

# PROJETS DE RECHERCHE

Dr Philippe HUETZ

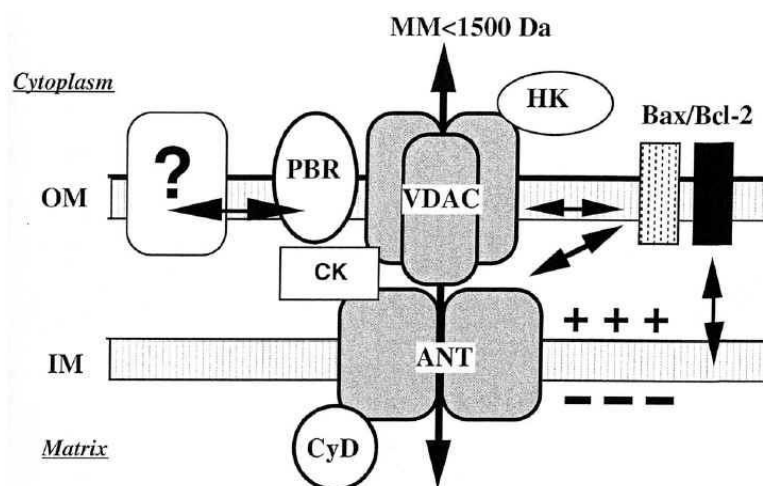
## CANCER

### I - Etude de la réactivité des thiols au niveau de la protéine membranaire mitochondriale ANT (Adenine Nucleotide Translocase).

J'étudie, en utilisant des calculs de chimie quantique, un modèle de réaction que j'ai écrite pour rendre compte de l'oxydation de deux cystéines de l'ANT, cruciale pour le mécanisme de la protéine déclenchant l'apoptose.

### L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme universellement adopté dans le règne animal et remarquablement conservé au cours de l'évolution. Elle implique de multiples gènes pro-apoptogènes (p53, c-myc, bax...), l'induction et/ou l'activation de systèmes enzymatiques (caspases, transglutaminases, endonucléases, protéases...) contrôlés par des gènes anti-apoptogènes (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> entre autres). Elle est déclenchée par la reconnaissance d'un signal extracellulaire (phase initiatrice), un stimulus initial qui peut être de différentes natures : une radiation, un stress oxydant (monoxyde d'azote, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicaux libres (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sup>•</sup>)...), un processus inflammatoire (TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor)), une réaction autoimmune (Fas/CD95 [1]). En particulier, un stress génotoxique, une chimiothérapie, certains agents xénobiotiques (atractyloside...) activent la protéine p53 ; ce signal engendre une cascade réactionnelle, dans laquelle la mitochondrie joue un rôle majeur [2,3]. Le mécanisme central de cette phase effectrice est l'altération de la perméabilité membranaire mitochondriale, et l'ouverture du PTPC (Permeability Transition Pore Complex), un complexe multiprotéique de la membrane interne dont fait partie l'ANT (Fig.1).



**Fig.1:** Schéma de l'organisation putative du PTPC au site de contact des membranes mitochondriales. ANT, adenine nucleotide translocase ; VDAC, voltage-dependent anion channel ; PBR, peripheral benzodiazepin receptor ; CyD, cyclophilin D ; HK, hexokinase ; CK, creatine kinase ; OM, membrane mitochondriale externe ; IM, membrane mitochondriale interne ; ? protéine inconnue ; -/+,  $\Delta\Psi_m$ , potentiel transmembranaire.

Cette phase s'accompagne d'une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), suivi du gonflement de la matrice mitochondriale, une interruption du métabolisme énergétique aérobie et un stress oxydatif. Par voie de conséquence, des protéines intermembranaires telles que la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor), le cytochrome c, certaines pro-caspases, l'endonucléase G et d'autres facteurs vont être relargués dans le cytosol, initiant la phase de dégradation : activation des caspases, translocation nucléaire de l'AIF et de l'endonucléase G. La cellule va ensuite se désintégrer selon un schéma précis.

Sur le versant pathologique, l'apoptose permet de comprendre les morts cellulaires massives des cellules exposées à des rayonnements ionisants, ou lors d'une infection par le virus du SIDA (suicide des lymphocytes T  $CD4^+$  et des neurones) [4]. De même l'on considère que dans les maladies auto-immunes, les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer et l'ischémie cérébrale, la perte de certaines populations de neurones est due à des phénomènes de suicide cellulaire par apoptose. *A contrario*, la perte de la capacité de s'autodétruire par apoptose peut intervenir dans les propriétés de prolifération sans fin des cellules cancéreuses. Cela est par exemple le cas lorsque le proto-oncogène Bcl-2 (à l'origine de cancers lymphocytaires) est surexprimé de façon permanente. De même, l'inactivation du gène p53 suppresseur de tumeur, qui participe à l'apoptose, est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans les cancers humains. Dans d'autres cellules cancéreuses humaines, l'isoforme ANT2 de la protéine ANT est surexprimé par rapport à ANT1 et 3. L'on pense que cet isoforme fonctionne alors en inversant le sens de l'antiport ADP/ATP, ce qui expliquerait certaines altérations du métabolisme énergétique dans ces types de cancer.

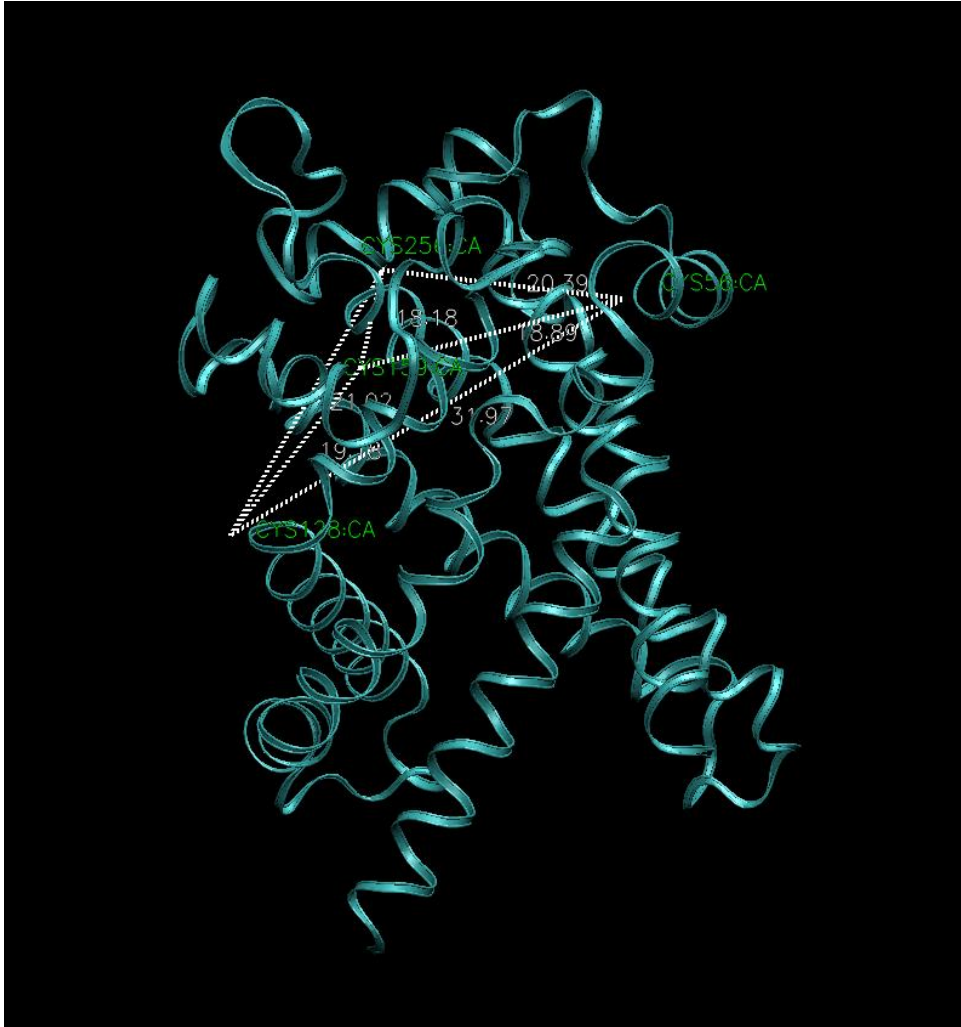
Sur le plan thérapeutique, différentes stratégies peuvent être adoptées en fonction du type de pathologie, de manière à mettre au point des agents pharmacologiques susceptibles d'inhiber ou de déclencher le processus apoptotique. Ainsi l'on peut chercher à bloquer sélectivement le gène anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses, et/ou agir sur les mécanismes mitochondriaux qui aboutissent à la mort cellulaire. L'on peut citer l'exemple récent obtenu dans le groupe d'Evangelos Michelakis [5] de l'effet du dichloroacétate (à confirmer sur l'homme), qui inhibe la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) mitochondriale, déplace le métabolisme de la glycolyse vers l'oxydation du glucose, diminue  $\Delta\Psi_m$ , augmente le niveau de  $H_2O_2$  mitochondrial, et active les canaux à potassium Kv dans tous les cancers, mais pas dans les cellules normales. Il induit donc l'apoptose et inhibe la croissance tumorale.

## La protéine ANT

La protéine ANT (Fig.2) appartient à la famille des transporteurs mitochondriaux. Elle est codée par le génome nucléaire. Sa masse molaire est d'environ 30 kDa, son pI se situe autour de 9.8. Sa séquence primaire contient un domaine tripliqué de 100 acides aminés. 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires forment un domaine compact, et son organisation fonctionnelle minimale serait homodimérique au sein de la membrane mitochondriale interne. Cette molécule bifonctionnelle a pour rôle physiologique le transport d'ADP de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie, et d'ATP de la matrice vers le cytosol. Elle fait également partie intégrante du PTPC qui, lors de l'apoptose, s'ouvre comme un pore léthal non spécifique, permettant le libre passage de petites molécules de MM < 1500 Da (eau, ions), provoquant une diminution du potentiel transmembranaire  $\Delta\Psi_m$ . Au sein de ce système, elle interagit avec diverses protéines, de façon non encore bien comprise, dont le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), la créatine kinase, Bax et Bcl-2 [6].

La connaissance de la structure de l'ANT a d'abord été fondée sur des hypothèses élaborées à partir de données biochimiques (voir la Réf. 7 pour une revue). La cristallisation

bidimensionnelle de la protéine a pu apporter un certain nombre d'indications supplémentaires par la détermination d'une structure de projection par microscopie électronique [8]. Finalement, la structure 3D de l'ANT a été déterminée par cristallographie aux rayons X par le groupe d'Eva Pebay-Peroula à Grenoble [9].



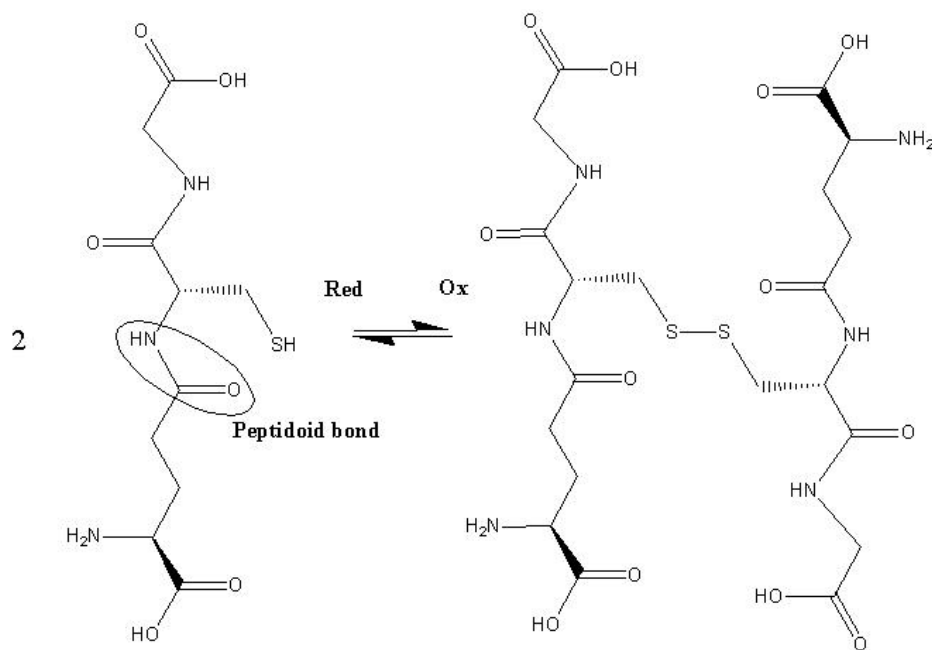
**Fig. 2:** ANT (Adenine Nucleotide Translocase) : position des cystéines (sommets du tétraèdre).

## Le glutathion

Il est connu que le glutathion (GSH, Fig.3), une molécule impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la protection contre le stress oxydatif ou la détoxification de nombreux xénobiotiques, a une incidence sur l'ANT [10-12]. En effet, une décroissance des niveaux de la concentration en GSH peut conduire à l'oxydation de l'ANT par la formation d'un pont disulfure (voie directe). D'un point de vue expérimental, les études récentes effectuées par Delphine Haouzi dans le laboratoire de Guido Kroemer à l'Institut Gustave Roussy de Villejuif, en collaboration avec Daniel Fau à Besançon, ont montré l'importance du niveau de glutathion (GSH) dans les cellules, *in vitro* et *in vivo*, chez des souris soumises à un régime riche ou pauvre en acides aminés soufrés, précurseurs du GSH. L'équilibre redox des protéines responsables de la mort cellulaire est mal connu ; on sait cependant que le niveau des groupements -SH module l'action de certains anticancéreux. En l'occurrence, une

déplétion en GSH favorise l'ouverture du PTPC et la MPT (Mitochondrial Permeability Transition), de façon co-stimulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ .

La décroissance du GSH mitochondrial (déplétion chronique) conduit également à un stress oxydatif intracellulaire (accumulation d'espèces réactives de l'oxygène), qui va augmenter le niveau de protéines pro-apoptotiques interagissant avec l'ANT (voie indirecte). Nous allons considérer la voie directe. Il a été montré que la cystéine 56 ([10], Fig.2) est directement impliquée dans la modification de la conformation de l'ANT et la formation d'un pore non spécifique. Les données suggèrent que le second résidu cystéine faisant face à la matrice impliqué dans ce cross-link oxydatif (à une distance d'environ 20 Å) est probablement la Cys 159 [13]. Il est à noter que la protéine montrée Fig.2 dont la structure a été élucidée est le transporteur bovin co-cristallisé avec un inhibiteur, le carboxyatractyloside, et l'ANT passe normalement d'une conformation à l'autre, selon qu'elle est liée à l'ADP ou à l'ATP. Ceci est déterminant pour savoir quel résidu Cys (Cys 159 ou Cys 256) est lié à Cys 56. Deuxièmement, il est très probable que l'ANT soit présente sous la forme d'un dimère ou d'un tétramère, ce qui pourrait induire la possibilité d'un pont disulfure intermoléculaire impliquant les Cys 56. Aucune donnée n'appuie cependant cette suggestion que la dimérisation de deux monomères d'ANT par leur résidu Cys 56 pourrait être importante dans les effets du stress oxydatif sur le pore MPT, bien que ce cross-link soit connu pour inhiber l'activité principale de transport de l'ANT [7].



**GLUTATHIONE = tripeptide  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine**

**Fig.3:** Réaction redox du glutathion.

### Modélisation de la réaction

Les états redox des protéines impliquées dans le processus apoptotique restent mal connus, cela étant ainsi un aspect important à préciser. Dans ce but, j'ai proposé un mécanisme de réaction non radicalaire impliquant le glutathion et les thiols des cystéines (modèles tronqués). Le but est de décrire la séquence précise des événements prenant place au fur et à mesure de ce mécanisme réactionnel. Sur la base des résultats, la complexité du

système sera accrue, en modélisant la réaction avec les molécules de glutathion et cystéine entières, de façon à mieux appréhender l'équilibre redox entre le GSH et l'ANT.

### **Références :**

- 1 - S. Nagata and P. Golstein, Science 267 (1995) 1449-1456.
- 2 - G. Kroemer and J.C. Reed, Nat. Med. 6 (2000) 513-519.
- 3 - H. LaViera et al., Oncogene 20 (2001) 4305-4316
- 4 - J.C. Ameisen, AIDS 8 (1994) 1197-1213.
- 5 - S. Bonnet et al., Cancer Cell 11 (2007) 37-51.
- 6 - C. Brenner et al., Oncogene 19 (2000) 329-336.
- 7 - A.P. Halestrap and C. Brenner, Curr. Med. Chem. 10(16) (2003) 1507-1525.
- 8 - E.R. Kunji and M. Harding, J. Biol. Chem. 278(39) (2003) 36985-36988.
- 9 - E. Pebay-Peroula et al., Nature 426 (2003) 39-44.
- 10 - P. Costantini et al., Oncogene 19 (2000) 307-314.
- 11 - D. Haouzi et al., Hepatology 33(5) (2001) 1181-1188.
- 12 - D. Haouzi et al., Apoptosis 7 (2002) 395-405.
- 13 - A.P. Halestrap et al., Biochimie 84 (2002) 153-166.

### **II - Origine de l'augmentation de la réactivité du BPDE sur les guanines des dinucléotides CpG quand les cytosines sont méthylées : élucidation du mécanisme réactionnel.**

Ceci est une étude d'importance fondamentale pour l'élucidation des mécanismes du cancer des poumons.

### **III - Précision des mécanismes réactionnels des phyto-oestrogènes vis-à-vis de l'ADN et de leurs récepteurs spécifiques.**

Le but est d'arriver à évaluer la toxicité (mutagénicité) des phyto-oestrogènes en vue de leur utilisation comme ersatz des oestrogènes cancérigènes dans le cadre de l'administration d'hormones substitutives pour les traitements de la ménopause.

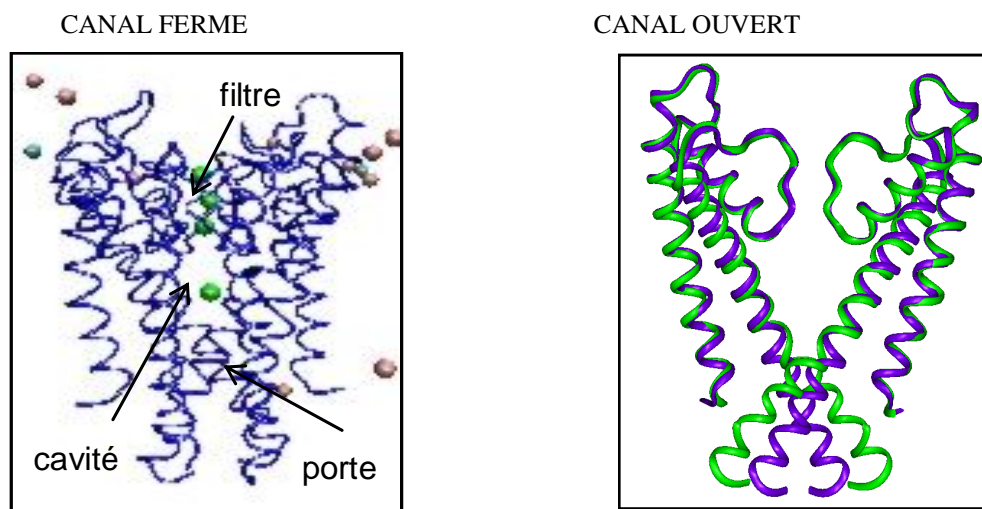
Un autre but est de développer des méthodologies computationnelles permettant d'élaborer des stratégies pour mieux cibler les propriétés anticancéreuses de milliers de polyphénols de plantes.

### **MECANISTIQUE DES CANAUX A POTASSIUM ETUDE DU CANAL KcsA**

**Présentation générale : la protéine KcsA**

Les canaux à potassium voltage-dépendants (KcsA, KvAP) sont des protéines membranaires qui jouent un rôle primordial pour divers processus cellulaires tels que la régulation du volume des cellules, la sécrétion hormonale ou la génération des impulsions électriques au niveau des cellules électriquement excitables (cellules neuronales, musculaires et endocrines) [1, 2], permettant la communication entre neurones ou la contraction musculaire. Dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones est importante puisqu'elle peut toucher jusqu'à 50 % des neurones dans certaines aires cérébrales. Or il a été montré que tout comme le calcium, un exode massif de potassium peut provoquer le phénomène de mort cellulaire programmée. Une action sur les canaux à potassium, tel un blocage sélectif avec du tétraéthylammonium (TEA) par ex., peut donc constituer une stratégie thérapeutique pour ralentir la dégénérescence neuronale [3]. Et en effet, du TEA ou des niveaux élevés en potassium extracellulaire protègent des neurones en culture du peptide  $\beta$ -amyloïde. Des mutations dans des canaux sensibles au voltage (potassium) ou activés par un ligand (récepteur-canal nicotinique) ont aussi été identifiées dans certaines formes d'épilepsies familiales, renforçant ainsi le rattachement des épilepsies idiopathiques (sans lésion cérébrale) aux canalopathies. On comprend ainsi que le prochain défi de la recherche dans ce domaine est de décoder les liens entre la nature moléculaire du canal ionique, sa fonction cellulaire et ses implications dans les grandes fonctions de l'organisme. Une meilleure connaissance du mécanisme de fonctionnement de ces canaux est donc fondamentale, et les travaux récents de Roderick MacKinnon sur la structure et la mécanistique des canaux ioniques, couronnés du prix Nobel de Chimie, ont constitué une étape majeure dans cette compréhension.

La protéine KcsA (voir figure) est le canal à potassium de la bactérie *Streptomyces lividans*, similaire en structure à d'autres canaux  $K^+$ , e.g. chez les vertébrés. Elle a fait l'objet de bon nombre d'études expérimentales et sa cristallisation a permis d'obtenir une structure détaillée à la résolution de 2 Å [4-7]. Un segment hautement conservé (la séquence signature du canal  $K^+$ ) forme l'élément structural appelé filtre de sélectivité, empêchant le passage des ions  $Na^+$  mais permettant aux ions  $K^+$  de traverser la membrane à des vitesses approchant la limite de diffusion : environ  $10^7$  ions par canal par seconde, dans le sens du gradient électrochimique du  $K^+$ , c'est-à-dire de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, le rapport  $Na^+/K^+$  étant d'environ 1/1000. Les concentrations des diverses espèces ioniques de part et d'autre de la membrane vont déterminer l'ouverture du canal (voltage-gating) [8].



## Références

- [1] Roderick MacKinnon, Potassium channels, minireview, FEBS Letters 555 (2003) 62-65.
- [2] Hille, B. (2001) in: Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd Edn., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [3] Yu SP et al., Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current, Science 278 (1997) 114-117.
- [4] C. Miller, Nature, 414, 23-24 (2001).
- [5] J.H. Morais-cabral, Y. Zhou and R. MacKinnon, Nature, 414, 37-42 (2001).
- [6] S. Bernèche and B. Roux, Nature, 414, 73-77 (2001).
- [7] Y. Zhou, J.H. Morais-Cabral, A. Kaufman and R. MacKinnon, Nature, 414, 43-48 (2001).
- [8] Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter, Julio F Cordero-Morales, Luis G Cuello & Eduardo Perozo, Nature Struct. & Mol. Biol. 13(4) (2006) 319-322.

## Projets

Au sein du Laboratoire de Physique Moléculaire (LPM) dans le groupe de biophysique (Université de Besançon), j'ai pu acquérir des connaissances importantes dans la compréhension du fonctionnement du canal à potassium KcsA [1]. J'ai également pu mettre en application sur cette protéine l'idée ayant émergé de mes études sur le lipide dioctadécylamine [2] que la prise en compte de la distribution des charges partielles, calculées au niveau quantique pour des configurations données, est cruciale pour appréhender la mécanistique de la diffusion des ions de façon adéquate. Dans le même ordre d'idées, mes investigations sur la réactivité d'espèces chimiques impliquées dans la cancérogenèse ou la prévention des cancers [3], impliquant également l'utilisation de méthodes *ab initio*, constituent avec les premières un tout me permettant d'aborder le problème délicat de la sélectivité à l'entrée du filtre du KcsA pour le passage des ions potassium ou sodium. Des études théoriques sont menées pour cibler cet aspect qui, malgré de nombreux travaux [4], reste incompris et dont les interprétations ne permettent pas de rendre compte du rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  d'environ 1 sur 1000. L'expertise acquise permet également d'envisager plus largement certains problèmes de réactivité, tels que la fixation de molécules médicaments au niveau de la gorge, intéressant particulièrement l'industrie biopharmaceutique.

## Références

- 1 - M. Compoin, C. Ramseyer and P. Huetz, Chem. Phys. Lett. 397 (2004) 510-515 ; C. Boiteux, M. Compoin, P. Huetz, C. Ramseyer and C. Girardet, Internet Electron. J. Mol. Des. 4 (2005) 235-248 ; M. Compoin, C. Boiteux, P. Huetz, C. Ramseyer, and C. Girardet, Phys. Chem. Chem. Phys. 7(24) (2005) 4138-4145 ; P. Huetz, C. Boiteux, M. Compoin, C. Ramseyer, C. Girardet, J. Chem. Phys. 124 (2006) 044703.
- 2 - P. Huetz, C. Ramseyer, C. Girardet, Chem. Phys. Lett. 380 (2003) 424-434.
- 3 - Ph. Huetz, E.E. Kamarulzaman, H.A. Wahab and J. Mavri, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44 (2004) 310-314 ; Philippe Huetz, Nasim Mavaddat and Janez Mavri, J. Chem. Inf. Model. 45 (6) (2005) 1564-1570 ; Philippe Huetz and Valérie Poux, J. Mol. Struct. THEOCHEM 764 (2006) 167-176.



4 - D.A. Doyle et al., Science 280 (1998) 69-77 ; L. Guidoni et al., Biochemistry 38 (1999) 8599-8604 ; I.H. Shrivastava et al., Biophys. J. 83 (2002) 633-645 ; B.-G. Hua et al., Plant Phys. 132 (2003) 1353-1361.

## REPLIEMENT DES PROTEINES

### Investigations théoriques/computationnelles.

#### I - Étude de l'influence des charges partielles sur la dynamique des protéines et l'établissement de leur structure native.

**Introduction.** Le repliement des protéines [1] constitue l'un des plus fascinants problèmes de biophysique fondamentale que depuis quelques décennies les chercheurs s'acharnent à résoudre. Dans les cellules, ce passage d'un état dit "dénaturé", c'est-à-dire d'un polymère plus ou moins statistique, de la chaîne polypeptidique néosynthétisée à un état dit "natif", où la protéine adopte la conformation (moyenne) unique et fonctionnelle qui la caractérise, est épaulé par des molécules dites chaperones. Mais pour la majorité des protéines globulaires, ce phénomène est spontané en solution aqueuse lorsque l'on passe de conditions dénaturantes à des conditions renaturantes, et traduit donc une propriété intrinsèque de la chaîne polypeptidique. Une protéine, composée de quelques dizaines à plusieurs milliers d'acides aminés, ne peut se replier en explorant l'espace de toutes les conformations possibles, cela lui prendrait au minimum plusieurs centaines d'années. Or le temps effectivement nécessaire pour atteindre la conformation native est de l'ordre de quelques microsecondes à quelques secondes [2].

La nature des forces motrices à l'origine de ce phénomène reste encore mal comprise, et bien que l'établissement progressif des interactions hydrophobes semble jouer un rôle prépondérant, l'approche purement thermodynamique se heurte à la constatation déroutante que, dans des conditions physiologiques, l'état natif n'est que marginalement plus stable par rapport à l'ensemble des conformations dénaturées (environ 40 kJ/mol de protéine). Bien que les états natifs de protéines différentes peuvent être assez similaires, une protéine donnée ne va adopter qu'un seul et unique état replié, ce dernier étant codé par l'ordre des acides aminés de la chaîne polypeptidique. Le problème du repliement des protéines est de prédire la structure tridimensionnelle compacte et fonctionnelle d'une protéine à partir de la connaissance de sa séquence en monomères.

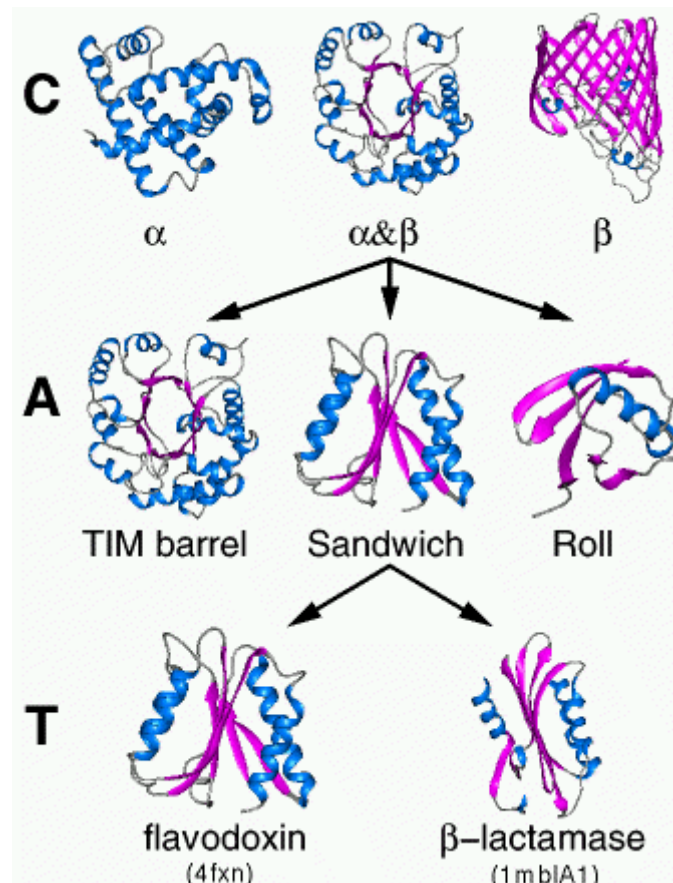
La découverte de ce second code génétique aurait un impact fondamental pour la biologie médicale, pour le design *ab initio* de nouvelles protéines (biosenseurs, enzymes, médicaments...), pour "traduire" *in silico* la masse d'information génétique obtenue par le projet Génome Humain en les structures protéiques tridimensionnelles correspondantes, et *in fine* comprendre leurs fonctions. En effet, la cristallisation des protéines, permettant leur analyse aux rayons X, procède par tâtonnements, et les protéines membranaires sont difficiles voire impossibles à cristalliser ; de même l'analyse par RMN multidimensionnelle, permettant l'approche de la structure d'une protéine en solution, est sujette à l'utilisation de modèles et devient trop complexe pour des molécules de haut poids moléculaire.

À côté de maladies telles qu'Alzheimer ou les maladies à prions, divers cancers sont suspectés de résulter d'un mauvais repliement de certaines protéines, lié à des mutations génétiques ayant pour effet d'altérer leur fonction ou de diminuer leur stabilité. Ainsi des protéines suppresseurs de tumeurs ne pourront plus jouer leur rôle régulateur, induisant la prolifération anarchique des cellules [3]. À l'opposé, un mécanisme d'apoptose peut découler



du repliement défectueux d'une protéine. Il arrive ainsi que cette structure anormale induise une auto-association conduisant à la formation de fibrilles amyloïdes, c'est-à-dire des polymères protéiques inertes et insolubles, essentiellement extracellulaires, qui entraînent la mort des cellules non pas par la voie nécrotique mais par l'activation du mécanisme apoptotique [4]. L'on peut citer également le travail de Alonso et al. [5], démontrant l'importance de la conformation et de la stabilité de la protéine E7 du papillomavirus humain dans son rôle oncogène.

Tous ces arguments appuient clairement l'importance de l'approfondissement de nos connaissances fondamentales sur le repliement des protéines, et en particulier une meilleure compréhension de la nature physique et des mécanismes des forces complexes commandant leur repliement et permettant le maintien de leur structure tridimensionnelle. Ceci doit se faire par des approches complémentaires à la fois expérimentales et théoriques, permettant d'élaborer de meilleurs modèles de prédiction de structure ou de propriétés thermodynamiques et cinétiques [6].



Classement hiérarchique de structures de domaines : CATH (Class, Architecture, Topology and Homologous superfamily) - [http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath\\_new/](http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath_new/).

**Projets.** Sur la base de mes travaux sur le filtre de sélectivité du KcsA (calculs *ab initio* des charges atomiques sur le schéma Merz-Kollman-Singh (MK), voir projet KcsA) et sur le lipide dioctadécylamine (DODA), j'ai démontré que les charges dévient significativement des valeurs habituellement implémentées dans les champs de force classiquement utilisés dans les simulations de dynamique moléculaire. Ceci est

spécifiquement déterminé par la géométrie du système à un instant donné. La charge partielle n'est pas une observable, et elle est obtenue sur la base de modèles plus ou moins affinés ou adaptés, tenant compte de propriétés physicochimiques telles la réactivité locale de certains groupements, les énergies des liaisons hydrogène, la correspondance entre les moments dipolaires et quadripolaires calculés et expérimentaux, etc., en intégrant la densité électronique entre deux rayons centrés sur un atome. Dans un modèle tel que MK, le potentiel électrostatique déterminé à partir des charges modèles est ajusté à celui calculé quantiquement par la procédure d'optimisation non linéaire de Levenberg-Marquardt, et les charges sont ainsi recalculées pour reproduire au mieux ce potentiel. Les charges sont partielles car l'on restreint le domaine d'observation de la densité électronique, et conformation-dépendantes par le jeu du recouvrement des orbitales, des fonctions d'onde. Or au cours du repliement d'une protéine, il y a une réorganisation spatiale continue de la forme "pelote statistique" à la forme native. Durant cette réorganisation, le "relief" de la densité électronique (vue de "près") va continuellement évoluer, de la même façon la dynamique du transfert électronique [7].

Le hasard n'ayant qu'un rôle minime dans cette exploration conformationnelle (*vide supra*), le but est de découvrir i) comment calculer plus simplement la charge partielle pour ne pas avoir à effectuer des calculs en "tout quantique", impossibles à mettre en oeuvre car ils demanderaient trop de temps de calcul, et ii) ce qui gouverne l'évolution vers la forme finale par cet éclairage. Des études sont en cours pour préciser le premier point.

## **II - Amélioration d'un modèle thermodynamique de dépliement d'une protéine sur la base de mes résultats expérimentaux.**

L'aspect central de mon travail lors de mon deuxième postdoc à Groningue (Pays-Bas) a concerné des études de dichroïsme circulaire (DC) du mutant C10S de l'enzyme IIB Cellobiose (IIBCell, 1E2B dans la PDB) du système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) de la bactérie E. Coli : expériences de dépliement/repliement en fonction de la concentration en dénaturant (hydrochlorure de guanidinium) et de la température.

Une première évaluation des valeurs des paramètres thermodynamiques du dépliement a ainsi été obtenue en ajustant les équations de la méthode dite "Linear Extrapolation Method" (LEM) définie par Nicholson et Scholtz [8a] (modification de la méthode de Santoro et Bolen [8b]) aux données de DC de la dénaturation du mutant.

L'hypothèse de base est de considérer que la transformation de la conformation de l'état "natif" à l'état "dénaturé" suit un mécanisme d'équilibre complet à deux états. Le modèle se fonde sur l'analyse de données de dénaturation par la chaleur ou un dénaturant et procure une mesure des changements conformationnels en termes de variations en énergie libre de Gibbs, enthalpie, entropie et capacité calorifique accompagnant le dépliement à l'équilibre.

Les données obtenues lors de ce travail étaient suffisamment précises pour conclure que la méthode LEM est insuffisante pour les traiter correctement, impliquant une révision de ce modèle. Ces résultats très précis permettent donc d'appréhender le perfectionnement du modèle thermodynamique les décrivant.

## **Références**

1- Voir site Internet Folding@Home Distributed Computing, <http://folding.stanford.edu>.

- 2- Polymer principles and protein folding, K.A. Dill, *Protein Science* 8(6) (1999) 1166-1180 ; Principles of protein folding - A perspective from simple exact models (Review), K.A. Dill et al., *Protein Science* 4 (1995) 561-602.
- 3- Rescuing the function of mutant p53, A.N. Bullock, A.R. Fersht, *Nat. Rev. Cancer* 1(1) (2001) 68-76.
- 4- Biological activity and pathological implications of misfolded proteins, *Cell Mol Life Sci* 55 (1999) 977-991.
- 5- High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners, L.G. Alonso et al., *Biochemistry* 41(33) (2002) 10510-10518.
- 6- How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics?, Christopher D. Snow et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34 (2005) 43–69.
- 7- Charge on the move: how electron-transfer dynamics depend on molecular conformation, Andrew C. Benniston and Anthony Harriman, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 169–179.
- 8- Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. a) Conformational stability of the *Escherichia coli* HPr protein: test of the linear extrapolation method and a thermodynamic characterization of cold denaturation, E.M. Nicholson and J.M. Scholtz, *Biochemistry* 35 (1996) 11369-11378 ; b) Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants, M.M. Santoro and D.W. Bolen, *Biochemistry* 27 (1988) 8063-8068.