.N.¹⁷ La structure cristallographique du BPTI a été réalisée à 2000 bar et a montré une augmentation du rayon de giration induit par l'adoption par le BPTI d'une forme plus ellipsoïdale sous pression par rapport à l'état natif¹⁸. La simulation du facteur de forme du BPTI à partir de cette structure cristallographique sous pression n'a, cependant, pas montré de différences significatives par rapport à celle sous pression atmosphérique (Figure III.34). Les deux représentations de Kratky s'ajustent avec le modèle de l'ellipsoïde décrit précédemment.

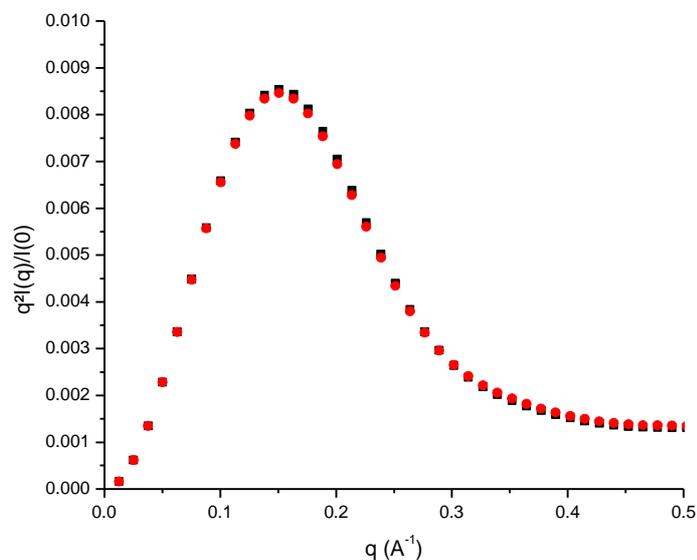


Figure III.34 : Représentation de Kratky de la simulation du facteur de forme du BPTI à partir de la structure du BPTI issus de la R.M.N.¹⁷, carré noir : à 1 bar (10A5.pdb) ; rond rouge : à 2000 bar (10A6.pdb).

A partir de 5000 bar, l'ajustement des points expérimentaux n'a été possible qu'avec un modèle de micelle décrivant un cœur globulaire compact entouré par des structures désordonnées. De plus, cette structure particulière évolue lorsque la pression augmente jusqu'à 6000 bar. La structure du BPTI est donc affectée de manière significative dès 5000 bar, valeur proche de celle pour laquelle la structure du BPTI observé par infrarouge est affectée est de 5500 bar¹⁹.

Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique après avoir été soumis à une pression de 6000 bar, la protéine adopte une forme plus sphérique qu'ellipsoïdale avec un rayon de 12.5 Å, soit un volume de 8181.2 Å³. Une modification structurale a eu lieu à haute pression et l'action de la pression sur le BPTI est donc irréversible.

Il faut être prudent quant à l'interprétation de ces résultats par le modèle de micelle. Il est fort probable que la protéine contienne plusieurs types de conformations. Les expériences en Infrarouge¹⁸ n'ont pas montré de dépliement total du BPTI pour des pressions inférieures à 5500 bar. Dans un premier temps, ce sont les structures secondaires de type hélices 3_{10} , hélices α , et tour β qui sont plus exposées que les feuillets β qui sont réarrangées jusqu'à cette valeur de pression limite. Les liaisons hydrogène permettant le maintien de ces structures secondaires sont déstabilisées par les molécules d'eau qui s'infiltreront à cette pression. Une augmentation de la pression jusqu'à 10 000 bar provoque la précipitation du BPTI. Ceci est dû à l'exposition des résidus hydrophobes appartenant au cœur de la protéine et plus précisément au niveau des feuillets β . Il est donc possible que la protéine ne soit pas complètement dénaturée à 6000 bar mais présente plutôt un dépliement partiel notamment des structures secondaires plus sensibles à la pression que d'autres.

On a montré par RMN que, jusqu'à 2000 bar, la pression affecte les résidus impliqués dans le site actif du BPTI, ainsi que les résidus voisins des molécules d'eau enfouies conduisant ainsi à une compaction du cœur hydrophobe¹⁶.

Les influences de la température et de la pression sur la couche d'hydratation de la protéine peuvent être observées si des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles en eau légère sont réalisées en parallèle avec des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles en eau lourde comme cela a été fait en 1998 par Svergun et al²⁰ sur le lysozyme, la réductase de thioredoxine d'*Escherichia coli* et la protéine R1 de la réductase de ribonucléotide d'*Escherichia coli*. Les auteurs se sont basés sur les différences significatives des contrastes entre la protéine et la couche d'hydratation selon le solvant utilisé.

E. Résultats des expériences par spectroscopie UV-visible

a) Mise en évidence de la β agrégation par la fixation de Rouge Congo.

Dans le but de confirmer ce phénomène de β agrégation, nous avons réalisé, au laboratoire INSERM U 473 de l'I.F.R. Bicêtre, des expériences avec le BPTI en solution en présence de Rouge Congo, en spectroscopie UV-visible. Cette molécule est un intercalant qui, lorsqu'il est libre dans la solution, va émettre un signal particulier sous la forme d'une bande vers 500 nm. A partir du moment où elle va se positionner entre deux feuillets β antiparallèles en formation dans une protéine, on observe un déplacement de la bande vers 535 nm. Ce phénomène est appelé red shift, car le déplacement de la bande s'effectue vers le rouge. Il est caractéristique d'une β agrégation. Cette méthode a notamment été utilisée pour observer la formation de fibrilles de β amyloïde et un phénomène similaire a été observé pour le lysozyme réduit en présence d'éthanol²¹.

(1) Conditions expérimentales

La solution de BPTI est préparée à 85 mg/ml, soit 12.9 mM comme pour les expériences de diffusion de neutrons en tampon d'acide acétique deutéré 50 mM dans D₂O avec 100 mM de sulfate d'ammonium. Le Rouge de Congo, acheté sous forme de poudre, est solubilisé dans l'éthanol à hauteur de 280 μ M.

Les expériences ayant pour but d'étudier la fixation du Rouge Congo au BPTI en fonction de la température sont réalisées dans des cellules Hellma avec un trajet optique de 10 mm. Le BPTI et le Rouge Congo sont mis en présence dans la cellule dans des proportions équimolaires de 50 μ M en tampon acide acétique. L'échantillon est porté à différentes températures entre 25 et 95 °C par effet Peltier.

Les expériences ayant pour but d'étudier la fixation du Rouge Congo au BPTI en fonction de la pression sont réalisées dans une cellule parallélépipédique de trajet optique de 5 mm introduit dans une bombe de haute pression pouvant supporter 7 kbar (figure III.35). Le BPTI et le Rouge Congo sont mis en présence dans la cellule dans des proportions équimolaires de 100 μ M en tampon acide acétique. L'échantillon est soumis à différentes pressions entre 1 bar et 6700 bar. Le milieu permettant l'application de la pression est le pentane.

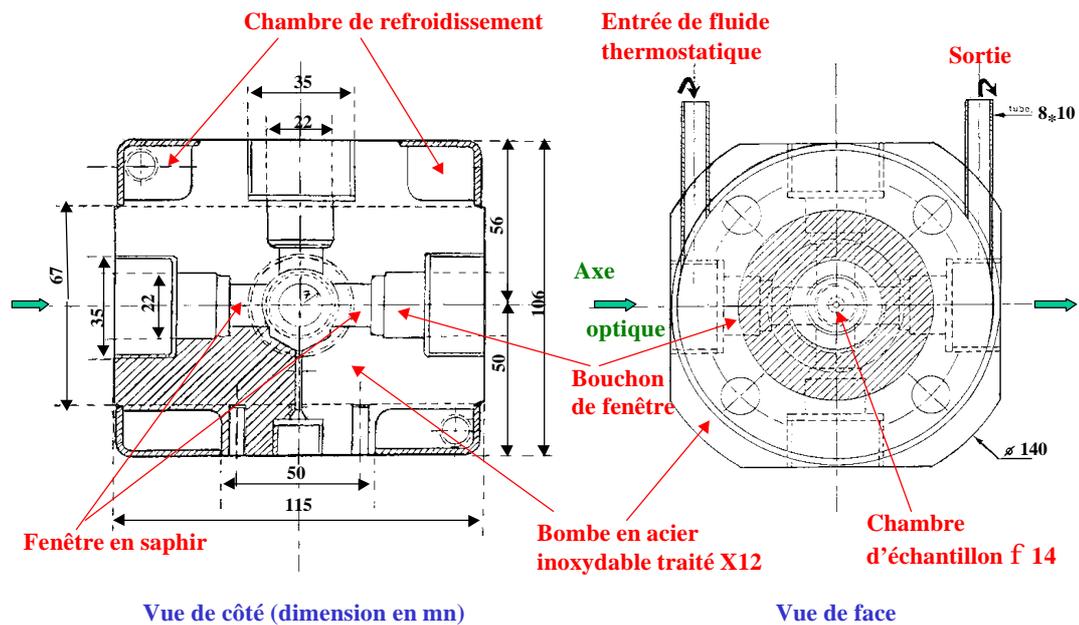


Figure III.35 : représentation schématique de la bombe pression utilisé pour des expérience de spectroscopie optique (avec l'autorisation de Dr Gaston Hui Bon Hoa, Inserm U 473, Kremlin bicêtre).

Les mesures ont été effectuées sur un spectromètre d'absorption UV – visible Cary 3 E de Varian sur une gamme en longueur d'onde comprise entre 350 et 700 nm, le pas d'intégration en longueur d'onde est de 0.1 nm.

(2) Résultats

Nous avons procédé à des expériences en température jusqu'à 95°C et des expériences sous pression jusqu'à 6700 bar. Pour les expériences en température (figure III.36), nous avons procédé de la manière suivante : dans un premier temps le BPTI et le Rouge Congo sont mis en présence à température ambiante, puis chauffés jusqu'à 95°C et refroidis à 25°C.

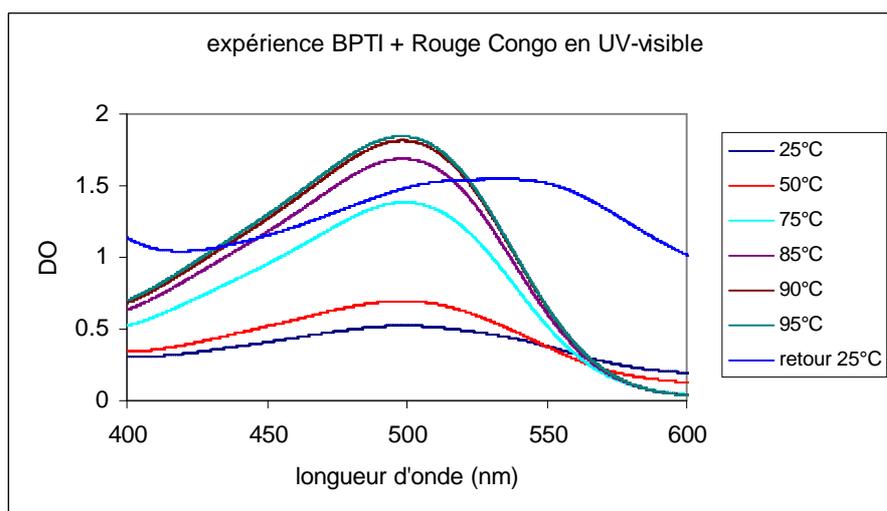


Figure III.36 : expérience de spectroscopie UV-visible en fonction de la température, BPTI (50 μ M) + Rouge Congo (50 μ M) en tampon acétate 50 μ M pH 4.5 et 100 μ M (NH₄)₂SO₄

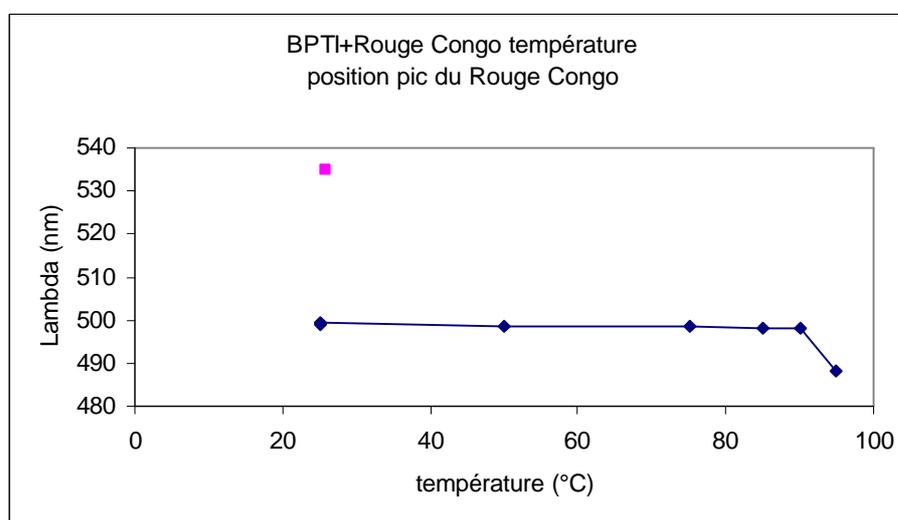


Figure III.37 : évolution du déplacement du pic du Rouge Congo en présence du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : retour à 22°C

La figure III.37 montre que la température n'influence pas la position de la bande caractéristique du Rouge Congo jusqu'à 90°C. Mais lorsque l'échantillon est porté à une température de 95°C, la bande se déplace vers le rouge à 490 nm, il se produit donc un léger « blue shift ». Lorsque l'échantillon est refroidi à 25°C, un déplacement de la bande vers 535 nm est observé, ce déplacement de la bande vers le rouge ou « red shift » est caractéristique d'une fixation du Rouge Congo entre des feuillets β .

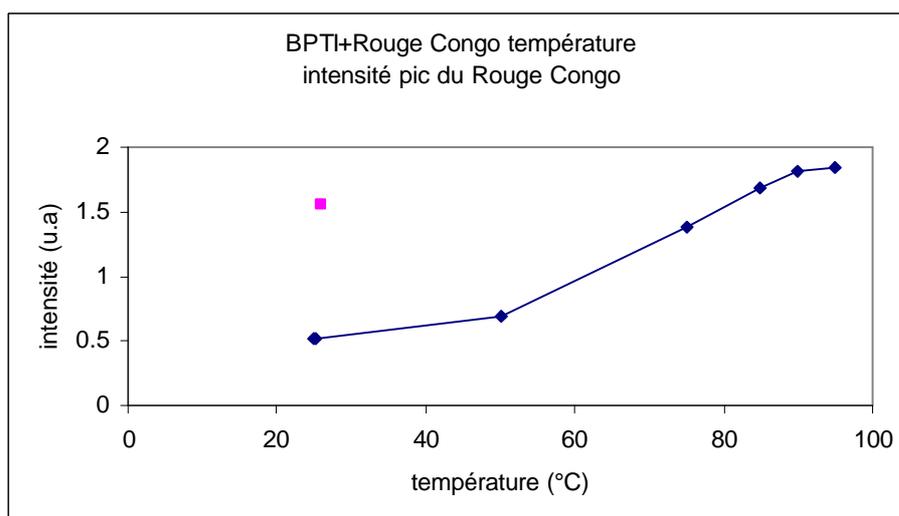


Figure III.38 : évolution de l'amplitude du pic du Rouge Congo en présence du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : retour à 22°C

La figure III.38 montre une augmentation de l'intensité de la bande caractéristique du Rouge Congo jusqu'à 90°C. Cette intensité se stabilise entre 90 et 95°C. Mais lorsque l'échantillon est refroidi à température ambiante, l'intensité diminue légèrement et ne retrouve pas son niveau initial.

Un contrôle de l'influence de la température sur le Rouge Congo seul a été réalisé (figure III.39)

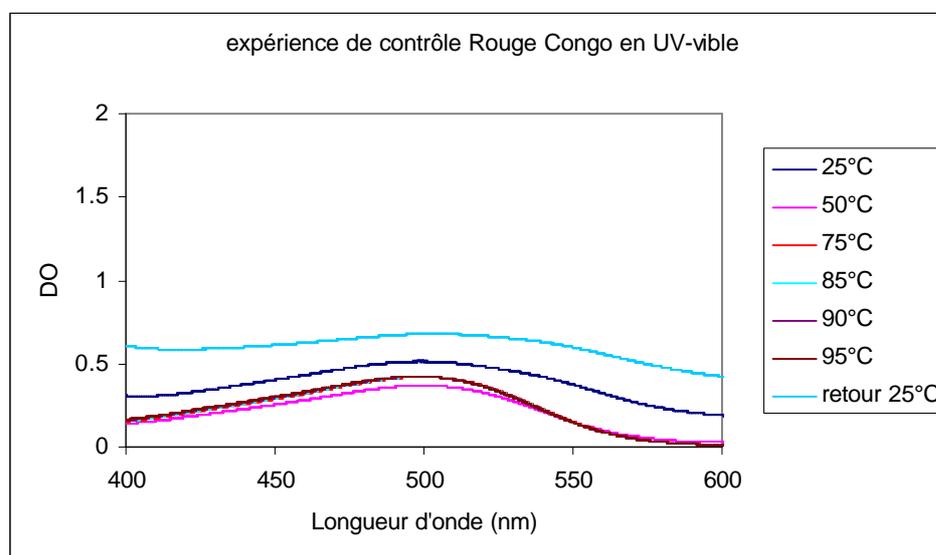


Figure III.39 : expérience de spectroscopie UV-visible en fonction de la température, Rouge Congo seul (50 µM) en tampon acétate 50µM pH 4.5 et 100 µM (NH₄)₂SO₄

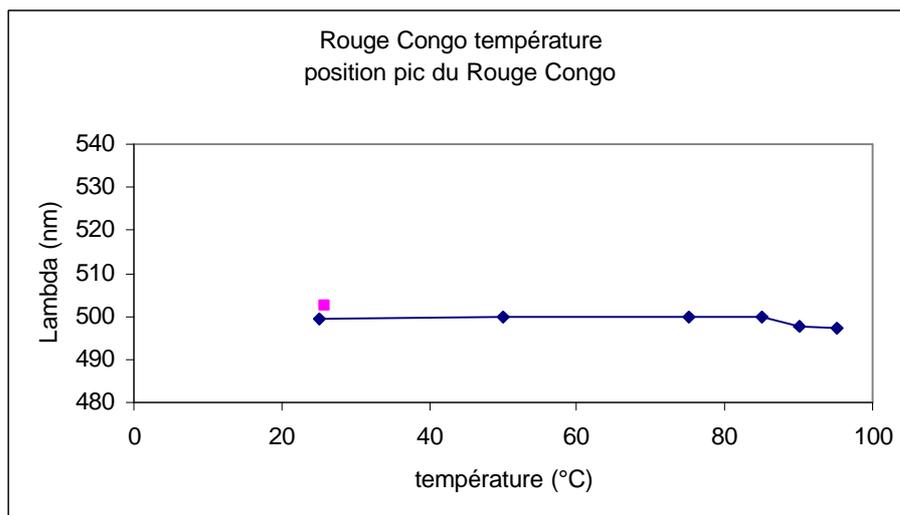


Figure III.40 : évolution du déplacement du pic du Rouge Congo seul en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

L'évolution du déplacement de la bande à 500 nm caractéristique du Rouge Congo libre décrit dans la figure III.40 ne montre pas de variation lorsque la température augmente jusqu'à 95°C.

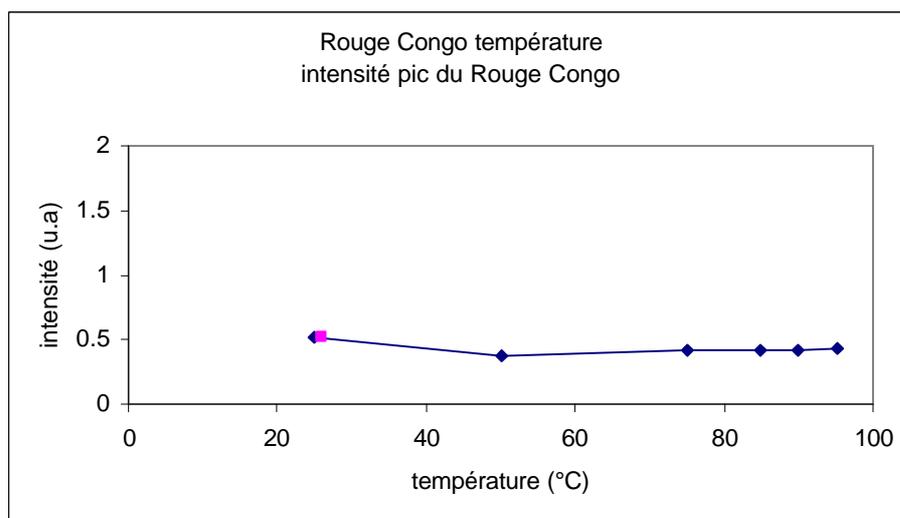


Figure III.41 : évolution de l'amplitude du pic du Rouge Congo seul en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

Aucune variation n'est détectée dans l'évolution de l'intensité de la bande à 500 nm lorsque la température augmente jusqu'à 95°C (figure III.41).

Nous avons procédé de la même manière pour les études en pression entre la pression atmosphérique et 6700 bar à température ambiante.

Les figures III.42 et 43 montrent l'influence de la pression sur la fixation du Rouge de Congo sur le BPTI.

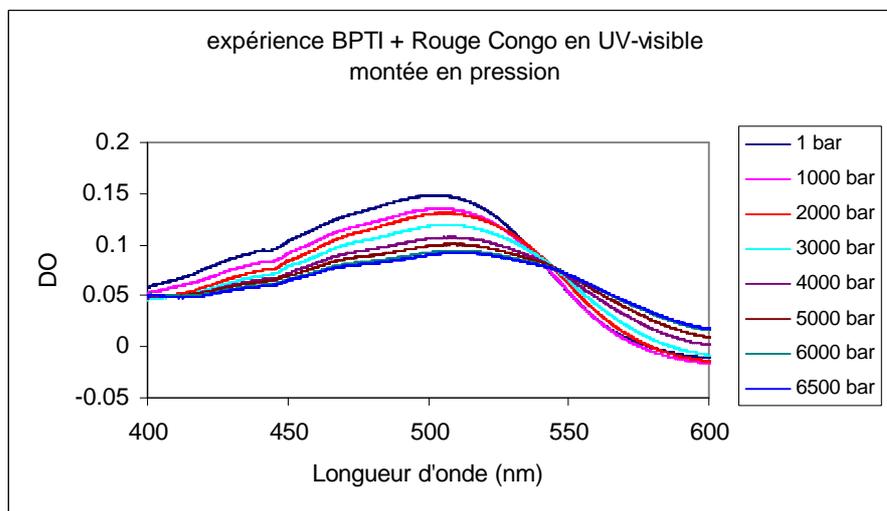


Figure III.42 : expérience en montée en pression en UV-visible en fonction de la pression. BPTI (50 μ M) + Rouge Congo (50 μ M) en tampon acétate (50 μ M) pH 4.5.

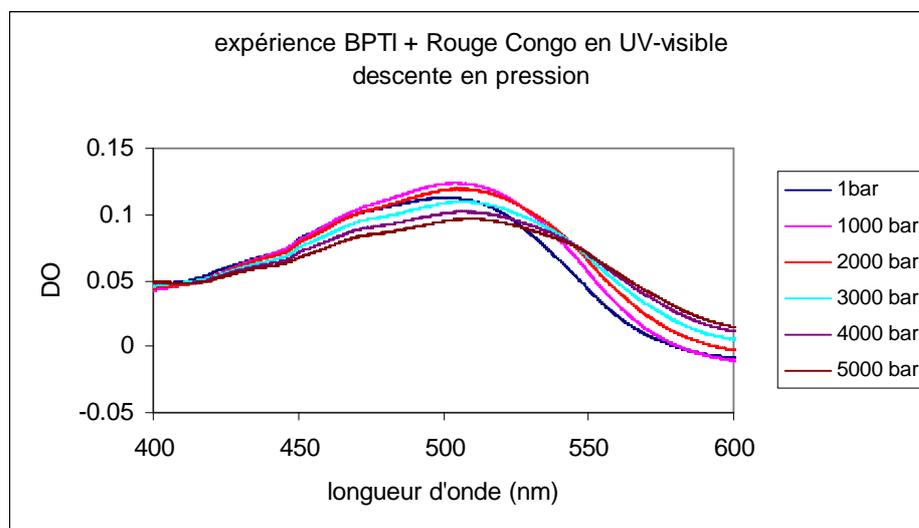


Figure III.43 : expérience en descente en pression en UV-visible en fonction de la pression. BPTI (50 μ M) + Rouge Congo (50 μ M) en tampon acétate (50 μ M) pH 4.5.

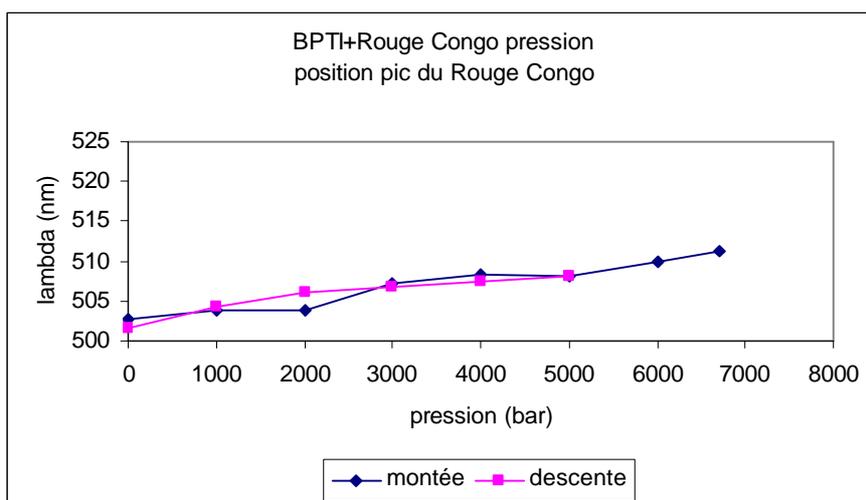


Figure III.44 : évolution du déplacement du pic du Rouge Congo en présence du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

Nous pouvons observer, sur la figure III.44, un déplacement de la bande de 502 nm vers 510 nm au fur et à mesure de l'application de la pression depuis la pression atmosphérique jusqu'à 6700 bar et ce phénomène est réversible.

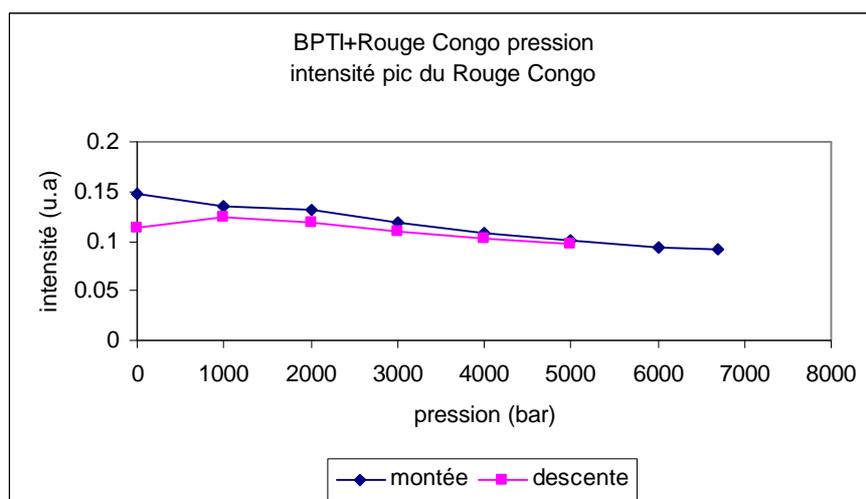


Figure III.45 : évolution de l'amplitude du pic du Rouge Congo en présence du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

L'évolution de l'amplitude de cette bande caractéristique du Rouge Congo en fonction de la pression appliquée (figure III.45) montre un léger effet de ce paramètre sur la sonde lorsqu'elle est en présence de BPTI et cette influence de la pression est-elle aussi quasi réversible entre 1 bar et 6700 bar.

La question qui se pose est la suivante : la pression n'induit-elle pas une modification du signal du Rouge Congo en agissant directement sur la sonde elle-même ?

Un contrôle de l'effet de la pression sur la sonde est décrit dans les figures III.46 et III.47.

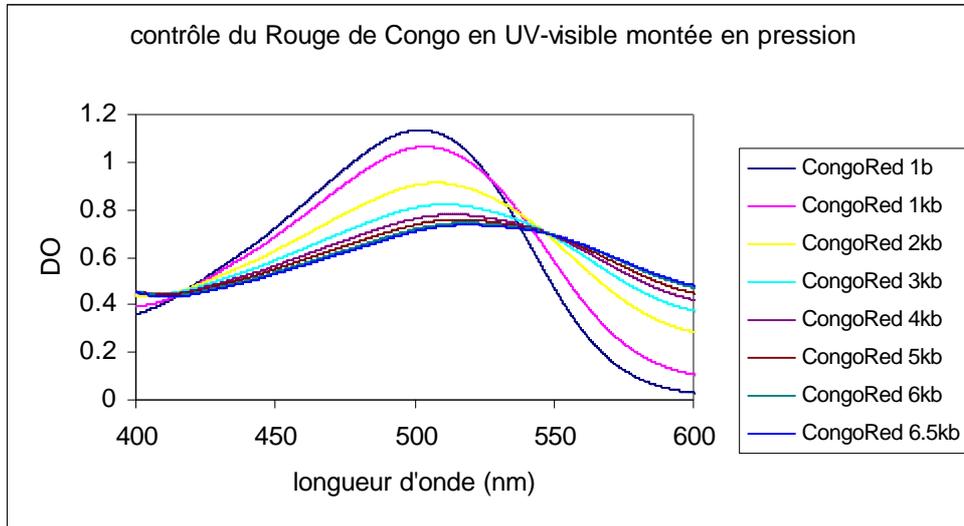


Figure III.46 : expérience en montée en pression en UV-visible. Rouge Congo ($50 \mu\text{M}$) seul en tampon acétate ($50 \mu\text{M}$) pH 4.5.

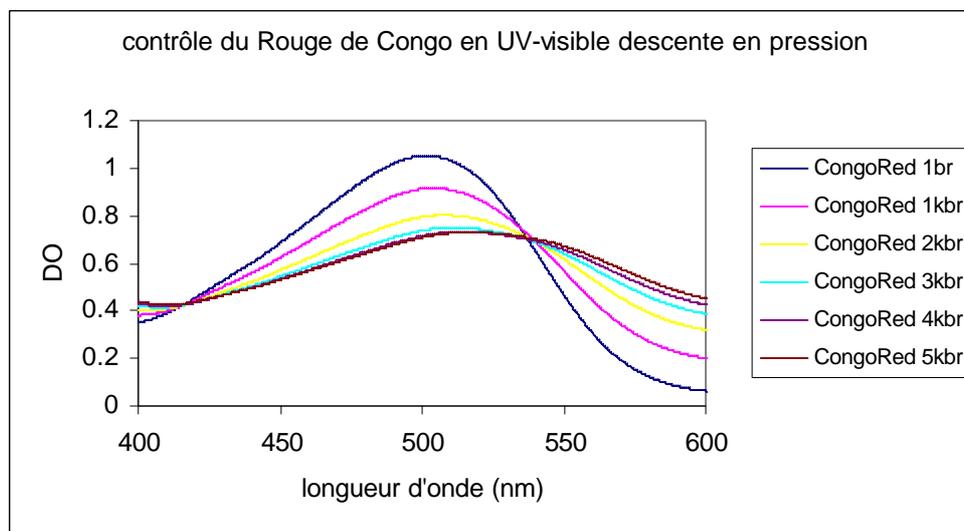


Figure III.47 : expérience en descente en pression en UV-visible. Rouge Congo ($50 \mu\text{M}$) seul en tampon acétate ($50 \mu\text{M}$) pH 4.5.

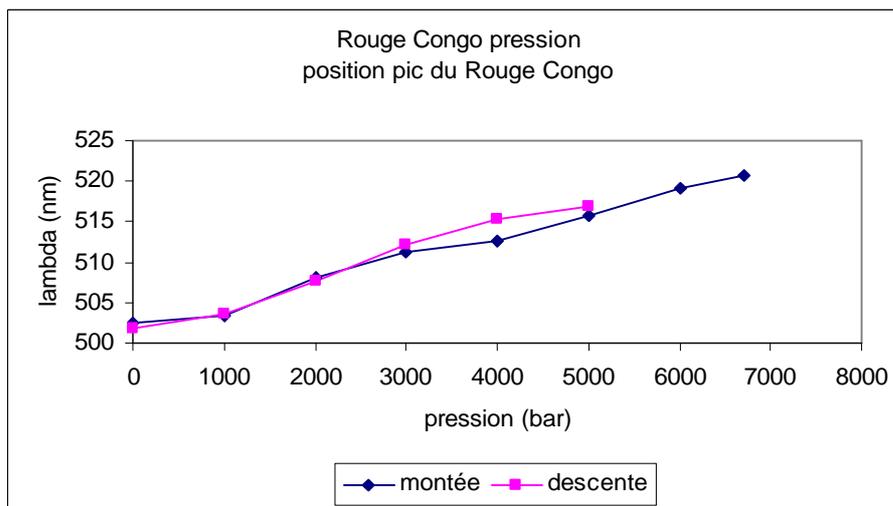


Figure III.48 : évolution du déplacement du pic du Rouge Congo seul en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.48 montre un déplacement réversible de la bande caractéristique du Rouge Congo entre 502 et 520 nm lorsque la pression augmente jusqu'à 6700 bar.

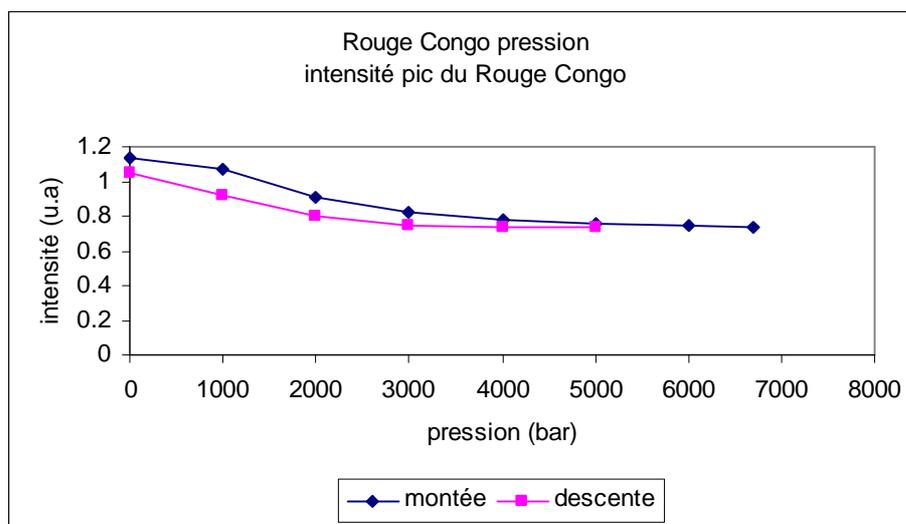


Figure III.49 : évolution de l'amplitude du pic du Rouge Congo seul en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.49 montre une diminution réversible de l'intensité de cette bande caractéristique du Rouge Congo lorsque la pression augmente jusqu'à 6700 bar.

(3) Discussion

Des expériences ont été réalisées en mettant en présence le Rouge Congo et le BPTI en fonction de la température.

La figure III.37, représentant l'évolution de la position de la bande à 500 nm caractéristique du signal du Rouge Congo en présence de BPTI, en fonction de la température, montre que la protéine change sa conformation à partir d'une température de 95°C. Ce changement dans la structure conformationnelle du BPTI permet la fixation du Rouge Congo dans la molécule et plus particulièrement au niveau de feuillets β nouvellement formés. En effet, lorsque l'échantillon est refroidi, la bande se déplace vers le rouge (« red shift ») à 535 nm montrant ainsi que l'environnement de la sonde est changé : le Rouge Congo s'est fixé au BPTI et s'est, plus exactement intercaler entre des feuillets β nouvellement formés. En effet, des expériences de fixation du Rouge Congo sur la poly-L-lysine ont montré que ce « red shift » est caractéristique de la formation de feuillets β ²².

La figure III.38, qui représente l'évolution de l'intensité de la bande du Rouge Congo en présence de BPTI, en fonction de la température, montre une augmentation régulière de l'intensité du signal relatif au Rouge Congo lorsque la température augmente jusqu'à 90°C. Des interactions doivent avoir lieu entre les sites spécifiques de fixation du Rouge Congo au sein de la protéine, à savoir les feuillets β et la sonde. Ces interactions n'évoluent plus entre 90 et 95°C, température à laquelle la protéine adopte une nouvelle conformation comme cela a été montré par spectroscopie Raman²³. Lorsque l'échantillon est ramené à température ambiante, l'intensité diminue faiblement et ne retrouve pas son niveau initial montrant ainsi que le Rouge Congo se trouve dans un nouvel environnement : la sonde s'est donc fixé à de nouveaux feuillets β .

Les expériences de contrôle sur le Rouge Congo seul en fonction de la température confirment ce phénomène (figures III.40 et III.41) puisque l'influence de la température sur la sonde seule dans le tampon est réversible.

Des expériences ont été réalisées en mettant en présence le Rouge Congo et le BPTI en fonction de la pression.

Les résultats ont montré une influence de la pression sur le signal relatif au Rouge Congo tant lorsqu'il est mis en présence du BPTI que lorsqu'il est libre dans la solution.

Nous pouvons dire que le BPTI sous pression jusqu'à 6700 bar ne forme pas de nouveaux feuillets β en quantité suffisante pour fixer la sonde.

La β agrégation ne constitue pas la seule modification structurale du BPTI lorsque cette protéine est soumise à une haute température ou à de hautes pressions. La structure du BPTI peut être observée par le biais de sondes intrinsèques que sont les résidus d'acides aminés aromatiques. L'inhibiteur possède en effet quatre phénylalanines et quatre tyrosines dans sa séquence primaire.

b) Expériences par Absorption UV-visible en dérivées 4^{ème}

Des expériences en 4^{ème} dérivé d'Absorption en UV-visible ont été réalisées sur le BPTI en solution en fonction de la température (figure III.48) et en fonction de la pression (figure III.52) afin d'observer l'influence de chacun de ces paramètres physiques sur l'environnement de ces tyrosines et de ces phénylalanines. Les résidus tyrosines émettent un signal caractéristique à une longueur d'onde autour de 285 nm, et les résidus phénylalanines ont un signal caractéristique vers 260 nm.

(1) Conditions expérimentales

Les mesures des spectres UV-visible en fonction de la température sont effectuées avec une solution de BPTI avec une concentration de 273 μ M dans des cellules Hellma avec un trajet optique de 10 mm.

Les mesures des spectres UV-visible en fonction de la pression sont effectuées avec une solution de BPTI avec une concentration de 469 μ M dans une cellule parallélépipédique en quartz de trajet optique de 5 mm introduit dans la bombe de haute pression décrite précédemment.

L'application des hautes températures et des hautes pressions est réalisée selon les mêmes méthodes que pour l'étude de la fixation du Rouge Congo.

Les mesures ont été effectuées sur un spectromètre d'absorption UV – visible Cary 3 E de Varian sur une gamme en longueur d'onde comprise entre 255 et 305 nm, le pas d'intégration en longueur d'onde est de 0.1 nm.

Nous avons considéré la différence de position de chacune de ces bandes à pression donnée par rapport à la pression atmosphérique, ainsi que leurs différences d'intensité relative.

(2) Résultats

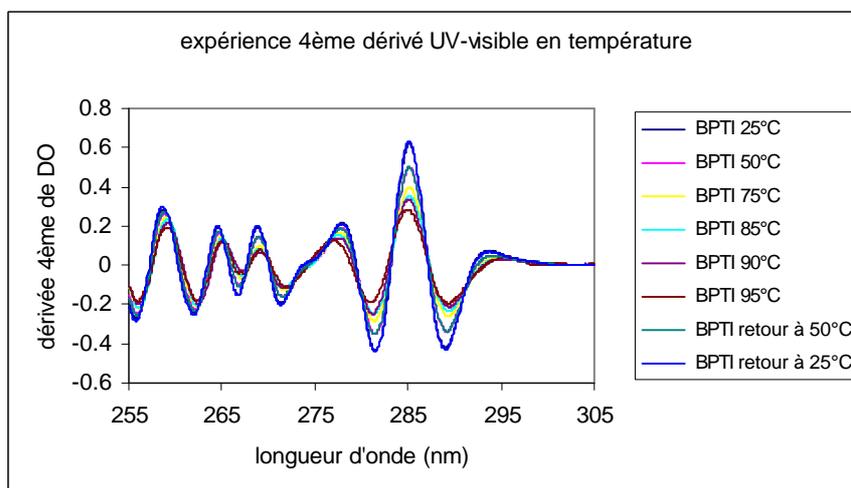


Figure III.50 : expérience de 4^{ème} dérivée UV-visible pour le BPTI en solution en fonction de la température.

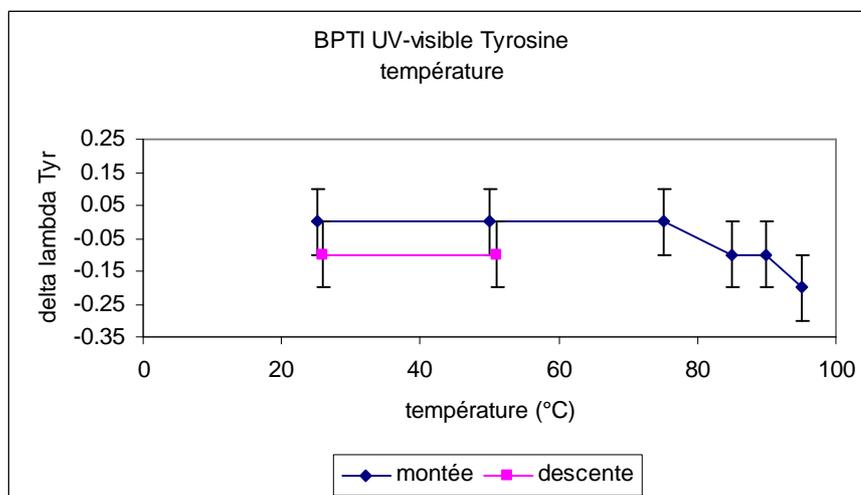


Figure III.51 : évolution du déplacement de la bande des tyrosines du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

La figure III.51 montre que la température a une influence sur l'environnement des tyrosines qu'à partir de 85°C jusqu'à 95°C puisque la bande caractéristique de ce résidu se déplace vers le bleu, soit un «blue shift ». Cette influence de la température est réversible dans la mesure où cette bande reprend sa position d'origine lorsque l'échantillon est refroidi à 25°C.

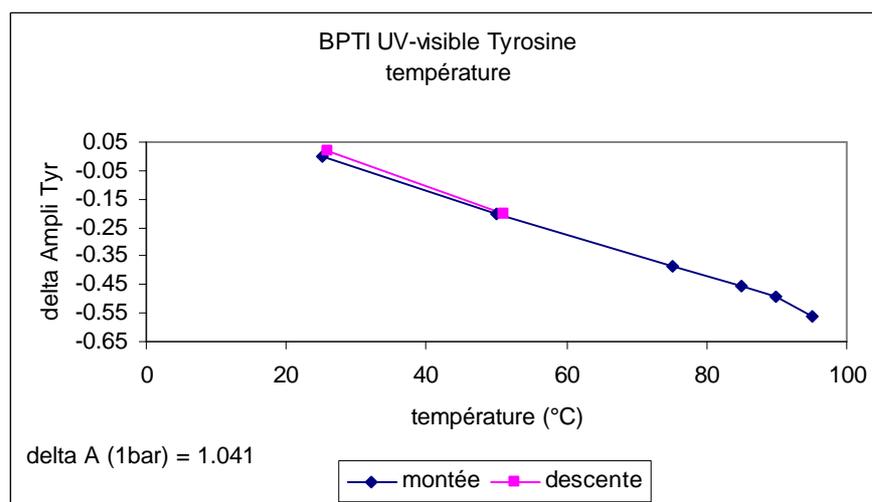


Figure III.52 : évolution de l'intensité de la bande des tyrosines du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

La figure III.52 qui présente l'évolution de l'intensité de la bande des tyrosines en fonction de la température montre une influence de ce paramètre sur l'environnement dans la mesure où l'intensité diminue ($\Delta I = -0.6$ u.a) au fur et à mesure de l'augmentation de la température jusqu'à 95°C. Ce phénomène est réversible car, lorsque l'échantillon est refroidi, l'intensité augmente pour revenir à son niveau initial.

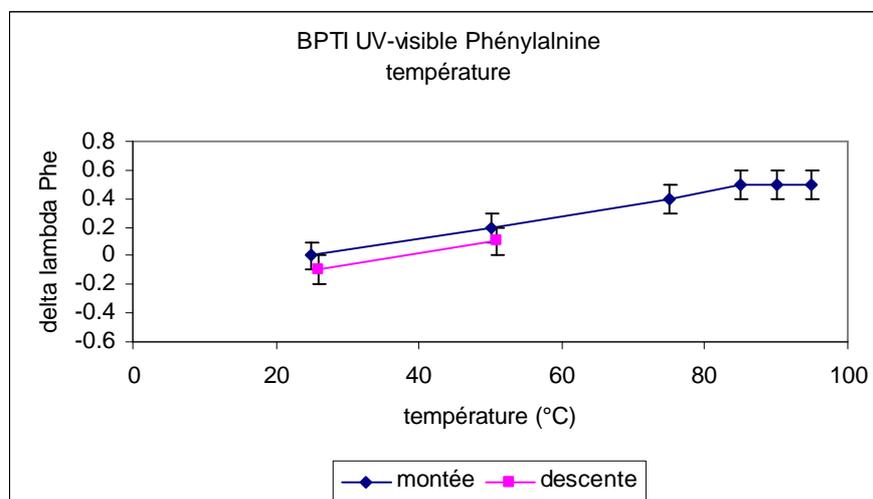


Figure III.53 : évolution du déplacement de la bande des phénylalanines du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

Nous pouvons voir, sur la figure III.53, que la température induit un déplacement de la bande caractéristique des phénylalanines vers le rouge, soit un «red shift», lorsque la température augmente jusqu'à 85°C. et ce «red shift» est conservé lorsque l'échantillon est porté jusqu'à 95°C. Ceci indique que ces résidus sont plus exposés au solvant et que, par conséquent, la protéine a adopté une nouvelle conformation à cette température. Mais ce

phénomène est réversible dans la mesure où, lorsque l'échantillon refroidi à 25 °C, la bande caractéristique de ce résidu aromatique revient pratiquement dans sa position initial.

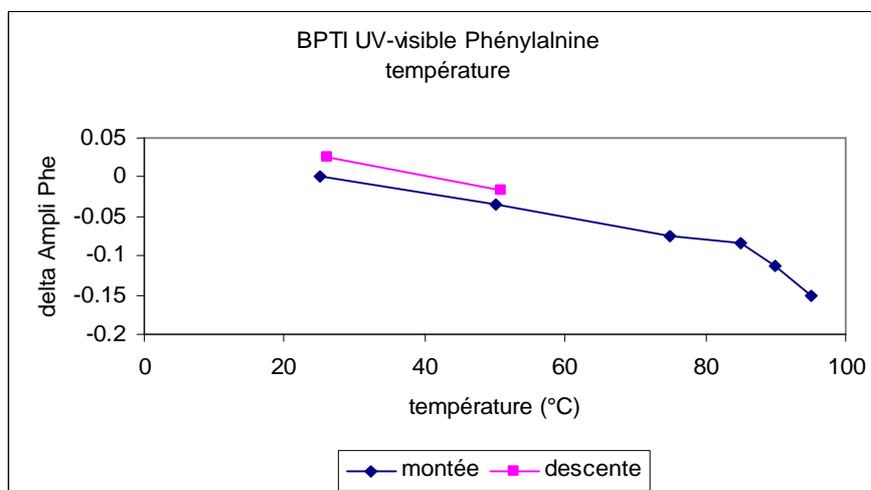


Figure III.54 : évolution de l'intensité de la bande des phénylalanines du BPTI en fonction de la température. En bleu : montée en température, rose : descente en température

La figure III.54 qui présente l'évolution de l'intensité de la bande des phénylalanines en fonction de la température montre une influence de ce paramètre sur l'environnement des résidus dans la mesure où l'intensité diminue régulièrement au fur et à mesure de l'augmentation de la température jusqu'à 85°C et cette diminution de l'intensité s'accroît à partir de cette température jusqu'à 95°C. Ce phénomène est réversible car, lorsque l'échantillon est refroidi, l'intensité augmente pour revenir à son niveau initial.

Les résultats des expériences sous pression sont présentés dans la figure III.55.

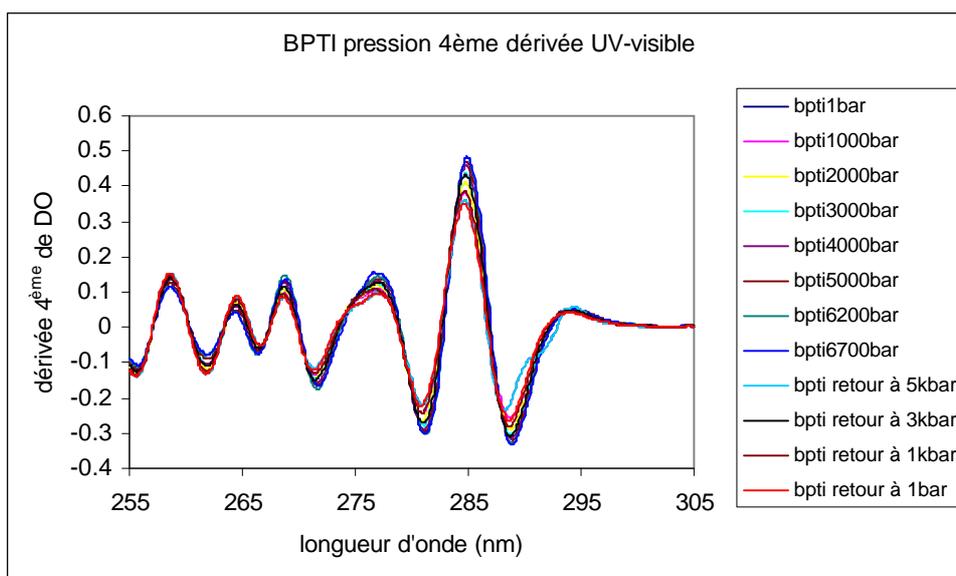


Figure III.55 : expérience de 4^{ème} dérivée UV-visible pour le BPTI en solution en fonction de la pression.

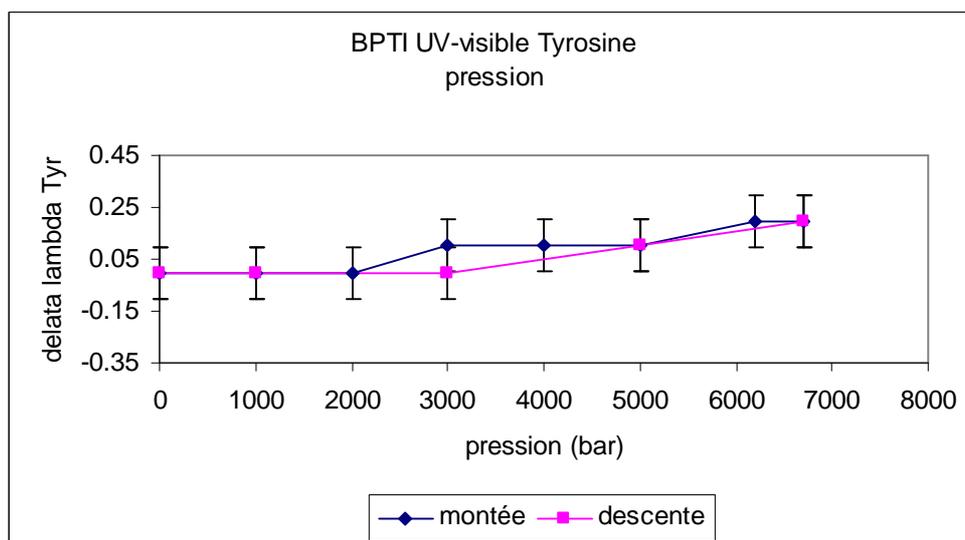


Figure III.56 : évolution du déplacement de la bande des tyrosines du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.56 montre que la pression a une influence sur l'environnement des résidus tyrosines du BPTI dès 3000 bar. En effet, la bande caractéristique des tyrosines se déplace vers le rouge, soit un « red shift ». En outre, le déplacement de cette bande en fonction de la pression présente une transition entre 5000 et 6000 bar où le « red shift » s'accroît. Ce phénomène est réversible car la bande caractéristique des tyrosines reprend sa position initiale lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique.

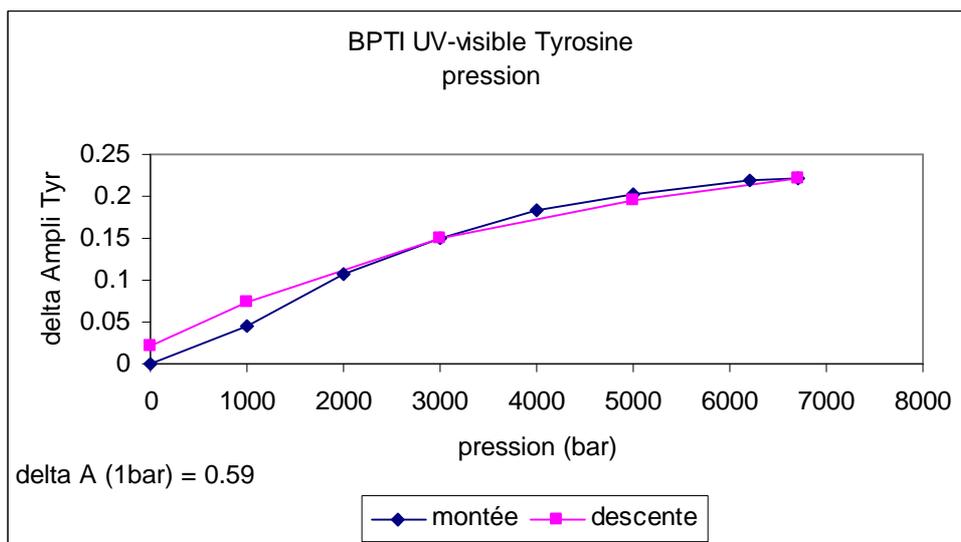


Figure III.57 : évolution de l'intensité de la bande des tyrosines du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.57 montre que la pression a une influence sur l'environnement des tyrosines dans la mesure où l'intensité de leur bande caractéristique augmente quand la pression augmente. Ce phénomène est réversible car l'intensité parcourt le même chemin lorsque la pression est ramenée à 1 bar.

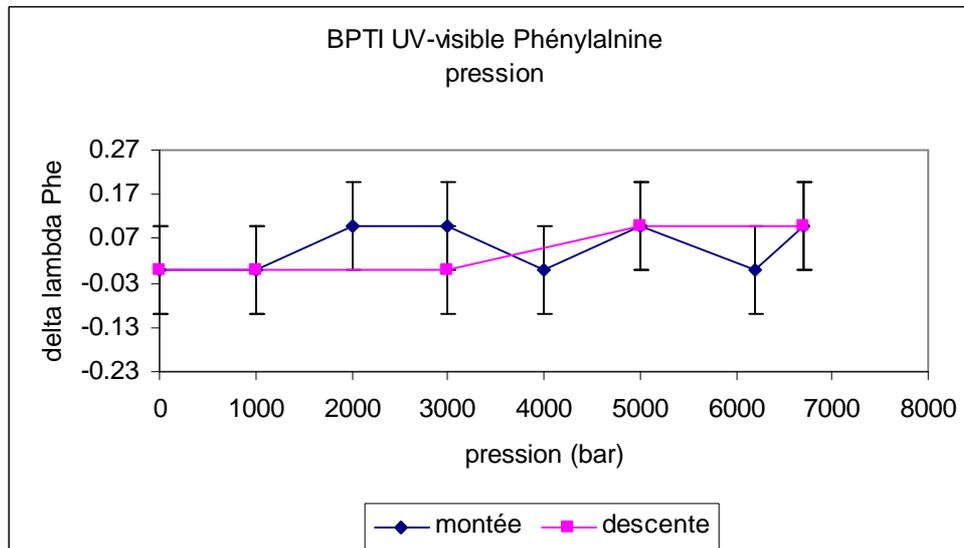


Figure III.58 : évolution du déplacement de la bande des phénylalanines du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.58 montre que la pression influence très peu l'environnement des phénylalanines : la différence de position de la bande caractéristique de ce résidu par rapport à la pression atmosphérique varie peu et reste dans la limite des barres d'erreurs.

Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique, la bande revient dans sa position initiale au cours de la descente en pression.

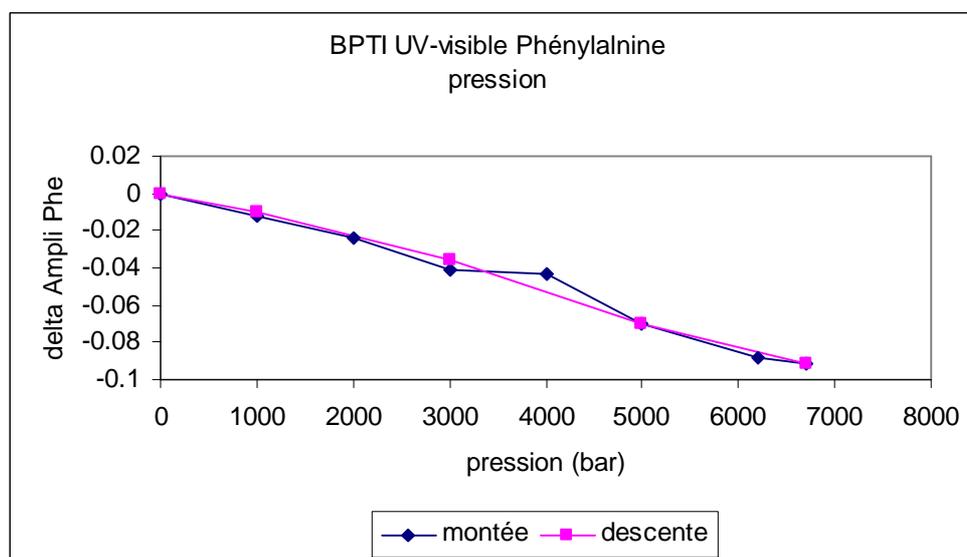


Figure III.59 : évolution de l'intensité de la bande des phénylalanines du BPTI en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.59 montre que la pression a une influence sur l'environnement des phénylalanines dans la mesure où l'intensité de leur bande caractéristique diminue quand la pression augmente. Ce phénomène est réversible car l'intensité parcourt le même chemin lorsque la pression est ramenée à 1 bar.

Comme pour les expériences de fixation du rouge Congo sur le BPTI, nous avons observé l'influence de la pression sur la sonde seule. Une solution de N-Acétyl phénylalanine ethyl-ester a été préparée à une concentration de 16 mM dans l'eau et soumise à des pressions allant de 1 bar jusqu'à 6000 bar. La figure III.60 représente la dérivée 4^{ème} du signal d'absorption de la N-Acétyl phénylalanine ethyl-ester à différentes pressions. Pour l'analyse des spectres, nous avons considéré la bande à 257 nm qui présente le maximum d'absorption.

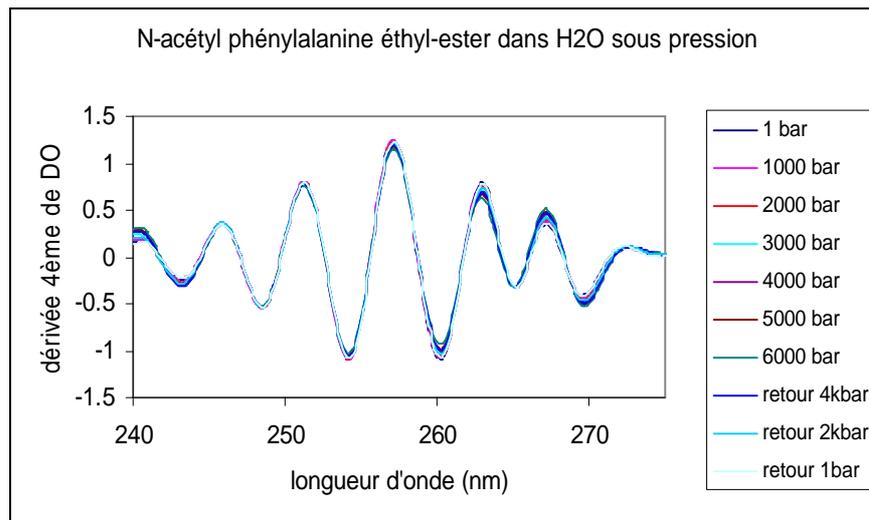


Figure III.60 : expérience de 4^{ème} dérivée UV-visible pour le N-Acétyl phénylalanine éthyl-ester en solution aqueuse en fonction de la pression.

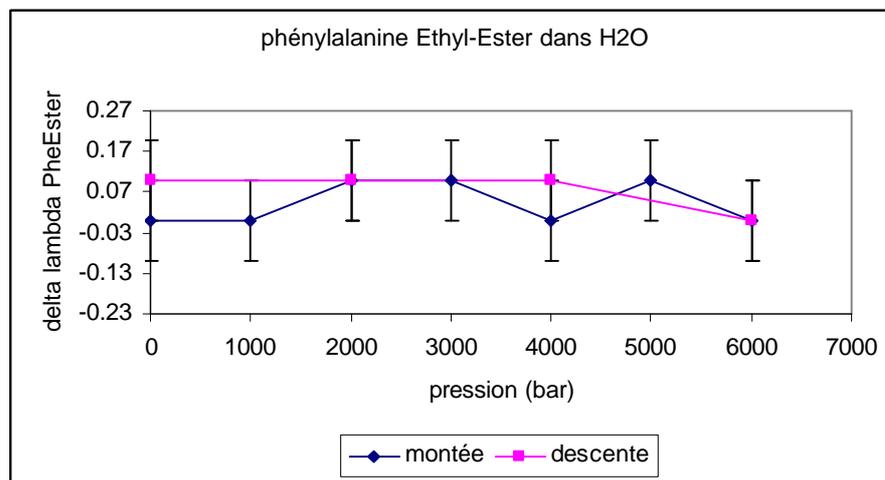


Figure III.61 : évolution du déplacement de la bande de N-Acétyl phénylalanine éthyl-ester en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.61 montre que la pression n'influence pas les transitions électroniques de la phénylalanine seule car aucun déplacement significatif de la bande à 257 nm n'est détecté au fur et à mesure de la pression appliquée.

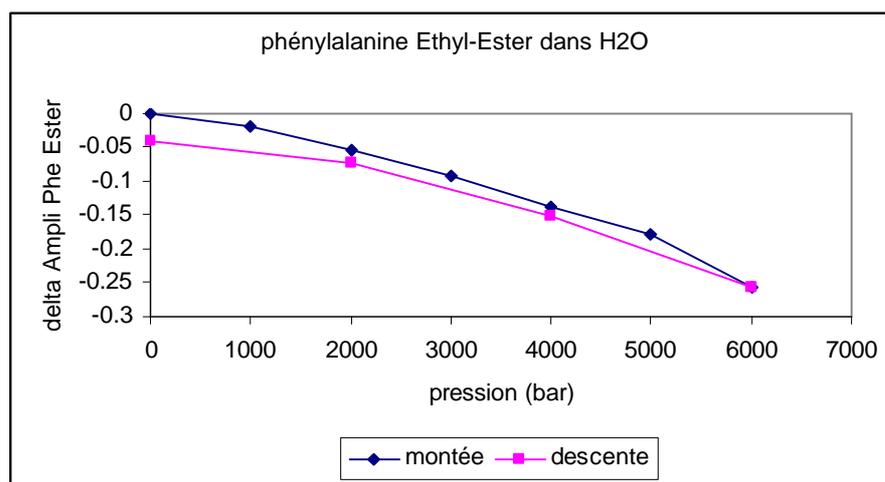


Figure III.62 : évolution de l'intensité de la bande N-Acétyl phénylalanine ethyl-ester en fonction de la pression appliquée. En bleu : montée en pression, rose : descente en pression

La figure III.62 montre que la pression a une influence sur N-Acétyl phénylalanine ethyl-ester dans la mesure où l'intensité de leur bande caractéristique diminue quand la pression augmente. Cette diminution est plus importante que pour les phénylalanines appartenant au BPTI (figure III.59). Ce phénomène est réversible car l'intensité parcourt le même chemin lorsque la pression est ramenée à 1 bar.

(3) Discussion

Pour comprendre l'effet précis de la température et de la pression sur ces résidus aromatiques et la raison pour laquelle ces paramètres agissent plus sur les phénylalanines que sur les tyrosines, il faut situer ces résidus dans la protéine. La figure III.63 présente la localisation des tyrosines et des phénylalanines dans le BPTI.

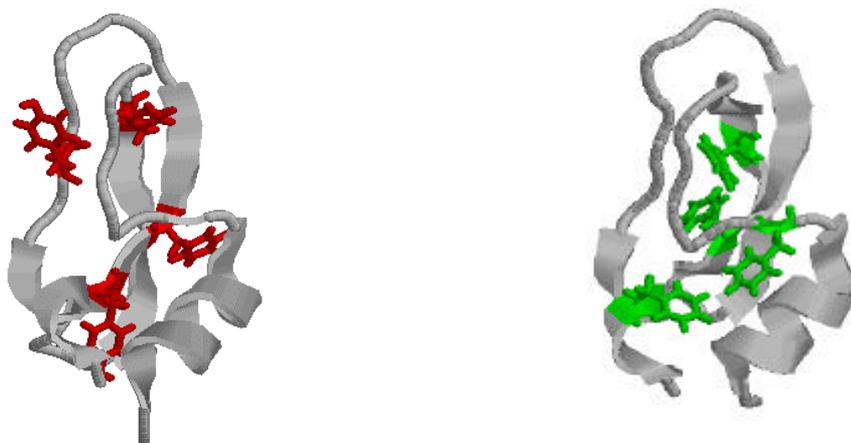


Figure III.63 : localisation des résidus phénylalanines (à gauche, en rouge) et des résidus tyrosines (à droite, en vert) dans le BPTI.

Nous pouvons constater que trois tyrosines sur quatre du BPTI sont situées sur les feuillettes β de la protéine. Les résidus phénylalanines se répartissent pour moitié, soit deux, sur chacun des feuillettes β , un sur l'hélice 3_{10} et le dernier sur une structure désordonnée reliant l'un des feuillettes β à l'hélice α .

Sur la base de ces informations, il nous est possible d'interpréter nos résultats.

D'après nos résultats d'étude de l'influence de la température sur l'environnement des résidus aromatiques, nous avons vu que la température n'induisait un déplacement de la bande caractéristique des tyrosines que de 0.2 nm vers le bleu entre la température ambiante et 95°C. La littérature indique que ce phénomène est dû à l'exposition de ces résidus au solvant, en effet, une diminution de la différence d'amplitude du signal caractéristique de ces résidus traduit une modification de la constante diélectrique du milieu²⁴ : en l'occurrence depuis un milieu hydrophobe vers un milieu hydrophile. Cette faible influence peut s'expliquer par le fait qu'étant placés sur des structures β plus rigides que les hélices ou les structures désordonnées, leur environnement n'est presque pas affecté.

Cependant l'intensité de cette bande des tyrosines diminue de manière significative ($\Delta I = 0.6$ u.a.) lorsque la température augmente entre 25 et 95 °C. Ceci peut s'expliquer par le fait que les structures autres que les feuillets β , c'est à dire les hélices α et surtout les structures désordonnées localisées plus en surface sont influencées par la température et leurs nouvelles conformations sont susceptibles d'influencer l'environnement des tyrosines localisées pour la plupart sur les feuillets β centraux. Les tyrosines du BPTI étant sur des structures plus rigides, ces résidus ne subissent que peu l'effet direct de la température. Et cette influence de la température est réversible dans la mesure où l'intensité de la bande des tyrosines revient à son niveau initial lorsque l'échantillon est refroidi à température ambiante.

La pression influence le déplacement de la bande caractéristique des tyrosines dès 3000 bar et induit un déplacement vers le rouge. L'environnement de ces résidus, situés pour la plupart d'entre eux au niveau du cœur du BPTI, est donc modifié à partir de cette valeur de la pression. La caractéristique hydrophobe du milieu est accentué et ce changement d'environnement, qui se maintient jusqu'à 5000 bar, est probablement dû à une compaction de cœur hydrophobe comme cela a été décrit dans la littérature par des expériences de R.M.N.²⁵. Lorsque la pression augmente jusqu'à 6700 bar, le déplacement de cette bande caractéristique se maintient. Cette transition entre 5000 et 6000 bar a déjà été décrite dans des expériences en infrarouge¹⁷. Et cette influence de la pression est réversible car la bande revient dans sa position initiale lorsque l'échantillon est ramené à la pression atmosphérique.

La pression exerce aussi une influence sur l'intensité de la bande caractéristique des tyrosines entre la pression atmosphérique et 6700 bar : cette intensité augmente au fur et à mesure de l'application de la pression indiquant que ces résidus sont un peu plus exposés au solvant. Sachant que la plupart des tyrosines se situent au niveau des feuillets β au cœur de la protéine, ce phénomène est probablement dû au dépliement partiel des structures en hélices et des structures désordonnées situées plus en surface. Et cette influence de la pression est réversible dans la mesure où l'intensité de la bande des tyrosines revient à son niveau initial lorsque la pression est relâchée.

La pression induisant une compaction du cœur de la protéine essentiellement constitué par des structures β , ainsi qu'une modification conformationnelle des structures désordonnées et des hélices situées plus en surface, l'environnement des résidus tyrosines est donc modifié de manière réversible par l'action de la pression.

L'influence de la température a été étudiée sur l'environnement des résidus phénylalanines du BPTI. La bande caractéristique de ces résidus aromatiques se déplace régulièrement de 0.4 nm vers le rouge au fur et à mesure de l'augmentation de la température jusqu'à 85°C. L'interprétation de ce phénomène est difficile car des effets de la température sur le solvant peuvent conduire à une baisse de l'énergie des états d'excitation du cycle aromatique de cet acide aminé. Il faudrait observer l'influence de la température sur la phénylalanine seule pour pouvoir émettre une explication. Ce « red shift » se maintient lorsque l'échantillon est porté à une température de 95°C confirmant ainsi une modification significative de l'environnement de ces résidus situés sur des structures désordonnées et l'hélice α . Et cette influence de la température sur l'environnement des phénylalanines est réversible dans la mesure où sa position initiale est retrouvée lorsque l'échantillon est refroidi à 25°C.

L'intensité de cette bande diminue aussi lorsque la température augmente mais de manière moins évidente que pour les tyrosines. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces résidus, situés sur des structures plus accessibles que les tyrosines, émettent déjà un signal conséquent à température ambiante, et leur degré d'exposition varie peu lorsque l'échantillon est chauffé.

L'environnement des phénylalanines a été observé en fonction de la pression appliquée entre 1 bar et 6700 bar. La bande caractéristique de ce résidu subit très peu l'influence de la pression. Et cet effet est réversible dans la mesure où la bande revient dans sa position initiale lorsque la pression est relâchée. La pression a donc peu d'influence sur l'environnement des phénylalanines localisées sur les structures désordonnées et les hélices dans cette gamme de pression.

L'intensité de cette bande diminue lorsque la pression augmente mais de manière moins évidente que pour les tyrosines et surtout de manière moins importante que pour la phénylalanine seule. Néanmoins, cette diminution de l'intensité, aussi faible soit-elle, peut être la conséquence d'une compaction de la protéine et d'une rentrée de molécules d'eau à leur proximité.

Nous avons observé l'influence de la pression sur la phénylalanine seule dans l'eau. Ce paramètre n'a que très peu d'influence sur le résidu aromatique en terme de déplacement de la bande caractéristique à 257 nm. La pression a un effet sur l'intensité d'absorption de la bande : sa diminution en fonction de la pression appliquée est près de trois fois plus

importante que pour le signal des phénylalanines dans le BPTI. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène serait un empilement des acides aminés aromatiques ; en effet, la pression va agir au niveau intermoléculaire en expulsant l'eau entre les phénylalanines et créer pour chacun de ces résidus un environnement hydrophobe. Dans le cas du BPTI les quatre résidus phénylalanines sont engagés dans des liaisons peptidiques qui empêchent ce phénomène d'empilement.

Nos résultats en spectroscopie UV-visible confirment la modification de la structure du BPTI au niveau des structures secondaires, observée dans la littérature et dans nos expériences.

F. Conclusion sur l'influence de la température et de la pression sur la structure du BPTI en solution.

Ainsi nos études structurales sur le BPTI en solution en fonction de la température ont permis de confirmer certains résultats de la littérature par spectroscopie Raman².

La diffusion de neutrons aux petits angles a montré une augmentation du rayon de giration de la protéine lorsque la température de l'échantillon est portée à 95°C.

Des expériences en infrarouge ont permis d'attribuer ce changement dans la structure globale de l'inhibiteur à un phénomène de β agrégation. De plus un recouvrement partiel des structures en hélices a pu être confirmé par ces expériences.

Les études de l'influence de la pression par diffusion de neutrons aux petits angles ont aussi montré une modification au niveau du rayon de giration, à savoir une réduction de sa valeur lorsque la protéine est soumise à une pression de 6000 bar et surtout un changement irréversible dans la forme du BPTI qui adopte une conformation plus sphérique qu'ellipsoïdale après relâchement de la pression jusqu'à la pression atmosphérique.

L'étude par spectroscopie UV – visible, et les expériences de fixation d'un intercalant des feuilletts β , le Rouge Congo, nous ont permis de différencier l'influence de la température de l'influence de la pression sur la structure du BPTI. Le phénomène de β - agrégation provoqué par les hautes température a été confirmé par ces résultats. En effet, nous avons pu montrer que le BPTI forme de nouveaux feuilletts β si la protéine en solution est portée à une température de 95°C puis refroidie à température ambiante.

L'étude la fixation du Rouge Congo en fonction de la pression ne donne pas le même résultat qu'en fonction de la température. En effet, une pression de 6700 bar ne permet pas la formation de feuillets β , ou du moins de façon irréversible.

Une étude en 4^{ème} dérivée d'absorption UV – visible a montré un effet antagoniste de la température et de la pression sur l'environnement des résidus tyrosines du BPTI. En effet, l'analyse du déplacement de la bande caractéristique de cet acide aminé aromatique a montré que la température provoquait l'exposition de ces résidus au solvant tandis que la pression induisait une augmentation du caractère hydrophobe de leur environnement par la compaction du BPTI. Sachant que les tyrosines sont situées pour la plupart sur les feuillets β centraux de la protéine, la compaction concerne surtout ce cœur hydrophobe du BPTI comme cela a été montré par R.M.N.²³. L'analyse des résultats concernant les phénylalanines est plus difficile dans la mesure où ce résidu aromatique présente le même comportement qu'il soit lié à la protéine ou qu'il soit libre en solution.

-
- ¹ Tanaka S., Ataka M., Onuma K., Astier J.P., et Veessler S., *J. Cryst. Growth*, **237-239**, 2002, pp 289-294.
- ² Cotton J.P. Neutron, X-Ray and Light Scattering, Elsevier science Publishers B.V. 1991, pp 3-31
- ³ Calmettes P., Durand D., Desmadril M, Minard P, Receveur V, and Smith J.(1994). How random is a highly denatured protein ? *Biophys. Chem* **53**,105-114
- ⁴ J. G. Powles, *The structure of molecular liquids by neutrons scattering*, advances in physics, **22**, 1973, pp 1-56.
- ⁵ Budayova-Spano M., Lafont S., Astier J.P., Ebel C., et Veessler S., *J. of Cryst Growth*, **217**, 2000, pp 311-319.
- ⁶ Des Cloiseaux, *Macromolecules*, **6**, 1973, pp 403-407
Jaenicke J. R. Role of accessory proteins in protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* **53**, 1993, pp104- 112
- ⁷ Yvon J., Les corrélations et l'entropie en mécanique statistique classique, Dunod, Paris 1966, pp 161-162
- ⁸ Douglas J. F. et Freed K. F., *Macromolecules* **17**, 1985, pp 1854-1870
- ⁹ Heremans K., et Smeller L., *BBA*, **1386**, 1998, pp 353-370.
- ¹⁰ Goosens K, Smeller L, Frank J, Heremans K, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1996 , pp 254-262, Wroblowski B., Diaz J.F., Heremans K., et Engelborghs Y., *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* , **25**, 1996, pp 446-455.
- ¹¹ Gibrat G. *rapport de stage de DEA physique des Solides*, Paris XI : Etude de la dénaturation thermique de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (BPTI).
- ¹² Loupiac C, Bonetti M, Pin S, Calmettes P, *Eur. J. Biochem.*, **269**(19), 2002, pp 4731-4737
- ¹³ Bridgman P.W., *J. Chem. Phys.* **3**(10), 1935, pp 597-605
- ¹⁴ Kitchen D.B., Reed L.H., Levy R.M., *Biochemistry*, **31**, 1992, pp 10083-10093.
- ¹⁵ Gekko K. et Noguchi H., *J. Phys. Chem.*, **83**, 1979, pp 2706-2714.
- ¹⁶ Pedersen J.S., Svaneborg C., Almdal K., Hamley I.W., et Young R.N., *Macromolecules*, **36**, 2003, pp 416-433.
- ¹⁷ Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., et Woodward C.K., *Protein Science*, **8**, 1999, pp 1946-1953
- ¹⁸ Williamson M.P., Akasaka K, Refaee M., *Protein Science*, **12**, 2003, pp 1971-1979

-
- ¹⁹ Takeda N, Nakano K, Kato M, Taniguchi Y, *Biospectroscopy*, **4**, 1998, pp 209-216
- ²⁰ Svergun D.I., Richard S., Koch M.H.J., Sayers Z., Kuprin S., et Zaccai G., *P.N.A.S.*, **95**, 1998, pp 2267-2272.
- ²¹ Cao A., Hu D., Lai L., *Protein Sci.*, **13**(2), 2004, pp319-324
- ²² Sabaté R., Estelrich J., *Inter. J. Biol. Macromol.*, **32**, 2003,pp 10-16.
- ²³ Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003,pp137 –143
- ²⁴ Lange R., Frank J., Saldana J.-L., et Balny C., *Eur Biophys J*, **24**, 1996, pp 277 –283
- ²⁵ Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., et Woodward C.K., *Protein Science*, **8**, 1999, pp 1946-1953

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA PRESSION SUR LA DYNAMIQUE DU BPTI : UNE ETUDE PAR DIFFUSION QUASI ELASTIQUE DE NEUTRONS.

IV. Influence de la température et de la pression sur la dynamique du BPTI. Une étude par diffusion quasi-élastique de neutrons.....	177
A. Matériels et méthodes.....	177
1. Préparation des échantillons et traitement des données.....	177
a) Poudres hydratées.....	177
b) Solution.....	178
B. Etude de l'influence de la température.....	180
1. Etude à basse résolution.....	180
a) Cas des solutions.....	180
2. Etude à haute résolution.....	193
a) Etude d'une poudre hydratée de BPTI.....	194
b) Etude du BPTI en solution.....	200
C. Etude de l'influence de la pression.....	205
1. Etude a basse résolution.....	205
a) Analyse à l'aide d'une exponentielle étirée.....	207
b) Analyse à l'aide d'une somme d'exponentielles.....	209
2. Etude à haute résolution.....	216

Une fois la structure tridimensionnelle adoptée, les protéines impliquées dans l'activité catalytique nécessitent une flexibilité interne qui se déroule à une échelle spatiale de l'ordre de l'angström et à une échelle de temps inférieure à la minute. Cette échelle de temps couvre une gamme depuis la femtoseconde pour les réarrangements électroniques, en passant par la picoseconde à la nanoseconde pour les fluctuations thermiques, par la milliseconde pour les changements conformationnels, jusqu'à la seconde et la minute pour les cinétiques et les divisions cellulaires.

La diffusion quasi-élastique de neutrons permet de sonder ces mouvements à l'échelle de la picoseconde jusqu'à la nanoseconde.

IV. Influence de la température et de la pression sur la dynamique du BPTI. Une étude par diffusion quasi-élastique de neutrons.

A. Matériels et méthodes

1. Préparation des échantillons et traitement des données

a) Poudres hydratées

Les échantillons de protéine en poudre hydratée sont utilisés car ils permettent de s'affranchir du mouvement de diffusion de la protéine et limitent la contribution du signal de l'eau dans le spectre de diffusion total. Ainsi on accède directement à la dynamique interne de la protéine.

- lyophilisation

Afin de toujours partir du même état d'hydratation, la protéine est préalablement lyophilisée avant d'être hydratée. Pour cela la protéine est tout d'abord mise en solution à une concentration d'environ 5mg/ml dans un tampon acide acétique deutéré 50mM dans D₂O avec 100 mM de sulfate d'ammonium, pD 4.5. La solution de protéine est alors lyophilisée. Pour cela, le volume étant d'environ 100 ml, on trempe la solution par de l'azote liquide, avant de sublimer l'eau. Quand toute l'eau est sublimée, la poudre de protéine est soumise à un vide secondaire actif de 10⁻⁴ atm pendant quelques jours. A partir de cette étape, la protéine lyophilisée est manipulée sous atmosphère sèche d'hélium. Ceci afin de prévenir l'adsorption d'eau par la protéine et de définir parfaitement l'état d'hydratation initial.

- hydratation

Les cellules utilisées pour la diffusion de neutrons sont remplies par la protéine sèche sous atmosphère à hygrométrie contrôlée (< 5 %). La quantité de protéine sèche varie de 150 à 400 mg suivant la cellule et l'expérience que l'on veut faire. La cellule remplie est mise sous une cloche en présence d'eau liquide (eau légère ou lourde suivant l'expérience). La cloche est alors soumise à un vide primaire. Le vide actif est ensuite arrêté. L'eau s'évapore alors jusqu'à ce que l'équilibre liquide-gaz soit atteint dans l'enceinte fermée. L'hydratation se fait à pression constante, égale à la pression de vapeur saturante de l'eau à température ambiante. La protéine, hydrophile, adsorbe l'eau rapidement. On atteint un taux d'hydratation de 0,35 g/g de protéine sèche en ~4 heures dans le cas du BPTI, comptée lorsque la pression de vapeur saturante est atteinte. Le contrôle de l'hydratation se fait par la pesée, et par différence entre la masse de la poudre hydratée et de la poudre sèche. Lorsque l'hydratation est atteinte, la cellule est fermée. Un joint en indium assure l'étanchéité de la cellule. Nous avons utilisé pour nos expériences des cellules rectangulaires IN13 de 4 cm * 3 cm avec une épaisseur de 0.5 mm.

Dans le cas des scan élastiques, le signal de l'échantillon, c'est à dire de la poudre hydratée dans la cellule, est soustrait de la cellule vide, puis normalisé au vanadium comme il est décrit dans la relation suivante :

$$I_E(Q,T) = \frac{\frac{I_{E+C}(Q,T)}{M_{E+C}} - \frac{I_C(Q,T_C)}{M_C}}{\frac{I_{V+C}(Q,T_V)}{M_{V+C}} - \frac{I_C(Q,T_C)}{M_C}} \quad (4.1)$$

où I, M et T indiquent respectivement l'intensité diffusée, le moniteur et la température de l'échantillon considéré. E : échantillon, C : cellule, V : vanadium.

b) Solution

La solution de protéine est préparée de la même manière que pour les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles.

La solution de protéine et son tampon sont introduits dans une cellule d'aluminium de type cylindre creux puis mesurés à trois température : 280 K, 300 K et 363 K.

Le traitement des données s'effectue de la manière suivante grâce au programme LAMP de l'ILL : afin d'obtenir le facteur de structure dynamique de la molécule de BPTI

$S(q, \omega)_{\text{BPTI}}$ sans avoir la contribution ni de la cellule, ni de celle du tampon dans lequel est préparée la solution de protéine, nous considérons :

$$S(q, \omega)_{\text{BPTI}} = (S(q, \omega)_{\text{solution}} - S(q, \omega)_{\text{CV}}) - \alpha * (S(q, \omega)_{\text{tampon}} - S(q, \omega)_{\text{CV}}) \quad (4.2)$$

Où $S(q, \omega)_{\text{solution}}$, $S(q, \omega)_{\text{tampon}}$, et $S(q, \omega)_{\text{CV}}$, sont les facteurs de structure dynamique de la solution de BPTI dans son tampon et dans la cellule, du tampon dans la cellule, et de la cellule vide respectivement ; α est un coefficient calculé à partir du volume spécifique de la protéine et permet de considérer le volume occupé par la protéine dans la solution. Le programme LAMP reprend les valeurs expérimentales à pas constant en vecteur de diffusion q et en énergie ω .

Le traitement des données des expériences sous pression s'effectue de la manière suivante :

Afin d'obtenir le signal de la molécule de BPTI sans avoir la contribution ni de la cellule, ni de celle du tampon dans lequel est préparée la solution de protéine, nous considérons :

$$S(q, \omega)_{\text{BPTI}} = (S(q, \omega)_{\text{solution}} - C_1 * S(q, \omega)_{\text{CV}}) - \alpha * (S(q, \omega)_{\text{tampon}} - C_2 * S(q, \omega)_{\text{CV}}) \quad (4.3)$$

Où C_1 et C_2 sont des coefficients calculés sur la base de la transmission de la solution et du tampon respectivement ; α est un coefficient calculé à partir du volume spécifique de la protéine et permet de considérer le volume occupé par la protéine dans la solution.

Nous avons tenté, au cours de ces expériences, d'obtenir les fonctions intermédiaires de diffusion incohérente du BPTI à partir des facteur de structure dynamique. La motivation essentielle de cette approche est l'observation des temps caractéristiques des mouvements de la protéine en fonction de la température et de la pression.

Une transformée de Fourier est réalisée par l'option Fast Fourier Transform du logiciel MATLAB, sur les spectres de $S(q, \omega)_{\text{BPTI}}$ afin d'obtenir la fonction intermédiaire de diffusion incohérente $I(q,t)_{\text{BPTI}}$.

B. Etude de l'influence de la température

1. Etude à basse résolution

Le spectromètre de diffusion quasiélastique de neutrons IN6 (ILL, Grenoble) à la résolution adoptée ($\lambda = 5.12 \text{ \AA}$, FWHM = 84.5 \mu eV) permet d'accéder à une échelle de temps de l'ordre de 10 picosecondes.

a) Cas des solutions

Les expériences ont été réalisées sur le spectromètre IN6 sur les solutions de BPTI en condition acide. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour l'étude structurale : le BPTI, acheté sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich (A-4129), est solubilisé en tampon d'acide acétique deutéré (Eurisotop) 50 mM dans D₂O avec 100 mM de sulfate d'ammonium. La solution est filtrée puis dialysée contre le même tampon pendant 24 à 48 heures afin d'échanger les protons labiles de la protéine contre les deutérons du tampon. La solution est ensuite concentrée grâce à des tubes de Centricons 3kDa MWCO afin d'obtenir la solution de BPTI la plus concentrée. Nous obtenons une solution de BPTI à 85 mg/ml.

Nous avons étudié l'influence de la température à 280 K, 300 K, et à 363 K sur la dynamique globale et interne du BPTI en solution à 85 mg/ml.

Les spectres des facteurs de structure dynamique du BPTI à 280 K, 300K, et à 363 K sont représentés sur la figure IV.1. Nous pouvons observer un élargissement de la largeur à mi-hauteur des spectres lorsque la température augmente de 280 K à 363 K.

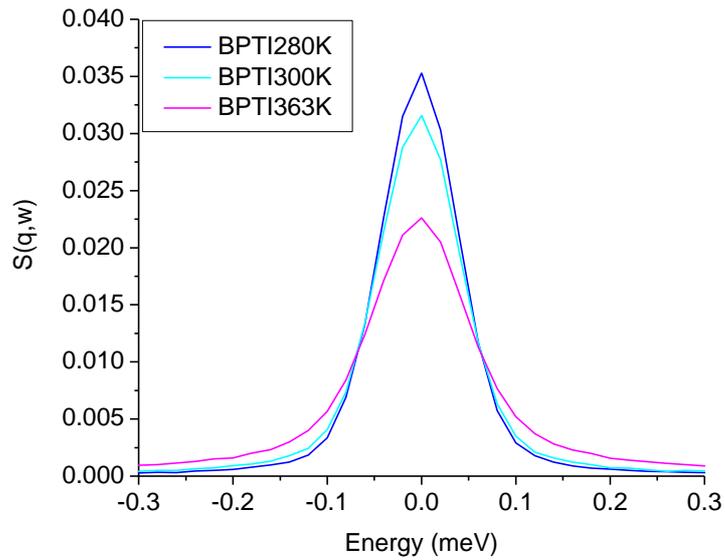


Figure IV.1 : représentation graphique du facteur de structure dynamique du BPTI en solution issu de l'expérience de diffusion quasiélastique de neutrons sur IN6 ($\lambda = 5.12 \text{ \AA}$, résolution de 84.5 \mu eV) à 280 K (bleu foncé), 300 K (bleu clair), et 363 K (magenta) à $q = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$.

Les spectres des fonctions intermédiaires de diffusion incohérente pour le BPTI à 280 K, 300K, et à 363 K sont représentés sur la figure IV.2. Comme nous pouvons le constater sur cette figure, il se produit une décroissance plus rapide de $I(q, t)$ lorsque la température augmente de 280 K à 363 K.

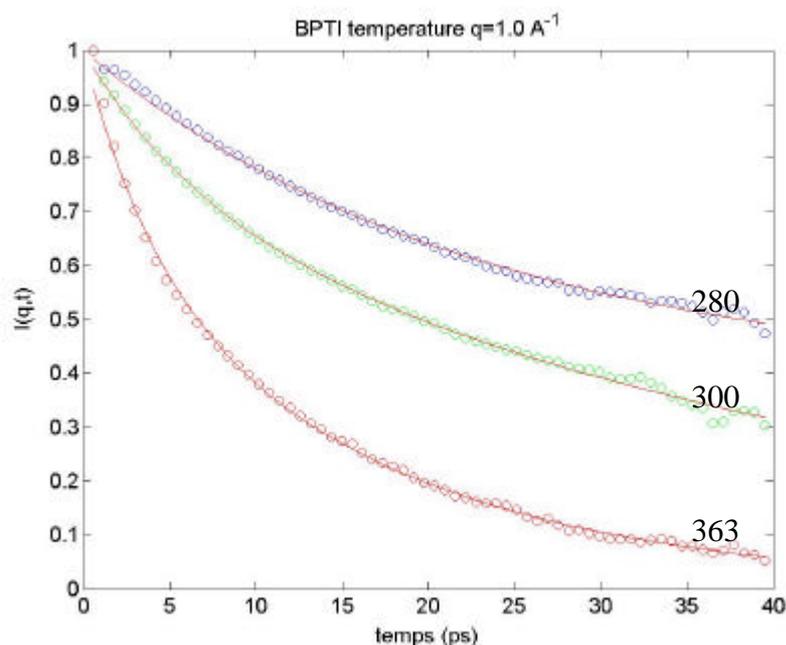


Figure IV.2 : Fonctions intermédiaires de diffusion incohérente du BPTI à $q = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ à 280 K, 300 K, et 363 K. Expérience de diffusion quasiélastique de neutrons en temps de vol sur le spectromètre IN5 ($\lambda = 5.2 \text{ \AA}$, $\text{FWHM} \approx 100 \text{ \mu eV}$) sur une solution de BPTI 85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D_2O et 100 mM $(\text{ND}_4)_2\text{SO}_4$.

Nous avons analysé ces différentes décroissances de $I(q,t)$ à l'aide d'une somme d'exponentielles caractérisée par les deux temps de relaxation τ_1 et τ_2 . τ_1 décrivant les mouvements globaux de la protéine dans la solution et τ_2 étant relié à la dynamique interne du BPTI.

$$I(q,t) = A_0 * \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + (1 - A_0) * \exp\left(-t * \frac{\tau_1 + \tau_2}{\tau_1 \tau_2}\right) \quad (4.6)$$

où A_0 est le pseudo facteur de structure élastique incohérent, τ_1 et τ_2 sont les deux temps de relaxation.

En traçant l'inverse du temps de relaxation τ_1 en fonction du carré de vecteur d'onde (figure IV.3), nous pouvons constater une évolution en Dq^2 où D est le coefficient de diffusion translationnelle du BPTI en solution. A température ambiante, nous retrouvons une valeur de coefficient de diffusion de translation de $13.6 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature par Gallagher et Woodward¹ par diffusion de lumière ($12 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Et ce coefficient de diffusion D subit l'influence de la température dans la mesure où sa valeur augmente lorsque l'échantillon est chauffé depuis 280 K jusqu'à 363 K (figure IV.4).

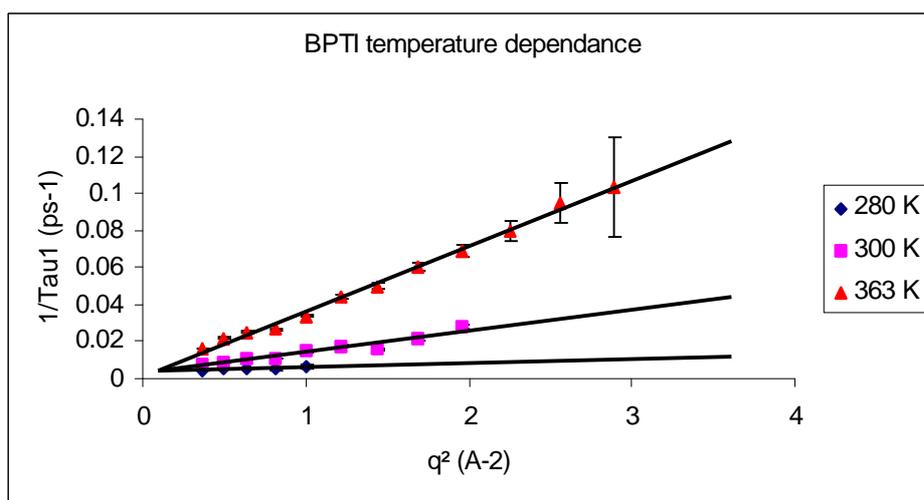


Figure IV.3 : Evolution de l'inverse du temps de relaxation τ_1 en fonction de q^2 pour le BPTI en solution à 85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D_2O et 100 mM $(ND_4)_2SO_4$. Le temps de relaxation τ_1 est issu de l'ajustement de $I(q,t)$ par l'équation (1).

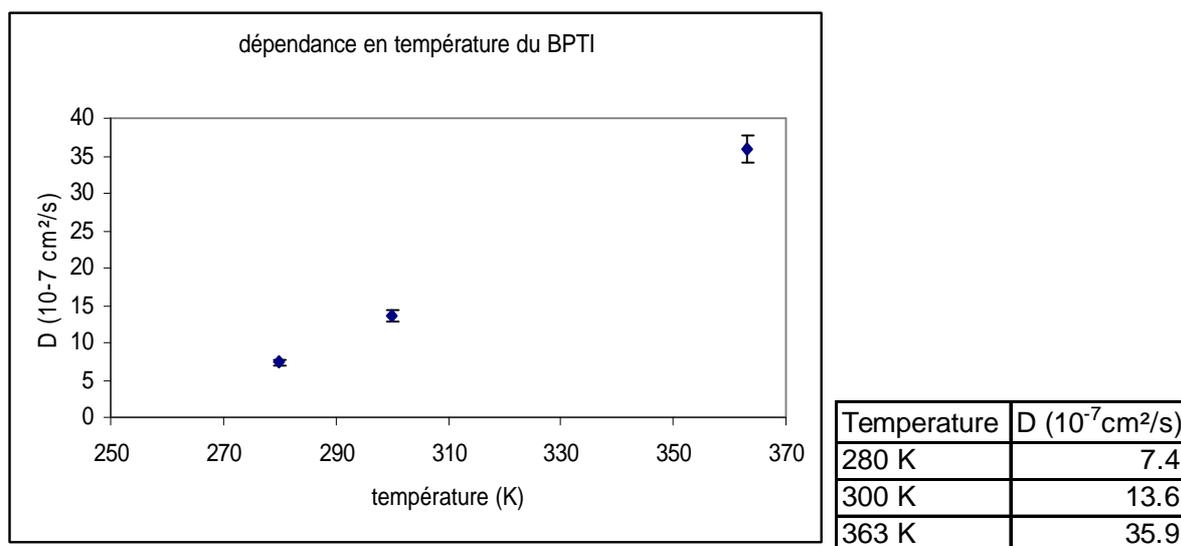


Figure IV.4 : Evolution du coefficient de diffusion de translation du BPTI en solution à 85 mg/ml en fonction de la température.

Quand la température augmente, la viscosité de l'eau diminue.

Comme nous l'avons montré dans l'étude structurale, le rayon de giration R_g , et donc le rayon hydrodynamique R_H , de la protéine augmente avec la température. La loi de Stokes-Enstein permet d'expliquer l'augmentation de la diffusion globale D_{trans} avec la température.

$$D_{trans} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (4.7)$$

où k_B est la constante de Boltzman, T est la température absolue, et η est la viscosité du solvant. La température a une influence sur le milieu dans lequel évolue la protéine la viscosité η diminue de manière plus importante avec la température que le rayon hydrodynamique R_H n'augmente.

Afin de déterminer la géométrie des mouvements, nous avons calculé le pseudo facteur de structure élastique incohérent A_0 à chacune des trois températures (figures IV.5 à IV.7). Nous avons leur évolution en fonction du vecteur d'onde, à l'aide du modèle de diffusion dans une sphère proposé par Volino et Dianoux².

$$\text{Pseudo EISF} = p + (1-p)A_0(Qa) \quad \text{avec : } A_0(q) = \left[\frac{3J_1(qa)}{qa} \right]^2 \quad (4.8)$$

Où p est la proportion de protons immobiles

Ce modèle a été utilisé afin d'étudier la géométrie des mouvements internes des protons dans le tetrapalmitate cuivreux³. Il a été montré que si on progresse le long de la chaîne aliphatique en s'éloignant du cœur de la molécule, le rayon de sphère, a , augmente.

Ainsi, un grand rayon de sphère décrit les mouvements internes des protons appartenant aux extrémités des chaînes latérales, tandis qu'une valeur plus petite de ce rayon, accompagné par une baisse de la proportion des protons immobiles, indique la participation des protons plus proche du cœur. En effet, ces protons ne peuvent explorer un volume aussi important que ceux plus exposés au solvant du fait de l'encombrement stérique.

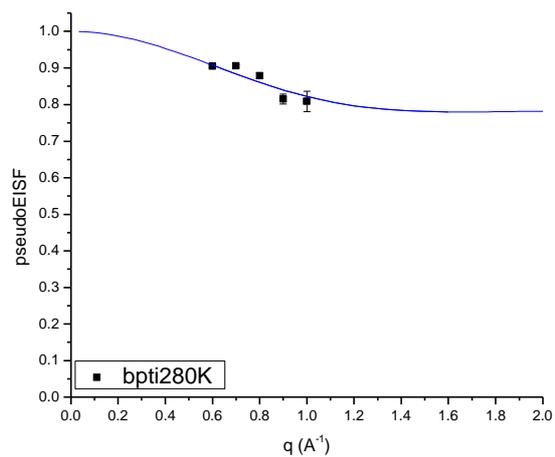


Figure IV.5 : évolution du pseudo EISF en fonction de q pour le BPTI en solution (85 mg/ml) à 280 K. L'ajustement est réalisé avec le modèle de diffusion dans une sphère.

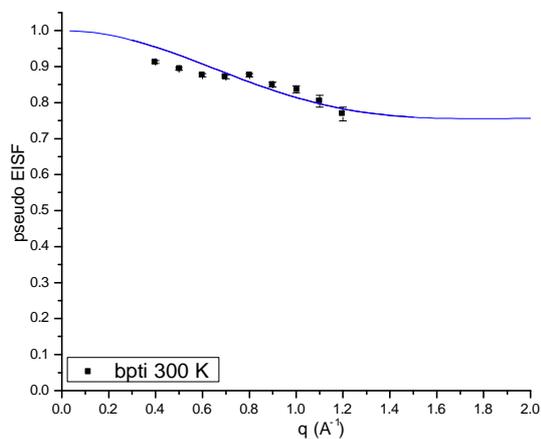


Figure IV.6 : évolution du pseudo EISF en fonction de q pour le BPTI en solution (85 mg/ml) à 300 K. L'ajustement est réalisé avec le modèle de diffusion dans une sphère.

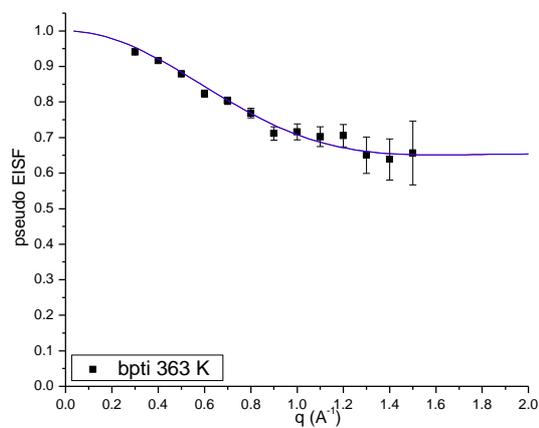


Figure IV.7 : évolution du pseudo EISF en fonction de q pour le BPTI en solution à 85 mg/ml, à 363 K. L'ajustement est réalisé avec le modèle de diffusion dans une sphère.

température	Rayon de sphère a (Å)	Proportion de protons immobiles	Proportion de protons mobiles
280 K	2.35	0.80	0.20
300 K	2.53	0.75	0.25
363 K	2.81	0.65	0.35

Tableau IV.a : rayons de sphère et proportions de protons immobiles et mobiles en fonction de la température pour le BPTI en solution.

Les résultats des paramètres ajustés par le modèle de diffusion dans une sphère sont récapitulés dans le tableau IV.a. Nous pouvons constater que le rayon de la sphère dans lequel les mouvements internes ont lieu augmente lorsque la température passe de 280 K à 363 K. D'autre part, la proportion de protons mobiles augmente entre 300 et 363 K.

Afin de comprendre de manière un peu plus détaillée l'influence de la température sur ce rayon de sphère et cette proportion de protons immobiles, essayons de déterminer quels sont les protons impliqués dans ces mouvements internes.

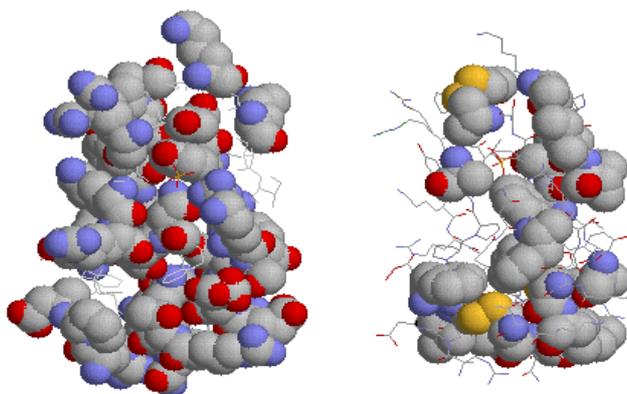


Figure IV.8 : représentation des atomes des résidus du BPTI. (5PTI.pdb). A gauche : les atomes des résidus de surfaces sont représentés par les sphères. A droite : les atomes des résidus enfouis sont représentés par les sphères.

Un inventaire des protons non échangeables du BPTI a été effectué sur une structure cristallographique de la protéine (figure IV.8). En calculant le rapport du nombre de protons non échangeables appartenant aux résidus de surface, d'une part, et du nombre de protons non échangeables appartenant aux résidus enfouis sur le nombre total de protons non échangeables, nous avons constaté que 60,6 % de ces protons appartiennent aux 36 résidus situés à la surface de la protéine et 39,4 % aux 22 résidus enfouis au niveau du cœur hydrophobe. La figure IV.8 est une représentation du volume occupé par les atomes des résidus de surface et des résidus enfouis de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine.

résidus de surface	résidus enfouis
Arg 1	Phe 4
Pro 2	Cys 5
Asp 3	Leu 6
Glu 7	Cys 14
Pro 8	Ala 16
Pro 9	Ile 18
Tyr 10	Ile 19
Thr 11	Phe 22
Gly 12	Ala 25
Pro 13	Ala 27
Lys 15	Leu 29
Arg 17	Cys 30
Arg 20	Phe 33
Tyr 21	Val 34
Tyr 23	Cys 38
Asn 24	Ala 40
Lys 26	Phe 45
Gly 28	Ala 48
Gln 31	Cys 51
Thr 32	Met 52
Tyr 35	Cys 55
Gly 36	Ala 58
Gly 37	
Arg 39	
Lys 41	
Arg 42	
Asn 43	
Asn 44	
Lys 46	
Ser 47	
Glu 49	
Asp 50	
Arg 53	
Thr 54	
Gly 56	
Gly 57	

Tableau IV.b : récapitulatif des résidus à la surface et des résidus enfouis du BPTI.

Détermination des résidus par Rasmol.

L'étude structurale du BPTI nous a appris que cette protéine a une forme globulaire compacte. Son cœur hydrophobe est essentiellement constitué d'une structure secondaire de type feuillets β . Cette structure est plus rigide que les structures désordonnées qui constituent une partie importante des structures secondaires en périphérie de la protéine. Du fait d'un fort encombrement stérique, les résidus enfouis, pour la plupart situés sur les feuillets β centraux, ne présenteront pas de mouvements internes avec de grandes amplitudes.

Aussi nous supposons qu'à basse température, seule la géométrie des mouvements d'une certaine proportion de protons non échangeables, appartenant aux résidus de surface, est détectée et décrite par l'évolution du pseudo EISF.

Comme nous pouvons l'observer sur la figure IV.8, les résidus de surface du BPTI occupent un volume important dans la protéine et sont susceptibles, étant donné leur localisation et leur structure d'explorer un espace relativement grand. En effet, certains résidus comme les lysines et les arginines ont une longue chaîne latérale. Les résidus glutamines et acides glutamiques ont des chaînes légèrement plus courtes et les résidus asparagines et acides aspartiques sont les résidus de surface qui possèdent des chaînes latérales de longueur moins importante encore.

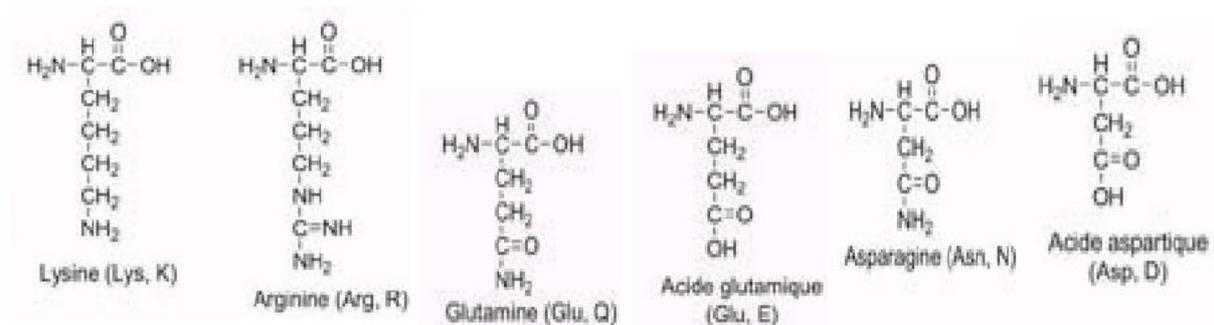


Figure IV.9 : représentation des résidus possédant une longue chaîne latérale.

Etant donné la complexité de la répartition des protons dans la protéine et étant donné l'utilisation du modèle simple de diffusion dans une sphère, nous nous sommes limités à interpréter l'évolution du rayon de sphère et l'évolution de la proportion de protons immobiles en fonction de la température.

Si nous supposons qu'à 280 K, seuls les protons non échangeables des résidus ayant les plus longues chaîne latérale ont des mouvements, le calcul du rapport entre les protons non labiles des lysines et des arginines et l'ensemble des protons non labiles du BPTI donne une

proportion de 24 %. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la proportion de protons mobile obtenue par l'ajustement du pseudo EISF à la plus basse température (20 %).

A 300 K, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les résidus ayant des chaînes latérales un peu plus courte que les résidus précédemment cités participent en plus aux mouvements internes. La proportion des protons non labiles des résidus lysines, arginines, glutamines et acides glutamiques approche 28 %. Cette valeur est elle-même très voisine de celle obtenu par l'ajustement du pseudo EISF à 300 K (25 %)

Enfin à 363 K, température pour laquelle le BPTI est très déstructuré, les résidus possédant une chaîne latérale de longueur inférieure à celle des résidus précédemment cités mais suffisante peuvent participer aux mouvements internes. La proportion des protons non labiles des résidus lysines, arginines, glutamine, acide glutamique, asparagine et acide aspartique est de 34 %. Or nous trouvons, à cette température, une valeur de proportion de protons mobiles de 35 %.

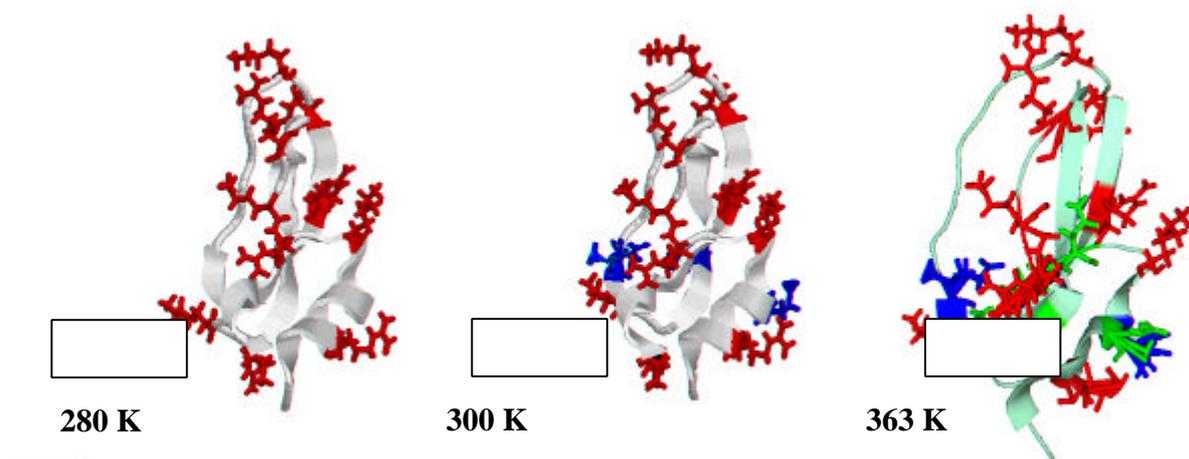


Figure IV.10 : représentation des résidus possédant une longue chaîne latérale participant aux mouvements internes à différentes températures. Les lysines et les arginines sont indiquées en rouge, les glutamines et les acides glutamiques sont indiqués en bleu, les asparagines et acides aspartiques sont indiquées en vert.

La figure IV.10 présente les résidus susceptibles de participer aux mouvements internes à 280 K, 300 K et 363 K. L'écart entre proportion calculée et proportion obtenu par l'ajustement des pseudo EISF est probablement du à l'implication dans des ponts salins de résidus parmi ceux localisés à la surface de la protéine (Figure IV.11) :

- entre les chaînes latérales de Asp50 et Lys46
- entre les chaînes latérales de Glu7 et Arg42
- et entre la chaîne latérale de Arg1 et la partie carboxy-terminale d'Ala58.

Bien qu'il ne s'agisse pas de liaisons fortes comme pour les ponts disulfures, ces ponts salins limitent la dynamique des protons non labiles appartenant aux résidus qui y sont impliqués (10% sur l'ensemble des protons non labiles de la protéine). Des études de spectroscopie Raman ont montré que la rupture de ces ponts intervient aux alentours de 40°C⁴.

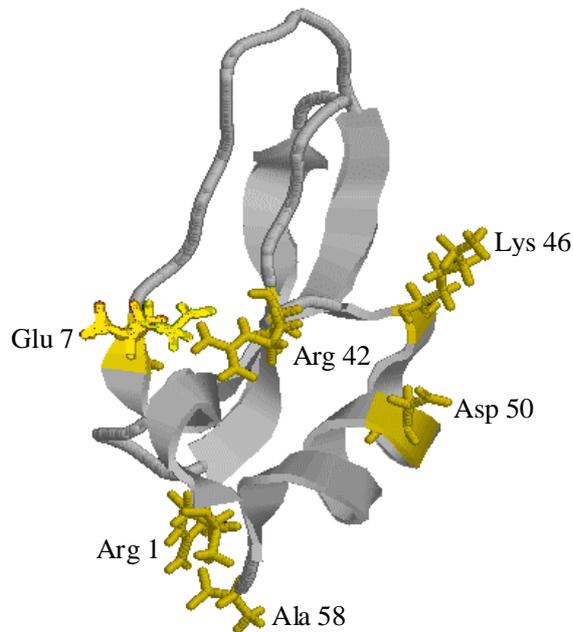


Figure IV.11 : représentation des résidus impliqués dans les ponts salins dans le BPTI.
(à partir de 5PTI.pdb)

Pour pouvoir expliquer cette différence entre calcul théorique et résultats expérimentaux, il faut comprendre comment se forment ces ponts.

Dans le cas des ponts salins, ce sont essentiellement les parties carboxyliques des résidus d'acide aspartique 50, d'acide glutamique 7 et la partie carboxylique de l'alanine 58 qui permettent la formation de ces ponts. Ainsi le reste de la chaîne latérale qui compose ces résidus conserve un certain nombre de degrés de liberté : chacun des ponts va pouvoir décrire un dôme puisque les mouvements de l'un des deux résidus impliqués seront limités par l'autre (figure IV.12).

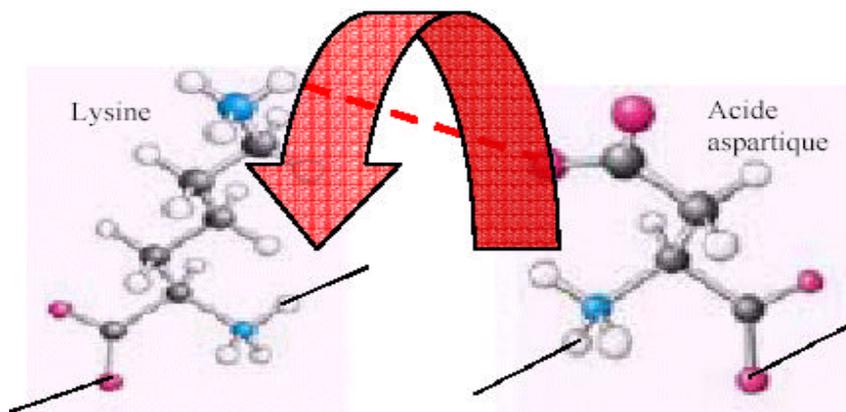


Figure IV.12 : schéma représentatif d'un pont salin entre une lysine et un acide aspartique. Les traits noirs en pointillés indiquent les liaisons avec les résidus voisins. Le trait épais en rouge représente le pont salin entre le groupe amine de la lysine et le groupe carboxylique de l'acide aspartique. La flèche rouge montre le dôme décrit par les mouvements du pont.

Cette interprétation de l'évolution de la proportion de protons mobiles en fonction de la température doit être considérée avec précaution dans la mesure où les mouvements internes observés concernent les protons non labiles de l'ensemble des résidus de surface.

La géométrie des mouvements, et plus particulièrement le rayon de la sphère dans laquelle les mouvements opèrent varie en fonction de la température.

La figure IV.13 est une représentation schématique de la diffusion des protons dans différentes sphères.

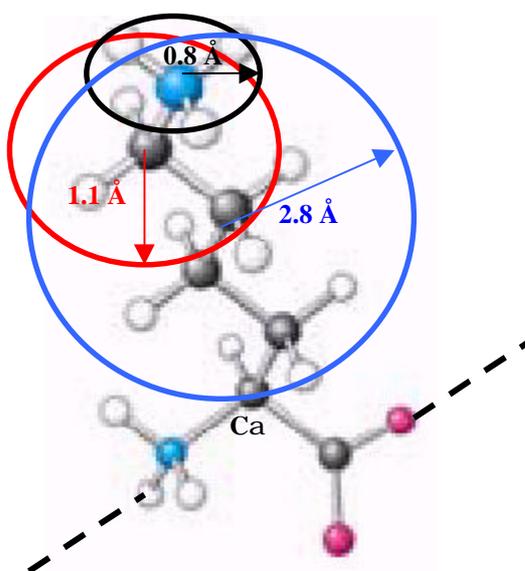


Figure IV.13 : représentation schématique de la diffusion dans une sphère. Le résidu d'acide aminé représenté est la lysine. Les valeurs de rayon sont indiquées dans chacune des sphères en fonction des couleurs.

Nous pouvons remarquer que plus le rayon de sphère augmente, plus la proportion de protons mobiles augmente.

La figure IV.14 représente les chaînes des résidus appartenant à la surface du BPTI et permet de donner une idée de la proportion de protons non labiles impliqués dans les mouvements internes.

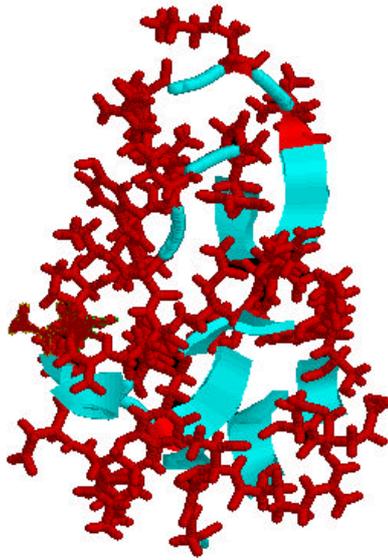


Figure IV.14 : représentation des résidus d'acides aminés (en rouge) à la surface du BPTI, le squelette est représenté en bleu.

Supposons qu'à 280 K, seuls les protons non échangeables appartenant aux extrémités des chaînes latérales des résidus situés à la surface du BPTI sont capables de mouvements. Alors l'augmentation du rayon de la sphère à l'intérieur de laquelle les mouvements internes opèrent et de la proportion de protons immobiles lorsque la température augmente de 280 K à 363 K peut être le résultat de la contribution des protons non labiles appartenant à ces mêmes chaînes latérales mais à des positions plus proches du carbone $C\alpha$.

De plus il ne faut pas perdre de vue que le reste de la protéine n'est pas figé. En effet, les structures secondaires auxquelles appartiennent les résidus cités jusqu'à présent sont-elles aussi mobiles et contribuent à la dynamique de l'ensemble des atomes qui les constituent.

En observant l'évolution du second temps de relaxation τ_2 en fonction du vecteur d'onde (figure IV.15), nous pouvons constater une dynamique interne du BPTI ralentie à 280 K pour des valeurs de q supérieures à 0.7 \AA^{-1} dans la mesure où τ_2 croît linéairement avec q . Ce ralentissement de la dynamique interne est moins prononcé lorsque l'échantillon est porté à une température de 300 K puisque la pente de τ_2 en fonction de q est moins importante qu'à 280 K à partir de la valeur de $q = 0.8 \text{ \AA}^{-1}$. Enfin, lorsque l'on atteint une température de 363 K, τ_2 devient indépendant de q montrant que la dynamique interne du BPTI est plus rapide sur une grande échelle.

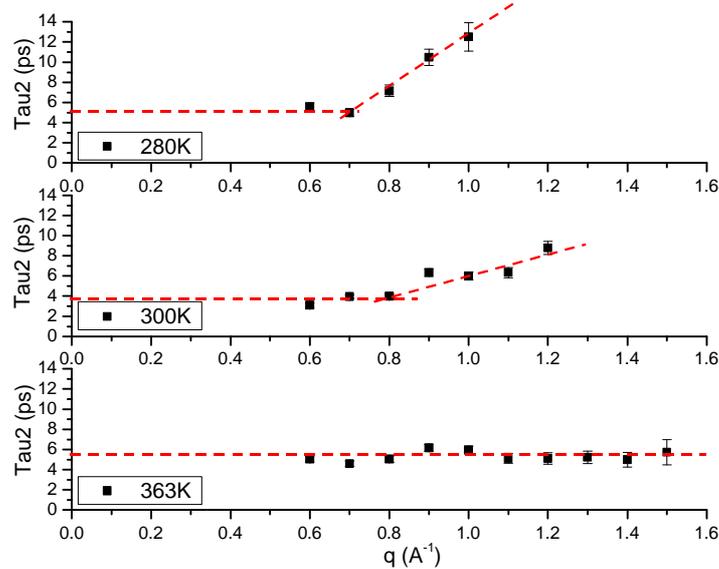


Figure IV.15 : Evolution de τ_2 en fonction de q à différentes valeurs de température.

Les résultats présentés dans la figure IV.15 font état d'une augmentation de la dynamique des chaînes latérales des résidus de surface du BPTI quand la température augmente. La densité de la couche d'eau d'hydratation du BPTI va diminuer lorsque la température augmente entre 280 K et 363 K. Les molécules d'eau vont avoir moins tendance à contraindre les mouvements de ces résidus exposés au solvant.

2. Etude à haute résolution

Les protéines sont étudiées sous forme de poudre hydratée, notamment pour l'étude de la dynamique par diffusion quasi-élastique de neutrons. Les échantillons de poudre hydratée permettent d'immobiliser la protéine que l'on veut observer et faire abstraction des mouvements globaux. Seuls les mouvements internes sont sondés. Différentes études ont été

menées pour déterminer l'influence de l'eau d'hydratation et du taux d'hydratation sur l'activité des protéines. Carreri et al.⁵ ont étudié l'hydratation de surface du lysozyme : de 0 à 0,1 h¹ ce sont les groupes chargés de la protéine qui sont hydratés, de 0,1 à 0,25 h, l'eau hydrate les groupes polaires, enfin au dessus de 0,25 h les sites les moins favorables de la surface sont hydratés afin de compléter l'hydratation. Des mesures de chaleur spécifique apparente du lysosyme, sous forme de poudre lyophilisée, hydratée entre 0 et 0,45 h ont permis d'identifier les étapes précédentes dans le processus d'hydratation. De plus Yang et al.⁶ montrent qu'au dessus du taux d'hydratation de 0,38 h, la chaleur spécifique reste constante. Ce taux d'hydratation est alors interprété comme l'hydratation complète de la surface de la protéine. Au-delà de cette hydratation, on ne fera que diluer la protéine. Doster et al.⁷ déterminent pour la myoglobine un taux d'hydratation complète à 0,39 h. Le calcul de la surface du lysosyme à partir de la méthode développée par Lee et Richards⁸ permet de conclure que l'hydratation complète à 0,38 h correspond au maximum à une couche d'eau en moyenne⁹. Rupley et al.¹⁰ ont mesuré l'activité enzymatique du lysosyme. Il apparaît que l'activité du lysosyme commence à 0,2 h ; à 0,38 h l'efficacité de l'enzyme atteint 10 % de l'activité en solution.

a) Etude d'une poudre hydratée de BPTI.

Des expériences de rétrodiffusion de neutrons à haute résolution sur le spectromètre CRG-IN13 (LLB, IBS, INFM) ont été réalisées à l'Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble) pour observer les mouvements internes du BPTI dans une échelle de temps de l'ordre de 100 ps. Afin de réduire la contribution du tampon, nous avons, dans un premier temps, étudié une poudre hydratée contenant 0.34 g d'eau lourde par g de protéine et ayant subi au préalable un échange H/D ; ceci permet l'obtention d'une couche d'eau autour de chaque protéine. Les résultats obtenus à partir des spectres de diffusion élastique (Figure IV.16) ont permis d'obtenir l'évolution du déplacement carré moyen des atomes en fonction de la température. Nous avons utilisé, pour l'analyse, la formule donnée par l'approximation gaussienne :

$$I(q, \mathbf{w} = 0) = I(q = 0, \mathbf{w} = 0) * \exp\left(-\left(\frac{\langle u^2 \rangle * q^2}{3}\right)\right) \quad (4.9)$$

¹ h désigne l'hydratation de la protéine en gramme d'eau par gramme de protéine sèche.

la constante de force $\langle k \rangle$ telle qu'elle est décrite par Zaccai G.¹¹ a été déterminée :

$$\langle k \rangle = \frac{k_B}{\left(d \langle u^2 \rangle / dT \right)} \quad (4.10)$$

où k_B est la constante de Boltzmann ($k_B = 0.00138 \cdot 10^{-20} \text{ J.K}^{-1}$)

Nous avons constaté une transition d'un comportement harmonique vers un comportement anharmonique pour une température d'environ 230 K (Figure IV.17). Cette valeur est en accord avec les résultats obtenus pour d'autres protéines solubles comme la C-phyco cyanine¹² ou la bactériorhodopsine¹³. Les deux régimes ont été analysés par la méthode des constantes de force : nous avons constaté que le BPTI était plus rigide à basse température (en régime harmonique) avec une constante de force d'environ 1.99 N/m et plus flexible en régime anharmonique avec une constante de force de 0.56 N/m ; nous observons, par ailleurs, qu'en régime harmonique, le BPTI est plus rigide que d'autres protéines comme la bactériorhodopsine de la membrane pourpre (1.70 N/m) mais présente tout de même une flexibilité similaire en régime anharmonique (0.55 N/m)¹⁰. La présence des trois ponts disulfures et des trois ponts salins peuvent expliquer ce phénomène.

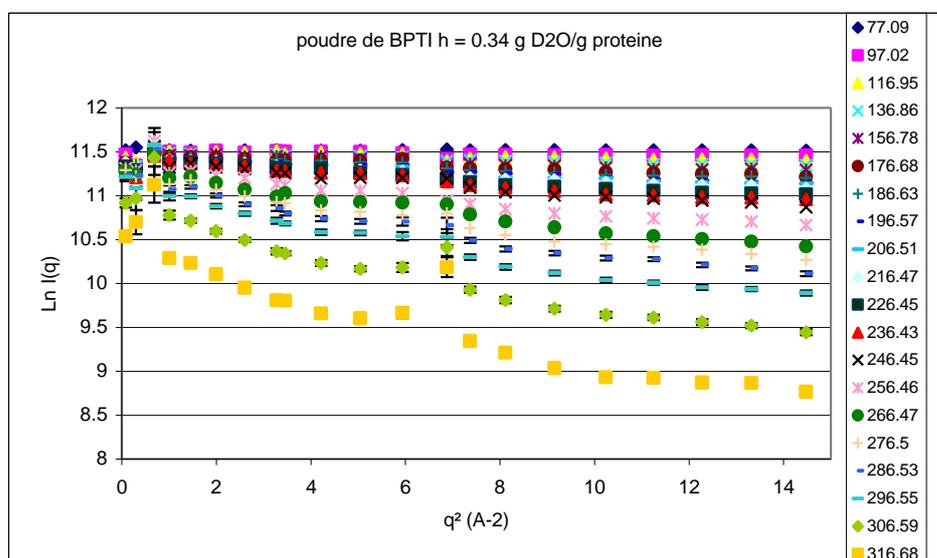


Figure IV.16 : Logarithme de l'intensité élastique en fonction de q^2 à différentes températures. Cas du BPTI hydraté à $h = 0.34 \text{ g D}_2\text{O/g protéine}$.

Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution).

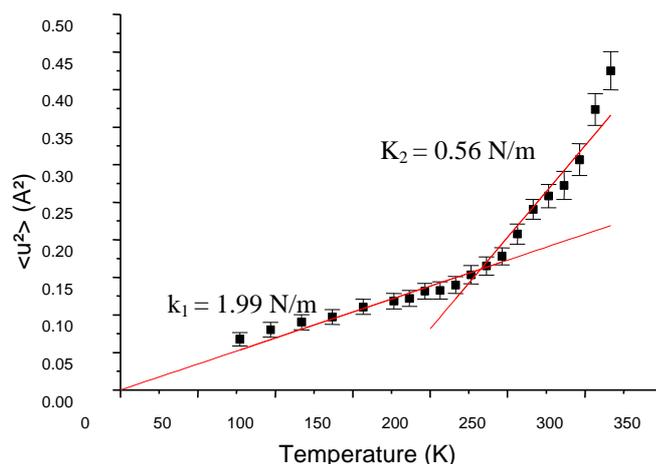


Figure IV.17 : évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température.

Cas du BPTI hydraté à $h = 0.34 \text{ g D}_2\text{O/g protéine}$.

Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution).

Les spectres quasiélastiques permettant d'accéder à l'amplitude et à la géométrie des mouvements internes sont présentés en figure IV.18 et ont été traités à l'aide du programme Agathe développé par Marc Bée ; l'EISF (Elastic Incoherent Structure Factor) a été obtenu en fonction du vecteur d'onde à deux températures : 280 K et 317 K (figure IV.19 et tableau IV.c). En utilisant le modèle de Volino et Dianoux¹⁴ et en tenant compte du nombre de protons immobiles p , nous obtenons les résultats suivant : à 280 K, moins de 30 % des protons ($p = 0.69 \pm 0.01$) diffusent dans un volume qui peut être assimilé à une sphère de rayon $a = 2.06 \pm 0.34 \text{ Å}$; à 317 K, près de la moitié des protons ($p = 0.48 \pm 0.03$) diffusent dans une sphère de rayon $a = 1.82 \pm 0.21 \text{ Å}$. Ainsi, lorsque la température de l'échantillon augmente de 280 K à 317 K, la proportion de protons mobiles du BPTI augmente. Plus précisément, les protons des résidus appartenant au cœur de la protéine deviennent plus mobiles lorsque la température augmente. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution du rayon moyen de la sphère a . D'autres modèles doivent être développés afin de décrire plus précisément les mouvements internes dans les protéines.

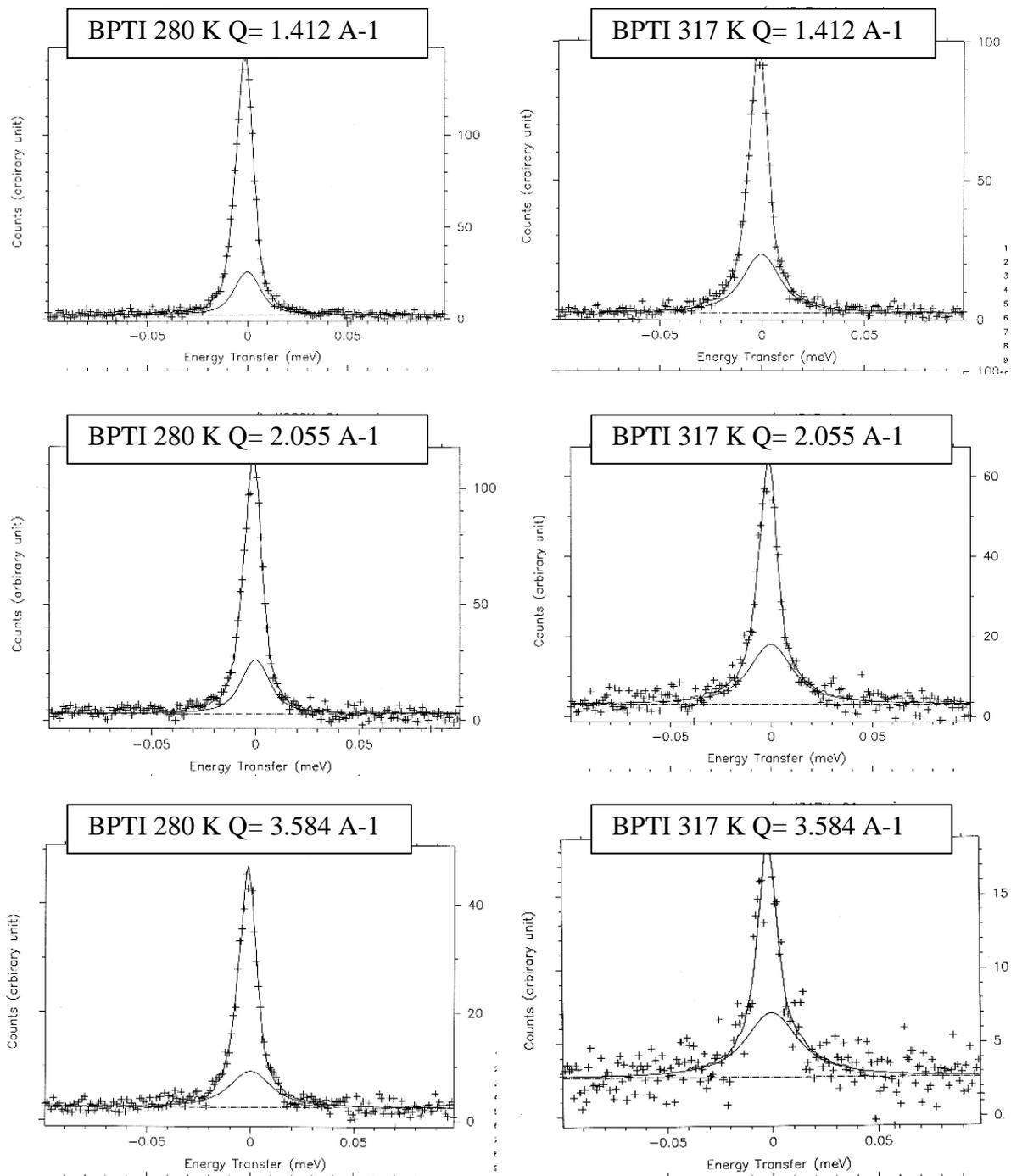


Figure IV.18 : spectres de scans quasiélastiques réalisés sur une poudre hydratée de BPTI à 0.34 g de D2O par g de protéine pour deux températures 280 K et 317 K. Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution).

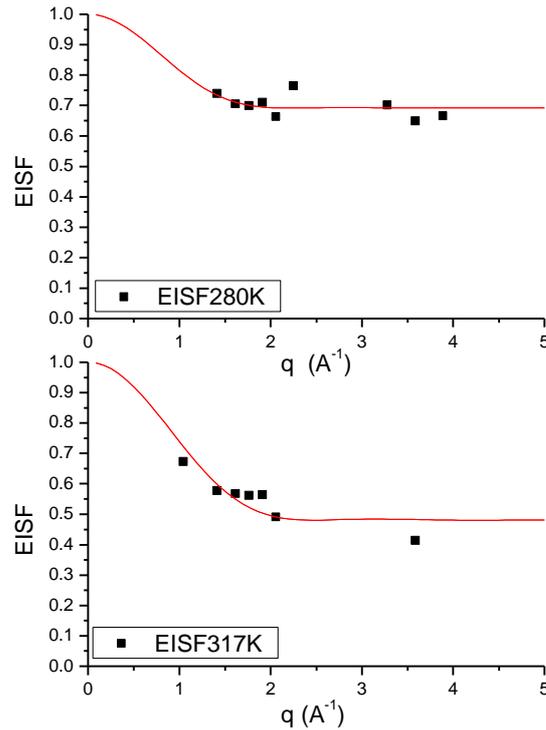


Figure IV.19 : EISF en fonction du vecteur de diffusion q pour deux températures. Cas du BPTI hydraté à $h = 0.34$ g D₂O/g protéine. Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution). Le modèle utilisé est celui de la diffusion dans une sphère de rayon a et tenant compte du nombre de protons immobiles p .

Température	Rayon de sphère a (Å)	Proportion de protons immobiles	Proportion de protons mobiles
280 K	2.06 ± 0.35	0.69 ± 0.01	0.31 ± 0.01
317 K	1.82 ± 0.21	0.48 ± 0.04	0.52 ± 0.04

Tableau IV.c : rayons de sphère et proportions de protons immobiles et mobiles en fonction de la température pour le BPTI en poudre hydratée.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur le substrat du BPTI : la trypsine pancréatique bovine. Nous avons donc étudié une poudre hydratée contenant 0.53 g d'eau légère par g de protéine, la résolution de 10 microeV du spectromètre permettant cette approche. L'analyse des résultats obtenus à partir des spectres de diffusion élastique (Figure IV.20) a permis d'obtenir l'évolution du déplacement carré moyen des atomes en fonction de la température.

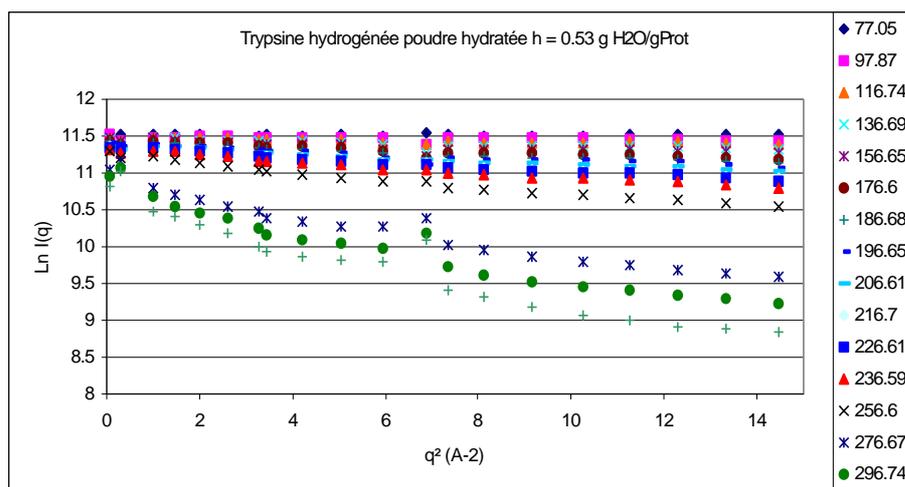


Figure IV.20 : Logarithme de l'intensité élastique en fonction de q^2 à différentes températures. Cas de la trypsine hydratée à $h = 0.53$ g D2O/g protéine. Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution).

Nous avons constaté une transition d'un comportement harmonique vers un comportement anharmonique pour une température d'environ 235 K (figure IV.21).

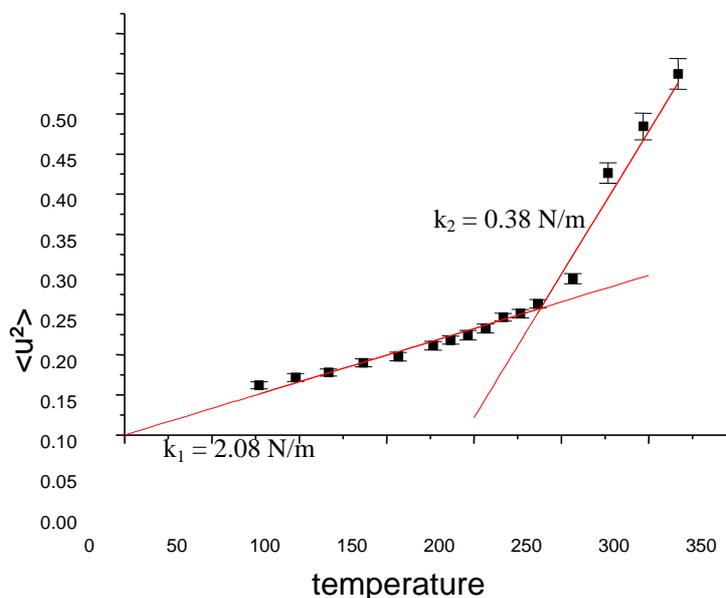


Figure IV.21 : évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température. Cas de la trypsine hydratée à $h = 0.53$ g H2O/g protéine. Spectromètre CRG-IN13 (8 microeV de résolution).

L'analyse par les constantes de force a permis d'obtenir des valeurs de rigidité de 2.08 N/m en régime harmonique et 0.38 N/m en régime anharmonique. Ces valeurs sont proches de celles obtenues pour le BPTI. Ceci peut s'expliquer par le fait que la trypsine et son inhibiteur ont besoin d'adapter leurs conformations rapidement. Mais la constante de force de la trypsine en régime harmonique est plus importante que pour d'autres protéines ; ceci est probablement dû à la présence de six ponts disulfures.

b) Etude du BPTI en solution

Des scans élastiques ont aussi été réalisés sur une solution de BPTI à l'état natif et en présence de dénaturant (4.1 M de thiocyanate de guanidinium et 0.1 M de dithiothréitol comme réducteur de ponts disulfures) à 68.6 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D₂O et 100 mM de (ND₄)₂SO₄. Le but de ces expériences était de comparer l'évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température du BPTI à l'état natif et dans les états dénaturés par la température et par l'action d'agents dénaturants.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température entre 280 K et 360 K. Des expériences de microcalorimétrie différentielle ont montré que la dénaturation du BPTI intervenait à 104.5 °C (377.5 K)¹⁵, tandis que des expériences par spectroscopie Raman révèlent une perte des structures secondaires du BPTI à une température de 95 °C (368 K)¹⁶.

L'influence de la température sur le déplacement carré moyen est présenté dans la figure IV.22 :

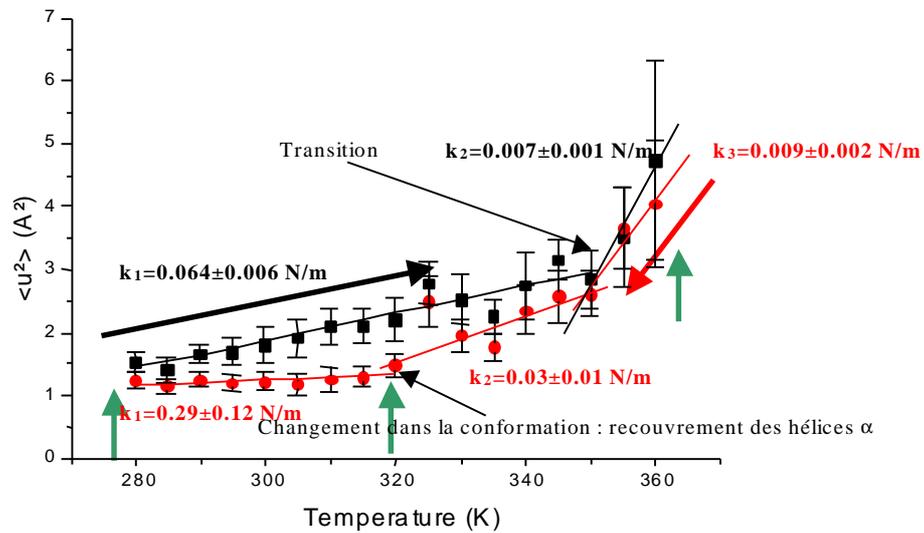


Figure IV.22 : évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température entre 280 K et 360 K. Cas du BPTI en solution soustrait de la cellule vide et de son tampon. Les flèches vertes indiquent les températures pour lesquelles nous avons procédé aux expériences de diffusion quasiélastique de neutrons en temps de vol

Comme nous pouvons le constater dans la figure IV.22, lorsque la température augmente depuis 280 K jusqu'à 360 K, l'évolution du déplacement carré moyen se fait en deux étapes.

La valeur moyenne du déplacement carré moyen du BPTI en solution entre 280 K et 350 K est plus importante que dans le cas de la poudre hydratée. L'analyse par les constantes de force montre effectivement une rigidité moins importante ($\langle k_1 \rangle = 0.064 \pm 0.006 \text{ N/m}$ en solution contre $\langle k \rangle = 0.565 \pm 0.048 \text{ N/m}$ en poudre hydratée) ; ceci peut être expliqué par la contribution des mouvements globaux de la protéine¹⁷. A 325 K, la brusque augmentation du $\langle u^2 \rangle$ peut résulter de la rupture des ponts salins telle qu'elle est décrite par les mesures en spectroscopie Raman¹⁶ : les structures secondaires qui dépendent de ces ponts salins, comme les hélices α au niveau des extrémités C et N terminales de la protéine, ont alors plus de degrés de liberté. L'augmentation du $\langle u^2 \rangle$ dans la gamme de température comprise entre 350 et 360 K montre que les mouvements internes sont fortement affectés. Une grande majorité des structures secondaires sont perdues et le BPTI prend une conformation différente de celle de l'état natif. En effet, les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles réalisées

sur ce système on montré une diminution du rayon de giration de la protéine depuis 11 Å à l'état natif jusqu'à 9.8 Å à 368 K¹⁸.

La réversibilité de la dépendance de la dynamique interne du BPTI en fonction de la température a été étudiée. Un phénomène d'hystérésis est observé (points rouges de la figure IV.22). La dépendance en température du déplacement carré moyen présente trois étapes lorsque l'échantillon est refroidi depuis 360 K jusqu'à 280 K et deux températures de transitions sont détectées à 350 K et 320 K :

- De 360 K à 350 K, aucun changement du $\langle u^2 \rangle$ n'est détecté indiquant que la protéine est dans un état dénaturé.
- De 350 K à 320 K, les valeurs de $\langle u^2 \rangle$ diminuent : ce qui peut être relié à un repliement partiel de la protéine.
- De 320 K à 280 K, les valeurs de $\langle u^2 \rangle$ se maintiennent constante en fonction de la température. Cette indépendance en température indique que le BPTI est replié dans une conformation différente de celle de l'état natif avec un nombre de degrés de liberté moins important.

Ces observations confirment les études par spectroscopie Raman et nos études par spectroscopie infrarouge³⁰ qui ont fait état d'une β -agrégation et d'un repliement partiel des hélices α lorsque les échantillons ont été refroidis depuis 95 °C jusqu'à température ambiante.

Dans le but de comparer l'évolution en fonction de la température du déplacement carré moyen du BPTI en solution, et du BPTI en solution, en présence d'agents chimique, des scans élastiques ont été réalisés sur une solution de BPTI avec et sans thiocyanate de guanidinium (GdmSCN) comme dénaturant chimique et du dithiothréitol (DTT) pour réduire les ponts disulfures. Les résultats sont présentés sur la figure IV.23.

Dans le cas du BPTI en solution sans agent dénaturant, nous retrouvons les mêmes résultats que précédemment (figure IV.22). Cependant, nous observons une légère diminution du $\langle u^2 \rangle$ à 320 K. La concentration de la solution étant un peu plus importante que lors de l'expérience précédente (figure IV.22), nous pouvons supposer qu'à la température à laquelle la rupture des ponts salins intervient, certains résidus perdent des degrés de liberté.

De plus si l'échantillon est refroidi depuis 320 K jusqu'à 280 K, nous retrouvons la même valeur de $\langle u^2 \rangle$ qu'au début de l'expérience. Ceci indique que l'effet de la température dans cette gamme de température est réversible.

Si nous mettons en présence le BPTI en solution en présence d'agents dénaturants, la valeur moyenne des $\langle u^2 \rangle$ sur l'ensemble de la gamme en température est plus importante et suit la même évolution entre 280 K et 320 K qu'en condition non dénaturante. Il est possible que la dénaturation du BPTI par le GdmSCN et le DTT ne soit pas complète dans cette gamme de température. Cependant, à 320 K, le déplacement carré moyen augmente de manière significative ; cela signifie probablement que la protéine est beaucoup plus dépliée et se comporte comme une chaîne gaussienne ou une chaîne à volume exclu. Lorsque l'échantillon est refroidi depuis 320 K jusqu'à 280 K, nous ne retrouvons pas la même valeur de $\langle u^2 \rangle$ qu'au début de l'expérience. Ceci indique que l'effet de la température en présence de GdmSCN et de DTT dans cette gamme de température est irréversible.

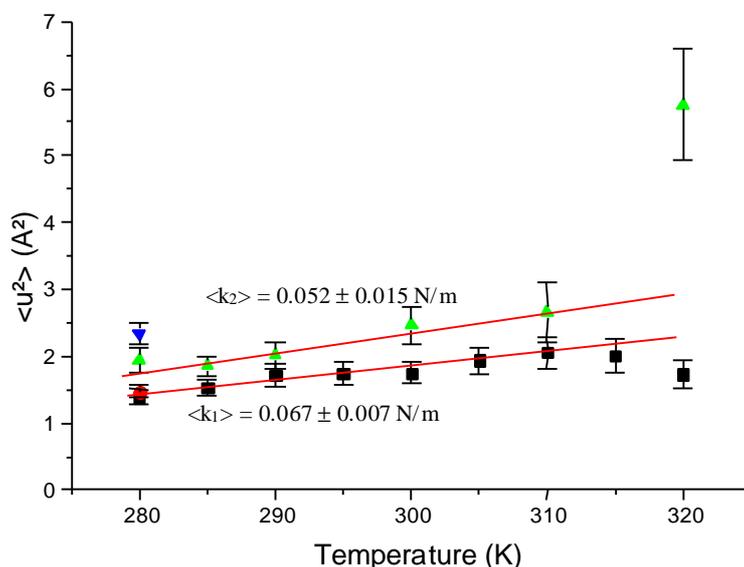


Figure IV.23 : évolution du déplacement carré moyen en fonction de la température entre 280 K et 320 K. Cas du BPTI en solution (85 mg/ml en tampon acide acétique deutéré 50 mM en D_2O et 100 mM de $(ND_4)_2SO_4$. En noir : sans agent dénaturant, en vert : en présence d'agent dénaturant, en rouge : retour à 280 K pour l'échantillon sans dénaturant, en bleu : retour à 280 K pour l'échantillon avec dénaturant

Des expériences de simulations par dynamique moléculaire ont été réalisées sur le BPTI en solution dans une gamme de température allant de 80 à 300 K¹⁹. L'intensité élastique et le déplacement carré moyen ont été calculés à partir des trajectoires simulées (figure IV.24). Les auteurs ont été en mesure de séparer les contributions respectives du solvant et de la protéine.

Pour des températures inférieures à 200 K ou dans des échelles de temps de l'ordre de 10 picosecondes, les contributions du solvant et de la protéine sont proportionnelles aux sections efficaces de diffusion de chacun des deux composants du système. En d'autres termes, un régime harmonique s'applique à la fois au solvant et à la protéine.

Cependant, lorsque la température est supérieure à 200 K, les comportements diffèrent entre ces deux constituants. Les auteurs décrivent une variation de l'intensité élastique totale essentiellement due à la contribution du solvant dont la diffusion augmente avec la température.

Pour des températures supérieures à 240 K ou dans des échelles de temps de l'ordre de 100 picosecondes, seule la protéine contribue à la diffusion totale car la diffusion du solvant devient trop rapide et sa détection n'est plus possible dans la fenêtre espace-temps définie par la simulation. La décomposition du déplacement carré moyen de la protéine montre que la transition dynamique observée dans la solution à 200-220 K implique l'apparition à la fois des mouvements internes au sein du BPTI et de la diffusion rotationnelle et translationnelle de la protéine entière. A 300 K, cette contribution des diffusions de rotation et de translation au déplacement carré moyen du BPTI en solution augmente de 30 % à l'échelle de temps de 10 ps et de 60 % à l'échelle de temps de 100 ps.

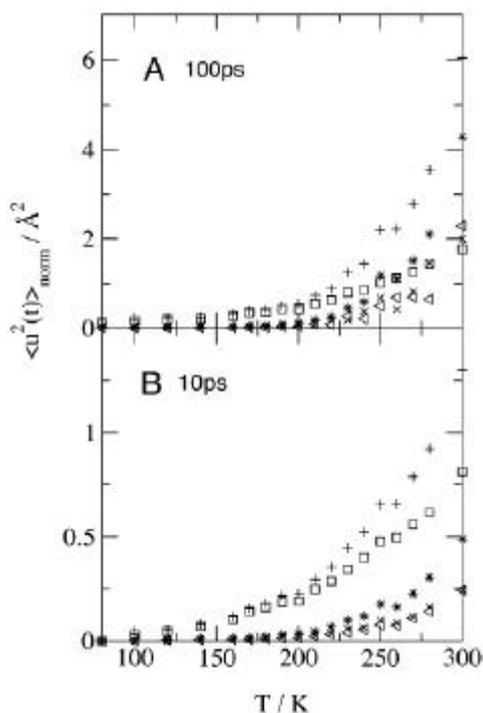


Figure IV.24 : Dépendance en température du déplacement carré moyen des différents mouvements du BPTI en solution calculé à partir de trajectoires de simulations par dynamique moléculaire. A : à 100 ps, B : à 10 ps.

(+) tous les mouvements de la protéine, (?) mouvements internes, (*) mouvements externes de diffusion, dont (x) mouvement externe de rotation, (<) mouvement externe de translation

Ces résultats nous confirment en fait que, dans la gamme de température de 280 à 360 K et dans la gamme de temps de 100 ps auxquelles nous avons travaillé sur le spectromètre CRG-IN13, nous observons uniquement les mouvements globaux et la dynamique interne du BPTI dans la solution.

C. Etude de l'influence de la pression

1. Etude à basse résolution

Après avoir observé l'influence de la pression sur la structure du BPTI (chapitre III), il s'agit maintenant d'observer l'influence de ce paramètre physique sur la dynamique du BPTI à l'échelle de la dizaine de picosecondes. Les expériences ont été réalisées sur le spectromètre IN5 à l'Institut Laue Langevin à Grenoble. La résolution choisie est à $\lambda = 5.2 \text{ \AA}$, $\text{FWHM} \approx 100 \text{ } \mu\text{eV}$ permettant d'accéder à une échelle de temps de l'ordre de 10 picosecondes. Une pression de 6200 bar a été atteinte grâce à la cellule pression en alliage de cuivre – béryllium décrite dans le chapitre III. La figure IV.25 présente les spectres de $S(q, \omega)$ pour la cellule vide, le tampon dans la cellule et la solution de protéine, composée du BPTI et du tampon, dans la cellule.

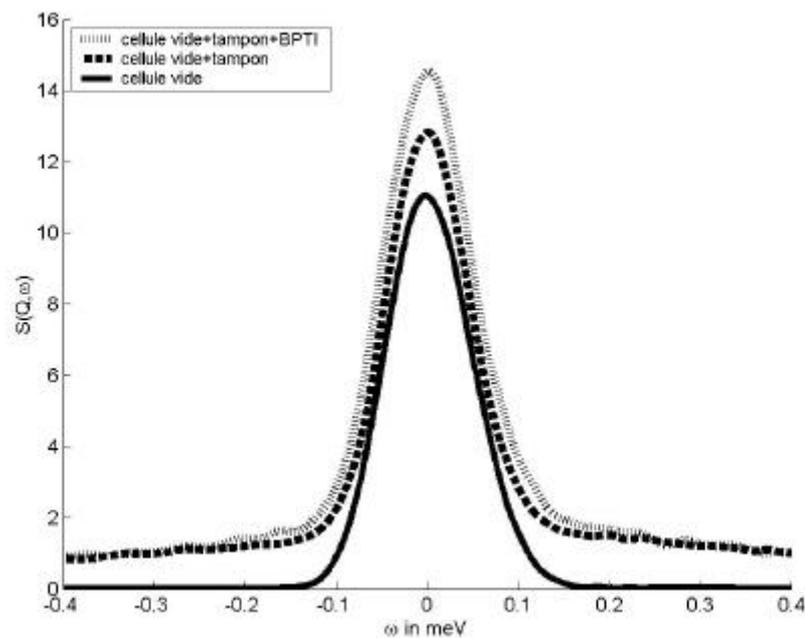


Figure IV.25 : représentation graphique du facteur de structure dynamique de la cellule vide, du tampon dans la cellule et du BPTI en solution dans la cellule issu de l'expérience de diffusion quasiélastique de neutrons sur IN5 ($\lambda = 5.2 \text{ \AA}$, résolution de $100 \mu\text{eV}$)

La figure IV.26 présente les facteurs de structure dynamique du BPTI à différentes valeurs de la pression entre 1 bar et 6000 bar.

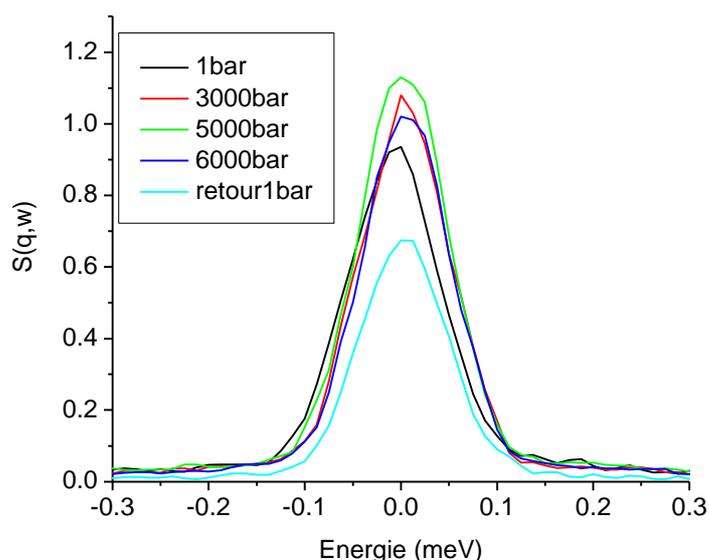


Figure IV.26 : représentation graphique du facteur de structure dynamique du BPTI en solution issu de l'expérience de diffusion quasiélastique de neutrons sur IN5 ($\lambda = 5.2 \text{ \AA}$, résolution de $100 \mu\text{eV}$) à 1 bar (noir), 3000 bar (rouge), 5000 bar (vert), 6000 bar (bleu foncé) et au retour à 1 bar (bleu clair), à $q = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$.

Nous pouvons observer sur la figure IV.26 une influence de la pression étant donné le rétrécissement de la largeur à mi-hauteur des spectres lorsque la pression appliquée augmente entre la pression atmosphérique et 6000 bar. D'autre part nous pouvons aussi constater que cet effet de la pression est irréversible puisque le spectre de $S(q, \omega)$ lorsque l'échantillon est ramené à 1 bar est différent de celui du début de l'expérience.

Nous avons effectué une transformée de Fourier sur les spectres du facteur de structure dynamique $S(q, \omega)$ du BPTI afin d'obtenir les fonctions intermédiaires de diffusion incohérente $I(q, t)$ comme cela est représenté dans la figure IV.27.

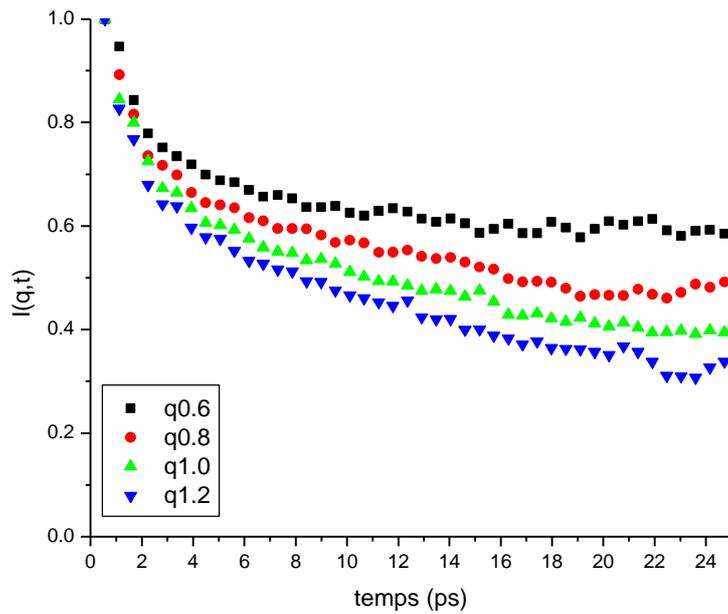


Figure IV.27 : Fonction intermédiaire de diffusion incohérente pour le BPTI à pression atmosphérique à différentes valeurs de q .

Comme nous pouvons le constater sur la figure IV.27, la dynamique du BPTI se décompose en deux parties au moins : la première pour des temps courts, jusqu'à 4 picosecondes, la dynamique est indépendante de q et est relativement rapide puisque le signal de $S(q)$ diminue rapidement avec le temps. La seconde partie varie, quant à elle, avec le vecteur d'onde et présente une augmentation de la vitesse au fur et à mesure que q augmente.

a) Analyse à l'aide d'une exponentielle étirée

Afin de pouvoir analyser de manière quantitative cette dynamique du BPTI, nous avons, pour chaque valeur du vecteur d'onde des spectres de $I(q,t)$, procédé à un ajustement des données expérimentales avec un modèle d'exponentielle étirée.

Les spectres des fonctions intermédiaires de diffusion incohérentes pour le BPTI à pression atmosphérique et à 6000 bar sont représentés en figure IV.28.

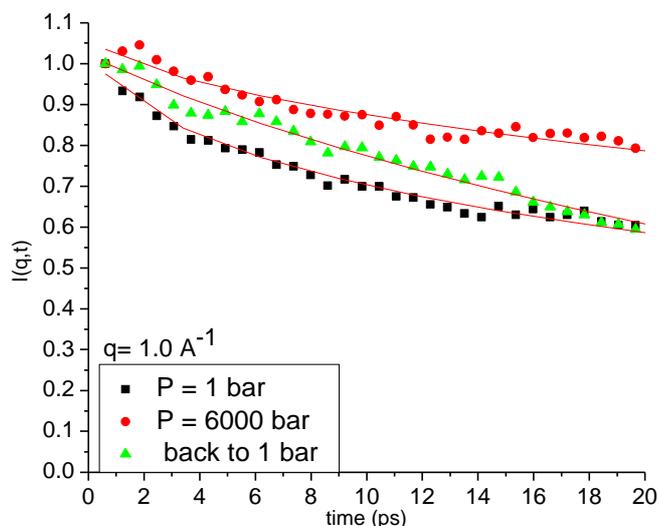


Figure IV.28 : Fonctions intermédiaires de diffusion incohérente pour le BPTI à pression atmosphérique et à 6000 bar à $q = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$.

Dans la figure IV.28 sont représentées les fonctions intermédiaires de diffusion incohérente en fonction du temps pour une solution concentrée de BPTI à pression atmosphérique et à 6000 bar. Nous pouvons constater que la courbe représentative de la fonction $I(q,t)$ à 6000 bar décroît moins vite que celle représentant $I(q,t)$ à pression atmosphérique. Cela se traduit par un ralentissement de la dynamique du BPTI à haute pression par comparaison à 1 bar.

L'analyse par le modèle de l'exponentielle étirée n'a pas convenu pour nos résultats car nous avons été amenés à rechercher par dichotomie puis à fixer les valeurs de l'exposant β pour pouvoir procéder aux ajustements des fonctions intermédiaires de diffusion incohérente. Malgré cela, les ajustements ne sont corrects que sur une gamme de temps au-delà de 5 ps.

De manière qualitative, nous avons observé une influence de la pression sur la dynamique du BPTI dans la mesure où la distribution des mouvements diminue à partir de 5000 bar. De plus cette influence de la pression est irréversible car la distribution des mouvements est différente de celle du début de l'expérience et surtout très étroite.

Il est probable qu'une modification de la structure induite par la pression a eu pour conséquence une modification de cette dynamique.

Cependant, ce modèle ne nous permet pas de distinguer les mouvements de translation des mouvements diffusifs internes de la protéine dans la solution.

b) Analyse à l'aide d'une somme d'exponentielles

Le modèle de l'exponentielle étirée ne permet pas de décrire très précisément l'influence de la température et de la pression sur la dynamique du BPTI à basse résolution (figure IV.29); nous avons donc réalisé une nouvelle analyse sur la base d'une somme de deux exponentielles, décrite dans le chapitre IV, qui tiennent compte de deux temps de relaxation τ_1 et τ_2 . τ_1 décrivant les mouvements globaux de la protéine dans la solution et τ_2 permettant d'observer la dynamique interne du BPTI.

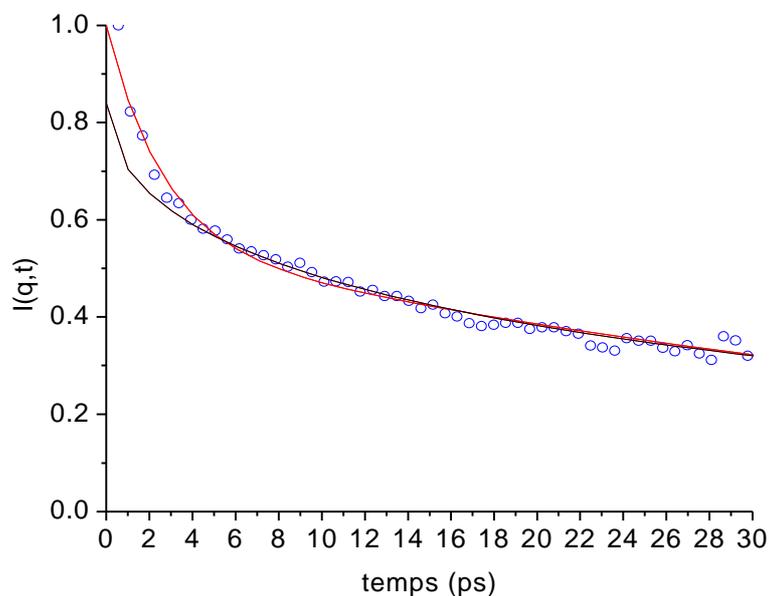


Figure IV.29 : Fonctions intermédiaires de diffusion incohérente du BPTI à $q = 1.1 \text{ \AA}^{-1}$ à pression atmosphérique. Les ronds bleus représentent les points expérimentaux, la courbe noire représente le résultat de l'ajustement par l'exponentielle étirée, la courbe rouge représente le résultat de l'ajustement par la somme d'exponentielles.

Les expériences de diffusion quasiélastique de neutrons à basse résolution sous pression ont donc été analysées avec le modèle de somme d'exponentielles (figure IV.30). En considérant l'inverse du temps de relaxation τ_1 en fonction du carré de vecteur d'onde q^2 , nous obtenons le coefficient de diffusion translationnelle de la protéine en solution à différentes pressions (figure IV.31). Nous pouvons constater l'effet de la pression jusqu'à 6000 bar sur

cette dynamique globale par la diminution de ce coefficient au fur et à mesure de l'augmentation de la pression.

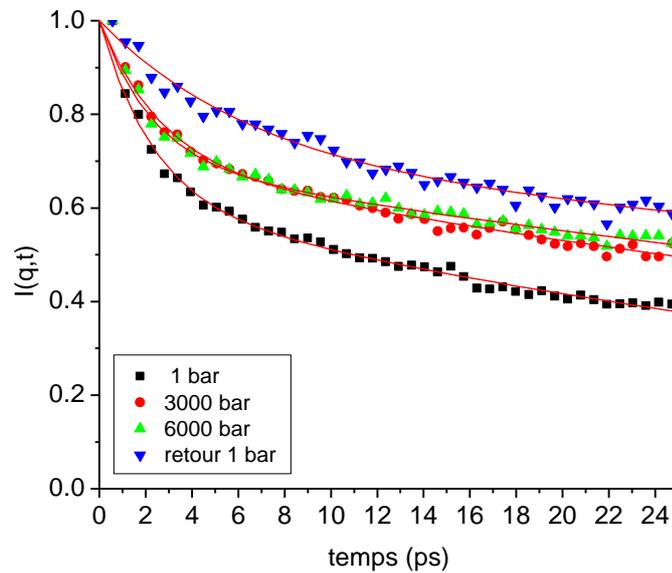


Figure IV.30: Fonctions intermédiaires de diffusion incohérente du BPTI à $q = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ à pression atmosphérique, à 3 kbar, à 6 kbar et après retour à pression atmosphérique.

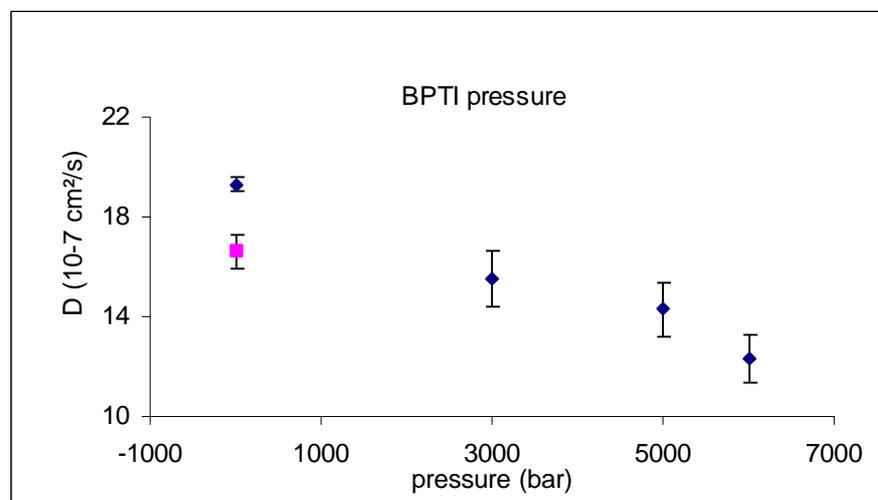


Figure IV.31 : Evolution du coefficient de diffusion translationnelle du BPTI en solution en fonction de la pression d'après l'inverse de τ_1 en fonction de q^2 .

Cet effet de la pression sur la diffusion globale de la protéine est irréversible dans la mesure où l'on ne retrouve pas la valeur initiale lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique. Il est possible que ce changement dans la dynamique globale du BPTI soit le résultat d'une modification structurale du BPTI par la pression. En effet, d'après la loi de Stokes-Einstein, une diminution du coefficient de diffusion translationnelle équivaut à une

augmentation du rayon hydrodynamique. Il est donc possible qu'à haute pression, des molécules d'eau aient pénétré la cavité hydrophobe du BPTI et provoqué une modification structurale et plus particulièrement un gonflement de la protéine.

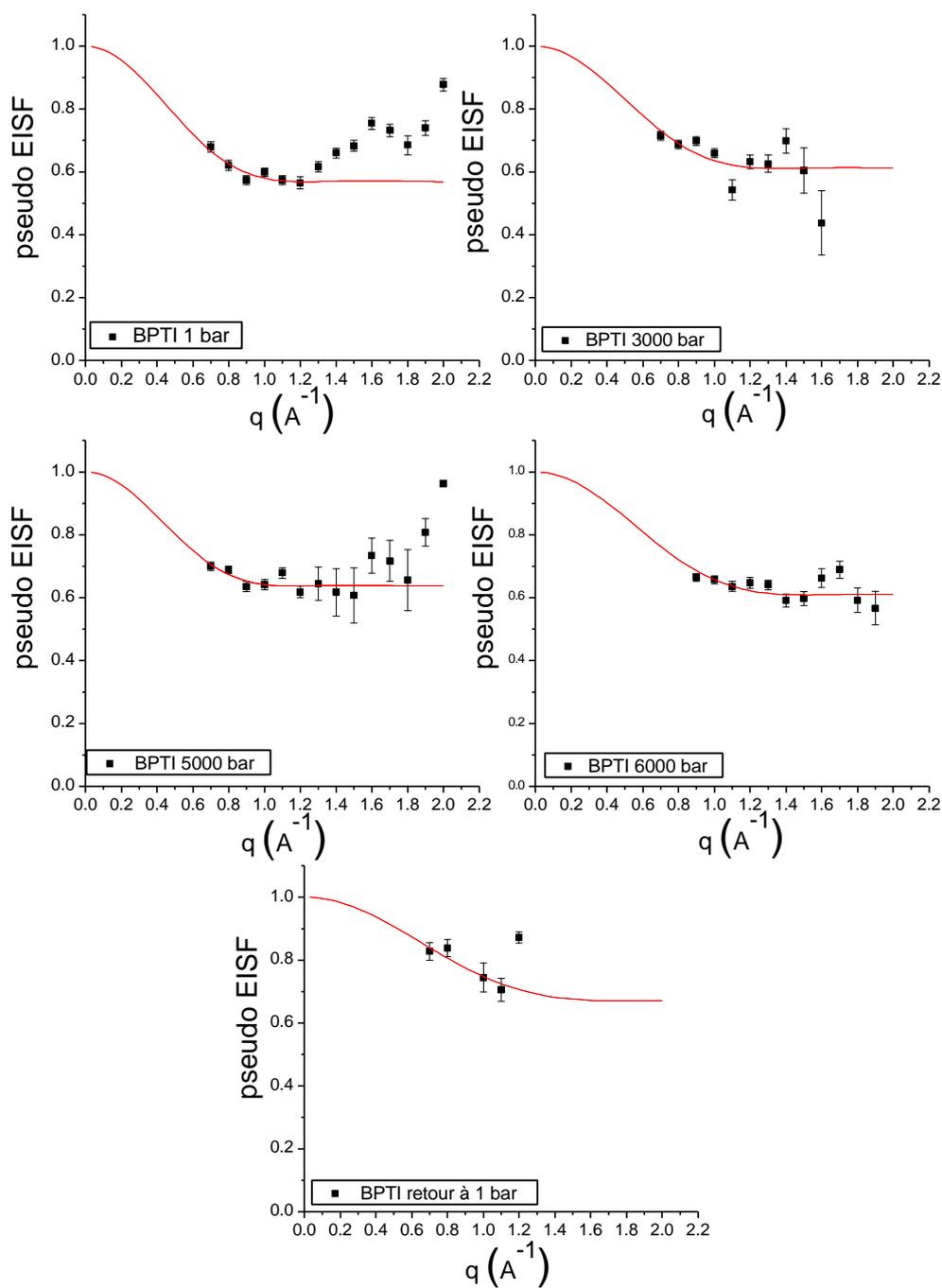


Figure IV.32 : Evolution du pseudo EISF en fonction du vecteur d'onde q pour le BPTI en solution à différentes valeurs de la pression. L'ajustement est réalisé avec le modèle de diffusion dans une sphère

La figure IV. 32 présente l'évolution du pseudo EISF obtenu par l'ajustement des fonctions intermédiaires de diffusion incohérente à l'aide d'une somme de deux exponentielles. Ce pseudo EISF est lui-même ajusté par le modèle de diffusion dans une sphère décrit par Volino et Dianoux et que nous avons d'ailleurs utilisé pour l'analyse des résultats des expériences en température. Aux grandes valeurs de vecteur d'onde, nous pouvons remarquer un comportement atypique de l'évolution du pseudo EISF en fonction de q . En effet, celui-ci augmente pour des valeurs de q supérieures à 1.2 \AA^{-1} . Ce phénomène pourrait s'expliquer par la contribution de la diffusion cohérente de la cellule dans cette gamme de vecteur d'onde.

Les ajustement du pseudo EISF ont été réalisés dans la gamme de q comprise entre 0 et 1.2 \AA^{-1} .

Le tableau IV.d est un récapitulatif des paramètres ajustés par ce modèles à différentes valeurs de la pression appliquée.

Pression	Rayon de sphère a (\AA)	Proportion de protons immobiles	Proportion de protons mobiles
1 bar	3.66 ± 0.20	0.57 ± 0.01	0.43 ± 0.01
3000 bar	3.30 ± 0.42	0.61 ± 0.03	0.39 ± 0.03
5000 bar	3.85 ± 0.29	0.64 ± 0.01	0.36 ± 0.01
6000 bar	3.06 ± 0.23	0.61 ± 0.01	0.39 ± 0.01
Retour à 1 bar	2.54 ± 0.12	0.67 fixé	0.33 fixé

Tableau IV.d: Récapitulatif des paramètres d'ajustement du pseudo EISF appliqués aux données présentées dans la figure IV.32.

D'après les ajustements des pseudo EISF par le modèle de diffusion dans une sphère, nous observons une diminution du rayon de sphère a entre 1 bar (3.66 \AA) et 3000 bar (3.30 \AA) avec une légère baisse de la proportion de protons mobiles : si nous considérons qu'à pression atmosphérique, les protons appartenant aux extrémités des chaînes latérales contribuent essentiellement aux mouvements internes, alors une pression de 3000 bar influence la dynamique interne du BPTI aux niveaux des chaînes latérales de la surface de la protéine. Ce phénomène est d'autant plus possible qu'il a été montré que la pression induit une augmentation de la densité de l'eau à la surface des protéines²⁰. Cette augmentation de la densité de l'eau constituant les premières couches d'hydratation du BPTI va contraindre les mouvements des chaînes latérales des résidus de surface de la protéine.

Ce rayon de sphère augmente (3.85 Å) et s'accompagne d'une nouvelle baisse de la proportion de protons mobiles lorsque la pression appliquée atteint 5000 bar. Une telle augmentation pourrait s'expliquer :soit par la participation aux mouvements internes de protons plus éloignés de la surface, le volume exploré par l'ensemble des protons appartenant aux chaînes latérales et des protons plus enfouis est plus important que dans le cas où seuls les protons de surface contribuent à ces mouvements internes ; soit par une augmentation du volume globale de la protéine due à l'introduction de molécules d'eau.

L'étude structurale du BPTI présentée dans le chapitre III a montré qu'à cette valeur de la pression, le rayon de giration de la protéine diminue avec une valeur de $R_g = 15 \text{ \AA}$ par rapport à 15.3 \AA à l'état natif. Mais la protéine ne possède plus sa structure native lorsqu'elle est soumise à une pression de 5000 bar, elle est, en effet, plus aisément décrite comme une micelle. La pénétration de molécules d'eau a déstabilisé les liaisons hydrogènes impliquées dans les structures en hélices. Les protons situés sur les chaînes latérales de résidus habituellement moins exposés, et donc plus contraints, acquièrent des degrés de liberté supplémentaires et explorent ainsi un espace plus important.

Cette pression de 5000 bar a aussi pour effet d'augmenter la densité de la couche d'eau à la surface du BPTI. Ce phénomène aura pour tendance de ralentir un peu plus les mouvements internes des protons d'où la diminution de la proportion de protons mobiles.

Lorsque l'échantillon est soumis à une pression de 6000 bar, le rayon de sphère diminue fortement avec une légère augmentation de la proportion de protons mobiles par rapport à la pression précédente. La pression influence fortement la dynamique des protons de surface. Une plus forte pénétration d'eau dans la protéine peut avoir lieu à cette valeur de la pression et la densité au voisinage des chaînes latérales des résidus appartenant aux structures dépliées va augmenter. Ces molécules d'eau vont contraindre les mouvements de ces chaînes et induire, par conséquent, cette réduction de rayon de sphère.

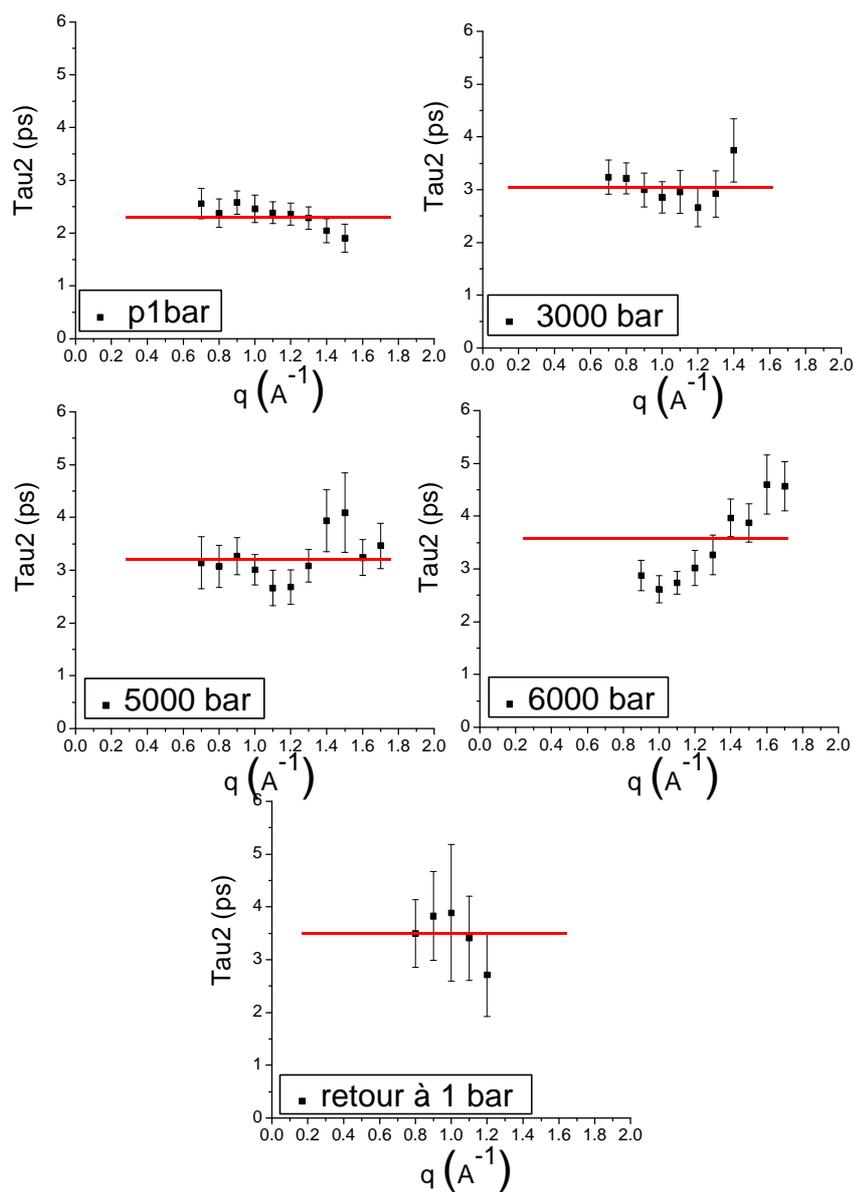


Figure IV.33 : Evolution du second temps de relaxation τ_2 en fonction du vecteur d'onde q à différentes valeurs de la pression appliquée.

Pression (bar)	$\langle \tau_2 \rangle$ (ps)
1	2.3
3000	3
5000	3.2
6000	3.6
Retour à 1 bar	3.5

Tableau IV.e: Evolution de $\langle \tau_2 \rangle$ à différentes valeurs de pression.

La figure IV.33 et le Tableau IV.e présentent l'évolution de la valeur moyenne du second temps de relaxation τ_2 en fonction de la pression. Nous pouvons constater que la dynamique interne du BPTI ralentit dès 3000 bar puisque de $\langle\tau_2\rangle = 2.3$ ps à pression atmosphérique, les mouvements sont ralentis à $\langle\tau_2\rangle = 3$ ps à 3000 bar. L'influence de la pression devient un peu plus évidente à partir de 5000 bar puisque le ralentissement des mouvements caractérisé par ce temps de relaxation τ_2 atteint $\langle\tau_2\rangle = 3.2$ ps à cette valeur de la pression.

A 6000 bar, le ralentissement des mouvements est encore accentué pour atteindre $\langle\tau_2\rangle = 3.6$ ps .

Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique, nous ne retrouvons pas la valeur moyenne initiale de τ_2 , le ralentissement des mouvements induit par la pression est irréversible dans la mesure où la valeur du temps de relaxation τ_2 se maintient à $\langle\tau_2\rangle = 3.5$ ps.

En supposant que le ralentissement des mouvements concerne les protons situés sur les résidus de surfaces de la protéine, ce sont eux qui subissent l'effet de la pression avant le squelette du BPTI. Cette hypothèse est probable dans la mesure où chacun des résidus enfouis du BPTI vont avoir des contraintes stériques du fait de leur environnement constitué par les résidus qui leur sont voisins. De plus le cœur de la protéine est essentiellement composé de feuillets β rigide. Enfin les trois ponts disulfures de cette protéine va en plus ôter certains degrés de liberté à la fois à la chaîne principale et à ces résidus enfouis et leur chaînes latérales. Des expériences de simulation par dynamique moléculaire ont montré que le squelette du BPTI n'était pas affecté par la pression jusqu'à 5000 bar²¹.

Il est possible que la couche d'eau d'hydratation du BPTI soit modifiée en terme de densité et d'organisation. La pression va en effet induire une augmentation de la densité de l'eau à la surface de la protéine. Les molécules d'eau à la surface de la protéine vont contraindre de plus en plus les mouvements des chaînes latérales des résidus de surface au fur et à mesure de l'application de la pression.

La compaction irréversible du BPTI observée par diffusion de neutrons aux petits angles sous pressions induit sans doutes des contraintes supplémentaires d'où le ralentissement des mouvements observé pour des pressions supérieures à 5000 bar.

L'influence de la pression sur la dynamique interne du BPTI en solution est donc irréversible et est corrélée à la modification structurale de la protéine à haute pression qui a été détectée par diffusion de neutrons aux petits angles.

Il est important aussi de savoir qu'une analyse des facteurs de structure dynamique $S(q, \omega)$ par deux lorentziennes, l'une décrivant les mouvements rapides et l'autre représentant les mouvements plus lents dans le BPTI, donne sensiblement les mêmes résultats.

2. Etude à haute résolution

La dynamique globale du BPTI en solution a été observée par diffusion quasiélastique de neutrons à haute résolution. Les mesures ont été effectuées sur le spectromètre de diffusion de neutrons en temps de vol IN5 (la résolution adoptée est $\lambda = 9 \text{ \AA}$, $\text{FWHM} \approx 20 \text{ \mu eV}$). Les spectres $I(q, t)$ obtenus en fonction de la pression sont ajustés par un modèle d'exponentielle simple qui permettent d'accéder au temps caractéristique τ_1 .

La figure IV.34 représente l'inverse du temps de relaxation τ_1 en fonction de q^2 à différentes valeur de la pression depuis la pression atmosphérique jusqu'à 6200 bar.

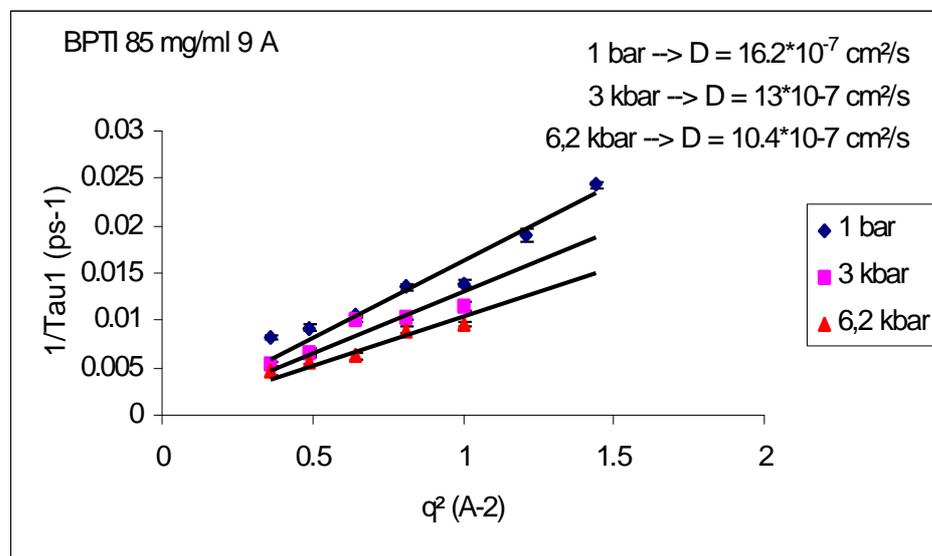


Figure IV.34: inverse du temps caractéristique τ en fonction du carré de vecteur d'onde pour le BPTI en solution à différentes pressions.

Cette évolution de $1/\tau_1$ en fonction de q^2 est linéaire de telle manière qu'il est possible d'écrire :

$$\frac{1}{t_1} = Dq^2 \quad (4.11)$$

où D est le coefficient de diffusion translationnel du BPTI en solution en $\text{\AA}^2.\text{ps}^{-1}$.

En ce qui concerne le BPTI à pression atmosphérique nous trouvons une valeur du coefficient translationnel $D = 16,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature ($D = 12 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ à 65 mg/ml de BPTI à pH 5)³. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que les corrections de cellule lors de la soustraction ne sont peut être pas parfaites compte tenu de son épaisseur importante, nous allons donc considérer ces valeurs de coefficient de diffusion de manière relative en les comparant pour les différentes valeurs de pressions appliquées.

La pression a un effet évident sur la dynamique globale de la protéine en solution dans la mesure où le coefficient de diffusion translationnelle diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la pression comme le montrent les figures IV.34 et IV.35.

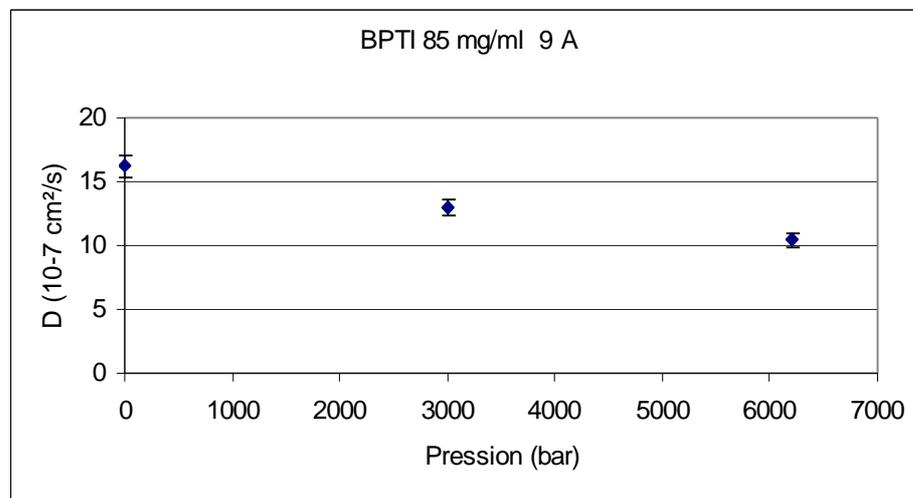


Figure IV.35: évolution du coefficient de diffusion translationnelle pour le BPTI en solution à différentes pressions.

-
- ¹ Gallagher W.H. et Woodward C.K., *Biopolymers*, **28**, 1989, pp 2001-2024.
- ² Volino and Dianoux J. *Molecular Physics*, **41**, 1980, pp 271-279
- ³ Carpentier L, Bée M., Giroud-Godquin A.M., Maldivi P., Marchon J.C. (1989). Alkyl chain motion in columnar mesophases. A quasielastic neutron scattering study of dicopper tetrapalmitate. *Mol Phys* ; **68** pp1367-1378
- ⁴ Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003,pp 137 –143
- ⁵ G. Careri, A. Giansanti, E. Gratton, *Lysosyme film hydration events : an IR and gravimetric study*, *Biopolymers* **18**, 1979, pp 1187-1203.
- ⁶ P. Yang, J. A. Rupley, *Protein-water interactions. Heat capacity of lysosyme-water systems*, *Biochemistry* **18**, 1979, pp 2654-2661
- ⁷ W. Doster, A. Bachleitner, R. Dunau, M. Hiebl & E. Luescher, *Thermal properties of water in myoglobin crystals and solution at subzero temperatures*, *Biophys. J.*, **50**, 1986, pp 213-219.
- ⁸ B. Lee & F. M. Richards, *The interpretation of protein structures : estimation of the static accessibility*, *J Mol Biol* **55**, 1971, pp 379-400.
- ⁹ J. A. Rupley & G. Careri, *Protein hydration and function*, *Adv. Prot. Chem.* **41**, 1991, pp 37-172.
- ¹⁰ J. A. Rupley , P. H. Yang & G. Tollin *ACS Symp. Ser.* **127**, 1980, pp 111-132.
- ¹¹ Zaccai G, *Science*, **288**, 2000, pp 1604-1607
- ¹² Dellerue S. Thèse 2000 : Structure et dynamique de protéines photosynthétiques étudiées par diffusion de neutrons et simulation par dynamique moléculaire..
- ¹³ Ferrand M, Dianoux AJ, Petry W, and Zaccai G, *PNAS*, **90**, 1993, pp 9668-9672
- ¹⁴ Volino F. et Dianoux A.J., *Mol. Phys.*, **41**, 1980, p 271.
- ¹⁵ Makhatadze GI, Kim KS, Woodward C, Privalov PL., *Protein Sci*, **2**(12), 1993, pp 2028-2036
- ¹⁶ Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003, pp 137 –143
- ¹⁷ Tehei M, *PNAS*, **98** (25), 2001, pp 14356-14361.
- ¹⁸ Experiences de DNPA réalisées sur le spectromètre PACE (LLB, Saclay), et KWS-1 (Forschungszentrum, Jülich). Résultats en attente de confirmation et de publication.
- ¹⁹ Hayward JA., Finney JL., Daniel R.M., et Smith JC., *Biophys. J.*, **85**, 2003, pp 679-685.

²⁰ Mentré P., et Hui Bon Hoa G., *Intern. Rev. Cyt.*, Effects of High Hydrostatic Pressures on Living Cells : A Consequence of the Properties of Macromolecules and Macromolecules-associated Water., **201**, 2000, pp 1-84.

²¹ Brunne R.M. et Van Gunsteren W.F., *FEBS Letters*, **323**, 1993, pp 215-217.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :

L'objectif de cette thèse a été de comparer les effets de la température et de la pression sur la structure et la dynamique d'une protéine modèle, l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (BPTI).

Ce système modèle a été étudié par de nombreuses techniques spectroscopiques comme l'infrarouge, le Raman, la R.M.N. et la simulation par dynamique moléculaire. Les résultats de ces études nous ont aidé à interpréter certains de nos résultats.

L'outil qui nous a permis cette investigation a été essentiellement la diffusion des neutrons.

La diffusion de neutrons aux petits angles associée à la théorie des polymères nous a permis, par le biais de modèles géométriques relativement simples, d'interpréter l'influence de la température et de la pression sur le rayon de giration du BPTI, sur la forme de la molécule et sur les interactions intermoléculaires.

La diffusion quasiélastique de neutrons nous a permis, quant à elle, d'étudier l'influence de ces deux paramètres physiques sur les mouvements de diffusion globale et sur la dynamique interne du BPTI en solution à des échelles de temps de l'ordre de la picoseconde. L'interprétation des résultats a été réalisée sur la base d'un modèle très simple de diffusion dans une sphère en tenant compte de la proportion de protons mobiles.

Une première série d'expériences de diffusion de neutrons aux petits angles nous a servi à caractériser le BPTI en solution. Le BPTI dans son état natif présente un rayon de giration de 10.9 Å, rayon de giration extrapolé à concentration nulle. Une simulation du facteur de forme à partir de la structure cristallographique du BPTI donne une valeur similaire égale à 10.8 Å. Ces valeurs sont proches de celles trouvées dans la littérature (environ 12 Å par Budayova-Spano et al¹ en DNPA). Un ajustement du facteur de forme expérimental et de celui issu de la simulation, à l'aide d'un modèle d'ellipsoïde donne de meilleurs résultats que l'ajustement avec un modèle de sphère ou de coquille sphérique. La protéine se présente, en effet, sous la forme d'une poire et est mieux représentée par un ellipsoïde.

L'influence de la température sur les conformations de la protéine en solution a été étudiée dans le domaine de Guinier afin d'observer plus précisément les modifications au niveau du rayon de giration de la protéine ainsi qu'au niveau des interactions intermoléculaires.

A température ambiante et à haute concentration (40 mg/ml), des interactions attractives apparaissent, les molécules de BPTI sont plus proches les unes des autres, ce qui conduit à l'augmentation de la valeur du rayon de giration apparent. Ce n'est pas le cas à plus basse concentration.

Le rayon de giration du BPTI à 8.8 mg/ml ne présente pas de variation pour des températures comprises entre 22 °C et 70 °C et se maintient autour de 11,3 Å. Lorsque l'échantillon est porté à une température de 85 °C, la valeur du rayon de giration augmente jusqu'à 12,3 Å. Ceci peut s'expliquer par une modification de la structure du BPTI et plus précisément par un dépliement partiel de la protéine. Il ne s'agit pas du résultat d'une association de protéines puisque l'intensité lorsque q tend vers 0 ne varie pas avec la température.

La détermination du second coefficient du viriel A_2 montre que la température influence les interactions intermoléculaires à 85°C.

Lorsque l'on porte les échantillons à 95°C, les résultats font état d'une augmentation du rayon de giration de la protéine, extrapolé à concentration nulle : nous trouvons une valeur de 13.3 Å. Cette augmentation de la valeur du rayon de giration du BPTI à haute température peut s'expliquer par une modification au sein des structures secondaires de la protéine : les hélices alpha sont dépliées et certaines parties de structures désordonnées acquièrent plus de liberté d'autres parties de ces structures désordonnées sont modifiées pour former des feuilletts β comme nous avons pu le confirmer par spectroscopie optique.

Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons étendu la gamme de vecteur d'onde jusqu'à 0.4 \AA^{-1} afin de nous rendre compte de l'influence de la température sur la forme du BPTI. En représentation de Kratky, le meilleur ajustement des points expérimentaux a été réalisé avec un modèle d'ellipsoïde. Aucune modification de la forme du BPTI n'est visible entre la température ambiante et 85 °C. De plus, lorsque l'échantillon est ramené à température ambiante, nous retrouvons la même forme ellipsoïdale. A 95°C, la protéine conserve toujours sa forme ellipsoïdale mais les axes de l'ellipsoïde sont modifiés de telle manière que le volume augmente de près de 6.5%.

La question, au vu de ces résultats, est : est-ce que la pression induit des modifications structurales similaires à celles induites par la température ?

Pour y répondre, nous avons procédé à des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles sur une solution concentrée de BPTI sous une pression maximale de 6200 bar, grâce à une cellule en alliage de cuivre – béryllium. Ce dispositif nous a permis de réaliser simultanément des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles et de diffusion quasiélastique de neutrons.

Les expériences de DNPA sous pression sur une solution de BPTI à 85 mg/ml ont montré un maintien du rayon de giration entre 1 bar et 3 kbar ($\sim 15.2 \text{ \AA}$), une diminution du rayon de giration à 5 kbar (15 \AA) et à 6 kbar (13.8 \AA). Nous pouvons avancer les hypothèses suivantes pour expliquer ce phénomène :

- la compaction du cœur hydrophobe de la protéine sous l'action de la pression
- la pénétration de molécules d'eau lourde à l'intérieur de la protéine diminuant par conséquent le contraste entre la protéine hydrogénée et le solvant deutéré.

Les structures situées à la périphérie du BPTI, notamment les hélices α commenceraient à se déplier et présenter un contraste local moins important.

Lorsque l'échantillon est ramené à la pression atmosphérique, on constate une petite diminution du rayon de giration (15 \AA) par rapport à l'état initial (15.2 \AA). Ce phénomène peut s'expliquer par une modification des structures secondaires et notamment une transformation des structures désordonnées comme celles des boucles en feuillets β qui, à nombre égal d'acides aminés occupent un espace moins important.

Nous avons tenté de déterminer, à partir des valeurs de $I(0)$, la variation de contraste et de volume spécifique du BPTI pour chacune des valeurs de la pression appliquée. Les résultats ont montré que la pression provoque une diminution du contraste entre la protéine et le solvant et, par conséquent, induit une réduction de ce volume. Il aurait fallu travailler dans les mêmes conditions que pour l'étude en température pour avoir, en plus, une information sur l'effet de la pression sur les interactions intermoléculaires.

Afin d'étudier l'influence de la pression sur la forme de la protéine, il s'est avéré nécessaire d'étendre le domaine de vecteur d'onde jusqu'à 0.4 \AA^{-1} .

En augmentant la pression entre 1 bar et 3 kbar, la protéine adopte une forme sphérique plutôt qu'une forme ellipsoïdale. Une étude par R.M.N. sous pression jusqu'à 2000 bar a montré que la protéine adoptait une conformation différente de celle de l'état natif. La simulation du facteur de forme, à partir de la structure cristallographique du BPTI à 2000 bar,

issue des études par R.M.N., n'a pu être ajustée correctement que par le modèle de l'ellipsoïde.

La protéine ne possède plus sa structure native lorsque la pression à laquelle elle est soumise atteint les valeurs de 5000 et 6000 bar. A ces pressions, la protéine se présente comme une "micelle" formée par un cœur compact sphérique entouré par une couronne de structures aléatoires assimilées à des chaînes gaussiennes. La structure du BPTI est donc affectée de manière significative dès 5000 bar ce qui est en accord avec ce qui est observé en infrarouge. Lorsque l'échantillon est ramené à 1 bar, le BPTI ne présente plus sa forme ellipsoïdale mais garde une forme plutôt sphérique. Une modification structurale a donc eu lieu à haute pression et l'action de la pression sur le BPTI est donc irréversible.

La question qui pourrait maintenant se poser est : la modification de la structure du BPTI induite par la température ou la pression a-t-elle une influence sur les mouvements de diffusion globale et sur la dynamique interne de la protéine ?

Pour y répondre, nous avons procédé à une étude du BPTI en solution par diffusion quasiélastique de neutrons.

Une étude entre 280 K et 363 K de la dynamique globale et de la dynamique interne a été effectuée sur le BPTI en solution acide dans le but d'éviter tout phénomène d'interactions intermoléculaires. Ces conditions sont les mêmes que pour l'étude structurale.

Les fonctions intermédiaires de diffusion $S(q,t)$ ont été ajustées par un modèle de somme d'exponentielles tenant compte de deux temps de relaxation τ_1 et τ_2 .

Les résultats ont montré, par le biais du premier temps de relaxation τ_1 relatif à la diffusion globale de la protéine, une augmentation des mouvements de translation de la protéine en solution, lorsque la température passe de 280 K à 363 K.

D'autre part, les résultats des ajustements par le modèle de diffusion dans une sphère ont montré une augmentation du rayon de la sphère dans laquelle les mouvements internes opèrent lorsque la température passe de 280 K à 363 K. A basse température (280 K) les protons liés aux extrémités des chaînes latérales des résidus de surface de la protéine participent aux mouvements internes. Lorsque la température augmente, les protons des chaînes latérales situés plus près du carbone $C\alpha$ des résidus de surface participent à ces mouvements. De plus le second temps de relaxation τ_2 , relié aux mouvements internes, diminue lorsque la température passe de 280 K à 363 K.

L'augmentation de la valeur de la constante de diffusion translationnelle du BPTI à haute température s'explique par l'influence de ce paramètre sur le milieu dans lequel diffuse la protéine : la viscosité diminue au fur et à mesure de l'augmentation la température, ce qui facilite d'autant plus les mouvements globaux de la protéine. Le rayon de giration de la protéine augmente à 95°C mais pas suffisamment pour ralentir ces mouvements d'après la loi de Stokes-Einstein.

Nous avons également étudié l'évolution du déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température entre 280 K et 360 K pour le BPTI en solution. Lorsque la température passe de 280 K à 360 K, l'évolution de $\langle u^2 \rangle$ se fait en deux étapes avec une transition à 350 K. Par spectroscopie Raman, on sait qu'à cette température une grande majorité des structures secondaires est perdue et que le BPTI prend une conformation différente de celle de l'état natif. Cet effet est observé sur l'évolution de $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température. Un phénomène d'hystérésis en trois étapes est observé lorsque l'échantillon est refroidi depuis 360 K jusqu'à 280 K : la protéine se maintient dans une conformation dénaturée entre 360 et 350 K, se replie partiellement à partir de 350 K jusqu'à 320 K et garde cette nouvelle conformation différente de l'état natif jusqu'à 280 K. Les études réalisées en spectroscopie Raman² font état d'un recouvrement partiel des hélices α lors du refroidissement des échantillons après chauffage jusqu'à 95°C.

L'évolution du déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température entre 280 K et 320 K du BPTI en solution en présence d'un dénaturant chimique, le thiocyanate de guanidinium a été étudié. Nous avons observé une dynamique plus importante de la protéine dans ces conditions. De plus, l'action de l'agent dénaturant est irréversible sur cette dynamique et peut s'expliquer par un dépliement partiel de la molécule.

Il est important de savoir qu'une étude de l'influence de la pression sur la structure du BPTI en solution en présence d'agent réducteur de ponts disulfures, le 2-mercaptoethanol, a été réalisée par infrarouge³. Il a été montré une transition structurale à partir de 4000 bar, pression à partir de laquelle les bandes caractéristiques des feuillets β (1624 et 1636 cm^{-1}) deviennent plus intenses. Au-delà de 10 000 bar, le dépliement du BPTI réduit est complet. Lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique, des bandes caractéristiques d'agrégation de la protéine apparaissent à 1612 et 1683 cm^{-1} . Ce phénomène n'apparaît pas pour le BPTI natif, en absence d'agent réducteur.

Par diffusion quasiélastique de neutrons à haute résolution ($\lambda = 9 \text{ \AA}$, FWHM = 20 μeV), nous avons suivi la dynamique globale du BPTI en solution acide en fonction de la pression. L'ajustement des fonctions intermédiaires de diffusion est fait en utilisant une exponentielle simple. La pression a un effet évident sur la dynamique globale de la protéine en solution dans la mesure où le coefficient de diffusion de translation diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la pression. Bien que nous ayons détecté une réduction du rayon de giration lorsque la solution de BPTI est soumise à une pression de 6200 bar, les mouvements globaux de la protéine sont ralentis. Ceci s'explique par le fait que la viscosité du solvant D₂O augmente avec la pression,

Par conséquent, la pression agit sur la diffusion globale de la protéine de manière indirecte via la modification des propriétés du solvant.

Par diffusion quasiélastique de neutrons à basse résolution ($\lambda = 5.1 \text{ \AA}$, FWHM = 100 μeV) nous avons suivi à la fois la dynamique globale et la dynamique interne du BPTI en solution.

Nous avons essayé d'ajuster les données à l'aide d'un modèle d'exponentielle étirée. Ce modèle n'a pas permis de décrire très précisément l'influence de la température ou de la pression sur la dynamique du BPTI à basse résolution ; nous avons donc réalisé une nouvelle analyse sur la base d'une somme de deux exponentielles caractérisées par les temps de relaxation τ_1 et τ_2 .

Le premier temps de relaxation τ_1 est relié au coefficient de diffusion translationnelle qui diminue quand la pression augmente. Nous trouvons des valeurs de coefficient de diffusion de translation très proches de celles obtenues à haute résolution. L'effet de la pression sur la diffusion globale de la protéine est irréversible car l'on ne retrouve pas la valeur initiale du coefficient de diffusion lorsque l'échantillon est ramené à pression atmosphérique. Ce changement dans la dynamique globale du BPTI peut être relié à la modification structurale du BPTI observée sous pression par diffusion de neutrons aux petits angles où le BPTI adoptait une forme sphérique plutôt qu'ellipsoïdale.

Les résultats des ajustements par le modèle de diffusion dans une sphère ont montré une diminution du rayon de la sphère dans laquelle les mouvements internes opèrent lorsque

la pression appliquée augmente jusqu'à 3000 bar. Les molécules d'eau constituant les premières couches d'hydratation du BPTI vont être influencées par la pression et la densité de cette couche va augmenter. Ce phénomène va contraindre les mouvements des chaînes latérales des résidus situés à la surface de la protéine. Une pression de l'ordre de 5000 bar induit une augmentation du rayon de la sphère dans laquelle les mouvements internes opèrent. Ceci peut s'expliquer par une modification structurale observée par diffusion de neutrons : en effet, le facteur de forme de la molécule de BPTI est mieux décrit par un modèle de micelles.

Une introduction d'eau au niveau de certaines structures secondaires de la protéine a pu déplier partiellement la protéine, notamment au niveau des structures désordonnées et des hélices, et a pu rendre plus mobile certaines chaînes latérales de résidus de surface faisant participer aux mouvements internes des protons plus proche du carbone $C\alpha$, d'où cette augmentation du rayon de la sphère.

Lorsque la pression appliquée atteint 6000 bar, le rayon de la sphère diminue de manière évidente. Nous pouvons expliquer ce phénomène par une plus forte pénétration d'eau dans la protéine et la densité au voisinage des chaînes latérales des résidus appartenant aux structures dépliées va augmenter. Ces molécules d'eau vont contraindre les mouvements de ces chaînes et induire, par conséquent, cette réduction du rayon de sphère.

Sur la base de l'évolution du second temps de relaxation, nous avons constaté un ralentissement de la dynamique interne du BPTI dès 3000 bar. Ce ralentissement s'accroît au fur et à mesure de l'application de la pression jusqu'à 6000 bar. Les mouvements des chaînes latérales de surface sont affectés par la pression suite à la réorganisation et surtout à l'augmentation de la densité de l'eau à la surface du BPTI.

Après retour à pression atmosphérique, nous ne retrouvons pas la valeur moyenne initiale de τ_2 . L'influence de la pression sur la dynamique interne du BPTI en solution est donc irréversible ce qui est lié à la modification structurale de la protéine observée par DNPA à haute pression. De plus, la β agrégation, observé en infrarouge⁴ et qui est le résultat de la modification de structures désordonnées en feuillets β induit une rigidification de ces domaines et provoque un ralentissement de la dynamique interne à ce niveau.

Des études en spectroscopie UV-visible en fonction de la température et en fonction de la pression nous ont permis de compléter l'étude structurale par diffusion de neutrons aux petits angles.

Nous avons tenté de démontrer le phénomène de β - agrégation en utilisant une sonde spécifique, le rouge Congo qui a la propriété de s'intercaler entre les feuillets β nouvellement formés dans la protéine. Cette étude par spectroscopie optique en fonction de la température nous a révélé que la β - agrégation n'intervient qu'après avoir porté la solution de protéine à une température de 95°C, puis refroidie à température ambiante. L'étude en UV-visible en fonction de la pression montre que le rouge Congo ne se fixe pas, ou du moins pas assez, lorsque l'échantillon est soumis à une pression de 6700 bar, ni lorsqu'il est ramené à pression atmosphérique. Une pression de 6700 bar ne permet donc pas l'apparition de nouveaux feuillets β .

L'influence de la température et de la pression sur l'environnement de résidus aromatiques a été observée par absorption UV en dérivée 4^{ème}. Nous avons mis en évidence l'effet antagoniste de la température et de la pression sur l'environnement des résidus aromatiques du BPTI et en particulier les tyrosines, localisées essentiellement sur les feuillets β au centre de la protéine. La température a pour effet d'exposer ces résidus au solvant tandis que la pression accentue l'hydrophobicité de l'environnement autour des tyrosines. Cette augmentation du caractère hydrophobe du milieu au voisinage des résidus tyrosines est probablement due à la compaction du cœur de la protéine déjà observé par R.M.N.⁵

Il serait intéressant de poursuivre ces études par des expériences en spectroscopie de fluorescence. Grâce à une sonde, l'ANS, qui émet un signal quand elle se trouve dans un environnement hydrophobe, il est possible de suivre le dépliement partiel du BPTI sous pression.

Le dépliement du BPTI sous pression nécessite de monter à des pressions supérieures à 10 000 bar. Il sera alors possible de décrire le diagramme pression - température du BPTI.

Il sera possible d'atteindre cet objectif par la réalisation d'une nouvelle cellule au LLB.

L'étude des protéines par la diffusion des neutrons offre de nombreuses possibilités. Pour l'observation de la dynamique, il est intéressant d'utiliser la variation de contraste (H/D) qui permettrait d'observer l'influence de la température et de la pression sur certaines structures secondaires qui resteraient hydrogénées alors que le reste serait deutéré. L'inconvénient de l'utilisation de la diffusion neutronique réside dans la taille de l'échantillon ; en effet une étude en dynamique d'une protéine hydrogénée en tampon deutéré

nécessite déjà des concentrations élevées, par conséquent, l'observation d'un domaine précis ne pourra se faire qu'à des concentrations plus grandes encore. Il faut sans doute commencer ce genre d'études sur des poudres hydratées par des tampons à base d'eau lourde ou immobiliser ces protéines sur des supports dont la composition sera dépourvue d'hydrogène afin d'observer la dynamique des hélices α ou celle des feuillets β en fonction de la température et du degré d'hydratation.

Afin de mieux comprendre la relation structure – dynamique – fonction du BPTI, il serait intéressant d'observer l'effet de la température et de la pression sur le complexe BPTI-trypsine, sachant que la protéase est dénaturée pour des températures supérieures à 74°C⁶ et pour des pressions au-delà de 6500bar⁷. L'étude de la structure et de la dynamique du BPTI hydrogéné complexé à une trypsine deutéré, ou inversement, dans un milieu composé d'un mélange adéquat d'eau lourde et d'eau légère pourrait être intéressante ; la réalisation des échantillons notamment de la trypsine deutéré sera cependant difficile et onéreux.

¹ Budayova-Spano M., Lafont S., Astier J.P., Ebel C., et Veesler S., *J. of Cryst Growth*, **217**, 2000, pp 311-319.

² Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003, pp 137 –143

³ Meersman P., Heremans K., *Biophys. Chem.*, **104**, 2003, pp 297-304.

⁴ Goosens K, Smeller L, Frank J, Heremans K, *Eur. J. Biochem.*, 236, 1996 , pp 254-262.

⁵ Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., et Woodward C.K., *Protein Science*, **8**, 1999, pp 1946-1953

⁶ Ivanova G.P., Mirgorodskaja O.A., Moskvichev B.V., Kozlov L.V., *Biokhimiia*, **46**(10), 1981, pp 1815-1822.

⁷ Ruan K., Lange R., Meersman F., Heremans K., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 1999, pp 79-85

BIBLIOGRAPHIE

- Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., et Woodward C.K., *Protein Science*, **8**, 1999, pp 1946-1953
- B. Lee & F. M. Richards, *The interpretation of protein structures : estimation of the static accessibility*, *J Mol Biol* **55**, 1971, pp 379-400.
- Balny C, *Bulletin de la Société Française de Biophysique*, **140**, 2003, pp 10-13.
- Balny C., Hooper A.B., *Eur. J. Biochem.*, **176**, 1988, pp 273-279
- Balny C., Masson P., et Heremans K., *BBA*, **1595**, 2002, pp 1-402.
- Bée M., *Quasi-elastic neutron scattering, principles and applications in solid state chemistry, biology and materials science*, Adam Hilger, Bristol, Philadelphia, 1988.
- Bellissent-Funel M.-C, Teixeira J., Bradley K. F. & Chen S. H., *dynamics of hydration water in protein*, *J. Phys I France* **2**, 1992, pp 995-1001.
- Benoît H. et Benmouna M., *Macromolecules* **17**, 1984, pp 535-540
- Benoit-Doty . *J.Phys. Chem.* **57**, 1953, p 958:
- Bert P., *La pression barométrique*, Recherche de physiologie expérimentale G. Masson édition Paris 1878.
- Branden C. et Tooze J., *Introduction to protein structure*, Garland Publishing, Inc New York and London, 1991.
- Brandts J.F., Oliveira R.J., et Westort C., *Biochemistry*, **9**, 1970, pp 1038-1047.
- Bridgman P.W., *J. Chem. Phys.* **3**(10), 1935, pp 597-605
- Bridgman P.W., *J. Biol. Chem.*, **19**, 1914, pp 511-512.
- Briki F., Busson B., Doucet J., *BBA*, **1429**, 1998, pp 57-68.
- Brown L.R., De Marco A., Richarz R., Wagner G., Wüthrich K., *Eur. J. Biochem.*, **88**, 1978, pp 87-95
- Brunne R.M. et Van Gunsteren W.F., *FEBS Letters*, **323**, 1993, pp 215-217.
- Budayova-Spano M., Lafont S., Astier J.P., Ebel C., et Veessler S., *J. of Cryst Growth*, **217**, 2000, pp 311-319.
- Byers T.Y., et Brandton D., *PNAS*, **82**, 1985, p 6153.
- Calmettes P., Durand D., Desmadril M, Minard P, Receveur V, and Smith J. How random is a highly denatured protein ? *Biophys. Chem* **53**, 1994, pp 105-114
- Cao A., Hu D., Lai L., *Protein Sci.*, **13**(2), 2004, pp319-324
- Carmona P, Molina M, Rodriguez-Casado A, *Eur Biophys J*, **32**, 2003, pp137 –143
- Carpentier L, Bée M., Giroud-Godquin A.M., Maldivi P., Marchon J.C. Alkyl chain motion in columnar mesophases. A quasielastic neutron scattering study of dicopper tetrapalmitate. *Mol Phys* ; **68**, 1989, pp1367-1378
- Chang J-Y et Ballatore A, *FEBS Letters*, **473**(2), 2000, pp 183-187.
- Chatani E., Nonomura K., hayashi R., Balny C., et Lange R., *Biochemistry*, **41**, 2002, pp 4567-4574
- Chothia C., *Structural invariants in protein folding*, *Nature* **254**, 1975, pp 304-308.
- Cotton J.P. Neutron, X-Ray and Light Scattering, Elsevier science Publishers B.V. 1991, pp 3-31
- Creighton T.E *Science* **256**, 1992, pp 111-114
- Cusack S., Smith J.C., Finney J., Karplus M., et Trehwella J., *Physica B*, **136**, 1986, pp 256-259.
- Cusack S., Smith J.C., Finney J., Tidor B., et Karplus M., *J. Mol. Biol.*, **202**, 1988, pp 903-908.
- Cusack S. Large Amplitude motion in biological systems. Hercules Book. Volume III application to soft condensed matter and biology. chapitre XVI. Les éditions de physique. 1989, pp 279-296

De gennes P.G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*, *Cornell University Press London*, 1979

Debye, *J. Appl. Phys.*, **15**, 1944, pp 338-342

Des Cloiseaux, *Macromolecules*, **6**, 1973, pp 403-407.

Dellerue S. Thèse 2000 : Structure et dynamique de protéines photosynthétiques étudiées par diffusion de neutrons et simulation par dynamique moléculaire..

Deisenhofer J. et Steigemann W., *Acta Cryst.*, **B31**, 1975, pp 238-250.

Di Bari M., Deriu A., Filabozzi A., Andreani C., Di Venere A., et Rosato N., *Physica B*, **276-278**, 2000, pp 510-511.

Doster W., Gebhardt R., *Chem. Phys.*, **292**, 2003, pp 383-387.

Douglas J. F. et Freed K. F., *Macromolecules* **17** 1985, pp 1854-1870

Dubins D.N., Filfil R., Macgregor Jr R.B., Chalikian T.V., *Biochemistry*, **42**, 2003, pp 8671-8678

Dumoulin M., Ueno H., Hayashi R., Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **262**, 1999, pp 475-483

Erauso G., Reysenbach A.L., Godfroy A., Meunier J.R., Crump B., Partensky F., Baross J.A., Martinson V., Barbier G., Pace N., et Prieur D., *Archives on microbiology*, **160**, 1993, pp 338-349.

Expériences de DNPA réalisées sur le spectromètre PACE (LLB, Saclay), et KWS-1 (Forschungszentrum, Jülich). Résultats en attente de publication.

Feigin L. A. and Svergun D. I., *Structure Analysis by Small angle X-ray and Neutron Scattering*, *Plenum Press, New York and London*, 1989

Ferrand M, Dianoux AJ, Petry W, and Zaccai G, *PNAS*, **90**, 1993, pp 9668-9672

Fitter J., Verclas S. A. W., Lechner R. E., Seelert H. & Dencher N. A., *Function and picosecond dynamics of bacteriorhodopsin in purple membrane at different lipidation and hydration*, *FEBS Lett.* **433**, 1998, pp 321-325.

G. Careri, A. Giansanti, E. Gratton, *Lysosyme film hydration events : an IR and gravimetric study*, *Biopolymers* **18**, 1979, pp 1187-1203.

Gall A. et al. *Monitoring the internal dynamics of the bacterial photochemical reaction centre*.

Gallagher W.H. et Woodward C.K., *Biopolymers*, **28**, 1989, pp 2001-2024.

Gerstein M. & Chothia C., *Packing at the protein-water interface*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1996, pp 10167-10172.

Gibrat G. *rapport de stage de DEA physique des Solides*, Paris XI : Etude de la dénaturation thermique de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (BPTI).

Gill S.J., et Glogovsky R.L., *J. Chem. Phys.*, **69**, 1965, pp 1515-1519.

Goosens K, Smeller L, Frank J, Heremans K, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1996 , pp 254-262,

Green N.M. et Work E., *Biochem. J.*, **54**, 1953, p 347

Hamiaux C. Thèse 2000 : Cristallogénèse du BPTI à pH acide. Etude des relations entre l'état d'association des molécules en solution et à l'état cristallin par diffusion et diffraction des rayons X.

Hamiaux C., Pérez J., Prangé T., Veessler S., Riès-Kautt M., et Vachette P., *J. Mol. Biol.*, **297**, 2000, pp 697-712.

Hawley SA, *Biochemistry*, **10**, 1971, pp 2436-2442.

Hayward JA., Finney JL., Daniel R.M., et Smith JC., *Biophys. J.*, **85**, 2003, pp 679-685.

Heremans K., et Smeller L., *BBA*, **1386**, 1998, pp 353-370.

Heremans K., *High Pressure Research*, **24**(1), 2004, pp 57-66

Hite B.H., Giddings N.J., et Weakley Jr C.E, *West Virginia University Agricultural Experiment Stations bulletins*, **146**, 1914, pp 3-67.

<http://www.lactel.fr/franc/nut/nutlait2.html/>

Ikeuchi Y., Susuki A., Oota T., Hagiwara K., Tatsumi R., Ito T., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2002, pp 364-371

Ivanova G.P., Mirgorodskaja O.A., Moskvichev B.V., Kozlov L.V., *Biokhimiia*, **46**(10), 1981, pp 1815-1822.

J. A. Rupley & G. Careri, *Protein hydration and function*, Adv. Prot. Chem. **41**, 1991, pp 37-172.

J. A. Rupley, P. H. Yang & G. Tollin ACS Symp. Ser. **127**, 1980, pp 111-132.

J. G. Powles, *The structure of molecular liquids by neutrons scattering*, advances in physics, **22**, 1973, pp 1-56.

Jacrot B. The study of biological structures by neutron scattering from solution. *Rep. Prog. Phys* **39**, 1976, pp 911-935

Jaenicke J. R. Role of accessory proteins in protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* **53**, 1993, pp 104- 112

Kamaya H., Ueada I., Moore P.S., et Eyring H., *Biochem. Biophys. Acta*, **550**(1), 1979, pp 131-137.

Kaneshima S., Ueda I., Kamaya H., et Eyring H., *Biochem. Biophys. Acta*, **603**(2), 1980, pp 237-244.

Kitchen D.B., Reed L.H., Levy R.M., *Biochemistry*, **31**, 1992, pp 10083-10093.

Kornblatt J.A., Kornblatt M.J., Clery C., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 1999, pp 120-126

Kraulis P.J. *J. Appl. Crystallog.*, **24**, 1991, pp 946-950.

Kuinitz M., Northrop J.M., *The Journal of General Physiology*, 1936, pp 991-1007.

Kunugi S., Kitayaki M., Yanagi Y., Tanaka N., Lange R., Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **248**, 1997, pp 567-574.

Lafont S., Veessler S., Astier J.P., et Boistelle R., *J. Cryst. Growth*, **173**, 1997, pp 132-140.

Laidler K.H., *Arch Biochem.*, **30**(2), 1951, pp 226-236.

Lange R., Frank J., Saldana J.-L., et Balny C., *Eur Biophys J*, **24**, 1996, pp 277 –283

Lange R., Heiber-Langer I., Bonfils C., Fabre I., Negishi M., et Balny C., *Biophys. J.*, **66**, 1994, pp 89-98.

Lee B. & Richards F. M., *The interpretation of protein structures : estimation of the static accessibility*, *J Mol Biol* **55**, 1971, pp 379-400.

Li H, Yamada H, Akasaka K, *Biochemistry*, **37**(5), 1998 pp 1167-1173.

Li H, Yamada H, Akasaka K, *Biophys. J.*, **77**, 1999, pp 2801-2812.

Loupiac C, Bonetti M, Pin S, Calmettes P, *Eur. J. Biochem.*, **269**(19), 2002, pp 4731-4737.

Makhatadze G.I., Kim K-S, Woodward C, et Privalov P.L, *Protein Science*, **2**, 1993, pp 2028-2036

McCammon J. A. & Harvey S. C., *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press, 1987.

Mentré P., et Hui Bon Hoa G., *Intern. Rev. Cyt.*, **201**, 2000, pp 1-84.

Meersman P., Heremans K., *Biophys. Chem.*, **104**, 2003, pp 297-304.

Neumann RC, Kauzmann W, et Zipp A *The Journal of Physical Chemistry*, **77**(22), 1973, pp 2687-2691

Neville W.M. et Eyring H., *PNAS*, **69**(9), 1972, pp 2417-2419.

Nielsen A. Neutron and Synchrotron radiation for condensed matter studies. Les éditions de la Physique eds Baruchel 1993, p 3-33.

Nyström B., Roots J., *J. Chem. Phys.*, **78**(6), 1983, pp 2833-2837.

Nyström B., Roots J., *Makromol. Chem.*, **185**, 1984, pp 1441-1447.

Ogunmola G.B., Kauzmann W., et Zipp A., *PNAS*, **73**(12), 1976, pp 4271-4273.

Ogunmola G.B., Zipp A., Chen F., et Kauzmann W., *PNAS*, **74**(1), 1977, pp 1-4.

Overman S.A., Aubrey K.L., Vispo N.S., Cesareni G., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **33**, 1994, pp 1037–1042

Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **38**, 1999, pp 4018–4027

Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *Biochemistry*, **37**, 1998b, pp 5654–5665

Overman S.A., Thomas G.J. Jr, *J. Raman Spectrosc.*, **29**, 1998a, pp 23–29

P. Yang, J. A. Rupley, *Protein-water interactions. Heat capacity of lysosyme-water systems*, *Biochemistry* **18**, 1979, pp 2654-2661

Paliwal A., Asthagiri D., Bossev D.P., Paulatis M.E., *Biophys. J.*, **87**(5), 2004, pp 3479-3492.

Pedersen J.S., Svaneborg C., Almdal K., Hamley I.W., et Young R.N., *Macromolecules*, **36**, 2003, pp 416-433.

Pedersen P. L., et Carafoli E., *Trends. Biochem. Sci.*, **12**, 1987, pp 146-150 et pp 186-189.

Pedersen. J. S. et Schurtenberger P., *Macromolecules* **29**, 1996, pp 7602-7612.

Perez J., J.M.Zanotti, D.Durand. Evolution of the internal dynamics of two globular Proteins from Dry Powder to solution. *Biophysical Journal* **77**, 1999, pp 454-469.

Porod. G. *Koll. Z.* **124**, 1951, p 83

Prehoda K.E., Mooberry E.S., et Markley J.L., *Prot. Dyn. Funct. And Design.*, High Pressure Effects on Protein Structure, 1997.

Preston G.M., Caroll T.P., Guggino W.B., Agre P., *Science*, **256**(5055), 1992, pp 385-387.

Rariy R.V., Bec N., Saldana J.L., Nametkin S.N., Mozhaev V.V., Klyachko N.L., Levasov A.V., et Balny C., *FEBS Letter*, **364**, 1995, pp 98-100.

Rawiso M., Duplessix R. et Picot C., *Macromolecules*, **20**, 1987, pp 630-648

Receveur V., Calmettes P., Smith J. C., Desmadril M., Coddens G. & Durand D., *Picosecond dynamical changes on denaturation of yeast phosphoglycerate kinase revealed by quasielastic neutron scattering*, *Proteins : Struct., Funct. Genet.* **28**(3), 1997, pp 380-387.

Receveur V. thèse 1997 : Etude structurale et dynamique des états dénaturés de la phosphoglycérate kinase de levure par diffusion de neutrons et de rayons X

Refaee M, Akasaka K, et Williamson M.P. *J. Mol. Biol.*, **327**, 2003, pp 857-865.

Regnard P., *La vie dans les eaux*, 1891

Richard F. M., *the interpretation of protein structures : total volume, group volume distributions and packing density*, *J. Mol. Biol.* **82**, 1974, pp 1-14.

Richards F. M., *Areas Volumes, Packing and protein structure*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 1977, pp 151-176.

Richards F. M., *Calculation of Molecular volumes and areas for structures of known geometry*, *Methods in Enzymology* **115**, 1985, pp 440-464.

Royer C., Hinck A.P., Loh S ;N., Prehoda K.E., Peng X., Jonas J., et Markley J.L., *Biochemistry*, **32**, 1993, pp 5222-5232.

Ruan K., Lange R., Meersman F., Heremans K., et Balny C., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 1999, pp 79-85

Rupley J. A. & Careri G., *Protein hydration and function*, *Adv. Prot. Chem.* **41**, 1991, pp 37-172.

Russo D. et al. Proceeding ECNS'99

Russo D. thèse 2000: Etude structurale et dynamique de l'état natif et des états dénaturés de la néocarzinostatine, par microcalorimétrie différentielle, spectroscopies optiques et diffusion de neutrons et de rayons X

Sabaté R., Estelrich J., *Inter. J. Biol. Macromol.*, **32**, 2003, pp 10-16.

Samarasinhe S.D, Campbell D.M., Jonas A. et Jonas J. *Biochemistry*, **31**, 1993, pp 7773-7778.

Sareth S., Li H., Yamada H., Woodward C.K., et Akasaka K., *FEBS Letters*, **470**, 2000, pp 11-14.

Sharp P., Bloomfield ,V. A, *Biopolymers*, **6**, 1968, p1201

Silva J.L., et Weber G., *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 1993, pp 89-113

Smith J. C., Lamy A., Kataoka M., Yunoki J., Petrescu A.-J., Receveur V., Calmettes P. et Durand D., *Motions in native and denaturated proteins*, *Physica B* 1998, pp 241-243.

Smith JC, Cusack S, Tidor B and Karplus M, *J. Chem. Phys.*, **93**, 1990, pp 2974-2991.

Smith JC, Cusack S., Pezzeca U., Brooks., B., et Karplus M., *J. Chem. Phys.*, **85**(6), 1986, pp 3636-3654.

Smith JC, Kuczera K, Tidor B, Doster W, Cusack S and Karplus M, *Physica B* **156 & 157**, 1989, p 437.

Squires G.L. Introduction to the théory of Thermal Neutron Scattering , *Cambridge*, 1978

University Press. Lowesey S.M. Theory of neutron scattering from condensed matter. Oxford University Press Eds. 1984

Susuki K, Miyosawa Y, Susuki C, *Arch. Biochem. Phys.*, **101**, 1963, pp 225-228.

Svergun D.I., Richard S., Koch M.H.J., Sayers Z., Kuprin S., et Zaccai G., *P.N.A.S.*, **95**, 1998, pp 2267-2272.

Takeda N, Nakano K, Kato M, Taniguchi Y, *Biospectroscopy*, **4**, 1998, pp 209-216

Tanaka S., Ataka M., Onuma K., Astier J.P., et Veessler S., *J. Cryst. Growth*, **237-239**, 2002, pp 289-294.

Tandford C. *Adv. Prot. Chem.*, **23**, 1968, pp 121-282

Tandford C. *Adv. Prot. Chem.*, **24**, 1970, pp 1-95

Tedford L.A., Smith D., et Schaschke C.J., *Food Research Int.*, **32**, 1999, pp 101-106.

Tehei M, *PNAS*, **98** (25), 2001, pp 14356-14361.

Vachette P., Small angle scattering by solution of biological macromolecules, *IOS press Amsterdam*, 1996

Vidugiris G.J.A., et Royer C.A., *Biophys. J.*, **75**, 1998, pp 463-470.

Vincent J.P. et Lazdunski M., *Biochemistry*, **11**, 1972, pp 2967-2977

Volino F., & Dianoux A., *Neutron Incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symetry : general formalism and application to diffusion inside a sphere*, *J. Molecular Physics*, **41**, 1980, pp 271-279.

W. Doster, A. Bachleitner, R. Dunau, M. Hiebl & E. Luescher, *Thermal properties of water in myoglobin cristals and solution at subzero temperatures*, *Biophys. J.*, **50**, 1986, pp 213-219.

Wagner G, *FEBS Letters*, **112**(2), 1980, pp 280-284.

Williams G. et Watts D.C., *Trans. Faraday Soc.*, **66**, 1970, pp 80-85.

Williamson M.P., Akasaka K, Refae M., *Protein Science*, **12**, 2003, pp 1971-1979.

Wlodawer A, Nachman J, Gilliland GL, Gallagher W, Woodward C, *J.Mol.Biol.*, **198**, 1987, pp 469-480.

Wong P.T.T., Hermans K., *BBA*, **956**, 1988, pp 1-9.

Wroblowski B., Diaz J.F., Heremans K., et Engelborghs Y., *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* , **25**, 1996, pp 446-455.

Wüthrich K., N.M.R. of proteins and nucleic acids. *John Wiley ans Sons, New York.*, 1986.

Yvon J., Les corrélations et l'entropie en mécanique statistique classique, *Dunod*, Paris 1966, pp 161-162

Zaccai G, *Science*, **288**, 2000, pp 1604-1607

Zaccai G. & Jacrot B. Small angle neutron scattering. *Ann. Rev. Biophys.. Bioeng.* **12**, 1983, pp 139-157.

Zanotti J.-M., Bellissent-Funel M.-C, Parello J., hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and NMR : the case of the typical EF-Hand calcium-binding parvalbumin, *Biophys. J.* **76**, 1999, pp 2390-2411.

Zanotti J.-M., *Structure et dynamique de l'eau interfaciale. Rôle de l'eau d'hydratation dans la dynamique des protéines globulaires*, thèse de l'université Paris XI, 1997.

Zhang J., Peng X., Jonas A., et Jonas A, *Biochemistry*, **34**, 1995, pp 8631-8641.

Zimm B. H., *J. Chem. Phys.*, **16**, 1948, pp 1093-1099

Zipp A, Kauzmann W, *Biochemistry*, **12**, 1973, pp 4217-4228.

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA PRESSION SUR LA STRUCTURE ET LA DYNAMIQUE DE L'INHIBITEUR DE LA TRYPSINE PANCREATIQUE BOVINE. UNE ETUDE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS.

RESUME : Ce travail de thèse porte sur une protéine de la catalyse enzymatique : l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine ou BPTI qui est un système modèle très étudié par différentes techniques mais peu par diffusion de neutrons. Il s'agit d'une petite protéine (58 résidus d'acides aminés, poids moléculaire de 6500 Da) qui possède une très grande stabilité puisqu'elle ne peut être dénaturée à des température inférieures à 95°C ou à des pressions inférieures à 14 kbar. Cette stabilité est due à la présence de trois ponts disulfures et de trois ponts salins. Nous avons étudié la structure et la dynamique de l'état natif et des états dénaturés par la température et par la pression, du BPTI, par la technique de diffusion de neutrons. La diffusion de neutrons aux petits angles nous a permis d'observer une augmentation du rayon de giration de la protéine en solution à 95°C et une réduction de ce rayon à 6000 bar. La forme ellipsoïdale de la molécule à l'état natif n'est pas modifiée entre 22°C et 95°C mais présente une augmentation du volume du BPTI. De plus, la forme du BPTI est modifiée depuis une forme ellipsoïdale dans l'état natif, vers une forme globulaire à 3000 bar et micellaire lorsque la pression atteint 5000 et 6000 bar. Des expériences complémentaires par spectroscopie infrarouge et UV-visible, en température et en pression, ont permis de confirmer ces résultats. La diffusion quasiélastique de neutrons a permis d'observer un effet antagoniste de la température et de la pression sur les mouvements globaux et sur la dynamique interne du BPTI en solution. L'augmentation de la température a pour effet d'induire des mouvements globaux et internes plus rapides tandis que l'augmentation de la pression induit un ralentissement de ces mouvements.

STUDY OF THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PRESSURE ON STRUCTURE AND DYNAMICS OF BOVINE PANCREATIC TRYPSIN INHIBITOR. A NEUTRON SCATTERING STUDY.

SUMMARY : The subject of this PhD thesis concerns a protein belonging to the enzymatic catalysis : the bovine pancreatic trypsin inhibitor or BPTI which is a model system much studied by several techniques but less by neutron scattering. It is a small protein (58 amino acid residues, a molecular weight of 6500 Da) which has a very high stability since it cannot be denatured at temperatures below 95°C or at pressures below 14 kbar. This stability is due to the presence of three disulphide bridges and three salt bridges. We have studied the structure and the dynamics of native state and thermal and pressure denatured states of BPTI by neutron scattering technique. By small angle neutron scattering we have observed an increase of the radius of gyration of the protein in solution at 95°C and a reduction of this radius under 6000 bar. The ellipsoidal shape of the molecule in the native state do not change between 22°C and 95°C but we have observed an increase of the volume of BPTI. Indeed, the shape of BPTI is modified from an ellipsoidal one to a spherical one at 3000 bar, while it is well represented by a micelle when applied pressure values reach 5000 and 6000 bar. Further experiments by infrared spectroscopy and by UV-visible spectroscopy as a function of temperature and pressure allowed us to confirm our results. Quasielastic neutron scattering allowed us to observe an opposite effect of temperature and pressure on global motions and internal dynamics of BPTI in solution. Increasing temperature induces a faster dynamics of these global and internal motions whereas increasing pressure induces a slowing down of these motions.

DISCIPLINE : Biophysique

Mots-Clés : BPTI, structure, dynamique, température, pression, diffusion de neutrons, UV-visible, Infrarouge

Adresse : Laboratoire Léon Brillouin (UMR 12, CEA-CNRS), CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.
