



**HAL**  
open science

# Photo-renaturation de protéines par des macromolécules chaperonnes

Juliette Ruchmann

► **To cite this version:**

Juliette Ruchmann. Photo-renaturation de protéines par des macromolécules chaperonnes. Matériaux. ESPCI ParisTECH, 2009. Français. NNT: . tel-00464683

**HAL Id: tel-00464683**

**<https://pastel.hal.science/tel-00464683>**

Submitted on 17 Mar 2010

**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.



# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité :  
Chimie et Physico-chimie des Polymères

Présentée par  
**Juliette RUCHMANN**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI**

Sujet de la thèse :

## **Photo-renaturation de protéines par des macromolécules chaperonnes**

Soutenue le 27/10/2009 devant un jury composé de :

M. Ludovic JULLIEN	Président
Mme Reiko ODA	Rapporteur
M. Michel DESMADRIL	Rapporteur
M. Didier BOQUET	Examineur
M Ilias ILIOPOULOS	Examineur
M. Christophe TRIBET	Directeur de thèse



# Remerciements

En premier lieu, je remercie Christophe Tribet pour TOUT ce qu'il m'a apporté pendant ces trois années et demi. Christophe, je veux ici saluer tes compétences d'encadrant. Peu de personnes (chercheur ou non) savent comme toi concilier exigence scientifique et respect, encouragement et formation. Je te remercie également pour ta disponibilité, ton sens de l'humour ainsi que pour nos nombreuses discussions toujours instructives quels qu'en furent les sujets et les horaires. Je te remercie enfin pour l'ensemble des moyens que tu as mis à ma disposition que ce soit pour me permettre de partir à l'étranger (ah, mon premier voyage au Japon ...) ou pour le soutien concret que tu m'as offert à la fin de ma thèse. Profondément, sincèrement, humainement, scientifiquement ... MERCI.

Je remercie les directeurs successifs du PPMD, François Lequeux pour avoir soutenu ma candidature lors de mon inscription en thèse puis Christian Fretigny pour m'avoir autorisée à mettre mon "grain de sel" dans la vie du laboratoire (site internet, intranet, conseil de labo ...)

Je remercie Ludovic Jullien d'avoir accepté de présider cette commission d'examen et Reiko Oda et Michel Desmadril pour leur travail en tant que rapporteurs.

Dans le cadre des diverses collaborations entretenues au cours de cette thèse, je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de plus loin à ce travail. A l'ESPCI, merci à Ilias Iliopoulos (MMC) ainsi qu'à l'équipe du LPEM et à son fluorimètre. Un peu plus loin (mais accessible par le RER), merci à Didier Boquet au CEA et à Michel Desmadril à Orsay. Enfin beaucoup plus loin, par-delà les mers, merci à Kazunari Akiohi et à toutes les filles de l'Institute of Biomaterials and Bioengineering qui m'ont fait découvrir Tokyo.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont collaboré à ce projet : Olivier, Claire, Rehana, Morgane, Emilie et Laurie-Anne. Merci pour les résultats et pour m'avoir appris qu'être "chef" n'est pas si simple.

Je remercie chaleureusement tous les membres PPMD pour tout ce que nous avons partagé ensemble et en particulier les savoureux moments de dégustation : tea time, raclettes, barbecues, gâteaux, macarons, bières du vendredi soir ... et j'en oublie encore ! Un merci tout particulier à Flore, Agnès, Isabelle, Annie, Philippe et Armand sans lesquels mes projets non-scientifiques n'auraient pu voir le jour. Merci à tous les compagnons de mes déjeuners à la kfet. Les filles, merci pour tout : repas, discussion, thé, discussion, gâteaux, discussion, travail ? Merci à vous aussi les garçons. Je tiens enfin à remercier tout particulièrement, mes co-bureaux qui m'ont supporté pour le meilleur et pour le pire pendant plus de deux ans : merci Nicolas, merci Elise et bien sûr merci Astrid !

Ces remerciements seraient incomplets si je ne témoignais pas toute ma reconnaissance à Arnaud qui a eu le courage de relire entièrement ma thèse, bien que la chimie ne soit pas sa science favorite. Il a ainsi largement contribué à rendre ce manuscrit compréhensible et pas trop désagréable à lire, je l'espère.



# Glossaire

- ADP : adénosine diphosphate
- AIBN : azobisisobutyronitrile
- ANS : 8-Anilino-1-naphthalènesulfonique acide
- ATP : adénosine triphosphate
- BSA : albumine de sérum de bovin
- CAB : carbonique anhydrase bovine
- CHP : *Cholesterol Hydrophobically modified Pullulan*
- CMC : concentration micellaire critique
- Cyt C : cytochrome C
- DCCI : N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide
- DCU : dicyclohexyl-urée
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DTT : dithiotreitol
- ESST : encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles
- GFP : *Green Fluorescent Protein*
- HOBT : 1-hydroxy-benzotriazole
- Me $\beta$ CD : méthyl- $\beta$ -cyclodextrine
- NAS : N-acryloxysuccinimide
- NHS : N-Hydroxysuccinimide
- NMP : N-méthyl-pyrrolidone
- NPA : 4-Nitrophenylacetate esterase
- PEG : poly(éthylène glycol)
- PrP : protéine prion
- PrP<sup>Sc</sup> : forme anormale de la protéine prion
- PVP : poly(vinylpyrrolidone)
- scFv : single chain variable fragment
- SDBS : Sodium dodecylbenzenesulfonate
- STS : sodium tétradecylsulfate
- tBoc : tert-Butyloxycarbonyl
- TFA : trifluoro acétique
- THF : tétrahydrofurane
- TX 100 : un polyéthylène glycol tert-octylphenyl ether, le Triton<sup>®</sup> X-100



# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>iii</b>
<b>Glossaire</b>	<b>v</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Renaturation des protéines en solution</b>	<b>3</b>
1.1 Enjeux et intérêt . . . . .	4
1.2 Le repliement des protéines . . . . .	4
1.3 Les différentes stratégies classiques d'augmentation des rendements de renaturation	8
1.4 Les molécules chaperonnes . . . . .	12
1.5 Problématique . . . . .	17
<b>2 Synthèse des polymères photostimulables</b>	<b>23</b>
2.1 Problématique . . . . .	24
2.2 Les greffons photo-stimulables . . . . .	24
2.3 Nomenclature des polymères . . . . .	29
2.4 Modification d'un squelette poly(acide acrylique) . . . . .	29
2.5 Modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide) . . . . .	32
2.6 Conclusion . . . . .	37
<b>3 Association photostimulable entre polymères et particules colloïdales</b>	<b>41</b>
3.1 Problématique . . . . .	42
3.2 Association avec des micelles de tensio-actif . . . . .	42
3.3 Association avec les protéines natives . . . . .	63
3.4 Conclusion . . . . .	67
<b>4 Les polymères modifiés azobenzènes ont-ils un effet sur la stabilité de la protéine ?</b>	<b>71</b>
4.1 Problématique . . . . .	72
4.2 Une protéine modèle, le cytochrome C . . . . .	72
4.3 Association et stabilisation de l'état déplié du cytochrome C par des polymères modifiés azobenzènes . . . . .	79
4.4 Modulation de l'effet des polymères modifiés azobenzènes . . . . .	83
4.5 Conclusion . . . . .	88
<b>5 Les polymères modifiés azobenzènes permettent-ils la renaturation d'une protéine qui agrège ?</b>	<b>91</b>
5.1 Problématique . . . . .	92
5.2 Association spécifique des polymères avec la CAB dépliée . . . . .	92
5.3 Effet renaturant des polymères . . . . .	101
5.4 Conclusion . . . . .	113



<b>6 Un fragment d'anticorps le scFv Sha 31</b>	<b>115</b>
6.1 Problématique . . . . .	116
6.2 Le scFv Sha 31 . . . . .	116
6.3 Etude du repliement du scFv Sha 31 seul . . . . .	117
6.4 Etude du repliement du scFv Sha 31 en présence de polymères . . . . .	121
6.5 Conclusion . . . . .	124
<b>Conclusion</b>	<b>127</b>
<b>A Synthèse des polymères photostimulables</b>	<b>129</b>
A.1 Synthèse du greffon azobenzène C4azoC4 . . . . .	129
A.2 Modification d'un squelette poly(acide acrylique) . . . . .	132
A.3 Modification d'un squelette poly(N-acryloxy succinimide) . . . . .	133
A.4 Récapitulatif de tous les polymères utilisés . . . . .	137
<b>B Techniques expérimentales utilisées</b>	<b>139</b>
B.1 Fluorescence . . . . .	139
B.2 Electrophorèse capillaire . . . . .	141
B.3 Dichroïsme circulaire . . . . .	144
<b>C Etude de l'association polymère/tensio-actif</b>	<b>147</b>
C.1 Influence des paramètres $k$ et $\langle L \rangle$ sur la valeur de $l_C$ dans le cadre de l'ajustement des données d'électrophorèse capillaire . . . . .	147
<b>D Etude du cytochrome C</b>	<b>149</b>
D.1 Influence des dérives dans les zones de pré et post-déplieement sur les valeurs de $\Delta G^{H_2O}$ . . . . .	149
D.2 Renormalisation de la fluorescence du cytochrome C en présence de polymère pour différentes concentrations en urée . . . . .	151
<b>E Etude du scFv Sha 31</b>	<b>153</b>
E.1 Récapitulatif des échantillons . . . . .	153
E.2 Tests ELISA . . . . .	154
<b>Table des figures</b>	<b>160</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>162</b>

# Introduction

La découverte des protéines chaperonnes dans les années 80 a beaucoup inspiré les chimistes. Ces protéines naturellement exprimées *in cellulo* accompagnent les processus de repliement d'autres protéines soit au cours de leur traduction soit à la suite d'une dénaturation causée par un stress thermique ou chimique. Avec l'explosion actuelle du marché des biotechnologies, en particulier en ce qui concerne les anticorps recombinants, l'usage de systèmes aidant la renaturation de ces bioproduits s'est généralisé. La demande en outils (processus ou molécules) susceptibles d'augmenter les rendements de renaturation n'a donc jamais été aussi importante. Les chimistes ont dès lors cherché à concevoir des systèmes mimant les chaperonnes naturelles. Pourtant, à l'heure actuelle, il n'existe pas encore d'additif et/ou de protocole de renaturation universellement efficace, en particulier pour des polypeptides comme les fragments d'anticorps recombinants conçus ou modifiés par l'homme et dont le repliement n'a pas été optimisé par la nature au cours de l'évolution. Il faudrait pouvoir mimer les propriétés les plus remarquables des chaperonnes naturelles comme leur association spécifique à une protéine mal repliée, la perturbation de son état conformationnel et sa libération contrôlée en solution.

C'est dans ce cadre que nous avons, au cours de cette thèse, conçu et synthétisé des macromolécules photo-stimulables dont nous avons ensuite testé l'efficacité en tant que chaperonne "activable" par la lumière vis-à-vis de diverses protéines. Le premier chapitre présente différentes méthodes utilisées pour augmenter les rendements de renaturation *in vitro* et comment, à partir de cet état de l'art, nous avons conçu des polymères photostimulables susceptibles d'influencer le repliement des protéines. Le deuxième chapitre décrit la synthèse de ces macromolécules. Le troisième chapitre présente une étude de l'association en solution diluée des polymères avec des tensio-actifs (additifs utilisés parfois pour aider au repliement) et des protéines globulaires natives. Un modèle simple nous a permis de relier la réponse à la lumière de ces complexes avec les variations d'affinité des chromophores pour les milieux aqueux ou apolaires. Les quatrième et cinquième chapitres abordent la question : "les polymères conçus ont-ils un effet chaperonne?". On y propose l'étude de l'effet des polymères sur le dépliement et le repliement de deux protéines modèles, respectivement, le cytochrome C et la carbonique anhydrase bovine. Enfin, le dernier chapitre présente l'effet de l'un des polymères sur une protéine d'intérêt, le fragment d'anticorps scFv Sha 31.



# Chapitre 1

## Renaturation des protéines en solution

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Enjeux et intérêt</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Le repliement des protéines</b>	<b>4</b>
1.2.1	Structure des protéines	4
1.2.2	Les différentes conceptions du chemin de repliement	5
1.2.2.1	Le modèle à plusieurs états	5
1.2.2.2	Comment influencer et diriger le repliement ?	5
1.2.2.3	Le débat moderne	6
1.2.3	Mise en pratique	7
1.2.3.1	Solubilisation	7
1.2.3.2	Compétition entre repliement et agrégation	7
<b>1.3</b>	<b>Les différentes stratégies classiques d'augmentation des rendements de renaturation</b>	<b>8</b>
1.3.1	Cas des protéines toujours solubles	8
1.3.1.1	Dialyse	8
1.3.1.2	Colonne de filtration sur gel	9
1.3.2	Cas des protéines qui agrègent	9
1.3.2.1	Dilution	9
1.3.2.2	Immobilisation	10
1.3.3	Utilisation d'additifs	10
1.3.3.1	Les additifs stabilisant l'état natif	10
1.3.3.2	Les additifs supprimant l'agrégation	11
1.3.3.3	Les additifs macromoléculaires	12
<b>1.4</b>	<b>Les molécules chaperonnes</b>	<b>12</b>
1.4.1	Les chaperonnes biologiques	12
1.4.1.1	Généralités	12
1.4.1.2	L'exemple de GroEL/GroES	13
1.4.2	Les chaperonnes artificielles	14
1.4.2.1	Système développé par H. Gellman <i>et al.</i>	14
1.4.2.2	Système développé par K. Akiyoshi <i>et al.</i>	15
1.4.2.3	Caractéristiques communes	15
1.4.3	Des macromolécules chaperonnes photostimulables	16
1.4.3.1	Intérêt	16
1.4.3.2	Etat de l'art	16
<b>1.5</b>	<b>Problématique</b>	<b>17</b>

---

## 1.1 Enjeux et intérêt

Grâce aux avancées scientifiques des vingt dernières années en matière de génie génétique et de biologie moléculaire, les méthodes de production de protéines par voie recombinante sont aujourd'hui largement employées, à la fois dans l'industrie et la recherche. Ces protéines recombinantes constituent souvent une réponse efficace à un besoin médical (anticorps recombinants, hormones, protéines thérapeutiques) ou industriel (enzymes biocatalytiques). Le "top 6" des bio-produits, incluant peptides et protéines telles que l'EPO, insulines, facteurs de croissance et interférons, représentait un marché de plus de 20 milliards d'euros en 2007 (MedAdNews). Les anticorps recombinants et leurs dérivés (fragments scFv, diabody ...), bien que développés plus récemment, atteignent déjà environ 30% des revenus des biotechnologies [Holliger et Hudson 2005]. Cela correspond à des sommes considérables pour certaines de ces molécules :

- 3.5 milliards d'euros par an pour Etanercept,
- 3.1 milliards d'euros par an pour Infliximab,
- 2.8 milliards d'euros par an pour Rituximab,

notamment pour des anticorps employés pour le traitement ou le diagnostic de maladies auto-immunes, de cancers tels que des lymphomes ... [Leader *et al.* 2008].

Dans les différentes techniques de surexpression existantes, les systèmes d'expression bactérienne sont parmi les plus utilisés [Gräslund *et al.* 2008]. Ils permettent une production en grande quantité, rapide et économique. Cependant, la conversion d'une information génétique en une protéine biologiquement active n'est pas systématique dans un environnement cellulaire différent du système dont elle est issue. *A fortiori*, de nombreuses protéines recombinantes ne sont pas produites directement sous leur forme native mais peuvent nécessiter des traitements ultérieurs à leur expression et à leur purification pour recouvrer leur activité. Dans le cas le plus simple, la séquence peptidique complète et potentiellement fonctionnelle forme des agrégats *in cellulo*, nommés corps d'inclusion. L'étape principale du traitement consistera alors à solubiliser et replier correctement les chaînes. Cette étape de repliement est délicate. Ses rendements sont souvent limités, notamment lorsque la protéine présente une forte tendance à l'agrégation. Il est donc intéressant d'étudier les mécanismes mis en jeu et les différentes techniques de renaturation employées pour augmenter les rendements et mieux cerner les étapes critiques le long du chemin de repliement. De telles études sont conduites activement depuis les années 1900 [Anfinsen 1973].

## 1.2 Le repliement des protéines

Une protéine est un polymère linéaire issu du couplage de différents acides aminés par des liaisons peptidiques. Cette chaîne polypeptidique doit acquérir une structure tridimensionnelle précise pour pouvoir assurer sa fonction biologique. Le paradigme classique suppose une structure tridimensionnelle unique et stable où l'équilibre entre un nombre restreint de conformations est indispensable à l'activité biologique. En solution, le processus de repliement peut être décrit comme le passage d'une multitude de conformations possibles s'échangeant rapidement entre elles à un agencement tridimensionnel restreignant les conformations accessibles. Ce processus est appelé renaturation lorsqu'il s'accompagne d'un regain de l'activité biologique.

### 1.2.1 Structure des protéines

Les protéines ont jusqu'à quatre niveaux d'organisation structurale [Creighton 1992] :

1. la séquence des acides aminés constitue la structure primaire,
2. les structures secondaires sont des structures tridimensionnelles localement adoptées par certains segments de la protéine et stabilisées par des liaisons hydrogènes ; les plus communes sont les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ ,

3. la structure tertiaire décrit la position relative des différents éléments de structure secondaire les uns par rapport aux autres,
4. enfin, certaines protéines peuvent présenter une structure quaternaire; elles sont alors composées de plusieurs chaînes polypeptidiques appelées sous-unités, chacune d'elle ayant sa propre structure secondaire et tertiaire.

La stabilité des structures protéiques met en jeu l'ensemble des interactions non-covalentes, en particulier les interactions hydrophobes, électrostatiques, de Van der Waals et liaisons hydrogène, ainsi que des liaisons covalentes importantes, les ponts disulfures. En fonction du potentiel redox du milieu, l'équilibre thiol/pont disulfure peut être déplacé. Il en résulte un verrouillage conformationnel renversable dans le cas de liaisons intraprotéiques et/ou la formation d'oligomères dans le cas de liaisons interprotéiques.

## 1.2.2 Les différentes conceptions du chemin de repliement

Vers la fin des années 60, les expériences d'Anfinsen l'ont conduit à l'affirmation suivante : la structure native d'une protéine est l'état le plus stable thermodynamiquement, par conséquent, la conformation de l'état natif dépend uniquement de la séquence primaire de la protéine. Depuis, de nombreux modèles ont été construits pour expliquer, déterminer et prévoir les chemins de repliement suivis par une protéine.

### 1.2.2.1 Le modèle à plusieurs états

Le modèle le plus répandu décrivant la transition depuis le désordre conformationnel (protéine dénaturée) vers une conformation native unique suppose un passage par un ou plusieurs "états" de repliement bien distincts, auxquels on peut attribuer une valeur d'énergie libre. Par exemple, on peut avoir les chemins suivants :

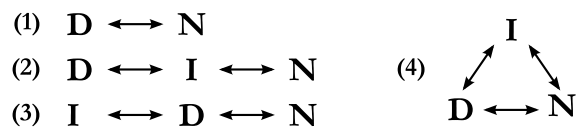


FIGURE 1.1 – Représentation de différents schémas réactionnels simples de repliement. D : état dénaturé, I : état intermédiaire et N : état natif.

La plupart des résultats expérimentaux s'interprètent parfaitement par ce type de schéma réactionnel où les équilibres entre divers états de repliement peuvent se décrire à partir de constantes thermodynamiques [Creighton 1992; Rose *et al.* 2006; Baldwin 2008]. Ces dernières dépendent notamment de la solvataion différentielle de chaque intermédiaire et de la température. Ainsi, une variation d'énergie libre de solvataion due par exemple à l'absence ou à la présence d'un dénaturant comme l'urée déplace l'état d'équilibre.

Par ailleurs, ce modèle permet une interprétation des cinétiques de relaxation vers l'état le plus stable grâce à une utilisation de la théorie de l'état de transition faisant intervenir une simple barrière d'activation entre les intermédiaires de repliement. L'énergie d'activation est sensible aux mêmes paramètres de solvataion et de température que les énergies libres des états stables [Bieri et Kiefhaber 2000].

### 1.2.2.2 Comment influencer et diriger le repliement ?

Le modèle précédent nous apprend que l'on peut orienter le chemin de repliement par modification de ses paramètres cinétiques en modulant la solvataion des intermédiaires et des états de transition. Néanmoins, il demeure encore impossible diriger judicieusement le repliement. En

effet, il est très délicat de prédire l'impact du renforcement ou de l'affaiblissement d'une liaison particulière sur l'ensemble de la conformation. Une raison de cette difficulté réside dans le fait que l'énergie libre de repliement procède d'un réseau complexe d'interactions. Les unes, attractives (liaisons hydrogène, Van der Waals, hydrophobe, ionique), compensent globalement les autres, répulsives (effets stériques, entropie de conformation, déshydratation, ...), pour conférer à la structure native une stabilité finale correspondant "seulement" à l'énergie de quelques liaisons hydrogène par macromolécule.

A partir du milieu des années 80, quelques paramètres clés du repliement ont été mis en avant :

- l'hydrophobie. L'orientation du repliement est dominée par la distribution de l'hydrophobie le long de la séquence, alors que les interactions électrostatiques jouent en général un rôle plus limité. Au cours du repliement, les domaines hydrophobes sont enfouis au cœur de la structure. La compacité de la macromolécule augmente en parallèle de l'apparition de structures secondaires. Celles-ci finissent par optimiser la densité de liaisons hydrogènes internes et les contacts entre résidus [Dill *et al.* 2008].

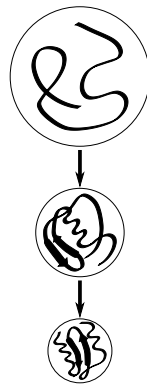


FIGURE 1.2 – Représentation schématique de l'évolution de la compacité et des structures secondaires au cours du repliement d'après [Dill *et al.* 2008].

- la coopérativité. La formation de contacts tertiaires entre éléments de structures secondaires partiellement établis, par exemple entre deux fragments d'hélices  $\alpha$ , apporte une coopérativité essentielle à la stabilité [Ghosh et Dill 2009].
- des groupes d'acides aminés à rôle spécifique. Chaque protéine peut posséder des parties de sa séquence dont la mutation influence le repliement, notamment en modulant les vitesses de relaxation vers l'état natif. Leur présence est critique pour le bon déroulement du repliement et peut éventuellement faire l'objet d'une optimisation par bio-ingénierie.

### 1.2.2.3 Le débat moderne

Malgré ces avancées, certains points font encore débat car les chemins de repliement suivis peuvent s'avérer complexes et multiples. Des études sur l'évolution des distances entre paires de résidus (par transfert de fluorescence et RMN) ou sur l'accessibilité au solvant (par cinétiques d'échange hydrogène/deutérium) permettent de déterminer les trajectoires suivies au cours du repliement. Il en ressort que certaines protéines passent systématiquement par des micro-états particuliers et présentent un repliement séquentiel à deux, trois ou  $n$  intermédiaires séparés par des barrières d'activation, mais d'autres peuvent explorer des chemins multiples conduisant finalement à l'état natif. En fait, ces différents modes de repliement peuvent parfois être explorés par une même protéine en fonction des conditions de solvatation, de température, ... [Udgaonkar 2008].

Il existe le cas limite de protéines dont le repliement s'effectue en quelques microsecondes et pour lesquelles les barrières d'activation deviendraient inférieures à 2-3 kT par molécule.

Dans le cas de ces protéines appelées *downhill folders*, toute distinction entre intermédiaires est inappropriée et le nombre de chemins possibles peut alors devenir particulièrement grand [Ghosh *et al.* 2007]. Le temps de l'exploration conformationnelle à l'échelle microscopique deviendrait le paramètre dominant dans la cinétique de retour vers l'état natif. Ces questions font encore l'objet de débats contradictoires parfois vifs [Ferguson *et al.* 2007; Sadqi *et al.* 2007; Zhou et Bai 2007].

### 1.2.3 Mise en pratique

Il serait important pour les équipes voulant effectuer une renaturation de savoir comment diriger précisément le repliement afin d'aider la protéine à éviter les chemins non productifs (*off-pathways*) comme l'agrégation et les possibilités de repliement incorrect (*misfolding*). Cependant, comme on ne peut encore prédire précisément le type de solvataion ou de perturbation des chaînes polypeptidiques qui favoriserait le repliement correct d'une protéine donnée, on va se contenter dans ce paragraphe d'énoncer les grands principes permettant de limiter l'agrégation et le *misfolding*. En pratique, cela conduit les expérimentateurs voulant effectuer une renaturation à une approche de type plan d'expérience devant être reprise au cas par cas pour chaque nouvelle protéine (voir le paragraphe 1.3 pour la description des quelques choix possibles).

#### 1.2.3.1 Solubilisation

Dans le cas de la renaturation de protéines obtenues sous forme de corps d'inclusion, il faut commencer par disperser ces agrégats. Les agents les plus fréquemment utilisés sont des dénaturants forts comme l'urée ou le chlorure de guanidinium, ou encore des détergents ioniques comme le SDS ou N-laurylsarcosine [Tsumoto *et al.* 2003; De Bernardez Clark 1998]. Le but de l'étape de solubilisation est d'obtenir une dispersion monomoléculaire de chaînes polypeptidiques. Les dénaturants sont utilisés à très forte concentration ( $8-9 \text{ mol.L}^{-1}$  pour l'urée et  $6-7 \text{ mol.L}^{-1}$  pour le chlorure de guanidinium). Il y a alors création de liaisons préférentielles entre le dénaturant et le polypeptide et ainsi altération des liaisons hydrogène intra-chaînes stabilisant les structures secondaires et tertiaires. Pour les protéines présentant des ponts disulfures, on ajoute souvent un agent réducteur au milieu dispersant, comme le dithiotreitol (DTT), le mercaptoéthanol ou la cystéine.

#### 1.2.3.2 Compétition entre repliement et agrégation

Lorsque les protéines sont solubilisées dans de fortes concentrations de dénaturant, elles sont *a priori* dans un état déplié, bien solvaté et flexible. La renaturation doit leur permettre de se replier et de retrouver leurs structures secondaires et tertiaires natives et d'aboutir à une forme compacte. Pour permettre le repliement correct d'une protéine dénaturée, il suffit en principe de retirer ou de diluer le dénaturant présent. La protéine en tampon aqueux, tant qu'elle reste isolée, doit alors retrouver sa structure native. Il faut cependant prendre en compte les possibilités d'agrégation et de *misfolding*. Ces deux processus conduisent à des protéines non natives et diminuent les rendements de renaturation.

Le *misfolding* décrit les protéines ayant formé des structures secondaires et tertiaires non natives et restant piégées dans cet état pour des raisons cinétiques ou du fait de mésappariement de ponts disulfures. Quant à l'agrégation, elle peut avoir lieu tant que les zones hydrophobes des protéines ne sont pas enfouies au cœur de la molécule [De Bernardez Clark 1998]. Comme représenté schématiquement sur la figure 1.3, l'état dénaturé et les états intermédiaires sont sujets à l'agrégation. Toutes les protéines ne présentent pas d'intermédiaires de repliement, mais lorsqu'ils existent, ces derniers sont relativement compacts et comportent de nombreux éléments de structure secondaire mais pas de structure tertiaire. Ils exposent alors, comme à l'état dénaturé, de nombreuses parties hydrophobes et peuvent agréger.

Pour combattre l'agrégation, on peut :



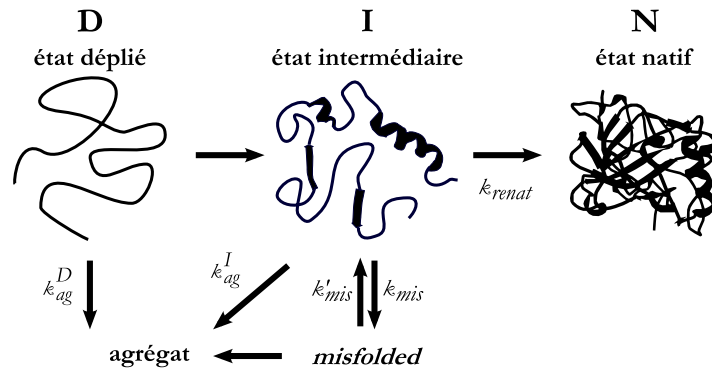


FIGURE 1.3 – Représentation schématique du processus de repliement d'après [Tsumoto *et al.* 2003].

- limiter la concentration en protéines, c'est le moyen le plus direct de minimiser un phénomène intermoléculaire ;
- limiter le temps de vie des états susceptibles d'agréger,
- ajouter des additifs solubilisants.

Pour combattre le *misfolding*, il est intéressant de passer par un protocole de renaturation multi-étapes procédant par variation graduelle de la concentration en dénaturant et du potentiel redox. En effet, ces étapes permettent de forcer la protéine à suivre un chemin particulier de repliement tout en conservant encore une bonne solubilité et flexibilité. Cela autorise des protéines mal repliées à retourner vers un chemin de repliement correct. Ainsi en augmentant  $k'_{mis}$ , on augmente le rendement de la renaturation.

Le problème est que toutes ces stratégies ne sont pas compatibles. En effet, lorsque que les intermédiaires de renaturation ont tendance à agréger, on ne peut pas passer par des concentrations intermédiaires en dénaturant qui stabilisent ces états. On n'a donc pas la possibilité d'intervenir sur les protéines mal repliées. Le choix de la technique à employer pour maximiser les rendements de renaturation dépend donc des différents équilibres représentés figure 1.3 et de leurs constantes de vitesse respectives. On peut dégager deux grands types de comportements qui orientent différemment les stratégies de repliement : soit  $k_{ag}^I$  est faible et les états intermédiaires sont toujours solubles, soit  $k_{ag}^I$  est élevé et ils ont tendance à agréger.

### 1.3 Les différentes stratégies classiques d'augmentation des rendements de renaturation

A partir des éléments exposés au paragraphe précédent, il est possible de différencier les stratégies de renaturation selon qu'elles s'appliquent à des protéines solubles ou ayant une tendance à l'agrégation. On présentera ensuite les différents additifs qui peuvent être utilisés pour aider au repliement.

#### 1.3.1 Cas des protéines toujours solubles

Dans le cas des protéines toujours solubles, les protocoles utilisés passent par des concentrations intermédiaires en dénaturant afin de limiter les effets du *misfolding*.

##### 1.3.1.1 Dialyse

###### Dialyse en une étape

La solution de protéines dénaturées est mise à dialyser contre le tampon de renaturation. Au cours de la dialyse, les protéines sont en contact avec des concentrations de dénaturant de

plus en plus faibles et sont exposées de manière prolongée à des concentrations intermédiaires en dénaturant et/ou d'autres additifs solubles. L'un des intérêts de cette technique est que la protéine reste toujours en solution et n'interagit pas avec des phases solides ou des gels sur lesquels elle pourrait s'adsorber.

### Dialyse multi-étapes

On peut également effectuer des dialyses successives contre des solutions contenant de moins en moins de dénaturant. La différence avec une dialyse en une seule étape est que la protéine a le temps de s'équilibrer avec chacune des concentrations en dénaturant. On maximise ainsi la probabilité que la protéine emprunte le bon chemin de repliement. Cette technique sera employée pour la renaturation du fragment d'anticorps scFv Sha 31 présentée au chapitre 6.

La dialyse étant fondée sur la diffusion des petites molécules, c'est un procédé lent qui ne répond pas bien à des critères de production à grande échelle. La diafiltration est une solution de remplacement intéressante car elle s'appuie sur les mêmes principes mais sa force motrice est la différence de pression imposée par l'utilisateur [De Bernardez Clark 1998]. En revanche, dans ce cas, les questions d'interface et de colmatage des pores deviennent importantes.

#### 1.3.1.2 Colonne de filtration sur gel

Le changement de solvant peut être effectué sur une colonne de filtration sur gel. La colonne est équilibrée avec le tampon de renaturation, puis la protéine dénaturée est déposée en haut de colonne et est ensuite éluée avec divers tampons de renaturation. La concentration en dénaturant diminue graduellement comme dans le cas d'une dialyse en une étape, mais ici les protéines sont environnées par la matrice de la colonne et peuvent interagir avec cette dernière par liaisons hydrogènes ou interactions hydrophobes. Ces interactions peuvent aider à lutter contre le *misfolding*.

### 1.3.2 Cas des protéines qui agrègent

Lorsque l'on cherche à renaturer des protéines qui agrègent, la solution la plus simple pour limiter cette agrégation est de travailler avec de faibles concentrations en protéines. Des concentrations de l'ordre de  $10$  à  $50 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  permettent d'obtenir des rendements optimaux [De Bernardez Clark 1998] mais impliquent également une augmentation des volumes utilisés, donc des coûts. De plus, l'obtention de la protéine renaturée en faible concentration ajoute une contrainte supplémentaire pour certaines applications, comme la cristallisation qui requiert des concentrations supérieures au  $\text{g.L}^{-1}$ .

#### 1.3.2.1 Dilution

La dilution directe d'une solution de protéines en dénaturant concentré dans le tampon de renaturation est le procédé le plus simple à mettre en œuvre. Le passage brutal d'un milieu contenant beaucoup de dénaturant à un milieu en contenant très peu force les protéines dépliées à s'effondrer rapidement sur elles-mêmes. L'utilisation de ce procédé n'empêche pas forcément l'agrégation des protéines, mais en tous cas ne la favorise pas par une longue exposition à des concentrations intermédiaires en dénaturant.

Il existe deux méthodes pour améliorer le procédé de dilution. La première est de diluer la protéine dénaturée dans une solution contenant toujours une certaine quantité de dénaturant. Il s'agit de trouver une concentration en dénaturant suffisamment forte pour solubiliser les agrégats formés mais suffisamment faible pour promouvoir le repliement. La seconde est de pratiquer de la dilution pulsée [Lilie *et al.* 1998]. Il s'agit d'ajouter la protéine dénaturée dans le tampon de renaturation en plusieurs fois en laissant suffisamment de temps entre chaque ajout pour que les protéines se replient. Cela permet d'empêcher l'accumulation d'états partiellement

repliés susceptibles d'agréger tout en obtenant au final une concentration totale en protéines assez élevée. Cette méthode fonctionne si la protéine repliée n'intervient pas dans le processus d'agrégation.

### 1.3.2.2 Immobilisation

L'un des moyens les plus efficaces d'empêcher toute agrégation est d'immobiliser chaque chaîne polypeptidique en la reliant à une phase solide. Pour fixer la protéine dénaturée, on utilise des interactions non-covalentes ou renversables. Une solution très employée consiste à utiliser une colonne de résine contenant du nickel et une protéine portant un tag-histidine en extrémité de chaîne. La protéine dénaturée est fixée sur la colonne et n'a pas la possibilité d'agréger lors de l'éluion avec le tampon de renaturation. L'immobilisation de la chaîne polypeptidique peut cependant l'empêcher de se replier convenablement en gênant son libre agencement dans l'espace. La liberté de mouvement de la protéine peut être entravée, soit parce qu'elle est liée à la colonne par plusieurs points d'ancrage, soit par simple gêne stérique due à la matrice. La solution de ce problème consiste à travailler dans des conditions faiblement dissociantes afin que la protéine puisse facilement passer d'un état lié à un état libre.

### 1.3.3 Utilisation d'additifs

Les techniques décrites ci-dessus ne sont en général pas suffisantes pour obtenir des rendements de renaturation élevés et il est souvent essentiel d'ajouter des additifs de renaturation. Ce sont de petites molécules qui facilitent le repliement. Ces additifs peuvent être classés en deux groupes (figure 1.4) : ceux qui ont un effet sur la stabilité des protéines et ceux qui limitent ou suppriment l'agrégation. En fait, lorsqu'il s'agit d'additifs moléculaires, la séparation entre ces deux groupes n'est pas exclusive. Un additif stabilisant l'état natif d'une protéine va aussi diminuer sa solubilité car ces deux effets antagonistes ont un unique moteur : la solvation de la protéine par l'additif.

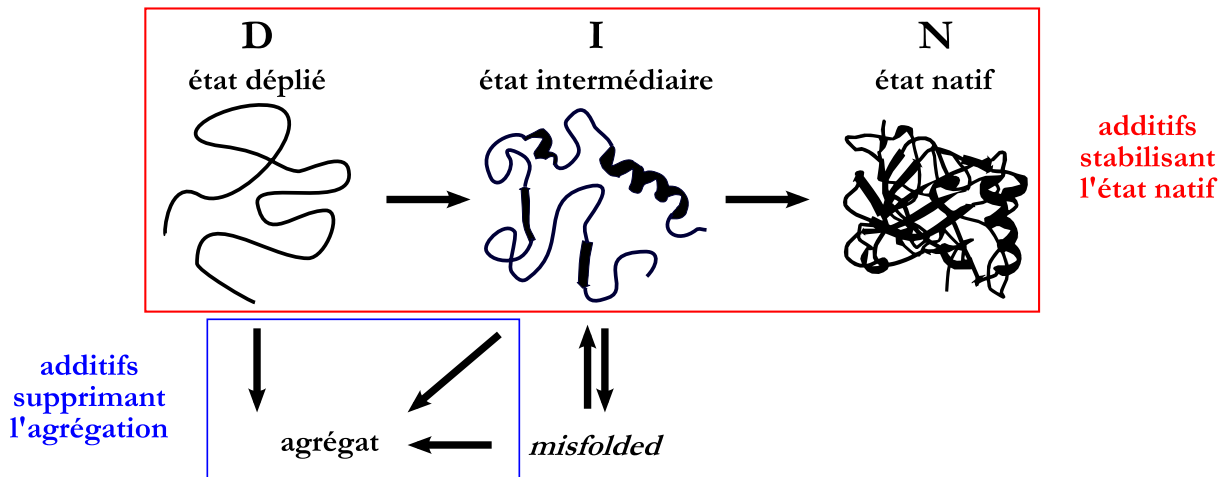


FIGURE 1.4 – Représentation schématique du processus de repliement et zone d'action des différents types d'additifs.

#### 1.3.3.1 Les additifs stabilisant l'état natif

Les additifs renforçant le repliement utilisés classiquement sont des sucres, des polyols, certains sels comme le sulfate d'ammonium ou le chlorure de magnésium et certains acides aminés comme la glycine ou l'alanine [Tsumoto *et al.* 2003]. Ces agents utilisés en concentration élevée ( $\approx 1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) diminuent la solubilité des protéines et stabilisent leur état natif

[Arakawa *et al.* 2007]. On les appelle parfois agents relargants ou kosmotropiques. Des constatations expérimentales montrent que tous ces agents sont préférentiellement exclus de la surface des protéines [Creighton 1997]. On dit que la protéine présente une hydratation préférentielle (*cf.* figure 1.5). En termes énergétiques, le contact entre la protéine et ce type d'additif conduit à une augmentation de l'énergie libre de dissolution. Si l'hydratation préférentielle de la protéine ne change pas lors de la dénaturation de cette dernière, la zone d'exclusion va s'agrandir car la surface présentée au solvant par la protéine augmente. On obtient ainsi une situation plus défavorable à l'état déplié qu'à l'état natif qui, par conséquent, s'en trouve stabilisé. Les raisons de l'exclusion des agents kosmotropiques de la surface de la protéine sont multiples et dépendent de la nature de l'additif : on peut rapidement citer les effets d'exclusion stérique surtout pour les polymères, une augmentation de la tension de surface de l'eau pour les sucres, les sels et les acides aminés ou des interactions répulsives avec la protéine pour le 2-méthyl-2,4-pentanediol ou le glycérol [Creighton 1997]. Le comportement opposé représenté figure 1.5 sous l'appellation "liaison préférentielle" est lui typique des dénaturants (ils augmentent la solubilité de la protéine et stabilisent son état déplié).

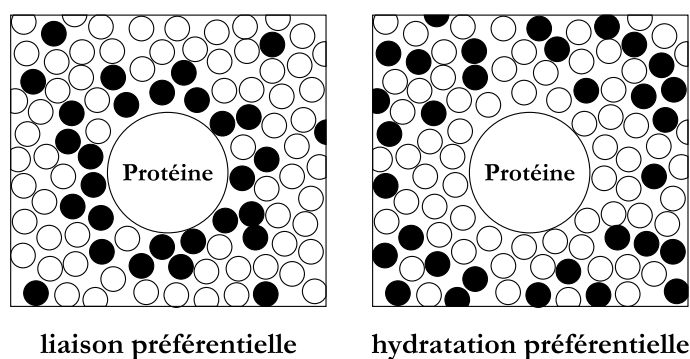


FIGURE 1.5 – Représentation schématique des principes de liaison préférentielle et hydratation préférentielle d'une protéine en présence d'additifs d'après [Creighton 1997]. ○ molécule d'eau, ● additif.

### 1.3.3.2 Les additifs supprimant l'agrégation

Les additifs supprimant l'agrégation limitent les interactions protéine/protéine et réduisent les possibilités d'association entre protéines.

#### L'arginine

L'arginine est un additif très utilisé. Elle est connue pour limiter l'agrégation des intermédiaires de repliement et est plus efficace en forte concentration, de l'ordre de quelques moles par litre. C'est l'association protéine/arginine qui favorise la dissociation des agrégats de protéines et limite ainsi l'agrégation. En fait, le mécanisme d'action de l'arginine est complexe et pas encore complètement élucidé. Récemment, T. Arakawa, K. Tsumoto *et al.* ont montré que ses effets sur les protéines sont multiples et parfois antagonistes [Arakawa *et al.* 2007]. Ainsi, des facteurs comme la forte affinité de l'arginine pour la majorité des acides aminés favorise son association avec les protéines. Par contre, il existe aussi des facteurs défavorisant cette association comme des effets de tension de surface et de volume exclu. Au final, le comportement de l'arginine est proche de celui du guanidinium. L'association protéine/arginine est cependant plus faible que l'association protéine/guanidinium à cause de la plus grande proportion des effets défavorables cités précédemment. C'est cette association limitée qui fait que l'on n'observe pas de déstabilisation des protéines en présence d'arginine.

## Les tensio-actifs

Les tensio-actifs sont largement utilisés pour limiter l'agrégation. Dans ce paragraphe, on va s'intéresser aux tensio-actifs n'ayant pas d'effet dénaturant sur les protéines, c'est-à-dire essentiellement aux tensio-actifs neutres. En effet, les tensio-actifs chargés sont connus pour se lier fortement aux protéines et ont souvent un effet dénaturant [Wetlaufer et Xie 1995].

Il semble que les tensio-actifs ont un effet positif sur la renaturation, non parce qu'ils dissocient les agrégats formés, mais parce qu'ils empêchent leur formation initiale en interagissant avec les intermédiaires précoces de repliement [Lilie *et al.* 1998]. Dans le cas de la carbonique anhydrase bovine (CAB), il a été établi qu'il n'est pas nécessaire que les tensio-actifs micellisent pour améliorer le rendement de renaturation. Ainsi, le n-hexanol, le n-pentanol, le TX 100, le CHAPS et le C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> augmentent de près de 20% l'efficacité de renaturation.

Il est à noter que l'inconvénient majeur des tensio-actifs est qu'ils sont difficiles à retirer du milieu [De Bernardez Clark 1998].

### 1.3.3.3 Les additifs macromoléculaires

Des polymères biocompatibles comme le poly(éthylène glycol) (PEG) [Cleland *et al.* 1992] et la poly(vinylpyrrolidone) (PVP) [Jiang *et al.* 2006] permettent de promouvoir la renaturation de la carbonique anhydrase bovine. J.L. Cleland *et al.* ont montré que le PEG interagit avec un intermédiaire précoce de repliement de la CAB et que le complexe ainsi formé ne peut plus agréger. Depuis, l'utilisation de polymères comme additifs de renaturation est fondée sur ce principe d'interaction et de protection des états du chemin de repliement susceptibles d'agréger. Ainsi, de nombreuses macromolécules amphiphiles ont révélées des capacités d'aide à la renaturation de certaines protéines.

Les additifs macromoléculaires présentent l'avantage de séparer les effets de stabilité et de solubilité. En effet, les effets de limitation de l'agrégation sont dus à leur taille macromoléculaire qui leur permet d'enrober la protéine. Par contre, ils peuvent avoir ou non un effet sur la stabilité des protéines en fonction de leurs interactions avec cette dernière. Ainsi, certains polymères n'ont pas d'effet sur la cinétique de renaturation, comme le PEG vis à vis de la CAB, alors que d'autres en ont, comme la PVP.

Récemment, de nombreux polymères stimulables ont été testés car ils permettent la formulation de systèmes contrôlables [Yoshimoto *et al.* 2003] ou recyclables. Par exemple, le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) aide à la renaturation de la  $\beta$ -lactamase. Une fois la renaturation effectuée, on fait précipiter le polymère par chauffage de la solution, puis on le sépare et enfin on le resolubilise à froid pour le réutiliser [Lin *et al.* 2000]. Il en est de même pour des polymères répondants au pH comme l'Eudragit S-100 qui assiste la renaturation de  $\alpha$ -chymotripsine [Roy et Gupta 2003].

## 1.4 Les molécules chaperonnes

### 1.4.1 Les chaperonnes biologiques

#### 1.4.1.1 Généralités

*In vivo*, les conditions de concentration en protéines, température et force ionique, favorisent fortement l'agrégation. Pour permettre aux protéines synthétisées à l'intérieur de la cellule de parvenir jusqu'à leur structure tertiaire, il existe donc des systèmes aidant le repliement. Ces systèmes mettent en jeu des protéines appelées "molécules chaperonnes". Ces chaperonnes peuvent jouer de nombreux rôles au sein de la cellule comme celui de participer :

- au repliement,
- à la translocation de protéines nouvellement synthétisées,
- à la réparation de protéines partiellement dépliées suite à un stress (*e.g.* choc thermique),

- au contrôle de l'activité biologique de protéines régulatrices spécifiques [Bukau 1999].

Il existe de nombreuses familles de chaperonnes souvent désignées selon leur poids moléculaire. Par exemple, la famille Hsp70 est constituée de protéines d'environ 70 kDa. L'appellation Hsp correspond au terme historique de protéine de choc thermique (*Heat-Shock Proteins*). En effet, ces protéines sont fortement exprimées en conditions de stress, comme à la suite d'une exposition à de hautes températures.

Si l'on cherche à définir les propriétés fondamentales d'une molécule chaperonne, la définition communément acceptée est la suivante : une chaperonne aide au repliement d'une protéine et limite les réactions secondaires non productives, mais ne fait pas partie de la structure finale [Ellis 1987]. Pour ce faire, les chaperonnes ont les capacités suivantes :

- elles empêchent l'agrégation en se liant de façon réversible aux intermédiaires de repliement susceptibles d'agrèger,
- lors de leur association avec des protéines, elles peuvent les déplier, au moins partiellement, et ainsi permettre à des polypeptides mal repliés de retourner vers un chemin de repliement correct.

Il semble reconnu que le mécanisme de fonctionnement des chaperonnes repose sur la reconnaissance de parties hydrophobes exposées au milieu extérieur dans certains intermédiaires de repliement ou de protéines *misfolded* [Bukau 1999].

#### 1.4.1.2 L'exemple de GroEL/GroES

Nous allons ici reporter brièvement le système d'action des chaperonnes GroEL/GroES afin d'illustrer les tendances générales présentées ci-dessus. Ce système est l'un des mieux connus en terme de structure et de mécanisme d'action.

GroEL appartient à la famille des Hsp60. On la trouve dans de nombreuses bactéries et en particulier chez *Escherichia Coli*. Elle est constituée de deux anneaux accolés constitués de 7 sous-unités identiques d'environ 60 kDa disposées autour d'une cavité centrale [Ranson *et al.* 1998]. Cette protéine peut lier une co-chaperonne GroES, une par anneau, une protéine mal repliée, une par anneau, et des molécules d'ATP, 7 par anneau. Le mécanisme d'aide au repliement peut être décrit suivant 4 quatre étapes, comme représenté figure 1.6.

1. Un anneau GroEL liant 7 ATP présente une surface interne recouverte de groupes hydrophobes capables de se lier aux groupements hydrophobes mal exposés d'un substrat protéique mal replié. Ce système peut aussi se lier à GroES. Il se produit alors un changement de conformation de l'anneau. La cavité contenant la protéine est fermée, agrandie et ne présente plus sur ses parois que des groupements hydrophiles. Le polypeptide est alors isolé et ainsi protégé de l'agrégation. De plus, il est dans un environnement favorable à l'enfouissement de ses parties hydrophobes en son cœur et donc au repliement.
2. En une dizaine de secondes, temps mis à profit par le substrat pour se replier, la structure adoptée par l'anneau cis active l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi. Pi est libéré et l'association GroEL/GroES est affaiblie.
3. L'anneau trans est à son tour capable de lier des molécules d'ATP et une protéine mal repliée.
4. Cette liaison provoque la libération de GroES, de l'ADP et du substrat mieux replié. Le cycle peut alors être recommencé à partir de l'étape 1.

Dans le cycle décrit ci-dessus, on retrouve les deux caractéristiques proposées pour une molécule chaperonne. Premièrement, l'enfermement de la protéine dans la cavité du complexe GroEL/GroES interdit toute agrégation. Deuxièmement, lors du changement de conformation de la cavité due à la liaison de GroES, le substrat protéique précédemment lié à GroEL est étiré puis libéré. Le système chaperonne fournit ainsi de l'énergie à la protéine et peut la déstabiliser suffisamment pour la sortir du minimum local d'énergie dans lequel elle était piégée.

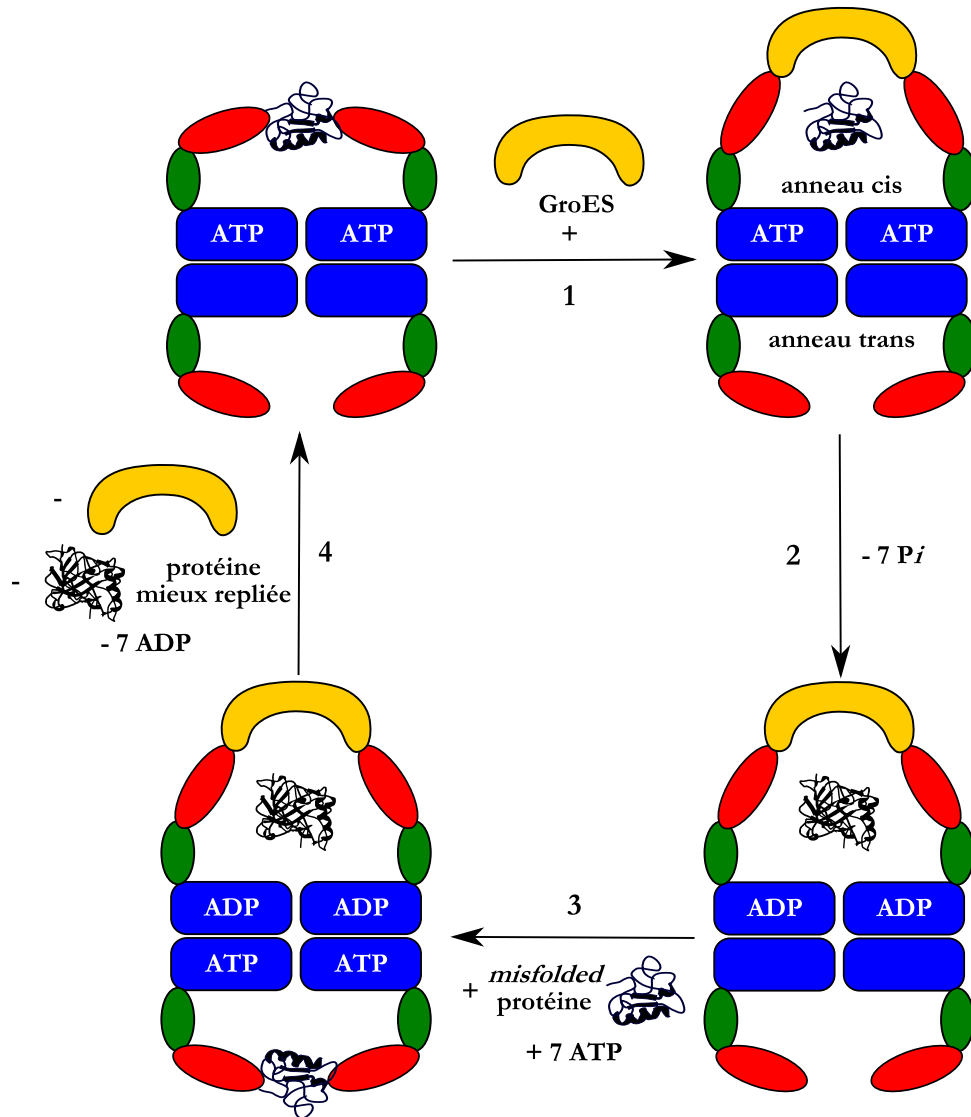


FIGURE 1.6 – Représentation schématisée des cycles de réaction du système GroEL/GroES dans le repliement des protéines, d’après [Voet et Rousseau 2005].

A l’idée initiale d’une chaperonne jouant le rôle de ”cage” protectrice contre l’agrégation, il s’est clairement ajouté aujourd’hui le constat d’une régulation de la renaturation en fonction des dimensions et de la composition de la cavité interne (en particulier sa charge négative) [Ellis 2006].

### 1.4.2 Les chaperonnes artificielles

Les systèmes des chaperonnes biologiques ont beaucoup inspiré les chimistes qui souhaitent mimer leur action avec des objets dits ”chaperonnes artificielles”. Leur fonctionnement reste fondé sur les deux caractéristiques de base énoncées précédemment : protection contre l’agrégation et déstabilisation de la structure. Nous allons ici nous focaliser sur deux exemples de chaperonnes artificielles développées respectivement par les équipes de H. Gellman et de K. Akiyoshi.

#### 1.4.2.1 Système développé par H. Gellman *et al.*

Le système est composé d’une paire de petites molécules, un tensio-actif (CTAB ou STS) et une cyclodextrine ( $\beta$ CD ou Me $\beta$ CD). Son efficacité a été prouvée sur la renaturation de

protéines dénaturées chimiquement comme la CAB [Rozema et Gellman 1996] et le lysozyme [Gellman et Rozema 1996].

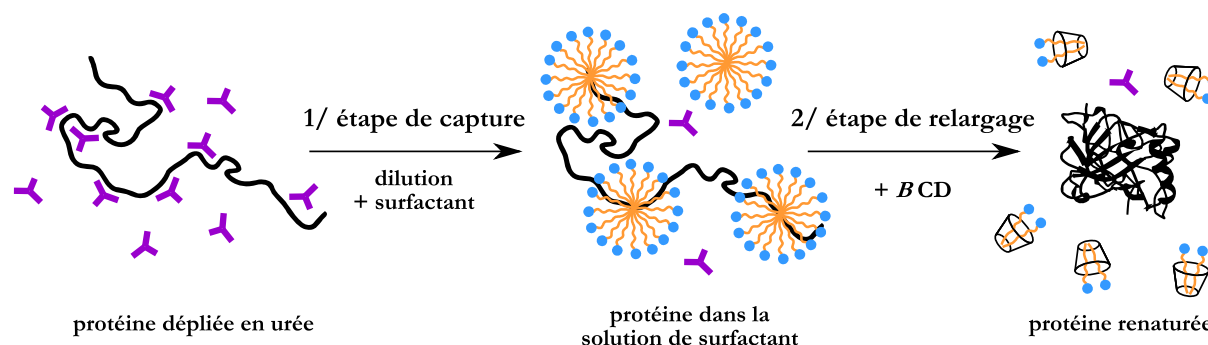


FIGURE 1.7 – Représentation schématique du fonctionnement du système de chaperonne artificielle tensio-actif/ $\beta$ CD développé par H. Gellman *et al.*

Le mécanisme d'action de ce couple "chaperonne artificielle" est schématisé figure 1.7. La protéine dénaturée en urée ou en guanidinium est diluée brutalement dans une solution contenant le tensio-actif. Ce dernier se lie alors sur la protéine qui est ainsi protégée contre l'agrégation. Les tensio-actifs ayant démontré une efficacité dans ce système sont des tensio-actifs dénaturants. La protéine est donc sous forme dépliée lorsqu'elle est associée à ces derniers. Il faut attendre l'étape de relargage pour observer une renaturation de la protéine. Cette étape consiste en l'ajout d'une cyclodextrine en excès qui va piéger les tensio-actifs présents en solution. La protéine est alors relâchée de manière contrôlée et a la possibilité de se replier [Hanson et Gellman 1998].

#### 1.4.2.2 Système développé par K. Akiyoshi *et al.*

Le système conçu par K. Akiyoshi *et al.* utilise un polymère pullulan modifié par des groupements cholestérol (CHP : *Cholesterol Hydrophobically modified Pullulan*) qui s'auto-associent pour former des nanogels d'environ 30 nm de diamètre. Ce système a montré une bonne efficacité de renaturation pour des protéines dénaturées chimiquement ou thermiquement telles que la CAB [Nomura *et al.* 2005], la citrate synthase [Sawada *et al.* 2006] ou la GFP (*Green Fluorescent Protein*) [Asayama *et al.* 2008].

Le principe de fonctionnement est schématisé figure 1.8. La protéine est mise en solution en présence de CHP puis cette solution est chauffée pour provoquer la dénaturation de la protéine. Cette dernière, lorsqu'elle est à l'état dépliée, s'associe spontanément avec les nanogels. Ces complexes protègent la protéine de l'agrégation et la maintiennent dans une structure différente de celle l'état natif (ceci a été montré par des mesures de dichroïsme circulaire). L'addition d'un excès de cyclodextrine dans le milieu provoque la dissociation des nanogels et la libération de la protéine qui peut alors se replier.

#### 1.4.2.3 Caractéristiques communes

On retrouve dans ces deux systèmes de nombreuses caractéristiques communes . Ils fonctionnent en deux étapes avec :

1. Une étape de capture où la complexation de la protéine avec la chaperonne met principalement en jeu des interactions hydrophobes ainsi que des liaisons hydrogène dans le cas des CHP. La formation de ces complexes respecte bien les caractéristiques des chaperonnes. En effet, l'agrégation est supprimée et la protéine est maintenue dans un état non natif. Pour finalement obtenir la protéine native, il est nécessaire de passer par une deuxième étape.



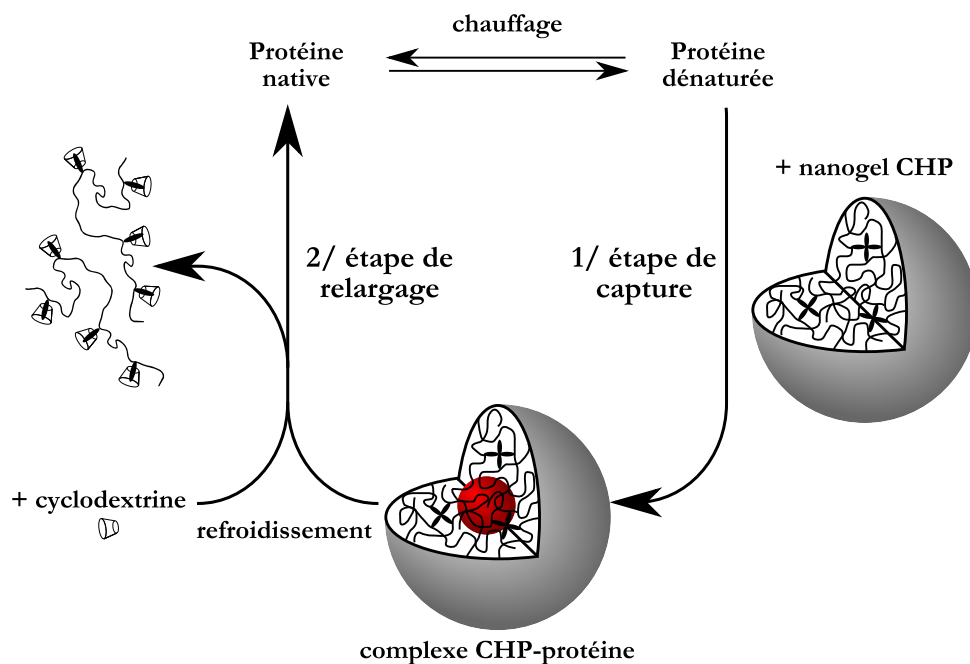


FIGURE 1.8 – Représentation schématique du fonctionnement du système de chaperonne artificielle CHP nanogel/ $\beta$ CD développé par K. Akiyoshi *et al.*, d'après [Nomura *et al.* 2005].

2. Une étape de relargage qui nécessite l'utilisation d'un stimulus permettant d'affaiblir les interactions chaperonne/protéine et ainsi de dissocier les complexes et de permettre à la protéine de se renaturer. Dans les exemples précédents, le stimulus est l'ajout d'une seconde molécule, la cyclodextrine, qui vient modifier les associations hydrophobes.

Dans ces deux systèmes, l'énergie mise en jeu dans un cycle de renaturation provient de l'extérieur, de l'ajout d'un autre partenaire, la cyclodextrine. Il ne s'agit donc pas d'assemblages "autonomes". De plus, on contrôle peu les temps de persistance des objets à chaque étape du cycle. Enfin, la mise en œuvre de succession de cycles reste techniquement difficile (ajout/retrait de cyclodextrine).

### 1.4.3 Des macromolécules chaperonnes photostimulables

#### 1.4.3.1 Intérêt

Le système de chaperonne photo-stimulable conçu au cours de cette thèse est fondé sur les principes énoncés dans les paragraphes précédents, mais vise à changer radicalement le stimulus déclenchant les associations/dissociations. Dans ce but, les systèmes photo-stimulables présentent de nombreux avantages, car la lumière est un stimulus :

- propre, il ne nécessite pas d'ajouter des molécules dans la solution,
- non invasif et qui peut, par exemple, être utilisé *in vivo*,
- dans notre cas, cyclable si le changement physico-chimique produit est réversible,
- et l'on peut envisager de parcourir des cycles dans des échelles de temps allant de la microseconde à plusieurs heures, ce qui balaye la gamme très large des temps de repliement des protéines.

#### 1.4.3.2 Etat de l'art

A l'heure actuelle, il n'existe que deux d'exemples de chaperonnes photostimulables.

L'un d'entre eux est la machine moléculaire développée par l'équipe de T. Aida *et al.* Ce système très intéressant est constitué d'une protéine GroEL génétiquement puis chimiquement

modifiée qui est capable d'aider au repliement de la GFP [Muramatsu *et al.* 2006]. La nouveauté de ce système réside dans la nécessité de combiner deux stimuli, la présence d'ATP et une irradiation UV, pour avoir une action efficace sur la renaturation. Ceci constitue une avancée dans le domaine de la machinerie moléculaire et permettra peut-être le développement de systèmes de relargage contrôlé plus sûrs.

L'autre exemple est un nanogel de pullulan portant des spiropyranes produit par l'équipe K. Akiyoshi *et al.*. Ce système a montré une bonne efficacité de renaturation vis à vis de la citrate synthase dénaturée en guanidinium [Hirakura *et al.* 2004]. Il présente cependant quelques difficultés de formulation dans l'eau. En effet, la forme chargée du spiropyrane (la merocyanine) est fortement stabilisée en milieu aqueux. Il est donc difficile d'obtenir un système entièrement réversible capable de supporter plusieurs cycles d'irradiation. De plus, les complexes pullulan/protéine n'ont pas été complètement caractérisés et le mécanisme d'action de ces nanogels reste mal décrit.

## 1.5 Problématique

Cette thèse s'articule autour de la problématique suivante : comment concevoir une macromolécule chaperonne photo-stimulable ?

L'exemple des nanogels spiropyranes de K. Akiyoshi *et al.* montre que l'utilisation de polymères amphiphiles photostimulables dans le cadre de l'aide à la renaturation en solution de petites protéines semble très prometteuse. Nous avons continué dans cette voie mais avec l'objectif d'avoir un système plus simple et avec une chimie plus malléable permettant une étude en profondeur de son interaction avec les protéines.

Nous avons donc conçu des polymères amphiphiliques présentant une hydrophobie photo-stimulable. L'utilisation de macromolécules permet d'avoir des objets d'une taille comparable à celle des protéines et de concevoir assez facilement un système réutilisable, par exemple en immobilisant le polymère sur une surface.

Les polymères synthétisés au cours de ce travail sont constitués, comme représenté figure 1.9, d'un squelette poly(acrylate de sodium) apportant la solubilité dans l'eau et de greffons azobenzènes apportant l'hydrophobie et la photostimulabilité.

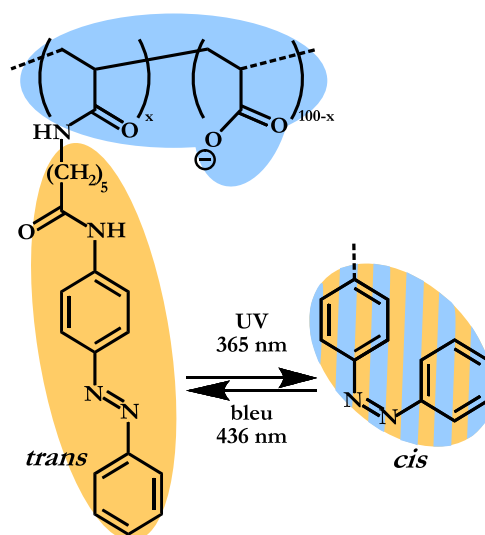


FIGURE 1.9 – Structure des polymères synthétisés au cours de cette thèse. (bleu) les parties hydrophiles, (orange) les parties hydrophobes.

La modification des squelettes est obtenue par couplage peptidique. L'utilisation d'une méthode de greffage permet d'obtenir une répartition aléatoire des groupes hydrophobes et de

contrôler précisément le taux de greffons hydrophobes ainsi que le taux de charges. Cette méthode apporte également la possibilité de diversifier la nature des chaînes latérales greffées sur le polymère. On peut ainsi envisager de mettre sur le squelette des groupements chargés positivement ou ayant la capacité de faire des liaisons hydrogènes. Grâce à cette chimie, on peut moduler à volonté les interactions polymère/protéine. Le travail de conception et de synthèse des polymères est présenté dans le chapitre 2.

La figure 1.10 présente de façon schématique le cycle chaperon espéré. On peut le subdiviser en trois parties qui font ressortir les trois questions sur lesquelles nous avons travaillé dans cette thèse :

- A quelles conditions structurales ou de composition du milieu, y a-t-il association et dissociation photostimulable entre les polymères modifiés azobenzènes et des particules colloïdales ? Le chapitre 3 aborde cette question en utilisant comme système modèle des micelles de tensio-actif.
- Les polymères modifiés azobenzènes peuvent-ils déstabiliser une protéine et donc se lier plus fortement aux protéines mal repliées ? Le chapitre 4 étudie cette question en utilisant comme système modèle le cytochrome C.
- Les polymères modifiés azobenzènes limitent-ils efficacement l'agrégation ? Le chapitre 5 répond à cette question en utilisant comme système modèle la carbonique anhydrase bovine.

Enfin, un dernier chapitre illustre l'action des polymères modifiés azobenzènes sur la renaturation d'une protéine d'intérêt, à savoir l'anticorps scFv Sha 31 développé par l'équipe de Didier Boquet au CEA.

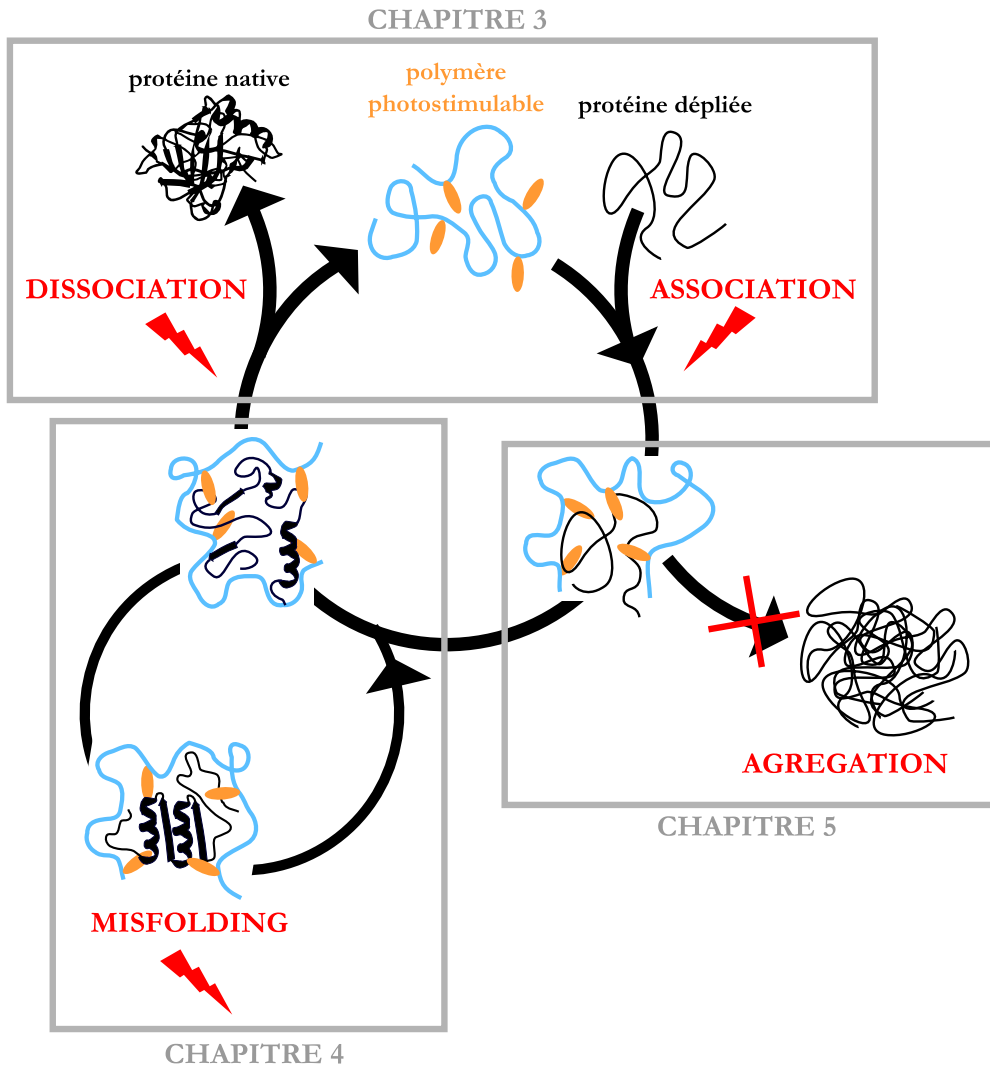


FIGURE 1.10 – Représentation schématique d'un cycle chaperon des polymères modifiés azobenzènes lors du repliement d'une protéine.

## Bibliographie

- [Anfinsen 1973] C.B. Anfinsen. *Principles that Govern the Folding of Protein Chains*. Science, vol. 181, no. 4096, pages 223–230, July 1973.
- [Arakawa *et al.* 2007] T. Arakawa, D. Ejima, K. Tsumoto, N. Obeyama, Y. Tanaka, Y. Kita and S. N. Timasheff. *Suppression of protein interactions by arginine : A proposed mechanism of the arginine effects*. Biophysical Chemistry, vol. 127, no. 1-2, pages 1–8, April 2007.
- [Asayama *et al.* 2008] W. Asayama, S.-I. Sawada, H. Taguchi and K. Akiyoshi. *Comparison of refolding activities between nanogel artificial chaperone and GroEL systems*. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 42, no. 3, pages 241–246, April 2008.
- [Baldwin 2008] R. L. Baldwin. *The Search for Folding Intermediates and the Mechanism of Protein Folding*. Annual Review of Biophysics, vol. 37, June 2008.
- [Bieri et Kiefhaber 2000] O. Bieri and T. Kiefhaber. *Kinetic models in protein folding*. In Mechanisms of protein folding. Oxford University Press, 2000.
- [Bukau 1999] B. Bukau. Molecular chaperones and folding catalysts : regulation, cellular function and mechanisms. CRC Press, 1999.
- [Cleland *et al.* 1992] J.L. Cleland, C. Hedgepeth and D.I. Wang. *Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. Reaction stoichiometry and refolding model*. Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 19, pages 13327–13334, 1992.
- [Creighton 1992] T. E. Creighton. Proteins : Structures and molecular properties. W. H. Freeman, second edition edition, August 1992.
- [Creighton 1997] T. E. Creighton. Protein structure : a practical approach. Oxford University Press, May 1997.
- [De Bernardez Clark 1998] E. De Bernardez Clark. *Refolding of recombinant proteins*. Current Opinion in Biotechnology, vol. 9, no. 2, pages 157–163, April 1998.
- [Dill *et al.* 2008] K.A. Dill, S. Banu Ozkan, M. Scott Shell and T.R. Weikl. *The Protein Folding Problem*. Annual Review of Biophysics, vol. 37, pages 289–316, June 2008.
- [Ellis 1987] J. Ellis. *Proteins as molecular chaperones*. Nature, vol. 328, no. 6129, page 378, 1987.
- [Ellis 2006] R.J. Ellis. *Protein folding : Inside the cage*. Nature, vol. 442, no. 7101, pages 360–362, 2006.
- [Ferguson *et al.* 2007] Neil Ferguson, Timothy D. Sharpe, Christopher M. Johnson, Pamela J. Schartau and Alan R. Fersht. *Structural Biology : Analysis of 'downhill' protein folding*. Nature, vol. 445, no. 7129, pages E14–E15, February 2007.
- [Gellman et Rozema 1996] S. H. Gellman and D. Rozema. *Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme : Modulation of the competition between renaturation and aggregation*. Biochemistry, vol. 35, no. 49, pages 15760–15771, December 1996.

- [Ghosh et Dill 2009] K. Ghosh and K.A. Dill. *Theory for protein folding cooperativity : helix bundles*. Journal of the American Chemical Society, vol. 131, no. 6, pages 2306–2312, February 2009.
- [Ghosh et al. 2007] K. Ghosh, S.B. Ozkan and K.A. Dill. *The ultimate speed limit to protein folding is conformational searching*. Journal of the American Chemical Society, vol. 129, no. 39, pages 11920–11927, October 2007.
- [Gräslund et al. 2008] S. Gräslund, P. Nordlund, J. Weigelt, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Minget et al. *Protein production and purification*. Nature Methods, vol. 5, no. 2, pages 135–146, 2008.
- [Hanson et Gellman 1998] P. E. Hanson and S. H. Gellman. *Mechanistic comparison of artificial-chaperone-assisted and unassisted refolding of urea-denatured carbonic anhydrase B*. Folding and Design, vol. 3, no. 6, pages 457–468, November 1998.
- [Hirakura et al. 2004] T. Hirakura, Y. Nomura, Y. Aoyama and K. Akiyoshi. *Photoresponsive Nanogels Formed by the Self-Assembly of Spiropyrene-Bearing Pullulan That Act as Artificial Molecular Chaperones*. Biomacromolecules, vol. 5, no. 5, pages 1804–1809, 2004.
- [Holliger et Hudson 2005] P. Holliger and P. J. Hudson. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nature Biotechnology, September 2005.
- [Jiang et al. 2006] Y. Jiang, Y.B. Yan and H.M. Zhou. *Polyvinylpyrrolidone 40 Assists the Refolding of Bovine Carbonic Anhydrase B by Accelerating the Refolding of the First Molten Globule Intermediate*. Journal of Biological Chemistry, vol. 281, no. 14, pages 9058–9065, April 2006.
- [Leader et al. 2008] B. Leader, Q. J. Baca and D. E. Golan. *Protein therapeutics : a summary and pharmacological classification*. Nature Reviews Drug Discovery, 2008.
- [Lilie et al. 1998] H. Lilie, E. Schwarz and R. Rudolph. *Advances in refolding of proteins produced in E. coli*. Current Opinion in Biotechnology, vol. 9, no. 5, pages 497–501, October 1998.
- [Lin et al. 2000] S.C. Lin, K.L. Lin, H.C. Chiu and S. Lin. *Enhanced protein renaturation by temperature-responsive polymers*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 67, no. 5, pages 505–512, 2000.
- [Muramatsu et al. 2006] S. Muramatsu, K. Kinbara, H. Taguchi, N. Ishii and T. Aida. *Semi-biological molecular machine with an implemented "AND" logic gate for regulation of protein folding*. Journal of the American Chemical Society, vol. 128, no. 11, pages 3764–3769, March 2006.
- [Nomura et al. 2005] Y. Nomura, Y. Sasaki, M. Takagi, T. Narita, Y. Aoyama and K. Akiyoshi. *Thermoresponsive Controlled Association of Protein with a Dynamic Nanogel of Hydrophobized Polysaccharide and Cyclodextrin : Heat Shock Protein-Like Activity of Artificial Molecular Chaperone*. Biomacromolecules, vol. 6, no. 1, pages 447–452, 2005.
- [Ranson et al. 1998] N. A. Ranson, H. E. White and H. R. Saibil. *Chaperonins*. Biochemical Journal, vol. 333, no. Pt 2, page 233, 1998.

- [Rose *et al.* 2006] G.D. Rose, P.J. Fleming, J.R. Banavar and A. Maritan. *A backbone-based theory of protein folding*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 103, no. 45, pages 16623–16633, November 2006.
- [Roy et Gupta 2003] I. Roy and M.N. Gupta. *pH-responsive polymer-assisted refolding of urea- and organic solvent-denatured alpha-chymotrypsin*. Protein Engineering, vol. 16, no. 12, pages 1153–1157, December 2003.
- [Rozema et Gellman 1996] D. Rozema and S. H. Gellman. *Artificial Chaperone-assisted Refolding of Carbonic Anhydrase B*. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 7, pages 3478–3487, February 1996.
- [Sadqi *et al.* 2007] Mourad Sadqi, David Fushman and Victor Munoz. *Structural Biology : Analysis of 'downhill' protein folding; Analysis of protein-folding cooperativity (Reply)*. Nature, vol. 445, no. 7129, pages E17–E18, February 2007.
- [Sawada *et al.* 2006] S.-I. Sawada, Y. Nomura, Y. Aoyama and K. Akiyoshi. *Heat Shock Protein-like Activity of a Nanogel Artificial Chaperone for Citrate Synthase*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, vol. 21, no. 6, pages 487–501, November 2006.
- [Tsumoto *et al.* 2003] K. Tsumoto, D. Ejima, I. Kumagai and T. Arakawa. *Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies*. Protein Expression and Purification, vol. 28, no. 1, pages 1–8, March 2003.
- [Udgaonkar 2008] J.B. Udgaonkar. *Multiple Routes and Structural Heterogeneity in Protein Folding*. Annual Review of Biophysics, vol. 37, pages 489–510, June 2008.
- [Voet et Rousseau 2005] D. Voet and G. Rousseau. Biochimie. De Boeck Université, 2005.
- [Wetlaufer et Xie 1995] D. B. Wetlaufer and Y. Xie. *Control of aggregation in protein refolding : A variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II*. Protein Science, vol. 4, no. 8, pages 1535–1543, 1995.
- [Yoshimoto *et al.* 2003] N. Yoshimoto, T. Hashimoto, M.M. Felix, H. Umakoshi and R. Kuboi. *Artificial Chaperone-Assisted Refolding of Bovine Carbonic Anhydrase Using Molecular Assemblies of Stimuli-Responsive Polymers*. Biomacromolecules, vol. 4, no. 6, pages 1530–1538, November 2003.
- [Zhou et Bai 2007] Zheng Zhou and Yawen Bai. *Structural Biology : Analysis of protein-folding cooperativity*. Nature, vol. 445, no. 7129, pages E16–E17, February 2007.

## Chapitre 2

# Synthèse des polymères photostimulables

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Les greffons photo-stimulables</b>	<b>24</b>
2.2.1	La photostimulabilité	24
2.2.2	Utilisation de greffons azobenzènes hydrophobes	24
2.2.3	Synthèse des greffons azobenzènes	27
2.2.3.1	Couplage diazoïque	27
2.2.3.2	Couplage de l'azobenzène et de l'espaceur alkyle	28
2.2.3.3	Déprotection de la fonction amine	28
<b>2.3</b>	<b>Nomenclature des polymères</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Modification d'un squelette poly(acide acrylique)</b>	<b>29</b>
2.4.1	Stratégie de synthèse	29
2.4.2	Détermination du taux de greffage	30
2.4.2.1	Par UV-visible	30
2.4.2.2	Par RMN proton	30
2.4.3	Bilan sur les polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique)	32
<b>2.5</b>	<b>Modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)</b>	<b>32</b>
2.5.1	Synthèse du poly(N-acryloxysuccinimide) par polymérisation radicalaire classique	33
2.5.2	Modification du squelette poly(N-acryloxysuccinimide)	33
2.5.2.1	Caractérisation des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)	34
2.5.2.2	Bilan des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)	37
<b>2.6</b>	<b>Conclusion</b>	<b>37</b>

---



## 2.1 Problématique

Nous avons choisi de synthétiser des polymères amphiphiles photostimulables ayant une chimie modulable. Notre point de départ est un polymère, bien connu au laboratoire, constitué d'un squelette poly(acrylate de sodium) et de greffons azobenzènes. Ces chaînes pendantes porteuses d'un chromophore sont à l'origine de l'hydrophobie photo-stimulable de ces polymères. Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps présenter le fonctionnement, la conception puis la synthèse des ces greffons azobenzènes. Ensuite, nous nous intéresserons au greffage de ces chaînes sur le squelette polymère. Nous présenterons les deux méthodes employées. La première est un couplage peptidique classique, la seconde met en jeu des monomères réactifs. Cette dernière permet de réaliser des séries de macromolécules plus rapidement et avec une meilleure pureté. La chimie plus modulable de cette seconde approche ouvre aussi l'horizon vers des structures polymères plus complexes, telles que des multiblocs...

## 2.2 Les greffons photo-stimulables

### 2.2.1 La photostimulabilité

Les systèmes photostimulables réagissent à l'absorption de photons, en général de lumière visible ou UV compte-tenu de leurs applications. Pour fonctionner, ces systèmes doivent contenir des composés photochromes. Ces composés ont la capacité de subir une transformation réversible induite par la lumière entre deux états possédant des spectres d'absorption différents [Durr 1990]. Il existe différents types de photochromes souvent classés selon le processus de transformation mis en jeu à l'échelle moléculaire. Les azobenzènes présentent une isomérisation cis-trans d'une double liaison, les spiropyranes ou les fulgides réagissent par électrocyclisation et les triarylmethanes subissent une rupture de liaison.

Tous ces phénomènes ont lieu à l'échelle moléculaire et sont de faible amplitude. Pour avoir une photostimulation induisant un effet à l'échelle macromoléculaire, il faut donc qu'un système photostimulable soit capable d'amplifier les réorganisations subies par les photochromes. L'ensemble des travaux sur le sujet montre qu'il y a deux façons d'amplifier ce changement moléculaire, soit en se positionnant au voisinage d'une transition critique, soit en employant des systèmes capables de coupler la modification physico-chimique du chromophore à une reconnaissance moléculaire spécifique conduisant à la formation d'assemblages. Dans la première catégorie, on retrouve par exemple les systèmes où la photostimulation engendre une transition de phase comme les transitions dans les cristaux liquides [Ikeda 2003], les changements de conformation dans les polypeptides [Pieroni *et al.* 1998] ou la précipitation contrôlée de polymères thermosensibles [Irie 1993]. La deuxième catégorie contient des systèmes capables de s'assembler entre eux comme des tensioactifs [Hayashita *et al.* 1994; Kang *et al.* 2000; Shang *et al.* 2003] ou avec des partenaires par exemple cyclodextrines comme des polyamphiphiles [Tomatsu *et al.* 2005].

### 2.2.2 Utilisation de greffons azobenzènes hydrophobes

#### Principe de fonctionnement du système photostimulable

Nous avons choisi d'utiliser un système de type polymère amphiphile photostimulable qui va être capable de s'associer ou non avec différents partenaires en fonction de l'irradiation. L'utilisation de l'azobenzène comme chromophore repose sur trois raisons principales :

- le changement conformationnel s'effectue par une irradiation UV-visible et est relativement insensible à l'environnement (*e.g.* polarité du solvant, présence de micelles ...). Selon la longueur d'onde employée (figure 2.1), on favorise la forme trans stable ou la forme cis métastable. En outre, dans la série des dérivés éther-azobenzènes ou amido-azobenzènes, l'état métastable a une durée de vie de plusieurs heures en absence de lumière.

- l'isomérisation de l'azobenzène s'accompagne d'une modification de la polarité et de la géométrie de la molécule (figure 2.1) permettant la modulation d'une association avec des composés hydrophobes.
- les dérivés azoïques sont peu sujets à la dégradation, en particulier par photo-oxydation.

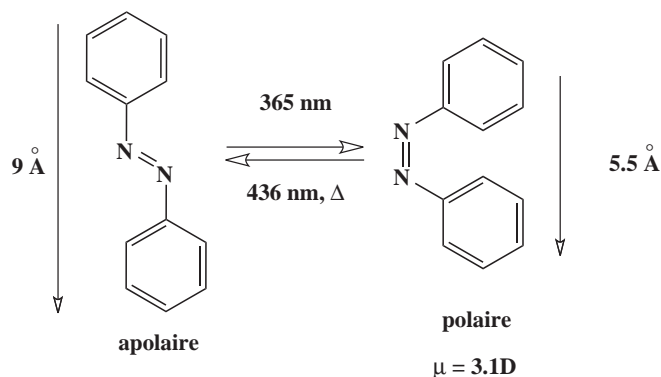


FIGURE 2.1 – Photoisomérisation de l'azobenzène.

Les polymères sont constitués d'un squelette hydrophile poly(acrylate de sodium) sur lequel sont greffés des chaînes pendantes hydrophobes contenant un azobenzène. Dans le noir ou sous irradiation bleue, les azobenzènes majoritairement sous forme trans sont plans et apolaires. Les chaînes latérales sont à leur maximum d'hydrophobie et cherchent à s'associer à d'autres molécules hydrophobes. Sous irradiation UV, les azobenzènes devenus majoritairement cis présentent un moment dipolaire de 3.1 Debyes qui diminue l'hydrophobie des chaînes pendantes et donc leur capacité d'association. De plus, le changement de géométrie de l'azobenzène peut également rapprocher le groupe phényle terminal du squelette polymère. Il est alors moins disponible pour s'associer. Ce type de polymère a déjà été utilisé dans différentes applications pour inverser des émulsions [Khoukh *et al.* 2006] ou faire fortement varier la viscosité [Pouliquen et Tribet 2006; Tomatsu *et al.* 2005].

### Conception des greffons

Dans ce travail, deux types de greffons azobenzènes ont été utilisés, le C6azo et le C4azoC4 dont la structure est présentée figure 2.2.

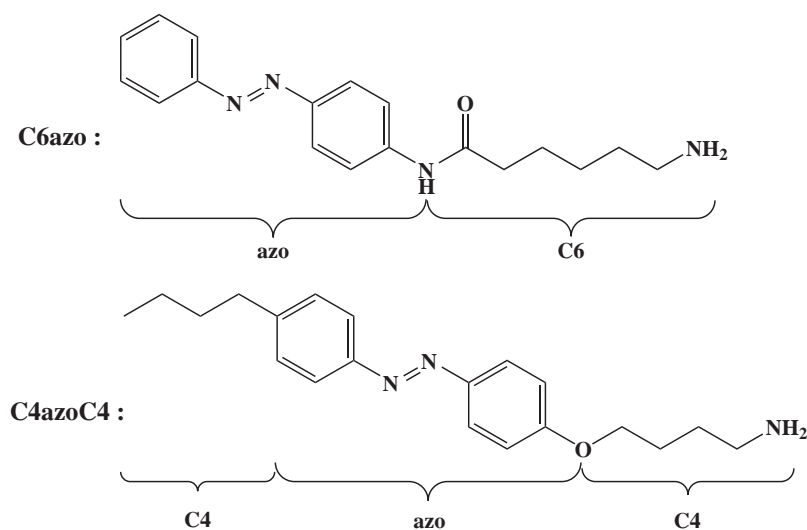


FIGURE 2.2 – Structure des deux greffons azobenzènes utilisés.

Ces greffons sont conçus avec un espaceur alkyle entre l'azobenzène et la fonction amine qui sera greffée ensuite sur la chaîne polymère. La longueur de cet espaceur est un paramètre important permettant de moduler l'association du polymère avec une entité hydrophobe. Dans la thèse de Gauthier Pouliquen [Pouliquen 2003], il est démontré qu'un espaceur trop court ou inexistant affaiblit fortement les possibilités d'association en raison de la trop grande proximité de l'azobenzène avec le squelette polymère. En effet, l'approche des partenaires hydrophobes est alors fortement défavorisée. Au contraire, plus un espaceur va être long (de 12 à 18 carbones) plus il va y avoir association avec n'importe quel partenaire plus ou moins hydrophobe et ce quel que soit l'état d'irradiation de l'azobenzène. Un espaceur de longueur intermédiaire (de 4 ou 6 carbones) est donc un bon compromis pour permettre une association fragilisable par la lumière.

Le second élément de structure de ces greffons est la présence ou non d'une queue alkyle en position 4' sur l'azobenzène. Cette queue permet d'augmenter l'hydrophobie du greffon et de placer l'azobenzène au centre et non à l'extrémité de la partie hydrophobe du greffon. Les changements de géométrie obtenus lors du passage de l'azobenzène en conformation cis sont ainsi maximisés. Des études montrant l'importance de cette position au centre et l'impact de la taille de la partie hydrophobe ont été menées dans le cas de tensioactifs photostimulables [Hayashita *et al.* 1994; Shang *et al.* 2003]. T. Hatton *et al.* ont montré qu'une structure avec un espaceur et une queue de quatre carbones chacun maximise les effets de lumière sur l'adsorption à la surface eau/air de surfactants neutres [Shang *et al.* 2003].

### Caractéristiques spectroscopiques des greffons

Comme illustré sur la figure 2.3, les spectres des greffons azobenzènes sous forme trans comportent une bande principale de type  $(\pi - \pi^*)$  avec un maximum à 347 nm et une bande de plus faible intensité de type  $(n - \pi^*)$  autour de 450 nm. L'irradiation du chromophore à une longueur d'onde proche du maximum d'absorption de la bande  $(\pi - \pi^*)$ , soit 365 nm, entraîne une forte diminution de l'intensité de celle-ci ainsi que l'augmentation de la bande  $(n - \pi^*)$  qui caractérise la formation de l'isomère cis.

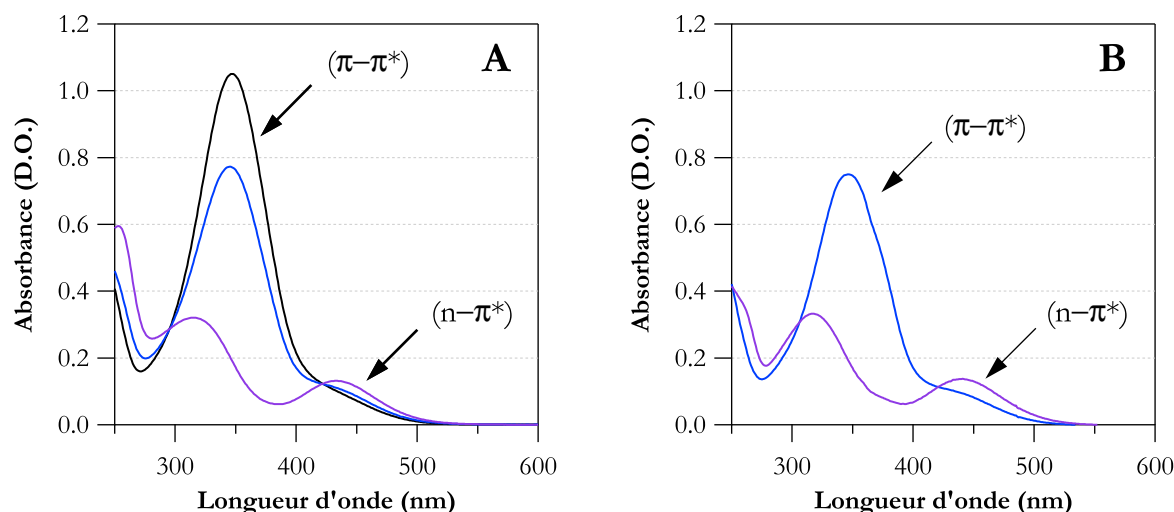


FIGURE 2.3 – Spectres d'absorption UV-visible du polymère (A) PAA\_3.5C6azo à  $0.145 \text{ g.L}^{-1}$  et (B) PAA\_5C4azoC4 à  $0.082 \text{ g.L}^{-1}$ , (—) après 24 h de relaxation dans l'obscurité, (—) sous irradiation bleue à 436 nm et (—) sous irradiation UV-visible à 365 nm.

Le retour au composé trans peut être effectué par une irradiation à une longueur d'onde proche du maximum d'absorption de la bande  $(n - \pi^*)$ , soit 436 nm, ou par chauffage. En effet, la conformation trans est la forme thermodynamiquement stable de l'azobenzène [Durr 1990].

Les temps de demi-vie de la conformation cis ont été mesurés et sont de l'ordre de quelques heures pour le greffon C6azo (1 h pour le PAA\_3.5C6azo) et supérieure à 5 h pour le C4azoC4.

Le spectre des greffons obtenu dans l'obscurité est représentatif d'une population d'azobenzène totalement sous forme trans. Par conséquent, le spectre obtenu sous irradiation bleue montrant une diminution de l'intensité de la bande ( $\pi - \pi^*$ ) et une augmentation de la bande ( $n - \pi^*$ ) par rapport au spectre dans le noir est lui représentatif d'une population d'azobenzènes mixte bien que majoritairement trans. Pour les chromophores de type aminoazobenzène, le mélange de population obtenu pour une irradiation à 436 nm est de l'ordre de 80% de molécules trans et 20% de molécules cis. Lors d'une irradiation à 365 nm, les proportions sont inversées et on obtient une population composée à 20% de molécules trans et 80% de molécules cis.

D'après G. Zimmerman *et al.*, la photoisomérisation des aminoazobenzènes suit une cinétique d'ordre 1 [Zimmerman *et al.* 1958]. Celle-ci n'est pas perturbée par l'incorporation du chromophore par greffage latéral sur une chaîne polymère à condition de travailler en milieu dilué [Chen et Morawetz 1976]. Au laboratoire, les constantes de vitesse d'isomérisation des greffons C6azo ont été mesurées sous une irradiation d'environ  $1 \text{ mW.cm}^{-2}$  pour des systèmes ayant une absorbance inférieure à 1. Les valeurs trouvées sont de l'ordre de  $1 \cdot 10^{-2}$  à  $5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  [Pouliquen 2003; Khoukh 2006]. Ces données permettent de conclure que l'irradiation de nos systèmes conduit efficacement et rapidement (moins de 300 s) à un état stationnaire ne dépendant que de la longueur d'onde. En pratique, nous étudierons dans la suite le comportement des solutions de polymères après des temps d'irradiation suffisamment longs, typiquement 15 min, pour s'assurer que l'état stationnaire est atteint.

### 2.2.3 Synthèse des greffons azobenzènes

Seul le greffon C4azoC4 a été préparé au cours de cette étude. L'autre greffon a été synthétisé antérieurement au laboratoire, selon la méthode décrite par G. Pouliquen dans sa thèse [Pouliquen 2003].

La synthèse du C4azoC4 se compose de deux étapes : la première est un couplage diazoïque permettant la formation de l'azobenzène, la seconde est un couplage entre l'azobenzène précédemment formé et l'espaceur alkyle. Les détails expérimentaux sont reportés en annexe A.1.

#### 2.2.3.1 Couplage diazoïque

##### Schéma réactionnel

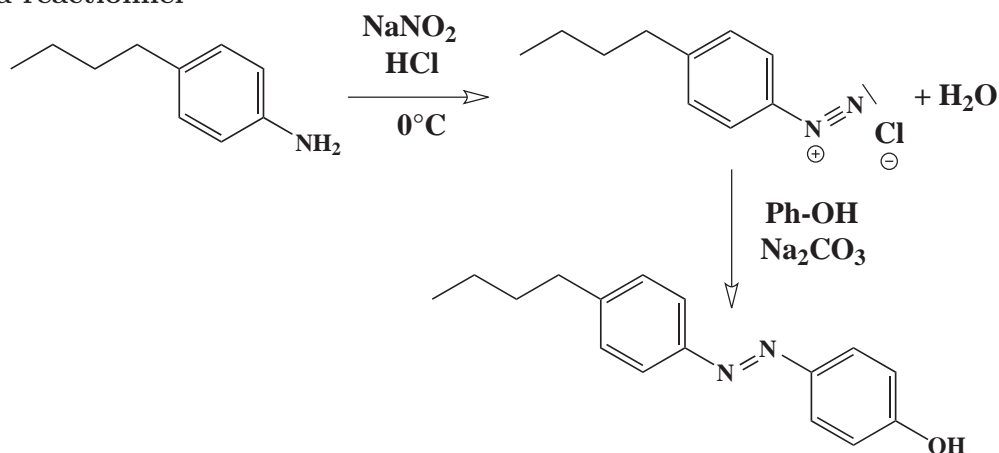


FIGURE 2.4 – Schéma réactionnel de l'étape de couplage diazoïque.

L'acide nitreux formé *in situ* par l'acidification de la solution de nitrite de sodium réagit avec la butylaniline pour former un ion diazonium aromatique. Ce dernier réagit ensuite comme

électrophile dans la réaction de substitution aromatique du phénol. Les ions diazonium aromatiques sont fortement stabilisés par mésomérie. Il faut cependant travailler à 0 °C afin d'éviter la décomposition spontanée du diazonium en diazote et carbocation.

Cette étape peut être effectuée sur une grande quantité de réactif (25 g de 4-butylalanine) et possède un excellent rendement, 100% pour le produit brut. La purification, effectuée par recristallisation dans un minimum de n-hexane, donne un produit sous forme de paillettes dorées. Le rendement après purification est de 91%. La caractérisation du produit est effectuée par RMN  $^1\text{H}$  (voir annexe A.1.1, figure A.1).

### 2.2.3.2 Couplage de l'azobenzène et de l'espaceur alkyle

#### Schéma réactionnel

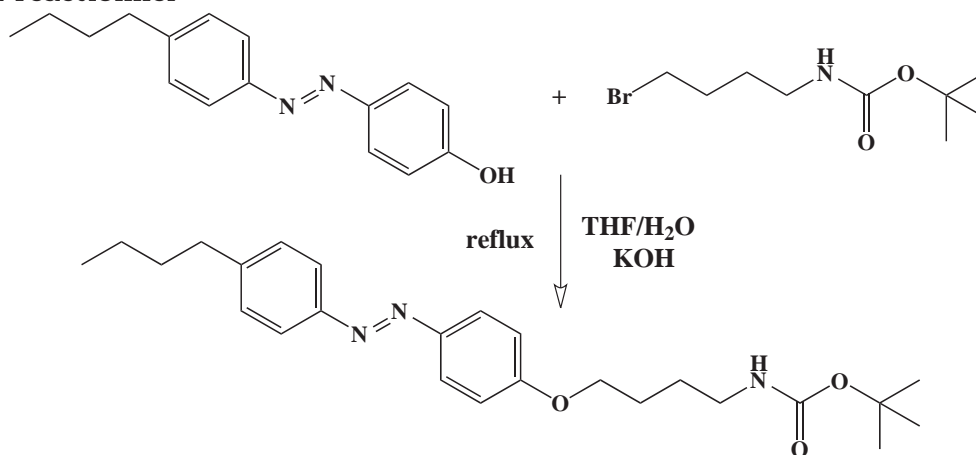


FIGURE 2.5 – Schéma réactionnel de l'étape de couplage entre l'azobenzène et de l'espaceur alkyle.

La déprotonation du phénol par la potasse active sa nucléophilie et favorise la substitution nucléophile sur le bromoalkyle. La réaction est quasi totale, malgré le milieu biphasique et la non utilisation de catalyseur de transfert de phase. Après une nuit de réaction, on observe un précipité blanc de KBr. L'analyse du milieu réactionnel par chromatographie sur couche mince ne montre alors plus de traces des réactifs.

Le produit est récupéré par précipitation dans un mauvais solvant, le n-hexane. Cette phase de précipitation peut être répétée afin d'augmenter la quantité de produit récupérée. Avec une seule étape de cristallisation, on obtient un rendement de 45%, mais avec trois cycles de précipitation, on peut monter jusqu'à 75%. La caractérisation du produit est effectuée par RMN  $^1\text{H}$  (voir annexe A.1.2, figure A.2).

### 2.2.3.3 Déprotection de la fonction amine

Il ne reste plus qu'à déprotéger la fonction amine pour récupérer le produit désiré. On suit un protocole classique de déprotection d'un groupement tBOC en utilisant de l'acide trifluoroacétique. L'analyse par RMN  $^1\text{H}$  du produit récupéré (spectre non représenté) montre la disparition du signal à 1.4 ppm des groupes méthyle de la fonction protectrice tBOC.

## Schéma réactionnel

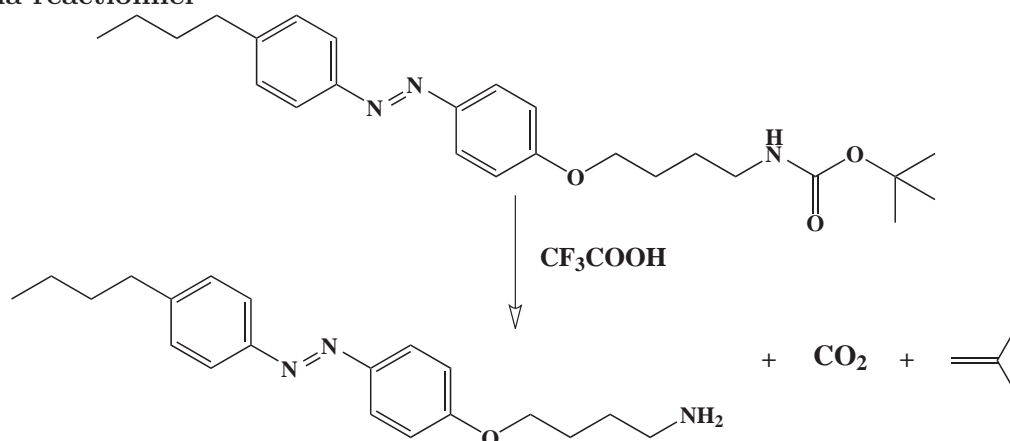


FIGURE 2.6 – Schéma réactionnel de l'étape de déprotection de la fonction amine.

## 2.3 Nomenclature des polymères

Les polymères seront définis selon la nomenclature systématique

Type de précurseur\_  $x$  type de greffon azo\_  $y$  glycine\_  $z$  arginine.

”Type de précurseur” est la nature du squelette précurseur, sa la valeur est PAA pour un polymère synthétisé par modification d’un squelette poly(acide acrylique) et NAS pour un polymère synthétisé par modification d’un squelette poly(N-acryloxysuccinimide). Les nombres  $x$ ,  $y$ , et  $z$  sont les taux de greffage molaire en pourcentage. ”Type de greffon azo” prendra comme valeur C6azo ou C4azoC4 en fonction de la nature du greffon azobenzène utilisé.

## 2.4 Modification d’un squelette poly(acide acrylique)

La modification de squelettes poly(acide acrylique) par des groupes hydrophobes a été développée depuis de nombreuses années au laboratoire. Ce greffage est effectué par couplage peptidique. De nombreuses amines primaires, secondaires et aromatiques ont déjà été testées telles que l’isopropylamine, diverses  $n$ -alkylamines [Magny *et al.* 1992], l’amino-azobenzène [Pouliquen 2003], des amino-alkyl-azobenzènes [Pouliquen 2003; Vial 2007]...

### 2.4.1 Stratégie de synthèse

Le greffage est réalisé dans la  $N$ -méthyl-pyrrolidone (NMP) entre la forme acide du polymère et les greffons en présence d’un couple d’activateurs  $N,N'$ -dicyclohexyl-carbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (DCCI/HOBT). La DCCI est un réactif électrophile qui, avec un acide carboxylique, forme un intermédiaire ester activé capable de réagir avec une amine. Cet intermédiaire peut cependant subir un réarrangement intramoléculaire irréversible conduisant à un greffon parasite, noté greffon DCU et représenté figure 2.7. Plus le milieu réactionnel va contenir d’espèces susceptibles de réagir avec l’ester activé, plus le temps de vie de ce dernier sera court et moins il aura le temps de se réarranger pour former le greffon indésirable. On ajoute donc du HOBT, un nucléophile capable de réagir avec l’ester activé pour former un autre intermédiaire réactif vis-à-vis de l’amine et ne subissant aucun réarrangement.

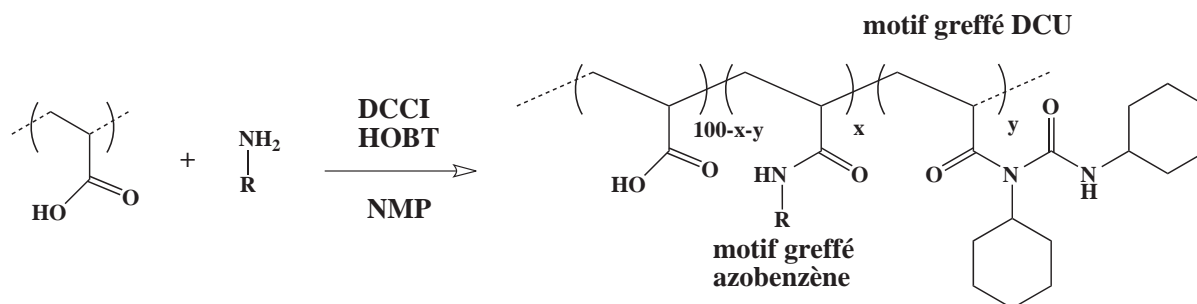


FIGURE 2.7 – Schéma réactionnel du couplage peptidique d'un greffon amino-azobenzène (représenté par NH<sub>2</sub>-R) sur un squelette poly(acide acrylique).

Cette méthode de greffage a été utilisée avec les azobenzènes de type C6azo et C4azoC4. A titre d'exemple, la synthèse d'un polymère modifié à 5% par des greffons C6azo est décrite en annexe A.2.

## 2.4.2 Détermination du taux de greffage

Le taux de greffage obtenu peut être mesuré par spectroscopie UV-visible et par RMN du proton.

### 2.4.2.1 Par UV-visible

Les propriétés spectroscopiques des chromophores azobenzènes ne sont pas altérées par le greffage lorsque que le taux de modification est inférieur à 15% [Vial 2007]. Nos polymères ont tous des taux de motifs azobenzènes inférieurs à 8% et leurs spectres UV-visible en solution dans l'eau se superposent à celui du greffon seul. On peut donc exprimer l'absorbance d'une solution de polymère modifié azobenzène  $A_\lambda$  en fonction de son taux de greffage  $x$ , de la masse molaire moyenne du polymère  $M$  et du coefficient d'extinction molaire du greffon seul  $\varepsilon_\lambda$ , en supposant que ce dernier reste constant, selon

$$A_\lambda = \frac{\varepsilon_\lambda l c x}{M}, \quad (2.1)$$

où  $l$  est le chemin optique parcouru dans la cuve et  $c$  la concentration massique en polymère dans la solution exprimée en g.L<sup>-1</sup>. La masse molaire moyenne du polymère est calculée à partir de la structure du polymère déterminée par RMN proton. La mesure est effectuée sous irradiation à 436 nm. Le coefficient d'extinction molaire à 347 nm vaut  $2.32 \cdot 10^4$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour le greffon C6azo en l'absence de lumière [Pouliquen 2003]. En supposant le coefficient d'extinction molaire à 437 nm de la conformation cis négligeable devant celui de la conformation trans, on a la relation

$$\varepsilon_{347}(\text{bleu}) = 0.80 \quad \varepsilon_{347}(\text{noir}) = 1.86 \cdot 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}. \quad (2.2)$$

Le coefficient d'extinction molaire du C4azoC4 a été mesuré pour le greffon en solution dans l'eau à pH 3 sous irradiation bleue et vaut  $1.77 \cdot 10^4$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### 2.4.2.2 Par RMN proton

Sur le spectre RMN proton d'un polyacrylate de sodium modifié C6azo (figure 2.8), les protons aromatiques, les protons (c) et les protons (d) sont caractéristiques du greffon azobenzène. L'intégration du signal des protons (d) étant peu précise, ils ne serviront pas à établir le taux de modification du polymère. Les signaux des protons représentatifs du squelette polymère sont (a) et (b). Cependant, le massif (a) recouvre également la contribution des protons centraux de l'espaceur alkyle du greffon azobenzène. Le massif (b) sera donc considéré comme référence pour

quantifier les protons de la chaîne polymère. Le signal (e) est caractéristique du greffage parasite de la DCU.

Sur le spectre RMN proton d'un polyacrylate de sodium modifié C4azoC4 (figure 2.9), les protons caractéristiques les plus visibles du greffon azobenzène sont les protons aromatiques et les protons du méthyle (f). Ceux-ci seront donc utilisés pour quantifier le taux de modification du polymère.

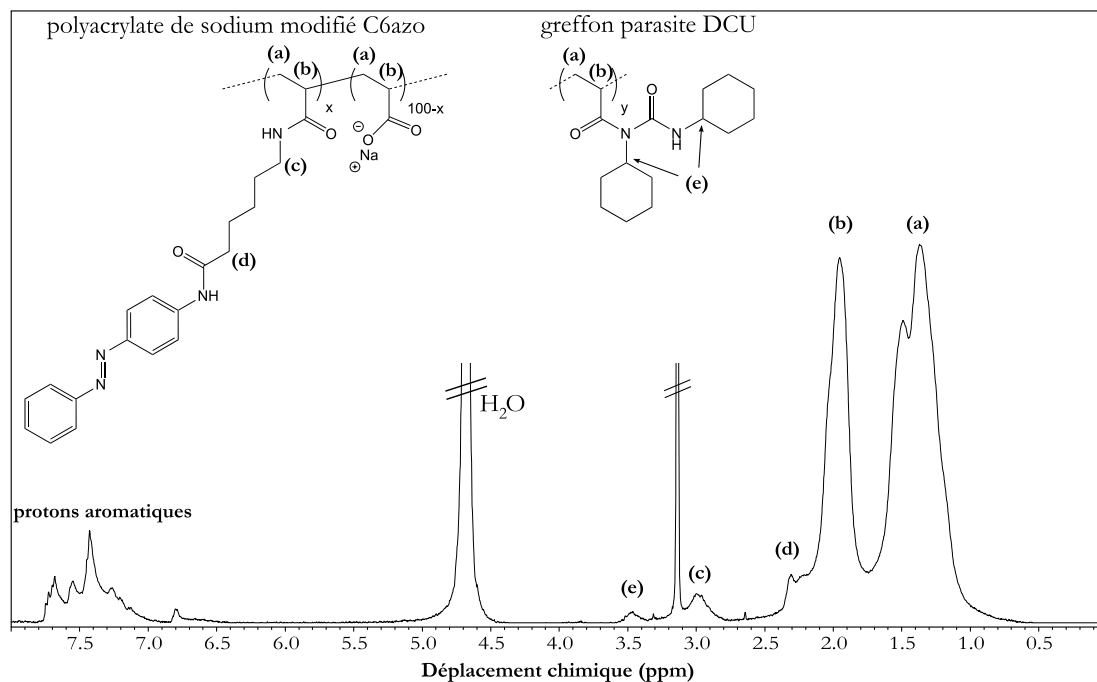


FIGURE 2.8 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un polyacrylate de sodium modifié C6azo à 2% en masse dans l'eau deutérée.

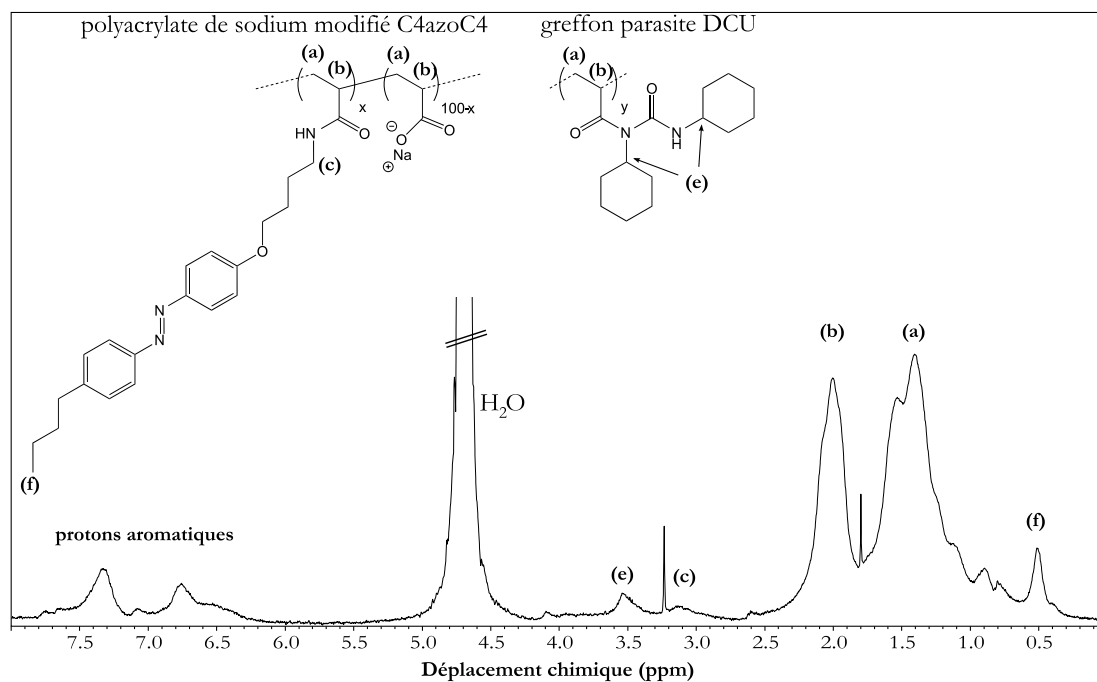


FIGURE 2.9 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un polyacrylate de sodium modifié C4azoC4 à 2% en masse dans l'eau deutérée.



### 2.4.3 Bilan sur les polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique)

Le tableau 2.1 regroupe les taux de greffage visés et obtenus pour les différents polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique).

Nom du polymère	visé	Taux de modification azobenzène		Taux de modification DCU
		déterminé par RMN $^1\text{H}$ aromatiques	déterminé par UV-visible	
PAA_1C6azo		0.7%	1.1%	1.0%
PAA_3.5C6azo	5.0%	3.9%	3.1%	0.3%
PAA_5C6azo	10.0%	3.9%	6.8%	0.6%
PAA_1C4azoC4	4.0%	0.8%	0.9%	1.0%
PAA_5C4azoC4	8.0%	5.2%	5.3%	4.1%

TABLE 2.1 – Récapitulatif des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique).

Au vu de ces différents résultats, on constate que

- les taux de modification obtenus sont plus faibles d'un facteur 2 à 3 que les taux visés, donc le greffage n'est pas quantitatif,
- de plus, plusieurs polymères montrent un taux non négligeable de greffage parasite de la DCU.

Devant la faible réactivité des amines utilisées, nous avons essayé de forcer l'activation de l'acide carboxylique afin d'augmenter le rendement du greffage. Lors de la synthèse du PAA\_5C4azoC4, la quantité de DCCI introduite a été doublée par rapport au mode opératoire habituel décrit en annexe A.2. On a introduit 2.5 équivalents de DCCI par rapport au greffon contre 1.1 équivalents dans le mode opératoire classique. HOBt est toujours ajouté en proportion 1.1 équivalents par rapport à la DCCI. L'effet attendu est obtenu car on greffe 60% du C4azoC4 introduit contre 25% dans le cas de la synthèse suivant le protocole classique de 1C4azoC4. La contrepartie est un taux de greffage DCU très élevé, de 4%.

Le greffon DCU apporte à la chaîne polymère une hydrophobie non désirée et non photostimulable. Il est donc gênant d'obtenir des polymères avec autant de greffons non désirés que de greffons azobenzènes, comme pour les polymères à faible taux d'azobenzène (1C6azo et 1C4azoC4) ou ceux où l'activation a été forcée (PAA\_5C4azoC4). Ce problème de greffage parasite nous a conduit à envisager une autre voie de synthèse des polymères.

## 2.5 Modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)

La nouvelle voie de synthèse doit répondre à deux critères :

- on souhaite greffer de manière quantitative et sans sous-produits les amino-alkyl-azobenzènes préalablement synthétisés
- et obtenir des polymères dont la structure reste proche de ceux synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique).

Ces contraintes ont conduit à envisager l'utilisation de monomères réactifs hydrolysables en acides carboxyliques comme les acétals, les anhydrides ou les esters activés. Les esters activés ont l'avantage d'être plus réactifs que les acétals tout en étant moins sensibles à l'hydrolyse que les anhydrides [Favier *et al.* 2004]. Parmi ces monomères de type ester activé, le N-acryloxysuccinimide (NAS) est un candidat très intéressant car il est très réactif vis à vis des amines et peut être copolymérisé par polymérisation radicalaire classique et polymérisation radicalaire contrôlée avec de nombreux monomères, comme la N-vinyl pyrrolidone, l'acrylamide ou le N,N-diméthylacrylamide [Favier *et al.* 2004; Religio *et al.* 2004; Li *et al.* 2006].

Le squelette poly(N-acryloxysuccinimide), poly(NAS), est synthétisé par polymérisation radicalaire classique puis modifié en une seule étape par différentes amines.

### 2.5.1 Synthèse du poly(N-acryloxysuccinimide) par polymérisation radicalaire classique

Après purification du monomère et du solvant, le 1,4-dioxane, la polymérisation du NAS est effectuée sous atmosphère inerte et par amorçage avec 0.51% en nombre par rapport au monomère d'azobisisobutyronitrile (AIBN). Au bout d'une nuit, on obtient 91% de rendement. Les détails de la polymérisation sont décrits en annexe A.3.1.

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique est effectuée sur le poly(acrylate de sodium) issu de l'hydrolyse du poly(NAS). Pour une solution de polymère à 0.5% en masse dans un tampon  $\text{LiNO}_3$  à  $0.5 \text{ mol.L}^{-1}$ , on obtient une masse molaire moyenne en poids ( $\overline{M}_w$ ) d'environ 85 700 et une masse molaire moyenne en nombre ( $\overline{M}_n$ ) d'environ 30 000, ce qui donne un indice de polymolécularité ( $I_p$ ) de 2.9.

Il est envisageable de synthétiser le poly(NAS) par polymérisation radicalaire contrôlée afin d'obtenir des chaînes mieux définies. Cependant, le squelette commercial poly(acide acrylique) utilisé pour la synthèse de nos premiers polymères ayant lui aussi un indice de polymolécularité supérieur à 2, il a semblé envisageable de travailler avec des chaînes poly(NAS) très polydisperses.

### 2.5.2 Modification du squelette poly(N-acryloxysuccinimide)

Le monomère NAS a été choisi afin de pouvoir modifier facilement et efficacement la chaîne polymère avec des amines. Plusieurs greffons ont été employés afin d'apporter différentes fonctions au polymère :

- les greffons amino-azobenzène, C6azo ou C4azoC4, permettent la modulation de l'hydrophobie du polymère et sa photo-stimulabilité,
- la glycine permet d'éloigner la fonction carboxylate de sodium de la chaîne et ainsi de jouer sur les effets électrostatiques,
- l'arginine apporte une fonction guanidine chargée positivement aux pH usuels, notamment inférieurs à 9.

L'utilisation d'acides aminés en tant que greffons permet d'avoir des polymères biomimétiques. De plus, l'effet d'acides aminés comme la glycine et l'arginine ont déjà été étudiés sur la renaturation de protéines en tant qu'additifs moléculaires respectivement stabilisant ou dispersant [Ho *et al.* 2003].

La modification de l'homoNAS est une synthèse "one-pot". Elle est composée de plusieurs ajouts successifs des différentes amines mais sans étape de purification intermédiaire. Nous avons donc procédé comme suit :

- dissolution de l'homoNAS dans du DMSO à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
- ajout d'une solution de greffon azobenzène dans le DMSO, réaction laissée une nuit à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
- ajout d'une solution de glycine dans l'eau contenant de la triéthylamine, réaction pendant 1 h à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
- ajout d'une solution d'arginine dans l'eau contenant de la triéthylamine, réaction pendant 1 h à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
- ajout d'une solution de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , réaction pendant la nuit à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La bonne miscibilité du DMSO avec l'eau nous permet d'avoir un milieu homogène malgré le mélange de solvants. Dans ces conditions, les différents greffages sont quantitatifs. Le protocole détaillé de la synthèse du NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg est décrit en annexe A.3.2.

#### Limitation de l'hydrolyse de l'homoNAS pendant les étapes de greffage

Les étapes d'ajout de la glycine et de l'arginine ont un temps de réaction court (1 h) afin de limiter l'hydrolyse du NAS par l'eau présente dans le milieu réactionnel. La vitesse d'hydrolyse

de l'homoNAS dans un mélange DMSO/eau dans des proportions 80/20 à 40 °C a été déterminé par RMN du proton. Comme illustré dans la figure 2.10, on peut suivre l'apparition à 2.56 ppm du signal des protons du N-Hydroxysuccinimide (NHS) produit par l'hydrolyse.

Les proportions des pics (c) et (d) permettent de remonter au taux d'hydrolyse. Au bout de 5 min, on observe 5% d'hydrolyse, au bout de 3 h 30 13% et au bout de 23 h 39%. Ces résultats montrent que l'hydrolyse est faible, inférieure à 10%, après 2 h de réaction dans les conditions de greffage utilisées. On peut ainsi penser que l'hydrolyse impacte peu l'efficacité de greffage.

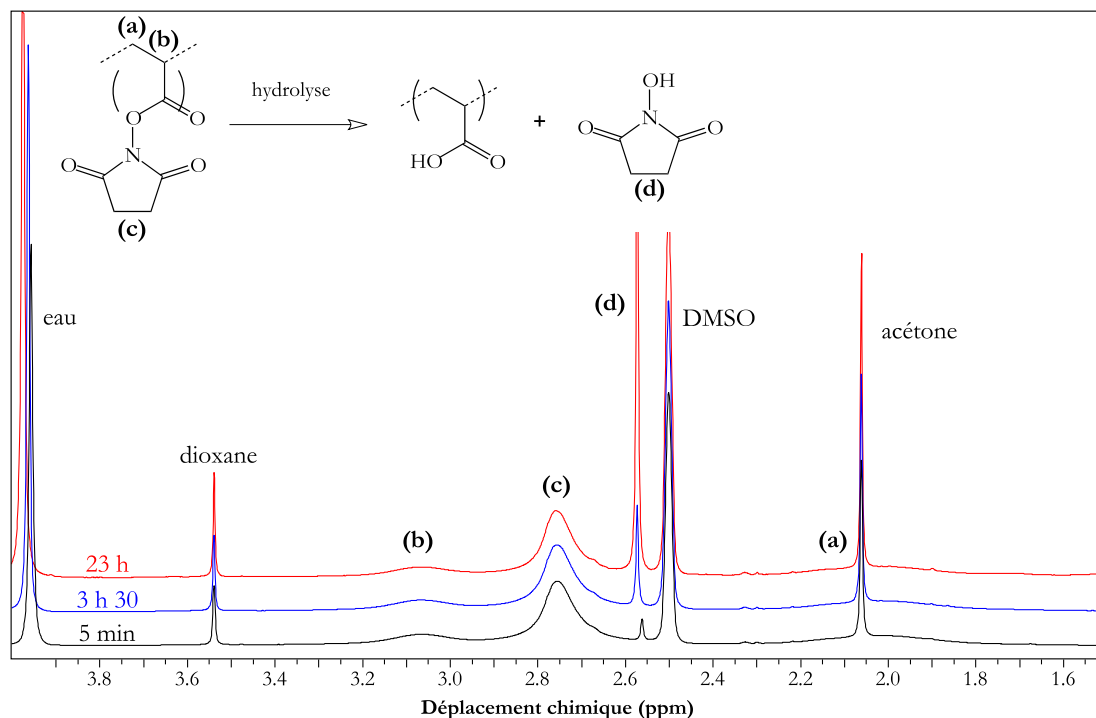


FIGURE 2.10 – Suivi par RMN  $^1\text{H}$  de l'hydrolyse du poly(NAS) au cours du temps dans un mélange DMSO deutéré/ $\text{D}_2\text{O}$  80/20 à 40 °C.

### 2.5.2.1 Caractérisation des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)

Les polymères ont été caractérisés par RMN du proton. Aucun signal résiduel à 2.7 ppm caractéristique de monomères NAS non hydrolysés n'a jamais été observé.

#### Greffage de la glycine.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la glycine dans le  $\text{D}_2\text{O}$  est composé d'un singulet à 3.54 ppm. Une fois greffée sur la chaîne polymère, on retrouve le signal du  $\text{CH}_2$  de la glycine autour de 3.7 ppm. Cette légère augmentation de déplacement chimique s'explique par la transformation de l'amine en amide qui crée un environnement déblindant.

Lorsque l'on augmente la quantité de glycine greffée sur la chaîne polymère (figure 2.11), on observe l'apparition d'une deuxième série de signaux à 3.4 et 4.1 ppm. Ces derniers correspondent à la résonance des deux protons diastéréotopes du  $\text{CH}_2$  de la glycine. En effet, l'augmentation du taux de greffage induit une augmentation de la structuration de la chaîne due à une augmentation de la gêne stérique. La mobilité de certains greffons glycine en est réduite au point de rendre leurs protons non équivalents en RMN. Des expériences de RMN 2D ont été effectuées afin de confirmer cette hypothèse. Une séquence HMQC (*Homonuclear Multiple Quanta Correlation*) a permis d'obtenir la carte de corrélation entre les protons et les carbones auxquels ils sont chimiquement liés (spectre en annexe A.3.2 figure A.5). Les deux pics à 3.4 et 4.1 ppm sont

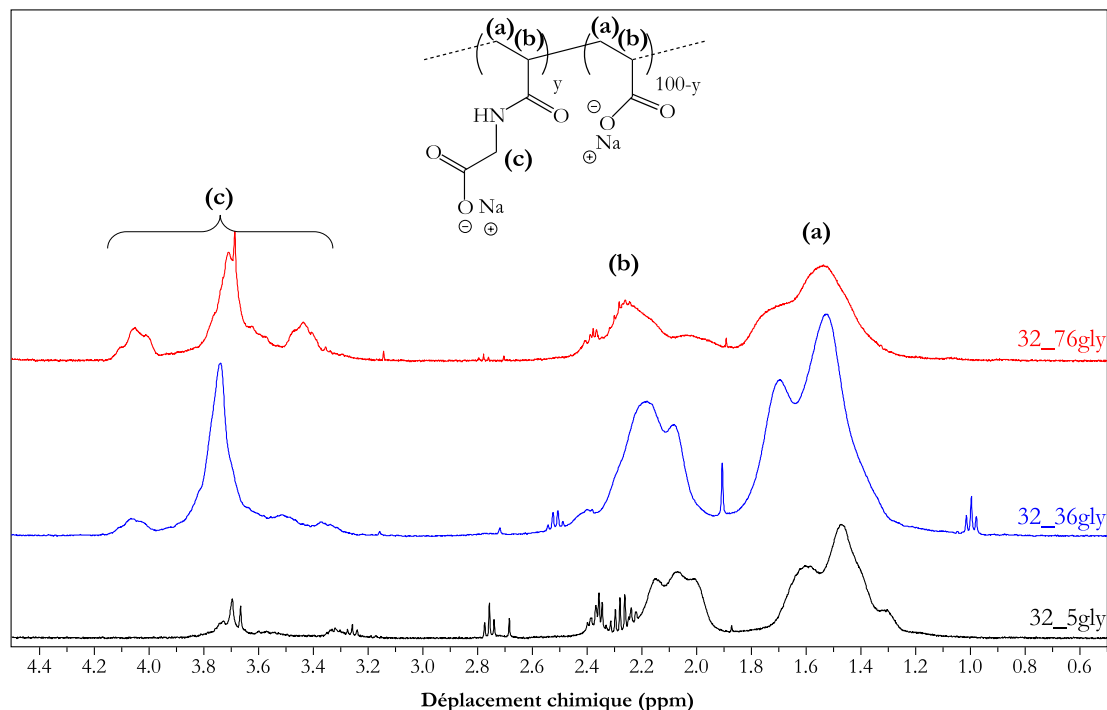


FIGURE 2.11 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du poly(NAS) modifiés à différents taux par de la glycine en solution à 2% dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .

bien corrélés au même signal carbone à 44.3 ppm. La séquence COSY (spectre en annexe A.3.2 figure A.6) est une autre preuve de la diastéréoisométrie des protons car on trouve une corrélation indiquant un couplage géminé entre le pic à 3.4 ppm et celui à 4.1.

Le taux de greffage de la glycine peut être obtenu en calculant le rapport des intégrations des signaux (c) et (a) caractéristiques, respectivement, du  $\text{CH}_2$  du greffon glycine et du  $\text{CH}_2$  de la chaîne polymère. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.2.

L'analyse élémentaire du carbone et de l'azote est une autre technique permettant l'estimation du taux de greffage. Ce dernier peut être exprimé comme :

$$y = \frac{n(\text{C})_{AA}}{\frac{\% \text{massique}(\text{C}) * M(\text{N})}{\% \text{massique}(\text{N}) * M(\text{C})} n(\text{N})_{gly} - n(\text{C})_{gly} + n(\text{C})_{AA}} \quad (2.3)$$

avec  $\% \text{massique}(\text{C})$  et  $\% \text{massique}(\text{N})$  les pourcentages massiques de carbone et d'azote obtenus par analyse élémentaire,  $M(\text{C})$  et  $M(\text{N})$  les masses molaires du carbone et de l'azote,  $n(\text{C})_{gly}$  et  $n(\text{N})_{gly}$  le nombre d'atomes de carbone ou d'azote dans un motif greffé glycine et  $n(\text{C})_{AA}$  le nombre d'atomes de carbone dans un motif acrylate de sodium.

Nom du polymère	Taux visé	Taux déterminé par RMN $^1\text{H}$	Taux déterminé par analyse élémentaire
NAS_10gly	5%	11%	12%
NAS_35gly	30%	35%	34%
NAS_75gly	60%	76%	71%

TABLE 2.2 – Récapitulatif des taux de modification obtenus pour le greffage de la glycine.

Le tableau 2.2 permet de comparer les taux de modification visés lors de la préparation de la synthèse et ceux mesurés par les deux techniques précédemment exposées. Les résultats obtenus par RMN du proton et par analyse élémentaire sont en bon accord. Les valeurs plus élevées

des taux de modification mesurés par rapport à ceux visés peuvent s'expliquer par une sous-estimation de la quantité de polymère pesée. Ceci est probablement dû à une présence résiduelle d'environ 20% en masse de solvant dans la poudre de poly(N-acryloxysuccinimide).

Le résultat le plus remarquable est l'obtention d'un greffage quantitatif de la glycine dans les trois synthèses réalisées.

### Greffage de l'arginine.

Dans ce paragraphe, nous allons caractériser et comptabiliser les greffons arginine sur un polymère ayant préalablement subi une étape de greffage de glycine. Le greffage de l'arginine seule n'a pas été testé.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'arginine moléculaire dans le  $\text{D}_2\text{O}$  est composé :

- d'un triplet à 3.25 ppm caractéristique du CH en alpha de l'amine et de l'acide carboxylique,
- d'un triplet à 3.18 ppm caractéristique du  $\text{CH}_2$  en alpha de la fonction guanidine,
- d'un multiplet à 1.59 ppm caractéristique des deux  $\text{CH}_2$  au milieu de la chaîne alkyle.

Après greffage sur la chaîne polymère (figure 2.12), le signal des  $\text{CH}_2$  au milieu de la chaîne alkyle (e) est noyé dans le massif des  $\text{CH}_2$  du squelette polymère (a). Le signal du  $\text{CH}_2$  en alpha de la fonction guanidine (f) est conservé autour de 3.0 ppm. Enfin, le signal du CH (d) à 4.0 ppm, est déblindé en raison de la transformation de l'amine en amide.

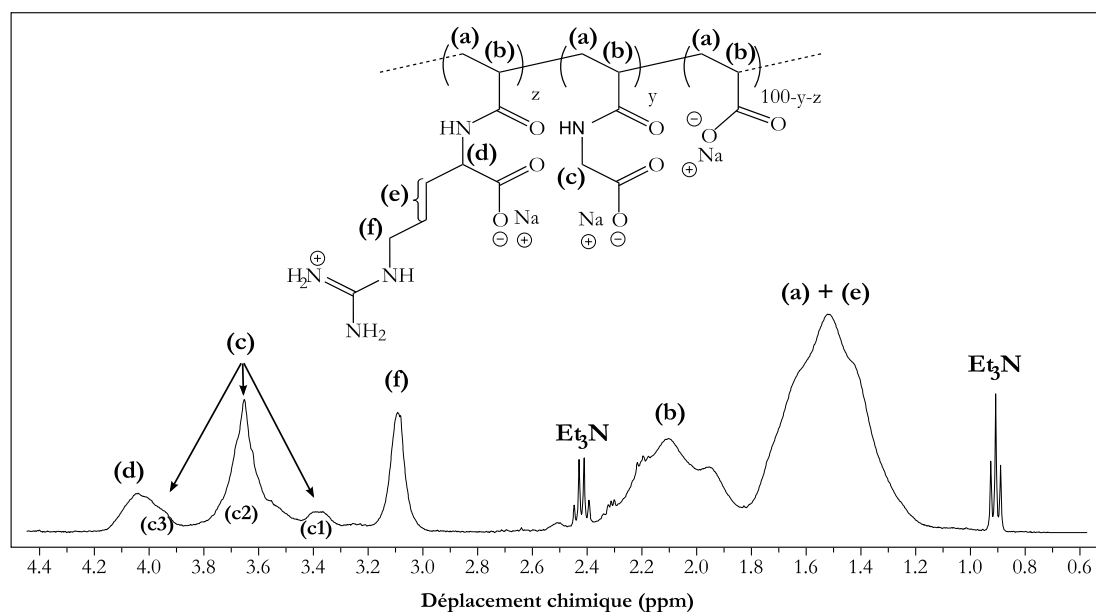


FIGURE 2.12 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du NAS\_35gly\_15arg en solution à 2% dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .

La contribution des protons (e) au pic (a) n'étant pas négligeable, il vaut mieux prendre comme référence pour les protons de la chaîne le pic (b). Les taux de greffage de la glycine  $y$  et de l'arginine  $z$  peuvent être obtenus malgré le chevauchement des pics (c3) et (d). En effet, d'après les spectres RMN obtenus pour des polymères greffés uniquement avec de la glycine, les intégrales des pic (c1) et (c3) sont égales. On peut donc estimer les taux de modification obtenus par

$$y = \frac{2 * I(c1) + I(c2)}{2 * I(b)} \quad \text{et} \quad z = \frac{I(f)}{2 * I(b)}, \quad (2.4)$$

avec  $I$  la valeur de l'intégration des pics correspondants.

Pour le polymère dont le spectre RMN est représenté en figure 2.12, on trouve  $y = 35\%$  et  $z = 14\%$ . Les taux visés étant de 30% pour la glycine et de 15% pour l'arginine, on trouve un

greffage quantitatif de la glycine, comme précédemment, et une très forte efficacité de celui de l'arginine.

### Greffage de l' aminoalkylazobenzène.

Le protocole détaillé de la synthèse d'un polymère possédant les trois différents types de greffons peut être trouvé en annexe A.3.2.

La détermination du taux de greffage des azobenzènes est effectuée à partir de l'intégration du signal de ses protons aromatiques :

$$x = \frac{I(\text{aromatiques})}{nb(\text{aromatiques}) * I(b)}, \quad (2.5)$$

avec  $I$  la valeur de l'intégration des pics correspondants et  $nb(\text{aromatiques})$  le nombre de protons aromatiques par greffon,  $nb(\text{aromatiques}) = 9$  pour le C6azo et  $nb(\text{aromatiques}) = 8$  pour le C4azoC4.

Pour tous les polymères synthétisés par modification du squelette poly(N-acryloxysuccinimide), le greffage des azobenzènes a été quantitatif.

#### 2.5.2.2 Bilan des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide)

Le tableau 2.3 résume la structure des différents polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide).

Nom du polymère	Taux de modification déterminé par RMN <sup>1</sup> H		
	greffage azobenzène	greffage glycine	greffage arginine
NAS_10gly	/	11%	/
NAS_35gly	/	35%	/
NAS_75gly	/	76%	/
NAS_35gly_14arg	/	35%	14%
NAS_7C6azo_35gly	7.0%	35%	/
NAS_4C6azo_35gly_14arg	4.0%	32%	18%

TABLE 2.3 – Récapitulatif des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide).

## 2.6 Conclusion

Nous avons synthétisé une large gamme de polymères amphiphiles photo-stimulables qui vont être utilisés pour la renaturation de protéines. Les rôles de l'hydrophobie et de la photostimulabilité vont pouvoir être testés grâce aux deux types de greffons synthétisés C6azo ou C4azoC4 et aux taux de modification variables de 1% à 7% obtenus. Le greffage de la glycine et de l'arginine permet de varier la densité de charge de la chaîne polymère. On va ainsi également pouvoir tester l'importance des interactions électrostatiques.

En plus de la réalisation des objets désirés, nous avons mis au point une méthode de synthèse relativement simple à mettre en œuvre et ouvrant d'énormes possibilités de modulation de la chimie de ces polymères. En effet, la modification de motifs NAS par des amines s'est révélée quantitative, assez peu sensible à l'hydrolyse et supportant des modifications successives sans purification intermédiaire. De plus, le monomère NAS peut être polymérisé par polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT. Ceci ouvre la voie de la maîtrise du squelette polymère tant dans sa taille que dans son architecture (copolymérisation ...). On peut alors envisager la création de squelettes polymères variés modifiables presque à volonté.

## Bibliographie

- [Chen et Morawetz 1976] D. T.-L. Chen and H. Morawetz. *Photoisomerization and Fluorescence of Chromophores Built into the Backbones of Flexible Polymer Chains*. *Macromolecules*, vol. 9, no. 3, pages 463–468, May 1976.
- [Durr 1990] H. Durr. *Photochromism*. Elsevier, Amsterdam [etc.], 1990.
- [Favier *et al.* 2004] A. Favier, F. D’Agosto, M. T. Charreyre and C. Pichot. *Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights*. *Polymer*, vol. 45, no. 23, pages 7821–7830, October 2004.
- [Hayashita *et al.* 1994] T. Hayashita, T. Kurosawa, T. Miyata, K. Tanaka and M. Igawa. *Effect of structural variation within cationic azo-surfactant upon photo-responsive function in aqueous solution*. *Colloid & Polymer Science*, vol. 272, no. 12, pages 1611–1619, December 1994.
- [Ho *et al.* 2003] J. G. S. Ho, A. P. J. Middelberg, P. Ramage and H. P. Kocher. *The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient*. *Protein Science*, vol. 12, no. 4, pages 708–716, 2003.
- [Ikeda 2003] T. Ikeda. *Photomodulation of liquid crystal orientations for photonic applications*. *Journal of Materials Chemistry*, vol. 13, no. 9, pages 2037–2057, 2003.
- [Irie 1993] M. Irie. *Stimuli-responsive poly(N-isopropylacrylamide). Photo- and chemical-induced phase transitions*. In *Responsive Gels : Volume Transitions II*, *Advances in Polymer Science*, pages 49–65. Springer Berlin / Heidelberg, 1993.
- [Kang *et al.* 2000] H.-C. Kang, B. Min Lee, J. Yoon and M. Yoon. *Synthesis and Surface-Active Properties of New Photosensitive Surfactants Containing the Azobenzene Group*. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 231, no. 2, pages 255–264, November 2000.
- [Khoukh *et al.* 2006] S. Khoukh, C. Tribet and P. Perrin. *Screening physicochemical parameters to tuning the reversible light-triggered control of emulsion type*. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 288, no. 1-3, pages 121–130, October 2006.
- [Khoukh 2006] S. Khoukh. *Associations photostimulables entre polymère et tensio-actif et application à la conception d’émulsifiants : contrôle de la stabilité et de l’inversion d’émulsions par la lumière*. PhD thesis, Université Paris VI, 2006.
- [Li *et al.* 2006] Y. T. Li, B. S. Lokitz and C. L. McCormick. *RAFT synthesis of a thermally responsive ABC triblock copolymer incorporating N-acryloxysuccinimide for facile in situ formation of shell cross-linked micelles in aqueous media*. *Macromolecules*, vol. 39, no. 1, pages 81–89, 2006.
- [Magny *et al.* 1992] B. Magny, F. Lafuma and I. Iliopoulos. *Determination of micro-structure of hydrophobically modified water-soluble polymers by  $^{13}C$  n.m.r.* *Polymer*, vol. 33, no. 15, pages 3151–3154, 1992.

- [Pieroni *et al.* 1998] O. Pieroni, A. Fissi and G. Popova. *Photochromic polypeptides*. Progress in Polymer Science, vol. 23, no. 1, pages 81–123, 1998.
- [Pouliquen et Tribet 2006] G. Pouliquen and C. Tribet. *Light-Triggered Association of Bovine Serum Albumin and Azobenzene-Modified Poly(acrylic acid) in Dilute and Semidilute Solutions*. Macromolecules, vol. 39, no. 1, pages 373–383, 2006.
- [Pouliquen 2003] G. Pouliquen. *Polymères amphiphiles pour la photostimulation de transitions sol-gel*. PhD thesis, Université Paris VI, 2003.
- [Religio *et al.* 2004] P. Religio, M. T. Charreyre, J. P. S. Farinha, J. M. G. Martinho and C. Pichot. *Well-defined polymer precursors synthesized by RAFT polymerization of N,N-dimethylacrylamide/N-acryloxysuccinimide : random and block copolymers*. Polymer, vol. 45, no. 26, pages 8639–8649, December 2004.
- [Shang *et al.* 2003] T. G. Shang, K. A. Smith and T. A. Hatton. *Photoresponsive surfactants exhibiting unusually large, reversible surface tension changes under varying illumination conditions*. Langmuir, vol. 19, no. 26, pages 10764–10773, December 2003.
- [Tomatsu *et al.* 2005] I. Tomatsu, A. Hashidzume and A. Harada. *Photoresponsive Hydrogel System Using Molecular Recognition of  $\alpha$ -Cyclodextrin*. Macromolecules, vol. 38, no. 12, pages 5223–5227, 2005.
- [Vial 2007] F. Vial. *Perméabilisation contrôlée de membranes lipidiques par des copolymères amphiphiles hydrosolubles stimulables*. PhD thesis, Université Paris VI, 2007.
- [Zimmerman *et al.* 1958] G. Zimmerman, L.-Y. Chow and U.-J. Paik. *The Photochemical Isomerization of Azobenzene1*. Journal of the American Chemical Society, vol. 80, no. 14, pages 3528–3531, 1958.





## Chapitre 3

# Association photostimulable entre polymères et particules colloïdales

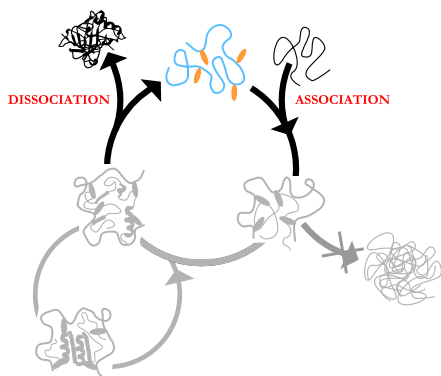
### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Association avec des micelles de tensio-actif</b>	<b>42</b>
3.2.1	Mécanisme d'association	42
3.2.2	Fraction de chromophores azobenzènes liés : étude spectrophotométrique	44
3.2.2.1	Méthode	44
3.2.2.2	Effet du taux de modification hydrophobe des polymères : détermination d'une longueur de boucle critique	46
3.2.2.3	Effet de la force ionique et de la nature du tensio-actif	47
3.2.2.4	Effet de la nature du greffon : modulation du $\Delta G_{azo}$ de transfert	48
3.2.3	Fraction de tensio-actif lié : étude utilisant l'électrophorèse capillaire	50
3.2.3.1	Méthode	50
3.2.3.2	Effet du taux de modification hydrophobe des polymères : estimation d'une longueur de boucle critique	52
3.2.3.3	Effets de la force ionique et de la nature du greffon	54
3.2.4	Stœchiométrie des complexes	56
3.2.4.1	Cas du SDBS	56
3.2.4.2	Cas du Triton	56
3.2.5	Effet de la lumière	58
3.2.5.1	Principe	58
3.2.5.2	Mise en évidence de la photo-dissociation	59
3.2.5.3	Les limites de la photo-dissociation	60
<b>3.3</b>	<b>Association avec les protéines natives</b>	<b>63</b>
3.3.1	Importance de la nature de la protéine	64
3.3.2	Photo-modulation des interactions hydrophobes	66
3.3.3	Modulation des interactions électrostatiques	66
<b>3.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>67</b>

---

### 3.1 Problématique



Dans ce chapitre, on va s'intéresser à l'association photo-stimulable entre les polymères décrits précédemment et des particules colloïdales présentant une couronne hydrophile et un cœur hydrophobe, comme des micelles de tensio-actifs ou des protéines natives. En ce qui concerne l'association polymère/protéine native, la question principale va être de s'assurer du piégeage réversible de la protéine et en particulier de la possibilité d'une dissociation des complexes protéine/polymère après repliement.

D'un point de vue plus général, cette question du contrôle de l'association entre polymères amphiphiles et particules se pose dans toutes les recherches sur les systèmes dits associatifs, notamment dans les mélanges polymère/tensio-actifs. Or il y existe assez peu de modèles décrivant les équilibres d'association/dissociation de tensio-actifs et de polymères aléatoirement modifiés. Ainsi, cette étude permettra également d'améliorer la compréhension globale de ces systèmes.

Finalement, en ce qui concerne la recherche de systèmes chaperonnes photo-stimulables, l'étude de complexes tensio-actifs/polymères modifiés azobenzènes nous permet d'aborder les questions essentielles suivantes :

1. Comment formuler un système photo-actif sur la base d'associations hydrophobes entre un polymère et un objet colloïdal (ici une micelle)? En particulier, peut-on espérer des réponses à la lumière sur une large gamme de compositions ?
2. Quel mécanisme et quels paramètres régissent ces réponses ?

Ces connaissances nous permettront non seulement d'aborder le cas de l'association polymère/protéine, mais aussi d'envisager à l'avenir des systèmes à trois partenaires (polymère, tensio-actifs et protéine). En effet, les tensio-actifs moléculaires font partie des principaux additifs amphiphiles renaturants. Il est alors intéressant de poser la question de la photostimulation d'un système tensio-actif/polymère.

Dans ce chapitre, nous allons commencer par proposer un modèle général de la stabilité des complexes de polymères photo-actifs, à partir de l'exemple de leur association sur des micelles. Ce modèle va ensuite être confronté à des résultats expérimentaux de mesure de la quantité d'azobenzènes liés par une méthode de spectroscopie UV-visible et de mesure de la quantité de micelles liées par une méthode d'électrophorèse capillaire. Nous en déduirons la stoechiométrie des complexes polymères/tensio-actifs dans le noir. Enfin, nous regarderons l'effet de la lumière sur ces objets.

### 3.2 Association avec des micelles de tensio-actif

Pour cette étude, deux tensio-actifs différents ont été employés, l'un neutre, un polyéthylène glycol tert-octylphenyl ether le Triton<sup>®</sup> X-100, noté TX 100, et l'autre chargé négativement, le sodium dodecylbenzenesulfonate, noté SDBS (figure 3.1). Le TX 100 est une molécule usuelle pour la solubilisation de protéines membranaires [Le Maire *et al.* 2000] et le SDBS un tensio-actif dénaturant, proche du SDS souvent utilisé pour déplier les protéines. Dans les deux molécules, la présence d'un cycle benzyl permet un suivi spectrophotométrique.

#### 3.2.1 Mécanisme d'association

Préalablement aux présents travaux, l'étude de ce type de systèmes tensio-actif/polymère photo-stimulable avait déjà été effectuée au laboratoire, mais avec un autre tensio-actif, le dode-

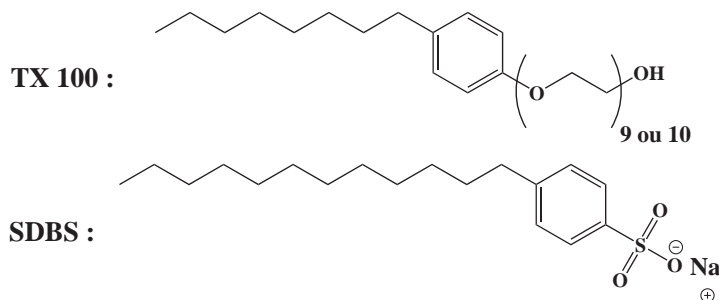


FIGURE 3.1 – Structure des deux tensio-actifs utilisés.

cyl tetraéthylèneoxyde [Khoukh 2006; Khoukh *et al.* 2007]. Un schéma décrivant l'association des polymères avec les micelles de tensio-actif avait été proposé.

Ce schéma comporte deux étapes représentées figure 3.2. La première étape décrit l'association d'un premier azobenzène avec une micelle. Cette association peut être vue comme un équilibre classique avec une constante  $K_{\text{assoc}}$ . Une fois le premier azobenzène lié, le polymère va avoir tendance à entourer la micelle pour former de multiples associations avec cette dernière. Le polymère se lie ainsi beaucoup plus fortement et l'on s'attend à ce que l'équilibre d'association soit alors déplacé vers la formation des complexes.

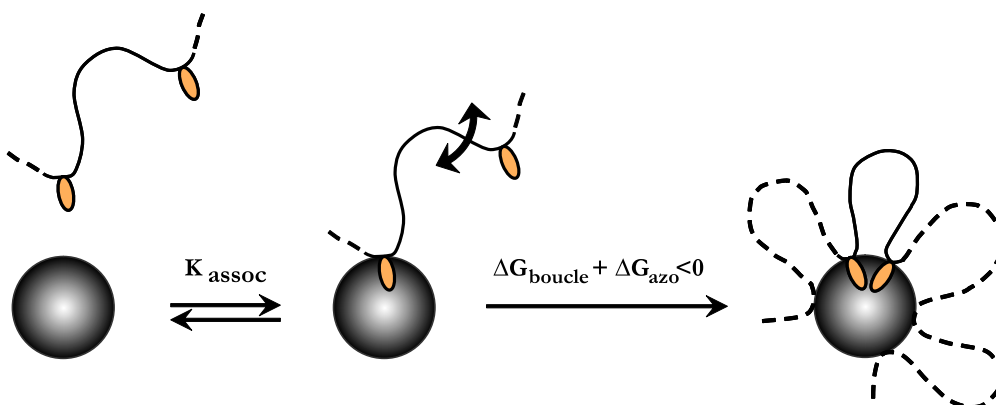


FIGURE 3.2 – Schéma illustrant le mécanisme d'association d'un polymère modifié azobenzène sur une micelle.  $K_{\text{assoc}}$  constante d'équilibre d'association du premier azobenzène dans la micelle,  $\Delta G_{\text{boucle}}$  énergie libre de formation d'une boucle et  $\Delta G_{\text{azo}}$  énergie libre de transfert de l'azobenzène de l'eau vers le cœur hydrophobe de la micelle.

Afin de décrire de façon quantitative cette transition vers les complexes dits "en fleur", nous proposons l'approche suivante : il faut que le gain d'énergie libre  $\Delta G_{\text{azo}}$  obtenu en transférant l'azobenzène de l'eau au cœur de la micelle compense la perte d'énergie libre  $\Delta G_{\text{boucle}}$  due à la formation d'une boucle polymère. Cette énergie nécessaire à la formation d'une boucle peut avoir plusieurs origines. Dans le cas de chaînes flexibles, elle est due à la perte de liberté conformationnelle et peut alors s'écrire sous forme d'un terme entropique  $T\Delta S_{\text{boucle}}$ . Pour des chaînes semi-flexibles, l'énergie de formation de la boucle provient essentiellement de la courbure à réaliser et est alors un terme enthalpique. Enfin, des répulsions électrostatiques peuvent s'ajouter et contribuer à la déstabilisation des boucles. Nous proposons, à titre d'hypothèse générale, qu'il existe une longueur de boucle critique  $l_C$  au-dessus de laquelle l'énergie dépensée pour former des boucles n'est plus compensée, *i.e.*  $\Delta G_{\text{boucle}} > -\Delta G_{\text{azo}}$ . Il n'y aurait pas alors effondrement du polymère sur la micelle.

Cette modélisation est construite sur l'hypothèse que plus une boucle est longue, plus l'énergie dépensée pour la former est importante. Elle ne prend pas en compte de manière explicite les

interactions d'origine électrostatique présentes dans les systèmes étudiés. Il est difficile de les quantifier, mais on estimera globalement leur impact au travers du seul paramètre  $l_C$ .

Ce mécanisme suppose deux types de comportement opposés dépendant du taux de modification du polymère :

- soit la distance entre deux motifs azobenzènes est plus grande que  $l_C$  et on a uniquement une association équilibrée entre le polymère et le tensio-actif,
- soit les motifs azobenzènes sont suffisamment proches pour avoir  $\Delta G_{\text{boucle}} + \Delta G_{\text{azo}} < 0$  est ainsi une association polymère/tensio-actif très forte.

### 3.2.2 Fraction de chromophores azobenzènes liés : étude spectrophotométrique

Nous avons déterminé la fraction des groupes azobenzènes participant à la complexation dans des mélanges tensio-actif/polymère. Cette étude permet d'estimer la longueur moyenne des boucles polymères formées autour d'un cœur hydrophobe. On a alors analysé l'impact de la composition des chaînes, de la nature du greffon et de la force ionique dans le cadre du modèle décrit au paragraphe 3.2.1.

#### 3.2.2.1 Méthode

##### Principe

La quantité d'azobenzènes participant à la complexation a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible. En effet, lors de la formation des complexes polymère/tensio-actif, les chaînes latérales des polymères contenant l'azobenzène pénètrent dans le cœur hydrophobe des micelles. Ce changement d'environnement du chromophore, passage d'un milieu aqueux à un milieu hydrophobe, va alors se répercuter sur son spectre d'absorption UV-visible.

##### Conditions opératoires

Les expériences sont réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Hewlett-Packard 8453 dans une gamme de longueur d'onde comprise entre 200 et 600 nm. Dans une cellule en quartz de largeur 1 cm sous agitation, on introduit 2.5 mL d'une solution de polymère à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  dans une solution de tampon borate pH 9.1 avec ou sans NaCl. On enregistre le spectre d'absorption de cette solution qui sera le spectre de référence. Puis on effectue des ajouts successifs (de quelques microlitres) d'une solution de tensio-actif de concentration  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . Après chaque ajout, on laisse homogénéiser environ 5 min, puis on enregistre le spectre d'absorption de cette nouvelle solution. La dilution provoquée par les différents ajouts sera corrigée par calcul afin d'obtenir des courbes normalisées à la même concentration en polymère.

Afin de s'affranchir de toute variation des spectres qui serait imputable à l'effet du faisceau du spectromètre, on irradie continûment la cellule à 436 nm. Pour avoir un maximum de précision, la longueur d'onde retenue pour la détermination du taux d'azobenzène lié est celle où la différence entre les spectres en présence de tensio-actif et le spectre de référence est maximale (autour de 370 nm). Les tensio-actifs utilisés ne perturbent pas les mesures car ils ne présentent pas d'absorbance au-dessus de 300 nm. Sous irradiation bleue, la population d'azobenzènes contient 20% de molécules en conformation *cis*. A la longueur d'onde retenue, ces composés *cis* contribuent de manière négligeable à l'absorbance de la solution.

##### Traitement des résultats

L'augmentation de la concentration en Triton dans le milieu provoque un effet bathochrome (déplacement du pic d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes) et un effet hyperchrome (augmentation du coefficient d'extinction molaire). Cette variation du spectre d'absorption est à rapprocher de celle que l'on peut observer lorsque l'on compare le spectre d'un greffon C6azo dans l'eau et en milieu hydrophobe, par exemple dans le dodécane [Khoukh *et al.* 2007].

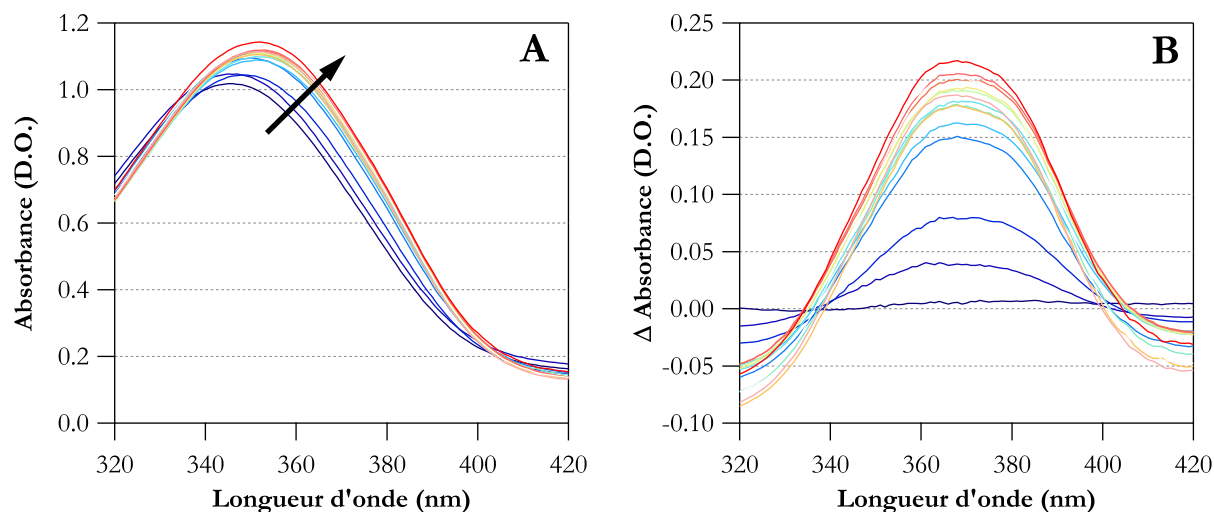


FIGURE 3.3 – Effet de l’ajout en concentration croissante de TX 100 (de — 0 g.L<sup>-1</sup> vers — 1.8 g.L<sup>-1</sup>) sur la bande ( $\pi - \pi^*$ ) de l’azobenzène. Solution de PAA\_3.5C6azo à 0.2 g.L<sup>-1</sup> dans 150 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl (A) spectres après correction de l’effet de dilution, (B) après retranchement du spectre de référence du polymère seul.

La présence de points isobestiques à 334 et 404 nm visibles sur les deux graphiques de la figure 3.3 permet d’affirmer que le chromophore n’est présent que sous deux formes distinctes : l’une libre qui fait référence à l’état de l’azobenzène lorsque le polymère est seul en solution, et l’autre liée qui correspond à l’état de l’azobenzène en milieu hydrophobe c’est-à-dire lorsqu’il est associé au Triton. Il est alors possible de relier quantitativement la différence d’absorbance entre un spectre en présence de tensio-actif et celui du polymère seul, notée  $\Delta Abs$ , avec la fraction d’azobenzène lié.

### Expression reliant la différence d’absorbance et la fraction d’azobenzène lié.

L’absorbance du mélange de polymère/Triton est due à la fois aux groupes azobenzènes complexés, désignés par l’indice  $B$  pour *bound*, et aux groupes azobenzènes libres restant, désignés par l’indice  $F$  pour *free*. D’après la loi de Beer-Lambert, l’absorbance  $A$  de la solution vaut :

$$A = l(\varepsilon_B [\text{azo}]_B + \varepsilon_F [\text{azo}]_F), \quad (3.1)$$

avec  $l$  le chemin optique,  $\varepsilon$  le coefficient d’extinction molaire de l’azobenzène et  $[\text{azo}]$  la concentration molaire en azobenzène.

L’expression de la différence d’absorbance  $\Delta Abs$  entre l’absorbance de la solution en présence et l’absence de TX 100 s’exprime donc comme

$$\Delta Abs = l(\varepsilon_B - \varepsilon_F) [\text{azo}]_B. \quad (3.2)$$

$\Delta\varepsilon = \varepsilon_B - \varepsilon_F$  représente la différence entre les coefficients d’extinction molaire du chromophore azobenzène en milieu totalement hydrophobe et en milieu aqueux. Une bonne approximation de la valeur de  $\Delta\varepsilon$  correspond à la différence d’absorption entre les spectres d’un greffon C6azo dans le dodécane et dans l’eau. La valeur mesurée pour  $\Delta\varepsilon$  à 369 nm est de 0.0051  $\mu\text{L}.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Nous utiliserons cette valeur à titre de normalisation dans toute la suite de ce travail.

Le rapport  $\frac{\Delta Abs}{[\text{azo}]_0 l \Delta\varepsilon}$  donne une estimation de la fraction d’azobenzène lié  $F_B(\text{azo})$  :

$$F_B(\text{azo}) = \frac{[\text{azo}]_B}{[\text{azo}]_0} = \frac{\Delta Abs}{[\text{azo}]_0 l \Delta\varepsilon} \quad (3.3)$$

### 3.2.2.2 Effet du taux de modification hydrophobe des polymères : détermination d'une longueur de boucle critique

#### Résultats

La figure 3.4 représente l'évolution de  $F_B(\text{azo})$  en fonction de la concentration totale en tensio-actif dans le milieu obtenue pour différents polymères en présence de TX 100.

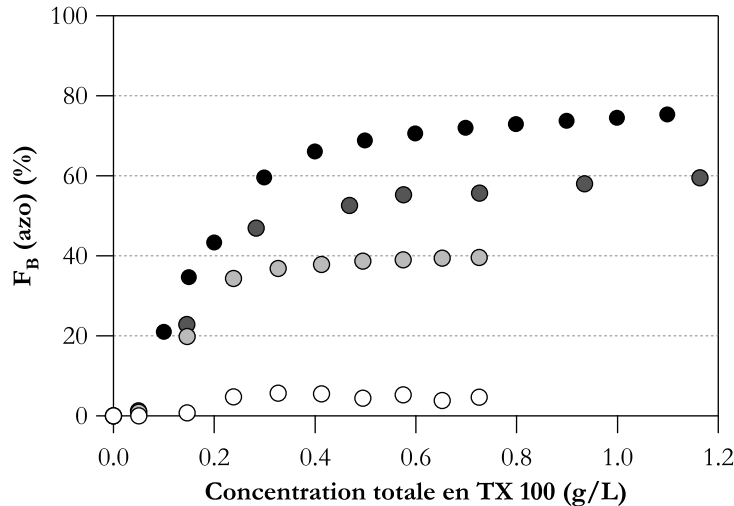


FIGURE 3.4 – Variation de la fraction d'azobenzène lié en fonction de la concentration en TX 100 obtenue d'après l'équation 3.3. (○) PAA\_1C6azo à 0.3 g.L<sup>-1</sup>, (◐) PAA\_2C6azo à 0.15 g.L<sup>-1</sup>, (◑) PAA\_3.5C6azo à 0.2 g.L<sup>-1</sup>, (●) PAA\_5C6azo à 0.2 g.L<sup>-1</sup>. L'erreur expérimentale est de l'ordre de la taille des symboles.

On distingue trois régimes :

- pour une concentration en tensio-actif en-dessous d'une concentration critique (environ 0.1 g.L<sup>-1</sup> pour le TX 100), aucune association n'est détectable;
- une fois cette concentration critique dépassée, on observe une augmentation brutale de la fraction d'azobenzènes liés, c'est le régime coopératif;
- enfin, pour les concentrations en tensio-actif les plus élevées, la courbe tend vers un plateau qui montre tout au plus une légère dérive, c'est le régime anti-coopératif.

La concentration critique en-dessous de laquelle il n'y a pas d'association polymère/tensio-actif correspond à la concentration micellaire critique (CMC) du TX 100 dans les conditions utilisées [Carnero Ruiz *et al.* 2001].

#### Estimation de la longueur de boucle critique

En accord avec le modèle de boucle présenté page 42, on observe une forte différence de comportement entre les polymères peu modifiés comme le PAA\_1C6azo, dont les groupes azobenzènes ne s'associent quasiment pas aux micelles, et les polymères plus modifiés, PAA\_2C6azo, PAA\_3.5C6azo et PAA\_5C6azo.

Ces derniers montrent une forte affinité pour les micelles, mais présentent tous des taux d'azobenzènes liés différents au plateau. Ceci peut être interprété dans le cadre de notre modèle en prenant en compte le côté aléatoire de la répartition des azobenzènes sur le squelette polymère. Lorsque deux azobenzènes successifs sur une chaîne sont séparés en moyenne par une longueur inférieure à  $l_C$ , ils se lient à une micelle. Un greffon azobenzène placé à une distance supérieure à  $l_C$  des ses voisins restera au contraire essentiellement libre. Cependant, la répartition aléatoire des motifs hydrophobes sur la chaîne implique l'existence d'une hétérogénéité des distances entre azobenzènes. On s'attend donc à une fraction d'azobenzènes liés inférieure à 100% et qui dépend du taux de modification du polymère  $x$ .

Il est possible de relier les paramètres  $l_C$ ,  $F_B(\text{azo})$  et  $x$  par une relation mathématique issue d'un calcul de probabilité. On considère une partie de la chaîne polymère constituée d'un groupe azobenzène d'où il émerge deux segments, un à droite et un gauche, de longueur  $l_C$ . Cet azobenzène va se lier si et seulement si l'un des deux segments comporte au moins un autre azobenzène. La fraction d'azobenzènes réellement liés s'exprime donc comme l'ensemble des possibles moins les distributions telles qu'un azobenzène soit entouré de deux segments de longueur  $l_C$  uniquement constitués de motifs acrylate de sodium.

$$F_B(\text{azo}) = 1 - P(0)^2 \quad (3.4)$$

avec  $P(0)$  la probabilité qu'un segment de longueur  $l_C$  soit constitué uniquement de motifs acrylate de sodium (sans azobenzène).  $P(0)$  s'exprime comme la probabilité d'avoir un motif acrylate de sodium à la puissance le nombre de motifs consécutifs voulus.

$$P(0) = (1 - x)^{l_C} \quad (3.5)$$

Au final, on obtient

$$F_B(\text{azo}) = 1 - (1 - x)^{2l_C}. \quad (3.6)$$

On peut déterminer  $l_C$  en ajustant les paramètres de l'équation 3.6 par rapport aux mesures de  $x$  et  $F_B(\text{azo})$ . Le résultat obtenu est représenté figure 3.5 pour une valeur de  $l_C = 10 \pm 2$  motifs en présence de TX 100.

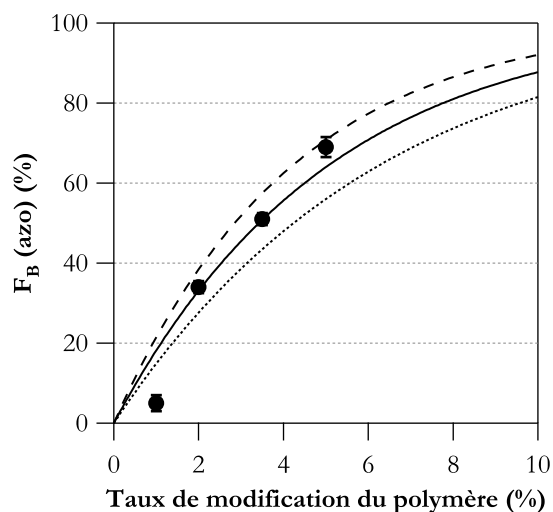


FIGURE 3.5 – Détermination de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA<sub>x</sub>C6azo/TX 100 sous lumière bleue. (●) valeurs expérimentales. Représentations de l'équation 3.6 avec pour paramètre (—)  $l_C = 10$ , (- - -)  $l_C = 8$  et (- · -)  $l_C = 12$ .

### 3.2.2.3 Effet de la force ionique et de la nature du tensio-actif

Les squelettes polymères sont sous forme anionique poly(acrylate de sodium) au pH de 9.1 utilisé, on s'attend donc à observer des effets de force ionique. Pour estimer l'impact des répulsions entre charges sur la formation des complexes, on a étudié la variation de la fraction d'azobenzènes liés en milieu tampon pH additionné ou non de NaCl. Les résultats sont reportés figure 3.6.

#### Cas du TX 100

L'expérience présentée sur la figure 3.6 de gauche a été effectuée pour un polymère modifié à 4% C6azo mais ayant un squelette de masse molaire plus petite,  $\overline{M}_n = 7\,500 \text{ g.mol}^{-1}$ , que les



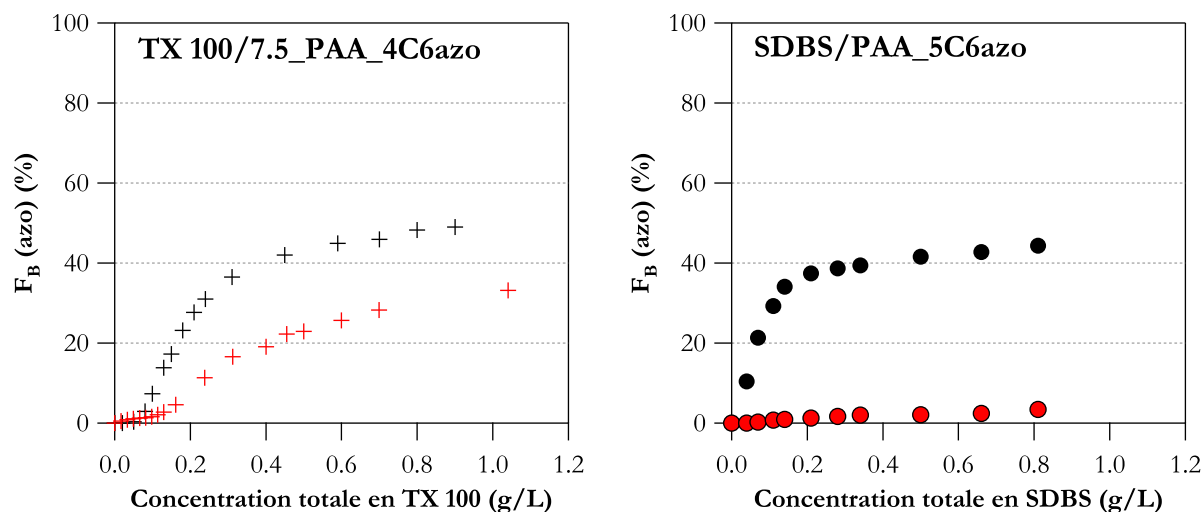


FIGURE 3.6 – Variation de la fraction d'azobenzène lié en fonction de la concentration en tensio-actif obtenue d'après l'équation 3.3. (à gauche) ajout de TX 100 dans une solution de 7.5\_PAA\_4C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  (à droite) ajout de SDBS dans une solution de PAA\_5C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$ . (Noir) Solution à  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de tampon borate pH 9.1 et (rouge) avec  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. L'erreur expérimentale est de l'ordre de la taille des symboles.

polymères étudiés au paragraphe précédent,  $\overline{Mn} = 42\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ . Lorsque la taille de la chaîne polymère diminue, on s'attend à un effet de dissociation des complexes polymère/micelles. Cet effet est bien observé ici car à l'intersection des deux régimes coopératifs et anti-coopératifs, le taux d'azobenzènes liés pour le 7.5\_PAA\_4C6azo est d'environ 40% contre 69% pour le PAA\_5C6azo. Les effets de longueur de chaîne ne seront pas discutés plus avant, on va se concentrer sur l'effet de la force ionique.

On observe figure 3.6 que le degré d'association est réduit quand on diminue la concentration en sel. Ceci est dû à l'augmentation de la portée des répulsions électrostatiques. Le polymère est alors plus rigide et la formation de boucles proches les unes des autres est défavorisée. Le paramètre force ionique a un impact important sur le taux d'azobenzènes liés qui peut être traduit en disant que  $l_C$  diminue quand la force ionique diminue.

### Cas du SDBS

Si l'on compare les fractions d'azobenzènes liés pour le polymère PAA\_5C6azo en présence de SDBS (figure 3.6 à droite) et de TX 100 (figure 3.4), on constate que  $F_B(\text{azo})$  est plus faible dans le cas de l'utilisation du SDBS. A faible force ionique, dans le tampon seul, on n'observe même aucune association.

Dans ce système, les chaînes de polymère et les micelles de SDBS sont fortement chargées négativement. Pour qu'il y ait association polymère/SDBS, il faut donc compenser cette répulsion électrostatique chaîne/micelle inexistante dans le cas polymère/TX 100. On peut traduire cet effet comme une diminution de la valeur absolue de  $\Delta G_{\text{azo}}$ , d'autant plus forte que la force ionique est faible. Il arrive donc un moment où la valeur de  $\Delta G_{\text{azo}}$  va être insuffisante pour compenser la perte d'énergie due à la formation de boucle. Il n'y a alors plus d'association forte polymère/micelle, comme c'est le cas dans le mélange PAA\_5C6azo/SDBS à faible force ionique.

#### 3.2.2.4 Effet de la nature du greffon : modulation du $\Delta G_{\text{azo}}$ de transfert

Par ailleurs, en modifiant la nature du greffon azobenzène, nous avons considéré l'effet de variation de l'hydrophobie qui doit avoir un impact sur la valeur du  $\Delta G_{\text{azo}}$  de transfert. La

figure 3.7 représente l'évolution de la fraction en azobenzènes liés en fonction de la concentration en TX 100 total dans le milieu pour des polymères portant un greffon C4azoC4.

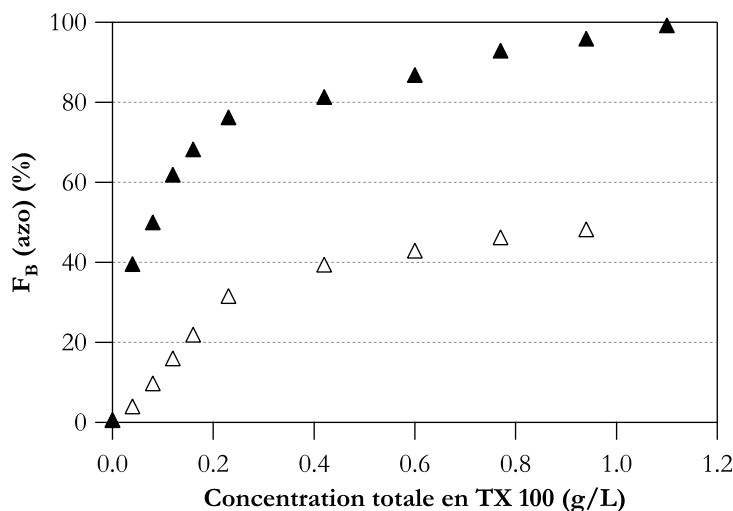


FIGURE 3.7 – Variation de la fraction en azobenzènes liés en fonction de la concentration en TX 100 obtenue d'après l'équation 3.3. (Δ) PAA\_1C4azoC4 à 0.5 g.L<sup>-1</sup>, (▲) PAA\_5C4azoC4 à 0.1 g.L<sup>-1</sup>. L'erreur expérimentale est de l'ordre de la taille des symboles.

Entre les figures 3.4 et 3.7, on remarque deux différences principales dues au changement de greffon.

1. La valeur de la fraction d'azobenzènes liés à saturation est plus élevée pour les polymères à chaînes latérales de type C4azoC4 que pour ceux en C6azo à taux de greffage similaire. A l'intersection du régime coopératif et du plateau terminal, le PAA\_1C4azoC4 a plus de 30% de ses azobenzènes liés contre moins de 5% pour le PAA\_1C6azo. Le PAA\_5C4azoC4 a quasiment 80% de ses greffons dans des micelles contre 69% seulement pour le PAA\_5C6azo. La chaîne latérale C4azoC4 est plus hydrophobe que celle en C6azo grâce à la présence de sa queue alkyle. Ceci entraîne une augmentation de l'affinité du greffon C4azoC4 pour les milieux hydrophobes qui peut se traduire par une augmentation de la valeur absolue du  $\Delta G_{azo}$ . On peut estimer l'ordre de grandeur de cette variation en utilisant les valeurs du logarithme du coefficient de partition des ces greffons sous forme amine entre l'eau et l'octanol. Le logiciel ChemDraw fournit les valeurs suivantes :  $\log(P)(C4azoC4) = 5.7$  et  $\log(P)(C6azo) = 3.7$ . La variation du  $\Delta G_{azo}$  entre les deux composés est alors d'environ  $3.5 RT$ . Avec  $\Delta G_{azo}(C4azoC4) \approx \Delta G_{azo}(C6azo) - 3.5 RT$ , la longueur de boucle critique nécessaire à l'association forte polymère/micelle doit augmenter quand on passe du greffon C6azo au greffon C4azoC4.

De même que précédemment, on peut estimer la valeur  $l_C$  en ajustant les paramètres de l'équation 3.6 suivant les valeurs expérimentales de  $x$  et  $F_B(azo)$ . Le résultat obtenu est représenté figure 3.8 pour une valeur de  $l_C = 19 \pm 3$  motifs en présence de TX 100. La valeur de  $l_C$  obtenue est peu précise compte-tenu du faible nombre de points expérimentaux. On peut cependant conclure que  $l_C(C4azoC4)$  est supérieur à  $l_C(C6azo)$ .

2. On remarque aussi qu'il y a association dès les premiers ajouts de tensio-actif et ce même pour des concentrations inférieures à la CMC. On peut émettre l'hypothèse d'une comicellisation du polymère et du tensio-actif. La CMC du mélange est alors abaissée par rapport à celle du tensio-actif seul. La formation de micelles mixtes riches en azobenzènes peut en effet se produire facilement avec le C4azoC4 dont la partie hydrophobe ne contient pas de segment polaire et présente une plus grande flexibilité que celle du C6azo.

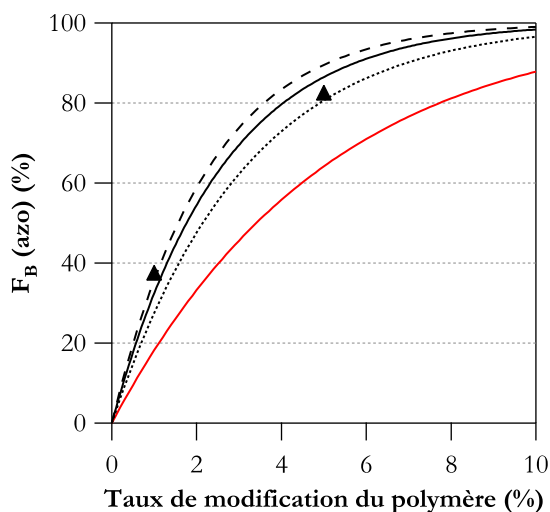


FIGURE 3.8 – Détermination de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA- $x$ C4azoC4/TX 100 sous lumière bleue. (▲) valeurs expérimentales. Représentations de l'équation 3.6 avec pour paramètre (—)  $l_C = 19.5$ , (- - -)  $l_C = 16$  et (· · ·)  $l_C = 22$ , (—)  $l_C = 10$ .

Ce point n'a pas été considéré plus avant dans cette thèse, mais la micellisation de composés azobenzènes de même nature est étudiée par le groupe d'Hatton. Leurs résultats montrent clairement que la rigidité de l'azobenzène joue un rôle sur la structure micellaire [Shang *et al.* 2006].

### 3.2.3 Fraction de tensio-actif lié : étude utilisant l'électrophorèse capillaire

Dans ce paragraphe, nous avons quantifié la fraction de tensio-actif lié au polymère en utilisant une technique séparative, l'électrophorèse capillaire. Cette étude complète les mesures de taux d'azobenzènes liés décrites à la section précédente. En déterminant d'une part la fraction d'azobenzènes liés et d'autre part le nombre de tensio-actifs liés par chaîne, on obtient une composition moyenne des assemblages hydrophobes formés. En particulier, on peut en déduire un ordre de grandeur du nombre de groupes azobenzènes liés par micelles afin de connaître les conditions permettant une maximisation de la réponse à l'irradiation UV/visible.

Les conditions d'analyse choisies correspondent au milieu dilué où les isothermes ne sont pas impactées par la dilution du polymère, c'est-à-dire que les complexes sont essentiellement constitués d'une chaîne polymère et de tensio-actifs liés, mais ne présentent pas d'amas multi-chaînes. Les résultats peuvent alors être analysés sous l'angle du modèle de formation de boucles enrobant une micelle.

#### 3.2.3.1 Méthode

##### Principe

Une description plus complète de cette méthode d'analyse est disponible en annexe B.2. Pour ne pas modifier l'état d'équilibre de la complexation, il faut éviter toute dilution ou dissociation au cours de l'analyse. Pour cela, nous avons employé une méthode d'analyse frontale utilisant une injection continue du mélange. Cette technique est appelée FACCE pour *Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis* [Gao *et al.* 1997]. Le mélange tensio-actif/polymère solubilisé dans l'électrolyte d'analyse est injecté en continu. Sous champ électrique, les analytes se séparent selon leur mobilité en formant en aval de la zone injectée des zones de compositions différentes. Il est ainsi possible de détecter autant de zones qu'il y a de composés dans le milieu.

La vitesse de déplacement des fronts de ces zones correspond à la mobilité apparente des espèces analysées.

Dans les mélanges polymère/tensio-actif, trois espèces sont en présence : le polymère libre, le tensio-actif libre et le complexe polymère/tensio-actif. Dans le cas de l'utilisation du TX 100, le tensio-actif est neutre alors que le polymère et les complexes sont chargés négativement. Le Triton libre se déplace donc à la vitesse électro-osmotique tandis que les espèces chargées migrent à une vitesse tenant compte du phénomène d'électromigration. Nous avons utilisé des conditions expérimentales permettant le ralentissement des analytes négatifs. En conséquence, on détecte en premier une zone contenant le tensio-actif libre, puis une zone contenant le complexe et une dernière contenant le polymère libre. L'injection du mélange étant faite en continu, ces zones sont détectées sous forme de plateaux successifs sur l'électrophérogramme.

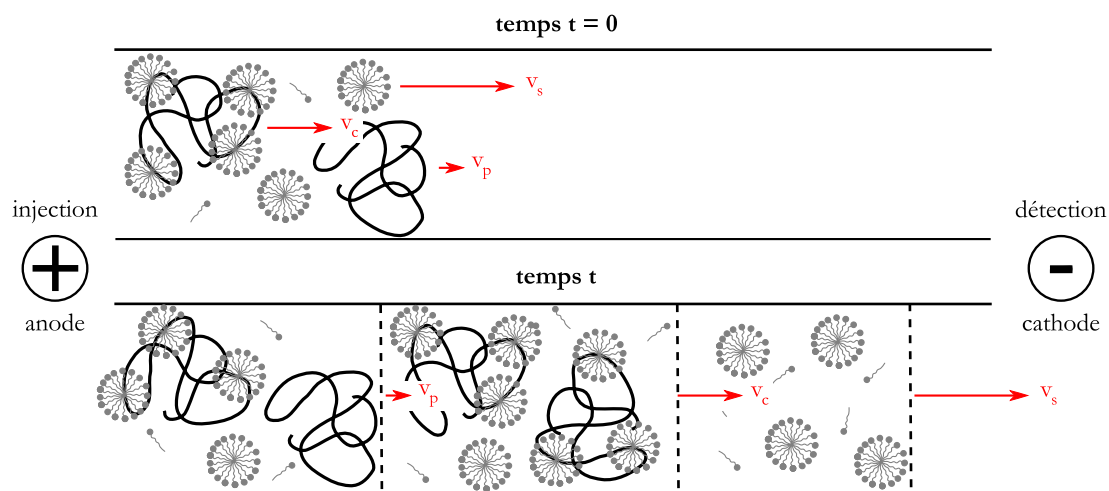


FIGURE 3.9 – Représentation schématique des zones de migration en FACCE pour un mélange polymère/TX 100.  $v_s$ ,  $v_c$  et  $v_p$  représentent respectivement les vitesses de migration du tensio-actif libre, du complexe et du polymère libre.

### Conditions opératoires

Les expériences ont été effectuées en utilisant un système P/ACE MDQ (Beckmann Instruments) équipé d'un détecteur UV-visible constitué d'une barrette de photodiodes permettant la détection des espèces à différentes longueurs d'ondes. Les capillaires utilisés sont de type silice fondue avec un diamètre interne de  $75 \mu\text{m}$  et une longueur de 31 cm. Avant chaque série d'expériences le capillaire est rincé sous pression par une solution de soude à  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , puis par l'électrolyte d'analyse. Afin de vérifier l'état de surface du capillaire, un composé neutre, l'oxyde de mésityle, est injecté régulièrement pour contrôler le temps d'électro-osmose.

Tous les composés sont détectables par leur absorbance en UV à la longueur d'onde de 220 nm. L'électrolyte d'analyse est un tampon borate de concentration  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  et de pH 9.1 qui peut, selon les expériences, être additionné de chlorure de sodium à  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  afin d'augmenter la force ionique du milieu. Les mélanges polymère/tensio-actif à analyser sont préparés dans l'électrolyte, puis laissé à relaxer une nuit dans le noir afin de maximiser la quantité d'azobenzène trans.

Un étalonnage est réalisé pour chaque série d'expériences afin de pouvoir convertir la hauteur des plateaux obtenus sur les électrophérogrammes en concentration des espèces concernées.

### 3.2.3.2 Effet du taux de modification hydrophobe des polymères : estimation d'une longueur de boucle critique

#### Résultats

Sur la figure 3.10, sont représentés quelques électrophérogrammes obtenus pour le polymère PAA\_5C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  en présence de concentrations variables en TX 100. Le premier pic est un marqueur neutre, l'oxyde de mésityle dont le temps de migration correspond au temps d'électro-osmose, il est parfois injecté en début d'analyse afin de calibrer celle-ci. Après le marqueur, le premier plateau correspond aux espèces neutres. Le second plateau correspond au complexe polymère/tensio-actif. Sur les électrophérogrammes de la figure 3.10, on ne voit pas le plateau polymère seul car l'analyse a été stoppée avant sa détection.

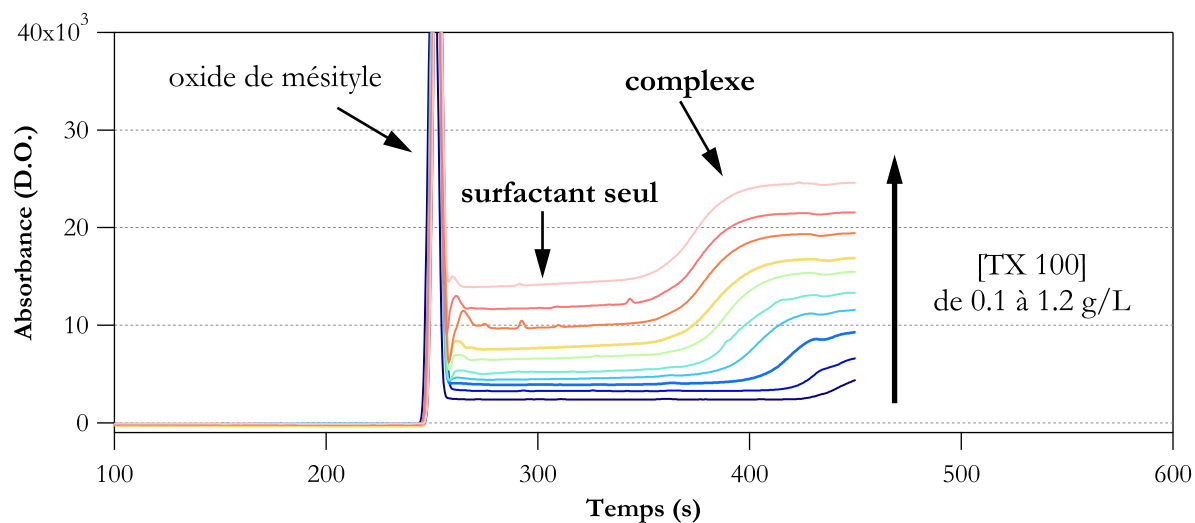


FIGURE 3.10 – Electrophérogrammes des mélanges TX 100/PAA\_5C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  avec des concentrations en tensio-actif de  $0.1$  à  $1.2 \text{ g.L}^{-1}$  en tampon borate  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$   $\text{pH}=9.1$ .

Connaissant la concentration totale de Triton introduite lors de la préparation des échantillons, on en déduit la concentration de tensio-actif lié. On peut alors tracer les isothermes d'association correspondantes.

Sur les isothermes représentées figure 3.11, on distingue trois régimes d'association :

- pas d'association en dessous de la CMC (ici à  $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ),
- une phase de forte association, typiquement entre CMC et  $2 \text{ CMC}$ ,
- un plateau ou une augmentation nettement plus faible pour les concentrations plus élevées en tensio-actif.

La dérive des valeurs dans le troisième régime des isothermes peut être interprétée comme la marque d'un équilibre d'association faible sur les segments des chaînes polymères peu modifiés. L'obtention d'une pente similaire pour des polymères de composition différente est cohérente avec cette hypothèse d'un équilibre d'association avec une constante  $K_{\text{assoc}}$  faible au delà du régime coopératif.

On trouve deux types de comportements en fonction du taux de modification hydrophobe des polymères. En dessous d'une valeur critique de  $x$ , pour 1% de modification, on observe très peu d'association alors que pour des valeurs supérieures à 2%, on observe une association forte. Les polymères présentant une association forte lient tous plus ou moins la même quantité de tensio-actif. On peut interpréter ce phénomène d'après le modèle de longueur critique de boucle.

#### Estimation d'une longueur de boucle critique

Pour estimer par calcul la valeur critique de longueur de boucle à partir des mesures de TX 100<sub>lié</sub>/polymère, nous avons considéré les approximations suivantes :

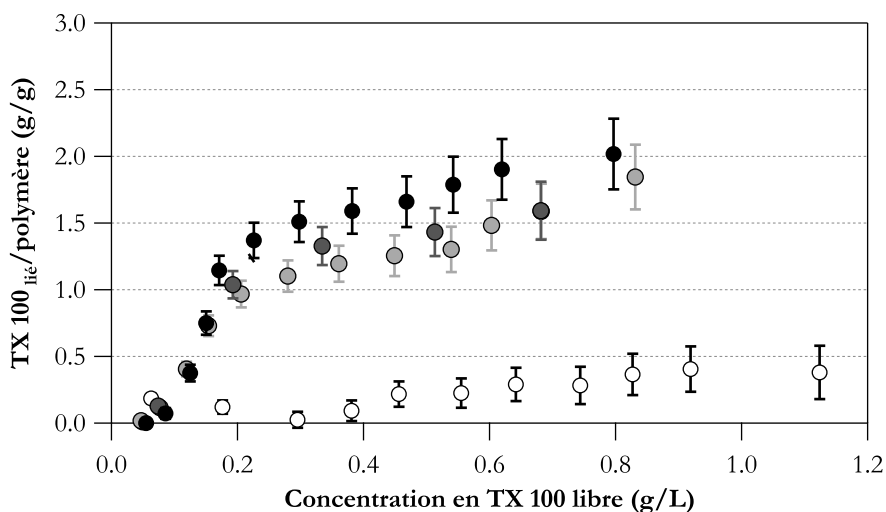


FIGURE 3.11 – Isothermes d’association du TX 100 avec les polymères modifiés C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  en présence de NaCl à  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans le noir. (○) PAA\_1C6azo, (◐) PAA\_2C6azo, (●) PAA\_3.5C6azo, (◑) PAA\_5C6azo.

1. Dans le régime coopératif, il se lie en moyenne une micelle par chaîne (*cf.* tableau 3.1 page 58). On simplifiera l’analyse en négligeant la polydispersité de composition des complexes. Ainsi, dans le modèle, on ne considère que des micelles libres ou liées à une chaîne. La quantité de tensio-actif lié par polymère est proportionnelle à la fraction de polymère liée moyennant une constante  $k$  qui ne dépend alors que de la masse molaire de la chaîne et de celle de la micelle. On fait l’hypothèse que les micelles liées et les micelles libres diffèrent peu en terme de nombre d’agrégation.
2. Pour s’affranchir des effets d’affinité faible, responsables de la pente de l’isotherme dans le régime anti-coopératif, on prend la mesure de  $\text{TX } 100_{\text{lié}}/\text{polymère}$  à l’intersection des régimes coopératifs et anti-coopératifs.
3. Une chaîne se lie en présence d’un excès de micelles libres dès lors qu’elle peut former plusieurs boucles de longueur inférieure à  $l_C$ . Au regard des incertitudes de mesure, on ne perd pas beaucoup d’information à simplifier le calcul statistique du nombre de segments sous-critiques par chaîne. On choisit de faire l’approximation qu’une micelle se liera fortement dès lors qu’une chaîne possède au moins un segment sous-critique. On néglige ici l’existence d’une fraction des chaînes ayant des propriétés intermédiaires entre équilibre classique avec une constante  $K_{\text{assoc}}$  et association forte ”en fleur”.

La fraction de polymère lié  $F_B(\text{pol})$  peut alors s’exprimer en fonction de la longueur de boucle critique  $l_C$ . Divisons une chaîne polymère en  $N$  segments de  $l_C$  motifs commençant chacun par un azobenzène.  $N$  est le nombre moyen de groupes azobenzènes portés par la chaîne et s’écrit  $N = x \langle L \rangle$ , avec  $\langle L \rangle$  la longueur moyenne en nombre des chaînes. Pour qu’un segment soit libre, il faut qu’il ne porte aucun azobenzène. La probabilité d’avoir un segment non collant s’écrit :

$$P(\text{segment libre}) = (1 - x)^{l_C} \quad (3.7)$$

Pour qu’une chaîne de polymère soit libre, il faut qu’elle n’ait aucun segment collant. On peut donc écrire :

$$\begin{aligned} F_B(\text{pol}) &= 1 - F_F(\text{pol}) \\ &= 1 - P(\text{segment libre})^N \\ \frac{\text{TX } 100_{\text{lié}}}{\text{polymère}} &= k(1 - (1 - x)^{l_C \langle L \rangle x}) \end{aligned} \quad (3.8)$$

Si on admet que le polymère le plus modifié, ici le PAA\_5C6azo, lie 100% de ses chaînes,  $k$  prend pour valeur 1.4 g de TX 100 par g de polymère. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la valeur théorique de  $k$  de 1.48 g par g calculée pour une stoechiométrie de complexe d'une micelle par chaîne avec un polymère de  $\overline{Mn} = 42\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et une micelle de  $N_{agg} = 100$ . On peut alors déterminer  $l_C$  en ajustant les paramètres de l'équation 3.8 avec les valeurs expérimentales de  $x$  et de TX 100<sub>lié</sub>/polymère. Le résultat obtenu est représenté figure 3.12.

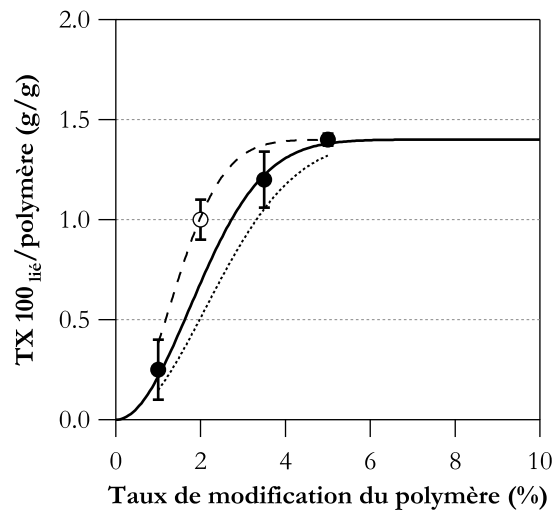


FIGURE 3.12 – Estimation de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA\_ $x$ C6azo/TX 100 dans le noir. Pour les polymères de longueur moyenne  $\langle L \rangle = 450$  motifs (●) valeurs expérimentales et représentations de l'équation 3.8 avec pour paramètre (—)  $l_C = 4$ , (- -)  $l_C = 2.5$  et (- · -)  $l_C = 7$ . Pour les polymères de longueur moyenne  $\langle L \rangle = 600$  motifs (○) valeurs expérimentales.

On retiendra comme ordre de grandeur  $l_C = 5 \pm 2$  motifs. En plus de l'incertitude due aux peu de points expérimentaux à notre disposition, l'estimation de  $l_C$  par cette méthode dépend de nombreux paramètres comme la stoechiométrie des complexes et les valeurs de  $k$  et  $\langle L \rangle$ . Leur effet sur la valeur de  $l_C$  est discuté en annexe C.1.

### 3.2.3.3 Effets de la force ionique et de la nature du greffon

Les paramètres force ionique et nature du greffon peuvent moduler l'association polymère/tensio-actif et donc la longueur de boucle critique.

#### Effet de la force ionique

L'effet de la force ionique sur l'association TX 100/PAA\_5C6azo est représenté figure 3.13. On observe que les deux courbes sont superposées à l'incertitude de mesure près. Contrairement au cas de la section précédente où la force ionique avait une influence sur la fraction d'azobenzènes liés aux micelles, ici elle intervient très peu sur la quantité de tensio-actif lié. Ceci est bien en accord avec l'hypothèse qu'une chaîne de polymère n'a besoin de se lier que par peu de boucles pour s'associer à la micelle. A partir de conditions pour lesquelles on atteint la liaison de toutes les chaînes, l'augmentation de la force ionique renforce cette association mais ne génère aucune modification de la stoechiométrie.

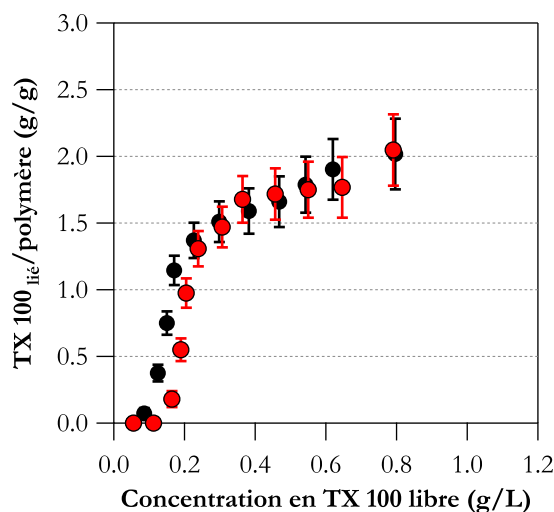


FIGURE 3.13 – Isothermes d’association tensio-actif/polymère dans le noir en fonction de la concentration TX 100 libre pour PAA\_5C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  en tampon borate  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  à pH 9.1 (●) avec  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, (●) sans sel.

### Effet de la nature du greffon

Comme observé précédemment sur les expériences de spectrophotométrie UV-visible (*cf.* p 49), le greffon C4azoC4 favorise la formation de complexes.

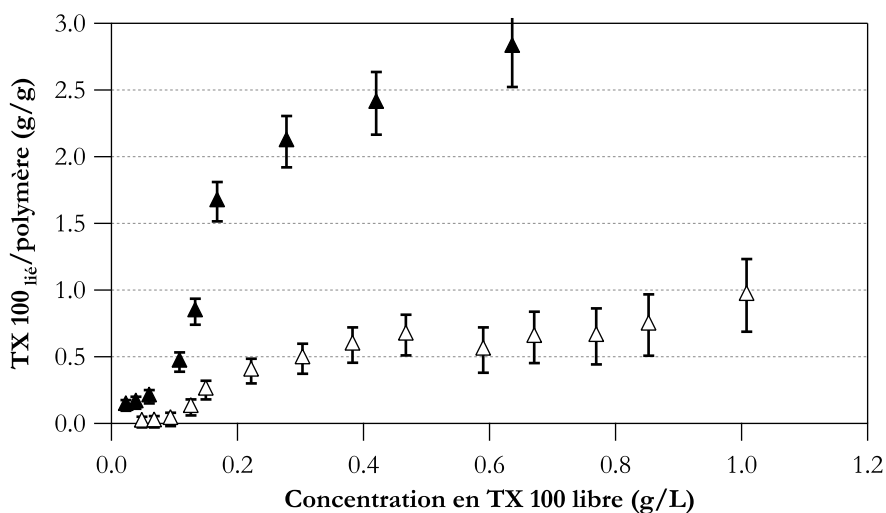


FIGURE 3.14 – Isothermes d’association du TX 100 avec les polymères modifiés C4azoC4 à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  en tampon borate  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH=9.1 avec  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl dans le noir. (Δ) PAA\_1C4azoC4, (▲) PAA\_5C4azoC4.

L’ajustement des paramètres de l’équation 3.8 avec les valeurs expérimentales de  $x$  et de TX 100<sub>lié</sub>/polymère, pour une valeur de  $k = 1.88 \text{ g}$  de TX 100 par g de polymère, donne ici une valeur de  $l_C = 11 \pm 3$  motifs. Cette valeur est plus élevée que celle obtenue par l’ajustement de la quantité de tensio-actif lié par les polymères modifiés C6azo.



### 3.2.4 Stœchiométrie des complexes

#### 3.2.4.1 Cas du SDBS

La figure 3.15 représente la quantité de SDBS lié par le PAA\_3.5C6azo en fonction de la concentration en SDBS libre. Cette courbe a été obtenue par des expériences de dialyse et non d'électrophorèse capillaire. En effet, le SDBS est un tensio-actif chargé négativement et sa mobilité est trop proche de celle du polymère pour obtenir une séparation efficace en électrophorèse. Nous avons donc changé de méthode séparative.

On commence par préparer une solution à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  de PAA\_3.5C6azo et  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  de SDBS dans  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. Cette solution est mise à dialyser contre 25 mL de solutions de SDBS à différentes concentrations ( $0-0.2 \text{ g.L}^{-1}$ ) dans  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl dans des membranes Spectra Por avec un seuil de coupure de  $6\,000 - 8\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ . Les solutions sont laissées à équilibrer pendant une semaine dans le noir. On détermine alors les concentrations en SDBS à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment de dialyse par spectrophométrie UV-visible (absorbance du SDBS à 224 nm). La différence de concentration en SDBS entre l'intérieur et l'extérieur est interprétée comme la quantité de tensio-actif liée au polymère.

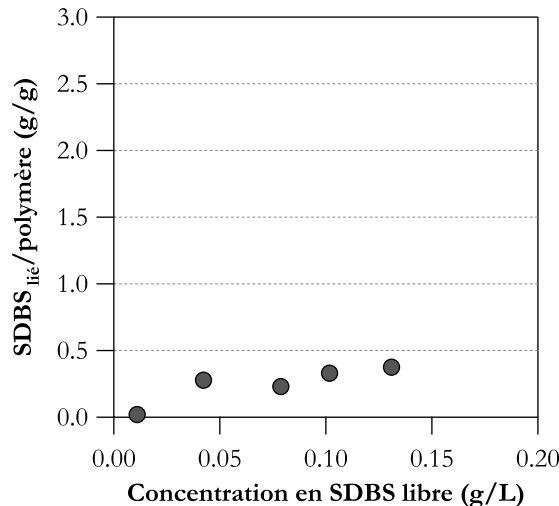


FIGURE 3.15 – Isotherme d'association de PAA\_3.5C6azo à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  dans le noir en fonction de la concentration en SDBS libre obtenue par dialyse.

L'isotherme obtenue ne donne aucune association à  $0.01 \text{ g.L}^{-1}$  de SDBS libre. Ceci est accord avec une valeur de CMC du SDBS dans  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de sel d'environ  $0.05 \text{ g.L}^{-1}$  (valeur obtenue par des mesures de tension de surface). Au delà de la CMC du SDBS, on observe une association polymère/tensio-actif d'environ 0.3 g de SDBS par gramme de PAA\_3.5C6azo, soit 37 molécules de SDBS par chaîne de polymère. Ceci correspond à la liaison d'environ une micelle par chaîne (le nombre d'agrégation de SDBS varie du simple au double, de 25 à 61, en fonction des conditions de concentration en sel et de mélange des isomères). A saturation en tensio-actif, le PAA\_3.5C6azo lie 35% de ses azobenzènes au SDBS, soit environ 6 azobenzènes par micelles.

#### 3.2.4.2 Cas du Triton

Les expériences de spectrophotométrie UV-visible (paragraphe 3.2.2) permettent d'estimer la fraction d'azobenzènes liés aux micelles de tensio-actif alors que les expériences d'électrophorèse capillaire (paragraphe 3.2.3) permettent d'estimer la quantité de tensio-actif lié au polymère. En combinant ces deux informations, on peut en déduire la composition moyenne des clusters hydrophobes formés, notée  $R$ .  $R$  représente le rapport molaire entre le nombre d'azobenzènes liés et le nombre de tensio-actifs liés. La valeur  $100 \times R$  est une bonne approximation du nombre

d'azobenzènes dans une micelle liée, en supposant que le nombre d'agrégation du tensio-actif reste de l'ordre de 100 [Magny *et al.* 1994].

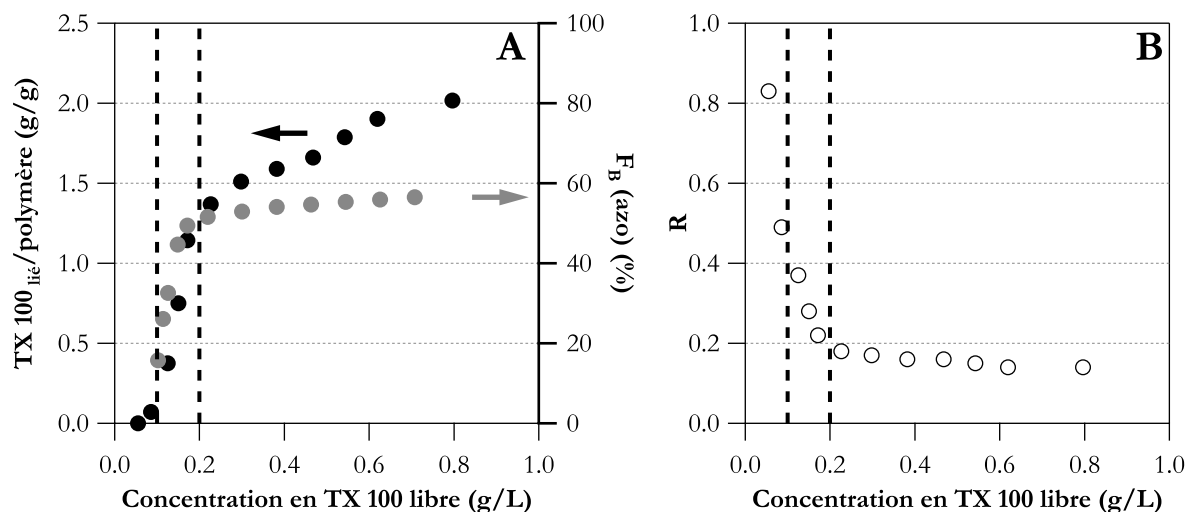


FIGURE 3.16 – (A) (●) Isotherme d'association et (●) fraction d'azobenzène liés pour un système PAA\_5C6azo/TX 100 en fonction de la concentration en TX 100 libre dans une solution avec  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de sel. (B) (○) Evolution de  $R$  pour le même système.

La figure 3.16 (A) est issue des figures 3.4 et 3.11. L'évolution de la fraction en azobenzènes liés,  $F_B(\text{azo})$ , pour le polymère PAA\_5C6azo a seulement été retracée en fonction de la concentration en TX 100 libre. On remarque alors que les trois régimes décrits séparément dans les deux études en spectrophotométrie et en électrophorèse sont parfaitement superposables.

- En dessous de la CMC, on est dans un régime "sans association".
- Pour des concentrations en tensio-actif comprises entre la CMC et  $2 \text{ CMC}$ , on observe une forte augmentation de la proportion d'azobenzènes liés et de la quantité de tensio-actif lié, soit un régime "d'association coopérative".
- Au delà de  $2 \text{ CMC}$ , la valeur de  $F_B(\text{azo})$  se stabilise alors que la quantité de tensio-actifs liés continue d'augmenter faiblement. On bascule dans un régime d'association "anti-coopérative".

La figure 3.16 (B) représente l'évolution de  $R$  en fonction de la concentration en TX 100 libre. Dans le régime d'association coopérative, la composition des clusters hydrophobes est très sensible à la variation de concentration en tensio-actif. Pour les premiers complexes formés,  $R$  vaut presque 1, soit autant d'azobenzènes que de tensio-actif, alors qu'à la fin du régime coopératif, il y a moins de 20 azobenzènes pour 100 tensio-actifs,  $R < 0.2$ . Dans le régime anti-coopératif, l'évolution de  $R$  avec la composition du milieu est beaucoup moins sensible.

Le tableau 3.1 résume la composition des complexes polymères/TX 100 en présence de sel pour un mélange situé à l'intersection des régimes coopératif et anti-coopératif et pour un mélange en excès de micelles, soit à une concentration de  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  en Triton libre (valeur choisie arbitrairement).

L'absence de différence de CMC et la présence d'une minorité de molécules azobenzènes par rapport au tensio-actif suggèrent une faible perturbation des micelles de TX 100 par les polymères. Dans l'hypothèse où le nombre d'agrégation n'est pas significativement modifié par l'association, on trouve environ une micelle liée par chaîne dans le régime d'excès de tensio-actif. Cette micelle comporte alors plusieurs groupes azobenzènes liés dont le nombre augmente avec le degré de modification du polymère (voir tableau 3.1).

En conclusion, on peut retenir de la complexation polymère/tensio-actif dans le noir que l'on obtient une transition brusque vers liaison quantitative. Cette transition est bien décrite par le

Nom du polymère	$\overline{Mn}$ ( g.mol <sup>-1</sup> )	$\frac{\text{nb azo}}{\text{chaîne}}$	$[\text{TX 100}]_{\text{libre}}$ ( g.L <sup>-1</sup> ) à l'intersection des régimes 2 et 3
PAA_1C6azo	42 000	4	0.18
PAA_2C6azo	60 000	13	0.21
PAA_3.5C6azo	42 000	16	0.19
PAA_5C6azo	42 000	22	0.19
PAA_1C4azoC4	32 000	3	0.20
PAA_5C4azoC4	32 000	17	0.17

Nom du polymère	Intersection des régimes coopératif et anti-coopératif			Excès de micelles $[\text{TX 100}]_{\text{libre}} = 0.5 \text{ g.L}^{-1}$		
	$\frac{\text{nb TA}}{\text{chaîne}}$	%azo <sub>B</sub>	$100 \times R$	$\frac{\text{nb TA}}{\text{chaîne}}$	%azo <sub>B</sub>	$100 \times R$
PAA_1C6azo	8	3%	2	14	4%	1
PAA_2C6azo	93	34%	6	130	39%	5
PAA_3.5C6azo	65	51%	12	91	56%	10
PAA_5C6azo	91	69%	17	117	75%	14
PAA_1C4azoC4	19	37%	7	30	42%	5
PAA_5C4azoC4	82	82%	17	124	98%	13

TABLE 3.1 – Composition des complexes polymères/TX 100 en présence de sel.  $\frac{\text{nb azo}}{\text{chaîne}}$  = nombre de greffons azobenzènes par chaîne de polymère,  $\frac{\text{nb TA}}{\text{chaîne}}$  = nombre de tensio-actifs liés par chaîne de polymère, %azo<sub>B</sub> = pourcentage d'azobenzènes liés et  $R$  = rapport molaire entre le nombre d'azobenzènes liés et le nombre de tensio-actifs liés.

modèle de boucle avec pour seul paramètre le taux d'hydrophobie critique, en dessous duquel un segment de polymère n'a qu'une affinité faible pour le tensio-actif.

### 3.2.5 Effet de la lumière

D'après le modèle d'association dans le noir décrit dans les sections précédentes, on s'attend à obtenir un effet de lumière si on franchit le seuil d'hydrophobie critique lors du basculement de 80% des azo en forme cis. C'est ce que nous allons montrer dans ce paragraphe, en nous intéressant à la faisabilité de cette photo-réponse ainsi qu'aux paramètres expérimentaux qui peuvent la moduler.

#### 3.2.5.1 Principe

En simplifiant à l'extrême, on peut supposer que la valeur de  $\Delta G_{\text{azo}}(\text{cis})$  n'est pas suffisante pour compenser la formation de boucles sur la chaîne polymère. L'irradiation en lumière UV d'un polymère change alors sa composition. On passe d'un polymère modifié à  $x\%$  à un polymère modifié à  $0.2 x\%$ . Si ce changement de taux de modification est suffisant pour faire passer le polymère en dessous de la composition critique, la lumière doit pouvoir détacher la totalité des micelles liées. On s'attend ainsi à l'existence d'une fenêtre de compositions du polymère permettant cette photo-réponse. Elle serait comprise entre les polymères trop peu modifiés pour former des complexes et ceux modifiés à des taux très supérieurs au taux critique, liant des micelles même avec 80% de leurs azobenzènes sous forme cis.

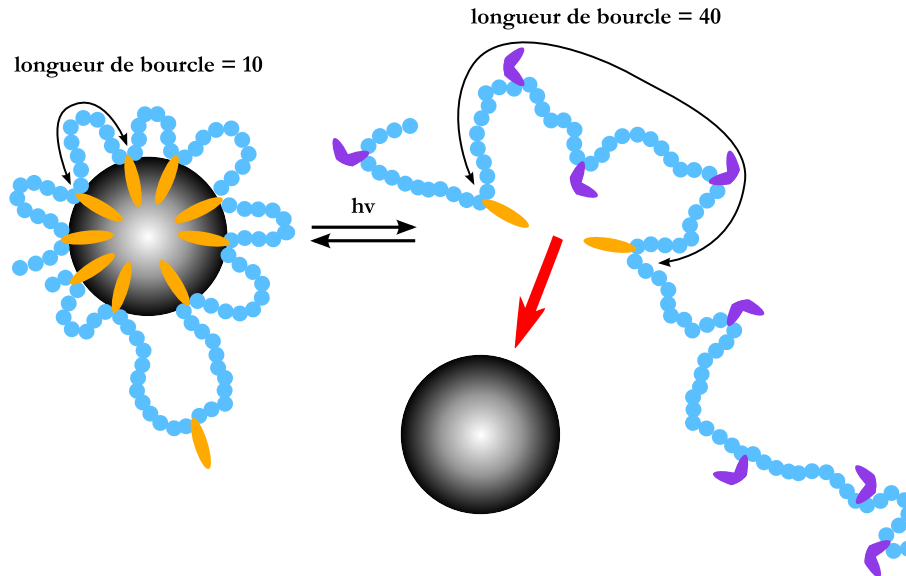


FIGURE 3.17 – Schéma illustrant le principe de la photo-dissociation des micelles.

### 3.2.5.2 Mise en évidence de la photo-dissociation

Dans un premier temps, on a observé la photo-stimulabilité des systèmes polymère/tensio-actif par diffusion de la lumière. Cette technique a l'avantage d'être utilisable sur tous les systèmes polymères/particules colloïdales, mais a aussi l'inconvénient de donner des résultats plus difficiles à relier à la composition des complexes.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière sur des mélanges polymère/tensio-actif ont permis de déterminer le rayon hydrodynamique des différentes espèces. Pour des concentrations en tensio-actif supérieures à la CMC, les micelles de TX 100 ont un rayon hydrodynamique d'environ 4 nm et les micelles de SDBS un rayon d'environ 3 nm. Tous les polymères issus de la modification d'un squelette poly(acide acrylique) par des greffons azobenzènes ont un rayon hydrodynamique moyen d'environ 20 nm. Cette valeur ne varie pas avec la lumière. Les distributions de taille obtenues pour les mélanges polymère/tensio-actif sont très proches de celles obtenues pour les polymères seuls et sont également invariantes avec la lumière. Les complexes polymère/tensio-actif sont donc des espèces de taille bien définie très proche d'une chaîne isolée de polymère.

La figure 3.18 représente les variations de l'intensité de lumière diffusée à  $140^\circ$  par des solutions de polymère à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  dans  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de sel en fonction de la concentration en tensio-actif et de l'exposition à la lumière. L'intensité de lumière diffusée par le mélange polymère/tensio-actif dans le noir est supérieure à la somme des intensités diffusées par les deux espèces seules en solution dans les mêmes conditions. Cette augmentation d'intensité n'étant pas accompagnée d'une élévation notable de taille des espèces en solution, on peut l'attribuer à l'augmentation de la masse molaire de ces espèces. Elle est donc caractéristique de l'apparition des complexes polymère/tensio-actifs.

On observe donc que les complexes sont formés dans les mélanges polymères/tensio-actif dans le noir, dissociés après irradiation UV puis reformés après irradiation bleue et ce pour les deux tensio-actifs utilisés, TX 100 et SDBS. La formation/dissociation des complexes en fonction de l'irradiation est parfaitement réversible. Cette alternance d'irradiation UV/bleu est répétable environ une dizaine de fois sans que l'on observe d'altération du système.

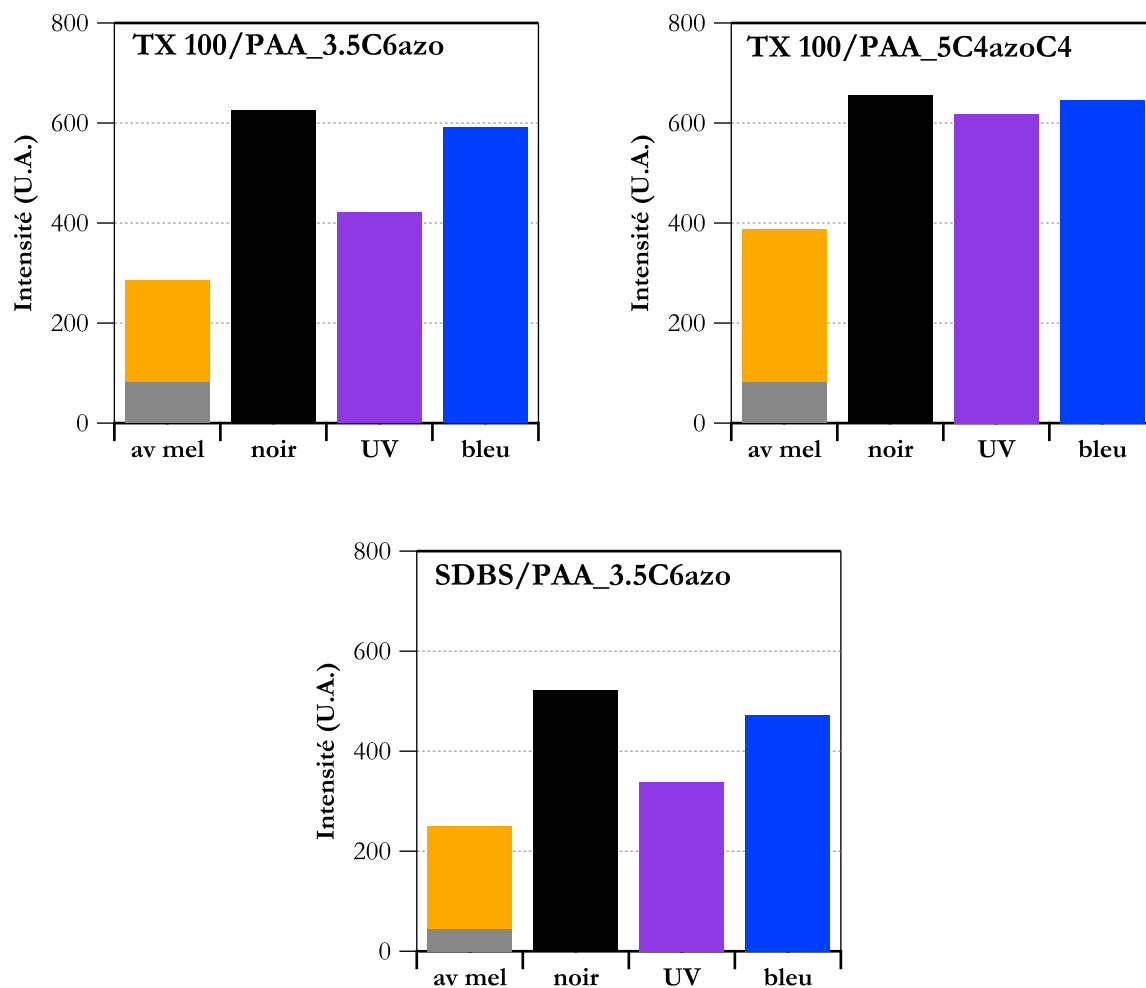


FIGURE 3.18 – Effet de l’irradiation sur l’intensité de lumière diffusée par une solution de tensio-actif à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  et de polymère à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  en présence de  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. (av mel) Avant mélange, tensio-actif seul en bas (gris) et polymère seul au-dessus (orange), (noir) mélange conservé 24 h dans l’obscurité, (UV) après irradiation de l’échantillon pendant 20 min à 365 nm, (bleu) après irradiation de l’échantillon pendant 20 min à 436 nm.

### 3.2.5.3 Les limites de la photo-dissociation

Sur la figure 3.18, on remarque que l’intensité diffusée par les mélanges sous irradiation UV est souvent un peu plus élevée que la somme des intensités du polymère et du tensio-actif seuls en solution. Cela laisse à penser qu’il y a une association résiduelle sous irradiation UV. Afin d’obtenir des résultats plus quantitatifs, les mêmes expériences d’électrophorèse capillaire que celles réalisées dans l’obscurité ont été conduites sur des échantillons préalablement irradiés sous UV. Typiquement, un échantillon analysé dans le noir est ensuite irradié à 365 nm pendant 20 min puis réanalysé immédiatement. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 3.19.

Dans la majorité des cas, on observe une dissociation des complexes pour une large gamme de compositions même s’il existe une association résiduelle non négligeable sous irradiation UV.

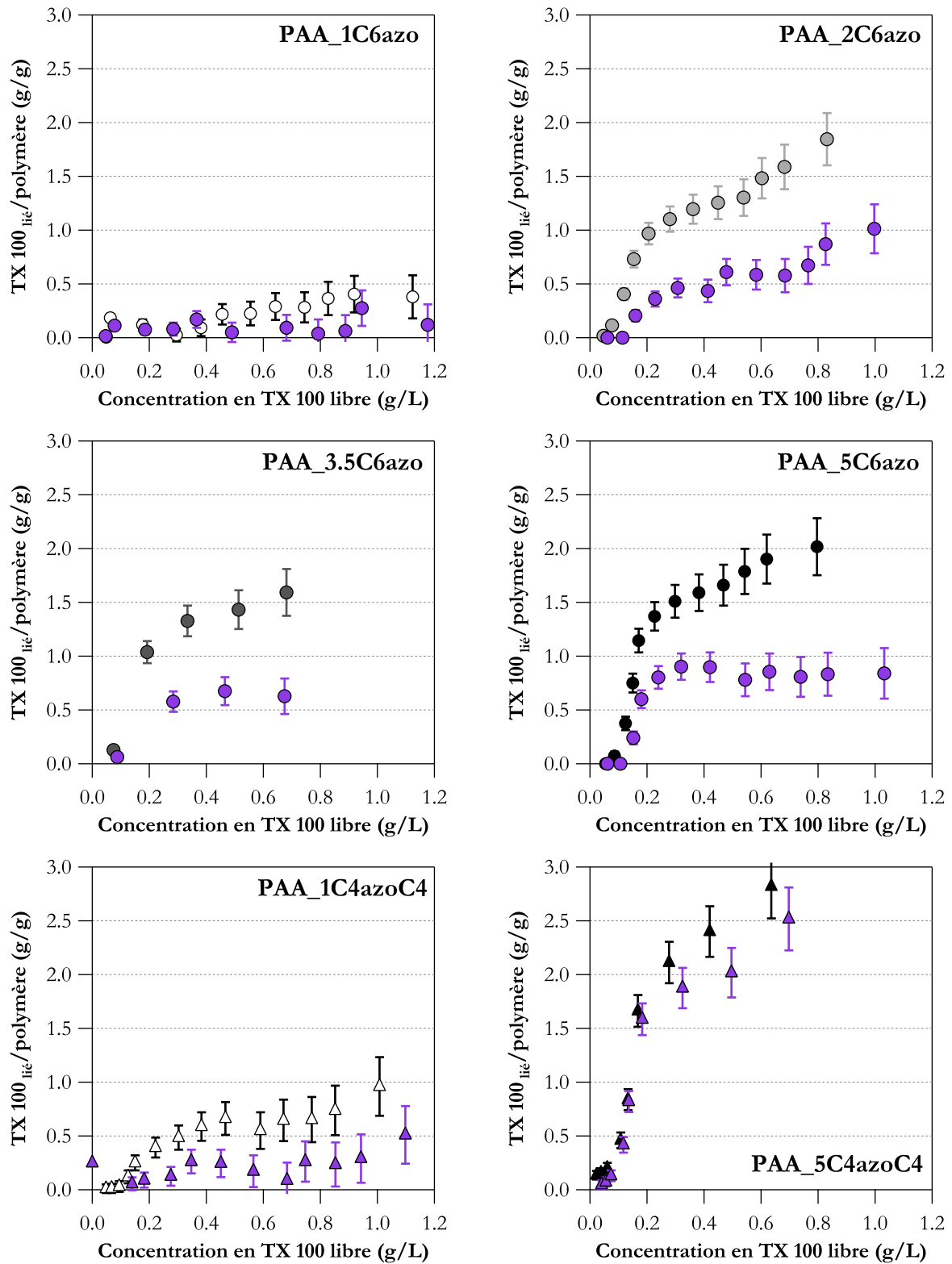


FIGURE 3.19 – Effet de l’irradiation sur les isothermes d’association TX 100/polymère pour des solutions contenant  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  de polymère et  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de sel. (noir) dans le noir (violet) après 20 min d’irradiation à 365 nm.

### Association persistante sous irradiation UV

Si le principe simple présenté au paragraphe 3.2.5.1 était applicable, après irradiation UV, tous les polymères auraient des taux de modification équivalents à  $0.2x$  et donc inférieurs à 1%. Or on a montré au cours de ce chapitre (figure 3.4 et 3.11) qu'un taux de modification de 1% est en deçà du taux de modification critique. On ne devrait donc observer aucune association significative pour les échantillons sous lumière UV. La figure 3.19 montre clairement que ce n'est pas le cas. L'hypothèse qui consiste à dire que les azobenzènes sous forme cis ne participent pas à l'association aux micelles est donc trop simpliste. Il faut envisager l'existence d'une longueur de boucle critique pour les systèmes sous irradiation UV correspondant à un  $\Delta G_{\text{azo}}(\text{UV})$  suffisamment élevé pour favoriser l'association.

D'après les valeurs expérimentales de TX 100<sub>lié</sub>/polymère obtenues pour les échantillons irradiés en UV, on peut déterminer une longueur de boucle critique en utilisant l'équation 3.8. Les courbes et les valeurs obtenues sont présentées dans la figure 3.20 et le tableau 3.2.

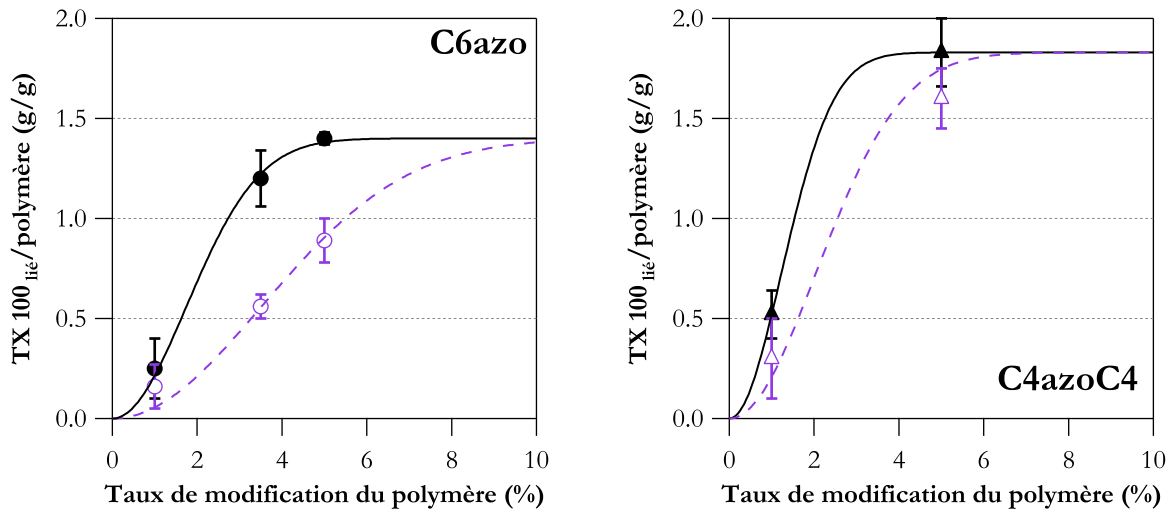


FIGURE 3.20 – Détermination de la longueur de boucle critique pour les différents greffons sous irradiation UV. (C6azo) polymères de longueur moyenne  $\langle L \rangle = 450$  motifs, dans le noir (●) valeurs expérimentales et (—) représentation de l'équation 3.8, sous irradiation UV (○) valeurs expérimentales et (---) représentation de l'équation 3.8. (C4azoC4) polymères de longueur moyenne  $\langle L \rangle = 300$  motifs, dans le noir (▲) valeurs expérimentales et (—) représentation de l'équation 3.8, sous irradiation UV (△) valeurs expérimentales et (---) représentation de l'équation 3.8.

Nom du greffon	$l_C$ dans le noir	$l_C$ sous irradiation UV
C6azo	$5 \pm 2$	$1 \pm 0.2$
C4azoC4	$11 \pm 3$	$4 \pm 2$

TABLE 3.2 – Valeurs de la longueur de boucle critique obtenues à partir des mesures de quantité de micelles liées pour les différents greffons.

On obtient des valeurs telles que  $l_C(\text{noir}) > l_C(\text{UV})$ , ce qui confirme que l'on a bien une diminution du  $\Delta G_{\text{azo}}$  sous irradiation UV. Cet effet est bien visible dans le cas des polymères modifiés C6azo où l'on peut constater une forte diminution de quantité de tensio-actif lié pour des polymères ayant un taux de modification compris entre 2 et 5%. Sous illumination UV, on arrive à la conclusion qu'il faut une diade de cis-C6azo pour permettre l'association forte, on atteint donc l'effet maximal possible décrit par le modèle ainsi que sa limite de cohérence.

En passant du C6azo au C4azoC4, il y a un décalage vers les boucles critiques plus longues, aussi bien pour la forme trans que pour la forme cis. La différence de longueur de boucle critique déterminée entre le trans-C4azoC4 et le cis-C4azoC4 ne permet pas une photo-dissociation des micelles aussi importante que dans le cas du greffon C6azo.

### Dissociation maximale en présence d'un excès de micelles

L'effet de photo-dissociation apparaît de manière importante dans le régime d'association anti-coopérative. On obtient une efficacité maximale de la réponse à la lumière en présence d'un excès de micelles, c'est-à-dire lorsque le nombre d'azobenzènes liés par micelle est petit de devant le nombre d'agrégation et donc qu'il y a seulement quelques boucles par micelles. Pour des mélanges avec  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  de TX 100 libre, on mesure 55% de dissociation pour le PAA\_2C6azo, 52% pour le PAA\_3.5C6azo, 56% pour le PAA\_5C6azo, 69% pour le PAA\_1C4azoC4 et 16% pour le PAA\_5C4azoC4.

### Energie mise en jeu par la photo-dissociation

Supposons que, malgré les longueurs de boucles assez faibles et la nature polyélectrolyte des polymères mises en jeu, on puisse utiliser l'expression suivante exprimant l'énergie de formation d'une boucle en fonction de sa longueur [Lairez *et al.* 1997].

$$\Delta G = k T \ln(l_C). \quad (3.9)$$

L'exposition UV induit alors une variation d'énergie libre de

$$\Delta G(UV) = k T \ln \left( \frac{l_C(UV)}{l_C(\text{Noir})} \right). \quad (3.10)$$

En utilisant les valeurs de longueur de boucle présentées dans le tableau 3.2, on trouve  $\Delta G(UV)$  de l'ordre de 1.6 kT dans le cas du C6azo et de 1 kT dans celui du C4azoC4. Avec en moyenne une dizaine d'azobenzènes et donc de boucles par micelle, on trouve une énergie de photo-dissociation d'environ 16 kT, soit  $9.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , pour le C6azo et environ 10 kT, soit  $5.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , pour le C4azoc4. C'est un ordre de grandeur tout à fait comparable à l'énergie de déstabilisation d'une protéine ( $\Delta G(\text{dépliement})$  compris entre 5 et 20  $\text{kcal.mol}^{-1}$  [Creighton 1992]).

## 3.3 Association avec les protéines natives

Il a été démontré dans le paragraphe précédent que les polymères modifiés azobenzènes peuvent s'associer de manière photostimulable avec des micelles de tensio-actif. Les forces régissant cette association sont les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques. Les premières sont modulées par la nature du greffon azobenzène, la conformation de l'azobenzène et l'hydrophobie du partenaire mis en jeu. Les secondes varient avec la force ionique du milieu et la charge du partenaire.

On s'attend à une complexité au moins aussi importante dans le cas des interactions avec les protéines qui présentent toute la panoplie des interactions ioniques, hydrophobes et liaison hydrogène. Selon la protéine et le polymère employé, il est ainsi envisageable que des complexes soient formés ou non avec les protéines natives. L'effet chaperonne visant au relargage final des protéines natives, il est intéressant de valider ces modèles d'étude permettant en principe la dissociation polymère protéine après repliement. Nous allons donc étudier la formation de complexes dans des mélanges polymère/protéine native sur trois exemples représentatifs de protéines globulaires basique, acide ou présentant des domaines hydrophobes accessibles. Les deux protéines peu hydrophobes sous forme native seront finalement retenues pour les études de renaturation (*cf.* chapitre 4 et 5).



### 3.3.1 Importance de la nature de la protéine

Les différentes protéines choisies pour cette étude sont l'albumine de sérum de bovin (BSA), la carbonique anhydrase de bovin (CAB) et le cytochrome C (Cyt C). Ce sont toutes de petites molécules globulaires hydrosolubles, de masse molaire comprise entre 12 000 et 66 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  avec un rayon hydrodynamique de quelques nanomètres. Leurs principales différences viennent de leur charge et de leur hydrophobie.

- La BSA et la CAB ont un point isoélectrique inférieur à 7 (tableau 3.3) et sont donc chargées négativement aux pH utilisés ( $\text{pH} = 7 - 9$ ) alors que le cytochrome C est chargé positivement.
- Contrairement à la CAB et au Cyt C, la BSA est connue pour avoir, même dans son état natif, une forte affinité pour les groupes hydrophobes [Peters Jr. 1996].

Protéine	Masse molaire ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Rayon hydrodynamique (nm) <sup>a</sup>	Point isoélectrique	Charge à pH 7 <sup>b</sup>
BSA	66 400 <sup>c</sup>	5.5	4.7 <sup>c</sup>	-15
CAB	30 000 <sup>d</sup>	2.7	5.85 <sup>f</sup>	-2
Cyt C	12 384 <sup>e</sup>	1.9	10.0-10.5 <sup>e</sup>	+9

TABLE 3.3 – Propriétés physicochimiques des protéines natives. <sup>a</sup> valeurs mesurées pour des solutions filtrées de protéines à  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en tampon phosphate pH 7, <sup>b</sup> valeurs issues d'un calcul à partir de la séquence en acides aminés [Toldo 1995] <sup>c</sup> [Peters Jr. 1996], <sup>d</sup> [Sigma-Aldrich a], <sup>e</sup> [Sigma-Aldrich b], <sup>f</sup> [Cleland et Wang 1990].

L'association protéine/polymère est étudiée par diffusion de la lumière. Pour chaque échantillon, on compare la somme des intensités diffusées par le polymère seul et la protéine seule à l'intensité diffusée par le mélange dans le noir, sous irradiation UV et sous irradiation bleue, comme représenté figure 3.21.

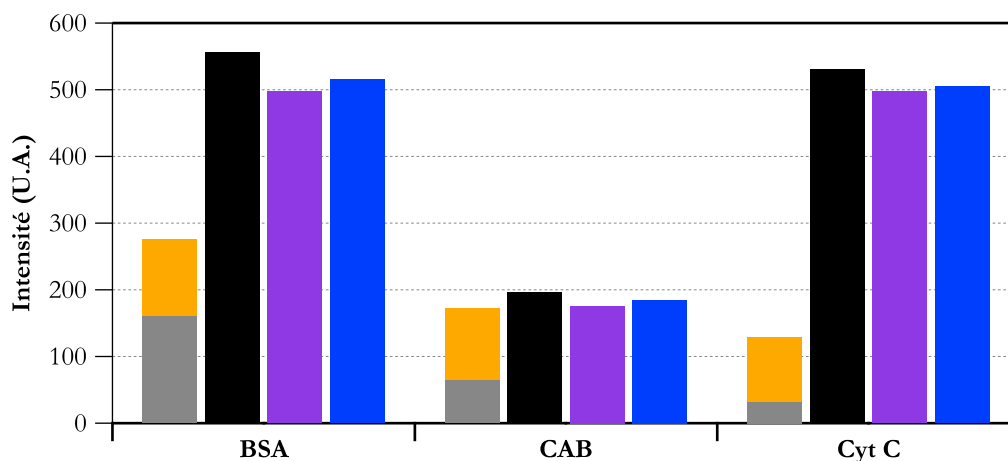


FIGURE 3.21 – Effet de l'irradiation sur l'intensité de lumière diffusée par une solution de protéine à  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  et de PAA\_3.5C6azo à  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en tampon phosphate  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  à pH 7. (gris) protéine seule avant mélange, (orange) polymère seul avant mélange, (noir) mélange conservé 24 h dans l'obscurité, (UV) après irradiation de l'échantillon pendant 20 min à 365 nm, (bleu) après irradiation de l'échantillon pendant 20 min à 436 nm.

De la même manière que précédemment (page 59), on attribue l'augmentation de l'intensité diffusée entre les produits seuls et le mélange à la formation de complexes. Afin de pouvoir comparer des échantillons contenant des protéines différentes et des polymères de différentes

compositions, on peut considérer plus en détail les paramètres jouant sur l'intensité diffusée. Pour les solutés de rayon très petit devant la longueur d'onde de la lumière d'analyse, l'intensité diffusée  $I$  est proportionnelle à la masse molaire  $M$ , à la concentration massique  $C$  et au carré de l'incrément d'indice de réfraction  $(\frac{dn}{dc})^2$ . Dans le cas des protéines, leur relative homogénéité de composition moyenne permet en général de négliger les différences d'incrément d'indice de réfraction entre deux protéines ( $(\frac{dn}{dc})(\text{protéine}) \approx 0.18 \text{ dL.g}^{-1}$ ). Par contre, ce paramètre est sensible à l'hydrophobie des polymères amphiphiles dérivés du PAA. Il peut varier jusqu'à un facteur de 1.3 entre le PAA ( $(\frac{dn}{dc}) \approx 0.14 \text{ dL.g}^{-1}$ ) et des macromolécules portant 70% de groupes hydrophobes ( $(\frac{dn}{dc}) \approx 0.19 \text{ dL.g}^{-1}$ ). Nous négligerons cette complexité pour les estimations ci-dessous qui ne visent pas à une mesure de masse molaire, mais simplement à estimer si le degré d'association des protéines est important ou non. En égalisant tous les  $(\frac{dn}{dc})^2$ , l'intensité diffusée varie en première approximation comme

$$I = \alpha(M_{\text{pol}} C_{\text{pol}} + M_{\text{prot}} C_{\text{prot}} + M_{\text{cplx}} C_{\text{cplx}}) \quad (3.11)$$

où  $\alpha$  est une constante.

On va estimer l'ordre de grandeur de la variation maximale d'intensité possible lors de la formation des complexes. Pour cela, nous allons supposer que la totalité des protéines s'associe avec des chaînes isolées de polymère et que la composition des complexes est relativement homogène. De ces hypothèses, on déduit qu'il n'y a ni polymères ni protéines libres dans le mélange donc  $C_{\text{prot}} = C_{\text{pol}} = 0 \text{ g.L}^{-1}$  et  $C_{\text{cplx}} = 1 + 1 = 2 \text{ g.L}^{-1}$ . Le nombre de complexes dans la solution étant égal au nombre de chaînes polymères, on a aussi  $M_{\text{cplx}} = 2M_{\text{pol}}$ . Au final, on obtient les variations d'intensité suivantes :

$$\frac{I(\text{mel})}{I(\text{pol})} = \frac{M_{\text{cplx}} C_{\text{cplx}}}{M_{\text{pol}} C_{\text{pol}}} = 4 \quad (3.12)$$

$$\frac{I(\text{mel})}{I(\text{prot})} = \frac{M_{\text{cplx}} C_{\text{cplx}}}{M_{\text{prot}} C_{\text{prot}}} = 4 \frac{M_{\text{pol}}}{M_{\text{prot}}} \quad (3.13)$$

	Valeurs expérimentales					Valeurs issues des équations 3.12 et 3.13	
	I(pol)	I(prot)	I(mel noir)	$\frac{I(\text{mel noir})}{I(\text{pol})}$	$\frac{I(\text{mel noir})}{I(\text{prot})}$	$\frac{I(\text{mel})}{I(\text{pol})}$	$\frac{I(\text{mel})}{I(\text{prot})}$
BSA	107	160	556	5	3	4	3
CAB	107	64	196	2	3	4	6
Cyt C	107	32	530	5	17	4	14

TABLE 3.4 – Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques de variation de l'intensité diffusée lors de l'association polymère/protéine pour différents mélange à  $1 \text{ g.L}^{-1}/1 \text{ g.L}^{-1}$ .  $I(\text{pol})$  = intensité diffusée par le polymère seul,  $I(\text{prot})$  = intensité diffusée par la protéine seule,  $I(\text{mel})$  = intensité diffusée par le mélange dans le noir.

Dans la fourchette d'incertitude de l'ordre de  $\pm 50\%$  liée à l'ignorance des incréments d'indice de réfraction, on trouve que les variations d'intensités mesurées pour la BSA et le Cyt C (*cf.* tableau 3.4) sont compatibles avec une complexation totale des protéines. La CAB, par contre, ne s'associe pratiquement pas au polymère. Ce résultat est cohérent avec les propriétés physicochimiques des différentes protéines. Le Cyt C chargé positivement s'associe fortement avec le polymère chargé négativement par interactions électrostatiques. Pour la BSA et la CAB chargées négativement, les interactions électrostatiques sont globalement répulsives, par contre la BSA présente des sites hydrophobes manifestement capables d'interagir avec les greffons azobenzènes du polymère. Les quelques complexes formés entre le polymères et la CAB sont probablement dus à de l'association hydrophobe. Cependant, ces interactions sont faibles car la CAB n'a pas

de poche hydrophobe et les azobenzènes ne peuvent interagir qu'avec quelques acides aminés hydrophobes. Il existe aussi des cas d'attraction coulombienne s'effectuant au voisinage du pI des protéines, quoique "du mauvais côté" de ce pI. En pratique, ces complexes électrostatiques ne subsistent généralement pas dans des solutions de force ionique supérieure à 150 mmol.L<sup>-1</sup> [Seyrek *et al.* 2003].

### 3.3.2 Photo-modulation des interactions hydrophobes

Lors des expériences de renaturation effectuées dans la suite de ce travail, le but est d'obtenir au final un système polymère/protéine native sans association. On cherche donc à tester l'efficacité dissociante de certains paramètres comme la lumière ou, dans le paragraphe suivant, la force ionique.

En ce qui concerne l'effet d'une exposition sous lumière UV, les résultats des différentes expériences réalisées sont résumés dans le tableau 3.5.

protéine/polymère ou tensio-actif/polymère	I(pol)	I(prot)	I(mel noir)	I(mel UV)	$R_{\text{dissocUV}}$
TX 100/PAA_3.5C6azo	107	83	626	422	49%
TX 100/PAA_1C4azoC4	119	83	302	209	94%
TX 100/PAA_5C4azoC4	284	83	644	619	9%
BSA/PAA_3.5C6azo	107	160	556	497	21%
BSA/PAA_1C4azoC4	119	160	467	393	34%
BSA/PAA_5C4azoC4	284	160	1405	1589	-18%
CAB/PAA_3.5C6azo	107	64	196	176	82%
CAB/PAA_1C4azoC4	119	64	204	174	77%
CAB/PAA_5C4azoC4	284	64	497	438	40%

TABLE 3.5 – Effet d'association et de dissociation sur différents mélanges polymère/protéine ou polymère/tensio-actif à 1 g.L<sup>-1</sup>/1 g.L<sup>-1</sup>. I(pol) = intensité diffusée par le polymère seul, I(prot) = intensité diffusée par la protéine seule, I(mel noir) = intensité diffusée par le mélange dans le noir, I(mel UV) = intensité diffusée par le mélange après irradiation pendant 20 min à 365 nm.

$R_{\text{dissocUV}}$  permet de caractériser l'effet de l'irradiation UV et s'exprime comme suit :

$$R_{\text{dissocUV}} = \frac{I(\text{mel noir}) - I(\text{mel UV})}{I(\text{mel noir}) - I(\text{pol}) - I(\text{prot})} \quad (3.14)$$

Globalement, on retrouve les tendances mises en évidence au paragraphe 3.2 avec les associations micelles/polymères : le taux de greffage et l'utilisation d'un greffon de type C4azoC4 par rapport à un greffon C6azo augmente l'association hydrophobe entre le polymère et son partenaire. Cela est bien visible sur la série d'expériences polymère/BSA où l'intensité de lumière diffusée par les complexes est élevée. De même, l'effet de la lumière est plus important pour les polymères PAA\_1C4azoC4 et PAA\_3.5C6azo que pour le PAA\_5C4azoC4.

L'important taux de dissociation UV observé pour la série polymère/CAB est due au fait que l'association est faible et donc sensible à tout changement. Par opposition, on observe une photo-dissociation incomplète dans le cas de l'utilisation de la BSA. Ceci est en accord avec une association plus forte et donc moins sensible à la lumière quel que soit le polymère.

### 3.3.3 Modulation des interactions électrostatiques

Le cas de l'association polymère/Cyt C est différent car régi par des interactions électrostatiques attractives. L'influence de la force ionique sur la formation des complexes a été testée. Les résultats sont présentés figure 3.22.

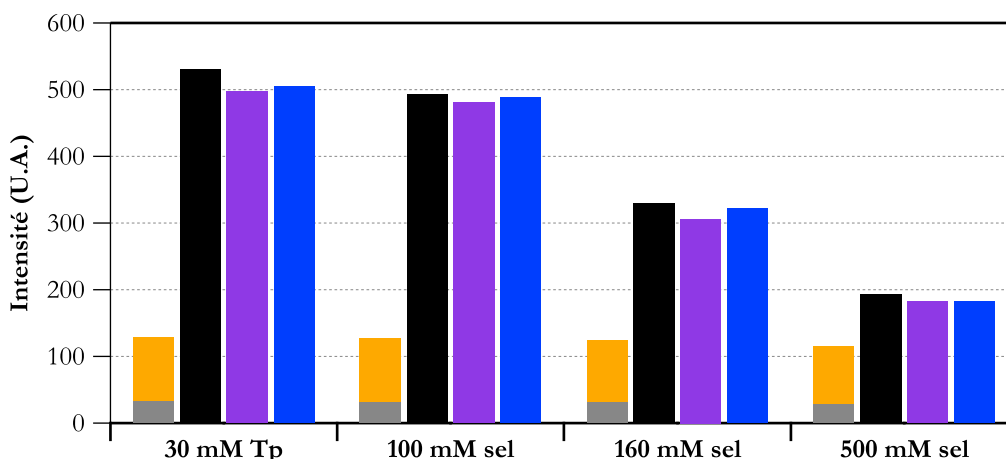


FIGURE 3.22 – Effet de l’irradiation et de la concentration en sel sur l’intensité de lumière diffusée par une solution de cytochrome C à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  et de PAA\_3.5C6azo à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  dans  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  de tampon phosphate pH=7. (30 mM Tp) en tampon seulement, avec en plus (100 mM sel)  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, (160 mM sel)  $160 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, (500 mM sel)  $500 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. (gris) protéine seule avant mélange et (orange) polymère seul avant mélange, (noir) mélange conservé 24 h dans l’obscurité, (UV) après irradiation de l’échantillon pendant 20 min à 365 nm, (bleu) après irradiation de l’échantillon pendant 20 min à 436 nm.

On observe, comme attendu, que plus la force ionique du milieu augmente, plus les interactions électrostatiques sont écrantées et moins il y a de complexes formés. Les interactions hydrophobes n’étant pas majoritaires, l’effet de l’irradiation UV est limité.  $R_{\text{dissocUV}}$  varie de 5% pour les faibles forces ioniques à 17% pour  $500 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl.

En conclusion de cette partie, on peut sélectionner les protéines CAB et Cyt C pour travailler sur les aspects renaturation, car on sait d’une part qu’elles forment des complexes avec les polymères modifiés azobenzènes et d’autre part que leur état natif est dissociable des polymères.

### 3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons répondu à plusieurs questions liées à la capacité de photostimulation des polymères modifiés azobenzènes dans des mélanges avec des micelles ou des protéines.

Premièrement, on a réussi à obtenir des systèmes micelle/polymère répondant à la lumière. Le modèle de boucle présenté en début de chapitre décrit bien nos résultats expérimentaux. Il permet en particulier d’expliquer pourquoi les polymères contenant un grand nombre d’azobenzènes (plus de 5%) forment des complexes qui répondent moins à la lumière. Pour obtenir une photostimulation efficace, il faut se positionner autour d’un taux de modification hydrophobe critique qui dépend de la nature du greffon azobenzène et se situe pour nos systèmes entre 1% et 3.5%. Dans les systèmes TX 100/polymère, le greffon C6azo a montré une plus grande efficacité de réponse à la lumière que le C4azoC4, trop hydrophobe même sous sa forme cis. Par ailleurs, une estimation des variations d’énergie libre de complexation mise en jeu par la photostimulation donne un ordre de grandeur comparable à l’énergie libre de repliement d’une protéine.

Deuxièmement, on a observé que les associations polymère/protéine native sont fortement dépendantes de la nature de la protéine. Les protéines CAB et Cyt C sont de bonnes candidates pour les tests de renaturation en présence de polymère car dans leur état natif, elles présentent une affinité pour les polymères modifiés azobenzènes qui est modulable par irradiation ou avec la force ionique.

Enfin, il ne sera pas possible de formuler des mélanges TX 100/polymère modifié C6azo ayant un effet photo-chaperonne artificielle. En effet, pour adapter la procédure de renaturation aidée par des tensio-actifs proposée par Gellman *et al.*, il faut pouvoir moduler l'assemblage des tensio-actifs, c'est-à-dire leur activité en solution. Or, nous avons montré que, dans tous les cas, la liaison polymère/tensio-actif n'intervient qu'au delà de la CMC et pas avant. Les polymères et l'irradiation n'ont ainsi pas d'effet significatif sur l'activité des tensio-actifs et ne pourront donc moduler leur action sur les protéines.

## Bibliographie

- [Carnero Ruiz *et al.* 2001] C. Carnero Ruiz, J. A. Molina-Bolivar, J. Aguiar, G. MacIsaac, S. Morozé and R. Palepu. *Thermodynamic and Structural Studies of Triton X-100 Micelles in Ethylene Glycol-Water Mixed Solvents*. Langmuir, vol. 17, no. 22, pages 6831–6840, October 2001.
- [Cleland et Wang 1990] J. L. Cleland and D. Wang. *Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase-B - Quasi-elastic light-scattering analysis*. Biochemistry, vol. 29, no. 50, pages 11072–11078, December 1990.
- [Creighton 1992] T. E. Creighton. *Proteins : Structures and molecular properties*. W. H. Freeman, second edition edition, August 1992.
- [Gao *et al.* 1997] J. Y. Gao, P. L. Dubin and B. B. Muhoberac. *Measurement of the Binding of Proteins to Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, vol. 69, no. 15, pages 2945–2951, 1997.
- [Khoukh *et al.* 2007] S. Khoukh, R. Oda, T. Labrot, P. Perrin and C. Tribet. *Light-Responsive Hydrophobic Association of Azobenzene-Modified Poly(acrylic acid) with Neutral Surfactants*. Langmuir, vol. 23, no. 1, pages 94–104, 2007.
- [Khoukh 2006] S. Khoukh. *Associations photostimulables entre polymère et tensio-actif et application à la conception d'émulsifiants : contrôle de la stabilité et de l'inversion d'émulsions par la lumière*. PhD thesis, Université Paris VI, 2006.
- [Lairez *et al.* 1997] D. Lairez, M. Adam, J.P. Carton and E. Raspaud. *Aggregation of Telechelic Triblock Copolymers : From Animals to Flowers*. Macromolecules, vol. 30, no. 22, pages 6798–6809, November 1997.
- [Le Maire *et al.* 2000] M. Le Maire, P. Champeil and J.V. Møller. *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. BBA-Biomembranes, vol. 1508, no. 1-2, pages 86–111, 2000.
- [Magny *et al.* 1994] B. Magny, I. Iliopoulos, R. Zana and R. Audebert. *Mixed Micelles Formed by Cationic Surfactants and Anionic Hydrophobically Modified Polyelectrolytes*. Langmuir, vol. 10, no. 9, pages 3180–3187, 1994.
- [Peters Jr. 1996] T. Peters Jr. *All about albumin : Biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic Press, 1996.
- [Seyrek *et al.* 2003] E. Seyrek, P. L. Dubin, C. Tribet and E. A. Gamble. *Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions*. Biomacromolecules, vol. 4, no. 2, pages 273–282, March 2003.
- [Shang *et al.* 2006] T. G. Shang, K. A. Smith and T. A. Hatton. *Self-Assembly of a Nonionic Photoresponsive Surfactant under Varying Irradiation Conditions : A Small-Angle Neutron Scattering and Cryo-TEM Study*. Langmuir, vol. 22, no. 4, pages 1436–1442, February 2006.
- [Sigma-Aldrich a] Sigma-Aldrich. *Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes*. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C3934|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C3934|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).

[Sigma-Aldrich b] Sigma-Aldrich. *Cytochrome C*. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/cytochrome-c.html>.

[Toldo 1995] Toldo. *EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service*, 1995. <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>.

## Chapitre 4

# Les polymères modifiés azobenzènes ont-ils un effet sur la stabilité de la protéine ?

## Etude d'une protéine modèle, le cytochrome C

### Sommaire

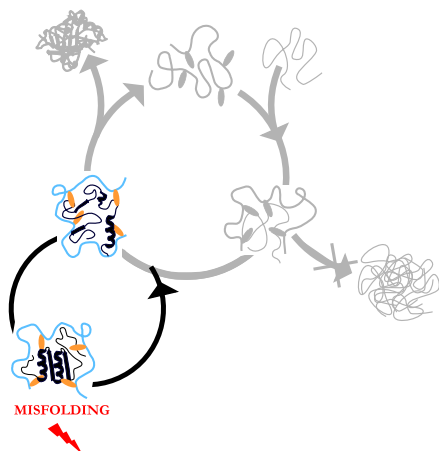
---

<b>4.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>72</b>
<b>4.2</b>	<b>Une protéine modèle, le cytochrome C</b>	<b>72</b>
4.2.1	Structure du cytochrome C	72
4.2.2	Techniques de suivi du repliement du cytochrome C	73
4.2.2.1	Préparation des solutions	73
4.2.2.2	La spectroscopie UV-Visible	74
4.2.2.3	La fluorescence	75
4.2.2.4	Le dichroïsme circulaire	76
4.2.3	Etude de l'équilibre entre état natif et état déplié	77
<b>4.3</b>	<b>Association et stabilisation de l'état déplié du cytochrome C par des polymères modifiés azobenzènes</b>	<b>79</b>
4.3.1	Précautions expérimentales	79
4.3.2	Résultats	80
<b>4.4</b>	<b>Modulation de l'effet des polymères modifiés azobenzènes</b>	<b>83</b>
4.4.1	Effet de la concentration en polymère	83
4.4.2	Effet de la force ionique	86
4.4.3	Effet de la lumière	87
<b>4.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>88</b>

---



## 4.1 Problématique



Dans ce chapitre, nous allons étudier les effets des polymères modifiés azobenzènes sur l'équilibre conformationnel d'une petite protéine soluble, le cytochrome C. Nous souhaitons en particulier répondre à la question : ces polymères ont-ils un effet sur la stabilité de la protéine lorsqu'ils s'associent avec elle? La réponse à cette question est fondamentale pour savoir si ces macromolécules ont ou non un potentiel de molécules chaperonnes.

Le cytochrome C a été choisi car c'est une protéine soluble et stable, aussi bien à l'état natif qu'à l'état dénaturé. L'étude de son repliement est décorrélée de toute problématique d'agrégation. C'est donc un modèle très utile pour mesurer l'impact d'additifs de repliement et en particulier leur effet déstabilisant.

Dans ce chapitre, on présente la structure du cytochrome C et les techniques permettant de suivre son repliement, puis l'effet des polymères modifiés azobenzènes sur la stabilité de cette protéine.

## 4.2 Une protéine modèle, le cytochrome C

Le cytochrome C est une petite hémoprotéine soluble qui joue un rôle essentiel dans la chaîne respiratoire de la cellule. Il transporte les électrons de la cytochrome C réductase (complexe III) à la cytochrome C oxydase (complexe IV) grâce à l'atome de fer de son hème, capable de passer de façon réversible d'un état d'oxydation Fe II à un état Fe III.

Pour des raisons de simplification des analyses, nous avons choisi de travailler sur le ferrocyclochrome C (cyt C à l'état réduit). En effet, il a été montré que son repliement est moins complexe et moins sensible à l'état de complexation du fer que celui du ferricytochrome C (cyt C à l'état oxydé) [Bhuyan et Udgaonkar 2001]. Dans ces conditions, il est possible de déterminer les paramètres thermodynamiques du système par une analyse selon un modèle à deux états en équilibre : protéine native, protéine dépliée.

### 4.2.1 Structure du cytochrome C

La structure cristalline du cytochrome C est connue depuis 1990 [Bushnell *et al.* 1990]. C'est une protéine de  $12\,384\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  composée d'une seule chaîne de 104 acides aminés et d'un hème [Sigma-Aldrich].

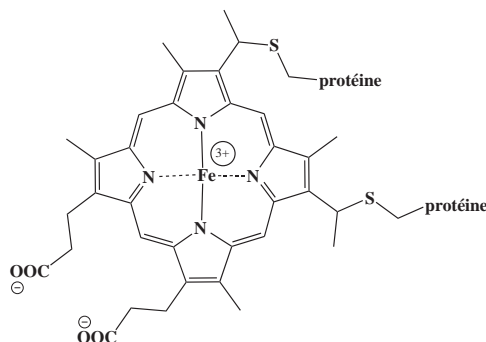


FIGURE 4.1 – Structure de l'hème du cytochrome C.

L'hème du cytochrome C est attaché de manière covalente à la chaîne par deux liaisons thioether avec les cystéines 14 et 17. Dans son état natif, l'atome de fer est complexé par les quatre azotes de la porphyrine et deux ligands axiaux, l'histidine 18 et la méthionine 80 [Jones *et al.* 1993].

Le cytochrome C a un point isoélectrique compris entre 10.0 et 10.5. Dans des conditions de travail à pH 7, il est donc chargé positivement. Les structures secondaires de cette protéine, représentées sur la figure 4.2, sont essentiellement des hélices  $\alpha$ .

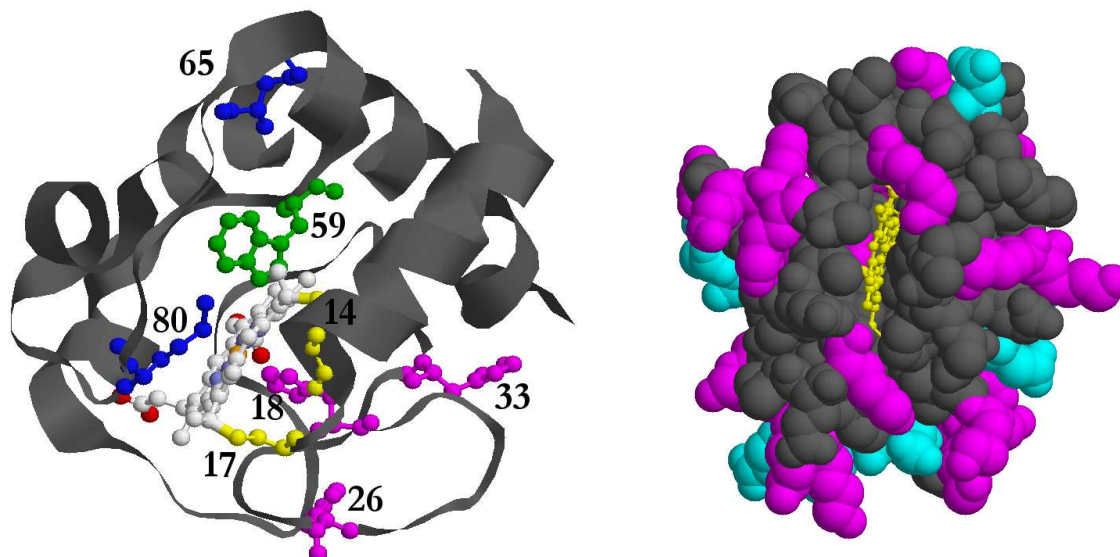


FIGURE 4.2 – Schéma de la structure du cytochrome C du cheval d'après la structure cristalline déterminée par Bushnell *et al.* A gauche, (bleu) les méthionines 65 et 80, (rose) les histidines 18, 26 et 33, (jaune) les cystéines 14 et 17 et (vert) le tryptophane 59. A droite, (jaune) l'hème, (rose) les acides aminés chargés positivement à pH 7 (arginine, histidine et lysine) et (turquoise) les acides aminés chargés négativement à pH 7 (aspartate et glutamate).

#### 4.2.2 Techniques de suivi du repliement du cytochrome C

Plusieurs techniques physico-chimiques permettent d'obtenir des informations sur la structure de la protéine en cours de repliement. C'est en particulier le cas de l'absorbance UV-visible, la fluorescence et le dichroïsme circulaire.

##### 4.2.2.1 Préparation des solutions

Le cytochrome C utilisé dans cette étude est de type IV et provient de cœur de cheval. Il a été acheté chez Sigma-Aldrich et est utilisé sans autre purification. Les échantillons sont préparés à partir de plusieurs solutions mères, conservées à 4 °C et renouvelées environ toutes les semaines :

- la solution de cytochrome C est réalisée dans l'eau à environ  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
- la solution de dénaturant, urée ou chlorure de guanidinium, est préparée à  $12 \text{ mol.L}^{-1}$ ,
- le tampon est réalisé à partir d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium de concentration  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  dont le pH est ajusté à 7 avec une solution de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,
- la solution de réducteur est préparée en dissolvant de la dithionite de sodium à  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon à  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Le pH de la solution est réajusté à 7 par ajout de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , puis la solution est dégazée 8 min sous argon. La solution de réducteur est re préparée tous les jours.

Les solutions à étudier sont préparées par mélange dans les proportions voulues de cytochrome C, tampon, réducteur et dénaturant. Elles sont ensuite dégazées pendant 8 min sous flux d'argon et laissées à reposer la nuit à température ambiante afin d'atteindre l'équilibre. Les concentrations

finale obtenues sont d'environ  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de cytochrome C,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de réducteur et  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de tampon.

On a choisi d'utiliser l'urée comme dénaturant au cours de cette thèse. Son pouvoir dénaturant est moins grand que celui du chlorure de guanidinium, mais elle a l'avantage d'être une molécule neutre. On souhaite en effet limiter les interactions dénaturant/polymère, or les polymères utilisés sont chargés négativement. La solubilité de l'urée dans l'eau étant de l'ordre de  $12 \text{ mol.L}^{-1}$ , la gamme de concentrations utilisée pour dénaturer le cytochrome C ira de 3 à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$ . La protéine n'est cependant pas complètement dénaturée à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée comme le montrent les figures 4.3, 4.4 et 4.5 des paragraphes suivants. Des échantillons de cytochrome C en présence de  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium ont ainsi été utilisés comme référence de l'état déplié de la protéine.

#### 4.2.2.2 La spectroscopie UV-Visible

De par la présence de son hème, le cytochrome C absorbe la lumière visible. Les spectres d'absorbance dépendent de l'état d'oxydation du fer et de sa complexation. Cette technique permet d'avoir une information sur l'environnement de l'hème.

Dans une solution de cytochrome C en équilibre avec l'air en tampon à pH 7, le fer est sous sa forme oxydée. Il en résulte deux bandes d'absorption dans la gamme 350 – 600 nm : la bande de Soret à 409 nm due à une transition ( $\pi - \pi^*$ ) de la porphyrine et la bande Q à 530 nm. Comme présenté sur la figure 4.3 A, l'ajout d'un réducteur dans le milieu, ici la dithionite de sodium, provoque une modification du spectre d'absorption. La bande de Soret est décalée vers les grandes longueurs d'onde jusqu'à 415 nm et la bande Q se divise en deux bandes à 520 et 550 nm. Cette modification d'absorbance est également visible à l'oeil nu, la solution de cytochrome C passant du orange au rose lors de l'ajout du réducteur. La bande à 550 nm servira de référence pour calculer la concentration en protéine ( $\varepsilon_{550} = 29\,500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  [Sigma-Aldrich]).

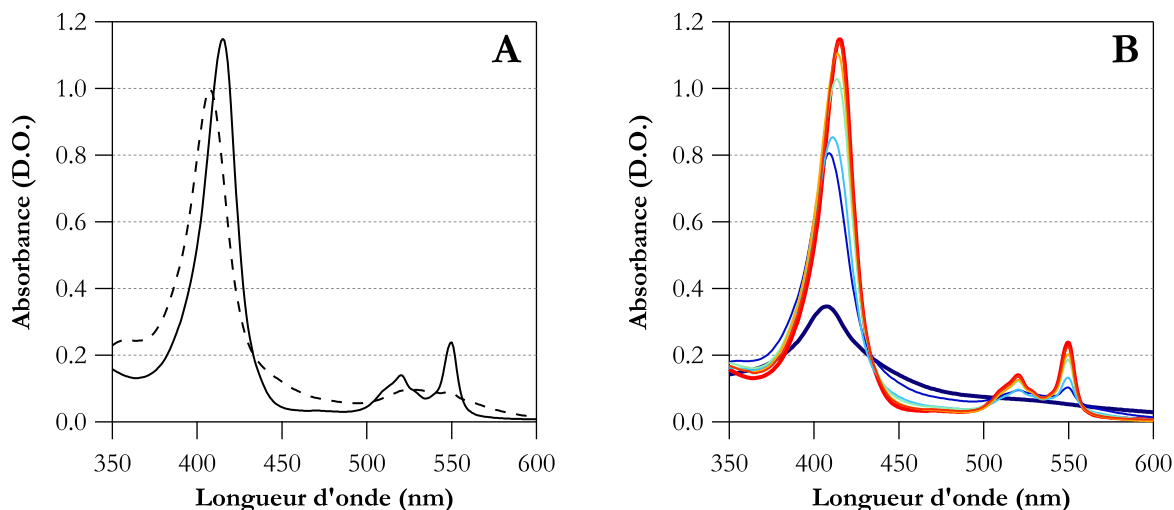


FIGURE 4.3 – Spectre d'absorption du cytochrome C à  $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ . (A) (—) à l'état oxydé (---) à l'état réduit. (B) Evolution des spectres d'absorbance du cytochrome C réduit avec l'augmentation de la concentration en dénaturant (rouge) cyt C natif, (de orange à bleu) concentration en urée croissante de 4 à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$ , (bleu foncé) en présence de  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium.

Lors de la dénaturation du cytochrome C réduit, on observe sur la figure 4.3 B une forte diminution de l'intensité des bandes Q et de Soret. On prendra comme caractéristique du repliement dans la région de l'hème l'évolution du signal d'absorbance à 415 nm. Cependant, l'absorbance de l'hème étant sensible à un très grand nombre de paramètres, il n'est pas facile

d'attribuer la cause de ces changements spectroscopiques à une modification structurale précise. Les explications suivantes sont les plus probables :

- le changement de coordination du fer a une influence sur le spectre UV-visible du cytochrome C. Or lors de la dénaturation de ce dernier, qu'il soit oxydé [Elove *et al.* 1994] ou réduit [Bhuyan et Udgaonkar 2001], le ligand méthionine 80 se dissocie et peut être remplacé par la méthionine 65 ou les histidines de la protéine ;
- la perte de l'ion fer est également une explication possible des modifications observées sur les spectres d'absorbance (perte d'intensité et léger décalage vers les faibles longueurs d'onde) [Vanderkooi *et al.* 1976; Zentko *et al.* 1999].

Nous avons également constaté que le choix du réducteur avait une importance. L'utilisation d'un thiol, le DDT, a entraîné la perte du signal UV-visible de l'hème. Nous avons donc changé de réducteur et utilisé la dithionite de sodium.

Un suivi de repliement par spectroscopie UV-visible a été effectué, mais étant donné la sensibilité de l'hème à toute perturbation, les données d'absorbance ne seront utilisées qu'en complément d'autres résultats. Elles serviront à confirmer les résultats obtenus par les techniques de fluorescence et de dichroïsme circulaire.

#### 4.2.2.3 La fluorescence

L'observation de la fluorescence des acides aminés aromatiques, en particulier des tryptophanes, est une méthode classique de suivi du repliement d'une protéine. Toutefois, le cas du cytochrome C est particulier. En effet, il ne comporte qu'un seul tryptophane situé en position 59 dont la fluorescence est quenchée à l'état natif par sa très grande proximité avec l'hème. Lors du dépliement, la chaîne de la protéine va s'étendre et la distance hème/tryptophane augmenter, diminuant ainsi l'extinction de fluorescence du tryptophane. Le regain de fluorescence est caractéristique de la perte de compacité de la protéine et donc de sa dénaturation.

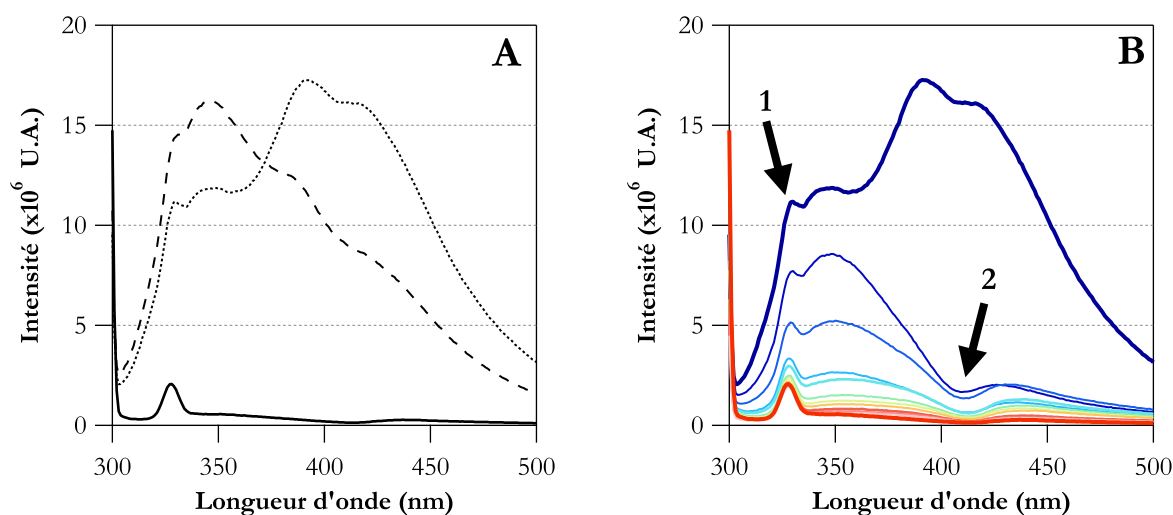


FIGURE 4.4 – Spectre d'émission de fluorescence du cytochrome C à  $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  avec une excitation à 295 nm. (A) (—) à l'état natif, ( $\cdots$  et  $- -$ ) à l'état dénaturé en présence de  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium. (B) Evolution des spectres de fluorescence du cytochrome C réduit avec l'augmentation de la concentration en dénaturant (rouge) cyt C natif, (de orange à bleu) concentration en urée croissante de 4 à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$ , (bleu foncé) en présence de  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium.

Les spectres d'émission de fluorescence représentés figure 4.4 montrent une très faible intensité dans le cas du cytochrome natif et une intensité qui augmente avec la dénaturation. L'épaulement à 330 nm (flèche 1 figure 4.4 B), présent sur tous les spectres, est dû une bande

de Stokes de l'eau. Les spectres du cytochrome C en présence d'urée (figure 4.4 B) semblent être composés de deux bandes de fluorescence, l'une à 350 nm et l'autre à 430 nm. En réalité, il n'y a qu'une seule bande très large due au tryptophane avec un maximum à 350 nm. Le minimum observé à 410 nm (flèche 2 figure 4.4 B) est dû à la forte absorption du milieu à cette même longueur d'onde [Löwenich et Kleinermanns 2007] (position de la bande de Soret). En effet, les photons émis par la fluorescence d'une protéine située à une extrémité de la cuve ont une forte probabilité d'être absorbés par l'hème d'une autre protéine présente sur leur chemin.

Les spectres du cytochrome C réduit en présence de guanidinium représentés en ligne pointillée et en tirets sur la figure 4.4 A sont représentatifs d'échantillons ayant la même composition mais préparés et analysés à quelques semaines d'intervalle. L'émission autour de 400 nm peut aléatoirement dominer ou s'avérer plus faible que celle à 350 nm. Il nous a été difficile de trouver une origine à ces fluctuations. Toutefois, on attribue le signal à 400 nm à la fluorescence de molécules de cytochrome C ayant perdu leur ion fer, appelées porphyrine-cytochrome C. En effet, une porphyrine excitée à 295 nm fluoresce vers 400 nm avec une faible intensité lorsqu'elle complexe un atome de fer [Löwenich et Kleinermanns 2007] et beaucoup plus intensément en son absence [Zentko *et al.* 1999]. Les deux échantillons en guanidinium sont caractéristiques de l'état déplié de la protéine, mais diffèrent par la proportion de population ayant conservé ou perdu l'ion fer. Cette fluorescence non reproductible ne provient pas de dégradations irréversibles car, dans tous les échantillons, une dilution du dénaturant restitue totalement les caractéristiques spectrales du cytochrome C natif.

Le suivi du repliement par fluorescence sera fait à la longueur d'onde du point fixe, soit 370 nm. Cela permet ainsi de s'affranchir des variations d'intensité dues à la présence ou non de métal dans l'état déplié de la protéine.

#### 4.2.2.4 Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique fondée sur l'interaction entre une lumière polarisée et un environnement chiral (voir l'annexe B.3 pour plus de précisions). Son utilisation dans la gamme de longueur d'onde 190 – 250 nm permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine.

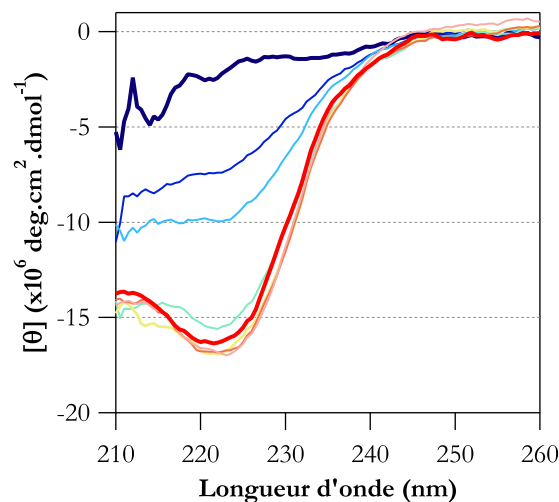


FIGURE 4.5 – Evolution des spectres de dichroïsme circulaire du cytochrome C à  $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  (**rouge**) cyt C natif, (de **orange** à **bleu**) concentration en urée croissante de 4 à 10  $\text{mol.L}^{-1}$ , (**bleu foncé**) en présence de 8  $\text{mol.L}^{-1}$  de guanidinium.

Le spectre de dichroïsme circulaire du cytochrome C natif, représenté en rouge sur la figure 4.5, présente un minimum vers 222 nm. C'est un indicateur du fait que les structures

secondaires de la protéine sont essentiellement composées d'hélices  $\alpha$ . Lorsque la protéine est dénaturée, le signal à 222 nm diminue suite à la perte des structures secondaires. On peut donc effectuer le suivi du repliement par dichroïsme circulaire à 222 nm.

### 4.2.3 Etude de l'équilibre entre état natif et état dépliée

Les transitions de repliement/dépliement de la protéine en présence d'urée ont été étudiées par les trois techniques spectroscopiques décrites ci-dessus. L'évolution des signaux d'absorbance à 415 nm, de fluorescence à 370 nm et de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée sont reportées figure 4.6. Afin de pouvoir superposer ces signaux, ils ont été normalisés suivant l'équation

$$\Sigma = \frac{S - S_N^0}{S_D^0 - S_N^0}, \quad (4.1)$$

où  $S$  représente l'intensité du signal de l'échantillon analysé,  $S_N^0$  l'intensité du signal pour la protéine native à 0 mol.L<sup>-1</sup> d'urée et  $S_D^0$  l'intensité du signal pour protéine dénaturée en 8 mol.L<sup>-1</sup> de guanidinium.

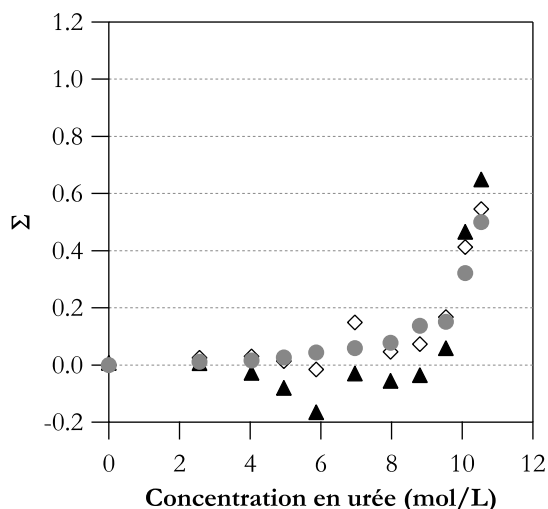


FIGURE 4.6 – Evolution des signaux normalisés (◇) d'absorbance à 415 nm, (●) de fluorescence à 370 nm et (▲) de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée.

Les courbes obtenues présentent une faible variation dans la gamme de concentration 0 – 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée, puis un saut brutal à 9 mol.L<sup>-1</sup>. Ce comportement classique est le même que celui obtenu lors de l'étude de la dénaturation à l'équilibre du ferrocyclochrome C par le chlorure de guanidinium comme décrit par A. Bhuyan *et al* [Bhuyan et Udgaonkar 2001]. La différence entre les deux expériences vient de la concentration en dénaturant nécessaire pour observer l'augmentation brutale de  $\Sigma$  : il faut seulement 5 mol.L<sup>-1</sup> de guanidinium contre 9 mol.L<sup>-1</sup> d'urée.

La superposition des trois signaux issus de techniques différentes indique que la dénaturation observée se produit dans les mêmes conditions avec la même amplitude quel que soit le phénomène moléculaire étudié (état de complexation du fer, compacité de la protéine ou structure secondaire). Cela valide l'hypothèse d'un processus de repliement à deux états sans accumulation d'intermédiaires. Dans ce cas, il est possible d'ajuster les courbes par un modèle simple permettant d'accéder aux paramètres thermodynamiques de l'équilibre état natif/état déplié.

L'hypothèse du processus de repliement à deux états implique que chaque échantillon est composé d'un mélange contenant uniquement la protéine sous forme native ( $N$ ) et la protéine sous forme dénaturée ( $D$ ). La constante d'équilibre monomoléculaire correspondante s'écrit comme

le rapport de la concentration en protéines natives sur la concentration en protéines dénaturées et peut aussi être exprimée en fonction du signal normalisé  $\Sigma$  via

$$K = \frac{[N]}{[D]} = \frac{\Sigma_N - \Sigma}{\Sigma - \Sigma_D}. \quad (4.2)$$

Dans la zone précédant le dépliement, pour des concentration en urée de 0 à 8 mol.L<sup>-1</sup>, on remarque que le signal observé évolue faiblement avec la concentration en dénaturant. L'absorbance et la fluorescence augmentent linéairement et le dichroïsme circulaire présente un minimum vers 6 mol.L<sup>-1</sup> d'urée. Ces évolutions sont dues aux variations de signatures des propriétés physico-chimiques observées avec le changement du milieu. Autrement dit, les échantillons à 0 et 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée ne contiennent que de la protéine native, cependant leur fluorescence varie faiblement et régulièrement avec le changement de composition du milieu. Ce comportement est également obtenu pour la dénaturation du ferrocyclochrome C en guanidinium [Bhuyan et Udgaonkar 2001]. Dans l'expérience en chlorure de guanidinium, on peut aussi observer une dérive des signaux après la zone de dépliement. Classiquement, ces dérives sont décrites par des fonctions affines [Santoro et Bolen 2002] :

$$\begin{aligned} \Sigma_N &= \Sigma_N^0 + m_N x \\ \Sigma_D &= \Sigma_D^0 + m_D x \end{aligned} \quad (4.3)$$

permettant de traduire la dépendance des observables à l'état natif  $\Sigma_N$  et à l'état dénaturé  $\Sigma_D$  en fonction de la concentration en dénaturant  $x$ . Les valeurs  $\Sigma_N^0$ ,  $\Sigma_D^0$  et  $m_N$ ,  $m_D$  sont respectivement les ordonnées à l'origine et les pentes des régression linéaires effectuées dans les zones de pré-dépliement et post-dépliement.

On peut calculer l'énergie libre de la réaction  $N \leftrightarrow D$ , notée  $\Delta G$ , par

$$\Delta G = -RT \ln K. \quad (4.4)$$

Toutefois, afin de comparer les divers additifs, on préfère extrapoler l'énergie libre nécessaire pour passer de l'état natif à l'état déplié en l'absence de dénaturant, soit  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ . En général, l'énergie libre varie linéairement avec la concentration en dénaturant [Creighton 1992]. On pose donc

$$\Delta G = \Delta G^{\text{H}_2\text{O}} + m x. \quad (4.5)$$

En réunissant toutes les équations précédentes, on obtient

$$\begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln \frac{(\Sigma_N^0 + m_N x) - \Sigma}{\Sigma - (\Sigma_D^0 + m_D x)} \quad \text{et} \\ \Sigma &= \frac{\Sigma_N^0 + m_N x + (\Sigma_D^0 + m_D x) e^{(-\frac{1}{RT}(\Delta G^{\text{H}_2\text{O}} + m x))}}{1 + e^{(-\frac{1}{RT}(\Delta G^{\text{H}_2\text{O}} + m x))}}. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Dans nos expériences, la zone de post-dépliement n'est pas atteignable à cause de la solubilité limitée de l'urée.  $\Sigma_D^0$  et  $m_D$  ne pouvant être déterminés expérimentalement seront pris égaux à 1 et 0 respectivement. Les ajustements effectués sur les données de fluorescence et de dichroïsme circulaire sont présentés figure 4.7 et les valeurs des paramètres obtenus sont résumés dans le tableau 4.1. La valeur  $C_m = -\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}/m$  est la concentration en dénaturant pour un échantillon dénaturé à environ 50%. Une étude de l'influence des dérives dans les zones de pré et post-dépliement sur les valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  est présentée en annexe D.1. On en déduira l'intervalle de confiance à attribuer aux valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ .

Les valeurs trouvées pour les deux signatures de fluorescence et de dichroïsme circulaire sont proches. On retrouve également que le chlorure de guanidinium est plus dénaturant que l'urée,  $m(\text{guanidinium}) \approx 3 m(\text{urée})$ . Par contre, les valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  obtenues par nos expériences en urée s'écartent d'environ 30% de la valeur obtenue en guanidinium par A. Bhuyan *et*

al [Bhuyan et Udgaonkar 2001]. Or  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  est une grandeur indépendante du dénaturant par définition [Santoro et Bolen 2002]. On peut probablement attribuer cet écart à l'incertitude de notre ajustement dans la zone de post-dépliement où nous manquons de valeurs expérimentales.

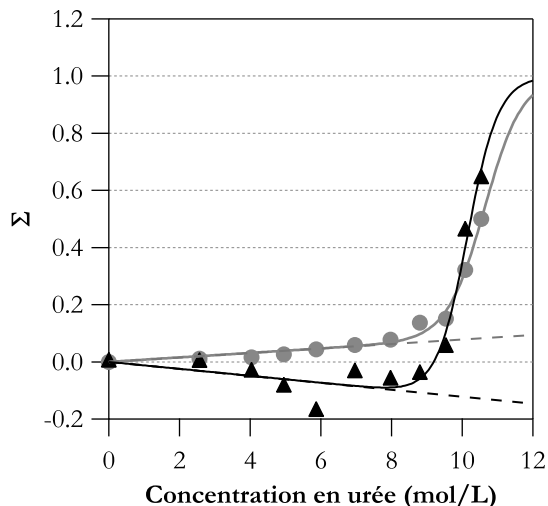


FIGURE 4.7 – Evolution des signaux normalisés (●) de fluorescence à 370 nm et (▲) de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée. (– –) Ajustement linéaire la zone de pré-dépliement, (—) ajustement de l'ensemble des données d'après l'équation 4.6.

	Dénaturation en urée		Dénaturation en guanidinium <sup>a</sup>
	Fluorescence	Dichroïsme circulaire	
$\Sigma_N^0$	$8.0 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-2}$	
$m_N$ (L.mol <sup>-1</sup> )	$7.8 \cdot 10^{-3}$	$-1.3 \cdot 10^{-2}$	
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	12	13	$19 \pm 2$
$-m$ (kcal.mol <sup>-2</sup> .L <sup>-1</sup> )	1.1	1.3	$3.7 \pm 0.2$
$C_m$ (mol.L <sup>-1</sup> )	10.9	10.0	5.1

TABLE 4.1 – Paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyclochrome C. (<sup>a</sup>) D'après [Bhuyan et Udgaonkar 2001].

Au final, ces expériences conduisent à des valeurs raisonnables des paramètres thermodynamiques du repliement du ferrocyclochrome C. Il est donc intéressant de reprendre ces mêmes expériences mais en présence de polymères modifiés azobenzènes afin de connaître leur impact sur la stabilité de la protéine.

### 4.3 Association et stabilisation de l'état déplié du cytochrome C par des polymères modifiés azobenzènes

Les expériences décrites dans la partie précédente sont réitérées, cette fois en présence de différents polymères modifiés azobenzènes.

#### 4.3.1 Précautions expérimentales

Les polymères sont introduits dans les échantillons à partir de solutions mères dans l'eau à 5 g.L<sup>-1</sup>, 1 h avant l'analyse. 15 min avant cette dernière, l'échantillon est irradié sous lumière



bleue afin de fixer le taux d'azobenzène trans. La concentration finale en polymère est de l'ordre de  $0.125 \text{ g.L}^{-1}$ , soit environ 1 g de polymère par gramme de protéine. Les polymères utilisés sont le squelette commercial poly(acide acrylique), noté PAA, et des polymères modifiés azobenzène dont la synthèse a été décrite au chapitre précédent, le PAA\_3.5C6azo (*cf.* paragraphe 2.4 page 29), le NAS\_7C6azo\_35gly et le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg (*cf.* paragraphe 2.5 page 32).

L'ajout de polymères est différé d'une nuit par rapport à la préparation de la solution afin de limiter le contact entre le réducteur et l'azobenzène. En effet, ce dernier peut être réduit en hydrazobenzène par les thiols, le glutathion ou la dithionite [Boulègue *et al.* 2007] ( $E^0(\text{azo/hydrazo}) = -0.44 \text{ V}$  et  $E^0(\text{SO}_2^-/\text{S}_2\text{O}_4^{2-}) = -0.66 \text{ V}$  à pH 7 [Mayhew 1978]).

### 4.3.2 Résultats

L'évolution des trois signatures normalisées, absorbance, fluorescence et dichroïsme circulaire, en fonction de la concentration en urée est présentée figure 4.8 pour les différents polymères utilisés. Les grandeurs thermodynamiques issues de l'ajustement des données expérimentales d'après l'équation 4.6 sont résumées dans le tableau 4.2.

Les données brutes obtenues en fluorescence sont corrigées selon la méthode présentée en annexe B.1.1 afin de s'affranchir de l'absorbance due aux azobenzènes. L'utilisation de ces données corrigées permet de comparer des échantillons contenant des concentrations en azobenzènes différentes. La normalisation des observables est effectuée par rapport à leurs valeurs pour un même mélange polymère/cytochrome C en l'absence de dénaturant et en présence de  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium. Ces références de l'état natif et de l'état dénaturé en présence de polymère ont des signatures proches de celles obtenues en l'absence de polymère. En ce qui concerne la fluorescence et le dichroïsme circulaire, l'écart entre les valeurs obtenues avec et sans polymère est inférieur à 10%.

	PAA	PAA_3.5C6azo	NAS_7C6azo _35gly	NAS_4C6azo _35gly_14arg
Détermination d'après les mesures de fluorescence				
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	9.5	3.1	3.2	4.9
$-m$ (kcal.mol <sup>-2</sup> .L <sup>-1</sup> )	1.3	0.36	0.33	0.53
$C_m$ (mol.L <sup>-1</sup> )	7.3	8.6	9.7	9.2
Détermination d'après les mesures de dichroïsme circulaire				
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	9.5	7.2	4.7	9.5
$-m$ (kcal.mol <sup>-2</sup> .L <sup>-1</sup> )	1.5	1.1	0.61	1.2
$C_m$ (mol.L <sup>-1</sup> )	6.3	6.5	7.7	7.9
intervalle de confiance	7.3 – 11.3	3.6 – 9.4	4.2 – 5.3	8.0 – 9.5

TABLE 4.2 – Paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyclochrome C en présence de différents polymères.

### Comparaison des résultats de fluorescence et de dichroïsme circulaire

Une première observation remarquable est que les signatures de fluorescence et de dichroïsme circulaire ne se superposent pas, sauf dans le cas du PAA. Il peut y avoir deux explications à ce phénomène :

1. la première est de considérer qu'en présence de polymère le repliement du cytochrome C n'est plus un processus à deux états. En effet, la non superposition des mesures de fluorescence et de dichroïsme circulaire implique que la perte des structures secondaires et l'extension de la protéine n'ont plus lieu pour les mêmes concentrations en urée. Cela peut être le signe du passage par un ou plusieurs intermédiaires de repliement toujours compacts mais sans structure secondaire, pour des concentrations en urée de  $7 \text{ mol.L}^{-1}$  en

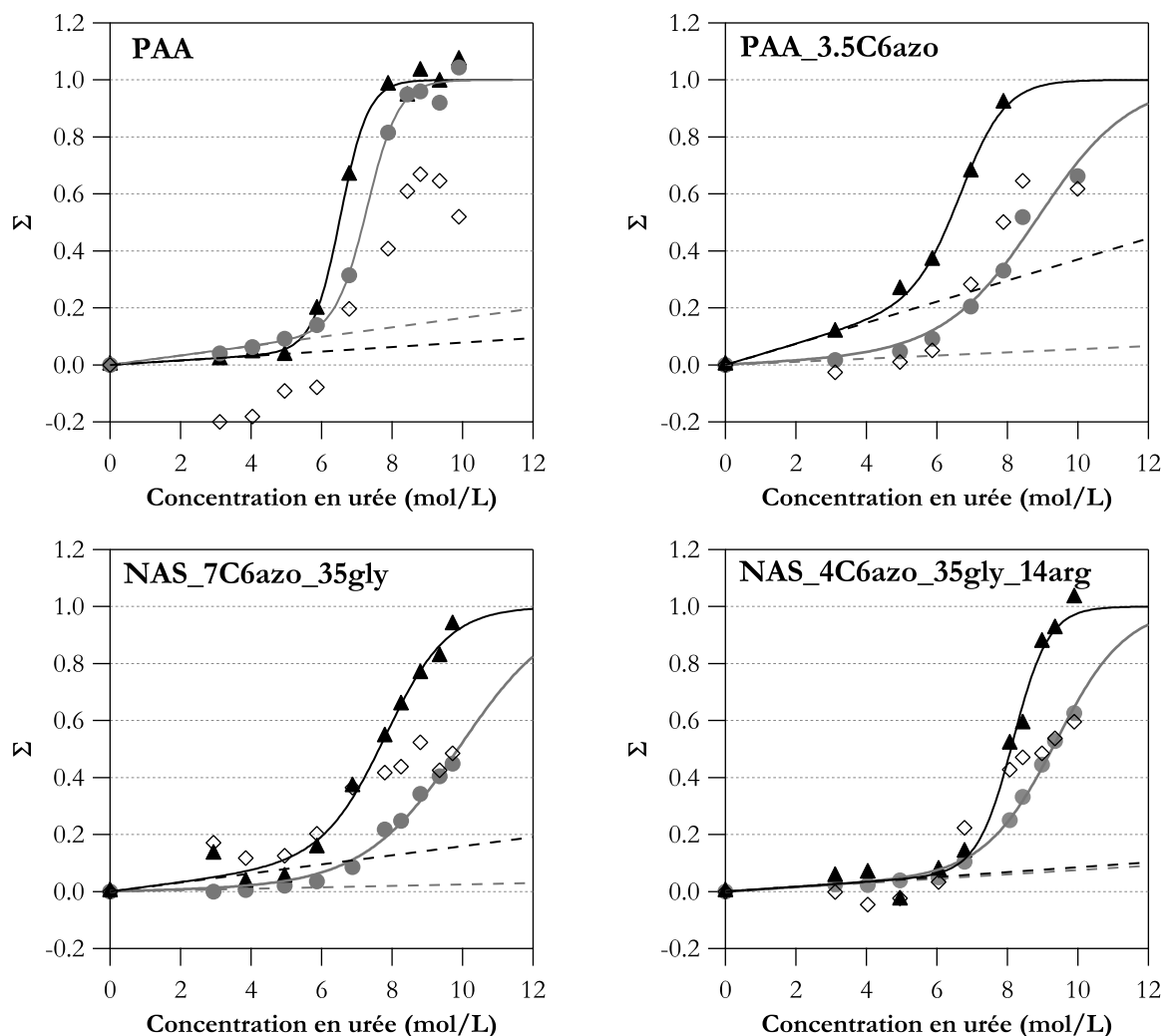


FIGURE 4.8 – Evolution des signaux normalisés ( $\diamond$ ) d'absorbance à 415 nm, ( $\bullet$ ) de fluorescence à 370 nm et ( $\blacktriangle$ ) de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. (—) Ajustement linéaire de la zone de pré-dépliement, (—) ajustement de l'ensemble des données d'après l'équation 4.6.

présence de PAA\_3.5C6azo,  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  en présence de NAS\_7C6azo\_35gly, et  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  en présence de NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg.

- la seconde est de considérer que la normalisation effectuée sur la fluorescence n'est pas adéquate. En effet, la correction des mesures de fluorescence ne prend pas en compte les phénomènes de quenching par l'azobenzène. Les valeurs obtenues pour des échantillons à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium avec et sans polymère sont très proches et ne révèlent pas de perte de fluorescence. Il est cependant possible que les contacts protéine dépliée/polymère ne soient pas les mêmes en guanidinium et en urée. Il se pourrait donc qu'en urée l'agencement des molécules soit tel que le tryptophane se trouve à proximité d'un azobenzène et qu'il y ait ainsi quenching de fluorescence.

Pour valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, il faudrait pouvoir mesurer la fluorescence de la protéine complètement dépliée en urée avec et sans polymère. Comme on l'a vu précédemment, cela n'est pas possible du fait de la solubilité de l'urée. Par contre, on peut effectuer une autre forme de normalisation des résultats de fluorescence en utilisant le degré de dénaturation mesuré par dichroïsme circulaire. Ainsi, si l'on se fonde sur ces mesures à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée pour avoir le taux de dépliement du cytochrome C, on peut ensuite effectuer une nouvelle normalisation et

retracer les courbes de fluorescence. Ces courbes sont présentées en annexe D.2. Elles montrent alors une très bonne superposition avec le dichroïsme circulaire pour le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg, mais toujours pas de superposition pour les deux autres polymères.

En conclusion, on peut dire que le mode de normalisation n'est pas en cause dans l'effet observé. Il n'est cependant pas exclu que le décalage entre les signaux de fluorescence et de dichroïsme circulaire corresponde en fait à un quenching de la fluorescence du tryptophane par les azobenzènes dans des proportions variables avec la concentration en urée.

### Analyse des résultats de dichroïsme circulaire

Afin de ne pas injecter artificiellement les effets complexes de quenching dans l'estimation de l'énergie libre de dépliement, nous avons analysé les valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  obtenues pour différents polymères uniquement à partir des mesures de dichroïsme circulaire. La valeur de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  peut alors être interprétée comme l'énergie nécessaire pour défaire les structures secondaires de la protéine en présence de polymère. Plus  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  est petit, plus le polymère a un effet stabilisant sur l'état déplié de la protéine.

Le PAA et le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg ont un faible effet déstabilisant. Les valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  avec ces deux polymères sont d'environ entre 9 kcal.mol<sup>-1</sup> contre 13 kcal.mol<sup>-1</sup> pour le ferrocyclochrome C seul. Par contre, le NAS\_7C6azo\_35gly et le PAA\_3.5C6azo ont un effet très fort, le  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  est diminué de moitié ou plus par rapport à celui du cytochrome C seul.

**Pourquoi le PAA a-t-il une influence sur la stabilité de la protéine ?** Les valeurs trouvées sont telles que  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}(\text{PAA}) < \Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ . Comme représenté sur le schéma 4.9, pour que  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  diminue, il faut que le PAA stabilise plus l'état déplié que l'état natif. Le PAA, chargé négativement, peut s'associer par interactions électrostatiques au cytochrome C, chargé positivement. D'après les résultats expérimentaux, il semble que l'association PAA/cytochrome C soit différente entre l'état natif et l'état déplié. Cela peut être dû à des effets de charge ou de liaison hydrogène.

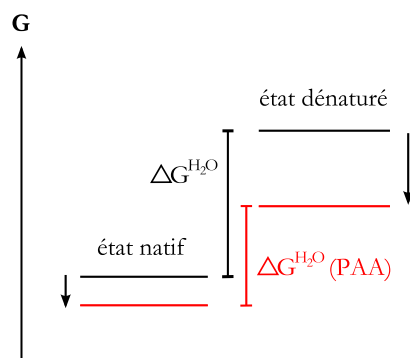


FIGURE 4.9 – Schéma explicatif de l'effet du PAA sur le cytochrome C .

**Rôle de l'hydrophobie** Le PAA\_3.5C6azo a un effet plus important que le PAA sur la stabilité du cytochrome C. En effet, on s'attend à ce qu'il ait avec la protéine les mêmes interactions électrostatiques que le PAA, mais il présente également des interactions hydrophobes dues à la présence de greffons azobenzènes. Il y a nettement plus de possibilités d'interactions hydrophobes entre polymère et état déplié qu'entre polymère et état natif, car à l'état natif, les acides aminés hydrophobes de la protéine sont enfouis en son cœur et non accessibles. Nos mesures sont donc compatibles avec le développement de peu de stabilisation hydrophobe de l'état natif mais beaucoup de l'état dénaturé, d'où la diminution de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}(\text{PAA}_3.5\text{C6azo})$  comme représenté sur le schéma 4.10.

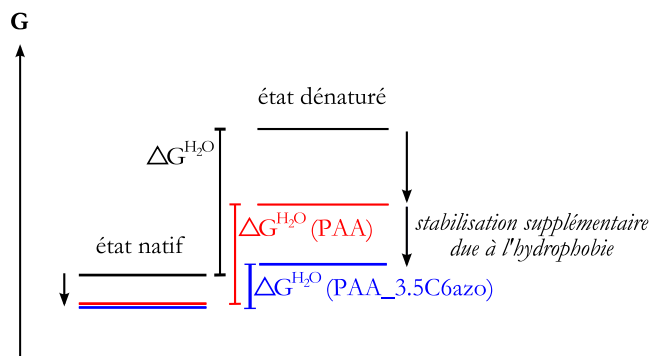


FIGURE 4.10 – Schéma explicatif de l'effet du PAA\_3.5C6azo sur le cytochrome C .

Le NAS\_7C6azo\_35gly et le PAA\_3.5C6azo ont un fort impact sur la stabilité de la protéine car ils la déstabilisent à la fois par des effets électrostatiques et par des effets hydrophobes. Le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg présente 14% de charges positives dues à la présence des greffons arginines donc sa charge globale est moins élevée que celle des deux autres. Cela lui donne au final un effet à peine plus fort que celui du PAA car il est moins chargé mais plus hydrophobe. Dans ces conditions, on n'observe aucun effet dénaturant dû aux arginines pendantes. Pour voir un effet dénaturant, il faudrait peut-être greffer plus d'arginine. Il semble cependant probable que dans les conditions utilisées ici, on soit de toutes façons dominé par l'effet des interactions électrostatiques.

## 4.4 Modulation de l'effet des polymères modifiés azobenzènes

Dans ce paragraphe, nous présentons l'importance des paramètres concentration en polymère, force ionique et effet de lumière sur le caractère déstabilisant des polymères. On souhaite déterminer les conditions de travail permettant un effet maximal du polymère. Pour cela, on se place à une concentration de  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  en urée et on fait varier les différents paramètres à étudier. C'est en effet à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée que l'on observe le plus de différences sur la dénaturation du cytochrome C en fonction de la présence ou de l'absence de polymère : sans polymère, on observe moins de 20% de dénaturation alors qu'en présence de NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg on a près de 50% de dénaturation, 40% avec le NAS\_7C6azo\_35gly, 60% avec le PAA\_3.5C6azo et 100% avec le PAA.

### 4.4.1 Effet de la concentration en polymère

Pour l'étude de l'effet de la concentration en polymère, on fait varier cette dernière de 0 à environ  $0.15 \text{ g.L}^{-1}$ , soit jusqu'à un rapport un pour un en masse polymère/protéine. Les résultats donnés figure 4.11 présentent l'évolution de l'absorbance à 415 nm et de la fluorescence à 370 nm pour différents polymères. Les données brutes obtenues en fluorescence sont corrigées selon la méthode présentée en annexe B.1.1 afin de s'affranchir de l'absorbance due aux azobenzènes.

L'absorbance est représentée comme le rapport de l'absorbance de l'échantillon sur l'absorbance du cytochrome seul à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée.  $A/A_0$  diminue lorsque la dénaturation augmente, de 1 pour le cytochrome C seul dans  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée à 0.24 pour le cytochrome C seul dans  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium. La fluorescence est représentée comme le rapport de l'intensité de fluorescence de l'échantillon sur l'intensité de fluorescence du cytochrome seul à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium.  $I/I_0(\text{gua})$  augmente avec la dénaturation de 0.2 à 1.

Les courbes présentent toutes la même allure : on observe une augmentation de la dénaturation pour les faibles concentrations en polymère, typiquement inférieures à  $0.05 \text{ g.L}^{-1}$ , puis le signal se stabilise. Ces deux régimes ont été mis en évidence sur la figure 4.11 par des droites. On

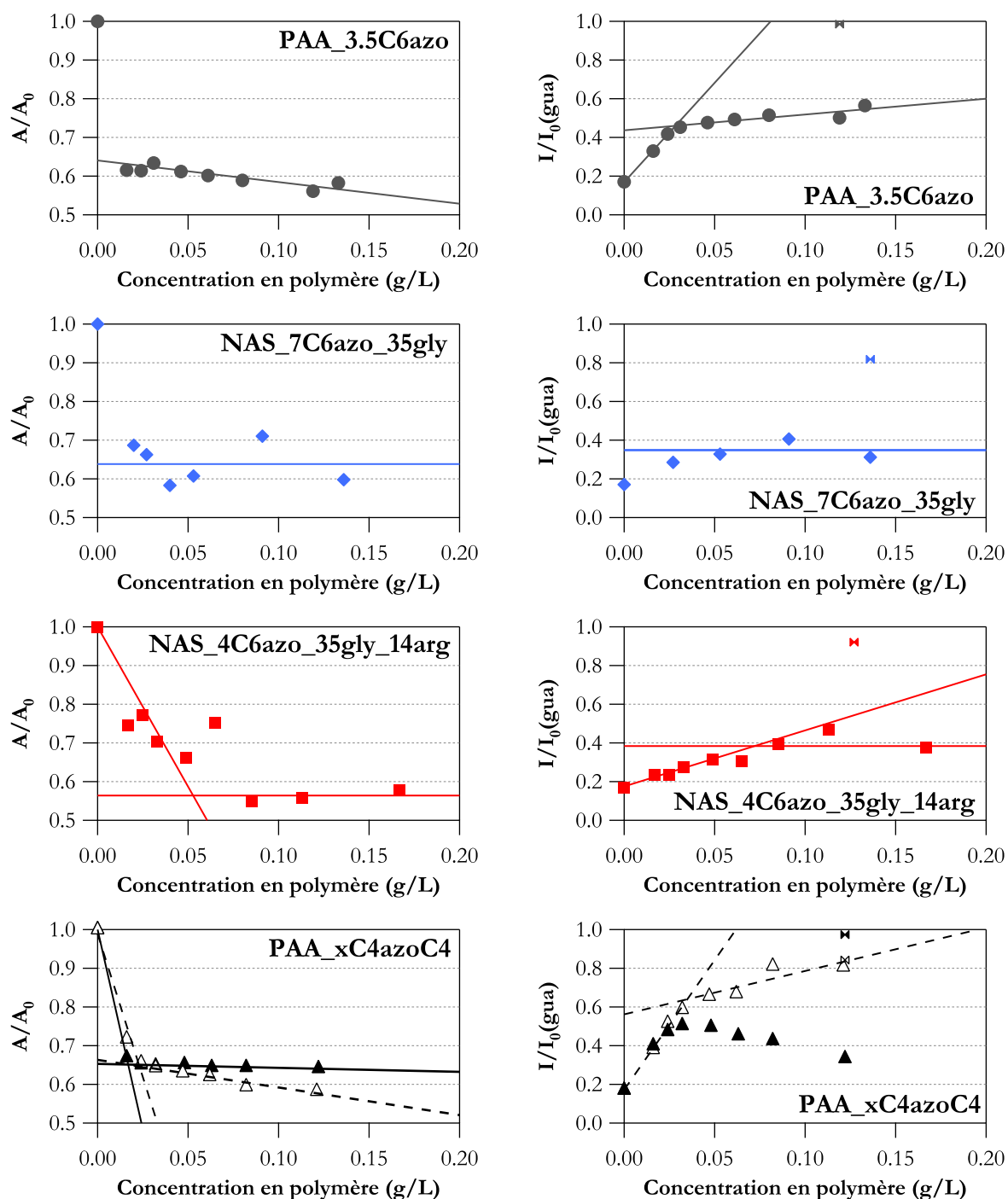


FIGURE 4.11 – Evolution de l’absorbance et de l’intensité du fluorescence pour des échantillon à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d’urée en fonction de la concentration en polymère. **A** absorbance de l’échantillon, **A<sub>0</sub>** absorbance du cytochrome seul à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d’urée. **I** intensité de fluorescence de l’échantillon, **I<sub>0</sub>(gua)** intensité de fluorescence du cytochrome seul à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium. (●) PAA\_3.5C6azo, (◆) NAS\_7C6azo\_35gly, (■) NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg, (△) PAA\_1C4azoC4, (▲) PAA\_5C4azoC4. (⊠) intensité de fluorescence des échantillons avec polymère à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium.

peut interpréter les intersections de ces droites comme la composition de l’échantillon à laquelle il y a saturation des protéines par les polymères.

### Analyse des résultats de fluorescence

Sur les graphiques illustrant les résultats de fluorescence sont également représentées les intensités de fluorescence pour les échantillons avec polymère à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium ( $\boxtimes$ ). Quel que soit le polymère, ces valeurs sont toutes comprises entre 0.8 et 1, donc proches de la valeur de 1 trouvée pour le cytochrome seul en  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  de guanidinium. Par contre, pour les échantillons à  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée,  $I/I_0(\text{gua})$  ne tend vers 1 que dans le cas du PAA\_1C4azoC4. Pour les autres polymères, la valeur maximale obtenue stagne vers 0.6 pour le PAA\_3.5C6azo, 0.4 pour le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg et en-dessous de 0.4 pour le NAS\_7C6azo\_35gly. Le PAA\_5C4azoC4 présente quant à lui une décroissance de 0.5 à 0.3 pour des concentrations de 0.035 à  $0.12 \text{ g.L}^{-1}$ .

La décroissance observée pour le PAA\_5C4azoC4 est vraisemblablement due à un phénomène de quenching. Si au delà de  $0.035 \text{ g.L}^{-1}$  de polymère, le PAA\_5C4azoC4 continue de fixer des protéines, cette association va amener des azobenzènes à proximité des tryptophanes. Il peut alors y avoir désexcitation non radiative de ces derniers. On s'attend à observer ainsi une perte de fluorescence d'autant plus grande que le nombre d'azobenzènes autour des tryptophanes augmente.

Pourquoi n'observe-t-on ce phénomène que sur un seul polymère, le PAA\_5C4azoC4 ? Pour observer un quenching qui varie avec la concentration en polymère, il faut que ce dernier ait une hydrophobie importante. En effet, l'énergie gagnée lors du transfert d'un azobenzène de la solution vers un patch hydrophobe de la protéine (qui peut être le Trp 59) doit compenser l'énergie perdue lors du réarrangement des complexes préalablement formés. Pour satisfaire à cette condition, le polymère doit avoir un taux de greffage élevé et un greffon très hydrophobe. Il a été vu au chapitre 2 que les greffons C4azoC4 sont plus hydrophobes que les greffons C6azo.

### Analyse de la composition des échantillons à la saturation.

Les concentrations en polymère à la saturation sont reportées dans le tableau 4.3.

Nom du polymère	Concentration en polymère à saturation déterminée d'après les mesures	
	d'absorbance (g/L)	de fluorescence (g/L)
PAA_5C4azoC4	0.017	0.027
PAA_3.5C6azo	<0.020	0.028
PAA_1C4azoC4	0.023	0.035
NAS_7C6azo_35gly	<0.03	<0.04
NAS_4C6azo_35gly_14arg	0.053	0.072

TABLE 4.3 – Concentration en polymère à saturation déterminée d'après les mesures d'absorbance et de fluorescence.

Les valeurs déduites des mesures d'absorbance sont systématiquement inférieures à celles déduites des mesures de fluorescence. Ces différences peuvent être interprétées grâce aux mêmes hypothèses que celles émises à la page 80 pour expliquer la différence entre les signatures de fluorescence et de dichroïsme circulaire au cours du suivi du dépliement en urée :

1. soit on n'est plus dans un processus de dépliement à deux états donc les deux types de mesures ne rendent pas compte d'un même état de dénaturation,
2. soit il y a un quenching de fluorescence dont la prise en compte augmenterait graduellement les valeurs dans le régime à forte concentration en polymère, ce qui aurait pour conséquence de rapprocher les estimations de celles obtenues en absorbance.

On va se focaliser sur les résultats issus des mesures de fluorescence. La composition des complexes polymère/protéine à saturation a été exprimée dans le tableau 4.4 en termes de composition massique, composition molaire, nombre d'azobenzènes par protéine liée et composition

électrostatique. La charge nominale de la protéine est prise comme étant le nombre d'acides aminés chargés positivement. Pour le polymère, on compte les nombre de motifs chargés négativement (c'est-à-dire en excluant les motifs azobenzène et arginine).

Nom du polymère	$[\text{pol}]_{\text{sat}}$ (g/l)	$\frac{\text{cyt C}}{\text{pol}}$ (g/g)	$\frac{\text{cyt C}}{\text{chaîne}}$ (mol/mol)	$\frac{\text{nb azo}}{\text{cyt C}}$	$\frac{\text{nb charge -}}{\text{nb charge +}}$
PAA_5C4azoC4	0.017	5.9	24	0.9	0.8
PAA_3.5C6azo	0.020	5.0	19	0.8	1.0
PAA_1C4azoC4	0.023	4.3	15	0.3	1.3
NAS_7C6azo_35gly	0.03	3.3	11	2.1	1.2
NAS_4C6azo_35gly_14arg	0.053	1.9	8	1.6	1.5

TABLE 4.4 – Composition des complexes polymère/protéine à saturation.  $[\text{pol}]_{\text{sat}}$  concentration à saturation obtenue par les mesures d'absorbance,  $\frac{\text{cyt C}}{\text{pol}}$  quantité de protéines associées au polymère en g/g,  $\frac{\text{cyt C}}{\text{chaîne}}$  nombre de protéines associées par chaîne de polymère,  $\frac{\text{nb azo}}{\text{cyt C}}$  nombre d'azobenzènes par protéine,  $\frac{\text{nb charge -}}{\text{nb charge +}}$  rapport du nombre de charges par polymère sur le nombre de charge par protéine avec +23 la charge nominale de la protéine.

On remarque que la saturation est plus tardive pour le NAS\_7C6azo\_35gly et encore plus pour le NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg que pour les polymères modifiés uniquement azobenzènes. On peut donc faire l'hypothèse que l'association est régie par les interactions électrostatiques. Quel que soit le polymère, on trouve que les complexes formés sont tels qu'il y a compensation des charges positives et négatives. En effet, les valeurs de la dernière colonne sont toutes proches de 1 et varient de moins d'un facteur 2, tandis que les colonnes décrivant les rapports de masse molaire ou les taux d'azobenzènes varient respectivement d'un facteur 3 et 7.

Le phénomène prédominant est donc bien l'électrostatique, mais dans un deuxième temps on peut voir un effet de l'hydrophobie. Si l'on regarde les trois polymères modifiés uniquement azobenzènes, on observe que le PAA\_5C4azoC4 est capable de lier plus de protéines que le PAA\_3.5C6azo qui lie lui-même plus de protéines que le PAA\_1C4azoC4. Ces polymères ayant quasiment la même charge, ce qui est illustré ici est bien un effet de leur hydrophobie.

#### 4.4.2 Effet de la force ionique

Pour confirmer la prédominance des effets électrostatiques, des expériences portant sur le paramètre force ionique ont été effectuées. La dénaturation du ferrocyclochrome C à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée en présence de  $0.120 \text{ g.L}^{-1}$  de polymère est suivie par absorbance et fluorescence en fonction de la concentration en NaCl ajoutée dans le milieu. Les résultats obtenus sont reportés figure 4.12.

Comme attendu, on observe que la dénaturation décroît quand la force ionique augmente. Les courbes issues de la fluorescence et de l'absorbance sont encore une fois décalées, mais de même allure. Si l'on se focalise sur les résultats obtenus en fluorescence, on observe une décroissance brutale autour  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. Puis, pour des concentrations en sel supérieures à  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ , on atteint un plateau dont la valeur est très proche de celle du cytochrome C seul en urée. Il y a donc une petite zone de concentration en sel, entre  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  et  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ , dans laquelle l'interaction électrostatique est affaiblie. Pour des concentrations en deçà de cette zone, l'interaction électrostatique domine et au delà il n'y a plus d'effet du polymère.

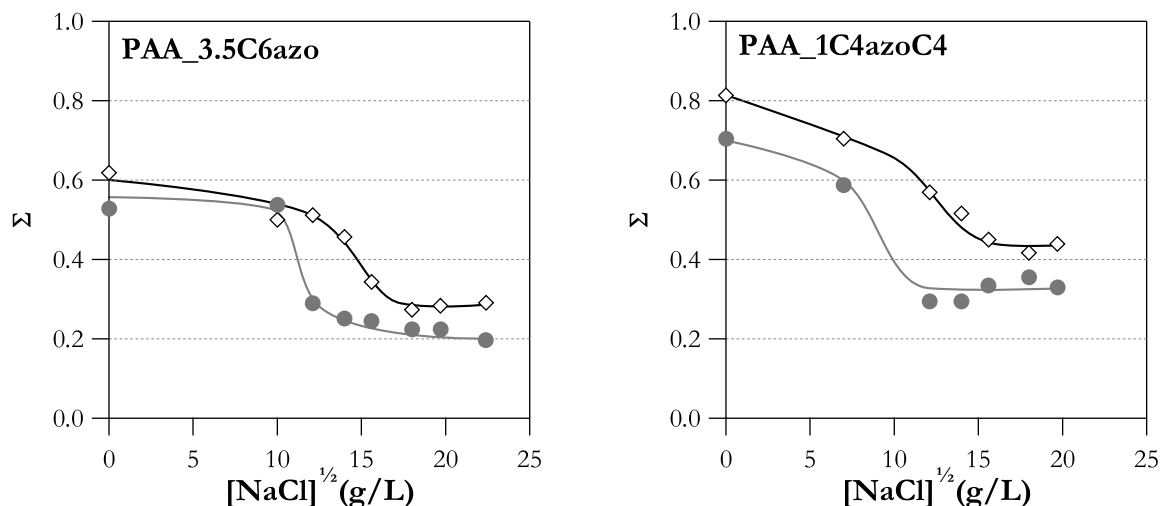


FIGURE 4.12 – Evolution des signaux normalisés ( $\diamond$ ) d'absorbance à 415 nm et ( $\bullet$ ) de fluorescence à 370 nm en fonction de la racine carrée de la concentration en chlorure de sodium pour des échantillons à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée en présence  $0.120 \text{ g.L}^{-1}$  de polymère. Les lignes sont juste un guide pour l'œil.

#### 4.4.3 Effet de la lumière

Il a été démontré dans les paragraphes précédents que l'interaction électrostatique est très fortement prédominante sur l'interaction hydrophobe et ce quasiment dans toutes les conditions testées. C'est ce qui explique qu'il n'a jamais été possible d'observer un effet de la lumière sur la dénaturation du cytochrome C. Toutes les expériences présentées précédemment impliquant des polymères modifiés azobenzènes ont été réalisées à la fois sous irradiation bleue, figures 4.8 à 4.12, puis sous irradiation UV. Les échantillons sont laissés à équilibrer 15 min sous la lumière avant analyse. Dans tous les cas, après retraitement des données, les résultats obtenus sous UV sont parfaitement superposables aux résultats obtenus sous bleu. Nous ne les avons donc pas reportés ici, sauf figure 4.13 pour l'expérience portant sur la force ionique.

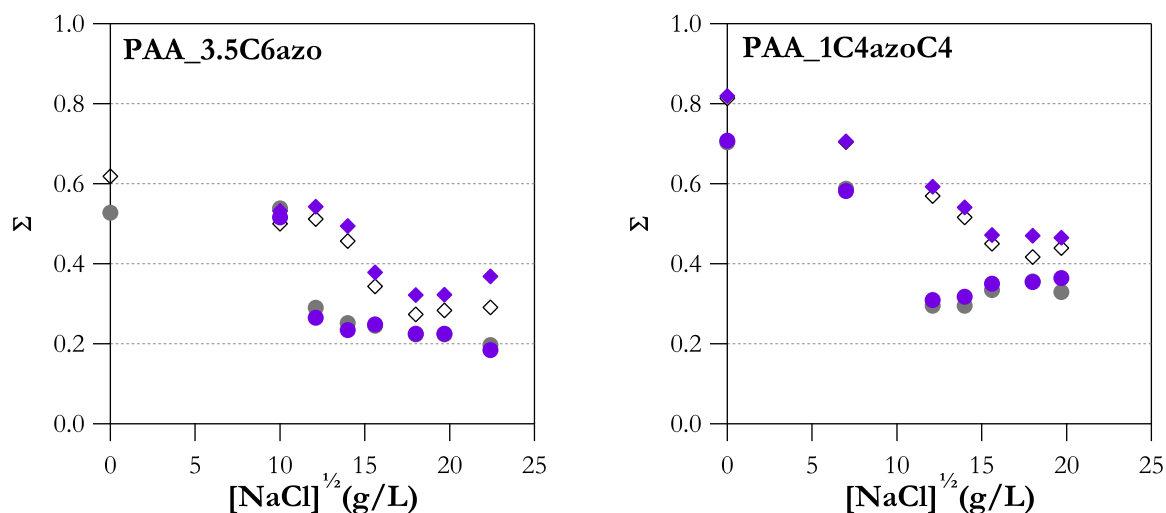


FIGURE 4.13 – Evolution des signaux normalisés ( $\diamond$ ) d'absorbance à 415 nm et ( $\bullet$ ) de fluorescence à 370 nm en fonction de la racine carrée de la concentration en chlorure de sodium pour des échantillons à  $9 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée en présence  $0.120 \text{ g.L}^{-1}$  de polymère. ( $\diamond$  et  $\bullet$ ) après 15 min sous irradiation bleue, ( $\blacklozenge$  et  $\bullet$ ) les mêmes échantillons après 15 min sous irradiation UV.



Les courbes en violet sont superposées aux courbes en noir pour les deux polymères, quelle que soit la concentration en sel. Même dans la région d'affaiblissement de l'interaction électrostatique, on ne distingue aucune différence entre les échantillons à azobenzènes majoritairement trans et ceux à azobenzènes majoritairement cis.

Il faut en déduire que le changement provoqué par la transition cis-trans sur des polymères portant quelques pourcents de greffons azobenzènes n'est pas suffisant pour avoir un impact sur la stabilité du complexe polymère/cytochrome C. En fait, il est possible que l'hydrophobie accessible ne soit pas un paramètre critique pour cette protéine. Le fait que l'association soit principalement d'origine électrostatique se traduit par la permanence de la complexation, même sous UV. De plus, le fait qu'elle soit soluble, même sous forme dépliée, suggère qu'elle ne présente pas au milieu extérieur de segments trop hydrophobes, même sous sa forme non native. La photo-stimulation qui joue essentiellement sur la modulation des contacts hydrophobes n'a alors que peu de chance de perturber la structure de cette protéine.

## 4.5 Conclusion

On peut conclure que les polymères modifiés azobenzènes ont le potentiel pour être des macromolécules chaperonnes. Ils sont en effet capables de s'associer à une protéine et de la déstabiliser.

Dans cette optique, la maîtrise des interactions hydrophobes semble capitale. En effet, même dans le cas du cytochrome C, pourtant peu sensible au paramètre hydrophobie, il est nécessaire d'avoir un polymère présentant des modifications hydrophobes pour obtenir un effet maximal sur le  $\Delta G(\text{déplie})$  (variation d'un facteur 2 à 3). L'effet des polymères azobenzènes sur le cytochrome C, de l'ordre de quelques  $\text{kcal.mol}^{-1}$  (entre 1 et 10  $\text{kcal.mol}^{-1}$ ), est donc sensiblement comparable à celui obtenu lors de la photo-modulation des associations polymère/micelle au chapitre 3. Il semble donc envisageable, à condition de trouver des conditions bien choisies qui permettent de moduler l'équilibre entre association et dissociation du polymère, de faire varier le  $\Delta G(\text{déplie})$  d'une protéine et ainsi de la faire basculer de l'état déplié vers l'état natif (ou réciproquement) avec une photo-modulation d'hydrophobie.

## Bibliographie

- [Bhuyan et Udgaonkar 2001] A. K. Bhuyan and J. B. Udgaonkar. *Folding of horse cytochrome c in the reduced state*. Journal of Molecular Biology, vol. 312, no. 5, pages 1135–1160, October 2001.
- [Boulègue *et al.* 2007] C. Boulègue, M. Löweneck, C. Renner and L. Moroder. *Redox Potential of Azobenzene as an Amino Acid Residue in Peptides*. ChemBioChem, vol. 8, no. 6, pages 591–594, 2007.
- [Bushnell *et al.* 1990] G. W. Bushnell, G. V. Louie and G. D. Brayer. *High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c*. Journal of Molecular Biology, vol. 214, no. 2, pages 585–95, July 1990.
- [Creighton 1992] T. E. Creighton. *Proteins : Structures and molecular properties*. W. H. Freeman, second edition edition, August 1992.
- [Elove *et al.* 1994] G. A. Elove, A. K. Bhuyan and H. Roder. *Kinetic Mechanism of Cytochrome C Folding : Involvement of the Heme and Its Ligands*. Biochemistry, vol. 33, no. 22, pages 6925–6935, 1994.
- [Jones *et al.* 1993] C. M. Jones, E. R. Henry, Y. Hu, C. K. Chan, S. D. Luck, A. Bhuyan, H. Roder, J. Hofrichter and W. A. Eaton. *Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, no. 24, pages 11860–11864, December 1993.
- [Löwenich et Kleinermanns 2007] D. Löwenich and K. Kleinermanns. *Porphyrin Fluorescence Dominates UV Photoemission of Folded Cytochrome C*. Photochemistry and Photobiology, vol. 83, no. 6, pages 1308–1312, 2007.
- [Mayhew 1978] S. G. Mayhew. *The Redox Potential of Dithionite and  $SO_2$ —from Equilibrium Reactions with Flavodoxins, Methyl Viologen and Hydrogen plus Hydrogenase*. European Journal of Biochemistry, vol. 85, no. 2, pages 535–547, 1978.
- [Santoro et Bolen 2002] M. M. Santoro and D. W. Bolen. *Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl .alpha.-chymotrypsin using different denaturants*. Biochemistry, vol. 27, no. 21, pages 8063–8068, May 2002.
- [Sigma-Aldrich ] Sigma-Aldrich. *Cytochrome C*. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/cytochrome-c.html>.
- [Vanderkooi *et al.* 1976] J. M. Vanderkooi, F. Adar and M. Erecińska. *Metallocytochromes C : Characterization of Electronic Absorption and Emission Spectra of  $Sn_4^+$  and  $Zn_2^+$  Cytochromes C*. European Journal of Biochemistry, vol. 64, no. 2, pages 381–387, 1976.
- [Zentko *et al.* 1999] S. Zentko, R. C. Scarrow, W. W. Wright and J. M. Vanderkooi. *Protonation of porphyrin in iron-free cytochrome C : Spectral*

*properties of monocation free base porphyrin, a charge analogue of ferric heme.* Biospectroscopy, vol. 5, no. 3, pages 141–150, 1999.

## Chapitre 5

# Les polymères modifiés azobenzènes permettent-ils la renaturation d'une protéine qui agrège ?

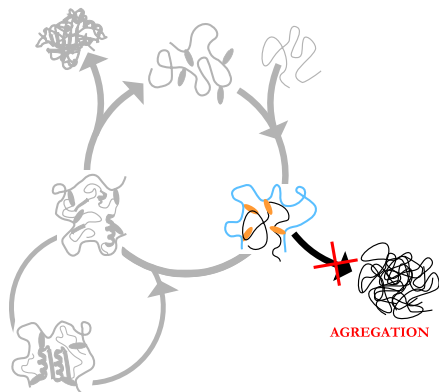
### Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>92</b>
<b>5.2</b>	<b>Association spécifique des polymères avec la CAB dépliée</b>	<b>92</b>
5.2.1	Une protéine modèle, la Carbonique Anhydrase Bovine	92
5.2.2	Polymère et CAB native	93
5.2.2.1	Electrophorèse capillaire	93
5.2.2.2	Dichroïsme circulaire	93
5.2.2.3	Activité enzymatique	95
5.2.2.4	Conclusion	96
5.2.3	Polymère et CAB dénaturée	96
5.2.3.1	Electrophorèse capillaire	96
5.2.3.2	Fluorescence	98
5.2.3.3	Dichroïsme circulaire	100
5.2.3.4	Conclusion	101
<b>5.3</b>	<b>Effet renaturant des polymères</b>	<b>101</b>
5.3.1	Protocole de dénaturation	101
5.3.2	Protocole de renaturation	102
5.3.2.1	Méthode	102
5.3.2.2	Expériences de référence	102
5.3.2.3	Détermination d'un protocole maximisant l'effet des polymères	103
5.3.3	L'effet renaturant des polymères de type PAA- <i>x</i> C6azo	106
5.3.3.1	Protection contre l'agrégation	107
5.3.3.2	Effet de l'irradiation en UV	108
5.3.4	Impact de la nature du polymère sur son efficacité	109
5.3.4.1	Les différents polymères utilisés	109
5.3.4.2	Résultats	110
5.3.4.3	Rôle de l'hydrophobie	110
5.3.4.4	Le rôle du squelette	112
5.3.4.5	Bilan	112
<b>5.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>113</b>

---

## 5.1 Problématique



L'objet de ce chapitre est l'étude de l'effet des polymères sur l'agrégation d'une protéine modèle. Plus spécifiquement, il s'agit ici de montrer que les polymères modifiés azobenzènes vont permettre la renaturation de cette protéine, incapable de se replier dans un milieu sans additifs, car restant piégée sous forme dépliée ou mal repliée au sein d'agrégats.

La Carbonique Anhydrase Bovine (CAB) est un bon modèle pour notre étude. Elle a été beaucoup étudiée, elle agrège [Cleland et Wang 1990] et a déjà été utilisée pour tester des additifs [Wetlaufer et Xie 1995] et des méthodes d'aide à la renaturation [Gellman et Rozema 1996].

Grâce à l'utilisation de techniques telles que la fluorescence, le dichroïsme circulaire, l'électrophorèse capillaire et des tests d'activité enzymatique et de solubilité, on va suivre la renaturation de la CAB en présence de polymère. Tout d'abord, on vérifiera que la CAB native n'est pas perturbée par la présence du polymère. On donnera ensuite des preuves élémentaires de l'association entre le polymère et la CAB dépliée, puis on vérifiera que les polymères sont compatibles avec le déroulement d'un processus de repliement jusqu'à l'état natif. Enfin, on verra si l'on peut agir sur ce processus de repliement par irradiation UV.

## 5.2 Association spécifique des polymères avec la CAB dépliée

### 5.2.1 Une protéine modèle, la Carbonique Anhydrase Bovine

La CAB est une métalloprotéine de 259 acides aminés dont le site actif contient un ion zinc. Elle catalyse la transformation du  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$ , contribuant ainsi à maintenir l'équilibre acide-base dans l'organisme, et aide au transport du  $\text{CO}_2$  hors des tissus.

Son point isoélectrique de 5.85 fait qu'elle est chargée négativement dans des conditions de travail à pH 8 [Cleland et Wang 1990]. La structure cristalline de cette protéine, représentée figure 5.1, montre des structures secondaires à la fois de type hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  en proportions 15% et 30% respectivement [Saito *et al.* 2004].

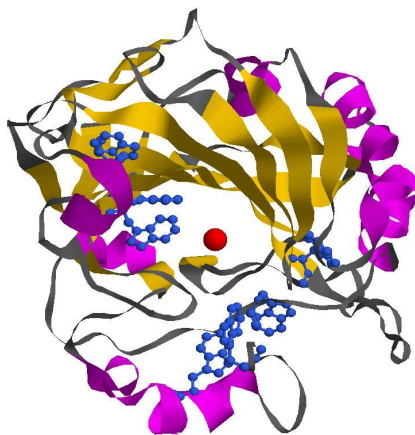


FIGURE 5.1 – Schéma de la structure de la CAB. (rose) les hélices  $\alpha$ , (jaune) les feuillets  $\beta$ , (rouge) l'ion zinc et (bleu) les tryptophanes.

La CAB est connue pour avoir une cinétique de renaturation lente due à l'isomérisation cis-trans de ses 18 prolines [Semisotnov *et al.* 1990]. Des temps de demi-vie de 10 à 12 min ont été mesurés dans le cas de la renaturation de la CAB en présence d'une concentration résiduelle de  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  en guanidinium et dans le cas d'une renaturation assistée par des tensio-actifs selon la méthode de Gellman *et al* [Hanson et Gellman 1998].

Il y a un grand intérêt à travailler sur une protéine ayant une cinétique de renaturation lente, car on a alors la possibilité de photostimuler le système à différents moments de la renaturation et de différentes manières. Le stimulus lumière peut, en fonction de l'absorbance du milieu et de l'intensité d'irradiation, avoir un effet maximal dès une minute d'irradiation ou s'étaler sur quelques heures.

## 5.2.2 Polymère et CAB native

Les mesures de diffusion de la lumière de la section 3.3 n'ont pas permis de détecter d'association des polymères modifiés azobenzènes avec la CAB native. Par électrophorèse, il est possible de quantifier précisément la fraction de protéine formant ou non des complexes avec un polymère [Porcar *et al.* 1998]. Les mesures d'électrophorèse capillaire présentées dans le paragraphe suivant visent à vérifier l'absence de complexes polymère/protéine native. Nous allons également vérifier que les polymères n'influent ni sur la structure secondaire ni sur l'activité enzymatique de la protéine native.

### 5.2.2.1 Electrophorèse capillaire

Des expériences d'électrophorèse capillaire de zone permettent la séparation de la protéine native et du polymère (voir conditions expérimentales en annexe B.2). Ils ont des mobilités nettement différentes, environ  $68 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour la CAB et  $348 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour les polymères PAA modifiés C6azo.

Comme on peut le voir sur les électrophérogrammes de la figure 5.2, les mélanges CAB native/polymère se séparent lors de l'analyse pour donner deux pics bien distincts correspondant aux signaux respectifs de la CAB native et du polymère seul. L'analyse du mélange protéine native/PAA\_1C6azo a été arrêté juste avant la sortie du pic polymère. On ne distingue aucun effet de la présence du polymère sur la migration de la CAB native, ce qui est en accord avec les résultats de diffusion de lumière.

### 5.2.2.2 Dichroïsme circulaire

Le spectre de dichroïsme circulaire dans la gamme de longueur d'onde 190 – 250 nm, présenté figure 5.3, donne des informations sur la structure secondaire de la protéine.

Le spectre de la CAB native présente un minimum à 210 nm plutôt caractéristique d'une structure secondaire majoritairement sous forme de feuillets  $\beta$ . On peut estimer la proportion des différents types de structures secondaires grâce à un programme d'analyse de données de dichroïsme circulaire comme DichroWeb [Whitmore]. Les valeurs obtenues lors de l'analyse des spectres de la CAB seule ou en présence de polymères sont présentés dans le tableau 5.1 (pour plus de références sur les paramètres d'analyse utilisés voir l'annexe B.3).

Echantillon	Hélice $\alpha$	Feuillet $\beta$	Coudes
CAB seule	10%	39%	12%
CAB + PAA_3.5C6azo	9%	40%	12%
CAB + NAS_7C6azo_35gly	11%	38%	12%

TABLE 5.1 – Proportions des différents types de structures secondaires de la CAB native seule ou en solution avec du polymère obtenues par le programme DichroWeb.

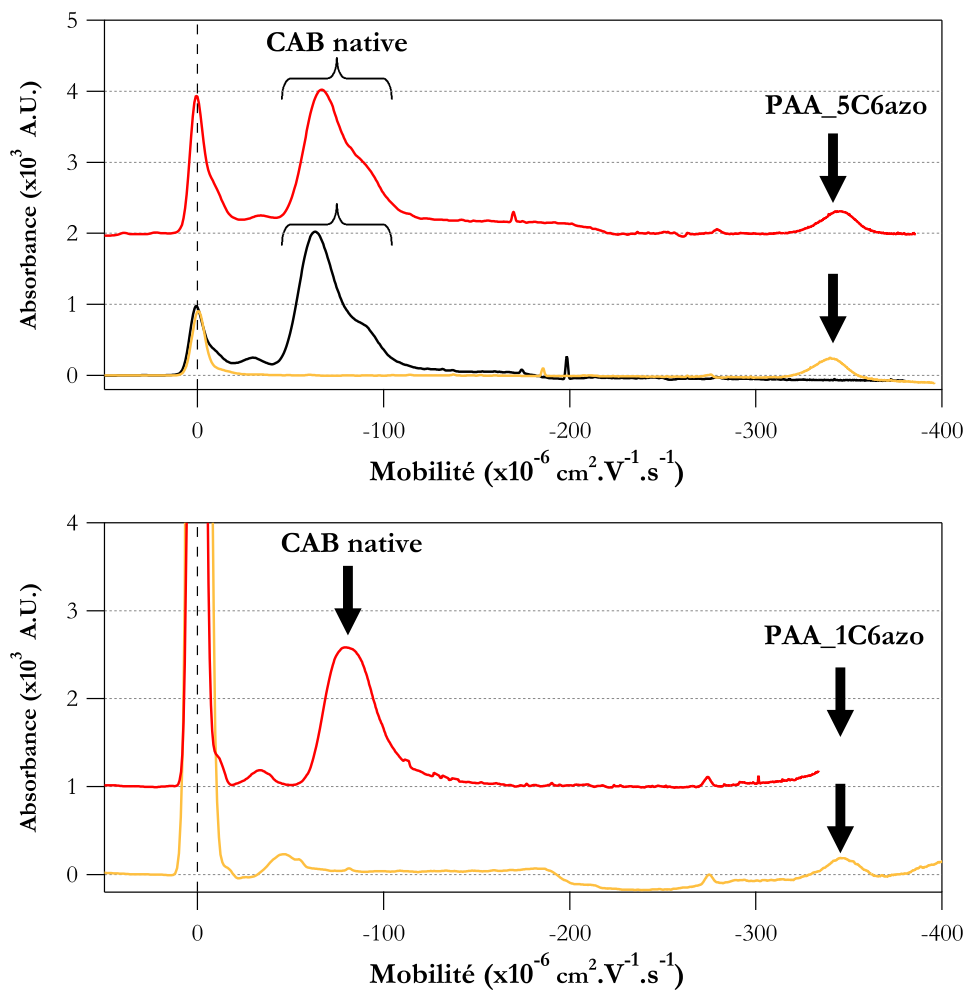


FIGURE 5.2 – Electrophérogammes de la CAB native en présence de polymère. (—) CAB native seule à 0.2 g.L<sup>-1</sup>, (—) polymère seul à 0.2 g.L<sup>-1</sup>, (—) mélange CAB native/polymère. L'absorbance est mesurée à 205 nm.

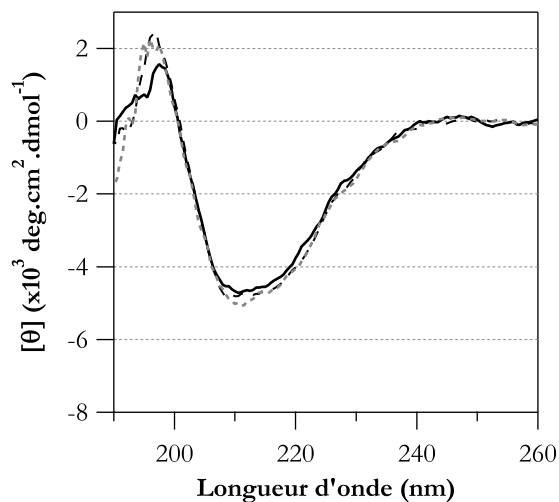


FIGURE 5.3 – Spectre de dichroïsme circulaire de la CAB à 0.165 g.L<sup>-1</sup> en tampon TRIS/HCl à 5 mmol.L<sup>-1</sup>. (—) CAB seule, (---) CAB + PAA\_3.5C6azo, (-.-) CAB + NAS\_7C6azo\_35gly.

Quel que soit l'échantillon, les valeurs sont très proches les unes des autres et en assez bon accord avec celles de la littérature (15% d'hélice  $\alpha$  et 30% de feuillets  $\beta$  [Saito *et al.* 2004]). On en conclut donc que le PAA\_3.5C6azo et le NAS\_7C6azo\_35gly ne modifient pas les structures secondaires de la protéine native en milieu aqueux.

### 5.2.2.3 Activité enzymatique

Pour tester l'activité biologique de la protéine, on effectue une mesure d'activité enzymatique en utilisant la réaction d'hydrolyse de la 4-Nitrophenylacetate esterase (NPA). Cette réaction, représentée figure 5.4, est catalysée par la CAB. On peut suivre l'évolution de la réaction par spectrophotométrie UV-visible en détectant l'un des ses produits, le 4-nitrophénol de couleur jaune [Pocker et Stone 1967].

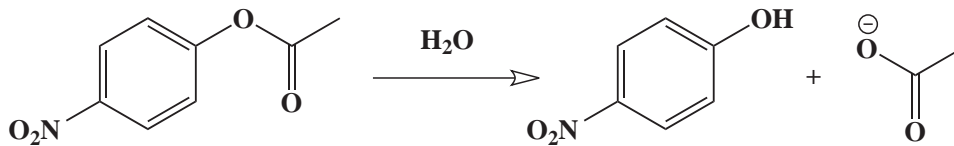


FIGURE 5.4 – Réaction d'hydrolyse de la NPA catalysée par la CAB.

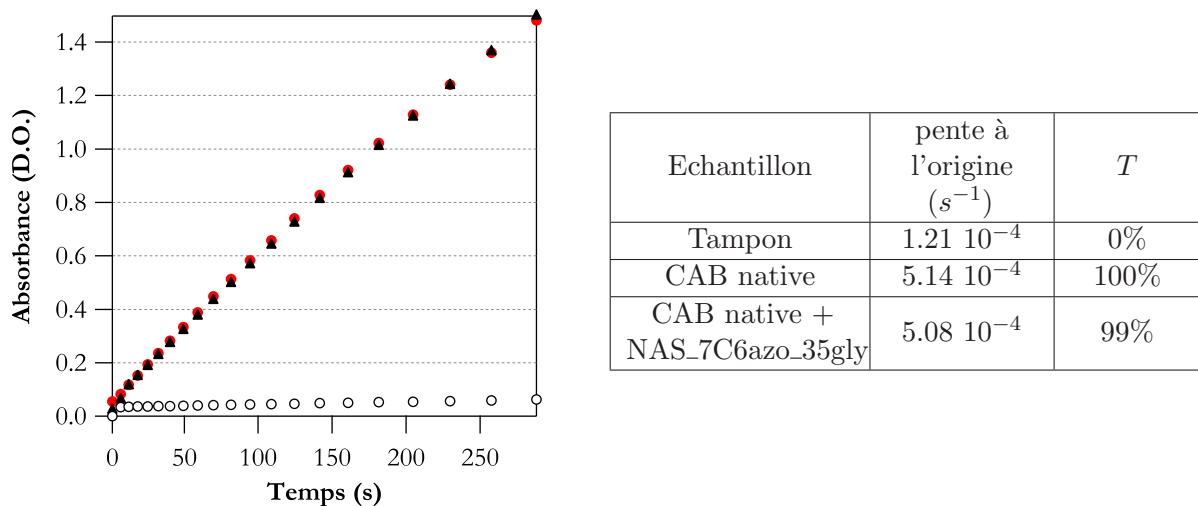


FIGURE 5.5 – Activité enzymatique de la CAB native en présence de polymères. (A gauche) Evolution de l'absorbance en fonction du temps (○) tampon (●) CAB native seule et (▲) CAB native en présence de NAS\_7C6azo\_35gly. (A droite) Valeurs des penne à l'origine et des activités enzymatiques résultantes.

Les mesures sont réalisées sur des échantillons de 3 mL contenant environ  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$  soit  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de CAB. La réaction est déclenchée par ajout de  $30 \mu\text{L}$  d'une solution de NPA à  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  dans l'acétonitrile. On enregistre l'évolution de l'absorbance à 420 nm pendant 300 s. L'échantillon est thermostaté à  $20^\circ\text{C}$ . Le taux d'activité enzymatique, noté  $T$ , est défini par

$$T = \frac{p - p_{\text{autolyse}}}{p_{\text{native}} - p_{\text{autolyse}}}, \quad (5.1)$$

avec  $p$  la penne à l'origine de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans l'échantillon étudié,  $p_{\text{autolyse}}$  la penne à l'origine en l'absence de protéine et  $p_{\text{native}}$  la penne à l'origine en présence de protéine native. Chaque mesure est effectuée trois fois et la valeur de l'activité enzymatique est calculée à partir de la moyenne des penne obtenues pour les trois essais. Pour



caractériser des échantillons contenant une fraction de la CAB sous forme d'agrégats, on utilisera également la valeur  $T_S$  de l'activité enzymatique rapportée à la concentration de protéines solubles.

On a vérifié que le test d'activité enzymatique n'est pas perturbé par la présence de polymères. Les polymères seuls en tampon ne montrent aucune activité enzymatique et ils ne perturbent pas non plus l'activité de la CAB native.

La figure 5.5 montre que le NAS\_7C6azo\_35gly n'affecte pas l'activité enzymatique de la CAB. Tous les polymères utilisés ont été testés de la même manière et n'ont pas d'influence sur l'activité enzymatique de la CAB native (résultats non présentés).

#### 5.2.2.4 Conclusion

D'après les résultats obtenus en électrophorèse capillaire, dichroïsme circulaire et activité enzymatique, on peut conclure que les polymères n'ont pas d'effet sur la CAB native en milieu aqueux. Ils ne forment pas de complexes, ni ne modifient sa structure secondaire, ni n'empoisonnent son activité enzymatique.

### 5.2.3 Polymère et CAB dénaturée

Pour avoir un effet chaperonne, il faut que le polymère s'associe spécifiquement avec la protéine dénaturée. Pour étudier les interactions entre le polymère et les structures dépliées de la CAB, on effectue des mesures d'électrophorèse capillaire, de fluorescence et de dichroïsme circulaire.

#### 5.2.3.1 Electrophorèse capillaire

On effectue les mêmes expériences d'électrophorèse capillaire que celles présentées au paragraphe 5.2.2.1 mais sur des échantillons de CAB préalablement dénaturée en présence de polymère puis diluée brutalement dans du tampon.

Les électrophérogrammes en bas de chaque graphique de la figure 5.6 sont le résultat de l'analyse d'une solution CAB/polymère après 24h de renaturation à  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  dans le noir. Dans aucun cas on n'observe un pic de même mobilité que celle de la protéine native, sauf peut-être dans le cas du mélange CAB/PAA\_5C6azo, mais le pic est alors de très faible amplitude. Cela signifie qu'au bout de 24h de renaturation, on ne trouve pratiquement pas de CAB à la fois native et libre dans le milieu. Ces mêmes remarques s'appliquent aux échantillons ayant subi une irradiation sous UV.

Mobilités ( $10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Aires des pics à différentes mobilités				Total
	64	165	300	348	
mélange CAB native/PAA_5C6azo	2666			839	3504
mélange CAB native/PAA_1C6azo	2680			121	2801
PAA_5C6azo dans le noir	164		989		1153
PAA_5C6azo sous UV			1058		1058
PAA_1C6azo dans le noir		1936			1936
PAA_1C6azo sous UV		2101			2101

TABLE 5.2 – Aires des pics normalisées par leur temps de migration moyen ( $\text{s}^{-1}$ ) à différentes mobilités.

Pour une étude plus quantitative des ces expériences, on peut se reporter au tableau 5.2 donnant l'aire des différents pics observés sur les électrophérogrammes. Les aires des pics polymères PAA\_5C6azo et PAA\_1C6azo ne sont pas équivalentes, car l'absorbance observée est

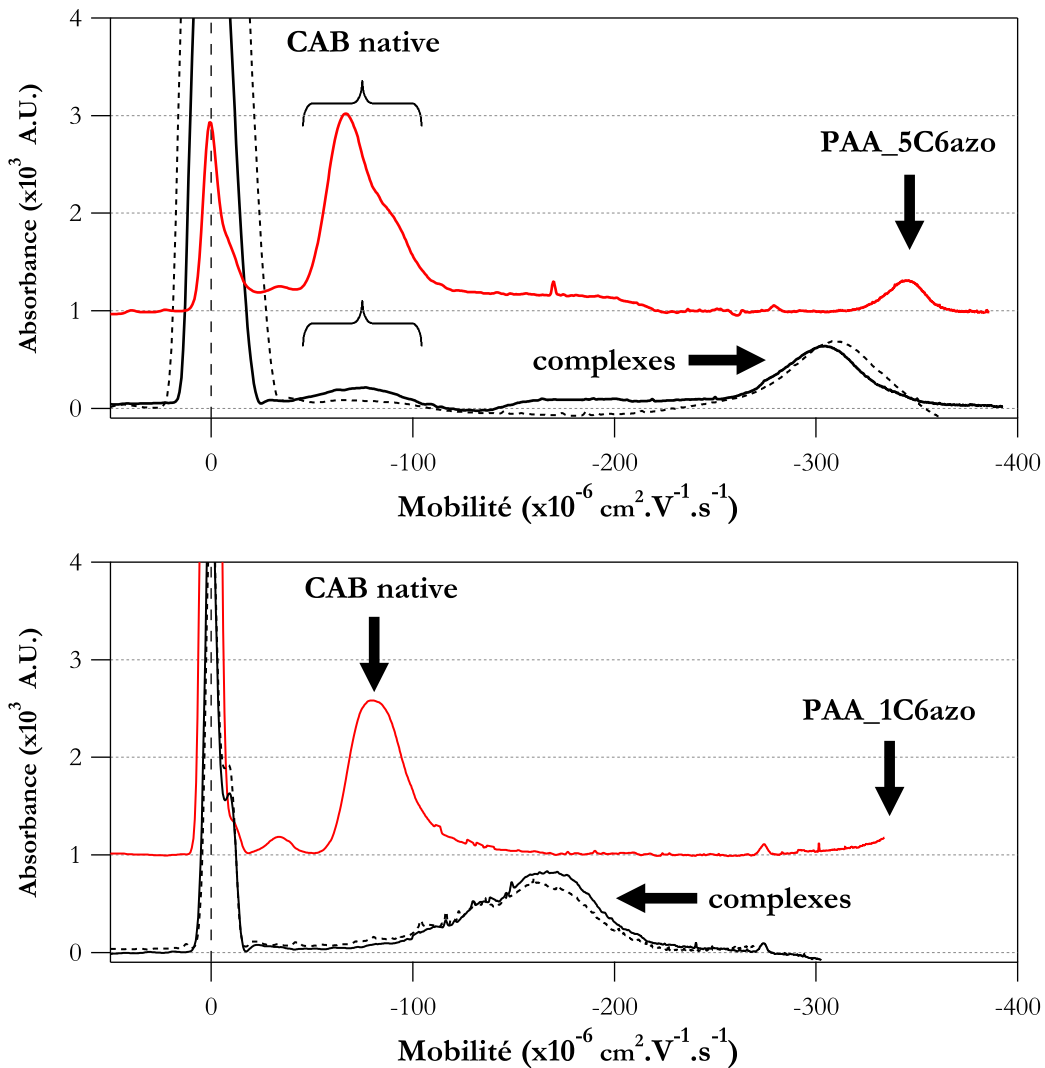


FIGURE 5.6 – Electrophérogrammes de la CAB à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  après renaturation en présence de polymère. (—) mélange CAB native/polymère, (—) mélange CAB/polymère après 24h de renaturation à  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  (—) même échantillon après 20 min d'irradiation UV. L'absorbance est mesurée à 205 nm.

en grande partie due aux azobenzènes. D'après l'étude de la dernière colonne du tableau, on remarque que, pour l'échantillon renaturé en présence de PAA\_5C6azo, on ne récupère que 30% de la quantité totale protéine/polymère analysée. Cette valeur est de l'ordre de 70% en présence de PAA\_1C6azo. Il est possible que la protéine non détectée soit restée adsorbée aux parois du capillaire, soit se situe dans le pic des espèces neutres dont l'intensité est essentiellement apportée par le marqueur MeO utilisé et l'urée résiduelle. Il est peu probable que des protéines, même sous forme d'agrégats, soient totalement neutres. On pourrait analyser l'échantillon à d'autres pH afin de distinguer ces deux cas, mais notre propos est ici de montrer la formation des complexes. Une fraction de protéine détectée a une mobilité plus grande que la protéine native et est donc certainement complexée par le polymère.

On en conclut qu'il y a une association très forte entre la protéine dénaturée et le polymère. L'irradiation sous UV ne semble pas permettre la dissociation de ces complexes.

### 5.2.3.2 Fluorescence

Les mesures de fluorescence vont confirmer l'existence de complexe polymère/protéine dénaturée et vont également montrer que l'état de la CAB dans ces complexes dépend de la nature du polymère.

#### La fluorescence de la CAB dépend de son état de dépliement...

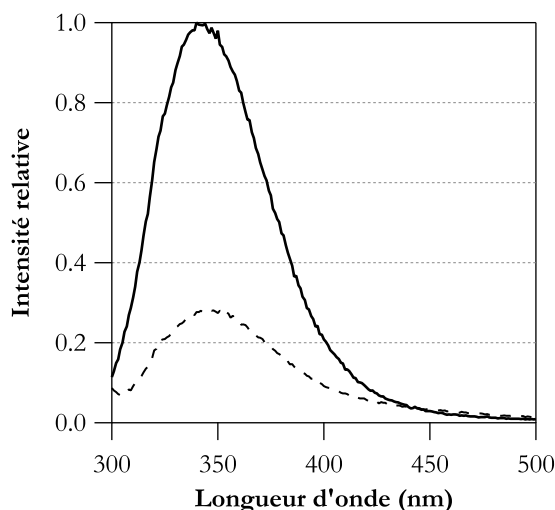


FIGURE 5.7 – Spectre d'émission de fluorescence de la CAB à  $0.030 \text{ g.L}^{-1}$  avec une excitation à 290 nm. (—) à l'état natif, (---) à l'état dénaturé en présence de  $8.8 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée.

La CAB présente une fluorescence intrinsèque due à la présence de sept tryptophanes dans sa structure. A l'état natif, on observe un maximum vers 340 nm pour une excitation à 290 nm, comme illustré figure 5.7. A l'état dénaturé (voir le paragraphe dénaturation pour plus détails), l'intensité est plus faible et son maximum s'est décalé vers 350 nm. C'est un résultat classique qui s'explique par le changement d'environnement des tryptophanes lors de la dénaturation [Creighton 1992]. Lorsque la protéine est dépliée, ils sont exposés à un milieu polaire et ont un maximum de fluorescence à 350 nm. Quand la protéine est native, ils sont enfouis dans un environnement beaucoup plus hydrophobe, or en solvant apolaire, un tryptophane a un maximum de fluorescence vers 330 nm.

On choisit de suivre les effets de la renaturation sur la fluorescence en observant l'évolution de l'intensité à 347 nm. Comme pour le cytochrome C, il faut corriger les données brutes obtenues en fluorescence en présence de polymères selon la méthode présentée en annexe B.1.1.

#### ... mais aussi de son interaction avec les polymères modifiés azobenzènes

L'observation de la fluorescence d'un mélange CAB/polymère va permettre de savoir si un état compact de la CAB est atteint ou non et si certains azobenzènes sont proches de la CAB ou non. En effet, les variations de la fluorescence intrinsèque de la CAB au cours de sa renaturation en présence de polymères modifiés azobenzènes reposent non seulement sur l'évolution de la structure de la protéine vers un état compact, mais aussi sur la proximité entre azobenzène/tryptophane qui module les phénomènes de quenching sensibles à la structure des complexes et à la configuration des azobenzènes.

Le spectre d'absorption de l'azobenzène se superpose au spectre d'émission du tryptophane. Ainsi, il peut y avoir un transfert non radiatif de l'excitation du tryptophane vers l'azobenzène qui se traduit par une diminution de la fluorescence. L'intensité du quenching doit diminuer avec l'augmentation de la distance azobenzène/tryptophane ou lors du passage de la forme trans à

la forme cis de l'azobenzène, à cause du moins bon recouvrement des spectres d'absorption de la forme cis et d'émission du tryptophane.

Sur la figure 5.8, on peut voir l'évolution de la fluorescence de la CAB pendant sa renaturation en présence de PAA\_3.5C6azo ou de NAS\_7C6azo\_35gly sous différentes irradiations.

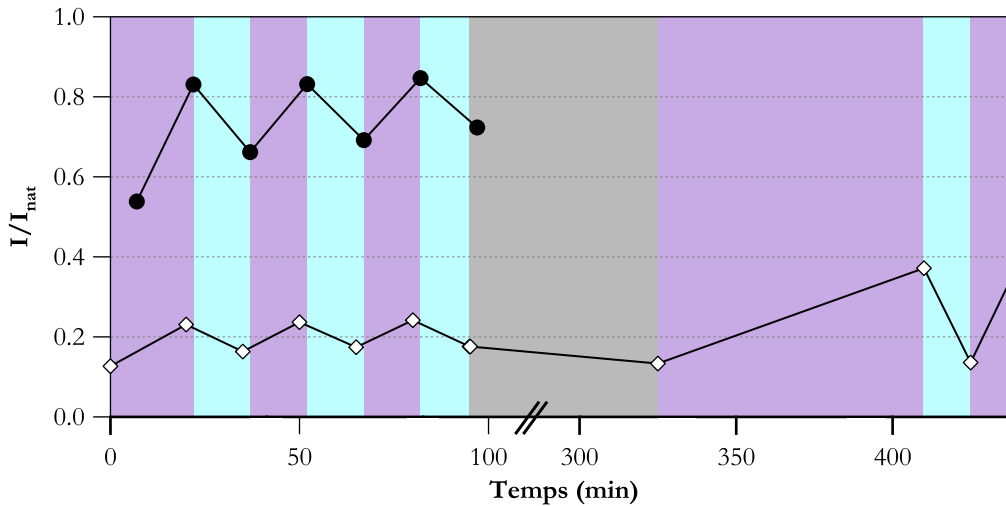


FIGURE 5.8 – Evolution de la fluorescence de la CAB pendant sa renaturation à  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$  en présence (●) de PAA\_3.5C6azo ou (◇) de NAS\_7C6azo\_35gly sous différentes irradiations, (gris) dans le noir, (bleu) sous bleu et (violet) sous UV.

L'observation de la figure 5.8 permet de faire les trois remarques suivantes :

1. Les changements d'irradiation induisent toujours une variation de la fluorescence. Les systèmes répondent donc à la lumière et supportent de nombreux cycles d'irradiation. Ces différences d'intensité de fluorescence, après correction des données selon la méthode présentée en annexe B.1.1, sont la preuve de l'existence d'un quenching des tryptophanes de la CAB par les azobenzènes du polymère. Par conséquent, on est bien en présence de complexes polymère/CAB.
2. Les valeurs d'intensité relative de fluorescence diffèrent beaucoup en fonction du polymère présent. Ceci laisse à penser que la structure de la CAB est différente dans les deux cas, compacte en présence du PAA\_3.5C6azo et encore dépliée en présence du NAS\_7C6azo\_35gly.
3. On remarque une légère augmentation de l'intensité de fluorescence au cours du temps, preuve d'une évolution lente de la structure des complexes.

Plus précisément, l'intensité de fluorescence est représentée figure 5.8 comme le rapport de l'intensité de l'échantillon sur l'intensité de la CAB native. Les mesures de fluorescence de la CAB native étant assez dispersées, des valeurs de  $I/I_{\text{nat}}$  de 1 à 0.85 sont significatives d'une CAB ayant la même fluorescence qu'une CAB à l'état natif. Le système PAA\_3.5C6azo/CAB sous UV présente donc une fluorescence très proche de celle d'une CAB native. On peut en déduire, que dès la dilution de la solution de CAB dénaturée dans le tampon, la protéine se trouve dans un état compact avec ses tryptophanes en son cœur. Sous irradiation bleue, les valeurs de  $I/I_{\text{nat}}$  sont plus faibles que sous UV, probablement à cause d'un quenching plus fort des azobenzènes trans.

Par contre, dans le cas du NAS\_7C6azo\_35gly, les intensités sont faibles par rapport à celles de la CAB native, quelle que soit la conformation des azobenzènes. Ceci peut être caractéristique d'une CAB peu compacte exposant ses tryptophanes au milieu extérieur ou de l'existence d'un quenching très fort même en présence d'azobenzène cis. Des mesures d'intensité de fluorescence de la CAB native en présence de NAS\_7C6azo\_35gly (*cf.* tableau B.2 annexe B.1.1)

ont montré que la CAB, bien que toujours active biologiquement en présence du polymère, présente une fluorescence quenchée et ce quelle que soit l'irradiation. On peut en déduire que le NAS\_7C6azo\_35gly se lie à la CAB native sans affecter son activité biologique mais en mettant des azobenzènes à proximité de certains tryptophanes de la protéine. Cette hypothèse est compatible avec l'observation de la structure de la CAB représentée figure 5.1 page 92 qui montre deux tryptophanes très accessibles de l'extérieur.

En résumé, ces expériences confirment la persistance d'une proximité spatiale entre groupes azobenzènes et résidus de la CAB, donc l'existence de complexes protéine/polymère. De plus, la structure de la protéine et son évolution au cours de la renaturation est fortement affectée par la nature du polymère. Dans tous les cas, les complexes sont photo-stimulables car on observe bien le changement de conformation des azobenzènes.

### 5.2.3.3 Dichroïsme circulaire

On peut finalement détecter l'association CAB dépliée/polymère au niveau de la structure interne de la protéine par des mesures de dichroïsme circulaire. Ces dernières ont été effectuées sur des échantillons de protéines dénaturées en présence de polymère, puis dilués brutalement en tampon. La figure 5.9 présente les spectres de dichroïsme de la CAB au cours de sa renaturation en présence de PAA\_3.5C6azo et de PAA\_7C6azo\_35gly..

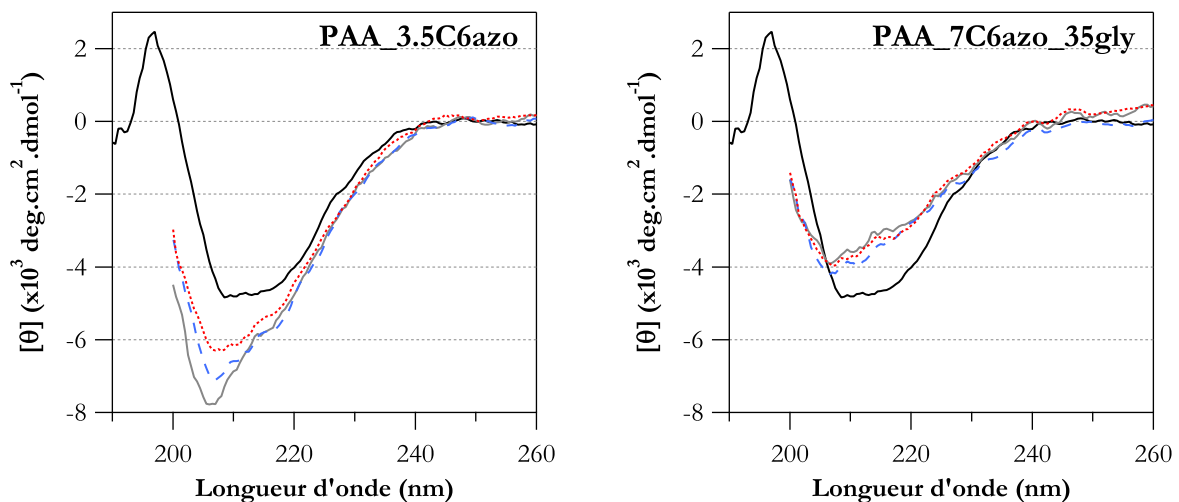


FIGURE 5.9 – Spectres de dichroïsme de la CAB à  $0.14 \text{ g.L}^{-1}$  au cours de sa renaturation en présence de PAA\_3.5C6azo et de PAA\_7C6azo\_35gly. (—) CAB native seule, (—) 10 minutes après dilution en tampon de renaturation, (— —) au bout de 3h de renaturation dans le noir et (- - -) au bout de 5h de renaturation (dont les deux dernières sous UV).

Dans le cas d'une renaturation en présence de NAS\_7C6azo\_35gly, les structures secondaires de la protéine sont modifiées par rapport à celles de la protéine native. On a une perte de la structuration mais qui n'évolue pas au cours du temps. L'assemblage protéine/polymère est figé dans une structure où la protéine ne présente pas de structures secondaires de même type que celles de la protéine native.

Le comportement en présence de PAA\_3.5C6azo est différent. Aux temps courts ( $t \leq 10$  min après dilution en milieu aqueux), on observe un minimum important à 207 nm qui suggère une fraction significative de régions désordonnées. Cependant, à cause de l'absorption UV des échantillons, il n'est pas possible d'étendre la mesure dans l'UV lointain et la proportion précise des diverses structures secondaires n'a pas pu être estimée. Au cours de la renaturation, le minimum s'estompe et le spectre CD se rapproche de celui correspondant à la structure de la

CAB native. Cependant, même après 3h de renaturation dans le noir et 2h sous UV, le spectre CD diffère du spectre natif.

Ces mesures de dichroïsme circulaire montrent que le polymère a un fort impact sur la structure secondaire adoptée par la protéine. De plus, cet effet est fortement dépendant de la nature du polymère.

#### 5.2.3.4 Conclusion

On a démontré qu'il y a une association forte entre la CAB dénaturée et les polymères modifiés azobenzènes. Il y a formation de complexes polymère/protéine détectables en électrophorèse capillaire. Ces complexes ne se dissocient pas sous irradiation UV, mais les mesures de fluorescence montrent que le changement de conformation des azobenzènes a bien lieu. Il serait très intéressant d'avoir une connaissance plus précise de la structure de ces complexes, mais cela nécessiterait notamment des expériences de diffusion aux petits angles que nous n'avons pas eu le temps de réaliser pendant cette thèse, car nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'influence de la chimie de ces polymères sur la renaturation de la CAB.

Le point mis en avant ici est que la nature du polymère influence énormément le repliement de la protéine.

### 5.3 Effet renaturant des polymères

Le but de cette section va être de quantifier l'effet renaturant des polymères, de trouver quels paramètres y sont liés et d'essayer de trouver une composition optimale du polymère. Pour y parvenir, il faut utiliser des méthodes permettant d'obtenir des informations quantitatives sur l'état de renaturation de la protéine. Nous avons choisi d'utiliser des tests de détermination de la quantité de protéines solubles et de la quantité de protéines enzymatiquement actives. Il faut également définir un protocole standard permettant de comparer les différents polymères testés.

#### 5.3.1 Protocole de dénaturation

Afin d'étudier l'association des polymères avec la CAB dénaturée, il s'avère essentiel de définir précisément un protocole de dénaturation. Une étude précédemment réalisée au PPMD [Marheineke 2006] et des articles [Hanson et Gellman 1998; Cleland et Wang 1990] ont conclu à un impact significatif sur la renaturation de paramètres incluant notamment la concentration initiale et finale en protéine, celle de dénaturant, la température et le temps d'incubation. Il est vraisemblable que le degré de dépliement de la CAB dépende des conditions de dénaturation, ce qui affecte sa propension à former des agrégats par dilution brutale dans le tampon de renaturation. Par exemple, la CAB a tendance à se replier spontanément dans l'eau et en particulier en présence d'une concentration résiduelle non négligeable en dénaturant. D'après Cleland and Wang, des concentrations entre 0.3 et 1 g.L<sup>-1</sup> de guanidinium dans le milieu de renaturation conduisent à un repliement efficace.

On choisit donc de travailler avec des conditions de dénaturation drastiques afin d'éviter toute renaturation, de maximiser l'agrégation en l'absence d'additifs et de mettre en valeur l'efficacité des polymères testés. De plus, on choisit de travailler avec l'urée comme dénaturant afin de limiter les interactions polymère/dénaturant. On a donc fixé les paramètres suivants :

- une dénaturation de la CAB en présence d'au moins 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée,
- et une dilution de la solution dénaturée au minimum de 20 fois afin de limiter la concentration en urée résiduelle lors du repliement (< 0.4 mol.L<sup>-1</sup>).

Dans l'étude précédemment menée au laboratoire, les préparations de CAB incubée en urée pendant 24h à température ambiante ont donné des échantillons dont le taux de renaturation par dilution brutale était supérieur à 50%. Au contraire, une incubation à plus de 50 C donne toujours un regain d'activité inférieur à 15%. De plus, une concentration en protéines élevée dans

la solution de dénaturation diminue le taux de renaturation. Au final, le protocole satisfaisant toutes nos conditions est celui employé par Gellman *et al.* dans [Hanson et Gellman 1998]. Il consiste en la préparation d'une solution à 25 g.L<sup>-1</sup> en protéines dans 8.8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée qui est chauffée à 70 °C pendant 6 min juste avant son utilisation pour les tests de renaturation par dilution dans un tampon de pH sans urée.

### 5.3.2 Protocole de renaturation

#### 5.3.2.1 Méthode

Après avoir dénaturé la protéine comme décrit ci-dessus, elle est diluée brutalement 40 ou 800 fois dans un tampon TRIS/HCl à 50 mmol.L<sup>-1</sup> et pH=7.75 contenant ou non des additifs. Les concentrations finales en protéine sont respectivement d'environ 0.6 ou 0.03 g.L<sup>-1</sup>. La solution est laissée sous agitation pendant quelques heures, puis on effectue les prélèvements nécessaires aux tests de solubilité et d'activité enzymatique. Les tests sont effectués sur des solutions dont la concentration en protéine a été ajustée à 0.03 g.L<sup>-1</sup>.

#### Solubilité

Pour avoir une mesure du taux de protéines solubles, on procède de la façon suivante :

- on évalue la concentration en protéine par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant comme coefficient d'extinction molaire 1.83 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> [Wong et Tanford 1973]. On choisit comme référence pour la ligne de base l'absorbance à 314 nm afin de limiter l'influence de sa dérive due à la diffusion existant dans les échantillons contenant des agrégats.
- on ultra-centrifuge la solution à 200 000 g pendant 10 min. Ces conditions permettent de faire sédimenter les agrégats d'une taille supérieure à environ 100 nm.
- on prélève ensuite le surnageant et on mesure la concentration en protéines restant en solution par absorbance.

On définit le taux de solubilité par

$$S = \frac{[CAB]_{\text{initiale}} - [CAB]_{\text{après centrifugation}}}{[CAB]_{\text{initiale}}} \quad (5.2)$$

#### 5.3.2.2 Expériences de référence

Les résultats des deux expériences de référence sont présentés dans le tableau 5.3.

Echantillon	Solubilité	$T$	$T_S$
CAB native	94%	100%	100%
sans additif	19%	7%	35%
STS / $\beta$ CD (notre expérience)	67%	63%	88%
STS / $\beta$ CD [Hanson et Gellman 1998]	90%		

TABLE 5.3 – Solubilité et activité enzymatique pour différents protocoles de renaturation de la CAB. Les marges d'erreur à prendre en compte sont de  $\pm 3\%$ .

#### Interprétation de la grandeur $T_S$

Bien que non reportée ici, l'activité enzymatique dans les surnageants de centrifugation a également été mesurée. Cette activité est égale à l'activité enzymatique trouvée pour l'ensemble de la solution avant centrifugation, c'est-à-dire contenant protéines solubles et agrégats. On peut donc en déduire que les agrégats éliminés par ultracentrifugation sont biologiquement inertes. Cette remarque est valable quelles que soient les conditions de renaturation testées, avec ou

sans additif et avec ou sans polymère. Par ailleurs, la grandeur  $T_S$  rend compte de l'activité des protéines solubles. Si l'on attribue cette activité à une fraction des CAB qui serait parfaitement renaturée et coexisterait avec des protéines encore mal repliées,  $T_S$  donne une information sur la quantité de protéines solubles mais mal renaturées. Il faut cependant nuancer cette dernière interprétation par la prise en compte de deux phénomènes plus subtils modulant l'activité et la fraction en monomère de protéines.

1. L'ultracentrifugation n'élimine pas la totalité des agrégats. Des oligomères de CAB, s'il s'en forme, resteront en solution et ils peuvent présenter une activité différente de la CAB native.
2. Il suffit de très peu de choses pour qu'une protéine perde son activité biologique. Un défaut localisé au voisinage du site actif dans sa structure tridimensionnelle ou la présence d'une molécule empoisonnant ce site actif peuvent faire chuter l'activité enzymatique.

En conclusion, on peut retenir que  $T_S$  donne néanmoins un indice de renaturation de la CAB indépendant du problème posé par l'agrégation.

### Renaturation sans additifs

Lors de la renaturation de la CAB uniquement en présence de tampon, on mesure une solubilité très faible qui est en accord avec l'agrégation massive de la protéine, souvent visible à l'œil nu. Il en découle une activité enzymatique  $T$  très faible, de 7%. Ces résultats montrent bien la nécessité d'utiliser des additifs pour obtenir des taux de renaturation satisfaisants.

La valeur de  $T_S$  obtenue en absence d'additif valide notre choix de protocole. Comme environ 2/3 de l'activité s'avère non récupérable, même au sein de la fraction soluble, l'augmentation de  $T_S$  traduira un effet renaturant effectif et pas seulement un effet de simple maintien en solution.

### Renaturation selon la méthode de Gellman *et al.*

Afin d'avoir une expérience de référence fixant un taux de renaturation accessible en pratique sur le système utilisé, on a appliqué le protocole de renaturation assisté par des micelles de tensio-actifs décrit par Gellman *et al.* [Hanson et Gellman 1998]. La solution de CAB dénaturée est diluée dans un milieu contenant  $0.57 \text{ mmol.L}^{-1}$  du tensio-actif STS de manière à obtenir une concentration en protéine de  $0.043 \text{ g.L}^{-1}$ , puis on laisse sous agitation pendant 2h. On séquestre ensuite le STS en le complexant par un excès de cyclodextrine, ici la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (Me $\beta$ CD), afin d'avoir une solution contenant  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$  de CAB,  $0.4 \text{ mmol.L}^{-1}$  de STS et  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$  de Me $\beta$ CD. Après 2h d'incubation, on effectue les tests de solubilité et d'activité enzymatique (*cf.* tableau 5.3).

La répétabilité de la manipulation a été vérifiée et nous avons toujours trouvé un écart d'environ 30% entre nos résultats d'activité globale et ceux publiés par Gellman *et al.* L'explication est probablement liée à la valeur de la solubilité qui n'est que de 67%. On a alors une valeur de  $T_S$  qui est bien comparable avec les valeurs rapportées par Gellman *et al.* Il se trouve que, dans certains lots, nous avons parfois observé la présence d'agrégats dans les solutions de CAB native (jusqu'à 20% de perte par ultracentrifugation).

#### 5.3.2.3 Détermination d'un protocole maximisant l'effet des polymères

Les résultats présentés ci-dessus ont permis de valider les protocoles de dénaturation et de renaturation choisis. En effet, on a observé très peu de renaturation en l'absence d'additifs et un fort regain d'activité enzymatique avec une méthode déjà validée. La conduite de ces expériences en présence des différents polymères va donc permettre de juger leur capacité d'aider à la renaturation de la CAB.



### Influence des polymères sur les mesures de solubilité

Dans ce chapitre, on va utiliser deux types de polymères, ceux qui portent des greffons azobenzènes et ceux qui n'en portent pas. Les polymères sans azobenzène sont transparents et n'absorbent pas la lumière à 280 nm, ils ne vont donc pas perturber la mesure de la concentration en CAB. Par contre, les polymères contenant des azobenzènes ont une absorbance non négligeable à 280 nm. Le coefficient d'absorption molaire à cette longueur d'onde sous irradiation bleue peut varier de 0.5 à 2.5 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> en fonction du taux de modification du polymère (les valeurs correspondent respectivement au PAA\_1C6azo et au NAS\_7C6azo\_14gly). En présence de ces polymères, il n'est pas possible d'évaluer précisément la concentration en CAB par spectrophotométrie, mais on peut mesurer la concentration en polymère à 347 nm avant et après ultracentrifugation. On sait, d'après les mesures d'électrophorèse capillaire présentées au paragraphe 5.2.3.1, qu'il y a une association forte entre polymère et protéine. Sachant que les solutions de renaturation présentent une stœchiométrie d'environ une chaîne de polymère par protéine, la fraction de polymère libre est très probablement faible. Le polymère seul étant toujours soluble, trouver une valeur de  $S$  inférieure à 100% signifie qu'il a été entraîné dans des agrégats formés par les protéines auxquelles il est lié. On peut, en première approximation, assimiler la solubilité du polymère à celle de la protéine.

Afin de valider l'approximation précédente, on a mesuré dans quelques cas la solubilité de la CAB par une méthode de dosage colorimétrique spécifique des protéines, la méthode BCA [Thermo-Scientific]. Le polymère ne perturbe pas le dosage. Malgré l'avantage de cette méthode qui permet de mesurer la solubilité de la protéine sans voir d'interférence des polymères, même modifiés azobenzènes, elle n'a pas été employée systématiquement. En effet, elle est peu précise dans la gamme de concentrations utilisée.

Polymère	Solubilité du polymère A(347 nm)	Solubilité de la protéine dosage BCA
PAA_7C6azo_35gly	94 ± 1%	100 ± 25%
NAS_3C6azo_20PEG_63EtOH	61 ± 1%	73 ± 50%

TABLE 5.4 – Comparaison des solubilités obtenues par deux méthodes de dosage différentes.

Les valeurs de solubilité de la protéine obtenues par dosage BCA sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par spectrophotométrie pour le polymère (*cf.* tableau 5.4). Ces mesures nous permettent de confirmer que les solubilités de la protéine et du polymère sont liées et que l'on peut les assimiler l'une à l'autre.

Pour résumer, les valeurs de  $S$  se référeront à la solubilité de la CAB dans le cas des polymères transparents et à la solubilité du polymère dans le cas de la présence d'azobenzènes (elles sont alors signalées par une \*).

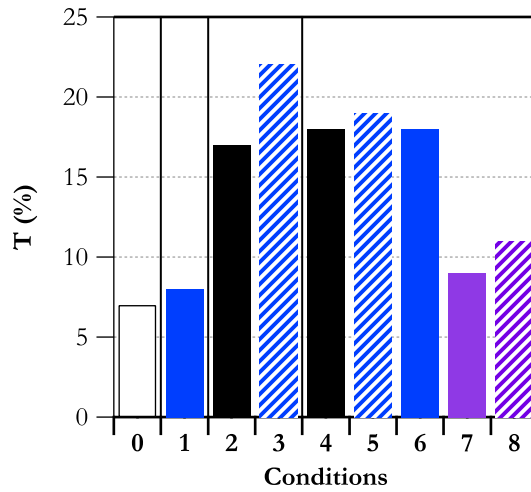
### Choix des paramètres pertinents

L'étude exhaustive des polymères modifiés azobenzène comme additifs de renaturation nécessiterait la prise en compte d'un très grand nombre de paramètres. Nous nous sommes en particulier focalisés sur l'impact de la nature du polymère et sur l'effet de la lumière. Dans ce but, il faut mettre en place un protocole permettant de comparer différents polymères entre eux tout en maximisant leur efficacité.

La caractérisation de divers échantillons contenant du 7.5\_PAA\_4C6azo est présentée figure 5.10. Ces résultats nous ont guidés dans le choix des conditions expérimentales. Nous avons, sur cet exemple, pu rapidement considérer l'influence :

- du rapport CAB/polymère,
- du mélange des partenaires en urée plutôt que dans le tampon de renaturation,
- d'expositions plus ou moins longues sous UV.

Le 7.5\_PAA\_4C6azo est un polymère modifié à 4% C6azo mais issu d'un précurseur PAA de faible masse molaire,  $\overline{M}_n = 7\,500 \text{ g.mol}^{-1}$ .



Conditions	$\frac{[CAB]}{[pol]}$ (g/g)	Ajout du polymère dans	Renaturation	
			Durée	Irradiation
0	0		2h	lumière ambiante
1	1	le tampon	1h	bleu
2	1	la solution de dénaturation	2h	noir
3	1		3h	1h noir/2h UV
4	2		2h	noir
5	2		2h	1h noir/1h UV
6	2		2h	bleu
7	2		2h	UV
8	2		2h	1h noir/ 6 cycles 5 min UV/5 min bleu

FIGURE 5.10 – Conditions de renaturation de la CAB avec le 7.5\_PAA\_4C6azo et activité enzymatique résultante. Les marges d'erreur sur les valeurs de  $T$  sont de  $\pm 1\%$ .

**Influence de la concentration en polymère** On obtient des valeurs de  $T$  très proches pour 1 g de CAB par gramme de 7.5\_PAA\_4C6azo et pour 2 g de CAB par gramme de 7.5\_PAA\_4C6azo dans des conditions équivalentes (comparaison de 2 avec 4 et de 3 avec 5). Le même type de résultats a été obtenu pour des polymères à chaîne plus longue comme le PAA\_3.5C6azo (résultats non reportés). Vu le faible impact d'un doublement de concentration en polymère, nous avons décidé de toujours travailler par la suite à un taux CAB/polymère fixe de 1 g/g, c'est-à-dire entre 1 et 1.4 protéines par chaîne de polymère (respectivement pour des masses molaires de 30 000 et 42 000  $\text{g.mol}^{-1}$ ).

**Conditions de mise en contact entre le polymère et la CAB dénaturée** Afin de maximiser les interactions polymère/CAB et de favoriser leur association, on ajoute le polymère concentré directement dans la solution de CAB préalablement dénaturée, puis on chauffe à nouveau cette solution à 70 °C pendant 6 min.

Cette procédure n'est pas anodine vis à vis de la renaturation. En effet, lorsque l'on fait le test d'ajouter le 7.5\_PAA\_4C6azo dans le tampon de renaturation et non pas dans la solution concentrée de CAB et d'urée, on obtient une activité enzymatique de 8%, équivalente à celle

mesurée en l'absence d'additif. L'ajout du même polymère à la CAB dénaturée conduit à une augmentation significative de l'activité enzymatique dans plusieurs conditions,  $T > 17\%$ . De plus, l'ajout du polymère uniquement dans le tampon de renaturation ne suffit pas pour empêcher qu'une fraction de protéine forme des agrégats visibles à l'oeil nu. C'est probablement la faible concentration du polymère dans le tampon de renaturation ( $0.03 \text{ g.L}^{-1}$ , comme la CAB) qui joue ici en défaveur de la rencontre stabilisante polymère/CAB par rapport aux rencontres CAB/CAB.

**Gestion de l'effet de lumière** Il est important de noter que, dans les conditions choisies, il n'est pas intéressant d'irradier la solution dénaturée, car à cette concentration, l'absorbance atteint de telles valeurs que les photons UV ne stimulent pas le cœur de la solution. De plus, le degré d'exposition devient fortement hétérogène dans la solution. Ainsi, à l'instant initial, les polymères seront majoritairement sous forme trans.

On a testé la renaturation dans le noir, sous exposition permanente UV ( $365 \pm 10 \text{ nm}$ ) ou bleu ( $436 \pm 10 \text{ nm}$ ), respectivement les conditions 4, 6 et 7. Le taux d'activité enzymatique obtenu sous UV est deux fois plus faible que ceux obtenus dans le noir et sous bleu. Comme l'hydrophobie du polymère est plus faible sous UV, il est tentant d'associer la perte d'efficacité avec un affaiblissement des associations CAB/polymère.

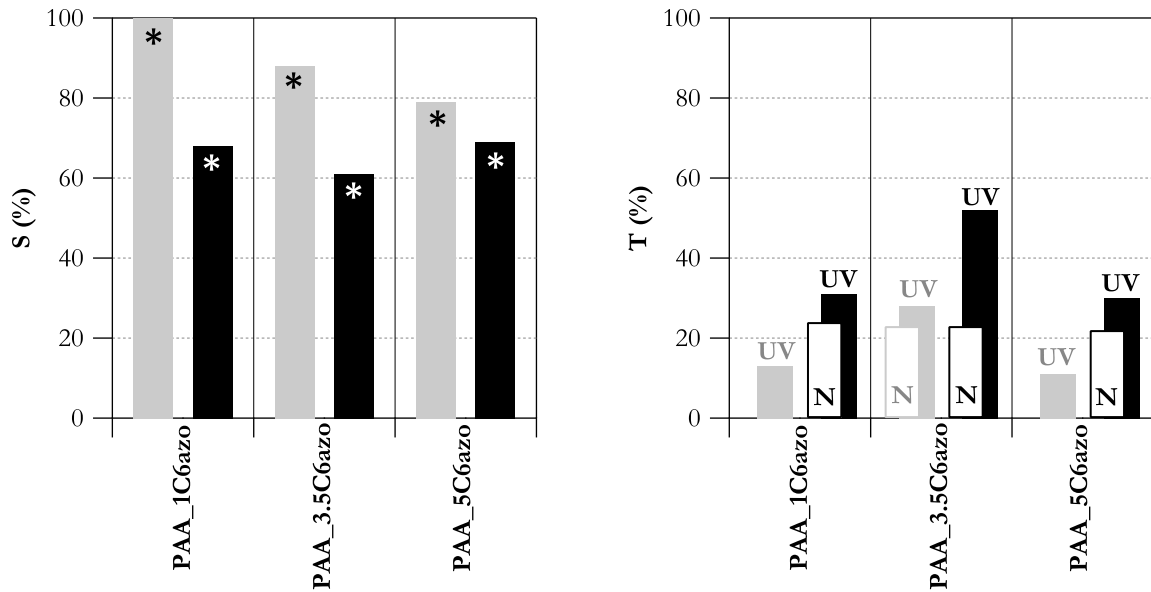
Cette constatation a conduit à l'utilisation de protocoles d'irradiation commençant toujours par une période d'incubation dans le noir d'au moins 1h. Ensuite, soit l'échantillon est irradié pendant une autre heure sous UV (conditions 3 et 5), soit il est soumis à des cycles courts UV/bleu (condition 8). La figure 5.10 reflète l'influence de ces différences d'exposition. Si le degré de renaturation reste toujours plutôt faible avec ce polymère, l'exposition sous UV et la durée de son application a des conséquences notables. Dans la suite, nous allons donc comparer plusieurs polymères en l'absence de lumière, puis après une exposition continue et longue (quelques heures) sous UV pour mettre en évidence de façon systématique l'existence ou non de cet effet d'irradiation.

**Résumé du protocole de renaturation en présence de polymère** La protéine est dénaturée par chauffage pendant 6 min à  $70^\circ\text{C}$  en présence de  $8.8 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée. On pèse dans un ependorf quelques milligrammes de polymère lyophilisé sur lesquels on ajoute la solution de CAB dénaturée afin d'obtenir une concentration en polymère de  $25 \text{ g.L}^{-1}$ . La solution est alors chauffée de nouveau pendant 6 min à  $70^\circ\text{C}$ . Elle est ensuite diluée brutalement 40 ou 800 fois dans un tampon TRIS/HCl à  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  et  $\text{pH}=7.75$ . On prend la précaution de manipuler dans le noir. Les concentrations finales en protéine et en polymère sont soit de  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$ , soit de  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$ . La solution est laissée sous agitation à l'abri de la lumière pendant 2h, puis on irradie l'échantillon, toujours sous agitation, en lumière UV pendant 3h. Lors de l'utilisation de polymères ne contenant pas d'azobenzènes, l'échantillon est manipulé à la lumière ambiante.

### 5.3.3 L'effet renaturant des polymères de type PAA<sub>x</sub>C6azo

Dans ce paragraphe, on va se focaliser sur les polymères dérivés du PAA. Leur étude permet de définir des critères d'efficacité pour la renaturation qui seront mis en application sur l'ensemble des polymères dans la section 5.3.4. Il s'agit également, dans le cas restreint des dérivés PAA, de mettre en évidence un comportement particulier à une protection par les complexes macromoléculaires ainsi que l'effet du basculement photo-contrôlé d'hydrophobie.

La figure 5.11 regroupe les résultats de solubilité et d'activité enzymatique de la CAB obtenue pour une renaturation en conditions diluées ou concentrées en présence de polymères modifiés C6azo pour des incubations de 2h dans le noir puis 3h sous UV.



Polymère	[CAB] (g/L)	Solubilité 2h noir + 2h UV	Taux d'activité enzymatique	
			2h noir	2h noir + 2h UV
PAA_1C6azo	0.03	100%		13%
	0.6	68%	24%	31%
PAA_3.5C6azo	0.03	88%	23%	28%
	0.6	61%	23%	52%
PAA_5C6azo	0.03	79%		11%
	0.6	69%	22%	30%

FIGURE 5.11 – Représentation de la solubilité  $S$  et de l'activité enzymatique  $T$  de la CAB après renaturation en présence de polymères modifiés C6azo. Solution de renaturation à (gris)  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$  de CAB, (noir)  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  de CAB. (Au premier plan, barres vides) après 2h d'incubation dans le noir, (à l'arrière plan, barres pleines) puis 2h d'incubation sous UV. (\*) Les barres marquées correspondent aux échantillons où la solubilité reportée est celle du polymère.

### 5.3.3.1 Protection contre l'agrégation

#### Maintien de la solubilité

Quels que soient les polymères testés, l'activité enzymatique après renaturation n'a jamais atteint le niveau obtenu avec l'utilisation de tensio-actifs dans la méthode de Gellman *et al.*, avec les polymères on a  $T < 50\%$ . Cela ne vient pas d'un effet de la solubilité qui est au contraire plus élevée que dans le protocole de référence de Gellman. Les polymères présentés ici protègent donc efficacement contre l'agrégation, mais le retour de l'activité enzymatique est limité par un autre phénomène.

#### Renaturation à concentration en CAB plus élevée ( $0.6 \text{ g.L}^{-1}$ )

On observe une plus grande solubilité dans le cas d'une renaturation en conditions diluées que dans le cas de l'utilisation des conditions concentrées. Ceci est attendu car l'agrégation repose sur la cinétique des rencontres intermoléculaires. Ces dernières sont accélérées d'un facteur de l'ordre de 400 entre les conditions les plus diluées et la plus forte concentration considérée.

Par contre, il est plus inattendu d'observer une augmentation du taux de renaturation en parallèle de cette diminution de solubilité. En conditions diluées, les taux de renaturation sont assez proches des taux observés pour la renaturation de la CAB sans additif, alors qu'en condi-

tions concentrées, leur valeur a au minimum doublé. Une explication probable de ce phénomène vient du fait que les complexes auront moins tendance à se dissocier lorsque leur concentration finale dans le milieu est plus forte. Les protéines seraient alors mieux protégées pendant leur repliement.

Les polymères modifiés C6azo permettent donc le maintien de la solubilité et une renaturation à forte concentration en protéine (de l'ordre de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). La protection électrostatique due à l'enrobage de la protéine par une ou des chaînes de polymère répulsives entre elles peut assurer la stabilité des solutions, même très concentrées. L'émergence de ce comportement différencie clairement le bénéfice apporté par un polymère en comparaison de simples effets de ralentissement de cinétiques d'agrégation liés à la dilution.

### 5.3.3.2 Effet de l'irradiation en UV

Il est remarquable d'observer que les valeurs de  $T$  (entre 22 et 24% en conditions concentrées) au bout de 2h dans le noir sont contenues dans un intervalle de l'ordre de l'incertitude de mesure. Cela ne permet pas de distinguer un polymère particulièrement protecteur en conditions "passives". Après irradiation UV, l'étalement des taux de renaturation (entre 28 et 52% en conditions concentrées) met au contraire en avant les propriétés photostimulables de certains complexes polymère/protéine.

La photostimulabilité des polymères est à l'origine de la différenciation de leur efficacité vis à vis de la renaturation de la CAB. De plus, lors du basculement photocontrôlé d'hydrophobie, les polymères passent de l'état d'additifs protecteurs passifs à des systèmes potentiellement actifs dont l'état d'association peut influencer sur le chemin de repliement dans la mesure où l'association de ces polymères affecte le repliement de protéines (cf chapitre 4).

#### Cas du PAA\_3.5C6azo

On peut choisir le PAA\_3.5C6azo pour une étude plus poussée de l'effet de lumière. On a mesuré la cinétique de regain d'activité enzymatique de la CAB pour une renaturation en conditions diluées en présence de PAA\_3.5C6azo dans le noir. Les résultats sont présentés figure 5.12. La cinétique a été suivie sur 2h puis complétée par une mesure à 24h, représentée par la ligne

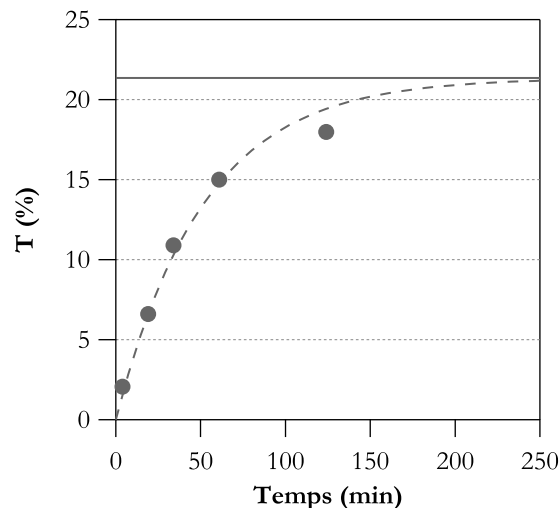


FIGURE 5.12 – Cinétique de renaturation de la CAB à  $0.03 \text{ g.L}^{-1}$  en présence de PAA\_3.5C6azo dans noir. (—) valeur à 24h, (---) ajustement selon une cinétique du premier ordre.

continue. Les données expérimentales ont été interpolées par une équation cinétique du premier ordre,

$$T = T_{final} - \Delta T \exp(-k t), \quad (5.3)$$

avec  $T_{final}$  la valeur obtenue à 24h et  $\Delta T$  l'amplitude.

Par extrapolation, on trouve un temps de demi-vie  $t_{1/2}$  de 36 min. Cette valeur de  $t_{1/2}$  n'est pas comparable à celles mesurées par Gellman et Semisotonov (*cf.* paragraphe 5.2.1 page 92). On peut conclure de cette différence que, dans les conditions utilisées, l'étape cinétiquement déterminante met probablement en jeu les complexes polymère/CAB.

D'après la cinétique présentée figure 5.12, on peut dire que la majorité de l'activité enzymatique est récupérée après 2h de renaturation et que ce degré de renaturation, de l'ordre de 20%, n'évolue plus par la suite. On peut alors faire l'hypothèse d'une renaturation en deux étapes :

- le regain d'activité enzymatique obtenu dans les deux premières heures de renaturation dans l'obscurité peut être interprété comme celui dû aux protéines ayant été protégées de l'agrégation par association avec le polymère, mais ayant pu s'en dissocier ou étant liées suffisamment faiblement pour que le polymère ne gêne pas le repliement,
- à la suite de cela, l'étape d'irradiation permet l'affaiblissement cette association polymère/protéine (comme cela a été démontré dans le cas de l'association polymère/protéine native, *cf.* chapitre 3). S'enclenche alors la renaturation d'une partie des protéines encore inactives à l'issue de la première étape.

Dans le cadre de ce modèle, la nature du squelette polymère impacterait essentiellement la phase de renaturation dans le noir, car elle intervient sur la capacité à s'associer à la CAB et à la protéger de l'agrégation. Par contre, le taux de modification azobenzène aurait un impact sur la phase de renaturation sous irradiation. C'est d'ailleurs ce que l'on observe expérimentalement, l'activité enzymatique augmente de 7% dans le cas du PAA\_1C6azo, de 13% dans le cas du PAA\_5C6azo et de 29% dans le cas du PAA\_3.5C6azo. On remarque que le polymère le plus efficace dans cette deuxième phase de renaturation est le PAA\_3.5C6azo qui a aussi été identifié au chapitre 3 comme celui présentant les meilleures capacités de photodissociation avec les micelles de TX 100.

En résumé, les polymères modifiés C6azo permettent un retour de l'activité enzymatique d'une protéine incapable de se renaturer seule et ce même dans des solutions concentrées. Cela en fait des outils très appréciables dans les problématiques de renaturation de protéines d'intérêt. De plus, ce sont des additifs actifs car capables par un stimulus lumineux de changer leur association et leur effet sur la protéine.

### 5.3.4 Impact de la nature du polymère sur son efficacité

Nos réflexions au cours de ce chapitre nous ont déjà amenés plusieurs fois à nous rendre compte que la nature du polymère peut avoir un fort impact sur la renaturation de la CAB. Notre but dans cette section va être de déterminer l'influence des divers paramètres ajustables par modification chimique de ces polymères, comme le taux d'hydrophobie, la charge, la capacité à faire des liaisons hydrogène... Pour y parvenir, nous allons utiliser le protocole défini page 106 maximisant l'effet des polymères et permettant ainsi leur comparaison dans les meilleures conditions.

#### 5.3.4.1 Les différents polymères utilisés

Les polymères testés sont ceux dont la synthèse est décrite au chapitre 2. Ils sont conçus autour d'un squelette hydrophile comportant des greffons hydrophobes photostimulables. On va ainsi pouvoir juger :

- du rôle de l'hydrophobie en faisant varier le taux de greffons hydrophobes. Pour les polymères à squelette PAA, on va observer une gamme de polymères avec des taux de greffage variant de 0% pour la chaîne de PAA pur à 5% pour le PAA\_5C6azo.
- du rôle du squelette hydrophile en jouant sur les charges. Les squelettes peuvent être composés de deux motifs chargés négativement, soit un motif acrylate de sodium, soit un motif glycine. Chaque motif comporte un groupe  $\text{COO}^-$ , mais dans le cas du motif glycine

cette fonction est éloignée du squelette par une rotule amidométhylène. On peut également trouver des motifs arginine présentant la double propriété d'être chargés positivement et d'être donneurs de liaisons hydrogènes. Enfin, le NAS\_3C6azo\_20PEG\_63EtOH sera utilisé afin d'avoir un polymère soluble dans l'eau mais à squelette neutre. Pour ce polymère, la solubilité dans l'eau est apportée, non par des charges négatives, mais par les greffons PEG.

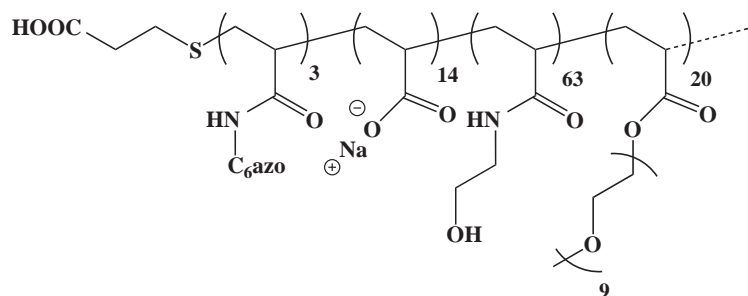


FIGURE 5.13 – Structure du polymère NAS\_3C6azo\_20PEG\_63EtOH.

### 5.3.4.2 Résultats

Les résultats de solubilité et d'activité enzymatique reportés figure 5.14 sont obtenus en conditions concentrées ( $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  de CAB) après 5h de renaturation (dont 2h dans le noir puis 3 sous UV).

### 5.3.4.3 Rôle de l'hydrophobie

Si l'on compare entre eux les polymères modifiés azobenzènes à squelette PAA, on ne voit pas de relation simple entre leur taux de modification et leur efficacité sur la renaturation de la CAB. Ils ont tous une efficacité assez similaire conduisant à un taux de renaturation significatif d'environ 30%, sauf le PAA\_3.5C6azo qui peut être identifié comme le polymère le plus efficace avec  $T > 50\%$ . On peut rappeler la conclusion donnée à la section précédente qui suppose un rôle important du taux d'azobenzènes lors de la phase de renaturation sous UV. Les polymères ayant un taux de modification compatible avec un fort affaiblissement de l'association polymère/protéine sous UV provoqueraient un regain d'activité enzymatique plus important (comme le PAA\_3.5C6azo) alors que les autres auraient tous le même effet sur la protéine.

### Le PAA

Un résultat particulièrement remarquable est que le PAA non modifié a une efficacité non nulle. En conditions concentrées, il maintient une solubilité de plus de 40% et permet un regain d'activité enzymatique de 21%. *A priori*, on ne s'attend pourtant pas à ce que le PAA interagisse avec la CAB. En effet, dans le tampon de renaturation à pH 7.75, ils sont tous deux chargés négativement et le polymère présente très peu de motifs acide acrylique capables de faire des liaisons hydrogènes. Par contre, dans la solution de dénaturation en présence de  $8.8 \text{ mol.L}^{-1}$  d'urée, on se sait pas exactement comment se comporte le PAA. Il est possible que, dans ces conditions, il interagisse avec la protéine dépliée. De plus, à l'état déplié, la protéine peut avoir un point isoélectrique très différent de celui en milieu aqueux et des domaines positivement chargés pourrait alors aider à une association avec le PAA.

L'importance des interactions électrostatiques dans la renaturation de la CAB en présence de PAA a été sondée en effectuant cette renaturation dans des tampons de dilution à force ionique croissante. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.5. La diminution de la force ionique conduit à une augmentation de la solubilité et de l'activité enzymatique de la

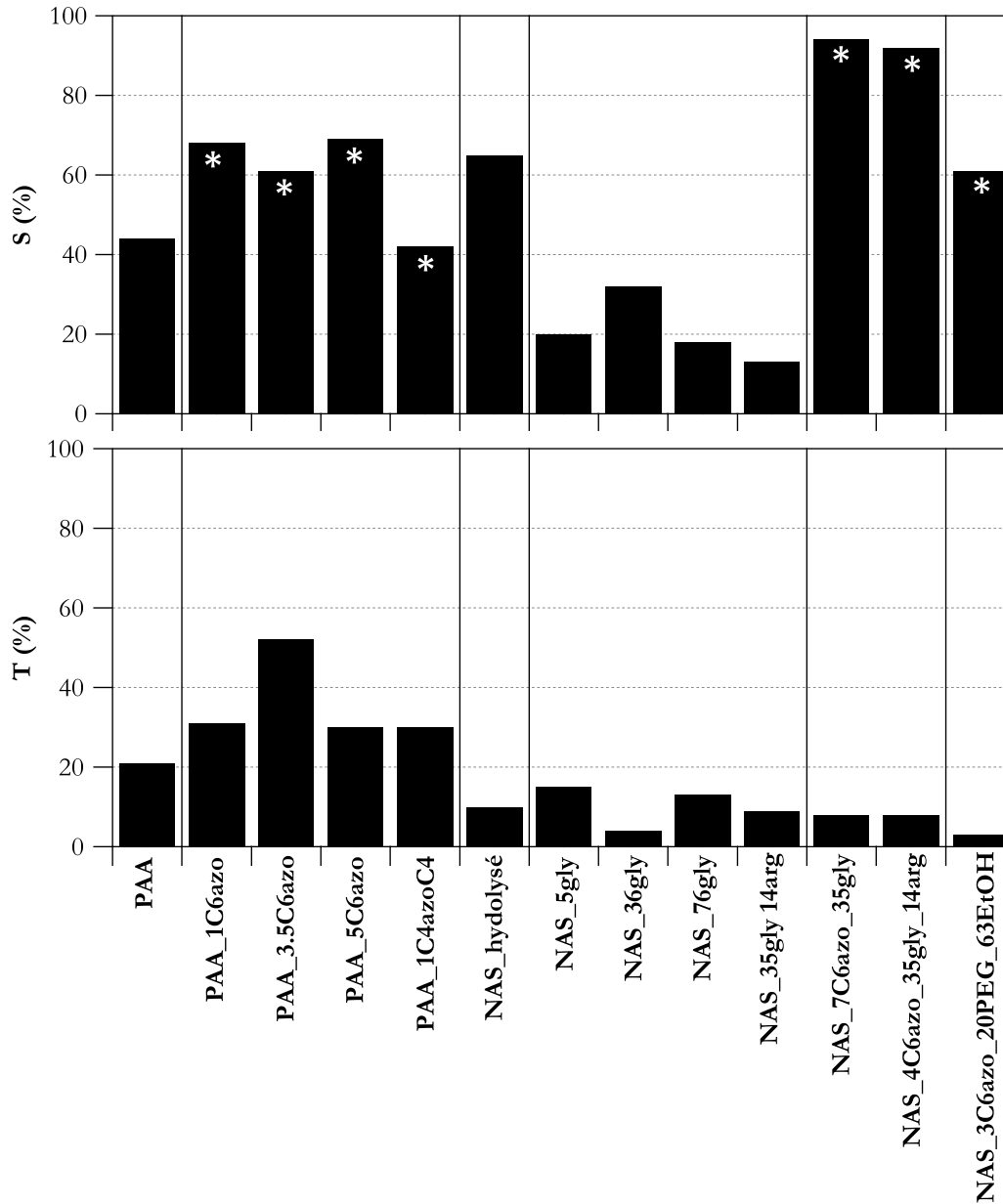


FIGURE 5.14 – Représentation de la solubilité  $S$  et de l'activité enzymatique  $T$  de la CAB après renaturation en présence de différents polymères en conditions concentrées ( $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  de CAB) après 5h de renaturation (dont 2h dans le noir puis 3 sous UV). (\*) Les barres marquées correspondent aux échantillons où la solubilité reportée est celle du polymère.

Solution de renaturation	$S$	$T$
Tampon $5 \text{ mmol.L}^{-1}$	80%	30%
Tampon $35 \text{ mmol.L}^{-1}$	44%	21%
Tampon $35 \text{ mmol.L}^{-1} + 64 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ NaCl}$	60%	21%

TABLE 5.5 – Solubilité et activité enzymatique de la CAB en présence de PAA pour des milieux de renaturation à différentes forces ioniques après 5h d'incubation.

protéine. A d'aussi faibles forces ioniques, on augmente la portée des répulsions électrostatiques (la longueur de Debye variant de 1 nm à 4 nm), ainsi même la renaturation de la CAB seule dans le milieu peut être favorisée. En fait, le peu de différence de comportement entre un milieu à



5 mmol.L<sup>-1</sup> de sel et celui à 100 mmol.L<sup>-1</sup> tend plutôt à prouver que les forces électrostatiques ne sont pas la composante majoritaire des interactions CAB/PAA.

### Le NAS<sub>hydrolysé</sub>

A titre de confirmation, on a testé l'effet d'un polymère issu d'un squelette NAS complètement hydrolysé. Il s'agit donc d'une chaîne poly(acide acrylique), mais contrairement au PAA commercial, nous en maîtrisons la pureté et la nature de l'extrémité de chaîne. Les extrémités de chaînes issues de l'amorçage avec l'AIBN sont de type diméthylacétonitrile (CN-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-). Le PAA commercial et le NAS<sub>hydrolysé</sub> maintiennent tous les deux des solubilités élevées de 44 et 65% respectivement. On ne note pas non plus de différence significative sur les degrés de renaturation obtenus avec ces chaînes. On peut alors considérer que les squelettes précurseurs des séries PAA et NAS jouent essentiellement le même rôle face à la CAB.

#### 5.3.4.4 Le rôle du squelette

##### Importance de l'accessibilité des groupes carbonyles

Les squelettes NAS modifiés glycine et/ou arginine mais pas C6azo ne se comportent absolument pas comme le PAA ou le NAS<sub>hydrolysé</sub>. En effet, entre le NAS<sub>hydrolysé</sub> et le NAS<sub>5gly</sub>, la solubilité de la CAB est diminuée d'un facteur 3 et pourtant la seule différence entre ces polymères est les 5% de groupes COO<sup>-</sup> éloignés de la chaîne par une rotule amidométhylène. Ce gain en degré de liberté conformationnelle de quelques charges négatives modifie profondément le comportement du polymère, même lorsque les changements sont présents sur seulement 5% de la chaîne, soit environ tous les 20 motifs.

L'effet protecteur du PAA était inattendu et il n'est pas généralisable à l'ensemble des polymères porteurs de groupes carboxylate. La densité de charge exceptionnellement importante du PAA homopolymère doit jouer un rôle que nous ne comprenons pas bien pour le moment. Il semble que le collage de chaînes PAA sur la CAB nécessite qu'un long segment du polymère, au moins une dizaine de motifs, interagisse avec la protéine.

Lorsque l'on rajoute des greffons C6azo sur des squelettes NAS modifiés glycine et/ou arginine, leur comportement change complètement. On récupère une solubilité quasi totale,  $S > 90\%$ , mais sans aucun retour d'activité enzymatique,  $T = 8\%$ . Les polymères PAA<sub>7C6azo\_35gly</sub> et PAA<sub>4C6azo\_35gly\_14arg</sub> présentent donc un comportement particulier : ils protègent la protéine de l'agrégation mais bloquent sa renaturation.

##### Le squelette neutre

Le NAS<sub>3C6azo\_20PEG\_63EtOH</sub> présente le même type de comportement que celui des polymères à squelettes NAS modifiés C6azo. La solubilité est maintenue,  $S = 61\%$ , mais il n'y a pas de regain d'activité enzymatique,  $T = 5\%$ .

#### 5.3.4.5 Bilan

Au final, on peut identifier trois types de comportements différents pour les polymères testés vis à vis de la renaturation de la CAB :

1. soit les polymères sont incapables d'empêcher l'agrégation de la protéine et sa renaturation n'a pas lieu,
2. soit ils maintiennent une forte solubilité de la CAB mais bloquent sa renaturation et ne permettent aucun retour de l'activité enzymatique. C'est le cas du NAS<sub>7C6azo\_35gly</sub>, du NAS<sub>4C6azo\_35gly\_14arg</sub> et du NAS<sub>3C6azo\_20PEG\_63EtOH</sub>,
3. soit ils maintiennent une forte solubilité et permettent une renaturation partielle. C'est le cas des PAA modifiés azobenzènes.

On peut en déduire que la présence de groupes hydrophobes est indispensable à l'association polymère/protéine et à la protection contre l'agrégation. Par cette remarque, on valide les choix faits lors de la conceptions des polymères (*cf.* paragraphe 1.5 17). Seul le PAA fait une entorse à cette règle. L'autre conclusion moins attendue est que seule la combinaison d'un squelette entièrement PAA modifié à quelques pourcents par des greffons hydrophobes permet la renaturation. Les polymères amphiphiles de type NAS\_7C6azo\_35gly, NAS\_4C6azo\_35gly\_14arg ou NAS\_3C6azo\_20PEG\_63EtOH s'associent bien à la protéine et la maintiennent en solution, mais ne lui permettent pas de se renaturer. L'état de charge de la chaîne polymère joue donc un rôle très important et complexe que nous ne sommes pas en mesure d'expliquer actuellement. Des expériences permettant une approche fine de la structure des complexes polymère/CAB seraient nécessaire à une compréhension plus poussée. Il faut également garder à l'esprit que cet effet très particulier d'un squelette PAA est peut-être spécifique à l'association avec la protéine carbonique anhydrase. Ainsi, une autre piste pourrait être de tester les polymères vis à vis d'une autre protéine soluble, chargée négativement et qui agrège lors de sa renaturation.

## 5.4 Conclusion

Les polymères à squelette PAA et modifiés C6azo sont des additifs de renaturation efficaces qui ont l'avantage d'être utilisables dans des formulations à forte concentration en protéine. Ceci est très intéressant en terme de gain en coût et en temps dans des perspectives de renaturation de protéines d'intérêt et même essentiel dans des procédures visant à la cristallisation de ces protéines. Nous avons identifié le PAA\_3.5C6azo comme le meilleur candidat et nous allons, dans le chapitre suivant, tester son efficacité vis à vis de la renaturation d'un anticorps recombinant.

En fait, les polymères modifiés C6azo sont plus que des additifs de renaturation efficaces, ils présentent toutes les caractéristiques de chaperonnes artificielles. Ils sont capables de s'associer fortement et de manière spécifique avec la CAB à l'état déplié et, grâce à leur hydrophobie photostimulable, sont actifs vis à vis de la protéine au cours de son cycle de repliement.

De plus, leur synthèse présente une assez grande liberté de modulation de leur chimie qui a des conséquences directes sur leurs effets vis à vis de la CAB. Ainsi, la présence ou l'absence d'une rotule amidométhylène peut bloquer ou permettre la renaturation de la protéine. Les polymères de deuxième génération, de type NAS\_xC6azo\_ygly, ont eux aussi un potentiel pour devenir des chaperonnes artificielles photostimulables. Il leur manque la capacité à se dissocier de la protéine sous UV ou à subir un changement de structure suffisamment important pour permettre le repliement des protéines préalablement piégées et protégées de l'agrégation. Pour ces polymères, il suffit peut-être d'une mise au point de leur formulation, ajustement de la force ionique, du taux d'hydrophobie ou ajout d'un troisième partenaire comme un tensio-actif, pour obtenir un effet chaperonne complet.

## Bibliographie

- [Cleland et Wang 1990] J. L. Cleland and D. Wang. *Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase-B - Quasi-elastic light-scattering analysis*. Biochemistry, vol. 29, no. 50, pages 11072–11078, December 1990.
- [Creighton 1992] T. E. Creighton. *Proteins : Structures and molecular properties*. W. H. Freeman, second edition edition, August 1992.
- [Gellman et Rozema 1996] S. H. Gellman and D. Rozema. *Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme : Modulation of the competition between renaturation and aggregation*. Biochemistry, vol. 35, no. 49, pages 15760–15771, December 1996.
- [Hanson et Gellman 1998] P. E. Hanson and S. H. Gellman. *Mechanistic comparison of artificial-chaperone-assisted and unassisted refolding of urea-denatured carbonic anhydrase B*. Folding and Design, vol. 3, no. 6, pages 457–468, November 1998.
- [Marheineke 2006] N. Marheineke. *Renaturation of carbonic anhydrase with amphiphilic polymers*. Master thesis of university paris VI, June 2006.
- [Pocker et Stone 1967] Y. Pocker and J. T. Stone. *The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. III. Kinetic Studies of the Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate\**. Biochemistry, vol. 6, no. 3, pages 668–678, 1967.
- [Porcar *et al.* 1998] I. Porcar, P. Gareil and C. Tribet. *Formation of Complexes between Protein Particles and Long Amphiphilic Polymers : Binding Isotherms versus Size and Surface of the Particles*. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 102, no. 40, pages 7906–7909, October 1998.
- [Saito *et al.* 2004] R. Saito, T. Sato, A. Ikai and N. Tanaka. *Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution*. Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography, vol. 60, no. 4, pages 792–795, 2004.
- [Semisotnov *et al.* 1990] G. V. Semisotnov, V. N. Uversky, I. V. Sokolovsky, A. M. Gutin, O. I. Razgulyaev and N. A. Rodionova. *Two slow stages in refolding of bovine carbonic anhydrase B are due to proline isomerization*. Journal of molecular biology, vol. 213, no. 3, page 561, 1990.
- [Thermo-Scientific ] Thermo-Scientific. *BCA Protein Assay*. <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=02020101>.
- [Wetlaufer et Xie 1995] D. B. Wetlaufer and Y. Xie. *Control of aggregation in protein refolding : A variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II*. Protein Science, vol. 4, no. 8, pages 1535–1543, 1995.
- [Whitmore ] Lee Whitmore. *DichroWeb*. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.
- [Wong et Tanford 1973] K. P. Wong and C. Tanford. *Denaturation of Bovine Carbonic Anhydrase B by Guanidine Hydrochloride. A Process Involving Separable Sequential Conformational Transitions*. Journal of Biological Chemistry, vol. 248, no. 24, pages 8518–8523, 1973.

## Chapitre 6

# Application des polymères modifiés azobenzènes à la renaturation d'une protéine d'intérêt : un fragment d'anticorps le scFv Sha 31

### Sommaire

---

<b>6.1</b>	<b>Problématique</b>	<b>116</b>
<b>6.2</b>	<b>Le scFv Sha 31</b>	<b>116</b>
6.2.1	Intérêt	116
6.2.1.1	Rôle biologique	116
6.2.1.2	Le projet du CEA	116
6.2.2	Expression	117
<b>6.3</b>	<b>Etude du repliement du scFv Sha 31 seul</b>	<b>117</b>
6.3.1	Le protocole standard	117
6.3.2	Le suivi de la renaturation par fluorescence	118
6.3.2.1	Etude de l'agrégation	119
6.3.2.2	Etude de la forme des spectres de fluorescence	120
6.3.3	Les étapes critiques du repliement	120
<b>6.4</b>	<b>Etude du repliement du scFv Sha 31 en présence de polymères</b>	<b>121</b>
6.4.1	Ajout des polymères à la fin du protocole standard	121
6.4.2	Ajout des polymères dès le début du protocole standard	123
<b>6.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>124</b>

---

# Conclusion

L'objectif de ce travail était de jeter les bases de la conception de macromolécules photo-stimulables ayant une efficacité sur la renaturation de protéines. Nous avons synthétisé des polymères amphiphiles capables d'association/dissociation photo-modulables avec des partenaires colloïdaux, micelles ou protéines. Grâce à leurs chaînes pendantes contenant des azobenzènes, ils développent des associations hydrophobes dépendant de l'état d'isomérisation cis-trans de ces groupes. En présence de différentes protéines, ces polymères ont montré des plusieurs propriétés caractéristiques de chaperonnes artificielles comme la limitation de l'agrégation, la déstabilisation de la protéine et l'augmentation des rendements de renaturation. Ceci laisse à penser que ce sont des outils prometteurs, tant pour la production de protéines d'intérêts que pour l'étude fine des processus de la renaturation.

Du point de vue des polymères, le travail effectué sur le système PAA modifié azobenzènes/TX 100 a permis d'avancer dans la compréhension des principes généraux régissant les associations hydrophobes polymère/petite particule. Pour notre système, régi par des interactions hydrophobes et électrostatiques, on a mis en avant différents paramètres permettant de moduler l'efficacité de la réponse au stimulus : le taux de modification du polymère, la répartition aléatoire des greffons, l'hydrophobie du greffon et la force ionique. Ces connaissances permettent de comprendre sur quels paramètres agir pour formuler des solutions ayant des réponses franches à la lumière. De plus, le mécanisme déterminé dans cette étude permet de résumer tous les effets énumérés précédemment dans un seul paramètre, une longueur critique de boucle entre deux points d'attache. On peut espérer généraliser ce concept à tous complexes formés par des points d'attaches multiples et non covalents sur un partenaire petit par rapport au rayon du polymère.

Du point de vue de la renaturation des protéines, on ne peut pas encore répondre précisément aux questions pourtant fondamentales : quelles sont précisément les interactions ayant un impact fort sur le repliement et où sont-elles localisées ? On a montré que la maîtrise des interactions hydrophobes est efficace, mais nous avons aussi mis en évidence le rôle particulier mais non compris du squelette PAA. En effet, les polymères PAA modifiés azobenzènes ont montré des capacités de déstabilisation, de limitation de l'agrégation et d'aide à la renaturation vis à vis de trois protéines solubles très différentes en termes de structures secondaires, de points isoélectriques, de présence de ponts disulfures...

On peut se poser la question de la marge d'optimisation des polymères conçus au cours de cette thèse. A ce titre, il sera vraiment très intéressant d'étudier la structure intime des complexes. Cela permettrait peut-être d'avancer sur la compréhension du lien structure chimique du polymère/effet sur les structures secondaires. En particulier sur la CAB, le polymère, selon sa nature, bloque ou non la protéine dans une structure non native. De plus, on pourrait étudier l'effet particulier du squelette PAA, en cherchant par exemple à déterminer le rôle de sa très grande densité de charge locale. On pourrait alors envisager de synthétiser des polymères dont l'interaction pourrait être mieux ciblée en leur donnant une architecture plus complexe ou une distribution d'azobenzènes non aléatoires. En effet, d'après l'étude des systèmes polymère/micelle, un polymère séquencé devrait avoir une réponse totalement tranchée vis à vis de son association avec un partenaire. Il devrait en découler un effet plus marqué sur des systèmes polymère/protéine.



# Annexe A

## Synthèse des polymères photostimulables

### Sommaire

---

<b>A.1 Synthèse du greffon azobenzène C4azoC4</b> . . . . .	<b>129</b>
A.1.1 Couplage diazoïque . . . . .	129
A.1.2 Couplage de l'azobenzène et de l'espaceur alkyle . . . . .	130
A.1.3 Déprotection de la fonction amine . . . . .	131
<b>A.2 Modification d'un squelette poly(acide acrylique)</b> . . . . .	<b>132</b>
<b>A.3 Modification d'un squelette poly(N-acryloxy succinimide)</b> . . . . .	<b>133</b>
A.3.1 Synthèse du poly(N-acryloxy succinimide) par polymérisation radicalaire classique . . . . .	133
A.3.2 Modification du squelette poly(N-acryloxy succinimide) . . . . .	134
<b>A.4 Récapitulatif de tous les polymères utilisés</b> . . . . .	<b>137</b>

---

### A.1 Synthèse du greffon azobenzène C4azoC4

#### A.1.1 Couplage diazoïque

##### Origine des réactifs

- 4-butylalanine,  $M = 149.23 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich
- phénol,  $M = 94.11 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich
- nitrite de sodium,  $M = 69.00 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich

##### Mode opératoire

**Réaction** Dans un erlenmeyer de 1 L maintenu à 0 °C dans un bain de glace et sous forte agitation, on introduit 25 g de 4-butylalanine dans 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 5 mol.L<sup>-1</sup>. On ajoute à cette préparation rosâtre 25 mL d'une solution de nitrite de sodium dans l'eau à 6.67 mol.L<sup>-1</sup> (1 équivalent par rapport à la butylaniline). Le milieu réactionnel est laissé à réagir, toujours à 0 °C, pendant 1 h. On ajoute alors 84 mL d'une solution blanche très épaisse de phénol dans de l'eau basique (1 équivalent de phénol et 2.5 équivalent de carbonate de sodium). Il est important d'effectuer cet ajout petit à petit afin de contrôler le dégagement gazeux produit lors de la neutralisation du milieu. Lorsque le milieu est basique, le produit désiré précipite sous forme d'un solide de couleur marron.

**Récupération** Le milieu réactionnel est filtré sur un fritté de porosité 4, puis séché pendant une nuit sous pompe à palettes. On obtient 45.55 g d'une poudre marron, soit 100% de rendement

pour le produit brut. 20.00 g de cet azobenzène est purifié par recristallisation dans un minimum de n-hexane. On récupère 18.20 g de paillettes dorées. Cette étape de synthèse présente 91% de rendement après purification.

### Caractérisation

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé, représenté figure A.1, permet de valider la pureté du produit en raison de l'absence des signaux caractéristiques des réactifs de départ.

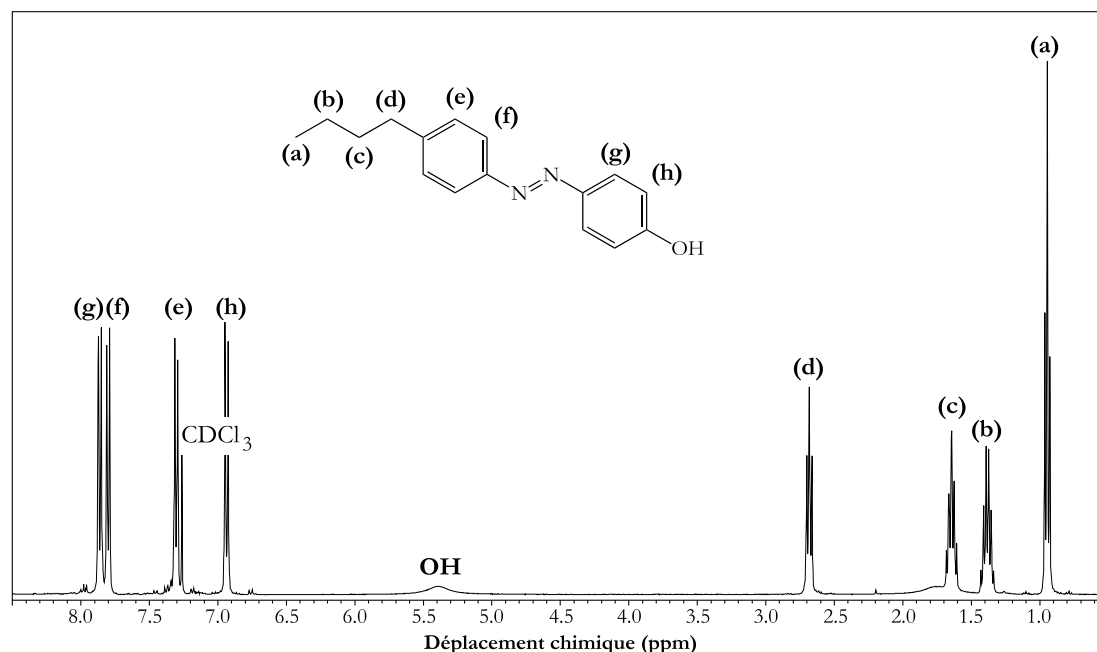


FIGURE A.1 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 4-butyl-4'-hydroxyl azobenzène à 1% dans le chloroforme deutéré.

### A.1.2 Couplage de l'azobenzène et de l'espaceur alkyle

#### Origine des réactifs

– 4-(Boc-amino)bromobutyl,  $M = 252.15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Aldrich

#### Mode opératoire

**Réaction** Dans un tricol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée, on introduit 2.5 g de 4-(Boc-amino)bromobutyl et 0.67 g d'hydroxyde de potassium (1.2 équivalents) dans 10 mL de tétrahydrofurane. On ajoute le minimum d'eau nécessaire pour dissoudre l'hydroxyde de potassium, puis le mélange est porté à reflux sous forte agitation. Dans l'ampoule de coulée, on introduit 20 mL d'une solution de 2.5 g de 4-butyl-4'-hydroxyl azobenzène (1 équivalent) dans le THF. Cette solution est ajoutée goutte à goutte dans le milieu réactionnel qu'on laisse réagir à reflux pendant une nuit. On observe l'apparition d'un précipité blanc de bromure de potassium.

L'avancement de la réaction peut être facilement suivi en chromatographie sur couche mince (phase stationnaire : silice, éluant : dichlorométhane/n-hexane 75/15) car les réactifs sont colorés et ont des rapports frontaux très différents.

**Récupération** Le milieu réactionnel est filtré sur papier filtre afin d'éliminer le bromure de potassium, puis évaporé à l'évaporateur rotatif. La solution huileuse restante est reprise avec 40 mL de dichlorométhane et transvasée dans une ampoule à décanter. La phase organique ainsi



obtenue est lavée deux fois avec 40 mL d'eau et une fois avec 40 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium, puis elle est séchée par ajout d'une quantité suffisante de sulfate de magnésium anhydre. La solution est filtrée sur papier filtre puis évaporée à l'évaporateur rotatif. L'évaporation à sec est difficile à obtenir, aussi on arrête l'évaporation au bout d'une heure. La solution orange et huileuse récupérée est diluée dans un grand excès de n-hexane (environ 200 mL). Cette solution est placée au congélateur pour la nuit. Le n-hexane est un mauvais solvant du produit qui précipite à froid et peut ainsi être récupéré par filtration sur fritté de porosité 4. Le filtrat obtenu étant encore de couleur orange, on peut lui imposer un nouveau cycle d'évaporation, redissolution, précipitation à froid, afin d'augmenter le rendement de la réaction. Avec une seule étape de cristallisation, on récupère 1.85 g de 4-Butyl-4'-(4-Boc-amino)butyl azobenzène, soit 45% de rendement.

### Caractérisation

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé, représenté figure A.2, montre l'apparition des signaux de l'espaceur. Le bon accord entre la valeur de l'intégration du signal des protons du groupe protecteur tBoc (8.6 pour 9 protons) et celle des protons du groupe méthyle de l'azobenzène (3.0 pour 3 protons) prouve qu'il a peu d'azobenzène résiduel dans le produit.

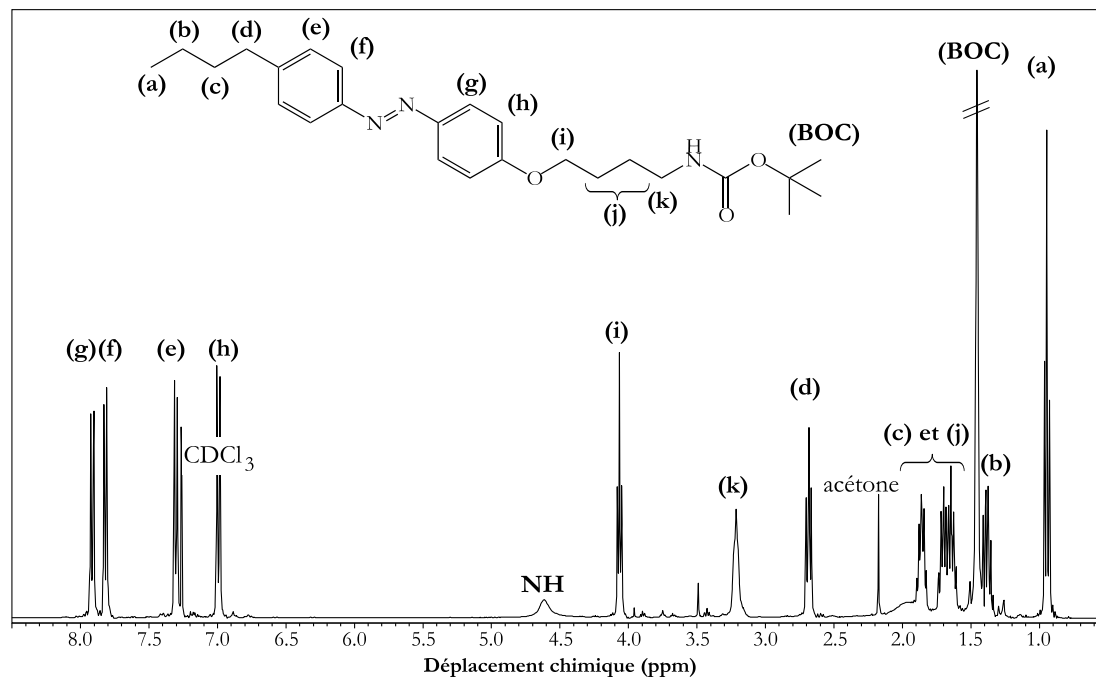


FIGURE A.2 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 4-Butyl-4'-(4-Boc-amino)butyl azobenzène à 1% dans le chloroforme deutéré.

### A.1.3 Déprotection de la fonction amine

#### Origine des réactifs

- acide trifluoro acétique,  $M = 114.02 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich

#### Mode opératoire

**Réaction** Dans un tricol de 50 mL surmonté d'un réfrigérant, on introduit 1.0 g de 4-Butyl-4'-(4-Boc-amino)butyl azobenzène, 1.4 mL de dichlorométhane et 1.4 mL de TFA (2.1 équivalents). Lors de l'ajout de TFA, la solution passe du orange au rouge sombre à cause de la

protonation de l'azobenzène due à l'acidification du milieu. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 h.

L'avancement de la réaction peut être suivi en chromatographie sur couche mince (phase stationnaire : silice, éluant : méthanol/dichlorométhane 1/9). Dans ces conditions, le réactif migre loin alors que le produit traîne en bas de la plaque.

**Récupération** La réaction est arrêtée au bout de 20 h quand le milieu réactionnel ne montre plus de trace du réactif. On transvase le contenu du tricol dans un bécher puis on rince le ballon avec 10 mL de dichlorométhane. L'ajout de 10 mL d'une solution de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  provoque un dégagement gazeux et la précipitation d'un solide orange. Ce précipité est récupéré par filtration sur un fritté de porosité 4 et rincé avec du n-hexane froid.

### Caractérisation

L'analyse de ce composé par RMN  $^1\text{H}$  (spectre non représenté) montre la disparition du signal à 1.4 ppm des groupes méthyle de la fonction protectrice tBoc.

## A.2 Modification d'un squelette poly(acide acrylique)

Voici la synthèse d'un polymère modifié à 5% par des greffons C6azo.

### Origine des réactifs

- C6azo sous forme chlorure d'ammonium,  $M = 346.5 \text{ g.mol}^{-1}$
- poly(acide acrylique)
- triéthylamine,  $M = 101 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich
- DCCI,  $M = 206.4 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich
- HOBT,  $M = 135.1 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich

Le C6azo est conservé sous forme de chlorure d'ammonium à l'issue de sa synthèse. La fonction amine est régénérée *in situ* lors de la réaction de couplage.

### Mode opératoire

**Réaction** Dans un erlenmeyer de 200 mL, on dissout 3.0 g de précurseur poly(acide acrylique) dans 75 mL de NMP que l'on laisse dissoudre pendant une nuit à  $50^\circ\text{C}$  sous agitation. On ajoute à la solution limpide 0.725 g de C6azo sous forme chlorure d'ammonium (0.05 équivalent par rapport aux motifs acide acrylique) préalablement dissout dans 5 mL de NMP. Pour restaurer la fonction amine du greffon, on introduit 0.32 mL de triéthylamine (1.1 équivalent par rapport au C6azo). On ajoute ensuite 0.342 g d'HOBT dissout dans 3 mL de NMP (1.1 équivalent par rapport à la DCCI), puis goutte à goutte 0.475 g de DCCI dissout dans 3 mL de NMP (1.1 équivalent par rapport au C6azo). La réaction est laissée à  $50^\circ\text{C}$  sous agitation pendant 1 h, puis on la laisse revenir à température ambiante.

**Récupération** Le milieu réactionnel est mis une nuit au congélateur afin d'aider à la précipitation de la dicyclohexyl-urée (DCU), sous-produit issu de l'activation de l'acide carboxylique par la DCCI. L'urée cristallisée est éliminée par filtration sur un fritté de porosité 4. L'ajout de 16 mL d'une solution de méthanoate de sodium à 30% dans le méthanol (2 équivalents de méthanoate par rapport aux motifs acide acrylique) fait précipiter le polymère sous forme d'un gel gorgé de NMP. On laisse la solution sous agitation pendant 1 h avant de filtrer le gel de polymère sur un fritté de porosité 4. Malgré plusieurs lavages au méthanol au cours de la filtration le polymère est encore gonflé de NMP dont on ne peut se débarrasser que par séchage pendant une nuit sous pompe à palettes. Le solide orange obtenu est redissous dans 14 mL d'eau (il faut une solution à au moins 20% en masse). Cette solution est ajoutée goutte à goutte dans

un grand volume de de méthanol (environ 200 mL) sous agitation afin de précipiter le polymère. Le solide est récupéré par filtration sur un fritté de porosité 4, puis séché pendant une nuit sous pompe à palettes. L'opération de solubilisation dans l'eau / précipitation est effectuée trois fois. Enfin, le polymère est dissous en solution aqueuse, le pH est ajusté à environ 7 et la solution est lyophilisée.

### Caractérisation

Le taux de greffage obtenu peut être mesuré par spectroscopie UV-visible et par RMN du proton.

## A.3 Modification d'un squelette poly(N-acryloxy succinimide)

### A.3.1 Synthèse du poly(N-acryloxy succinimide) par polymérisation radicalaire classique

#### Origine des réactifs

- N-acryloxysuccinimide (NAS),  $M = 169.13 \text{ g.mol}^{-1}$ , Accros
- Azobisisobutyronitrile (AIBN)  $M = 164.21 \text{ g.mol}^{-1}$ , Aldrich

#### Purification des réactifs

On sèche du THF et du 1,4-dioxane par passage sur une colonne d'alumine activée basique. Le monomère, dissous dans le THF à  $15 \text{ g.L}^{-1}$  est également passé sur une colonne d'alumine activée basique. Le THF est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le monomère purifié est séché pendant une nuit sous pompe à palettes.

#### Mode opératoire

**Réaction** Dans un tricol de 250 mL, on introduit 65 mg d'AIBN (0.51% en nombre par rapport au monomère). Pour se débarrasser de l'oxygène, on effectue trois cycles de mise sous vide puis mise sous atmosphère inerte (azote). Parallèlement, dans un bicol de 100 mL, on introduit 13.1 g de monomère purifié et 78 mL de 1,4-dioxane purifié. Cette solution est dégazée par barbotage d'azote, puis transférée sur l'AIBN à l'aide d'une canule. La polymérisation est effectuée à  $60^\circ\text{C}$  pendant 21h30.

**Récupération** Le polymère, insoluble dans le dioxane, a précipité au cours de la réaction. On filtre donc le milieu réactionnel sur fritté de porosité 4. On lave le polymère avec de l'acétone, puis on le sèche sous une cloche à vide reliée à une pompe à palettes pendant une nuit. On récupère 11.9 g de poly(NAS), soit 91% de rendement.

**Hydrolyse** Pour convertir le poly(NAS) en poly(acrylate de sodium), on le met en solution basique. On introduit 0.112 g de poly(NAS) avec 4 mL d'eau et 1 mL de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  dans un pilulier et on laisse sous agitation à température ambiante. Au bout de 48 h, la solution est limpide car tout le poly(NAS), insoluble dans l'eau a été converti en poly(acrylate de sodium), soluble dans l'eau. La solution est dialysée dans une cassette avec un seuil de coupure de  $3500 \text{ g.mol}^{-1}$  puis lyophilisée.

### Caractérisation

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du poly(NAS) est représenté figure A.2.

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique est effectuée sur le poly(acrylate de sodium) issu de l'hydrolyse du poly(NAS). Pour une solution de polymère à 0.5% en masse dans un tampon  $\text{LiNO}_3$  à  $0.5 \text{ mol.L}^{-1}$ , on obtient une masse molaire moyenne en poids ( $\overline{M}_w$ ) d'environ

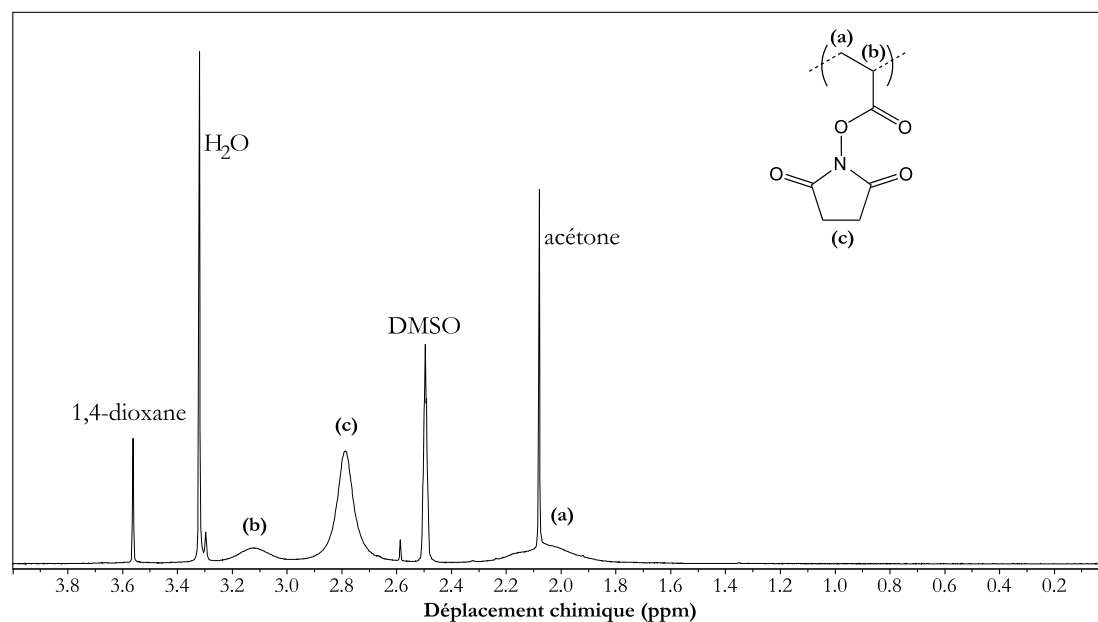


FIGURE A.3 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du poly(NAS) à 2% dans le DMSO deutéré.

85 700  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et une masse molaire moyenne en nombre ( $\overline{M}_n$ ) d'environ 30 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ce qui donne un indice de polymolécularité ( $I_p$ ) de 2.9.

### A.3.2 Modification du squelette poly(N-acryloxy succinimide)

**Mode opératoire d'une modification par les trois greffons utilisés (azobenzène, glycine et arginine)**

**Réaction** Dans un ballon de 50 mL, on introduit 0.49 g de poly(NAS) synthétisé à l'étape précédente. On ajoute 5 g de DMSO et on chauffe à 40 °C pour obtenir une dissolution complète. Dans un pilulier, on prépare une solution de 0.1025 g de C6azo sous forme chlorure d'ammonium (10% en nombre par rapport aux motifs acide acrylique) dans 5 g de DMSO. On y introduit également 71 mg de triéthylamine (2.2 équivalents par rapport au C6azo). Cette solution est ajoutée au milieu réactionnel contenant le polymère et laissée à réagir 2 h à 40 °C.

Dans un pilulier, on pèse 66 mg de glycine (30% en nombre par rapport aux motifs acide acrylique) et 199 mg de triéthylamine (2.2 équivalents par rapport à la glycine) que l'on dissout dans 2 mL d'eau. Cette solution est ajoutée au milieu réactionnel et laissée à réagir 1 h à 40 °C.

Dans un pilulier, on pèse 78 mg d'arginine (15% en nombre par rapport aux motifs acide acrylique) et 105 mg de triéthylamine (2.2 équivalents par rapport à l'arginine) que l'on dissout dans 2 mL d'eau. Cette solution est ajoutée au milieu réactionnel et laissée à réagir 1 h à 40 °C.

On ajoute alors dans le milieu réactionnel 3 mL d'une solution de soude à 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (2.2 équivalents par rapport à la quantité monomère NAS n'ayant pas réagi) et on laisse la nuit à 40 °C.

La triéthylamine ajoutée à toutes les étapes de cette synthèse est utilisée pour convertir les ammoniums en amines puis pour neutraliser l'acide N-hydroxysuccinimide, sous-produit du greffage. Le greffon C6azo utilisé pour cette synthèse s'est avéré contenir au moins 50% en masse d'impuretés salines (essentiellement du chlorure de sodium). Le taux réel de greffage azobenzène visé est donc de 5% et non 10%.

**Récupération** Le milieu réactionnel additionné de 10 mL d'eau est transféré dans un tube à centrifuger de 50 mL. La solution est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  jusqu'à précipitation de polymère. Le pH est alors entre 3 et 4. Le tube est centrifugé pendant 10 min à 4000 tr/min. A la sortie de la centrifugation, le précipité orange a sédimenté au fond du tube et le surnageant limpide et peu coloré est retiré. Le précipité est redissout dans 10 mL d'une solution basique de soude à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  pendant au moins une nuit. Le cycle précipitation/redissolution est répété 2 fois. Lors de la dernière solubilisation, on ajuste le pH de la solution à 7 puis on la lyophilise. On récupère 0.54 g de polymère, soit un rendement brut de plus de 100%. Le polymère est alors dialysé dans un boudin présentant un seuil de coupure de  $3500 \text{ g.mol}^{-1}$  afin d'éliminer les impuretés salines.

**Caractérisation** Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du NAS\_4C6azo\_35gly\_18arg dont la synthèse est décrite ci-dessus est représentée figure A.4.

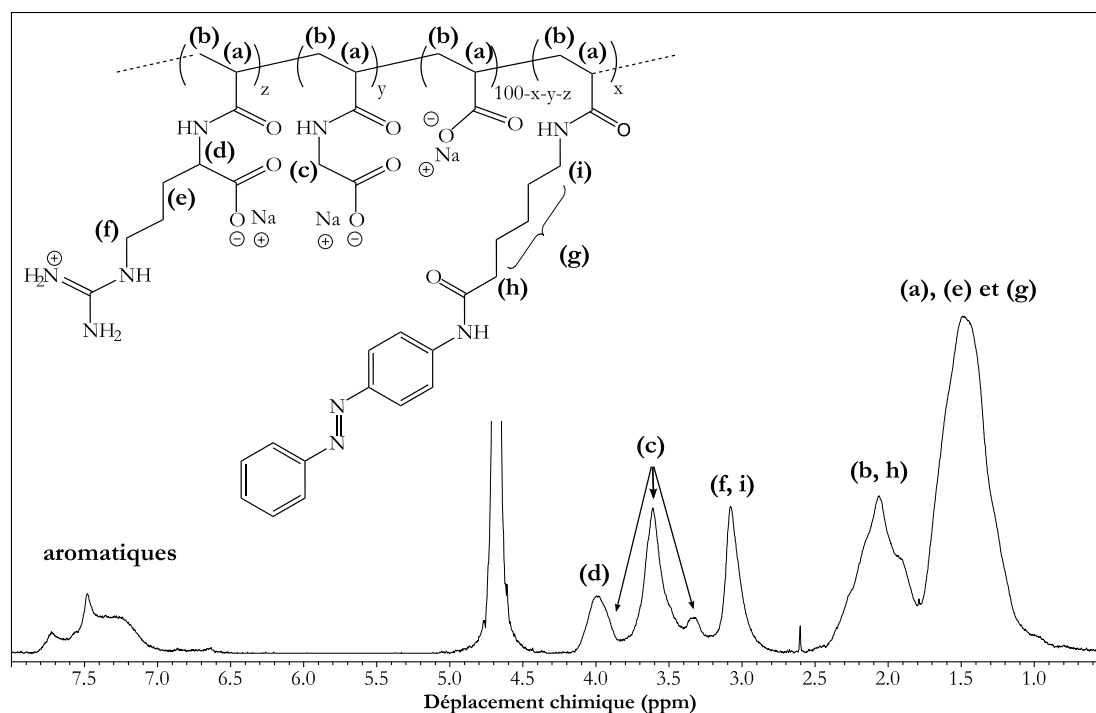


FIGURE A.4 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  du NAS\_4C6azo\_35gly\_18arg à 2% dans le DMSO deutéré.

### Mode opératoire des autres modifications

Quelles que soient les étapes de greffages réalisées, elles sont toujours effectuées dans l'ordre suivant : greffage de l'azobenzène, puis de la glycine, puis de l'arginine et enfin hydrolyse. La seule modification notable du mode opératoire est liée à l'étape de purification. Les polymères sans greffon azobenzène sont peu hydrophobes et donc précipitent mal en milieu aqueux acide. La purification des polymères modifiés uniquement glycine et arginine est ainsi réalisée par dialyse directe du milieu réactionnel à la sortie de la réaction auquel on ajoute 10 mL d'eau.

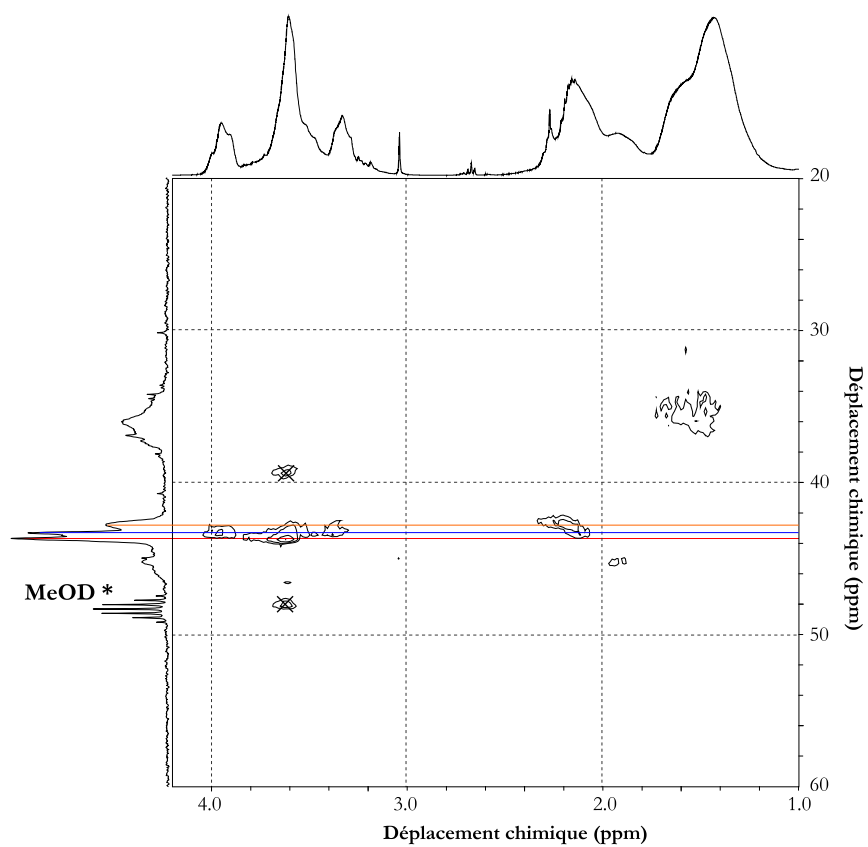


FIGURE A.5 – Spectre RMN HMQC du NAS\_76gly à 2% dans le D<sub>2</sub>O. Le méthanol deutéré est utilisé pour la calibration. Les signaux barrés sont non significatifs et issus du bruit.

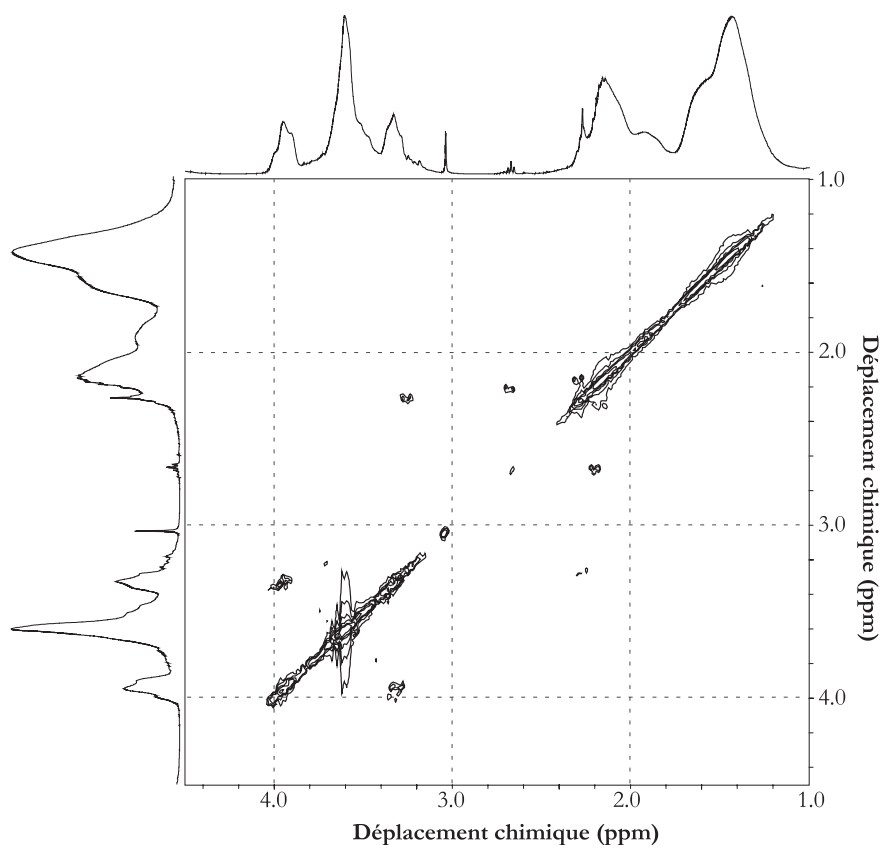


FIGURE A.6 – Spectre RMN COSY du NAS\_76gly à 2% dans le D<sub>2</sub>O.

## A.4 Récapitulatif de tous les polymères utilisés

Nom du polymère	$\overline{M}_n$ squelette PAA	Taux de modification déterminé par			
		absorbance azobenzène	glycine	RMN $^1\text{H}$ arginine	DCU
7.5_PAA_4C6azo	7 500	4.3%	/	/	
PAA_1C6azo	42 000	0.9%	/	/	1.0%
PAA_2C6azo	60 000	2.5%	/	/	
PAA_3.5C6azo	42 000	3.3%	/	/	0.3%
PAA_5C6azo	42 000	4.9%	/	/	0.6%
PAA_1C4azoC4	42 000	0.7%	/	/	1.0%
PAA_5C4azoC4	42 000	5.8%	/	/	4.1%
NAS_10gly	32 000	/	11%	/	/
NAS_35gly	32 000	/	35%	/	/
NAS_75gly	32 000	/	76%	/	/
NAS_35gly_14arg	32 000	/	35%	14%	/
NAS_7C6azo_35gly	32 000	7.0%	35%	/	/
NAS_4C6azo_35gly_14arg	32 000	4.0%	32%	18%	/
NAS_3C6azo_20PEG_63EtOH	32 000	3% de motifs C6azo, 14% de motifs acrylate, 63% de motifs ethoxyamine, 20% de motifs PEG ( <i>cf.</i> page 110)			
A8-35	7 500	35% de motifs acrylate, 25% de motifs octylamine, 40% de motifs ethylènediamine ( <i>cf.</i> page 121)			

TABLE A.1 – Récapitulatif de la composition de tous les polymères utilisés





# Annexe B

## Techniques expérimentales utilisées

### Sommaire

---

<b>B.1</b>	<b>Fluorescence</b>	<b>139</b>
B.1.1	Correction de la fluorescence due à l'absorbance des azobenzènes	139
B.1.1.1	Expression théorique	140
B.1.1.2	Confrontation avec les valeurs expérimentales	141
<b>B.2</b>	<b>Electrophorèse capillaire</b>	<b>141</b>
B.2.1	Principe	142
B.2.1.1	L'électromigration	142
B.2.1.2	L'électro-osmose	142
B.2.2	Modes de séparation	143
B.2.2.1	Mode de zone	143
B.2.2.2	Mode frontal	143
<b>B.3</b>	<b>Dichroïsme circulaire</b>	<b>144</b>
B.3.1	Principe	144
B.3.2	Etude de la structure des protéines	145
B.3.3	Utilisation du programme DichroWeb	146

---

### B.1 Fluorescence

Les mesures ont été effectuées sur un appareil FluoroMax-3 / Horiba Jobin Yvon avec support thermostaté dans les conditions suivantes :

Protéine	Cellule	Excitation	Emission
Cytochrome C	1 cm×1 cm	295 nm	300-500 nm
CAB	0.2 cm×1 cm	290 nm	300-500 nm
scFv Sha 31	1 cm×1 cm	290 nm	300-500 nm

TABLE B.1 – Récapitulatif des conditions utilisées pour les mesures de fluorescence

#### B.1.1 Correction de la fluorescence due à l'absorbance des azobenzènes

On cherche à exprimer la correction à prendre en compte sur l'intensité de fluorescence des protéines existant lors de la présence en solution de polymères modifiés azobenzènes.

### B.1.1.1 Expression théorique

L'intensité de fluorescence des protéines situées au point  $M$  perçue par le spectrofluorimètre en l'absence de polymère sera notée  $I_{ref}(M)$  et l'intensité de fluorescence de ces mêmes protéines en présence de polymères sera notée  $I_{pol}(M)$ .

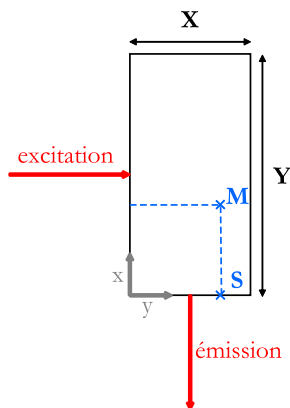


FIGURE B.1 – Cuve de fluorescence vue du dessus.

On rappelle la définition de l'absorbance en fonction de l'intensité incidente  $I_0$  et de l'intensité transmise  $I_T$ , ainsi que la loi de Beer-Lambert qui dépend du coefficient d'absorption de la solution  $\varepsilon_\lambda$ , de la concentration de la solution  $c$  et du chemin optique  $l$  :

$$A = \log \left( \frac{I_0}{I_T} \right) = \varepsilon_\lambda l c. \quad (\text{B.1})$$

L'intensité d'excitation qui parvient au point  $M$ , soit  $I_0(M)$ , correspond à l'intensité transmise à travers une solution de polymère de concentration  $c$  et d'épaisseur  $x$ ,

$$I_0(M) = I_0 10^{-\varepsilon_{ex} x c}. \quad (\text{B.2})$$

De même, l'intensité de fluorescence émise par les protéines situées au point  $M$ , soit  $I_F(M)$ , est à la sortie de la cuve, au point  $S$ , diminuée de l'absorbance de la solution de polymère de concentration  $c$  et d'épaisseur  $y$ ,

$$I_F(S) = I_F(M) 10^{-\varepsilon_{em} y c}. \quad (\text{B.3})$$

L'intensité de fluorescence de la protéine  $I_F$  ne dépend que de son rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  et de l'intensité du faisceau d'excitation  $I_0$ .

$$I_F = \Phi_F I_0. \quad (\text{B.4})$$

En absence de polymère, si on néglige l'absorbance de la protéine aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, l'intensité d'excitation initiale est entièrement transmise au point  $M$  et l'intensité d'émission de fluorescence, émise en  $M$ , est transmise sans altération en  $S$  :

$$I_F(S) = I_F(M) = \Phi_F I_0(M) = \Phi_F I_0. \quad (\text{B.5})$$

En présence de polymère, la prise en compte de l'absorbance de la solution transforme les équations de la façon suivante :

$$\begin{aligned} I_F(S) &= I_F(M) 10^{-\varepsilon_{em} y c} = \Phi_F I_0(M) 10^{-\varepsilon_{em} y c} = \Phi_F I_0(M) 10^{-(\varepsilon_{ex} x c + \varepsilon_{em} y c)} \\ I_{pol}(M) &= I_{ref}(M) 10^{-(\varepsilon_{ex} x + \varepsilon_{em} y) c}. \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

Pour obtenir la correction sur l'intensité de fluorescence globale perçue par le spectrofluorimètre, il suffit de moyenner l'équation précédente sur le volume de la cuve.

$$\begin{aligned}
\frac{I_{pol}}{I_{ref}} &= \frac{1}{XY} \int_x \int_y 10^{-(\varepsilon_{ex} x + \varepsilon_{em} y)c} dx dy \\
&= \frac{1}{XY} \left[ \frac{10^{-\varepsilon_{ex} x c}}{-\varepsilon_{ex} c \ln(10)} \right]_0^X \left[ \frac{10^{-\varepsilon_{em} y c}}{-\varepsilon_{em} c \ln(10)} \right]_0^Y \\
&= \frac{1}{XY} \frac{10^{-\varepsilon_{ex} X c} - 1}{-\varepsilon_{ex} c \ln(10)} \frac{10^{-\varepsilon_{em} Y c} - 1}{-\varepsilon_{em} c \ln(10)}.
\end{aligned} \tag{B.7}$$

On peut modifier l'équation précédente en y faisant apparaître les valeurs de l'absorbance du polymère dans la solution aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence,  $A_{ex}$  et  $A_{em}$  respectivement. Ces valeurs sont mesurées dans une cuve de 1 cm de large. On appellera  $k$  le facteur correctif permettant de s'affranchir de l'absorbance du polymère en solution, défini comme

$$k = \frac{I_{pol}}{I_{ref}} = \frac{1}{XY} \frac{10^{-A_{ex} X} - 1}{-A_{ex} \ln(10)} \frac{10^{-A_{em} Y} - 1}{-A_{em} \ln(10)}. \tag{B.8}$$

### B.1.1.2 Confrontation avec les valeurs expérimentales

On peut mesurer expérimentalement la valeur de  $k$  en mettant le polymère en présence de protéine native lorsqu'ils n'interagissent pas entre eux. Ainsi, la différence entre les spectres de fluorescence avec et sans polymère est due à l'absorbance de ce dernier. Cette expérience n'est pas faisable dans le cas du cytochrome C car sa fluorescence à l'état natif est trop peu intense. Elle a donc été faite sur la CAB.

On enregistre les spectres de fluorescence et d'absorbance de la CAB native seule, puis de la CAB native en présence de polymère dans le noir, sous irradiation bleue et sous irradiation UV. A partir des mesures d'absorbance à 290 nm, longueur d'onde d'excitation, et à 347 nm, longueur d'onde d'émission, on calcule la valeur théorique de  $k$ , notée  $k_{th}$ , d'après l'équation B.8. La valeur expérimentale de  $k$ , notée  $k_{exp}$ , s'exprime comme le rapport des intensités de fluorescence à 347 nm de la CAB en présence de polymère sur celle de la CAB sans polymère. Les résultats obtenus pour différents polymères sont présentés dans le tableau B.2.

		Noir	Bleu	UV
PAA_3.5C6azo	$k_{th}$	0.75	0.79	0.90
	$k_{exp}$	0.77	0.78	0.88
PAA_5C6azo	$k_{th}$	0.71	0.75	0.90
	$k_{exp}$	0.71	0.76	0.89
PAA_7C6azo_35gly	$k_{th}$	0.66	0.72	0.90
	$k_{exp}$	0.60	0.62	0.67

TABLE B.2 – Valeurs expérimentales et théoriques du facteur correctif de quelques polymères.

On constate un très bon accord entre les valeurs théoriques et expérimentales pour les polymères PAA\_3.5C6azo et PAA\_5C6azo.

## B.2 Electrophorèse capillaire

Les mesures ont été effectuées sur un appareil MDQ-PACE / Beckman équipé d'un détecteur UV/visible à barrette de diodes avec des capillaires en silice fondue de diamètre 75  $\mu\text{m}$ , de longueur totale 31 cm et de longueur effective 21 cm.

*Remarque* : Les mobilités sont définies ici comme des grandeurs algébriques.

## B.2.1 Principe

L'électrophorèse capillaire est une technique complémentaire des méthodes chromatographiques qui permet la séparation d'un grand nombre de molécules. La séparation des composés par électrophorèse capillaire résulte de la migration des analytes sous l'action d'un champ électrique. Cette migration est issue de la combinaison de deux mécanismes de transport : l'électromigration et l'électro-osmose [Potier *et al.* 2003].

### B.2.1.1 L'électromigration

L'électromigration résulte du déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. La vitesse linéaire acquise (ou vitesse électrophorétique) est alors fonction du champ électrique et de la mobilité électrophorétique de l'ion selon la relation

$$v_{ep} = m_{ep}E, \quad (\text{B.9})$$

avec  $v_{ep}$  la vitesse électrophorétique ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $E$  le champ électrique ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $m_{ep}$  la mobilité électrophorétique ( $\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

L'électromigration s'effectue dans le sens du champ électrique (mobilité électrophorétique positive) pour les cations et dans le sens opposé pour les anions (mobilité électrophorétique négative).

La mobilité électrophorétique d'une espèce dépend de sa charge électrique et de sa taille.

### B.2.1.2 L'électro-osmose

Le phénomène d'électro-osmose correspond à l'écoulement d'un liquide remplissant un capillaire dont la paroi interne possède une charge de surface lorsque celui est soumis à un champ électrique tangentiel. C'est ce phénomène qui est à l'origine du mouvement translationnel de l'ensemble du fluide dans le capillaire.

Dans le cas d'un capillaire en silice fondue, les charges de surface sont négatives. Lorsque le capillaire est rempli d'un tampon électrophorétique, les cations du tampon sont attirés vers les charges négatives de la surface du capillaire, formant ainsi une double couche électrique. Lors de l'établissement d'un champ électrique tangentiel à cette interface, les cations présents en excès dans la couche de diffusion migrent vers la cathode et entraînent avec eux les molécules de solvant, créant ainsi un écoulement de toutes les espèces présentes au sein du capillaire.

La vitesse linéaire de cet écoulement  $v_{eo}$  est alors proportionnelle à l'intensité du champ électrique  $E$  et à la mobilité électro-osmotique  $m_{eo}$

$$v_{eo} = m_{eo}E. \quad (\text{B.10})$$

Enfin, on utilise assez souvent la vitesse de migration  $v_M$  d'une espèce définie selon la relation

$$v_M = m_{app}E, \quad (\text{B.11})$$

avec  $m_{app}$  mobilité apparente égale à

$$m_{app} = m_{eo} + m_{ep}. \quad (\text{B.12})$$

Cette mobilité apparente est la mobilité mesurée. Elle reflète la compétition entre les deux modes de transport (électromigration et électro-osmose). En capillaire silice à pH neutre ou basique, la vitesse électro-osmotique est généralement supérieure à la vitesse électrophorétique. Ainsi, tous les composés migrent vers la cathode mais les molécules chargées positivement arriveront au détecteur avant celles chargées négativement

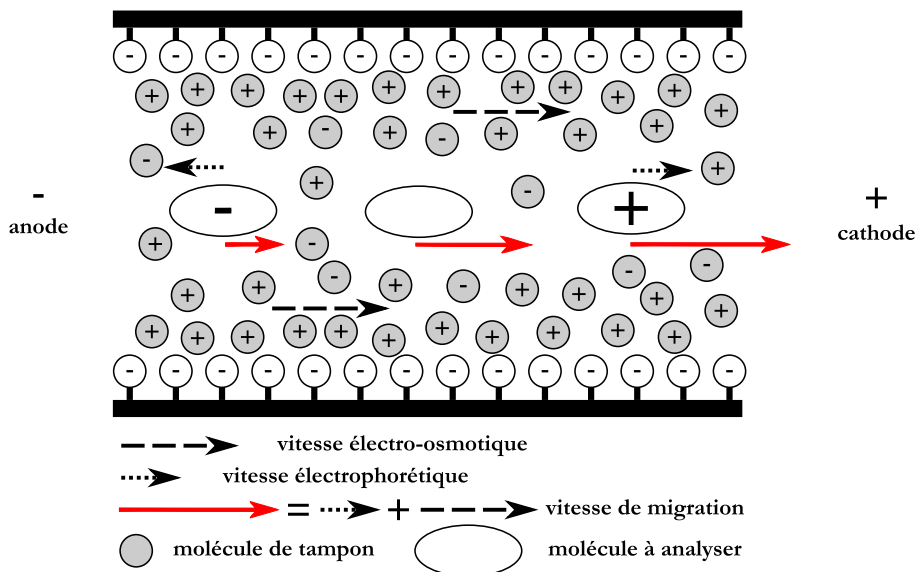


FIGURE B.2 – Représentation schématique de la migration des espèces dans un capillaire d'électrophorèse.

## B.2.2 Modes de séparation

Nous avons utilisé deux modes de séparation dans cette étude :

- le "mode de zone" qui consiste en l'injection d'une courte zone de solution à analyser,
- ou le "mode frontal" qui consiste en l'injection continue de l'échantillon sous l'effet du pompage électro-osmotique.

Dans tous les cas, les solutions à analyser sont préparées en dissolvant les analytes dans le milieu de séparation (un tampon de  $pH$  et de force ionique fixés). Toutes les solutions injectées doivent avoir la même composition en tampon.

### B.2.2.1 Mode de zone

Cette méthode de séparation est la plus utilisée. Le capillaire est initialement rempli par le milieu de séparation. On injecte alors une très faible quantité d'échantillon à analyser. Chaque extrémité du capillaire est plongée dans le tampon de séparation et on lui applique une tension. Les produits seront détectés sous forme de pics. Dans nos conditions d'analyse, la cathode étant placée côté détecteur, les analytes chargés positivement sont détectés les premiers puis viennent les analytes neutres et enfin ceux chargés négativement.

### B.2.2.2 Mode frontal

En mode frontal, le capillaire est rempli du tampon de séparation puis plongé côté détecteur dans ce même tampon et à l'autre extrémité dans l'échantillon à analyser. La tension est appliquée de manière à ce que l'électro-osmose déplace le liquide vers le détecteur. On détectera en premier les analytes cationiques puis les neutres et enfin les anioniques mais sous forme de plateau s'additionnant.

Le principal avantage de cette méthode est de ne pas perturber un équilibre existant en solution à condition que l'espèce libre soit aussi l'espèce la plus mobile. Cette technique permet ainsi de déterminer des isothermes d'association, par exemple entre un tensio-actif et un polymère (*cf.* chapitre 3).

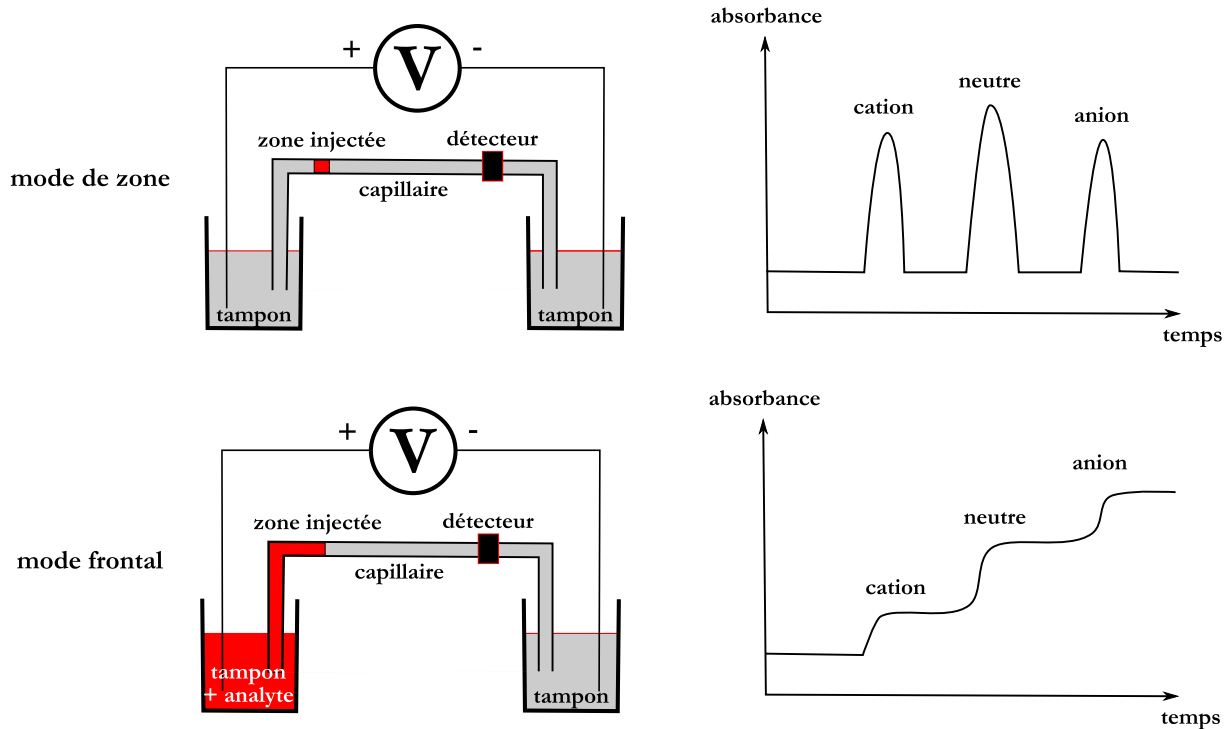


FIGURE B.3 – Comparaison entre le mode de zone et le mode frontal.

## B.3 Dichroïsme circulaire

Les mesures ont été effectuées sur un appareil JASCO J-815 avec des cellules en quartz de trajet optique 1 mm.

### B.3.1 Principe

On dit qu'un matériau présente un dichroïsme circulaire s'il absorbe différemment la lumière selon que sa polarisation est circulaire droite ou circulaire gauche. C'est, par exemple, le cas des solutions de molécules chirales.

La spectroscopie de dichroïsme circulaire peut être mesurée de deux manières :

1. soit on mesure la différence d'absorption de la lumière polarisée circulairement gauche et de la lumière polarisée circulairement droite en fonction de la longueur d'onde comme présenté figure B.4.

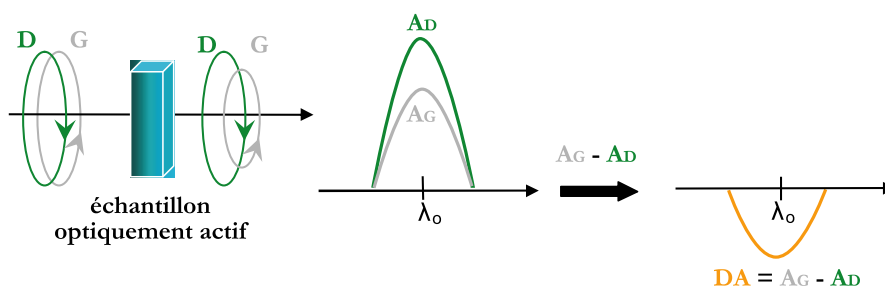


FIGURE B.4 – Principe optique du dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire  $DC$  peut alors être exprimé en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  comme suit :

$$DC = \Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{gauche}} - \varepsilon_{\text{droite}}, \quad (B.13)$$

$$(B.14)$$

avec  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ .

2. soit on mesure l'ellipticité induite sur une onde polarisée rectilignement. En effet, une onde incidente polarisée rectilignement peut se décomposer en deux parties, l'une circulaire droite et l'autre circulaire gauche. En traversant un échantillon optiquement actif, chaque polarisation va rencontrer un indice de réfraction et un coefficient d'absorption qui lui sont propres. Ainsi, en sortie de l'échantillon, les deux ondes polarisées se recomposent avec des amplitudes et des retards différents. L'onde résultante est alors une onde elliptique.

Dans le cas des peptides, le dichroïsme circulaire  $DC$  peut alors être exprimé comme suit, en  $deg.cm^2.dmol^{-1}.residu^{-1}$  :

$$DC = [\psi] = \frac{0.1 \psi MR}{l C}, \quad (B.15)$$

avec  $\psi$  l'ellipticité mesuré par l'appareil en millidegré,  $MR$  la masse molaire moyenne d'un résidu en  $g.mol^{-1}$  ( $MR$  = masse molaire de la protéine/nombre de résidus),  $l$  le trajet optique en cm et  $C$  la concentration en protéine en  $g.L^{-1}$ .

Ces deux expressions sont directement reliées par

$$[\psi] = 3298\Delta\varepsilon. \quad (B.16)$$

### B.3.2 Etude de la structure des protéines

Les protéines sont des molécules optiquement actives, elles présentent donc un dichroïsme circulaire. Ce dernier dépend de la structure adoptée par la protéine. On peut définir deux régions spectrales d'intérêt :

- l'UV lointain, entre 170 et 250 nm, dominée par l'absorbance des liaisons peptidiques,
- l'UV proche, entre 250 et 300 nm, dominée par l'absorbance des acides aminés aromatiques.

Région spectrale	Longueur d'onde	Chromophores responsable de l'absorption
UV lointain	190 - 230 nm	liaison peptidique
UV proche	250 - 270 nm	phenylalanine
	270 - 290 nm	tyrosine
	280 - 300 nm	tryptophane
	250 - 350 nm	pont disulfure

TABLE B.3 – Récapitulatif des régions spectrales d'intérêt en dichroïsme circulaire des protéines.

Le signal de dichroïsme circulaire en UV lointain renseigne sur la structure secondaire de la protéine. Il est assez sensible à la présence de structures ordonnées et est ainsi caractéristique de la conformation de la protéine. Il est donc souvent utilisé pour l'étude du repliement et en particulier pour suivre l'apparition des structures secondaires.

Les principaux types de structure secondaire (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , structure non ordonnée ...) donnent un signal caractéristique présenté figure B.5.

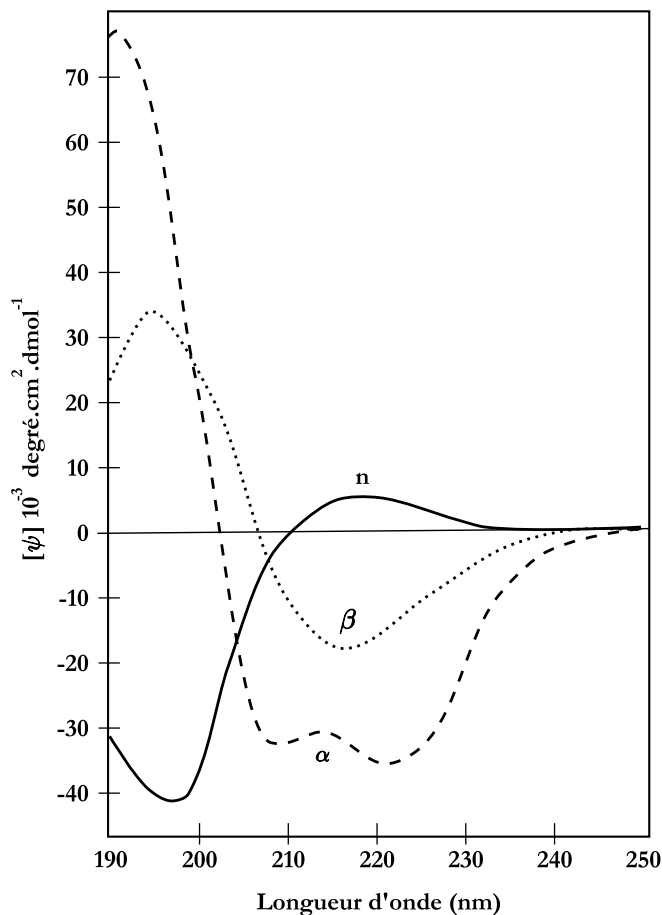


FIGURE B.5 – Spectres de dichroïsme circulaire de la poly(Lys) en conformation ( $\alpha$ ) hélice  $\alpha$ , ( $\beta$ ) feuillet  $\beta$ , (n) structure non ordonnée d'après [Greenfield et Fasman 1969].

Il est possible de déterminer la proportion de chaque type de structure secondaire dans une protéine en déconvoluant son spectre de dichroïsme circulaire. Dans ce travail, nous avons utilisé le programme d'analyse DichroWeb [Whitmore].

### B.3.3 Utilisation du programme DichroWeb

La déconvolution des spectres de dichroïsme circulaire de la CAB (*cf.* page 93) a été effectuée avec le logiciel DichroWeb pour le programme CONTINLL et avec la base de données de référence SP175. Ce choix dépend notamment des longueurs d'onde expérimentales disponibles (pour nous la longueur d'onde minimale = 190 nm).

## Bibliographie

- [Greenfield et Fasman 1969] N.J. Greenfield and G.D. Fasman. *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*. Biochemistry, vol. 8, no. 10, pages 4108–4116, 1969.
- [Potier *et al.* 2003] I. Le Potier, M. Taverna and P. Morin. *Electrophorèse capillaire*. In Techniques d'analyse. Techniques de l'Ingénieur edition, December 2003.
- [Whitmore] Lee Whitmore. *DichroWeb*. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.



## Annexe C

# Etude de l'association polymère/tensio-actif

### Sommaire

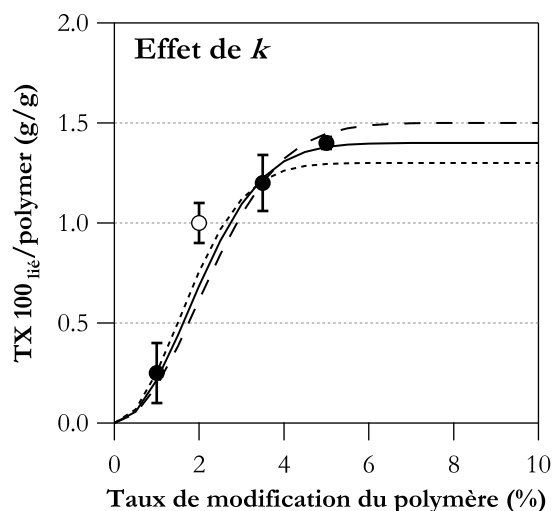
---

C.1 Influence des paramètres $k$ et $\langle L \rangle$ sur la valeur de $l_C$ dans le cadre de l'ajustement des données d'électrophorèse capillaire . . . . .	147
--	-----

---

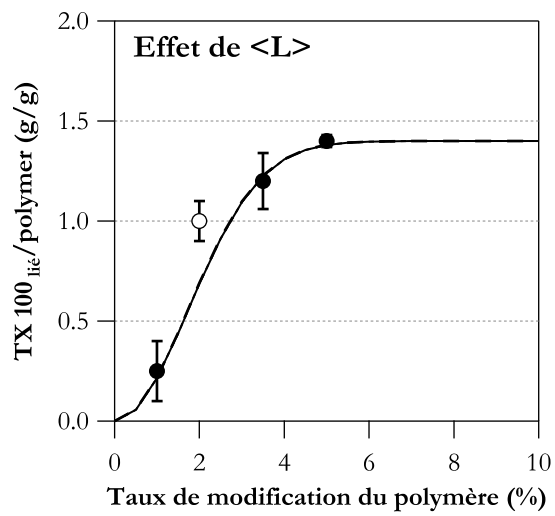
### C.1 Influence des paramètres $k$ et $\langle L \rangle$ sur la valeur de $l_C$ dans le cadre de l'ajustement des données d'électrophorèse capillaire

On ajuste le paramètre  $l_C$  de l'équation 3.8 pour différentes valeurs de  $k$  et  $\langle L \rangle$  suivant les valeurs expérimentales issues des mesures d'électrophorèse capillaire.



	Courbe		
	(—)	(- -)	(. . .)
$k$	1.5	1.4	1.3
$\langle L \rangle$	450	450	450
$l_C$	2.9	3.7	4.8

FIGURE C.1 – Effet de la variation de  $k$  sur la valeur de  $l_C$ . Représentation de l'équation 3.8 avec les paramètres donnés dans le tableau.



	Courbe	
	(- -)	(—)
$k$	1.4	1.4
$\langle L \rangle$	450	600
$l_C$	3.7	2.8

FIGURE C.2 – Effet de la variation de  $\langle L \rangle$  sur la valeur de  $l_C$ . Représentation de l'équation 3.8 avec les paramètres donnés dans le tableau.

La variation des grandeurs  $k$  et  $\langle L \rangle$  influe peu sur la détermination de  $l_C$  qui reste dans l'intervalle  $5 \pm 2$ .

# Annexe D

## Etude du cytochrome C

### Sommaire

---

D.1	Influence des dérives dans les zones de pré et post-déplie- ment sur les valeurs de $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ . . . . .	149
D.2	Renormalisation de la fluorescence du cytochrome C en présence de polymère pour différentes concentrations en urée . . . . .	151

---

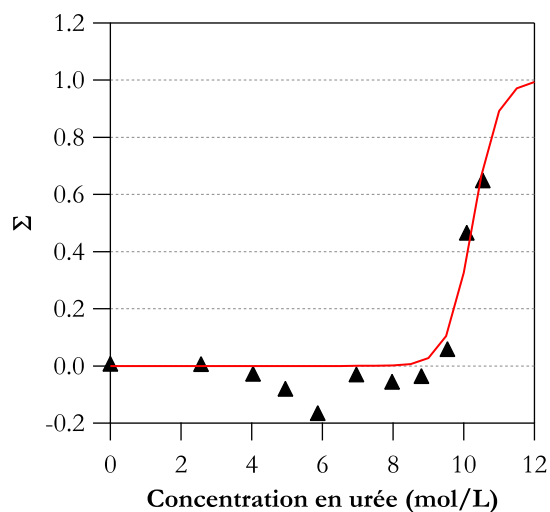
### D.1 Influence des dérives dans les zones de pré et post-déplie- ment sur les valeurs de $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$

Nous allons déterminer l'influence des dérives des signaux de dichroïsme circulaire dans les zones de pré et post-déplie-ment sur la détermination de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ . Pour cela, nous allons ajuster les valeurs expérimentales selon trois méthodes différentes :

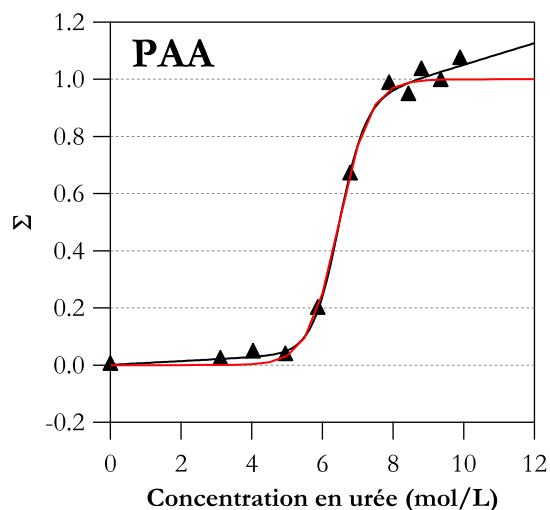
- une méthode avec 6 paramètres ajustables,  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $m$ ,  $\Sigma_N^0$ ,  $\Sigma_D^0$ ,  $m_N$  et  $m_D$ . Cette méthode ne peut être utilisée telle quelle qu'avec les données obtenues en présence de PAA. Dans les autres expériences, le peu de points obtenus dans la zone de post-déplie-ment oblige à imposer des contraintes. On choisit d'imposer le passage de la fonction affine de la zone de post-déplie-ment par le dernier point expérimental obtenu et  $0 \leq \Sigma_D^0 < 0.017 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  (la valeur maximale choisie est du même ordre de grandeur que les pentes des dérives observées dans la zone de pré-déplie-ment).
- une méthode avec 4 paramètres ajustables. On impose  $\Sigma_D^0 = 1$  et  $m_D = 0$  et on laisse libre  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $m$ ,  $\Sigma_N^0$  et  $m_N$  (c'est la méthode utilisée pour les résultats présentés dans le corps du manuscrit),
- une méthode avec 2 paramètres ajustables. On impose  $\Sigma_N^0 = 0, \Sigma_D^0 = 1$  et  $m_N = m_D = 0$ . Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau et les figures suivantes.

Méthode à $n$ paramètres	sans polymère	PAA	PAA_3.5C6azo	NAS_7C6azo _35gly	NAS_4C6azo _35gly_14arg
6		11.3	9.4	5.3	8.8
4	13	9.5	7.2	4.7	9.5
2	17	7.3	3.6	4.2	8.0
intervalle de confiance	$15 \pm 2$	$9 \pm 2$	$6.5 \pm 3$	$4.8 \pm 0.6$	$8.8 \pm 0.8$

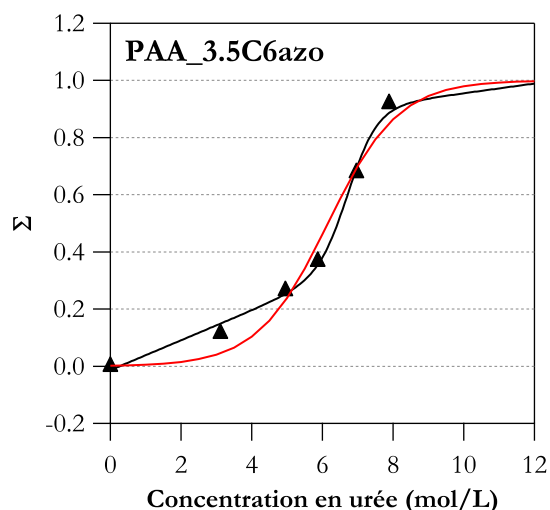
TABLE D.1 – Valeurs de  $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$  pour la dénaturation du cytochrome C en présence de différents polymères pour différentes méthodes de calcul.



	Méthode à $n$ paramètres		
	6	4	2
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$		13	17
$m$		-1.3	-1.6
$\Sigma_N^0$		0.014	0
$m_N$		-0.013	0
$\Sigma_D^0$		1	1
$m_D$		0	0

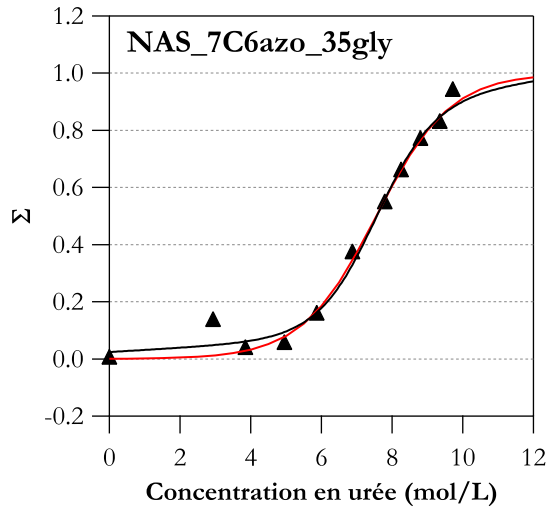


	Méthode à $n$ paramètres		
	6	4	2
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$	11.3	9.5	7.3
$m$	-1.6	-1.5	-1.0
$\Sigma_N^0$	-0.0079	-0.0019	0
$m_N$	0.020	0.0057	0
$\Sigma_D^0$	0.586	1	1
$m_D$	0.043	0	0

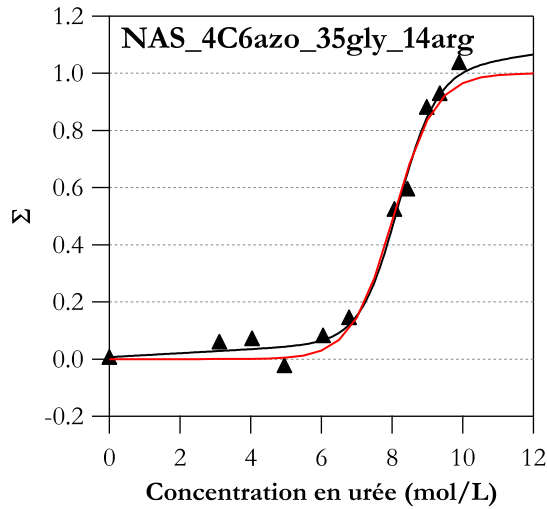


	Méthode à $n$ paramètres		
	6*	4	2
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$	9.4	7.2	3.6
$m$	-1.4	-1.1	-0.58
$\Sigma_N^0$	-0.014	-0.0083	0
$m_N$	0.052	0.047	0
$\Sigma_D^0$	0.79	1	1
$m_D$	0.017	0	0

FIGURE D.1 – Evolution des signaux (▲) de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. Ajustement de l'ensemble des données (—) d'après la méthode à 6 paramètres et (—) d'après la méthode à 2 paramètres.



	Méthode à $n$ paramètres		
	6*	4	2
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$	5.3	4.7	4.2
$m$	-0.70	-0.61	-0.56
$\Sigma_N^0$	-0.024	-0.026	0
$m_N$	0.0072	0.0042	0
$\Sigma_D^0$	0.77	1	1
$m_D$	0.017	0	0



	Méthode à $n$ paramètres		
	6*	4	2
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$	8.8	9.5	8.0
$m$	-1.1	-1.2	-1.0
$\Sigma_N^0$	0.0069	-0.0039	0
$m_N$	0.0069	0.0083	0
$\Sigma_D^0$	0.82	1	1
$m_D$	0.017	0	0

FIGURE D.2 – Evolution des signaux (▲) de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. Ajustement de l'ensemble des données (—) d'après la méthode à 6 paramètres et (—) d'après la méthode à 2 paramètres.

## D.2 Renormalisation de la fluorescence du cytochrome C en présence de polymère pour différentes concentrations en urée

On renormalise les données de fluorescence de manière à ce que le dernier point expérimental (celui pour la concentration d'urée la plus grande) soit confondu avec celui issu des mesures de dichroïsme circulaire.

	PAA_3.5C6azo	NAS_7C6azo _35gly	NAS_4C6azo _35gly_14arg
$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	7.8	6.3	9.6
$m_N$ (kcal.mol <sup>-2</sup> .L <sup>-1</sup> )	0.98	0.78	1.1
$C_m$ (mol.L <sup>-1</sup> )	8.0	8.1	8.7

TABLE D.2 – Détermination des paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyclochrome C en présence de différents polymères d'après les mesures de fluorescence renormalisées.

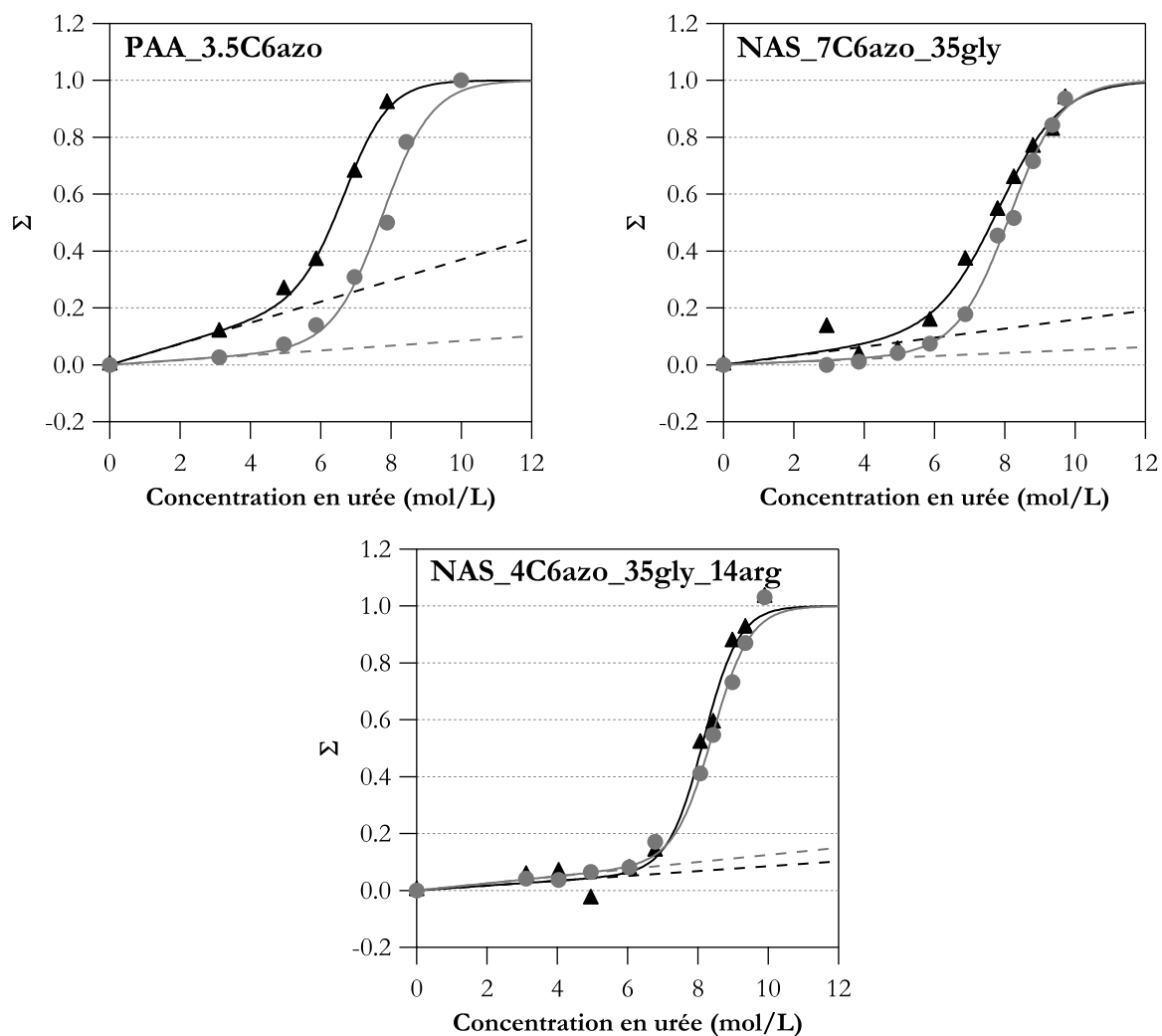


FIGURE D.3 – Evolution des signaux normalisés ( $\blacktriangle$ ) de dichroïsme circulaire à 222 nm et des signaux renormalisés ( $\bullet$ ) de fluorescence à 350 nm en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. (---) Ajustement linéaire la zone de pré-dépliection, (—) ajustement de l'ensemble des données d'après l'équation 4.6.

# Annexe E

## Etude du scFv Sha 31

### Sommaire

<b>E.1</b>	<b>Récapitulatif des échantillons</b>	<b>153</b>
<b>E.2</b>	<b>Tests ELISA</b>	<b>154</b>
E.2.1	Principe	154
E.2.2	Protocole	154
E.2.3	Effet crochet	155

### E.1 Récapitulatif des échantillons

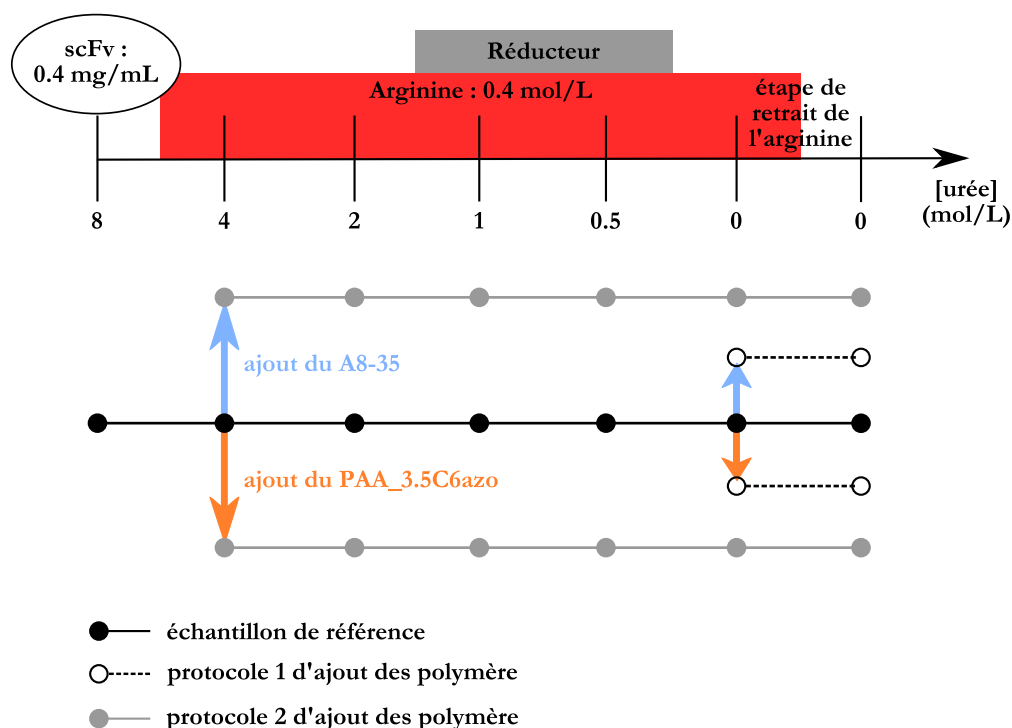


FIGURE E.1 – Récapitulatif des échantillons.

Le protocole de dialyse de renaturation du scFv Sha 31 a été réalisé 3 fois dans son ensemble dans les conditions suivantes :

- **dialyse n° 1** : dialyse en solution diluée,  $[\text{scFv}] = 0.03 \text{ mg.mL}^{-1}$ , étape de dialyse de 8 à 4 mol.L<sup>-1</sup> d'urée réalisée sur 24h,

- **dialyse n° 2** : dialyse en solution concentrée,  $[\text{scFv}] = 0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$ , étape de dialyse de 8 à 4  $\text{mol.L}^{-1}$  d'urée réalisée sur 24h,
- **dialyse n° 3** : dialyse en solution concentrée,  $[\text{scFv}] = 0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$ , étape de dialyse de 8 à 4  $\text{mol.L}^{-1}$  d'urée réalisée sur 72h.

Pour chaque dialyse, le stock d'échantillon de départ (dans 8  $\text{mol.L}^{-1}$  d'urée) a été divisé comme représenté sur la figure E.1 afin de suivre un protocole de référence, un protocole avec ajout des polymères en fin de renaturation (protocole 1) et un protocole avec ajout des polymères en début de renaturation (protocole 2).

## E.2 Tests ELISA

### E.2.1 Principe

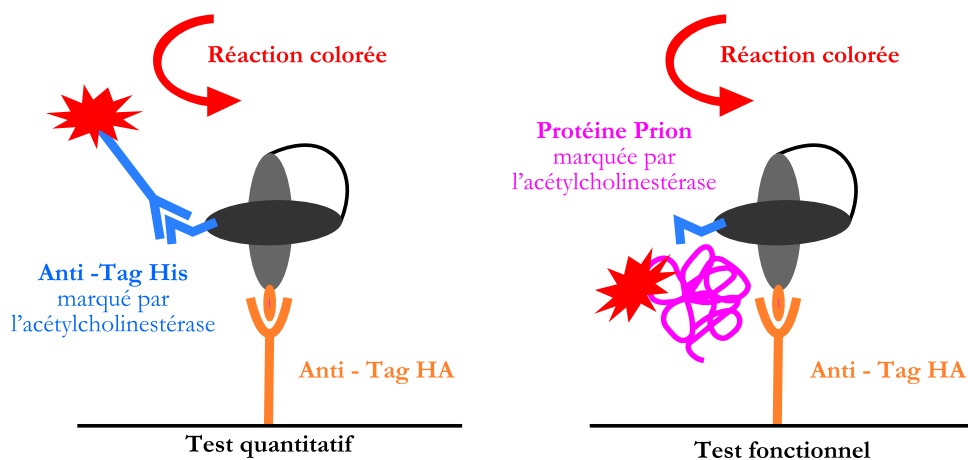


FIGURE E.2 – Principe de fonctionnement des tests ELISA de dosage des scFv totaux et actifs.

La séquence du scFv Sha 31 est marquée par un tag HA (étiquette moléculaire constituée d'une petite séquence d'acides aminés (5 à 10) reconnu par un anticorps monoclonal) à son extrémité N-terminale et un tag histidine à son extrémité C-terminale. Ces tags sont reconnus par l'anticorps de capture 12 CAS (dans le cas du tag HA) et poly His (dans le cas du tag HIS), quel que soit l'état de repliement du scFv. Les tests ELISA se réalisent dans une plaque de 96 puits dans lesquels l'anticorps de capture (12CA5) a été immobilisé par adsorption passive sur le plastique.

- Le dosage de la quantité totale de scFv produits se fait grâce à l'ajout d'anticorps poly His couplés à de l'acétylcholinestérase. L'anticorps poly His va reconnaître le tag His et l'acétylcholinestérase va agir sur le révélateur en produisant des chromophores.
- Le dosage de la quantité de scFv actifs se fait grâce à l'ajout de l'antigène pri4D couplé à de l'acétylcholinestérase. L'antigène pri4D se lie au scFv Sha 31 par les acides aminés constituant son épitope. La reconnaissance de l'antigène nécessite donc que les scFvs soient à l'état natif.

### E.2.2 Protocole

Ce test se réalise en quatre étapes :

1. ajout dans chaque puits de la plaque de test contenant l'anticorps de capture de la solution contenant le scFv, puis ajout du traceur (poly His ou pri4D),
2. incubation pendant une nuit,
3. lavage des puits et élimination des produits en suspension non fixés,



4. ajout du chromophore et lecture de la densité optique toutes les 15 minutes pendant une heure.

Les absorbances résultantes sont exprimées relativement à la valeur la plus élevée obtenue sur une même plaque, soit pour le dosage total, soit pour le dosage actif. Les deux tests sont indépendants et ne peuvent être comparés directement.

### E.2.3 Effet crochet

L'ajout simultané du traceur et des scFv permet de gagner du temps en évitant de réaliser une première incubation des scFv, suivie d'un lavage et de l'incubation du traceur mais il impose alors de tenir compte de l'effet "crochet" lors de l'analyse des résultats.

En effet, lorsque le scFv est très concentré, seule une partie de celui-ci se fixe sur les anticorps de capture jusqu'à saturation des espaces disponibles. Il reste alors du scFv en suspension dans le tampon d'incubation. Le traceur va se fixer indifféremment sur un scFv capturé ou en suspension. Les scFv restant en suspension sont éliminés lors du lavage avant la révélation. On peut donc se retrouver dans un cas de figure où l'excès de scFv non fixé a consommé la majeure partie du traceur et où après lavage seuls quelques uns des scFv fixés sont marqués par le traceur. Ces échantillons donneront un signal plus faible qu'ils ne le pourraient dans un marquage quantitatif.

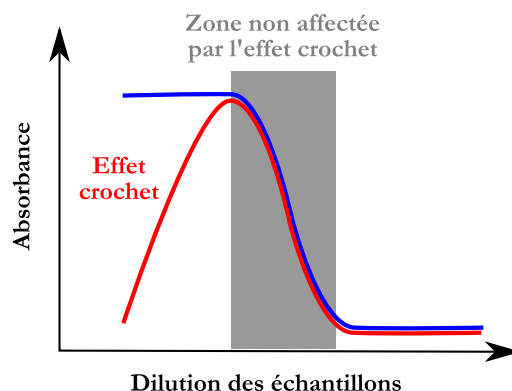


FIGURE E.3 – Schématisation de l'effet crochet. (—) évolution de l'absorbance d'un échantillon en fonction de sa dilution pour un protocole avec l'étape de fixation séparée de celle de marquage, (—) évolution de l'absorbance d'un échantillon en fonction de sa dilution dans le cas d'une fixation simultanée au marquage.

Comme représenté figure E.3, un échantillon traité par protocole avec deux étapes d'incubation séparées va présenter une saturation de l'absorbance aux fortes concentrations. En revanche, un échantillon subissant un protocole avec une unique étape d'incubation va présenter de faibles absorbances aux fortes concentrations dessinant ainsi une courbe en forme de crochet. Pour pouvoir s'affranchir de l'effet crochet, il faut analyser les données obtenues pour des dilutions suffisamment grandes pour que la plaque ne soit pas saturée en scFv. Le signal est alors proportionnel à la concentration de scFv.



# Table des figures

1.1	Représentation de différents schémas réactionnels simples de repliement. . . . .	5
1.2	Représentation schématique de l'évolution de la compacité et des structures secondaires au cours du repliement. . . . .	6
1.3	Représentation schématique du processus de repliement. . . . .	8
1.4	Représentation schématique du processus de repliement et zone d'action des différents types d'additifs. . . . .	10
1.5	Représentation schématique des principes de liaison préférentielle et hydratation préférentielle d'une protéine en présence d'additifs. . . . .	11
1.6	Représentation schématique des cycles de réaction du système GroEL/GroES dans le repliement des protéines. . . . .	14
1.7	Représentation schématique du fonctionnement du système de chaperonne artificielle tensio-actif/ $\beta$ CD développé par H. Gellman <i>et al.</i> . . . . .	15
1.8	Représentation schématique du fonctionnement du système de chaperonne artificielle CHP nanogel/ $\beta$ CD développé par K. Akiyoshi <i>et al.</i> . . . . .	16
1.9	Structure des polymères synthétisés au cours de cette thèse. . . . .	17
1.10	Représentation schématique d'un cycle chaperon des polymères modifiés azobenzènes lors du repliement d'une protéine. . . . .	19
2.1	Photoisomérisation de l'azobenzène. . . . .	25
2.2	Structure des deux greffons azobenzènes utilisés. . . . .	25
2.3	Spectres d'absorption UV-visible des polymères modifiés azobenzènes. . . . .	26
2.4	Schéma réactionnel de l'étape de couplage diazoïque. . . . .	27
2.5	Schéma réactionnel de l'étape de couplage entre l'azobenzène et de l'espaceur alkyle. . . . .	28
2.6	Schéma réactionnel de l'étape de déprotection de la fonction amine. . . . .	29
2.7	Schéma réactionnel du couplage peptidique d'un greffon amino-azobenzène sur un squelette poly(acide acrylique). . . . .	30
2.8	Spectre RMN proton d'un polyacrylate de sodium modifié C6azo à 2% en masse dans l'eau deutérée. . . . .	31
2.9	Spectre RMN proton d'un polyacrylate de sodium modifié C4azoC4 à 2% en masse dans l'eau deutérée. . . . .	31
2.10	Suivi par RMN proton de l'hydrolyse du poly(NAS). . . . .	34
2.11	Spectre RMN proton du poly(NAS) modifié à différents taux par de la glycine. . . . .	35
2.12	Spectre RMN proton du NAS_35gly_15arg. . . . .	36
3.1	Structure des deux tensio-actifs utilisés. . . . .	43
3.2	Schéma illustrant l'association d'un polymère modifié azobenzène sur une micelle. . . . .	43
3.3	Effet de l'ajout de TX 100 sur l'absorbance du polymère PAA_3.5C6azo. . . . .	45
3.4	Variation de la fraction d'azobenzène lié en fonction de la concentration en tensio-actif. . . . .	46
3.5	Détermination de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA_xC6azo/TX 100 sous lumière bleue. . . . .	47

3.6	Variation de la fraction d'azobenzène lié en fonction de la concentration en tensio-actif. . . . .	48
3.7	Variation de la fraction en azobenzènes liés en fonction de la concentration en tensio-actif. . . . .	49
3.8	Détermination de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA <sub>x</sub> C4azoC4/TX 100 sous lumière bleue. . . . .	50
3.9	Représentation schématique des zones de migration en FACCE pour un mélange polymère/TX 100. . . . .	51
3.10	Electrophérogrammes des mélanges TX 100/PAA <sub>5</sub> C6azo. . . . .	52
3.11	Isothermes d'association du TX 100 avec les polymères modifiés C6azo. . . . .	53
3.12	Estimation de la longueur de boucle critique pour les complexes PAA <sub>x</sub> C6azo/TX 100 dans le noir. . . . .	54
3.13	Isotherme d'association tensio-actif/polymère dans le noir. . . . .	55
3.14	Isothermes d'association du TX 100 avec les polymères modifiés C4azoC4. . . . .	55
3.15	Isothermes d'association SDBS/PAA <sub>3.5</sub> C6azo obtenue par dialyse. . . . .	56
3.16	Evolution d l'isotherme d'association, de la fraction d'azobenzènes liés et de <i>R</i> pour un système PAA <sub>5</sub> C6azo/TX 100. . . . .	57
3.17	Schéma illustrant le principe de la photo-dissociation des micelles. . . . .	59
3.18	Effet de l'irradiation sur l'intensité de lumière diffusée par une solution tensio-actif/polymère. . . . .	60
3.19	Effet de l'irradiation sur les isothermes d'association TX 100/polymère. . . . .	61
3.20	Détermination de la longueur de boucle critique pour les différents greffons sous irradiation UV. . . . .	62
3.21	Effet de l'irradiation sur l'intensité de lumière diffusée par une solution protéine/PAA <sub>3.5</sub> C6azo. . . . .	64
3.22	Effet de l'irradiation et de la concentration en sel sur l'intensité de lumière diffusée par une solution cytochrome C/PAA <sub>3.5</sub> C6azo. . . . .	67
4.1	Structure de l'hème du cytochrome C. . . . .	72
4.2	Schéma de la structure du cytochrome C du cheval. . . . .	73
4.3	Spectres d'absorption du cytochrome C dans différents états. . . . .	74
4.4	Spectres d'émission de fluorescence du cytochrome C dans différents états. . . . .	75
4.5	Evolution des spectres de dichroïsme circulaire du cytochrome C avec sa dénaturation. . . . .	76
4.6	Evolution des signaux normalisés d'absorbance, de fluorescence et de dichroïsme circulaire en fonction de la concentration en urée. . . . .	77
4.7	Evolution des signaux normalisés de fluorescence et de dichroïsme circulaire en fonction de la concentration en urée. . . . .	79
4.8	Evolution des signaux normalisés d'absorbance, de fluorescence et de dichroïsme circulaire en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. . . . .	81
4.9	Schéma explicatif de l'effet du PAA sur le cytochrome C . . . . .	82
4.10	Schéma explicatif de l'effet du PAA <sub>3.5</sub> C6azo sur le cytochrome C . . . . .	83
4.11	Evolution de l'absorbance et de l'intensité de fluorescence pour des échantillons à 9 mol.L <sup>-1</sup> d'urée en fonction de la concentration en polymère. . . . .	84
4.12	Effet de la force ionique sur l'évolution des signaux normalisés d'absorbance et de fluorescence en présence de polymères. . . . .	87
4.13	Effet de la force ionique et de l'irradiation sur l'évolution des signaux normalisés d'absorbance et de fluorescence en présence de polymères. . . . .	87
5.1	Schéma de la structure de la CAB. . . . .	92
5.2	Electrophérogrammes de la CAB native en présence de polymère. . . . .	94

5.3	Spectre de dichroïsme circulaire de la CAB native. . . . .	94
5.4	Réaction d'hydrolyse de la NPA catalysée par la CAB. . . . .	95
5.5	Activité enzymatique de la CAB native en présence de polymères. . . . .	95
5.6	Electrophérogrammes de la CAB après renaturation en présence de polymère. . .	97
5.7	Spectre d'émission de fluorescence de la CAB native et dénaturée. . . . .	98
5.8	Evolution de la fluorescence de la CAB pendant sa renaturation en présence de PAA_3.5C6azo ou de NAS_7C6azo_35gly sous différentes irradiations. . . . .	99
5.9	Spectres de dichroïsme de la CAB au cours de sa renaturation en présence de PAA_3.5C6azo et de PAA_7C6azo_35gly. . . . .	100
5.10	Conditions de renaturation de la CAB avec le 7.5_PAA_4C6azo et activité enzymatique résultante. . . . .	105
5.11	Solubilité et activité enzymatique de la CAB après renaturation en présence de polymères modifiés C6azo. . . . .	107
5.12	Cinétique de renaturation de la CAB en présence de PAA_3.5C6azo dans noir. .	108
5.13	Structure du polymère NAS_3C6azo_20PEG_63EtOH. . . . .	110
5.14	Solubilité et activité enzymatique de la CAB après renaturation en présence de différents polymères. . . . .	111
6.1	Structure des fragments d'anticorps. $V_L$ = domaine variable de la chaîne légère, $V_H$ = domaine variable de la chaîne lourde. . . . .	117
6.2	Représentation schématique du protocole de renaturation standard. . . . .	118
6.3	Evolution des spectres de fluorescence du scFv Sha 31 au cours du protocole standard de renaturation. . . . .	118
6.4	Fraction de scFv agrégés présents dans le milieu à chaque étape de dialyse. . . .	119
6.5	Evolution du rapport des intensités de fluorescence à 338 et 350 nm au cours du protocole standard de renaturation. . . . .	120
6.6	Structure de l'amphipol A8-35. . . . .	121
6.7	Réponse des échantillons au test ELISA en présence de polymère. . . . .	122
6.8	Fraction de scFv agrégés en présence de polymères. . . . .	122
6.9	Fraction de scFv agrégés en présence de polymères. . . . .	123
6.10	Evolution du rapport des intensités de fluorescence à 338 et 350 nm au cours de la renaturation en présence de polymères. . . . .	124
6.11	Réponse des échantillons au test ELISA en présence de polymère. . . . .	124
A.1	Spectre RMN proton du 4-butyl-4'-hydroxyl azobenzene. . . . .	130
A.2	Spectre RMN proton du 4-Butyl-4'-(4-Boc-amino)butyl azobenzène. . . . .	131
A.3	Spectre RMN proton du poly(NAS). . . . .	134
A.4	Spectre RMN proton du NAS_4C6azo_35gly_18arg. . . . .	135
A.5	Spectre RMN HMQC du NAS_76gly. . . . .	136
A.6	Spectre RMN COSY du NAS_76gly. . . . .	136
B.1	Cuve de fluorescence vue du dessus. . . . .	140
B.2	Représentation schématique de la migration des espèces dans un capillaire d'électrophorèse. . . . .	143
B.3	Comparaison entre le mode de zone et le mode frontal. . . . .	144
B.4	Principe optique du dichroïsme circulaire. . . . .	144
B.5	Spectres de dichroïsme circulaire de la poly(Lys). . . . .	146
C.1	Effet de la variation de $k$ sur la valeur de $l_C$ . . . . .	147
C.2	Effet de la variation de $\langle L \rangle$ sur la valeur de $l_C$ . . . . .	148

D.1	Ajustement suivant différentes méthodes de l'évolution des signaux normalisés de dichroïsme circulaire en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. . . . .	150
D.2	Ajustement suivant différentes méthodes de l'évolution des signaux normalisés de dichroïsme circulaire en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. . . . .	151
D.3	Evolution des signaux normalisés de dichroïsme circulaire et des signaux renormalisés de fluorescence en fonction de la concentration en urée en présence de différents polymères. . . . .	152
E.1	Récapitulatif des échantillons. . . . .	153
E.2	Principe de fonctionnement des tests ELISA de dosage des scFv totaux et actifs. . . . .	154
E.3	Schématisation de l'effet crochet . . . . .	155

# Liste des tableaux

2.1	Récapitulatif des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(acide acrylique). . . . .	32
2.2	Récapitulatif des taux de modification obtenus pour le greffage de la glycine. . .	35
2.3	Récapitulatif des polymères synthétisés par modification d'un squelette poly(N-acryloxysuccinimide). . . . .	37
3.1	Composition des complexes polymères/TX 100 en présence de sel. . . . .	58
3.2	Valeurs de la longueur de boucle critique obtenues à partir des mesures de quantité de micelles liées pour les différents greffons. . . . .	62
3.3	Propriétés physicochimiques des protéines natives. . . . .	64
3.4	Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques de variation de l'intensité diffusée lors de l'association polymère/protéine. . . . .	65
3.5	Effet d'association et de dissociation sur les intensités diffusées de différents mélanges polymère/protéine ou polymère/tensio-actif. . . . .	66
4.1	Paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyclochrome C. . . . .	79
4.2	Paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyclochrome C en présence de différents polymères. . . . .	80
4.3	Concentration en polymère à saturation déterminée d'après les mesures d'absorbance et de fluorescence. . . . .	85
4.4	Composition des complexes polymère/protéine à saturation. . . . .	86
5.1	Proportions des différents types de structures secondaires de la CAB native seule ou en solution avec du polymère obtenues par le programme DichroWeb. . . . .	93
5.2	Aires des pics normalisées par leur temps de migration moyen ( $s^{-1}$ ) à différentes mobilités. . . . .	96
5.3	Solubilité et activité enzymatique pour différents protocoles de renaturation de la CAB. . . . .	102
5.4	Comparaison des solubilités obtenues par deux méthodes de dosage différentes. .	104
5.5	Solubilité et activité enzymatique de la CAB en présence de PAA pour des milieux de renaturation à différentes forces ioniques après 5h d'incubation. . . . .	111
A.1	Récapitulatif de la composition de tous les polymères utilisés . . . . .	137
B.1	Récapitulatif des conditions utilisées pour les mesures de fluorescence . . . . .	139
B.2	Valeurs expérimentales et théoriques du facteur correctif de quelques polymères. .	141
B.3	Récapitulatif des régions spectrales d'intérêt en dichroïsme circulaire des protéines.	145
D.1	Valeurs de $\Delta G^{H_2O}$ pour la dénaturation du cytochrome C en présence de différents polymères pour différentes méthodes de calcul. . . . .	149

D.2 Détermination des paramètres thermodynamiques de la dénaturation du ferrocyanochrome C en présence de différents polymères d'après les mesures de fluorescence renormalisées. . . . . 151





## Résumé

Nous avons cherché à concevoir des macromolécules ayant un comportement de chaperonne vis à vis de diverses protéines et notamment en fondant leur activité sur des propriétés stimulables par la lumière. Les interactions hydrophobes constituent un paramètre clé de l'effet chaperonne qui a été mis en évidence dans les chaperonnes biologiques aussi bien que dans les chaperonnes artificielles. Nous avons synthétisé des polymères à amphiphilie photo-stimulable portant des chaînes pendantes azobenzènes. Ces polymères sont capables d'association/dissociation photo-stimulables avec des particules colloïdales à cœur hydrophobe. Différents paramètres peuvent moduler ces associations comme la force ionique, le taux de modification hydrophobe, la nature du greffon... Ces polymères ont montré plusieurs propriétés caractéristiques de chaperonnes artificielles : ils déstabilisent une protéine modèle, le cytochrome C, protègent de l'agrégation et augmentent l'efficacité des procédés de renaturation de l'anhydrase carbonique et d'un fragment d'anticorps surexprimé en bactérie. L'évolution du repliement a été caractérisée par suivi des structures secondaires en dichroïsme circulaire et par suivi de la compacité des protéines en fluorescence. L'association polymère/protéine a été étudiée par électrophorèse capillaire et par diffusion de la lumière.

**Mots-clés : renaturation, chaperonne, protéine, agrégation, photo-stimulation, polymère modifié hydrophobe, azobenzène, complexes polymère/tensio-actif.**

## Abstract

We wanted to design macromolecules that behave like artificial chaperones with different proteins and form which the motor will be light-stimulation. Hydrophobic interactions are proved to be a key point of the chaperone effect both in biological and artificial chaperones. We synthesized polymers with azobenzene moieties that have a light-triggered amphiphily. These polymers were shown to be able to photo-associate and photo-dissociate with colloidal partners like micelles or proteins. The parameters that can modulate these associations are ionic strength, hydrophobic modification rate, nature of azobenzene moieties... These polymers have exhibited some features of artificial chaperones : they destabilize a model protein like cythochrome C, they prevent from aggregation and improve the efficiency of the renaturation process of carbonic anhydrase and of an antibody fragment overexpressed in bacteria. The refolding was monitored by following the evolution of secondary structures by circular dichroism and the evolution of the compacity of the protein by fluorescence. The polymer/protein association was studied by capillary electrophoresis and light scattering.

**Key-words : renaturation, chaperone, protein, aggregation, light-stimulation, hydrophobic modified polymer, azobenzene, polymer/surfactant complex.**