



HAL
open science

Analyse Conformationnelle des Protéines en Réponse à l'Environnement (pH et Température) par Spectroscopie Raman Exaltée en Surface (SERS)

Arielle Tchinda Sonhapi

► **To cite this version:**

Arielle Tchinda Sonhapi. Analyse Conformationnelle des Protéines en Réponse à l'Environnement (pH et Température) par Spectroscopie Raman Exaltée en Surface (SERS). Cristallographie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCK080 . tel-04552883

HAL Id: tel-04552883

<https://theses.hal.science/tel-04552883>

Submitted on 19 Apr 2024

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'ETABLISSEMENT UNIVERSITE DE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE PREPAREE AU LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE CARNOT
DE BOURGOGNE

Ecole doctorale n° 553 Carnot-Pasteur

Doctorat de Physique

Par

Arielle TCHINDA SONHAPI

**Analyse Conformationnelle des Protéines en réponse à l'environnement (pH et
Température) par Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS).**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 6 décembre 2023

Composition du jury :

Pr. Fabrice NEIERS	Université de Bourgogne CSGA, Dijon	<i>Président du jury</i>
Pr. Marc LAMY DE LA CHAPELLE	Université du Mans Laboratoire IMMM	<i>Rapporteur</i>
Dr. Nadia DJAKER	Université Sorbonne, Paris Nord Laboratoire CSPBAT, USPN	<i>Rapporteur</i>
Pr. Pierre ADAM Michel	Université de de Troyes Laboratoire LNIO, Troyes	<i>Examinateur</i>
Dr. Leïla BOUBEKEUR-LECAQUE	Chargé de recherche, CNRS Laboratoire ITODYS, Paris	<i>Examinatrice</i>
Pr. Éric FINOT	Université de Bourgogne Laboratoire ICB, Dijon	<i>Directeur de thèse</i>
Dr. Aymeric LERAY	Chargé de recherche, CNRS Laboratoire ICB, Dijon	<i>Co-directeur de thèse</i>

Résumé

La thèse présentée offre une exploration approfondie des structures et des comportements des protéines, en mettant particulièrement l'accent sur leurs interactions avec des nanoparticules colloïdales d'or. Les techniques de Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS) et de microfluidique sont employées pour analyser en détail les modifications des protéines en réponse aux variations de pH et de température.

L'analyse de la structure secondaire des protéines, en utilisant l'albumine sérum bovine (BSA) comme modèle, révèle des liens étroits avec la conformation globale de la protéine. Des variations de pH et de température entraînent des changements conformationnels importants, visibles dans l'analyse des amides I, II, et III. De plus, l'étude ne se limite pas aux protéines bien structurées, mais englobe également les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs), qui adoptent des conformations flexibles en réponse à leur environnement, élargissant ainsi notre compréhension de la complexité structurale des protéines.

L'exploration des interactions protéine-nanoparticule sert de base pour comprendre comment cette diversité structurale se traduit par une variété de fonctions biologiques. Une approche novatrice basée sur les chaînes de Markov permet d'analyser le désordre protéique, offrant une vue globale de la flexibilité et de la plasticité des protéines, avec des applications réussies à la BSA et à l' α -synucléine.

Enfin, la thèse souligne l'importance de comprendre les protéines dans leur ensemble, de la structure fondamentale à leur rôle crucial dans les processus biologiques. Ces découvertes ont des implications potentielles pour des avancées médicales et biotechnologiques.

Abstract

The thesis presented offers an in-depth exploration of protein structures and behaviors, with particular emphasis on their interactions with colloidal gold nanoparticles.

Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and microfluidic techniques are employed to analyze in detail protein modifications in response to pH and temperature variations.

Analysis of protein secondary structure, using bovine serum albumin (BSA) as a model, reveals close links with overall protein conformation. Variations in pH and temperature lead to significant conformational changes, visible in the analysis of amides I, II, and III. Moreover, the study is not limited to well-structured proteins, but also encompasses intrinsically disordered proteins (IDPs), which adopt flexible conformations in response to their environment, thus broadening our understanding of protein structural complexity.

Exploring protein-nanoparticle interactions provides the basis for understanding how this structural diversity translates into a variety of biological functions. A novel approach based on Markov chains enables the analysis of protein disorder, providing a comprehensive view of protein flexibility and plasticity, with successful applications to BSA and α -synuclein.

Finally, the thesis highlights the importance of understanding proteins, from fundamental structure to their crucial role in biological processes. These discoveries have potential implications for medical and biotechnological advances.

Remerciements

Les meilleures choses qui arrivent dans le monde de l'entreprise ne sont pas le résultat du travail d'un seul homme. C'est le travail de toute une équipe...

Steve Jobs

J'aimerais remercier premièrement les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Bien évidemment, je souhaite exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude à mon directeur de thèse Éric FINOT ainsi qu'à mon co-directeur de thèse Aymeric LERAY tout d'abord pour m'avoir accueilli dans leur équipe et pour m'avoir motivé, soutenu, encadré en faisant preuve de patience et en me prodiguant des conseils sur des méthodes de travaux nécessaires au bon déroulement de ma thèse. Je vous remercie d'avoir partagé avec moi vos retours d'expériences tout au long de cette longue thèse. Votre soutien a accru la qualité de mes efforts et approfondi mon appétit pour les biomolécules. Je n'aurai pas pu espérer meilleurs encadrants.

Je tiens à remercier le professeur Mounir MAALOU, spécialiste de la physique de la matière molle à l'institut Charles Sadron de Strasbourg qui a été mon encadrant de master pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche expérimentale ainsi que pour les polymères biologiques. Je l'entends encore me dire " la recherche expérimentale n'est pas un domaine facile : il nécessite de la patience et par-dessus tous des pratiques minusculeuses... ". Vous avez été pour moi une grande source de motivation.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'ICB en général qui, d'une manière ou d'une autre ont facilité ces trois années au laboratoire. Je remercie particulièrement Laurent MARKEY pour m'avoir formé à la fabrication des cellules microfluidiques qui ont été d'une grande importance lors de toutes mes analyses expérimentales. Mes remerciements vont également à Juan-Miguel AROCAS qui m'a encadré lors de la conception des substrats rugosifiés.

Je remercie mes collègues de bureaux bien que n'ayant pas été très bavarde, leur présence et leur bonne ambiance m'ont permis de moins ressentir le stress de certains jours.

Pour finir, un grand merci à toute ma famille et à mes amis. Un "MERCİ" particulier à mes parents M. et Mme. SONHAPI, ma sœur Gwladys TATSAKOU et à mon frère Kessel FOKENG qui m'ont toujours soutenu et fait confiance dans tous les domaines et ce quel que soit ce que j'entreprends. Je vous dédie cette thèse en signe de ma profonde reconnaissance. Je n'aurai pas pu tenir pendant quatre années sans vous. J'espère que vous trouverez en cette persévérance tout l'amour que je vous porte.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	7
CHAPITRE 1 HISTORIQUE DE DECOUVERTE DES PROTEINES.....	9
I) Structures des protéines stables	10
1) Historique sur la découverte des protéines	10
2) Structure des protéines.....	10
3) Stabilité des protéines.....	15
4) Facteurs affectant la stabilité des protéines	15
5) Relation structure fonction des protéines	16
II) Les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs)	16
1) Origine du désordre.....	17
2) Propriétés	17
3) Repliement induit et rôle des PIDs.....	18
III) Dynamique de repliement des protéines.....	18
IV) Conclusion	20
CHAPITRE 2 METHODES DE CARACTERISATION DES STRUCTURES PROTEIQUES	22
I) Différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques	23
II) Les Spectroscopies vibrationnelles.....	24
1) La spectroscopie infra rouge (IR).....	26
2) La spectroscopie Raman.....	26
3) La diffusion Raman exaltée de surface : DRES (SERS en anglais)	28
III) Conclusion	35
CHAPITRE 3 METHODES EXPERIMENTALES.....	36
I) Méthodes expérimentales	37
1) Microscopie Confocale	37
2) Microscope confocal de l'ICB	37
a) Principe de fonctionnement du montage optique.....	39
b) Conception de la cellule micro fluïdique.....	41
c) Cellules de température	42
II) Substrats SERS	43
a) Dépôt d'or par évaporation.....	43
b) Préparation de la solution de BPE (molécule test).....	44
c) Choix du substrat.....	44
d) Limite de détection	45

e)	Facteur d'exaltation	45
III)	Analyse en composantes principales : PCA.....	46
IV)	Conclusion	47
CHAPITRE 4 ADSORPTION DE L'ALBUMINE SERUM BOVIN (BSA) SUR DES NANOPARTICULES D'OR : CARACTERISATION DES CONFORMATIONS DE LA STRUCTURE SECONDAIRE.....		48
I)	Structures physico-chimiques de la BSA	49
I)	Caractérisation de la structure primaire	51
a)	Etat de l'art.....	51
b)	Effets de l'environnement sur la BSA.....	53
II)	Caractérisation des structures primaires : nos résultats.....	54
a)	Protocole expérimental.....	54
b)	Résultats	55
c)	Nos conclusions	56
IV)	Caractérisation de la structure secondaire	57
A)	Quelques méthodes Bibliographiques	58
B)	Les trois bandes amides	63
C)	Densité de probabilité (PDF)	66
D)	Tri par les composantes principales : PCA.....	70
E)	Répartition des conformations de la structure secondaire.....	74
V)	Effet de l'environnement	79
A)	Effets du pH	79
B)	Effets de la température	79
VI)	Conclusion	82
CHAPITRE 5 ADSORPTION DE L' α -SYNUCLEINE SUR DES NANOPARTICULES D'OR : CARACTERISATION DES CONFORMATIONS DE LA STRUCTURE SECONDAIRE.....		84
I)	Structure physico-chimique de l'Alpha Synucléine	85
II)	Historique des Synucléines.....	85
III)	Séquence de l' α -synucléine.....	86
IV)	Caractérisation de la structure primaire.....	87
a)	Protocole expérimental.....	87
b)	Résultats	87
c)	Conclusion	89
V)	Caractérisation de la structure secondaire.....	89
A)	Quelques méthodes bibliographiques	89
B)	Densité de probabilité.....	91
C)	Tri par les composantes principales : PCA.....	93

D) Répartition des conformations de la structure secondaire	95
VI) Effets de l'environnement	96
A) Effet du pH.....	97
B) Effets de la température	98
VII) Conclusion.....	101
CHAPITRE 6 DYNAMIQUE ET COMPLEXITE CONFORMATIONNELLE DE L' α -SYNUCLEINE : ANALYSE SYSTEMIQUE DES PROPRIETES INTRINSEQUEMENTS DESORDONNEES EN FONCTION DU pH ET DE LA TEMPERATURE	103
I) Différentes méthodes d'analyse	104
A) Découverte de la systémique	104
B) Les chaînes de Markov	104
C) Entropie de Shannon.....	106
II) Résultats des analyses : cas de la BSA.....	107
A) Influence du pH sur les chaînes de Markov	108
B) Influence du pH sur l'entropie de structure.....	112
C) Influence de la température sur les chaînes de Markov.....	114
D) Influence de la température sur l'entropie de structure	116
III) Résultats des analyses : cas de l' α -synucléine	117
A) Influence du pH sur les chaînes de Markov.....	118
B) Influence du pH sur l'entropie de structure.....	123
C) Influence de la température sur les chaînes de Markov.....	125
D) Influence de la température sur l'entropie de structure	126
IV) Conclusion	127
CONCLUSION GENERALE	129
ANNEXE	134
Partie A.....	134
Partie B :	135
Partie C	136
Partie D.....	138
Partie E	139
Partie F.....	140
Partie G.....	142
Partie H.....	143
Références.....	145

INTRODUCTION GENERALE

Les nanosciences ont étendu leur domaine d'étude pour englober des objets presque ponctuels, qui sont les fondements de la physique du solide et des éléments essentiels de la biochimie. Cette expansion a ouvert de nouvelles perspectives de recherche sur la complexité, explorant l'émergence des propriétés macroscopiques, un domaine relativement récent dans le domaine de la physique. La biophysique et la physique de la matière condensée, aidées par des simulations et des outils de caractérisation à l'échelle nanométrique, commencent à aborder ces questions complexes.

L'autoassemblage de systèmes ordonnés et le repliement des protéines représentent des défis majeurs, pour lesquels nous possédons actuellement des connaissances fragmentaires. Pourtant, ces sujets revêtent une importance sociétale cruciale, car ils touchent aux fondements de notre fonctionnement cellulaire, qu'il soit normal ou perturbé.

Les protéines, en tant que molécules dynamiques, jouent un rôle essentiel dans les organismes en assurant le maintien de l'homéostasie et le développement cellulaire. Leur flexibilité leur permet d'adopter diverses conformations, mais la question de savoir comment elles parviennent à adopter leur structure native est un défi important. Le paradoxe de Levinthal suggère que le repliement aléatoire prendrait un temps trop long, alors que les protéines adoptent rapidement leurs conformations. Les protéines qui n'adoptent pas leur conformation native peuvent avoir divers destins, allant de la désintégration à la stabilisation par des interactions ou des molécules chaperonnes.

Les protéines se divisent en deux grandes catégories : les protéines stables, qui possèdent une structure tridimensionnelle unique et stable, et les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs), qui sont flexibles et peuvent adopter de multiples conformations. La découverte des PIDs a remis en question le paradigme traditionnel selon lequel la structure détermine la fonction des protéines. Malgré leur caractère non statique, les PIDs jouent un rôle crucial dans les cellules. Malheureusement, leur mauvais repliement altère leurs fonctionnements les rendant responsable de nombreuses pathologies, notamment les cancers et les maladies neurodégénératives.

Les maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, représentent un enjeu sociétal majeur en raison de leur prévalence croissante. On estime qu'un tiers des protéines humaines sont des PIDs, notamment l' α -synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson. Les PIDs sont des systèmes complexes, difficiles à comprendre en raison de leur hétérogénéité et de leur flexibilité.

Cette thèse s'inscrit dans un contexte passionnant qui vise à élucider les liens fondamentaux entre la structure et la fonction des macromolécules naturelles, en mettant l'accent sur les protéines. La biologie structurale a connu une évolution significative grâce à l'avènement de techniques de microscopie qui ont permis d'explorer les structures macromoléculaires à une résolution bien inférieure à celle de la lumière. Cette approche a ouvert des fenêtres sur des processus et des structures subcellulaires qui demeuraient généralement inaccessibles aux techniques expérimentales traditionnelles telles que la cristallographie des rayons X ou la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Un large éventail de méthodes, de la microscopie électronique à la dynamique moléculaire en passant par la fluorescence super-résolue, a été déployé pour étudier les molécules individuelles. Cependant, toutes ces approches présentent des limitations, notamment en ce qui concerne la résolution temporelle et la précision de localisation. Bien que la microscopie à fluorescence puisse souffrir de limitations en termes de résolution spatiale, elle est souvent privilégiée en raison de sa sensibilité. Néanmoins, sa conception exige des compromis en matière de fréquence d'acquisition et de temps d'exposition.

Les nanotechnologies ont révolutionné la façon dont nous abordons l'étude des protéines, en exploitant des approches optiques et magnétiques avancées. Les nanoparticules, en particulier, ont émergé comme des candidats prometteurs pour diverses applications, notamment la destruction ciblée de cellules, l'imagerie de haute précision et le transport de médicaments.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons fait appel à la Spectroscopie Raman exaltée de Surface (SERS), une méthode optique qui offre une caractérisation précise des molécules, même à des concentrations très faibles, y compris à l'échelle de molécules individuelles. Notre objectif est de démontrer que la surveillance de la cinétique d'adsorption des protéines stables et des PIDs sur des nanoparticules d'or peut permettre une caractérisation approfondie de la richesse des structures secondaires.

La stabilité des protéines est étroitement influencée par divers facteurs environnementaux, tels que le pH et la température. L'adsorption des protéines sur des surfaces solides joue également un rôle clé dans de nombreux processus naturels, suscitant un vif intérêt dans divers domaines de la recherche. Cependant, un défi majeur réside dans la capacité à suivre la dynamique de ces structures secondaires. Alors que la structure secondaire des protéines stables est relativement bien comprise, celle des PIDs demeure encore largement débattue.

Ce manuscrit de thèse se compose de six chapitres distincts : le premier chapitre consiste en une revue bibliographique approfondie sur le sujet ; il met en relief l'état de l'art des protéines stables et intrinsèquement désordonnées ainsi que les phénomènes qui régulent la dynamique de repliement des protéines. Le deuxième chapitre détaille les différentes méthodes expérimentales permettant la caractérisation des structures protéiques ; un accent est mis dans ce chapitre sur les méthodes vibrationnelles. Le troisième chapitre permet de décrire les méthodes expérimentales et statistiques employées pour l'acquisition et le traitement des données analysées dans ce manuscrit. Les chapitres 4 et 5 présentent, respectivement, les résultats obtenus pour la BSA et l' α -synucléine, en ce qui concerne les changements de structure secondaire lors de leur adsorption sur des nanoparticules d'or. Le dernier chapitre quant à lui permet grâce à une méthode novatrice d'établir les relations qui existent entre les différentes conformations des structures secondaires ; il sera question dans ce chapitre d'étudier la stabilité de la BSA (protéine stable) d'une part et de l' α -synucléine (PID) d'autre part en fonction des paramètres environnementaux (pH et température).

CHAPITRE 1 | HISTORIQUE DE DECOUVERTE DES PROTEINES

Dans ce premier chapitre, nous présentons dans un premier temps l'historique sur la découverte des protéines stables ainsi que des différentes structures que peuvent adopter les protéines. Par la suite, nous présenterons les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs) et explorerons leur rôle crucial dans la biologie cellulaire. Les PIDs sont une classe de protéines dont la structure tridimensionnelle reste largement désordonnée ou très malléable lorsqu'elles sont en état libre. Cette caractéristique apparente d'anarchie structurelle défie la notion traditionnelle selon laquelle la structure détermine la fonction des protéines. Au contraire, les PIDs sont des acteurs clés dans la régulation de nombreux processus biologiques complexes.

Nous verrons ici la flexibilité structurelle des PIDs, leurs mécanismes d'interaction, et leur impact sur la régulation des processus biologiques. Nous aborderons également le concept de repliement induit qui sous-tend leur capacité à adopter des structures tridimensionnelles spécifiques lorsqu'elles interagissent avec leurs partenaires. Enfin, nous examinerons de près leur rôle crucial dans la signalisation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et la réponse aux altérations génétiques, mettant en lumière l'importance fondamentale de ces protéines apparemment "désordonnées" dans la biologie cellulaire moderne.

I) Structures des protéines stables

1) Historique sur la découverte des protéines

Dans les années 1830, le chimiste hollandais Gerrit Mulder publia des résultats sur l'analyse de la fibrine du sang, des albumines du sérum sanguin et de l'œuf. Ces résultats indiquaient qu'ils étaient composés de Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote avec des pourcentages quasiment identiques pour ces quatre atomes et avec des traces variables de soufre et de phosphore. En 1838, sur la suggestion du chimiste suédois Berzelius, Mulder désigna ces composés sous le nom de protéine (du grec : prééminence). Plus généralement, on les définit comme étant des macromolécules essentielles dans le développement et l'homéostasie des cellules [1][2]. Après une période d'identification des composants, (les acides aminés), Fischer et Hofmeister présentèrent chacun, lors d'un congrès en 1902 le mode de liaison des acides aminés dans les protéines : la liaison peptidique [3][4].

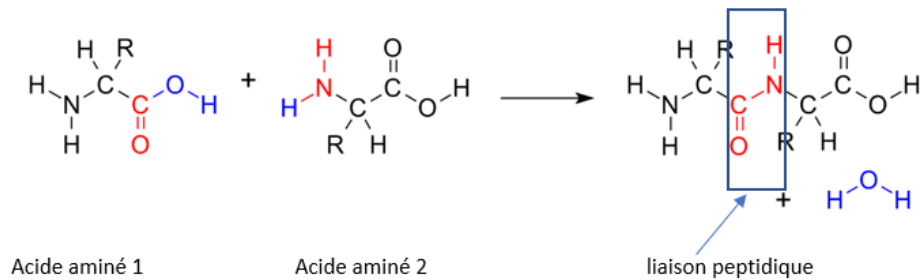
D'autres études ont révélé que les protéines sont issues de la transcription de l'ADN en ARN et de la traduction de ces derniers. Dans les cellules, les protéines sont classées en plusieurs catégories et assurent différentes fonctions : les protéines de structure donnent leur forme aux cellules ; les protéines de transport permettent le déplacement de molécules ; les protéines régulatrices contrôlent l'expression ou l'activité d'autres protéines. Les protéines de signalisation transmettent un signal venant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et les protéines motrices quant à elles permettent aux cellules de se déplacer [5]–[7]. Cette multitude de fonction confère aux protéines un statut privilégié au sein des organismes vivants.

2) Structure des protéines

L'identification des protéines se fait grâce à leurs structures. La nomenclature introduite en 1959 par Linderstrom-Lang permet de distinguer trois structures (primaire, secondaire, tertiaire)[8][9]. Cependant, Bernal et Rossmann ont quant à eux introduit le terme structure quaternaire et le concept de structure super secondaire[10]. On distingue donc quatre niveaux d'organisation dans l'architecture des protéines :

1) *Structure primaire*

C'est le premier niveau. Elle est une représentation linéaire de l'enchaînement des résidus d'acides aminés composant la protéine dans un ordre bien précis. Il existe 21 acides aminés construits suivant le même modèle structural et dont la conformation est liée à la géométrie de la liaison peptidique.



Réaction 1/ formation de la liaison peptidique

La liaison peptidique s'établit entre deux acides aminés de la chaîne protéique ; c'est une liaison covalente qui se forme entre le groupement carboxyle (COOH) d'un acide aminé et le groupement amine (NH₂) de l'acide aminé suivant avec élimination d'une molécule d'eau (Réaction1).

Dans une cellule, la synthèse d'une liaison peptidique est un processus dans lequel le groupement NH₂ du premier acide aminé de la chaîne polypeptidique et le groupement COOH du dernier acide aminé restent libres ; ce qui confère à la chaîne deux extrémités appelées respectivement extrémité N- et C-terminale. La chaîne C-terminale est chargée négativement, la chaîne N-terminale est chargée positivement tandis que la chaîne latérale est ionisable.

La détermination de cette séquence a été un travail très laborieux. D'abord, en 1949, Edman par clivage successif des acides aminés par l'extrémité N-terminale a obtenu la séquence jusqu'à cinquante résidus mais l'obtention de la séquence complète d'une protéine (insuline) ne s'est faite que plus tard dans les années 1950 par Frederick Sanger. Les liaisons entre protéines font intervenir de nombreux atomes. Les interactions entre ces atomes sont très spécifiques, de natures variées et apparaissent différemment à chaque niveau conformationnel. Les liaisons hydrogènes qui sont des interactions se produisant entre un atome d'hydrogène portant une charge partielle positive avec un atome électronégatif interviennent dans la stabilité, les propriétés fonctionnelles et structurales des protéines au premier niveau hiérarchique. L'énergie de ces liaisons hydrogènes varie entre 8 et 21 KJ.

2) Structure secondaire

Ces structures résultent des replis qu'adopte la chaîne polypeptidique sous l'effet de multiples liaisons hydrogènes qui s'établissent entre différents groupements -CO et -NH de son squelette.

Elle peut facilement se décomposer en quatre sous structures dont les hélices, les feuilletts, les coudes encore appelés tours et les structures aléatoires. Ces structures ne sont pas toutes aussi bien définies ou bien étudiées c'est pour cette raison que nous décrivons juste les hélices et les feuilletts.

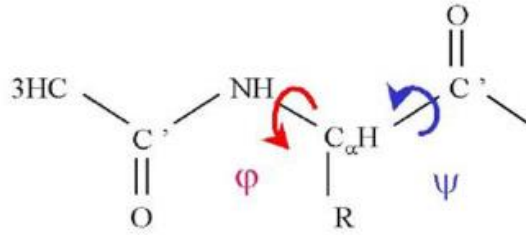


Figure 1/ illustration des angles dièdres dans la chaîne polypeptidique

Hélices alpha (α) : découverte par Linus Pauling en 1951 et confirmé lors de l'étude par diffraction des rayons X de la myoglobine, c'est la structure secondaire la plus abondante et la plus prévisible des protéines. Sa chaîne polypeptidique avec un pas de rotation droit forme une hélicoïde dans laquelle chaque groupe N-H de la chaîne principale d'un acide aminé forme une liaison hydrogène faible avec le groupe C=O de la chaîne principale du quatrième acide aminé qui le précède (Figure 2). Les liaisons-H sont linéaires et parallèles à l'axe de l'hélice. D'un point de vue électrostatique une telle orientation des liaisons-H et de la liaison peptidique a des conséquences importantes. En effet, étant donné que la liaison peptidique possède un moment dipolaire aligné selon la direction des groupements CO et NH, l'orientation des liaisons-H fait en sorte que l'hélice α possède un macro-dipôle qui est aussi aligné selon l'axe de l'hélice [11]. Tous les acides aminés ne sont pas impliqués dans la fabrication de cette structure mais, nous pouvons identifier la méthionine, l'alanine, la leucine, le glutamate non chargé ou la lysine comme y étant impliqués. L'hélice α s'élève de 0,15 nm par résidu et de 0,54 nm à chaque tour. Elle compte 3,6 résidus par tour. Elle est représentée dans les modèles structuraux par une spirale [12]–[15].

Il existe deux façons de définir l'hélice : l'hélice α est décrite soit comme un motif géométrique caractérisé par la hauteur du pas et les liaisons hydrogènes ; soit par la répétition des angles de torsion (ϕ , ψ) (Figure 1). L'angle ϕ représente l'angle entre la liaison N-C α -R et ψ l'angle C-C α -R. La chaîne principale des acides aminés impliquée dans une hélice possède des angles dièdres dont les valeurs moyennes sont (-60° , -45°).

Les angles de torsion possèdent une valeur positive, si pour éclipser les liaisons, une rotation vers la droite est nécessaire. Des valeurs négatives sont obtenues si cette rotation s'effectue vers la gauche. Le signe positif a préséance sur le signe négatif.

Feuillet beta (β) : les brins beta sont des sous structures dictées par les interactions de type liaison hydrogène. Leur stabilité est assurée lorsqu'elles s'assemblent en feuillets.

La première structure de feuillets β a été proposée par William Astbury en 1930. C'est la deuxième forme de structure secondaire observée dans les protéines avec une fréquence de présence plus faible que celle des hélices. C'est aussi la forme la plus complexe car le N-terminal et le C-terminal de la chaîne polypeptidique sont alignés (Figure 2). Ils sont constitués de brins beta reliés latéralement par au moins deux ou trois liaisons hydrogène entre des atomes du squelette carboné.

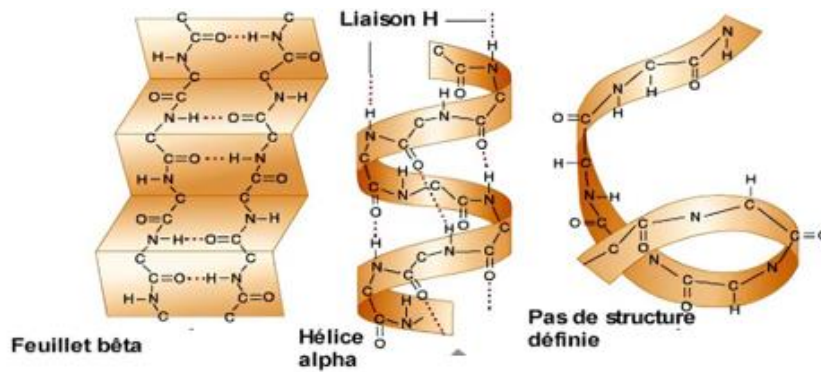


Figure 2/ illustration de la structure secondaire des protéines [20] .

Une des caractéristiques des feuillets est la valeur importante des angles dièdres ($-110^\circ, 120^\circ$). Cette structure forme un plan plissé généralement tordu. Elle se décompose en feuillet beta parallèle et antiparallèle. On parle de feuillet beta parallèle lorsque les chaînes vont dans le même sens et de feuillet antiparallèle quand elles vont dans le sens inverse. La distance entre deux résidus est de 0.33 nm et chaque chaîne est séparée de sa voisine de 0.46 nm. Le feuillet beta est représenté dans les modèles structuraux par une grosse flèche plate qui indique sa direction. Les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine), les acides aminés dotés de chaînes latérales ramifiées (thréonine, valine, isoleucine) sont principalement trouvés au cœur des feuillets beta. La proline est trouvée aux extrémités des brins car elle empêche l'agrégation entre protéines et la formation d'amyloïdes [16]–[19]. L'agrégation des feuillets β forme des feuillets β turn (coudes).

Les feuillets β turn sont des structures plus complexes dans lesquelles on peut trouver des transitions de structures ou la partie externe d'un feuillet β . Des études récentes montrent que les feuillets β parallèles peuvent s'associer pour former des séquences amyloïdiques (responsables de nombreuses maladies).

La structure non définie représente la partie de la protéine n'ayant pas de structure secondaire particulière. Ces parties sont mobiles, très flexibles et n'engagent pas d'interactions particulières entre les acides aminés qui la composent.

3) Structure tertiaire

C'est la conformation générale qu'adopte une protéine dans l'espace. Elle correspond à l'agencement des structures secondaires entre elles dans un espace à trois dimensions. Cette structure est à l'origine de la forme globale de la protéine native et permet à la protéine de se replier dans l'espace en formant des domaines indispensables à sa fonction [21]–[23]. Cette forme tridimensionnelle est maintenue grâce aux forces de cohésions (interactions électrostatiques, liaisons covalentes, interactions de Van Der Waals, interactions avec l'environnement de la protéine).

- Les interactions électrostatiques encore appelées interactions ioniques s'établissent entre deux groupements chargés positivement ou négativement et jouent un rôle de stabilisation. Elles interviennent dans la réactivité biologique des protéines.

- Les liaisons de Van Der Waals : elles sont de courte portée et résultent des forces d'attraction et de répulsion entre molécules. Elles se produisent lors du rapprochement entre deux molécules ou atomes mais, ne sont appréciables que lorsque les molécules interagissant sont neutres et non polaires. On les regroupe en trois catégories : les forces de Keesom, les forces de Debye et les forces de London :
 - Les forces de Keesom : elles résultent de l'interaction entre deux dipôles électriques permanents. Elles sont de faible énergie (0.5 à 3 KJ/mol) et s'établissent entre molécules polaires.
 - Les forces de Debye : elles ont lieu entre un dipôle permanent et un dipôle induit. Elles impliquent des molécules de même nature ou non. Leur énergie du même ordre que celle de Keesom dépend de la nature du dipôle permanent et de la polarisabilité de la molécule présente au dipôle induit.
 - Les forces de London : elles se produisent entre deux dipôles induits entre molécules polaires ou apolaires. Leur énergie est indépendante de la polarisabilité des molécules en interaction.

4) Structure quaternaire

Cette structure ne concerne que les protéines constituées de plusieurs chaînes peptidiques et possédant chacune une structure tridimensionnelle [24]. Chaque monomère est appelé sous unité et l'agencement tridimensionnel de ces sous unités est stabilisée le plus souvent par des interactions covalentes. On parle de structure homodimérique lorsque deux sous unités identiques sont associées et d'hétérodimérique dans le cas contraire.

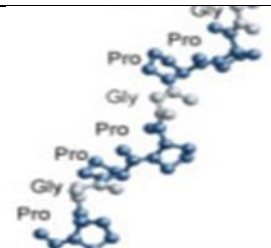
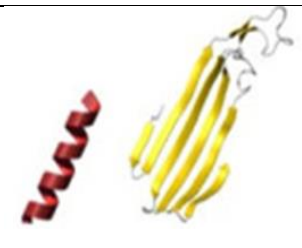
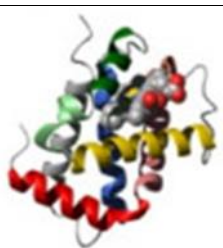
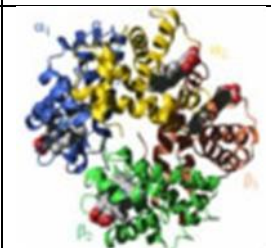
Structure primaire	Structure Secondaire	Structure tertiaire	Structure quaternaire
			
Séquence des acides aminés	Motifs que forment les acides aminés. On distingue principalement les structures en hélices α et en feuillets β .	Cette structure se rapporte aux relations dans l'espace des structures secondaires, hélices et feuillets.	Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation : on parle de structure quaternaire.

Tableau 1/ récapitulatif des différentes structures protéiques [25].

La fonction biologique d'une protéine est intimement liée à sa forme. Plusieurs facteurs sont nécessaires pour assurer le maintien de ces formes protéiques.

3) Stabilité des protéines

Les organismes vivants sont présents dans une vaste gamme de conditions environnementales ; par exemple des conditions extrêmes avec des pH pouvant atteindre une valeur de 1 à 12, des températures très hautes (110°C) ou très basses (-5°C) ou encore une pression hydrostatique pouvant se situer entre 0,1 et 120 MPa. La capacité de survie de ces organismes est liée entre autres à la stabilité de leurs protéines. L'étude de cette stabilité est nécessaire pour la compréhension de leurs structures et fonctions. La plupart des protéines ne sont stables qu'à pH neutre et température ambiante [26]–[29]. La stabilité des macromolécules est quantifiée par l'énergie libre standard, pour des réactions de repliement et de dépliement sous des conditions physiologiques, l'effet hydrophobe et les liaisons hydrogènes étant les principaux facteurs déterminant la stabilité de la structure native de la protéine.

4) Facteurs affectant la stabilité des protéines

La forme finale qu'adopte la protéine, sa structure tertiaire (ou quaternaire pour celles formées de plusieurs chaînes), dépend des forces responsables des liens reliant entre eux les radicaux des acides aminés constituant sa structure primaire. Dans certaines conditions, ces liens peuvent se défaire induisant ainsi un changement de forme de la protéine. La protéine modifiée devient donc généralement incapable d'assurer sa fonction : elle est alors dite dénaturée.

Les protéines sont peu stables et se dénaturent sous plusieurs contraintes environnementales telles la température (chauffage, congélation), le pH, et même certains solvants organiques.

Les protéines ont une gamme de température limitée dans laquelle l'intégrité structurale est maintenue (20 à 37°C).

La plupart des protéines se dénaturent irréversiblement lors d'un traitement thermique notamment via la formation d'agrégats causée par le repliement des protéines.

La manière dont les protéines atteignent leur stabilité varie d'une protéine à une autre. Bien que la plupart des protéines soient thermolabiles, certaines comme celles que l'on retrouve dans des organismes hyper thermophiles sont stables même à de très haute température (~50°C).

La stabilité thermique des protéines peut s'expliquer soit par une exposition du solvant à la surface soit par une augmentation du nombre de liaisons hydrogènes entre les résidus polaires [30]–[32]. L'agitation thermique a pour effet de briser les faibles liaisons hydrogène reliant les radicaux de la chaîne.

Le froid quant à lui a un effet sur la stabilité et l'activité des protéines. Une diminution de la température conduit à la formation d'un état mieux ordonné. La plupart des protéines se dénaturent en milieu trop acide (pH<2) ou trop alcalin (pH>7 ; cette dénaturation devient plus rapide lorsque le pH > 10).

5) Relation structure fonction des protéines

Le concept de clé-serrure a vu le jour en 1894 lorsqu'Emil Fischer a tenté d'expliquer ses résultats sur l'étude de la réaction enzymatique. Lors de ses travaux, il a établi que le substrat se liait au site actif d'une protéine par l'intermédiaire de deux structures tridimensionnelles parfaitement complémentaires. Ce concept qui signifiait qu'en réalité, la connaissance de la structure d'une protéine permettait de comprendre sa fonction fut appelé paradigme structure-fonction et constituera dès lors la base de la biologie structurale [33].

II) Les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs)

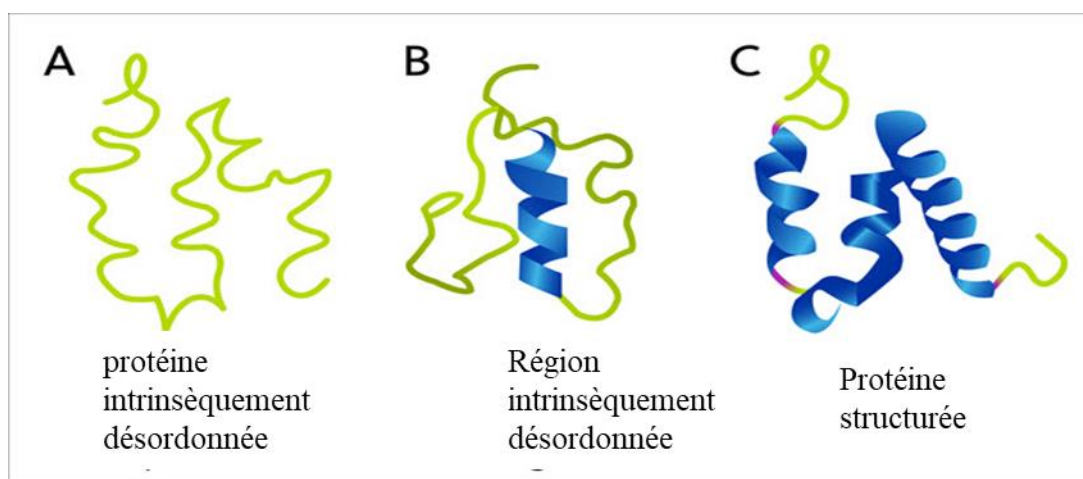


Figure 2/ présentation schématique : (A) des protéines intrinsèquement désordonnées (PID), (B) des régions intrinsèquement désordonnées (RID) et (C) des protéines structurées [34].

La découverte de cette classe de protéine remonte aux années 80 période au cours de laquelle des études effectuées par S. Prusiner sur le prion (protéine responsable de plusieurs maladies neurodégénératives parmi lesquelles l'Alzheimer) ont révélé chez les personnes malades un repliement en feuillet β et chez les personnes saines un repliement en hélices α [35]. Résultats qui prouvaient l'existence de deux structures tridimensionnelles dans une même protéine et qui remettaient en cause le paradigme structure-fonction jusque-là soutenu par la communauté scientifique. À la suite de ces résultats, de nombreuses études structurales ont non seulement éveillées la curiosité de nombreux chercheurs mais mis en évidence le caractère désordonné de plusieurs protéines. Malgré ces recherches, il a fallu attendre 20 années et un grand nombre de publications et de revues sur les protéines pour que la communauté scientifique reconnaisse et normalise cette nouvelle classe de protéine baptisée PIDs [36].

L'analyse du génome humain a révélé qu'environ un tiers des protéines sont des PIDs ou possèdent des régions désordonnées de longueurs supérieures à cinquante acides aminés [37]. Une analyse générale effectuée sur différentes classes protéiques a permis d'établir que du fait

de leur intervention dans les processus de signalisation et de régulation, les PIDs sont fortement impliquées dans les maladies humaines telles que les maladies neurodégénératives, les cancers et même les maladies cardiaques [38].

1) Origine du désordre

Malgré leur nom, ces protéines ne sont pas toujours complètement désordonnées en réalité, elles possèdent des régions capables d'échantillonner de manière transitoire des structures secondaires. Deux facteurs majeurs ont été identifiés comme étant responsable du désordre des protéines. Le désordre intrinsèque des protéines a été attribué à leurs faibles proportions d'acides aminés hydrophobes et aromatiques [39]. En effet, un noyau hydrophobe ne peut être établi pour entraîner la formation d'un repliement tridimensionnel dans les PIDs en l'absence des résidus hydrophobes et aromatiques volumineux. De plus, les PIDs possèdent une séquence primaire fortement enrichie en proline qui est un résidu responsable du désordre que l'on retrouve aussi au point de jonction des éléments de structures secondaires.

Contrairement aux protéines stables, les PIDs existent sous une forme hautement dynamique et ne possède pas de structure d'équilibre unique et bien définie. Cette particularité ne les rend pas moins importante au contraire, elles sont connues pour effectuer un certain nombre de fonctions biologique cruciales complémentaires au répertoire fonctionnel des protéines structurées.

2) Propriétés

En solution, les PIDs ne possèdent pas ou presque pas de structures secondaires et tridimensionnelles uniques.

De nombreuses études réalisées à l'aide de la RMN, des mesures spectroscopiques et de simulations moléculaires sur l'étude conformationnelle des protéines ont montrés que ces protéines ne constituaient pas une classe homogène mais existaient sous un ensemble de conformères.

Le repliement des protéines a d'ailleurs permis d'établir qu'en général elles existaient sous trois états conformationnels décroissant dont le globule fondu (« molten globule »), le pré-globule fondu et le « random coil ».

Le globule fondu ou forme structurée relâchée permet le passage de l'état dénaturé (« random coil ») à la structure native de la protéine ; cet état garde la totalité de sa structure secondaire mais perd une partie de ses interactions intramoléculaires et possède une structure tertiaire plus flexible qu'une protéine globulaire native.

Le deuxième état intermédiaire pré-globule fondu ne possède pas de structure secondaire stable mais présente des contacts intramoléculaires.

Enfin, le « random coil » correspond à l'état complètement déplié où la chaine polypeptidique peut adopter toutes les conformations statistiquement possibles [40].

3) Repliement induit et rôle des PIDs

La majorité des PIDs sont capables de recruter des partenaires et de s'y lier soit de manière individuelle soient multiple car elles possèdent une grande surface moléculaire.

La liaison avec les partenaires s'effectue à l'aide des résidus MoRE (« Molecular Recognition Element ») ou MoRF (« Molecular Recognition Feature »).

Leur grande flexibilité leur permet de s'adapter facilement à la surface de leurs partenaires qui peuvent être ou non des protéines [41]. Bien que leur forme libre soit complètement ou partiellement désordonnée, la liaison à des partenaires peut leur permettre d'adopter ou de se replier localement en structure tridimensionnelle spécifique : ce phénomène porte le nom de repliement induit.

La grande flexibilité des PIDs leur permet d'adopter une multitude de conformation ce qui leur permet de réaliser diverses fonctions biologiques importantes : elles interviennent principalement dans la régulation, la signalisation et dans le contrôle du cycle cellulaire. Elles interviennent également pour corriger certaines altérations présentes dans les séquences d'ADN [42].

III) Dynamique de repliement des protéines

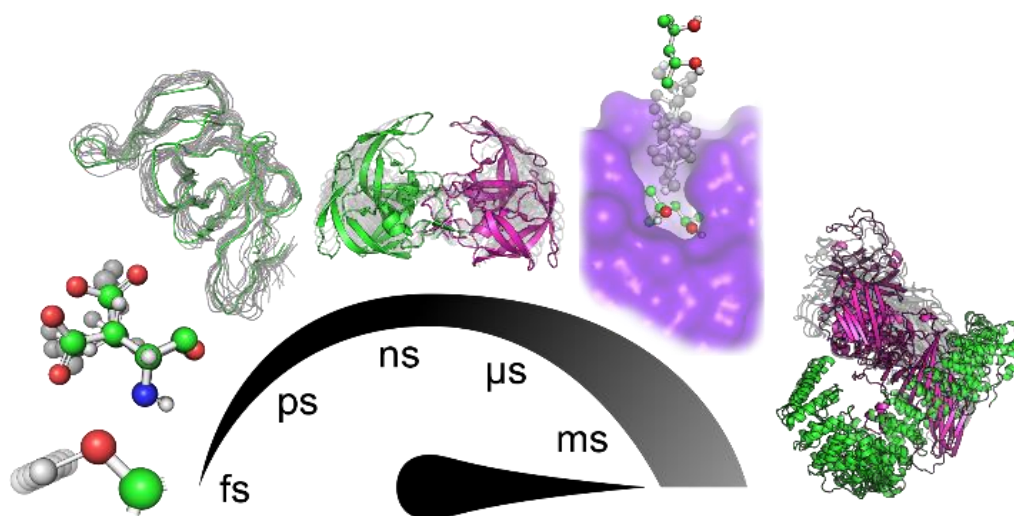


Figure 3/ temps caractéristique de la dynamique des protéines [43].

Le repliement des protéines fait l'objet d'une intense recherche [44], récemment l'intelligence artificielle a permis de prédire la structure d'une protéine bactérienne à partir de sa séquence d'acides aminés en seulement 30 minutes et avec un fort degré de précision [45].

Les PIDs semblent cependant ne pas faire partie des objets facilement simulables. À la vue de cette difficulté, il devient nécessaire de comprendre les interactions moléculaires qui assurent le maintien et le repliement des protéines.

Dans la plupart des protéines, le processus de pliage crée une forme globulaire dans laquelle les acides aminés hydrophobes sont enfouis vers l'intérieur et les acides aminés hydrophiles à la surface. Cette répartition des acides aminés assure la stabilité de la protéine.

Les protéines se replient pour atteindre leur conformation native qui possède un minimum d'énergie pour un environnement donné. Une évolution des séquences permet de générer ce minimum thermodynamique. Les protéines ne pouvant pas explorer l'espace des configurations de façon aléatoire, il existe un ou plusieurs chemins privilégiés pour arriver à l'état natif. Ce sont des combinaisons de mécanismes sous contrôle mixte : cinétique et thermodynamique. Du point de vue thermodynamique, le repliement naturel correspond au minimum d'énergie libre :

Energie totale = Energie d'interaction + désordre

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

L'Enthalpie ΔH caractérise la stabilité et l'entropie ΔS caractérise le désordre.

Dénaturé(D) \rightleftharpoons Natif(N), $\Delta G = 0$ à l'équilibre

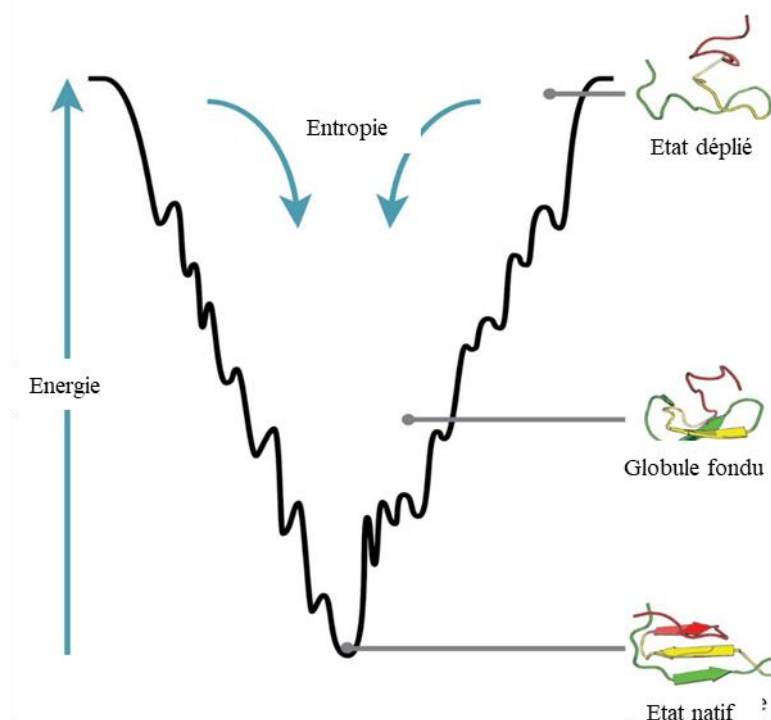


Figure 4/ entonnoir de repliement des protéines : la largeur représente l'entropie de la chaîne polypeptidique et la hauteur représente l'énergie [46].

Le repliement cinétique des protéines s'explique par plusieurs modèles construits à partir de considérations théoriques ou expérimentales : le modèle Framework, le modèle de diffusion-collision, le modèle d'effondrement hydrophobe ainsi que le paradoxe de Levinthal [47]. Concernant le paradoxe de Levinthal, en 1969, ce dernier a fait remarquer à la communauté qu'une protéine ne peut explorer aléatoirement des conformations possibles avant de trouver sa

conformation native. En d'autres termes, il existe un chemin privilégié au repliement des protéines. Ce chemin pour aller de l'état dénaturé à l'état natif en seulement une fraction de seconde (ns ou ps) est appelé globule fondu ou « molten globule » (Figure 4).

Cependant, il existe des protéines chaperonnes ayant pour rôle d'aider d'autres protéines à se structurer. Les protéines ne sont donc pas des objets statiques mais adoptent plutôt différentes conformations. L'étude de la dynamique des protéines est plus directement concernée par les transitions entre ces états mais peut également impliquer la nature et les populations d'équilibre des états eux-mêmes.

On appelle dynamique des protéines tout changement dépendant du temps dans la structure des protéines. Très complexe, elle comprend de nombreuses contributions de mouvement avec différents mécanismes d'action qui se produisent à diverses échelles de temps (picoseconde à la seconde) et à des amplitudes nanométriques qui dépendent fortement du système et de l'environnement local.

La plage de temps la plus propice pour suivre les divers changements conformationnels allant de la forme native la forme dénaturée est comprise entre la femtoseconde et la minute. Généralement, la formation d'une hélice dure 10^{-7} seconde ; la formation d'une boucle de 1 à 10^{-6} seconde et l'effondrement hydrophobe initial en un état compact est terminé en moins de 20 μ s [47].

IV) Conclusion

En conclusion de ce premier chapitre, les protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs) sont caractérisées par leur structure tridimensionnelle largement désordonnée ce qui suscite des questionnements sur notre compréhension de la biologie cellulaire. Leur rôle clé dans la régulation de processus biologiques complexes est de plus en plus évident, remettant en question le paradigme traditionnel établi par les protéines stables selon lequel la structure détermine la fonction des protéines.

L'une des caractéristiques les plus remarquables des PIDs est leur capacité à interagir avec divers partenaires biologiques. Leurs résidus MoRE (Molecular Recognition Element) ou MoRF (Molecular Recognition Feature) leur permettent de recruter et de se lier à ces partenaires, facilitant ainsi la formation de complexes moléculaires spécifiques. Ce phénomène de "repliement induit" leur permet d'adopter des structures tridimensionnelles spécifiques en réponse à ces interactions, ajoutant une dimension dynamique à leur fonctionnement.

Nous avons vu que les PIDs exercent une influence significative sur la régulation de multiples processus biologiques, notamment la régulation des signaux cellulaires, le contrôle du cycle cellulaire et la correction d'altérations génétiques. Leur flexibilité structurelle leur permet d'accomplir diverses fonctions biologiques cruciales, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie cellulaire et au développement des organismes vivants.

En fin de compte, ce chapitre nous a permis dans un premier temps de comprendre que divers facteurs environnementaux influencent la stabilité des protéines. Une variation de pH et ou de

température est responsable de nombreux changements conformationnels liés à la protéine indépendamment de leur nature. Concernant les PIDs, ce chapitre nous a permis d'appréhender le rôle central des PIDs dans la biologie cellulaire moderne. Ces protéines, en apparence "désordonnées," défient les attentes traditionnelles et ouvrent de nouvelles perspectives passionnantes pour la recherche biomédicale. Comprendre leur flexibilité structurelle, leurs mécanismes d'interaction et leur impact sur les processus biologiques est essentiel pour élucider les mécanismes sous-jacents à de nombreuses maladies et pour développer des interventions thérapeutiques ciblées.

Dans le chapitre 2, nous présenterons un état de l'art sur les différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques en allant des méthodes magnétiques aux méthodes optiques.

CHAPITRE 2 | METHODES DE CARACTERISATION DES STRUCTURES PROTEIQUES

Le chapitre 2 présente un aperçu des différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques en fonction de leurs natures. Les méthodes décrites vont de la détermination de la structure primaire grâce au séquençage direct des chaînes polypeptidiques aux méthodes de caractérisation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires telles que la diffraction des rayons X, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et les spectroscopies vibrationnelles. Ces techniques sont regroupées en catégories, notamment celles permettant la caractérisation des concentrations et celles permettant la caractérisation des structures, avec des méthodes magnétiques et optiques.

La RMN est présentée comme une méthode non destructive de choix en biologie et en chimie organique pour déterminer la structure de certaines protéines. Elle offre des informations sur la dynamique des arrangements conformationnels des macromolécules biologiques, tandis que les spectroscopies vibrationnelles fournissent des informations sur les acides aminés constituant les protéines ainsi que sur leurs structures globales.

La diffusion des rayons X est également évoquée comme une méthode complémentaire à la RMN pour étudier la structure tridimensionnelle des grandes molécules biologiques. Cependant, elle présente des limitations liées à l'état statique des échantillons.

Enfin, nous abordons les principes des spectroscopies vibrationnelles, en mettant l'accent sur la spectroscopie Raman, ainsi que sur l'effet de surface plasmonique utilisé pour améliorer la sensibilité de la spectroscopie Raman (SERS).

Cette introduction pose ainsi les bases pour la compréhension des méthodes de caractérisation des structures protéiques qui seront détaillées dans la suite du chapitre.

I) Différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques

Nom de la méthode	Masse nécessaire	Milieu de caractérisation	Résolution spectrale	Résolution spatiale	Résolution temporelle	Limites de détection (mol/L)
Rayon X	Mg	Sec		10 μ m	fs-ps	10 ⁻⁶ M
RMN	10mg pour une protéine de 20KDa	Liquide			ps-10ns et μ s-ms	10 ⁻⁶ M
IR	1,5g	Sec	2,5 -25 μ m		100 μ s-ms	>10mM
Raman	mg	Liquide, Solide, Gazeux	< 0,1 cm	De l'ordre du μ m	10 fs à < ps	10 ⁻⁷ M
SERS	<ng (molécules uniques)	Liquide, Solide, Gazeux	2 -3 nm	Quelque nm	fs-s	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻¹² M
AFM	Mg	Liquide Solide	~1 μ m	pm- Å		

Tableau 2/ comparaison entre les différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques.

Il existe différentes méthodes de caractérisation des structures protéiques dépendant de la nature des structures. La structure primaire est déterminée grâce au séquençage direct des chaînes polypeptidiques par les méthodes de Sanger [48] ou d'Edman [49] ou encore par la spectroscopie de masse. Les structures secondaires, tertiaires et quaternaires sont généralement caractérisées par la diffraction des rayons X, la résonance magnétique nucléaire ou par les spectroscopies vibrationnelles. Le nombre important de techniques utilisées dans le contexte des analyses biomoléculaires nous contraint à ne décrire que les méthodes les plus couramment utilisées. Ces méthodes sont regroupées en plusieurs catégories notamment celles qui permettent la caractérisation des concentrations (microbalance à quartz ; résonance plasmonique de surface) et celles permettant la caractérisation des structures. Nous pouvons également les regrouper en méthodes magnétiques ou optiques. Elles sont variées avec chacune des avantages et des inconvénients. Parmi les méthodes de caractérisation des structures, on distingue les méthodes dites magnétiques (la résonance magnétique nucléaire) et les méthodes optiques : les spectroscopies vibrationnelles (Infra Rouge, Raman, SERS). La DRX et la RMN permettent d'atteindre une résolution à l'échelle atomique décrivant ainsi précisément les structures protéiques et leurs variantes alors que les spectroscopies vibrationnelles apportent une information sur les acides aminés constituant les protéines ainsi que sur sa structure globale.

Du fait de son caractère non destructif, la RMN apparaît comme étant la méthode de choix en biologie et en chimie organique pour déterminer la structure de certaines protéines. Elle fournit des informations sur la dynamique des arrangements conformationnels au sein des macromolécules biologiques par mesure des temps de relaxation, de corrélation et des vitesses d'échange chimique. Les spectres RMN révèlent que pour une protéine structurée, les pics de

résonance individuels ont tendance à s'étendre (par exemple, il y a une grande dispersion du déplacement chimique) car les environnements magnétiques locaux des noyaux diffèrent considérablement contrairement aux PIDs dont les différents pics ont tendance à être plus rapprochés, voire à se chevaucher [50] -[52]. Néanmoins, les données spectrales RMN des PIDs fournissent deux contraintes conformationnelles causé par des problèmes de chevauchement des pics dans des protéines plus grosses restreignant la RMN à être combinée à d'autres méthodes pour l'identification (marquage isotopique et expériences multidimensionnelles) des PIDs [53]. Quelle que soit la méthode utilisée, l'accord avec les données RMN ne garantit pas que le résultat soit valide, étant donné les nombreux degrés de liberté par rapport à la rareté des contraintes [54].

La diffraction des rayons X quant à elle est une méthode complémentaire de la RMN qui permet de connaître l'arrangement des atomes composant les molécules dans un cristal. C'est la méthode la plus utilisée pour étudier la structure tridimensionnelle des grandes molécules biologiques. Cependant, l'utilisation d'une seule molécule est impossible du fait de la faible intensité des rayons diffusés. La solution est donc d'utiliser à la place d'une molécule unique un cristal c'est-à-dire un empilement moléculaire régulier et périodique dans les trois dimensions de l'espace. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne s'effectue pas en milieu liquide, ce qui la contraint à fournir des données à l'état statique. Pour résoudre ce problème, la diffusion des rayons X aux petits angles a été établie pour étudier la structure globale et les transitions structurelles des macromolécules en solution. Pour les protéines repliées, la technique fournit les structures tridimensionnelles à basse résolution pouvant ainsi être utilisée pour piloter la modélisation de corps rigides. C'est également un outil puissant pour l'analyse quantitative des systèmes flexibles, y compris les PIDs.

II) Les Spectroscopies vibrationnelles

La spectroscopie est une méthode de caractérisation basée sur l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière. Au cours de cette interaction, un échange d'énergie entre la lumière et la matière s'effectue.

Modes de vibrations	Nombre d'onde (cm-1)	Bandes Amides	Structures
ν (N-H), ν (O-H)	~3300	Amide A	
ν (N-H)	3350-3310	Amide B	
80% ν (C=O), ν (C-N), δ (N-H)	1600-1700	Amide I	Secondaire
60% δ (N-H), ν (C-N)	1580-1480	Amide II	Secondaire
δ (N-H), δ (C-N), ν (C=O), δ (N-C=O)	1200-1400	Amide III	Secondaire
δ (C=O) dans le plan, ν (C-C)	650-780	Amide IV	
δ (C-N) torsion	540-600	Amide V	
δ (C=O) dans le plan et hors du plan	540-500	Amide VI	
δ (N-H) hors du plan	250-290	Amide VII	

Tableau 3/ contribution des bandes Amides dans le squelette polypeptidique. δ : vibration de déformation ; ν : vibration d'élongation.

Cet apport d'énergie est utilisé pour faire vibrer les liaisons spécifiques. Du fait de la composition chimique, une molécule possède un spectre vibrationnel unique. Il est donc possible d'identifier une molécule à partir du spectre obtenu.

L'analyse des spectres protéiques a permis d'identifier neuf bandes amides (Tableau 3) permettant de déduire leurs structures. Ces bandes amides trouvent leurs origines dans les vibrations des groupes de chaînes polypeptidiques (groupes C=O, N-H et C-N) [55].

La position et la forme des bandes amides I (qui possède une forte intensité et est sensible à la conformation dans laquelle se trouve la liaison peptidique) est caractéristique des liaisons C=O dont les vibrations sont dépendantes de leurs localisations spatiales et donc de la structure secondaire. Ainsi, si la liaison est impliquée dans une hélice α ou dans un feuillet β , la position et la forme de la bande change. La bande amide II est liée aux vibrations N-H (« bending ») et C-N (« stretching »). Elle est sensible aux coudes formés lors des repliements.

La bande amide III est reliée aux liaisons N-H (« stretching ») et C-N (« bending ») mais les modes de vibration sont différents. Cependant, elle est sensible à la structure secondaire des protéines et peut donc être corrélée à la bande amide I [56].

En dehors de ces bandes amides qui donnent des renseignements directs sur la structure secondaire, d'autres liaisons importantes sont observables dans les spectres. Par exemple, la création d'un pont disulfure entre deux cystéines est caractérisée par l'apparition de pics spécifiques. Par ailleurs, les acides aminés possèdent des modes de vibration qui leur sont propres et sensibles à l'environnement. L'étude des spectres apporte donc de précieux renseignements sur la structure des protéines.

1) La spectroscopie infra rouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est l'étude de la diffusion, de la réflexion, et de l'absorption ou de la transmission du rayonnement IR dans la gamme spectrale de 800 nm à 3 μm pour les biomolécules. Le domaine IR se décompose en trois domaines : le proche IR, le moyen IR et l'IR lointain ; l'énergie du rayonnement IR se situe entre le visible et le micro-onde. Cette spectroscopie permet de déterminer le spectre d'absorption IR des molécules, mais également des protéines, qui leur est propre et unique.

Elle permet également de diagnostiquer, de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule [4,6]. L'absorption du rayonnement IR résulte du changement de modes de vibrations de la molécule et peut être augmentée lorsque la molécule est déposée sur une surface métallique nano structurée [17,18]. Le facteur d'exaltation peut atteindre 10^4 ou 10^5 [59][60] dans certaines conditions. L'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites « fréquences de groupe », sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée. Par cette méthode, les molécules, même en très faible concentration, peuvent être analysées sur le plan de leur composition et structure. Sa résolution spatiale varie de 2,5 μm à 25 μm et sa résolution temporelle de 100 μs à la ms. Son inconvénient majeur réside dans la réalisation des mesures d'absorption en condition sèche et non aqueux car l'eau absorbe fortement les rayons de la gamme IR. Cette condition pouvant altérer la structure des protéines. Néanmoins, elle reste un très puissant moyen de caractérisation pour l'identification des groupements moléculaires et l'obtention de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions [8].

2) La spectroscopie Raman

Lorsqu'on irradie une molécule, une partie des photons est diffusée. Ce phénomène a lieu même avec un rayonnement excitateur non résonant.

La spectroscopie Raman est une méthode d'analyse chimique non invasive qui fournit une caractérisation simultanée de la composition chimique d'un matériau, de son environnement ou encore de son degré d'oxydation et qui exploite le phénomène physique selon lequel un milieu modifie légèrement la fréquence de la lumière y circulant. Cette méthode permet de visualiser les différences non détectables à priori.

Sa résolution temporelle est de l'ordre de la picoseconde et sa résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Comparativement, elle exploite le même phénomène de vibration des liaisons interatomiques que la spectroscopie IR mais certains modes de vibration sont actifs en Raman et inactifs en IR, et inversement.

Elle fut prédite en 1923 par A. Smekal et observée pour la première fois dans des liquides, par Sir C.V Raman et porte depuis son nom [61]. Elle repose sur un phénomène de diffusion inélastique de la lumière (interaction lumière-matière avec échange d'énergie).

En collectant la lumière diffusée par l'échantillon, on obtient un spectre Raman qui nous renseigne sur sa structure : liaisons chimiques, arrangement cristallin, symétrie, phase... À ce titre, le spectre Raman fournit une empreinte du composé analysé permettant ainsi une identification d'une substance dans un mélange ou un matériau hétérogène.

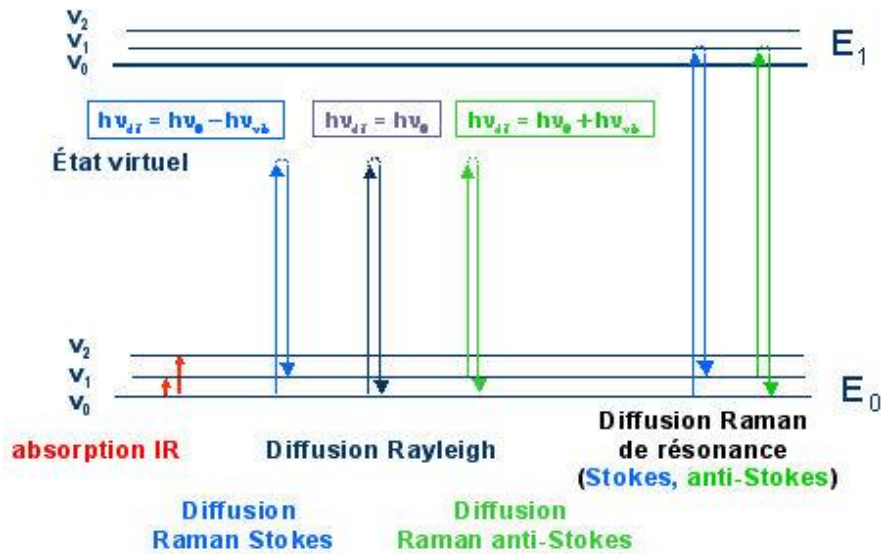


Figure 5/ les différents types de diffusion de la lumière [62].

Cette méthode permet de travailler avec des échantillons sous plusieurs conditions physique (solide, liquide, gaz). Son inconvénient majeur est que pour des échantillons de faible concentration, le spectre est de faible intensité et peut être masqué avec la fluorescence.

Bien que l'excitation ne soit pas résonnante, la différence d'énergie entre les photons laser et ceux de diffusion Raman correspond quant à elle à l'écart entre deux niveaux vibrationnels réels. Dans le cas de la diffusion Raman spontanée ces niveaux vibrationnels appartiennent à un même état électronique [63]–[67]. Deux cas sont alors envisagés :

- Si l'électron, excité par la longueur d'onde incidente retombe dans un niveau d'énergie supérieur au niveau de départ (il émet alors une longueur d'onde plus courte que la longueur d'onde incidente), on parle de diffusion Raman Stokes ($E_1 < E_0$ et $h\nu_{di}$ est de valeur négative).
- Si l'électron, excité par la longueur d'onde incidente retombe dans un niveau inférieur d'énergie, émettant une longueur d'onde plus grande, on parle alors de diffusion Raman anti-Stokes ($E_1 > E_0$ et $h\nu_{di}$ est de valeur positive).

La probabilité d'observation de transitions anti-Stokes, partant de niveaux moins peuplés, est plus faible que celle qui est observée pour les transitions Stokes ; de plus, elle décroît exponentiellement en fonction de l'énergie du niveau de départ [68]. Cette constatation, couplée à la symétrie qui existe entre les vibrations Stokes et anti-Stokes par rapport aux vibrations Rayleigh (diffusion élastique, sans perte ou gain d'énergie), conduit à choisir les vibrations Stokes pour l'étude Raman classique.

Les spectres de protéines obtenus par cette technique sont caractéristiques des acides aminés ainsi que de la structure secondaire [69]. Cette approche nécessite de grande quantité de protéine (concentration de l'ordre du mM) car la section efficace Raman des protéines, qui correspond à la probabilité que le phénomène Raman se produise, est très faible. Pour contourner cet inconvénient, il est possible d'exalter l'intensité du signal de la diffusion Raman en déposant les protéines sur des surfaces métalliques nano structurées (SERS).

Le SERS offre ainsi l'avantage d'être une méthode extrêmement sensible permettant l'étude de la dynamique et de la cinétique d'un petit nombre de molécules, on parle de molécules uniques [70][71]. Le signal Raman de molécules uniques permet d'observer une forte dynamique temporelle : dans les spectres successifs, les différentes bandes caractéristiques voient leurs intensités relatives ainsi que leurs fréquences fluctuer au cours du temps.

3) La diffusion Raman exaltée de surface : DRES (SERS en anglais)

a) Historique et découverte

Le SERS voit le jour à la suite des limitations de la spectroscopie Raman (signal Raman des spectres faibles). En effet, dans les années 70, Fleischmann et al. ont étudiés les molécules de pyridine adsorbées à la surface d'une électrode d'argent soumis à des cycles d'oxydo-réduction.

Au terme de ces analyses, ils observèrent pour la première fois un signal Raman d'une intensité exceptionnelle ; cette observation sera par la suite sujette à de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifique et sera attribuée à une augmentation de la rugosité des électrodes d'argent après plusieurs cycles redox avec pour corollaire une augmentation de la surface spécifique. Elle ne sera donc pas reconnue comme un fait nouveau [72].

Trois années plus tard, Jeanmaire et Albrecht publièrent des articles mettant en évidence un phénomène analogue dans des solutions de nanoparticules d'argent et d'or agrégées [73][74]. La communauté s'accorda sur l'implication d'un effet d'exaltation rendant le processus Raman plus efficace, dépendant du substrat métallique qu'elle nomma effet de surface.

L'exaltation Raman des premières expériences n'étant pas observée sur des électrodes polies finement, mais uniquement après que celles-ci eurent subi plusieurs cycles redox, on décida dès lors d'utiliser des substrats métalliques d'or, ou d'argent présentant des hétérogénéités spatiales de surface pour obtenir une exaltation du signal de diffusion Raman avec une excitation laser située dans le visible.

5) Propriétés optiques des substrats plasmoniques

Les plasmons

L'interaction du rayonnement électromagnétique avec une surface nanostructurée entraîne un mouvement collectif des électrons à la surface du métal. Ces oscillations transversales de la densité de charge encore appelés modes électromagnétiques ont été découvert par Ritchie en 1957 [75] et portent le nom de plasmons. Deux types de plasmons de surface peuvent être excités : les plasmons de surface localisés qui sont confinés à l'échelle de particules uniques c'est-à-dire à des distances nanométriques et les plasmons de surface délocalisés qui apparaissent à la surface de film mince métallique et pouvant se propager sur des distances de plusieurs micromètres.

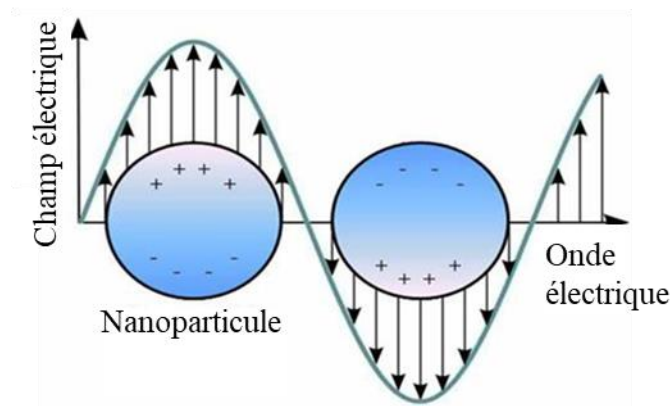


Figure 6/ : plasmon localisé de surface : déformation du nuage électronique [76].

Ces derniers sont dits non radiatifs car ils ne peuvent pas se coupler spontanément avec une onde électromagnétique. Les plasmons sont responsables de l'exaltation de la diffusion Raman et donc de l'intensité du signal mesuré.

L'exaltation résulte de l'interaction entre une onde électromagnétique et une surface métallique nano structurée. L'application d'une onde électromagnétique à la surface d'un métal crée un nuage électronique capable d'osciller.

Ces oscillations se produisent à une fréquence dite fréquence plasma. Le modèle de Lorentz permet de décrire l'interaction entre une onde électromagnétique et un atome. Dans ce modèle, le système électron-noyau est considéré comme un oscillateur harmonique, c'est-à-dire que cet électron va osciller à une fréquence spécifique lorsqu'il sera soumis à l'effet de l'onde électromagnétique. Les forces qui s'appliquent sur l'électron sont :

- La force de Coulomb, liée au champ électrique dépendant du temps

$$F_c = -|q|E \quad \text{Où } E = E_0 e^{-i\omega t} \quad (3)$$

Où E_0 est l'amplitude du champ électrique E ; q , la charge de l'électron et ω la fréquence de l'onde électromagnétique.

- La force d'amortissement des oscillations (couramment appelé force de frottements visqueux), liée à l'interaction entre l'électron et le noyau

$$F_a = -\mu \dot{x} \quad (4)$$

Où μ est la constante de viscosité et \dot{x} la vitesse de déplacement de l'électron.

- La force de rappel, qui a pour effet de ramener l'électron à sa position d'équilibre et qui s'oppose au déplacement de l'électron induite par la force de Coulomb :

$$F_r = -\gamma x \quad (5)$$

Avec γ la constante de rappel et x , le vecteur déplacement de l'électron par rapport à sa position d'équilibre.

La relation fondamentale de la dynamique nous permet d'établir l'équation du mouvement de l'électron de masse m et d'obtenir sa fréquence propre :

$$m\ddot{x} = -|q|E_0 e^{-i\omega t} - \mu\dot{x} - \gamma x \quad (6)$$

Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique, l'électron se déplace par rapport à sa position d'équilibre en fonction du temps. Ceci induit l'apparition d'un dipôle selon la direction du champ électrique \mathbf{E} , caractérisé par le moment dipolaire :

$$\mathbf{p} = -|q|\mathbf{x} = \alpha\epsilon\mathbf{E} \quad (7)$$

α est la polarisabilité qui traduit la réponse du système électron-noyau à une onde électromagnétique.

La polarisation totale, \mathbf{P} d'un matériau massif composé d'un nombre N de systèmes électrons-noyau par unité de volume est décrite comme la somme de tous les moments dipolaires :

$$\mathbf{P} = N\mathbf{p} \quad (8)$$

Au niveau macroscopique, la polarisation \mathbf{P} d'un matériau s'exprime sous la forme :

$$\mathbf{P} = \chi\epsilon\mathbf{E} \quad (9)$$

χ est la susceptibilité électrique du matériau. La réponse totale du matériau représentée par l'excitation électrique \mathbf{D} , est la somme de cette polarisation et du champ électrique incident \mathbf{E} :

$$\mathbf{D} = \epsilon\mathbf{E} + \mathbf{P} = (1 + \chi)\epsilon\mathbf{E} \quad (10)$$

Après avoir remplacé les termes on obtient la fréquence plasma :

$$\omega_p = \left(\frac{Nq^2}{m\epsilon}\right)^{1/2} \quad (11)$$

Nous venons de voir comment l'interaction entre la matière et une onde électromagnétique provoque un déplacement des électrons et ainsi l'apparition d'une oscillation plasma. Il a été montré que cette oscillation se produit pour certains niveaux d'énergies. L'oscillation plasma est alors quantifiée et appelée plasmon. Dans un volume, la fréquence du plasmon est un multiple de la fréquence plasma.

Dans le cadre de nanoparticules, du fait de leurs dimensions réduites, les plasmons de surface sont confinés dans la nanoparticule et ne peuvent pas se propager. Ils sont alors définis comme des plasmons de surface localisés (PSL). Pour certaines énergies, correspondant aux modes d'oscillation du gaz d'électrons, la lumière met en résonance les PSL (résonance des plasmons de surface localisés, RPSL). La RPSL peut être déterminée expérimentalement grâce à la spectroscopie d'extinction qui représente l'efficacité d'interaction entre la lumière et la nanostructure, le maximum étant atteint pour la RPSL. Celle-ci dépend de plusieurs paramètres dont la nature du métal, la taille et la forme des nanoparticules [18, 19], mais également du

milieu dans lequel se situent les nanoparticules [20, 21]. La condition de RPSL est atteinte lorsque la section efficace d'extinction est maximale. Celle-ci étant reliée à la longueur d'onde, il est possible de déduire immédiatement la position de la RPSL. L'excitation des plasmons induit une exaltation du champ électrique autour de la nanoparticule.

Exaltation du champ électrique

Les phénomènes à l'origine de l'exaltation SERS peuvent être de nature variée. Nous avons par exemple : la nature de l'espèce chimique, la longueur d'onde d'excitation la taille des nanoparticules [77]. Malgré ces incertitudes sur l'exaltation, deux effets coopératifs ont été identifiés comme participant à l'exaltation de surface : l'effet chimique et l'effet électromagnétique. Bien que les mécanismes gouvernant les effets électromagnétiques soient relativement bien connus, ceux concernant les effets chimiques le sont nettement moins [14,15].

• Origine de l'effet électromagnétiques de l'exaltation SERS

L'effet électromagnétique est un effet de longue portée qui affecte à la fois les champs excitateurs et les champs émis dans la diffusion Raman elle-même. Il constitue la plus importante contribution à l'exaltation du signal ($10^8 - 10^{10}$). L'origine électromagnétique de l'exaltation de surface est liée à plusieurs facteurs allant de la géométrie des particules plasmoniques à leur organisation entre elles.

- La contribution géométrique liée à la géométrie de la surface. Elle nécessite la présence sur le substrat de points singuliers matérialisés dans les expériences de champ proche par l'extrémité d'une pointe métallique. Le champ électromagnétique excitateur provoque un déplacement des charges positives et négatives à la surface du métal (comme dans le cas de la déformation du nuage électronique d'une molécule). Ce qui conduit à l'apparition d'un moment dipolaire induit. Le champ résultant est très intense et localisé. Le facteur d'exaltation ainsi que sa portée varient avec la forme de la surface et son orientation par rapport à la direction du champ excitateur [12,16].
- Plasmons localisés de surface : le second facteur est lié à l'excitation de plasmons de surface localisés sur le substrat. Les plasmons de surface sont des modes propres de vibrations des électrons du métal ; ils sont localisés à la surface du métal. L'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde appropriée permet d'exciter ces modes de vibration : excitation qui induit un champ électromagnétique, dont l'amplitude décroît perpendiculairement à la surface, sur une distance d'une centaine de nanomètres dans l'air et, à l'intérieur du métal sur quelques dizaines de nanomètres : c'est l'effet de peau des métaux. La désexcitation de ces plasmons de surface générés sur le substrat peut s'effectuer par transfert d'énergie due à un champ électromagnétique sur les molécules adsorbées. La géométrie et les dimensions de la surface ou de la particule influent également sur l'intensité du champ électromagnétique et sa portée.

• Origine de l'effet chimiques de l'exaltation SERS

Les mécanismes gouvernant les bases de cet effet sont très ambigus. Mais, l'explication généralement proposée est que lors d'interactions entre molécule et substrat, il s'opère un transfert de charge (électron ou trou). Ce transfert, responsable de l'excitation résonnante accroît la polarisabilité statique de la molécule et se traduit par une augmentation de l'intensité du signal Raman [13,14]. Cette contribution à l'exaltation du signal Raman intervient pour un facteur de l'ordre de 10^2 - 10^3 [83]. Elle apporte une contribution a priori beaucoup moins importante que celle de l'effet électromagnétique à l'exaltation globale du signal Raman. En plus de ces différences, il est noté que l'exaltation chimique est uniquement valable pour la première couche de molécule adsorbée alors que l'exaltation électromagnétique atteint les couches supérieures.

Substrats plasmoniques

Pour que les effets décrits précédemment se produisent, le diamètre de particules métalliques ou les corrugations des surfaces doivent être comprises entre 10 et 100 nm de diamètre. Les substrats sont des surfaces à base de métaux dont la fréquence de résonance s'étend de l'UV à l'IR. Les substrats les plus utilisés sont constitués d'or et d'argent ; les substrats à base d'aluminium et de cuivre sont peu utilisés car il est difficile de les manipuler à l'air et leurs propriétés SERS sont difficiles à maintenir stable dans le temps [84]. Les nanoparticules sont généralement classées en deux catégories : les nanoparticules sur substrat (nanostructures) et les nanoparticules en solution ou colloïdales.

Actuellement, les nanoparticules peuvent être fabriquées avec différents rapports surface/volume et à partir d'un grand nombre de matériaux.

De nombreux protocoles de fabrication des nanoparticules existent et sont dépendant de la nature des nanoparticules. De manière générale, les colloïdes sont synthétisés par des procédés chimiques et les nanostructures par des procédés physiques.

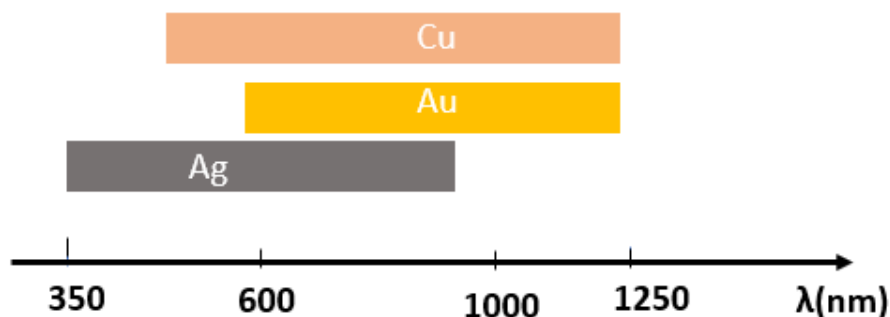


Figure 7/ résonance plasmons de quelques substrats SERS

La Figure 7 permet d'observer que la résonance optique de l'argent se trouve dans l'ultraviolet et celle de l'or dans le visible.

- **Les nanoparticules colloïdales**

Les nanoparticules colloïdales peuvent aujourd'hui être fabriquées assez facilement sous différentes formes. Ces petites particules offrent des moyens uniques d'étudier l'adsorption des protéines.

Il a été établi depuis les années 50 deux protocoles de synthèse des colloïdes : le protocole de Turkevich [85] et celui de Brust [86]. Le protocole de Turkevich est le protocole le plus facile car il utilise l'eau comme solvant ainsi que de faible concentration d'acide chloraurique $H[AuCl_4]$. Il permet idéalement d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques mono disperses de taille 10 à 20nm de diamètre. Cependant, il est possible d'obtenir des tailles plus grandes mais de dispersion plus élevée. La méthode de Brust permet d'obtenir des nanoparticules d'or dans des solvants organiques non miscibles à l'eau à l'instar du toluène.

- **Les nanostructures**

Les procédés physiques permettant la fabrication des nanostructures sont nombreux ; nous pouvons citer entre autres la lithographie et l'ablation laser. Certains procédés basés sur la fragmentation (Top-down) et l'assemblage (Bottom-up) permettent également d'obtenir des nanostructures.

Substrats	Méthodes de fabrication	Avantages	Inconvénients
Lithographiés	Gravures lithographie et	-Contrôlés -Permettent l'ajustement de la position des PSL	-Couteux -Difficilement industrialisable à grande échelle
Rugosifiés	Dépôt par évaporation	-Facteurs d'exaltation très élevés	-Réponse SERS inhomogène
Colloïdes	Brust ou Turkevich	-Peu couteux -Différentes formes et tailles Permettent l'ajustement de la position des PSL	-Instable par ajout de molécules ou changement de pH

Tableau 4/ avantages et inconvénients de quelques substrats SERS

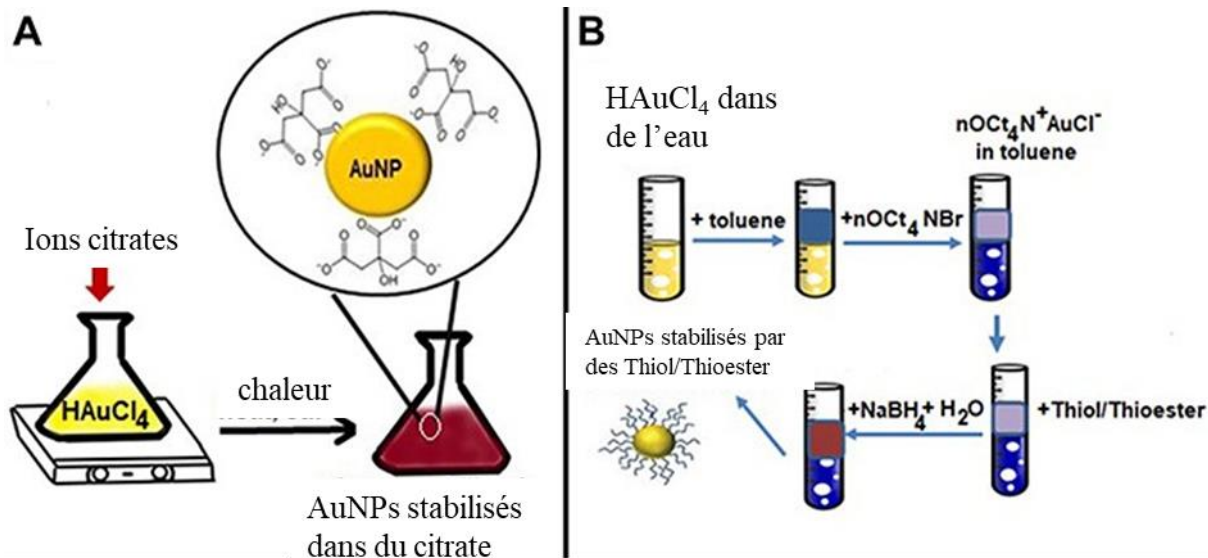


Figure 8/ (A) Méthode Turkevich pour la synthèse d'AuNPs (B) Série d'étapes impliquées dans la méthode Brust pour la synthèse d'AuNPs [85].

Au cours de nos travaux, nous avons utilisés les nanoparticules en suspension colloïdales de 100 nanomètres de diamètre commercialisées par BBI Solutions et ayant été produites en suivant le protocole de Turkevich (Figure 8). Ce protocole consiste à faire dissoudre une faible quantité d'acide chloroaurique dans de l'eau déminéralisée (mélange jaune clair) puis de faire chauffer le mélange jusqu'à ébullition en agitant puis y ajouter une solution de citrate de sodium. Ce dernier joue un rôle réducteur et servira par la suite à stabiliser les nanoparticules afin d'éviter leur agrégation. Le mélange passera progressivement du jaune au gris ; du gris au violet pour finalement se stabiliser au "rouge vin".

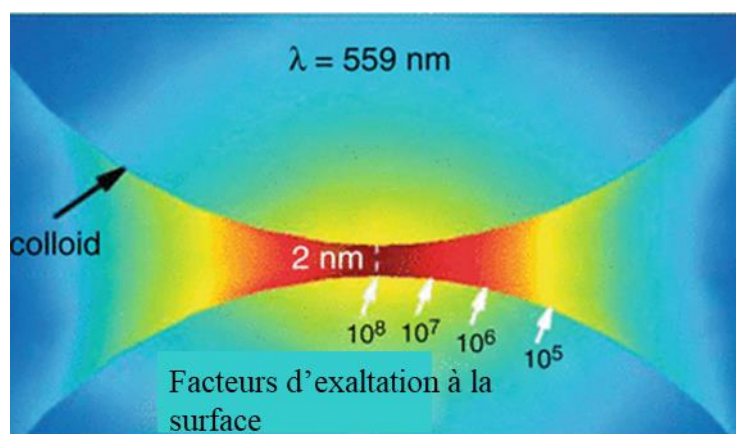


Figure 9/ image d'un point chaud induisant une exaltation du signal SERS [87].

Un des enjeux majeurs en SERS concerne la recherche de substrats SERS, présentant un maximum de gain Raman pour la caractérisation spectrale d'objets moléculaires à l'état de traces (système biologique, molécules biologiques, ...)[88]. L'utilisation des colloïdes rend possible cet objectif. Une caractéristique des colloïdes consiste en la possibilité d'obtenir des « points chauds ». Ces derniers sont des zones où les colloïdes sont extrêmement proches les uns des autres, permettant un recouvrement de leur champ électrique, induisant un champ beaucoup plus intense, et donc une intensité de signal DRES plus importante. Du fait de la présence inhomogène de ces points chauds, l'intensité du signal obtenu n'est pas reproductible d'une mesure à une autre. De plus, les colloïdes étant en solution, ils sont constamment en mouvement, ce qui peut également influencer la reproductibilité du signal mesuré.

III) Conclusion

En conclusion, nous avons exploré diverses méthodes de caractérisation des structures protéiques, en mettant l'accent sur les techniques spectroscopiques vibrationnelles, notamment la spectroscopie infrarouge (IR) et la spectroscopie Raman, ainsi que sur les substrats plasmoniques utilisés en spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). Nous avons également examiné l'effet électromagnétique et l'effet chimique qui contribuent à l'exaltation du signal SERS.

La caractérisation des structures protéiques est essentielle dans le domaine de la biologie et de la chimie, car elle nous permet de mieux comprendre la composition chimique, la structure secondaire et la conformation des protéines. Les techniques spectroscopiques vibrationnelles, telles que la spectroscopie IR et la spectroscopie Raman, sont particulièrement puissantes pour cette tâche, car elles offrent des informations précieuses sur les liaisons chimiques et les vibrations des groupes fonctionnels dans les protéines.

L'utilisation de substrats plasmoniques en SERS permet d'amplifier considérablement le signal Raman, ce qui permet d'atteindre des niveaux de détection très sensibles, même pour des molécules présentes à l'état de traces. Cependant, il est important de noter que la reproductibilité du signal SERS peut être un défi en raison de la présence de points chauds inhomogènes et du mouvement constant des colloïdes en solution.

En fin de compte, la combinaison de ces techniques spectroscopiques avec des substrats plasmoniques offre un potentiel énorme pour l'analyse des protéines et d'autres molécules biologiques. Ces outils nous permettent d'explorer les propriétés structurelles et chimiques des protéines, de comprendre leur dynamique et de détecter des molécules à des concentrations très faibles. Ils ouvrent la voie à de nombreuses applications potentielles dans le domaine de la recherche biomédicale, de la biotechnologie et de la chimie analytique. Cependant, il convient de poursuivre la recherche pour améliorer la reproductibilité des mesures SERS et explorer de nouvelles applications dans divers domaines scientifiques.

Dans le chapitre 3, nous allons valider notre méthode de caractérisation (SERS) sur des petites molécules. Ce chapitre mettra en évidence la description de notre montage optique, son principe de fonctionnement ainsi que quelques méthodes expérimentales et analytiques utilisées pour perfectionner notre système optique et interpréter nos résultats.

CHAPITRE 3 | METHODES EXPERIMENTALES

Dans ce chapitre, nous explorerons en détail les méthodes expérimentales cruciales mises en œuvre dans notre étude. Les méthodes expérimentales jouent un rôle central dans la compréhension des mécanismes et des phénomènes étudiés, ainsi que dans la collecte de données précises pour nos analyses. Nous nous concentrerons principalement sur la microscopie confocale, un outil puissant en sciences biologiques et médicales, ainsi que sur notre configuration spécifique de microscope confocal au sein de notre laboratoire. Nous aborderons également la conception de la cellule microfluidique utilisée pour nos expériences, le choix du substrat, les limites de détection de notre dispositif, et d'autres aspects importants de notre méthodologie.

La microscopie confocale, développée par Minsky dans les années 1950 et améliorée au fil du temps grâce aux progrès de la technologie informatique et laser, est une technique polyvalente utilisée dans divers domaines scientifiques. Elle offre des avantages tels que le contrôle de la profondeur de champ, l'élimination des informations de fond indésirables, et la possibilité de recueillir des coupes optiques à partir d'échantillons épais et de molécules individuelles. Notre laboratoire dispose d'un microscope confocal doté d'une configuration spécifique qui permet d'enregistrer le spectre Raman des échantillons sondés. Il utilise un objectif à immersion eau et un miroir dichroïque.

Nous discuterons également en détail de la conception de notre cellule microfluidique, essentielle pour le contrôle précis des volumes et des débits lors de nos expériences. Le chauffage de la cellule à des températures spécifiques est également pris en compte grâce à un dispositif d'incubateur que nous avons développé.

Le choix du substrat joue un rôle critique dans nos expériences SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). Nous avons évalué différents types de substrats, notamment des substrats non structurés, des substrats lithographiés et des colloïdes déposés sur des lamelles de verre. Nous expliquerons pourquoi nous avons opté pour les colloïdes en raison de leur rentabilité et de leur facilité d'utilisation.

Nous aborderons également les limites de détection de notre dispositif, en particulier pour la détection de molécules à des concentrations très faibles. Pour nos protéines d'intérêt, nous avons choisi une concentration spécifique, et nous discuterons de la limite de détection minimale de notre dispositif.

Enfin, nous introduirons l'analyse en composantes principales (PCA), une méthode couramment utilisée en spectroscopie analytique. La PCA nous permettra de catégoriser les spectres obtenus au cours de nos expériences, d'observer les corrélations entre eux et d'identifier les différentes familles spectrales présentes dans nos échantillons.

Ce chapitre fournira une base solide pour la compréhension des expériences à venir et des résultats que nous présenterons dans les chapitres ultérieurs de cette thèse.

I) Méthodes expérimentales

1) Microscopie Confocale

Développée par Minsky dans les années 1950, cette technique a connue de nombreuses améliorations grâce aux progrès de la technologie informatique et laser. Elle est très utilisée dans de nombreux domaines allant de la biologie à la science médicale où elle est d'un grand intérêt pour l'imagerie de fine section optique de spécimens vivants ou fixe dont l'épaisseur peut atteindre jusqu'à 100 μm . L'un de ses nombreux avantages est qu'elle permet de contrôler la profondeur de champ, l'élimination ou la réduction des informations de fond hors plan focal (ce qui entraîne une dégradation de l'image), et la possibilité de recueillir des coupes optiques à partir d'échantillons épais et de molécules uniques [89][80].

2) Microscope confocal de l'ICB

Les composants principaux du microscope confocal sont l'objectif, le miroir dichroïque et les photodétecteurs.

L'objectif joue le rôle de lentille et de condenseur. Il recueille et condense la lumière issue de la source excitatrice en un point limité par la diffraction de l'échantillon. L'ouverture numérique d'un objectif est très importante car, elle représente la capacité de l'objectif à capter les rayons lumineux diffractés par l'objet éclairé. Pour nos expériences, nous avons utilisé un objectif à immersion eau d'ouverture numérique 1,2 et de grossissement X60. Ainsi donc, grâce à sa grande ouverture numérique, notre objectif permet d'obtenir une image précise et nette de l'échantillon sondé. Avant et au cours des expériences une goutte d'eau (ou d'huile de même indice de réfraction que l'eau) est régulièrement mise entre la lentille frontale de l'objectif et la lamelle. Ce dépôt d'eau a un double but : celui d'utiliser pleinement les capacités de l'ouverture numérique et d'obtenir un meilleur pouvoir séparateur (capacité pour un objectif de différencier deux points très rapprochés).

Le miroir dichroïque permet de séparer la lumière excitatrice de la lumière d'émission. La lumière excitatrice est celle projetée vers l'échantillon. Elle est de faible puissance comparée à la lumière émise par l'échantillon et transmise aux photodétecteurs.

Cette lumière émise à partir du point focal est en effet recueillie au niveau des photodétecteurs et est utilisée pour obtenir une image confocale ou coupe optique de l'échantillon.

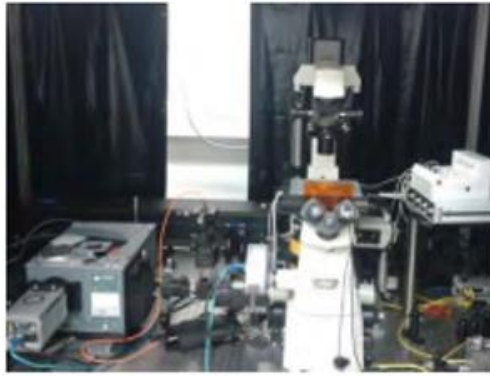


Figure 10/ image du montage SERS du laboratoire ICB
 (<https://youtu.be/9HvDq9F7I38?si=NFBABVWYPb0oRxgu>)

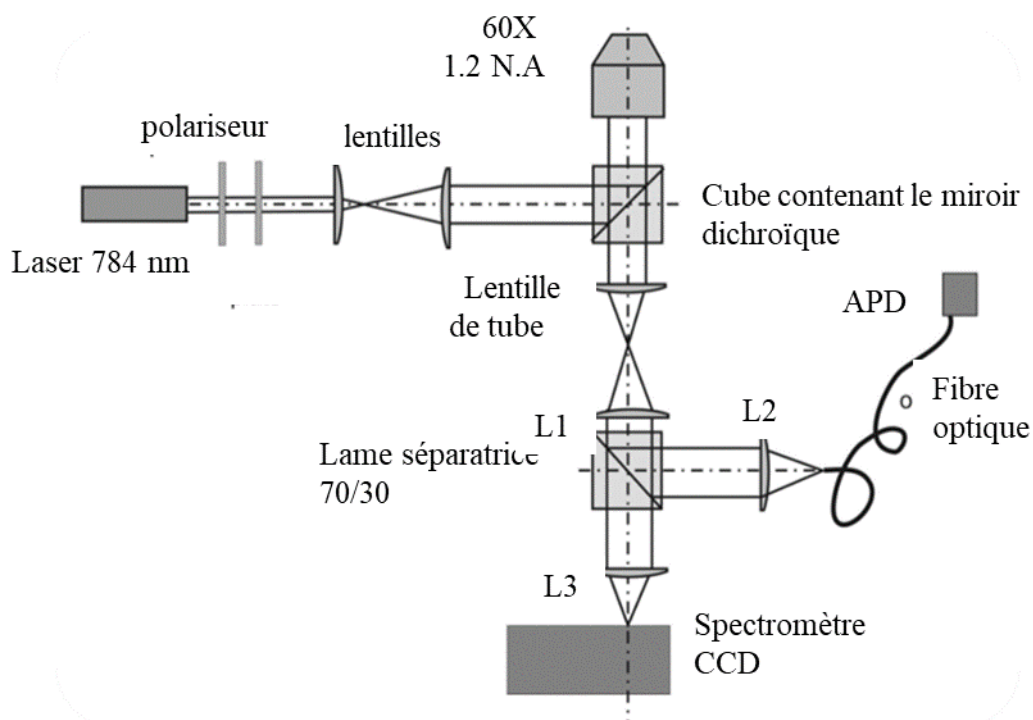


Figure 11/ principe du montage SERS du laboratoire ICB [90].

$FWHM_x=294 \text{ nm}$; $FWHM_y=294 \text{ nm}$; $FWHM_z=471 \text{ nm}$

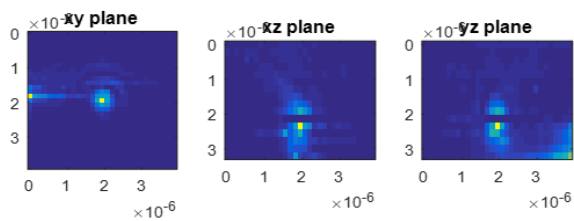


Figure 12/ fonction d'étalement du point (PSF) obtenue sur une nanoparticule d'or.

La fonction d'étalement du point permet de déterminer la résolution du microscope confocal. La PSF représente le volume d'excitation tridimensionnel qui se forme dans l'échantillon lorsque la lumière y est focalisée par un microscope confocal. La convergence de la lumière vers le point focal est limitée par la diffraction. Les propriétés optiques de l'échantillon influencent la forme de la PSF et la diffusion Raman se produit dans tout le volume d'excitation.

a) Principe de fonctionnement du montage optique

Lors de nos expériences SERS, nous avons fait le choix d'utiliser une source laser de longueur d'onde 784nm. Ce choix a été motivé par le désir d'augmenter le rapport signal sur bruit.

Le faisceau laser issu de cette source est collimaté au travers de deux lentilles convergentes (de distance focale 5 et 15 cm respectivement) avant d'être dirigé à l'intérieur d'un microscope à balayage inversé de marque NIKON et particulièrement sur un cube (composé d'un filtre d'excitation, d'un filtre d'émission et d'un miroir dichroïque) dont la longueur d'onde de transmission est de l'ordre de 785 nm.

Ces rayons seront réfléchis par le miroir dichroïque avant d'atteindre un objectif à eau d'ouverture numérique 1.2 et d'être focalisé sur un substrat afin d'exciter les plasmons de surface localisés et de créer une exaltation du champ électromagnétique diffusé par l'échantillon. Dans cette configuration, on obtient un rapport signal sur bruit satisfaisant en ne collectant que le signal provenant du volume de focalisation du laser dans l'échantillon. Le volume de focalisation est de forme elliptique défini dans le plan focal par la tâche d'Airy ($x = 0.37 \cdot \lambda / ON$) et allongé le long de l'axe optique (471 nm) (Figure 12).

Une fois la molécule excitée, le miroir dichroïque laisse passer le signal (Raman) issu de l'échantillon. Le signal est collecté en configuration de rétrodiffusion, c'est-à-dire qu'on collecte le signal diffusé par l'échantillon provenant du même objectif que celui utilisé pour l'excitation. En réalité, la diffusion produit trois types de signaux : Rayleigh, anti-stokes et stokes. Etant donné la rareté et la faible intensité du signal anti-stokes, celui-ci est généralement négligé. Un filtre Notch est utilisé pour bloquer le signal de diffusion élastique ou Rayleigh.

Sur le trajet lumineux vers les détecteurs, sont situées : une lentille de tube qui focalise le faisceau émis à la sortie du microscope sur le plan image ; une autre lentille collimate le faisceau sur une lame séparatrice qui enverra 70% de la lumière émise dans une fibre optique reliée à une photodiode à avalanche (APD) et 30% vers le spectromètre après dispersion sur un réseau de diffraction.

L'APD dont la résolution temporelle est de 10 μ s permet le décompte des photons émis et le spectromètre de résolution spectrale égale à 2 cm^{-1} permet d'observer l'ensemble du spectre (diffusion de la lumière en longueur d'onde). Le spectromètre mesure une bande spécifique du spectre grâce à l'utilisation d'un réseau de diffraction (600 lignes/mm) et d'une caméra CCD refroidie à l'azote liquide. Ainsi, on peut réaliser une analyse spectrale de l'échantillon, ou limiter l'émission à une plage de longueur d'onde précise (dans notre cas 260 à 2000 cm^{-1}).

La photodiode à avalanche (APD) produit comme résultat de l'absorption des photons un photo voltage. Elle est utilisée pour la détection et la mesure d'intensité lumineuse. Lors de

l'interaction entre molécules et nanoparticules, la cinétique d'adsorption est représentée par la trace temporelle fournie par l'APD. La représentation de cette intensité lumineuse permet de distinguer un ensemble d'évènements avec des changements abrupts ou non dont le degré de complexité se modélise aisément par la méthode de densité de probabilité (PDF).

La reconstruction de la surface de l'échantillon se fait par sélection d'un point chaud efficace. La surface est balayée en déplaçant le substrat à l'aide d'une platine piézoélectrique. Ainsi, la carte reconstruite à partir de la mesure du signal Raman sur l'APD permet de localiser précisément les points chauds présents sur l'échantillon.

La dernière spécificité de notre montage est l'interface informatique. A travers différents programmes et principalement LABVIEW, cette interface permet le pilotage des détecteurs ainsi que la visualisation des différents signaux caractéristiques des échantillons sondés.

L'étape suivante consiste à choisir un point chaud, à y laisser le laser puis à enregistrer les signaux en temps réel issus des deux capteurs (APD et spectromètre). Les images issues du compteur de photons ne contiennent en chaque pixel que l'information relative au nombre total de coups sans pour autant fournir des informations sur l'énergie des différents photons participant au signal. Les spectres sont obtenus en un seul point de l'image en additionnant l'intensité du signal sur la gamme spectrale détectée. Classiquement, nos acquisitions sont ainsi composées de 1024 spectres de 0.5 seconde.

Une pompe micro fluïdique a été utilisée pour contrôler le volume ainsi que l'écoulement de nos molécules biologiques. Les débits ont été finement réglés à l'aide d'une approche active utilisant une pompe microfluidique péristaltique, permettant un contrôle précis des volumes d'écoulement de l'ordre du picolitre. Enfin, le dispositif doit être conçu de manière qu'une molécule d'analyte entre en contact avec la zone de détection au moins une fois (de préférence plus d'une fois) pour permettre une capture et une détection efficaces. Il est évident qu'un débit lent permet d'atteindre cet objectif.

Une autre caractéristique de conception possible pour augmenter la probabilité de contact pendant le transit consisterait à réduire la hauteur du canal au-dessus de la zone de détection. Les canaux fluidiques peuvent facilement être fabriqués pour avoir une hauteur de 1 à 2 micromètres, ce qui réduit considérablement la probabilité qu'un analyte passe devant le détecteur sans entrer en contact physique direct avec lui.

Un dispositif de contrôle de température a également été utilisé au cours de nos expériences.

b) Conception de la cellule micro fluidique

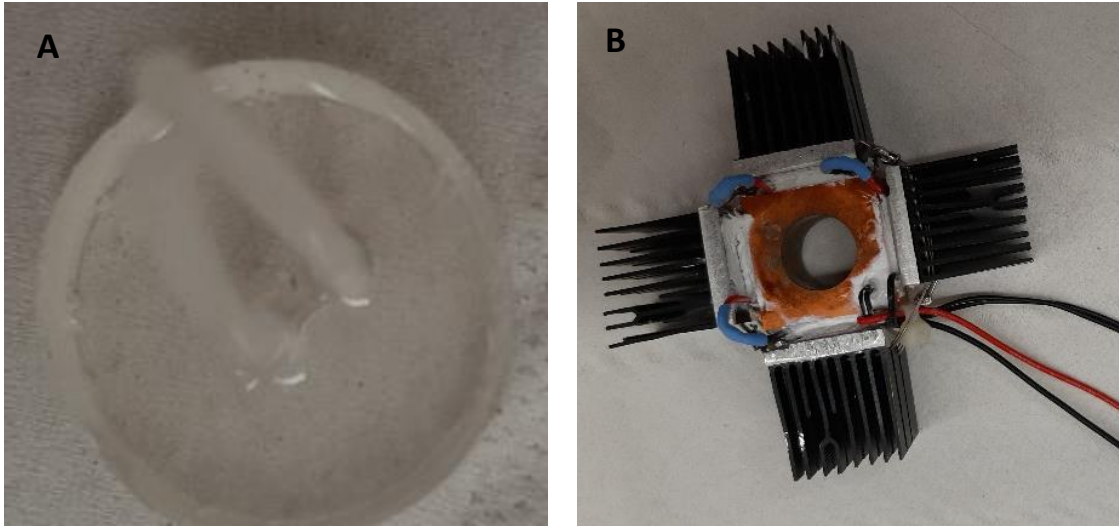


Figure 13/ (A) : cellule microfluidique monocanal de dimension latérale de $3.2 \mu\text{m}$ et hauteur $1.9 \mu\text{m}$ faite à base de PDMS ; (B) : cellule de température composée de quatre modules Peltier.

Le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane) encore appelé Sylgard 184 possède des propriétés thermiques qui varient entre -50° à 200° . Deux solutions commerciales permettent la fabrication du PDMS : une base (élastomère de silicone) et un agent de réticulation. La conception de la cellule micro fluidique nécessite de faire couler sur une empreinte SU-8 photorésistante (fourni dans notre cas par une équipe du laboratoire) une mixture de base et d'agent de réticulation dans la proportion 10 : 1 préalablement homogénéisée et dégazéifiée au mixeur rotateur. La suite consiste à mouler (moule en Teflon conçu par le service mécanique de notre laboratoire) et faire chauffer au four pendant 2h à 80°C . Une fois cette durée écoulée, il est Important de laisser le moulage refroidir à l'intérieur du four avant démoulage.

La Figure 13A est un modèle de cellule micro fluidique monocanal réalisé au laboratoire et utilisé pour cette étude. Le monocanal a une dimension latérale de $3,20 \mu\text{m}$ et hauteur $1,9 \mu\text{m}$. La faible hauteur du canal ainsi qu'un débit d'écoulement lent et intermittent ont été choisis pour augmenter la probabilité de contact entre les molécules d'analyte avec la zone de détection rendant ainsi la détection efficace. La dimension latérale du canal permet de réduire les contraintes liées à l'évaporation. En effet, plus le volume est confiné dans un faible volume plus l'évaporation est lente. Le collage de la cellule microfluidique avec un substrat de verre a été réalisé en utilisant un plasma d'oxygène qui active la surface du substrat pour qu'elle réagisse avec la surface active de la puce de PDMS.

c) Cellules de température

Nous avons dû thermaliser notre cellule micro fluïdique pour pouvoir la chauffer de la température ambiante à 60°C. Le chauffage ou le refroidissement est basé sur l'effet Peltier qui transforme un courant électrique en une différence de température entre ses faces. Un incubateur a été fabriqué afin d'atteindre notre objectif.

Nous avons disposé 4 éléments Peltier chauffants sur les bords latéraux de la cellule (Figure 13B). Ces quatre éléments ont été solidarisés à l'aide d'une bague en cuivre (possédant une ouverture au centre qui permet le passage du faisceau laser) excellent conducteur thermique, qui a été construite par le service mécanique de notre laboratoire. De la graisse thermique est appliquée sur les faces du Peltier pour favoriser le contact thermique. Nous avons rajouté 4 dissipateurs pour évacuer la chaleur de la source froide. Le contrôleur de température a été monté par le service électronique de notre laboratoire. Les radiateurs sont alimentés par une source de tension de 12 V pilotée par notre ordinateur qui ajuste les rampes de tension. Le logiciel Adaptative junior HMI permet de contrôler et d'enregistrer les variations de température. Ce logiciel très simple d'utilisation permet de rentrer une température de consigne et donne les valeurs de température toutes les secondes. Notre système peut donc passer de la température ambiante à 60°C (température maximale pouvant être atteinte) en environ 2 minutes : le passage d'un degré à un autre s'effectue en environ 30 secondes.

Afin d'avoir une température constante sur de longues durées, nous avons choisi un contrôleur PID (« Proportional Integral » Derivé). Ce dernier est un système de régulation qui améliore la performance du système en corrigeant les erreurs de la régulation de la valeur de consigne. L'asservissement PID utilise un système PWM (« Pulse With Modulation ») qui délivre de hauts courants pour assurer le chauffage. La linéarité du Peltier est obtenue avec un courant de 0.5 A ainsi, la chaleur rejetée par le Peltier est proportionnelle à la puissance fournie.

Pour utiliser cet asservissement, nous avons besoin d'un thermocouple K en accord avec la gamme de température étudiée et d'une boîte en plastique servant de support protecteur pour le module électrique d'asservissement.

Après plusieurs tests, nous avons pu établir une différence de température de 5°C entre la surface chaude et la solution liquide de la cellule microfluidique. Les températures de nos expériences sont celles prises dans le liquide.

II) Substrats SERS

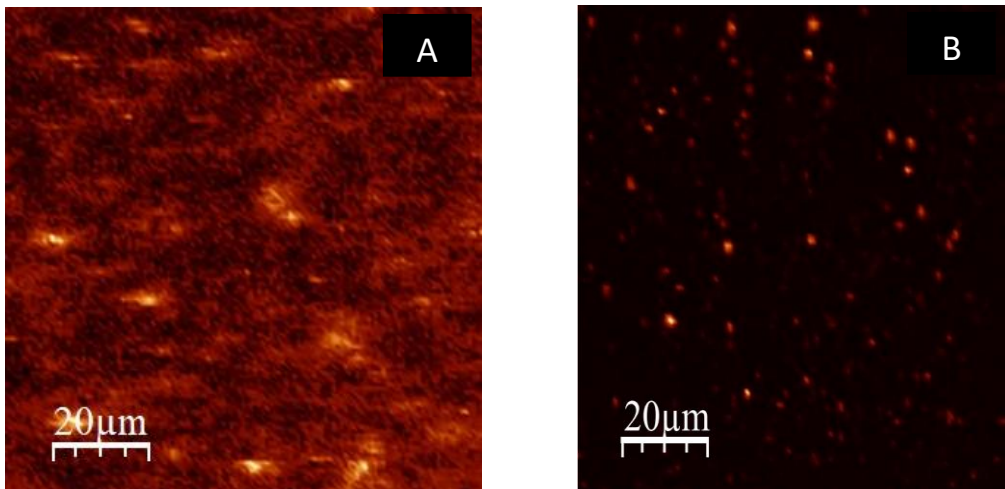


Figure 14/ images confocales des substrats plasmoniques : A) Substrats non structurés ou recuit obtenu par évaporation de l'or sur lamelle de verre puis chauffé à température 200°C pendant deux minutes. B) nanoparticules de 100 nm de diamètre évaporées sur lamelle.

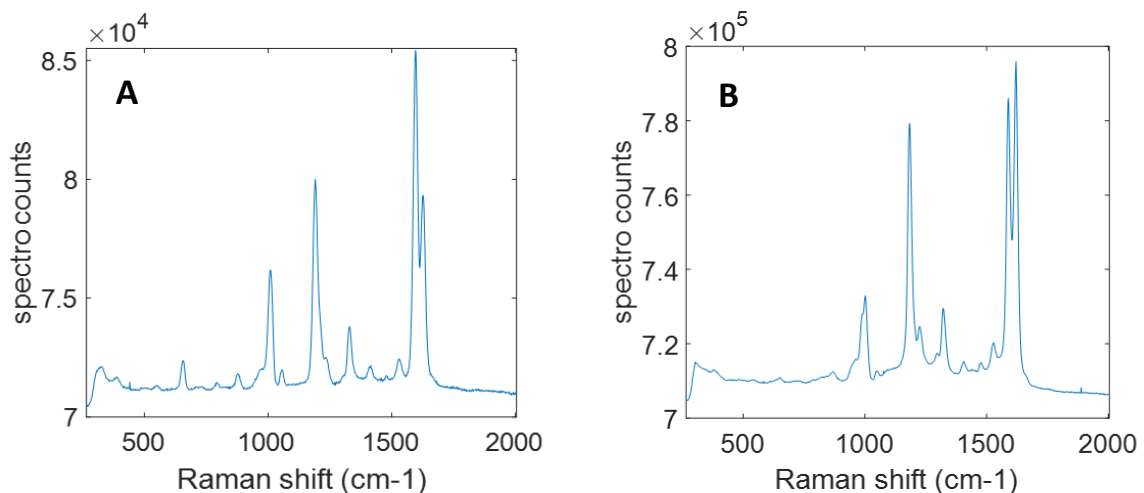


Figure 15/ moyenne de 600 spectres bruts de la BPE (bipyridyléthylène) de concentration μM obtenus à pH 7 avec une puissance laser de 5mW collectés sur différents substrats : A) substrats non structurés ou recuits B) colloïdes d'or évaporés sur lamelle de verre.

La solution colloïdale de 100 nm de diamètre stabilisée dans du citrate a été obtenue chez BBI solution. Après nettoyage de lamelle, une solution de 20 μL a été déposée au centre de la lamelle. Une fois évaporée, la lamelle a été passée au plasma Cleaner qui possède une chambre à vide utilisant de l'oxygène gazeux qui réagit avec le substrat pour enlever tout agent contaminant.

a) Dépôt d'or par évaporation

Cette étape se fait dans un bâti de dépôt par pulvérisation EDWARDS. La lamelle de verre est attachée à l'anode puis un courant de 40 mA est appliqué entre l'anode et cathode. Pour une durée de 2minutes, un plasma est créé par ionisation de l'argon qui joue le rôle de gaz de

pulvérisation. Les atomes de ce gaz bombardent la cathode et pulvérisent l'or sur la lamelle. La dernière étape consiste à chauffer la lamelle (sortie du pulvérisateur) pendant 4 minutes à une température de 200°C. Le chauffage favorise le regroupement de l'or en agrégats.

b) Préparation de la solution de BPE (molécule test)

La bipyridyl éthylène en poudre est insoluble dans l'eau. La dissolution a été faite dans un mélange composé de 50% d'eau déionisée et de 50% d'éthanol. Les concentrations ont été variées du millimolaire au femtomolaire pour les besoins d'expériences.

L'obtention de l'image se fait en déplaçant l'échantillon à l'aide du système piezoélectrique dans la direction (X, Y). Le signal enregistré par l'APD permet la reconstruction de l'image confocale. Cette image dont la vitesse de scan est d'une ligne par seconde est faite de 256X256 pixels. Par la suite un point chaud est choisi et on y recueille les différents signaux provenant des deux photodétecteurs (APD et spectres).

c) Choix du substrat

Dans les expériences SERS, le choix du meilleur substrat est une étape très importante car celui-ci doit d'abord être économique tant en temps qu'en coût. Allant dans ce sens, nous avons testé grâce à la BPE (Bipyridyléthylène) trois substrats différents : les substrats non structurés réalisés par simple dépôt/évaporation physique à l'aide d'un évaporateur ; les substrats lithographiés (provenant du laboratoire de Troyes) et les colloïdes évaporés sur lamelle de verre.

Il en est ressorti que les substrats lithographiés bien que présentant un avantage en termes de contrôle de la géométrie et de la fréquence de résonance n'étaient pas adaptés pour les expériences car bien trop coûteux. Les substrats issus du dépôt physique présentaient l'avantage d'être facile à mettre en œuvre cependant, les problèmes de reproductibilité aléatoire et des tailles hétérogènes d'agrégats formés persistaient. Ces deux types de substrats ont donc été négligés au détriment des suspensions colloïdales qui elles étaient moins coûteuses, faciles à mettre en œuvre et qui présentaient des facteurs d'exaltation importants bien que la distribution des points chauds fût quelque peu aléatoire.

Les applications en biotechnologie nécessitent la synthèse de nanoparticules dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques présentent des spécificités uniques par rapport aux particules macroscopiques [91]. L'exaltation des signaux SERS par des suspensions colloïdales d'or ou d'argent a été démontrée par Creighton et al. (Chapitre 2). L'interaction de la lumière avec des nanoparticules d'or est dominée par l'excitation des plasmons localisés de surface [83]. Une des conséquences principales de cette excitation pour la détection biomoléculaire est le champ électromagnétique fort créé à la surface des nanoparticules [92]. La connaissance/maitrise des procédés de fabrication des nanoparticules est d'autant plus importante que l'intensité de la diffusion SERS est intimement liée à la taille, la forme ainsi qu'à la distance entre particules [78].

Ces nanoparticules ont en effet la particularité de produire des points chauds qui sont des zones où les colloïdes sont extrêmement proches les uns des autres, permettant un recouvrement de leur champ électrique, induisant un champ beaucoup plus intense, et donc une intensité de signal SERS plus importante. Du fait de la présence inhomogène de ces points chauds, l'intensité du signal obtenu n'est pas reproductible d'une mesure à une autre.

d) Limite de détection

La limite de détection a été également évaluée en sondant différentes concentrations de BPE (allant de 10^{-15} à 10^{-3} M) par une puissance d'excitation d'1 mW en sortie du laser. Nous avons très vite constaté qu'en dessous de 10^{-13} M, aucun spectre Raman n'était détecté. La limite de détection minimale pour notre dispositif est donc de 10^{-13} M pour une acquisition de 600s. Cette limite peut être considérée comme relativement élevée puisqu'un point chaud permet de détecter une molécule individuelle. En effet, plus le point chaud est petit, plus la limite de détection est élevée. A une concentration de 10^{-13} M, la distance moyenne entre les molécules est estimée à 100 nm valeur qui dépasse la section transversale de notre capteur. Il a également été démontré lors de ces différents tests que l'intensité spectrale ainsi que le temps d'acquisition des spectres augmentaient avec la concentration de la solution.

Pour nos protéines, nous avons fait le choix d'utiliser une concentration de 10^{-6} M. Cette concentration correspond à un environnement intermédiaire car, elle représente une transition entre le régime à molécules uniques et celui de la variation de l'adsorption ou non des molécules. Cette concentration est importante car à cette concentration, les molécules sont plus proches les unes des autres (distance estimée à environ 300nm).

e) Facteur d'exaltation

La notion de facteur d'exaltation a connu de multiples améliorations depuis les travaux de E. LeRu et P. Etchegoin et ceux de P. Hildebrandt [93]. Cependant, elle reste assez difficile à expliquer au niveau du point chaud à cause de leur géométrie complexe. L'exaltation du signal Raman peut être quantifiée à l'aide du facteur d'exaltation (EF : « Enhancement Factor ») ou plutôt de la valeur moyenne de ce facteur (AEF : « Average Enhancement Factor ») beaucoup plus facile à calculer et définie par :

$$EF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{Raman}/C_{Raman}} \quad (12)$$

I_{SERS} et I_{Raman} représentent respectivement l'intensité du signal SERS et Raman classique ; C_{SERS} et C_{Raman} sont les concentrations des solutions sondées dans les configurations SERS et Raman classique respectivement.

La concentration SERS est celle déterminée autour du point chaud : elle s'apparente à la limite de détection du montage. La concentration Raman représente la concentration de la solution sondée. L'application de cette formule permet d'obtenir un facteur d'exaltation :

$$EF = \frac{10^{-6}}{10^{-13}} = 10^7 \quad (13)$$

Cette valeur est assez importante et suffisante pour les expériences en molécules uniques.

III) Analyse en composantes principales : PCA

Très utilisée en spectroscopie analytique, la PCA permet grâce à des transformations linéaires spécifiques de convertir un ensemble d'observations de variables corrélées en un ensemble de valeurs de variables linéairement non corrélées appelées composantes principales. Elle a pour but de catégoriser les spectres en fonction de leur degré de similitude dans le but de mieux comprendre les sources de fluctuations et d'identifier le nombre de famille de spectres indépendants. Elle est appliquée en décomposant en valeurs propres et vecteurs propres la matrice de covariance de données [94][95]. Les vecteurs propres représentent le nombre de composantes principales nécessaire pour la description de l'expérience ; Ils sont déterminés par la méthode dite du coude : en effet, leur évolution sur un graphe apparait semblable à un coude. Les vecteurs propres les plus importants sont ceux correspondants aux valeurs propres maximales. Une projection dans l'espace de ces vecteurs propres est généralement utilisée pour la mise en évidence des différentes corrélations pouvant être observées entre les spectres. Les spectres projetés suivant le même axe seront donc considérés comme corrélés même si ne présentant pas forcément la même intensité.

La fenêtre spectrale de 1600 à 1700 cm^{-1} a été utilisée pour trouver les corrélations entre spectres. La Figure 16 montre un classement des spectres (un spectre = un point) suivant les deux premières composantes pour la BPE. L'objectif ici est :

- (i) d'observer si des clusters s'ordonnent
- (ii) de comparer les étalements des nuages de points

Si cette analyse ne permet pas de suivre la cinétique ou les relations entre spectre, les résultats montrent essentiellement une répartition en ligne des structures. Cette configuration en ligne caractérise la présence d'une seule structure d'intensité variable (figure16).

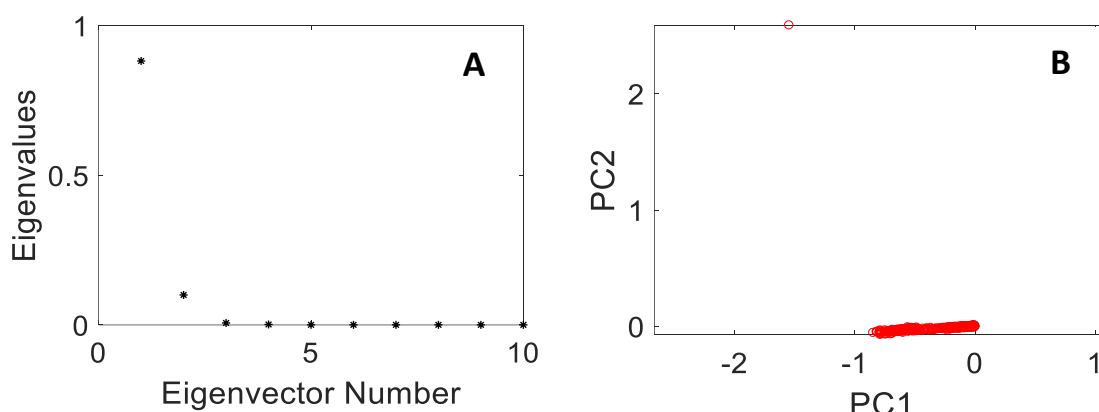


Figure 16/ A) : contribution des valeurs propres donnée par la PCA ; B) : représentation 2D de cette PCA à une température de 22°C pour un pH 7.6 calculées sur un ensemble de 600 spectres de la BPE.

La Figure 16A montre que la matrice de covariance des spectres de la BPE peut être décrite par des vecteurs et valeurs propres. Les valeurs propres donnent les poids de chaque vecteur propre (composante principale). L'amplitude des valeurs propres montre que la première composante principale représente environ 80% de la variance et la deuxième environ 5%. Le poids des dernières composantes étant nul, ces dernières vont donc être négligées. La décomposition des spectres dans l'espace 2D sur les deux premières composantes principales permet de déterminer le nombre de famille spectrale présent dans la molécule.

On observe sur la Figure 16B une seule famille facilement identifiable par l'accumulation des spectres. Ce résultat n'est pas surprenant car dans la bande allant de 1600 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} la BPE ne possède qu'une seule liaison vibrationnelle marquée par la fréquence à 1623 cm^{-1} .

IV) Conclusion

Le chapitre 3, consacré aux méthodes expérimentales, a fourni un aperçu détaillé de l'appareillage et des techniques employées dans cette étude. Le microscope confocal, au cœur de nos investigations, a été présenté en mettant en évidence ses composantes essentielles telles que l'objectif, le miroir dichroïque, et les photodétecteurs. La configuration optique a été décrite en détail, notamment en ce qui concerne la source laser, le trajet lumineux, et la détection des signaux Raman. De plus, nous avons abordé la conception de la cellule microfluidique, en expliquant comment elle a été fabriquée en utilisant le PDMS, ainsi que son contrôle thermique pour des expériences à différentes températures.

Nous avons également discuté de la préparation des substrats à base de nanoparticules d'or, essentiels pour les expériences SERS. Le choix de ces substrats a été motivé par leur facilité de mise en œuvre, leur coût abordable et leur capacité à produire des points chauds qui amplifient le signal Raman des molécules d'intérêt. De plus, nous avons examiné la limite de détection de notre dispositif, qui a été établie à 10^{-13} M , ainsi que le facteur d'exaltation, montrant que notre système offre une amplification significative du signal Raman.

Enfin, nous avons abordé l'analyse en composantes principales (PCA) en tant qu'outil permettant de traiter et de regrouper les données spectroscopiques, facilitant ainsi la compréhension des corrélations entre les spectres. Cette analyse a montré la capacité de notre approche à discriminer différentes familles de spectres, ouvrant ainsi la voie à des applications potentielles dans la caractérisation de molécules complexes.

Dans l'ensemble, ce chapitre a établi les bases expérimentales nécessaires à notre étude sur la détection de molécules biologiques à l'échelle nanométrique. Les informations et techniques présentées ici sont cruciales pour la compréhension des résultats obtenus dans les chapitres suivants, où nous explorerons plus en profondeur les applications de ces méthodes dans le domaine de la biotechnologie et de la détection de molécules à l'échelle nanométrique.

CHAPITRE 4 | ADSORPTION DE L'ALBUMINE SERUM BOVIN (BSA) SUR DES NANOPARTICULES D'OR : CARACTERISATION DES CONFORMATIONS DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

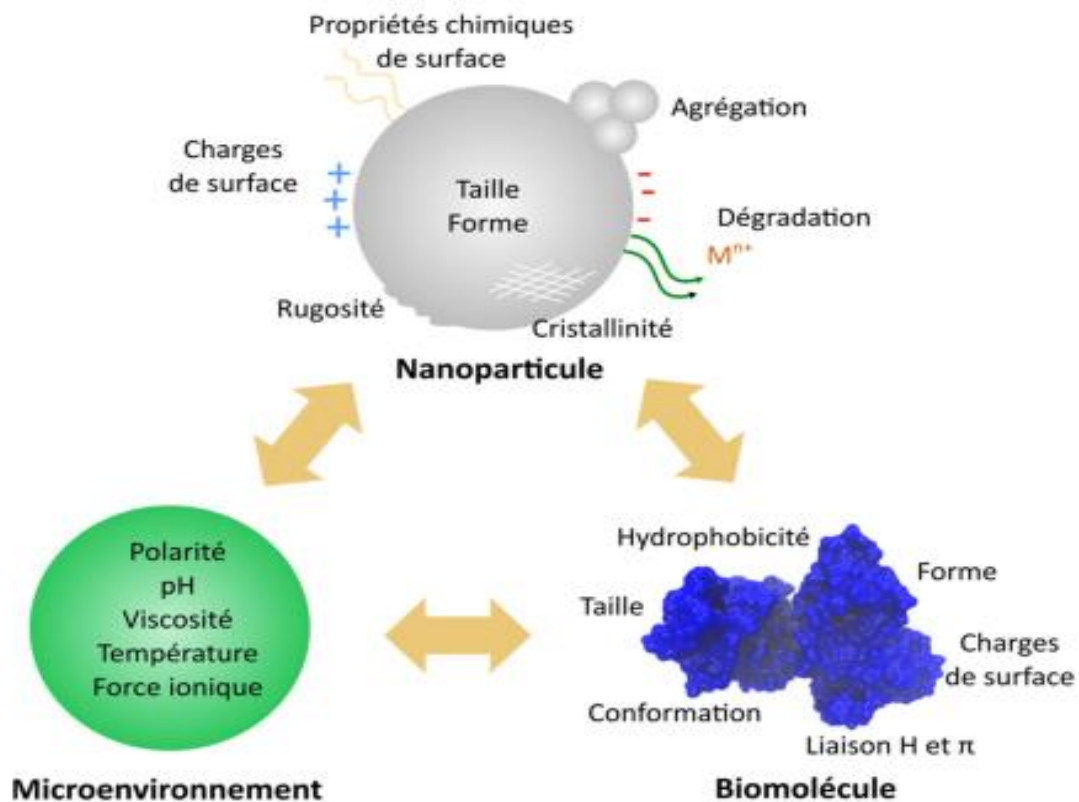


Figure 17/ schématisation des différents facteurs physico-chimiques influençant les interactions entre les nanoparticules et les biomolécules [96].

L'adsorption des protéines sur des nanoparticules est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs paramètres environnementaux, tels que le point isoélectrique et la stabilité de la structure de la protéine, ainsi que la charge et l'hydrophobicité de la surface [97]. Ce processus soulève de nombreuses questions au sein de la communauté scientifique : quelle est la nature des protéines adsorbées ? S'agit-il de protéines natives ou dénaturées ? Quelle est leur structure et quels sont les facteurs qui influencent leur adsorption ?

Ce chapitre présente les résultats des expériences menées en solution aqueuse avec l'albumine sérique bovine (BSA) sur des nanoparticules colloïdales d'or. La méthode SERS (« Surface-Enhanced Raman Spectroscopy ») a été couplée à la microfluidique afin de déterminer les conditions d'adsorption de cette protéine à la surface. Des analyses ont été réalisées pour

différentes valeurs de pH et de température, dans le but de mettre en évidence d'éventuels changements de conformation liés à des transitions de phases.

Nous allons dans un premier temps présenter la structure et la fonction de la BSA, puis nous verrons les effets de l'environnement sur la caractérisation des structures primaires et secondaires respectivement. La caractérisation de la structure secondaire fera état de différentes méthodes analytiques permettant d'ajuster et de mieux expliquer les fluctuations observables. Une quatrième partie de ce chapitre mettra en évidence les différents taux de conformations observés dans les structures secondaires en fonctions des paramètres tels que le pH et la température.

I) Structures physico-chimiques de la BSA

L'étude de l'adsorption des protéines sur des surfaces métalliques fournit des informations sur leur comportement électrochimique et leur structure. La BSA a été largement étudiée dans ce contexte et est considérée comme une protéine de référence dans de nombreuses expériences en biologie moléculaire, en médecine et en agroalimentaire. Par conséquent, les propriétés physico-chimiques et structurales de la BSA sont bien documentées.

a) Propriétés physico-chimiques de l'Albumine

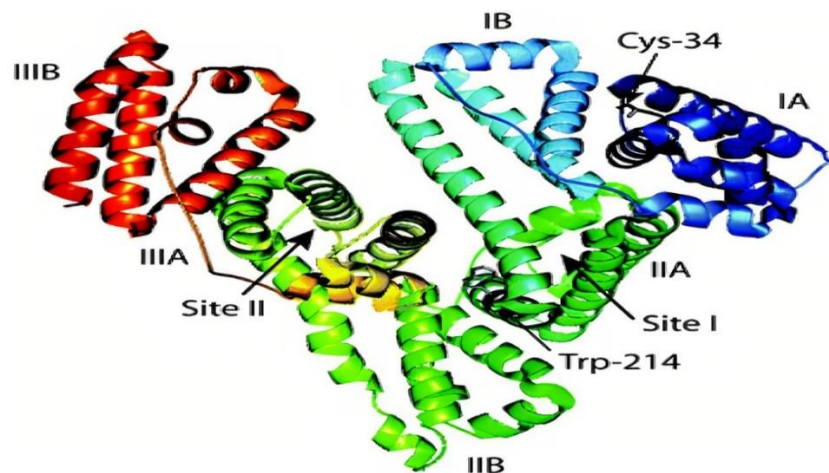


Figure 18/ structure de l'albumine [46].

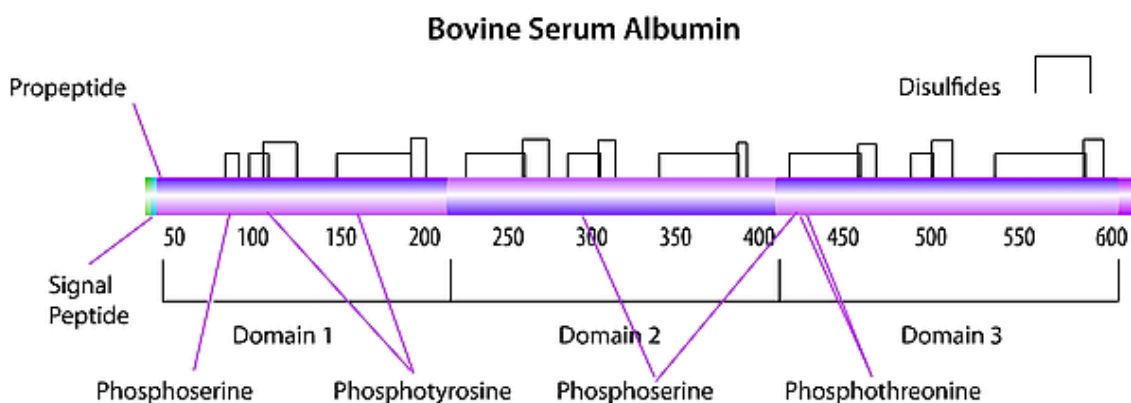
L'albumine, qui tire son nom du latin "Albus" signifiant blanc, est la protéine plasmatique la plus abondante, représentant environ 60% des protéines totales. Elle est synthétisée par les cellules du foie [97] et circule dans le sang pendant environ 27 jours avant d'être éliminée[98]. On la trouve chez l'homme (HSA) ainsi que chez les mammifères (BSA). Dans ce chapitre, nous concentrerons nos études uniquement sur la BSA.

La BSA remplit diverses fonctions essentielles dans l'organisme grâce à la présence de plusieurs sites de fixation à affinités variables à sa surface. Elle se lie à différentes molécules qu'elle transporte, ce qui en fait une protéine de transport et de fixation importante. De plus,

elle joue un rôle clé dans le maintien de la pression colloïdale osmotique, qui est nécessaire pour une distribution adéquate des fluides corporels entre les compartiments intracellulaires et les tissus [99].

b) Séquence de la BSA

La structure primaire de l'albumine varie selon l'espèce considérée, mais pour la BSA, elle est composée d'environ 583 à 585 acides aminés. Parmi ceux-ci, 35 sont des résidus de cystéine qui participent à la formation de 17 ponts disulfures à l'intérieur des segments d'hélices alpha. La composition en acides aminés de la BSA a été publiée pour la première fois par J.R. Brown dans les années 1975 [100], puis révisée en 1990 par Hirayama et al. La BSA est constituée de trois domaines (I, II et III) divisés en deux sous-domaines (A et B).



On distingue également six hélices alpha qui forment les trois domaines homologues, ainsi que deux résidus de tryptophane : Trp-134, situé près de la surface de la protéine dans un environnement hydrophile, et Trp-212, situé dans un environnement hydrophobe.

La BSA a la capacité de se lier aux acides gras libres, aux lipides et à d'autres composés aromatiques, ce qui peut affecter sa dénaturation thermique. Elle joue également un rôle dans l'oxydation des lipides et contribue au maintien du pH sanguin. La masse volumique de la BSA en solution aqueuse varie en fonction du pH. À pH 2, elle est de 1,406 g/cm³, tandis qu'à pH 7, elle est de 1,360 g/cm³. Son point isoélectrique, qui correspond au pH où sa charge nette est nulle, se situe entre 4,7 et 4,9 en solution aqueuse à 25 °C.

L'étude de l'organisation des protéines globulaires permet de mieux comprendre les interactions non-covalentes qui jouent un rôle essentiel dans leur stabilisation. Ces protéines s'organisent de manière à enfouir leurs résidus hydrophobes à l'intérieur de leur structure et à exposer leurs résidus polaires en surface (Kauzmann, W.) [101]. Depuis la publication de l'article de Kauzmann, il existe un consensus sur l'importance de l'interaction hydrophobe dans la stabilité et le repliement des protéines globulaires [102,104]. De nombreux paramètres environnementaux influencent la dynamique des protéines. Le prochain paragraphe décrit brièvement les effets de l'environnement sur la BSA, en particulier les différentes transformations subies par la BSA lorsqu'elle est adsorbée.

I) Caractérisation de la structure primaire

Nous présenterons dans ce paragraphe une brève description de l'état de la BSA sur les surfaces métalliques puis les résultats obtenus lors de nos expériences avant de conclure.

a) Etat de l'art

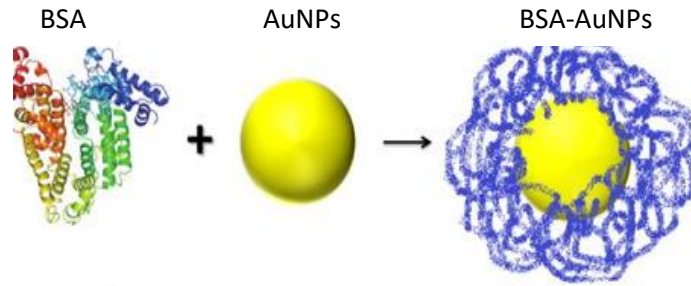


Figure 19/ formation de la couronne biomoléculaire issue de l'interaction entre protéine et nanoparticules [105].

Lorsque les nanoparticules sont en contact avec un milieu biologique, il se forme à leur surface une couche de protéine appelée « corona ». La formation de cette dernière est le résultat de plusieurs effets, tels que les interactions de Van Der Waals, les interactions électrostatiques et les effets hydrophobes [105–107]. En général, les protéines s'adsorbent soit fortement, soit faiblement à la surface de la nanoparticule [108-109].

Il existe deux mécanismes de formation de la couronne biomoléculaire : La "couronne dure" et la "couronne molle" [110]. La couronne dure est composée de biomolécules qui sont directement et fortement liées à la surface des nanoparticules, tandis que la couronne molle est composée de biomolécules qui sont soit faiblement liées à la surface, soit liées à la couronne dure via des interactions faibles. La stabilité du complexe biomolécule-nanoparticule est déterminée par l'énergie libre de Gibbs. Plus l'énergie est élevée, moins la probabilité de rupture du complexe est élevée, et vice versa.

De nombreux chercheurs, notamment Langmuir et Norde, ont mené des recherches sur l'adsorption des protéines sur des surfaces. Selon leurs travaux, l'adsorption dépend à la fois du point isoélectrique et de la stabilité structurale de la protéine, ainsi que de l'hydrophobicité de la surface [38,111,122-123].

Les surfaces chargées favorisent la formation de liaisons électrostatiques et ont tendance à former des complexes plus stables avec les biomolécules que les surfaces neutres. De même, les nanoparticules hydrophobes favorisent l'adsorption de biomolécules à leur surface en libérant les molécules d'eau à l'interface.

Après l'adsorption, la protéine subit des changements dans sa structure et son activité lorsqu'elle entre en contact avec les nanoparticules, ce qui lui confère une nouvelle identité. Le degré de modifications conformationnelles des protéines adsorbées est influencé par plusieurs paramètres notamment les propriétés de surface des nanoparticules [108] et le rayon de courbure [111].

Acides aminés	Fréquence Raman (cm ⁻¹)	Hydrophobicité	Polarité
Acide aspartique	747 779 871 939 1082 1261 1338 1425		X
Cystéine	499 678 764 787 860 932 1343 1414		X
Acide glutamique	530 764 871 915 1079 1115 1342 1419		X
Leucine	728 852 890 962 1135 1342 1419	X	
Lysine	779 849 1064 1139 1321 1360 1414 1447		X
Méthionine	653 700 723 755 875 970 1261 1343 1428	X	
Phénylalanine	618 750 821 1005 1032 1210 1589 1607	X	
Tryptophane	339 354 759 879 1013 1344 1363 1430 1463 1554 865	X	

Tableau 5/ Fréquences Raman des acides aminés et leur hydrophobicité.[112][49]

Une fois adsorbées, les protéines s'étalent sur la surface, augmentant ainsi leur surface d'interaction. La structure de la protéine adsorbée évolue cinétiquement dès le premier contact jusqu'à ce qu'elle s'étale complètement sur la surface, ce qui entraîne une grande hétérogénéité des conformations. Pour comprendre ces changements de conformation, il est nécessaire d'examiner le type de liaison formé lors de l'adsorption de la protéine sur la nanoparticule.

La BSA se lie à la surface par le biais du soufre (liaison thiol) et de certains acides aminés présents dans sa structure moléculaire. Ainsi, on peut identifier une bande de liaison spécifique à cette adsorption sur le spectre de diffusion de la protéine.

La liaison thiol-or peut être observée par la bande de vibration centrée à 385 cm⁻¹ [113].

Certains de ces acides aminés sont aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine, tandis que d'autres contiennent du soufre comme la méthionine et la cystéine. Cependant, il existe des acides aminés majoritaires, ou ayant une probabilité de présence élevée, tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, la lysine et la leucine [115] (Tableau 5). À pH 7, la lysine (un acide aminé polaire) est l'acide aminé le plus fréquemment détecté. Cependant, à pH 4.5, on observe une augmentation de la présence du tryptophane (un acide aminé hydrophobe) par rapport à la lysine. À pH 2, le spectre change complètement, seuls les acides aminés hydrophobes tels que la leucine et la méthionine sont détectés. Ces acides aminés hydrophobes se trouvent normalement à l'intérieur de la structure native de la protéine, ce qui suggère que la protéine est étalée sur la surface et proche de la dénaturation [115].

b) Effets de l'environnement sur la BSA

pH de transition	2,7	4,3	8
Forme isomérique	E	↔ F	↔ N
NOM	EXPANDED	FAST	NORMAL
% d'hélices α	35	45	55
Charge globale*	+100	+99	-18

Tableau 6/ effet du pH sur les formes isomériques de l'albumine de sérum. *Charge globale calculée d'après la composition et les Pka des chaînes latérales des acides aminés ; (+) correspond à une charge positive, (-) correspond à une charge négative [114].

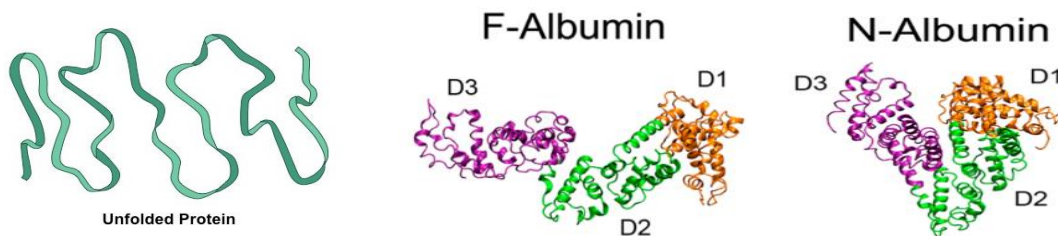


Figure 20/ structures des formes isomériques de la BSA.

L'adsorption d'une protéine sur une surface est surtout influencée par les variations de température et de pH. Il semble que la concentration exerce également une influence. Néanmoins l'adsorption de la BSA est réversible uniquement à de faibles concentrations de protéines [106].

Le pH joue un rôle crucial dans l'adsorption de la BSA. Le maximum de molécules de BSA s'adsorbe à un pH de 4.6, qui est proche de son point isoélectrique où la charge nette des macromolécules est nulle. En solution, la BSA existe sous différentes formes isomériques dépendant du pH. La forme normale (N) est prédominante dans une plage de pH allant de 4.5 à 7. Entre les pH 4.5 et 4.0, il y a une transition de la forme N vers la forme F (Normal-Fast ; F : Fast migrating) qui se produit de manière brusque pour un pH inférieur à 4.0. Lorsque le pH est inférieur à 3.5, une autre forme appelée E (Expand) apparaît [105]. La transition de la forme N à la forme F entraîne une diminution du contenu de la structure secondaire de la BSA. Sous sa forme N, l'albumine présente une structure compacte en forme de cœur, tandis que sous sa forme F, elle devient partiellement ouverte [105].

La température peut avoir plusieurs effets sur la BSA notamment la dénaturation lorsqu'elle est exposée à des hautes températures. Cette dénaturation est liée à des changements structuraux pouvant entraîner une perte de fonctionnalité de la protéine ; les hautes températures sont également responsables du phénomène d'agrégation qui lui entraîne généralement une diminution de la solubilité de la protéine ainsi qu'une altération de ses propriétés.

II) Caractérisation des structures primaires : nos résultats

a) Protocole expérimental

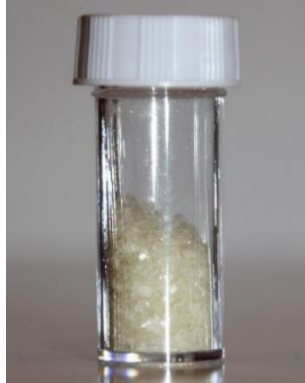


Figure 21/ BSA en poudre de poids moléculaire 66 KDa provenant de Sigma Aldrich.

Pour nos expériences, nous avons utilisé de l'albumine sérique bovine (BSA) d'un poids moléculaire de 66 kDa, provenant de Sigma Aldrich. Nous avons préparé des solutions de PBS (mélange de NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) à différentes valeurs de pH. Les différents niveaux d'acidité ont été obtenus en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Les conditions environnementales ont été variées : huit conditions de pH ont été sélectionnées, allant du pH 2 (dénaturation de la protéine) au pH 7,6 (pH physiologique [99]). Les températures ont été variées de 22 °C à 55 °C (correspondant à la température de dénaturation [100]).

Les concentrations de BSA ont été ajustées pour être dans le régime de la molécule unique. Ce régime permet d'apprécier les fluctuations de signal issues d'une seule molécule et de supprimer les effets de moyennes généralement présents lorsqu'un grand nombre de molécules est sondées simultanément. Notre premier objectif a été d'enregistrer la signature spectrale de la protéine.

b) Résultats

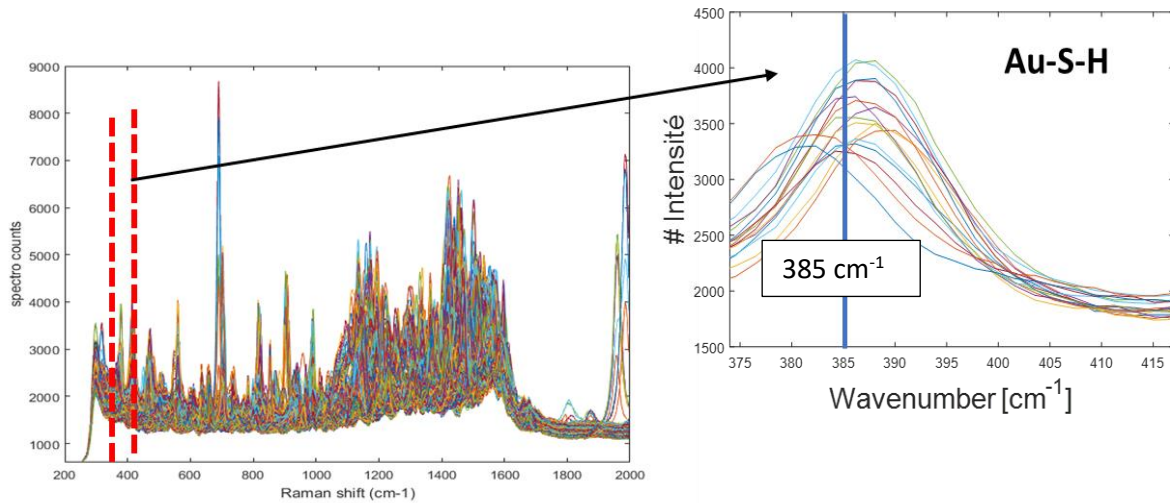


Figure 22/ 600 spectres bruts de la BSA à pH 7.6 et température 22°C avec zoom sur la bande Raman d'interaction entre protéine et nanoparticules. Nous avons sélectionné 15 spectres les plus intenses pour montrer la raie Raman correspondante à l'interaction de la liaison or avec les thiols de la protéine.

La Figure 22 présente un ensemble de 600 spectres de BSA obtenus à pH 7 et à une température de 22°C. Les vibrations des différentes molécules de la BSA, capturées par notre dispositif optique, s'étendent sur une plage de fréquences Raman allant de 260 à 2000 cm^{-1} . Chaque vibration est associée soit à un acide aminé spécifique, soit à l'interaction entre la protéine et la surface nanostructurée, soit à un mode de vibration propre à la molécule.

Notre premier résultat concerne la présence de la raie à 385cm^{-1} caractéristique de la liaison thiol ; la position de cette raie est indépendante des conditions environnementales. Nous retrouvons également les acides aminés à certaines positions (**voir valeurs marquées en gras dans le Tableau 5**) comme mentionné dans le Tableau 5.

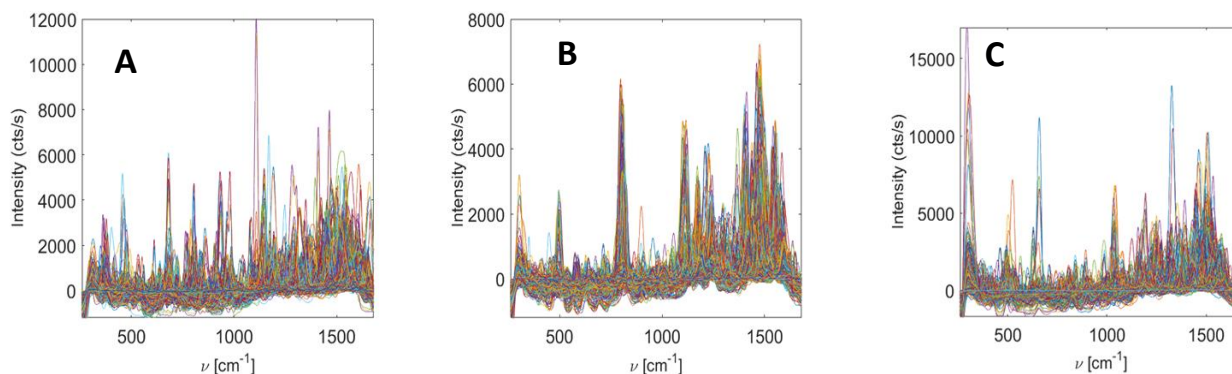


Figure 23/ spectres bruts de la BSA à une température de 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3.

La Figure 23 présente les spectres SERS de la BSA diluée dans du PBS pour environ 3000 spectres pour trois pH (7,6, 4,5 et 3) dans la plage de 260 à 1680 cm^{-1} . Bien que la plage spectrale de 260 cm^{-1} à 1200 cm^{-1} , reconnue pour ses faibles énergies, soit plus sensible à l'environnement (température, pH), la densité spectrale semble plus élevée entre 1100 et 1600 cm^{-1} .

À une échelle macroscopique, nous observons une grande fluctuation spectrale à pH 7,6 (Figure 23A) avec de nombreuses raies. Le pic très intense à 760 cm^{-1} est attribué à l'acide aspartique, l'un des acides aminés hydrophiles présents à la surface de la BSA. La raie d'intensité élevée à 1050 cm^{-1} est associée au tryptophane.

La Figure 23B présente l'accumulation des spectres de la BSA à pH 4,5. Une seule bande dominante apparaît à 1486 cm^{-1} (correspondant à la vibration de la liaison C-C généralement utilisé comme marqueur de la conformation des protéines). Les spectres semblent moins fluctuants qu'à pH 7,6. Seules les bandes à 865 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} attribuées respectivement au tryptophane et à la phénylalanine fluctuent en intensité. Ainsi donc, les acides aminés hydrophobes sont plus sensibles que les acides aminés hydrophiles au point isoélectrique.

L'analyse spectrale à pH 3 (Figure 23C) révèle la présence de plusieurs raies entre 260 et 1000 cm^{-1} , dont la raie la plus intense se situe autour de 653 cm^{-1} associée à la méthionine qui est un acide aminé hydrophobe.

c) Nos conclusions

Nous pouvons en conclure que lorsque les protéines et la surface présentent la même charge électrique, la répulsion électrostatique est masquée par la perte de structure de la protéine. En revanche, lorsque les charges sont opposées, une interaction électrostatique entre la protéine et la surface se produit.

D'un point de vue électrostatique, en tenant compte du point isoélectrique de la protéine et de la surface de l'or, on peut expliquer ces interactions. Le point isoélectrique de la BSA est de 4,7, ce qui indique que, en dessous de cette valeur, la charge électrique de la protéine est positive. Nos nanoparticules d'or (NPs) ont été stabilisées par les citrates, coloré en bleu dans cette étude et de charge négative.

Par conséquent, la protéine native en forme de cœur est repoussée par le surfactant citrate. En effet, nous supposons que le citrate est remplacé par la BSA. À pH physiologique, la BSA se lie à l'or par l'intermédiaire du groupe thiol et de la lysine.

La situation est similaire au pH le plus bas (pH 2). La protéine est attirée électrostatiquement par les citrates, et la liaison est assurée par le groupe thiol. Étant donné que la protéine est dénaturée, elle devient hydrophobe et préfère se lier à la surface de l'or plutôt que de rester en solution.

La situation intermédiaire, dans laquelle la protéine adopte une forme en cigare, est la plus complexe, car l'agent citrate peut agir comme un pont électrostatique entre la protéine et l'or. Cela explique la réduction observée de la participation des liaisons thiol. L'orientation de la protéine dans ce cas n'est plus fixe, ce qui favorise la détection d'acides aminés rares, tels que le tryptophane, dont la section Raman est plus prononcée.

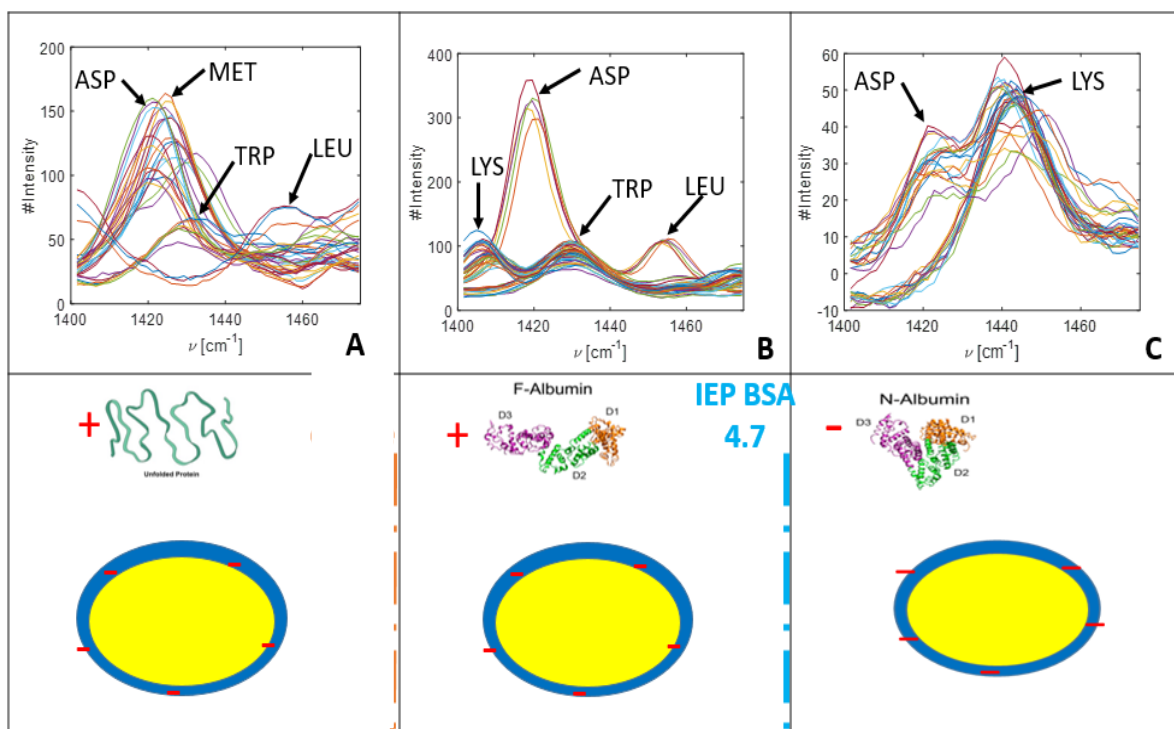


Tableau 7/ représentation des acides aminés observés dans les spectres de la BSA lors de l'adsorption sur les nanoparticules d'or : A) pH 2 B) pH 4,5 C) pH 7,6.

IV) Caractérisation de la structure secondaire

Dans cette partie, nous présenterons des méthodes pour déterminer les conformations (hélices, feuillettes et structures aléatoires) de la structure secondaire. Tout d'abord, nous examinerons les méthodes existantes décrites dans la littérature. Nous décrirons quelles seront les amides I, II et III les plus intéressantes pour déterminer les trois principales conformations observées dans la structure de la BSA : normale à pH 7 en forme de cigare à pH 4,5 et dénaturée à pH 3. Pour cela, nous présenterons successivement deux méthodes d'analyse pour évaluer les populations de spectres et trier les conformations par PCA.

Dans la section suivante, nous entreprendrons une recherche des rapports de population entre les hélices et les feuillets, afin d'effectuer une analyse plus détaillée. Notre objectif sera de caractériser la fonction de distribution de probabilité (PDF) des fenêtres Raman spécifiques à l'intérieur des bandes amides I et III.

Une première approche consistera à ajuster le spectre moyen accumulé sur une longue période. Ensuite, dans la dernière section, nous présenterons notre propre méthode d'analyse, qui permet de conserver les informations sur les fluctuations des spectres individuels.

A) Quelques méthodes Bibliographiques

Techniques	Méthodes de calcul de la teneur en conformations de la structure secondaire	Teneur en conformation	Conditions expérimentales	Références
SERS	Décompte du nombre de structure par spectre	α (1268-1300 cm^{-1}) β (1228-1231 cm^{-1}) alpha et random (1255-1265 cm^{-1}) β et random (1231-1250 cm^{-1}) pH7 : α (57%) 2% α et random (21%) β et random (19%) pH 3: α (44%) 8% α et random (0%) β et random (26%)	1.5 μM ; 785nm ;AuNPs ; PBS 1 μM ; AgNPs ; PBS SDS ; AuNPs(20nm) ; 785nm ; 2M	[115]
	Aire sous les histogramme construit à partir de 50 spectres;	α (1650-1657 cm^{-1}) β (1662-1665 cm^{-1}) random (autour de 1671 cm^{-1}) α (66,5%) β (9,5%) random (24,1%)	AuNPs(56,9nm)	[116]
	Fit par des gaussiennes	α (1655 cm^{-1}) β - parallel(1617 cm^{-1}) β - antiparallel(1670 cm^{-1}) random (1639 cm^{-1}) βT (1688 cm^{-1}) α (62%) β -parallel (11%) β -antiparallel	Résulta jour1	[117]

		(8%) random (9%) β T (10%) α (31%) β -parallel (13%) β -antiparallel (19%) random (13%) β T (24%)	Résultat jour40	
CD + NPs	algorithme de déconvolution K2D fit par la dérivée seconde ; %=-MRE(208)-4000/33000-4000 MRE=Intensité du pic CD/ 10Cnl C : concentration n : nombre de résidu(583) ; l :long de la cuve	α : 60%; β :0.07% random 0.33% α (0.3%) β (0.18%) random (0.52%) [AgNPs]: 2.10-11M; α : 54,67% [AgNPs]: 6.10-11M; α : 53,11% [AgNPs]: 2.10-10M; α : 49,85%	Epaisseur de la cuve : 0.05mm ; 2M ; AuNPs Résultat jour1 Résultat jour 40	[117]
		α : 47%; [CuNPs]: 7.34.10-10M	PBS ; pH 7 ; 25°C ; 10-4M ; 15 μ M ; eau distillée ; cuve 1cm	[118]
		α : 47,6%; β :20,4%; β T: 5,5%; random:26,5% [MnNPs]: 2.10-8M	Tris-Hcl ; pH 7.4 ; μ M ; 25°C	[120]
	second dérivative et MRE	[MnO ₂ NPs]: 0M; α : 64% [MnO ₂ NPs]: 2.10-3M; α : 56%	2 μ M de BSA;	[118]

	Second dérivée et MRE Méthode Bestel	[MnO ₂ NPs]: 1.5.10-2M; α : 54% [MnO ₂ NPs]: 0.2M; α : 47% α : 51-52.6% α :45,1-47,5% β : 4.8-5.1%		[121]
Raman	Décompte du nombre de résidu	α (1260-1300 cm ⁻¹) β (1230-1235 cm ⁻¹) random (1240-1250 cm ⁻¹) α (55-60%) β (0%) random (40-45%)	mM ; 150mW ; expo time : 2s 488nm; largeur du pic 5cm-1. pH 7 ; PBS	[122]
	décompte des spectres en fonction des structures ; Moyenne sur 10 spectres	α (1658 cm ⁻¹) β () random () pH 7: 60% 15% random (25%) pH 5: α (65%) β (5%) random (30%) pH 9: α (50%) β (20%) random (30%)	SDS ; mM ; 488nm	[123]
FTIR	autodéconvolution de fourier	α (1295-1330 cm ⁻¹) β (1220-1250 cm ⁻¹) random (1250-1270 cm ⁻¹) β T(1270-1295 cm ⁻¹) 51% 18% 31%(random + β T)	pH 7.2; mM; demi largeur de la bande 20cm-1	[124]
	dérivée seconde et calcul d'aire sous les gaussiennes	α (1657 cm ⁻¹) β () random () β T(1683 cm ⁻¹) 53% β (14%) random (4%) β T (8%)	g/L ; 512 scans	[125]
		α (1650-1658 cm ⁻¹) β -parallel(1613-1625	25°C ; 10-2M ; largeur des pics à	[126]

	dérivée seconde avec 7gaussiennes plus aire des pics ;	cm^{-1} β -antiparallel(1675-1695 cm^{-1}) random (1637-1645 cm^{-1}) β T (1666-1673 cm^{-1}) Hélice solvated(1625-1637 cm^{-1}) 59.76% β -parallel (2.08) β -antiparallel (4.4%) random (13.45%) β T (10.12%) Hélice solvated (10.14%)	mis hauteur : 13-18% ; pH 7 Tris-Hcl ;	
	dérivée seconde et aire sous les gaussiennes	α (1649-1660 cm^{-1}) β (1614-1638 cm^{-1}) random (1640-1648) β T(1660-1680 cm^{-1}) β -antiparallel(1680-1692 cm^{-1}) α (41,5%) β (20,9%) random (1%) β T(0%) β -antiparallel (4.2%)	PBS ; pH 7 ; μ M ;	[127]
		α (25.3%) β (26.6%) random (1.9%) β T(0%) β -antiparallel (11.4%)	Ajout AuNPs de 13nm	
CD	Program SELCON3 : algorithme de décomposition des valeurs singulières (SVD)	α β random β T α (46.7%) β (0.4%) random (26.3%) β T(16.3%)	25°C ; μ M	[100]
	program Dicroweb software package	α β random β T α (68-34%) β (5-12%) random (19-25%) β T(8-15%)	Température(20-90°C) ; PBS mM ; pH 7 ;	[128]
		α β random β T		[129] [130]

	Dérivée seconde et aire des gaussiennes	α (67%) random β T(10%)	β (0%) (23%)		
	Dérivée seconde et aire des gaussiennes	α α (54%) Nd	β β (18%) Nd		[120]
		α β T α (55.5%) random β T(6.7%)	β random β (7.6%) (30.2%)		[119]
x-ray		α α (68%) random (14%)	β β (18%)		[100]

Tableau 8/ récapitulatif des différentes méthodes expérimentales issues de la littérature ainsi que des teneurs en conformations de la structure secondaire fournies par chaque méthode.

Plusieurs méthodes éprouvées sont utilisées pour déterminer la structure secondaire des protéines en solution. Parmi les méthodes les plus couramment utilisées, on trouve la résonance magnétique nucléaire (RMN), le dichroïsme circulaire, l'infrarouge (IR), le Raman classique et la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). Les incertitudes observées lors de la détermination de ces structures résultent de la combinaison des incertitudes expérimentales et de la déconvolution des spectres à partir des bandes ou des structures protéiques connues.

Il convient de noter que le pourcentage de structure secondaire peut varier en fonction de la méthode utilisée. Plusieurs facteurs peuvent influencer le taux de structures secondaires dans une protéine. Bien que le milieu environnemental lui-même ne soit pas un facteur déterminant, sa nature (acide, basique, neutre) revêt une grande importance.

Nous présentons ici un tableau récapitulatif de quelques méthodes ayant permis de déterminer le taux de structures secondaires de la BSA. Dans ce tableau, il est remarqué que dans un milieu basique et sous forme cristallisée, la diffraction par rayons X fournit un taux élevé de structures en hélice. Ce taux est également observé lors de l'étude de l'interface solide-liquide par le dichroïsme circulaire, pour des concentrations élevées de l'ordre du milli-molaire.

Après l'adsorption de la protéine sur les nanoparticules, on observe une diversité des méthodes expérimentales. Tout d'abord, le dichroïsme circulaire, qui est la méthode la plus couramment utilisée, montre que les analyses sont principalement réalisées à pH 7 et à température ambiante. Pour cette méthode, l'influence de la concentration des nanoparticules sur la structure secondaire est mise en évidence. En réalité, la nature des nanoparticules n'a pas un impact significatif comparé à leur concentration. Plus la concentration est faible, plus le taux de structures en hélice est élevé. Il convient de noter que ce taux est calculé en moyennant cinquante spectres de BSA acquis pour une concentration en protéine de l'ordre du micro-

molaire, et la méthode de calcul peut être basée sur la déconvolution de la structure secondaire à l'aide de dérivées secondes ou sur le décompte du nombre de résidus.

La deuxième méthode est la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). Le principal défi rencontré ici est l'attribution des raies aux différentes conformations de la structure secondaire. Les chercheurs s'accordent sur la nature des vibrations dans la bande amide III, mais la bande amide I semble plus complexe. C'est pourquoi les expériences de calcul sont souvent axées sur l'amide III. Il a été démontré que la nature des nanoparticules n'influe pas significativement sur les résultats. Cependant, l'acidité du milieu environnemental semble exercer une influence sur le taux de structures.

Pour déterminer les proportions de sous-structures secondaires, en particulier la proportion des hélices α par rapport à l'ensemble des sous-structures, nous avons développé et appliqués trois traitements du signal. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients, que nous présenterons successivement.

Dans la partie suivante, nous introduisons les différentes bandes amides caractéristiques de la structure secondaire.

B) Les trois bandes amides

Conformations des structures secondaires	Amide I (cm^{-1})	Amide II (cm^{-1})	Amide III (cm^{-1})
Hélice α	1635-1660	1540-1550	1285-1300
Feuillet β	1660-1670	1510-1530	1230-1250
Structure aléatoire random	1670-1680		1250-1260
Beta Turn	1680-1700		1260-1285

Tableau 9/ décomposition en fréquences Raman des bandes Amide I et III. Plusieurs méthodes permettent d'estimer ces fréquences. Bien qu'elles ne s'accordent pas toujours, nous avons basé nos fréquences sur la moyenne des fréquences fournit par ces différentes méthodes [131-134].

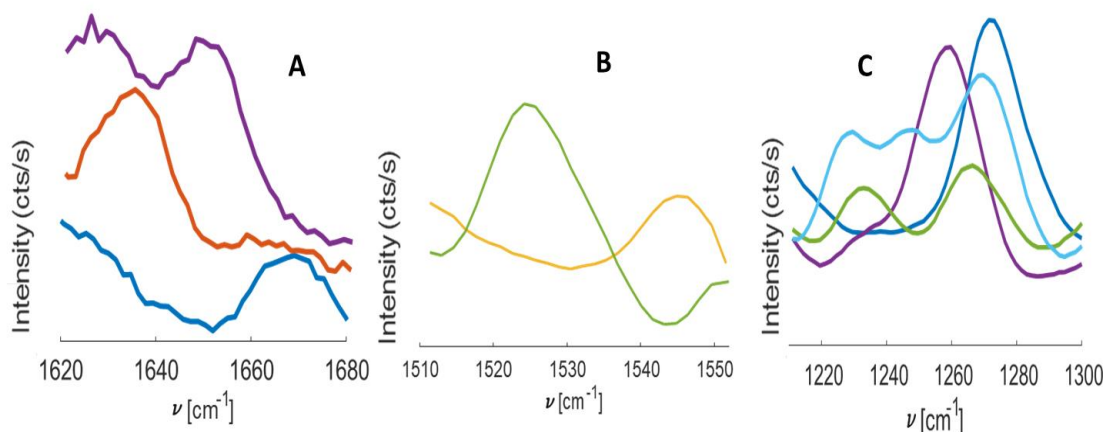


Figure 24/ sélection de quelques spectres présentant respectivement les conformations hélice, feuillet et random dans les trois bandes amides : A) amide I B) amide II C) amide III.

Les amides I, II et III sont particulièrement intéressants pour suivre la structure de la protéine, car ils fournissent une signature de la structure secondaire [58][57].

1) Bande amide I

La décomposition en fréquence Raman de la bande amide I permet d'accéder à quatre sous-structures cruciales de la structure secondaire des protéines (Figure 24A) : l'hélice α centrée à 1655 cm^{-1} est la structure secondaire la plus répandue et la plus prévisible par analyse de la séquence primaire ; le feuillet β s'étend sur une bande de fréquence allant de 1660 à 1670 cm^{-1} ; la structure aléatoire « random coil » s'étend de 1670 à 1680 cm^{-1} [119-124]. La structure aléatoire β turn comprise entre 1680 et 1700 cm^{-1} est caractéristique de l'agrégation des protéines.

2) Bande amide II

Dans la bande amide II, on retrouve les conformations en hélice et feuillet centrées respectivement aux positions 1545 cm^{-1} et 1520 cm^{-1} (Figure 24B). Cette bande bien que souvent utilisée en spectroscopie Infra rouge pour suivre les changements de conformations pouvant se produire en réponse à des facteurs tels que la liaison à un ligand, les modifications post-traductionnelles ou les interactions avec d'autres molécules intervient très peu lors des études en spectroscopie Raman.

3) Bande amide III

La même décomposition en fréquence a été effectuée dans la bande amide III, et l'attribution des différentes bandes Raman est la suivante Figure 24C) : l'hélice alpha dans la plage 1280 - 1300 cm^{-1} , le feuillet bêta dans la plage 1230 - 1250 cm^{-1} et la structure aléatoire dans la plage 1250 - 1260 cm^{-1} [125,126].

L'attribution des structures est plus complexe dans la bande amide III en raison de l'interférence avec la réponse de plusieurs acides aminés. C'est d'ailleurs dans cette bande amide III, située entre 1220 et 1300 cm^{-1} que les raies les plus fluctuantes sont observées.

Par la suite, deux méthodes seront utilisées pour l'analyse de ces structures secondaires ; nous présenterons respectivement la décomposition en densité de probabilité et la méthode d'analyse en composante principale (PCA).

Nous présentons ci-dessous les résultats obtenus à différent pH qui correspondent aux changements conformationnels observés dans la protéine. Bien que les différentes étapes de ces méthodes aient été décrites au chapitre précédent, nous présentons ci-dessous un développement de la méthode de densité de probabilité (PDF).

Le tracé des fonctions de distribution de probabilité (PDF) pour chaque température et pH a été réalisé sur un ensemble de 10 000 spectres, tous présentant au moins une conformation dans les bandes amide I ou amide III (voir annexe parties A et B).

Le programme Matlab utilisé pour tracer les fonctions gaussiennes est basé sur l'équation suivante :

$$f(x, a, b, c) = a * \exp\left(-\frac{(x-c)^2}{2*b^2}\right) \quad (14)$$

Cette équation représente une fonction gaussienne d'ordre 1, où a représente l'amplitude, b l'écart type et c la position du centre de la gaussienne. La fonction Gauss(n) est une fonction gaussienne reconnue dans Matlab, où n représente le nombre de gaussiennes nécessaires à l'ajustement, variant de 1 à 8, et les paramètres dépendent de n.

L'ajustement en série de gaussiennes a été réalisé en utilisant quatre gaussiennes pour l'amide I et sept pour l'amide III. Le nombre de gaussiennes différentes varie en fonction des fluctuations observées dans les spectres.

Pour l'amide I, l'équation suivante a été utilisée :

$$f(x, a, b, c) = a1 * \exp\left(-\frac{(x-c1)^2}{2b1^2}\right) + a2 * \exp\left(-\frac{(x-c2)^2}{2b2^2}\right) + a3 * \exp\left(-\frac{(x-c3)^2}{2b3^2}\right) + a4 * \exp\left(-\frac{(x-c4)^2}{2b4^2}\right) \quad (15)$$

Cette équation représente une fonction à 12 paramètres reconnue dans Matlab sous le nom de Gauss (4). De même, dans l'amide III, nous utilisons une fonction à 21 paramètres reconnue sous le nom de Gauss (7). Dans l'amide III, la gaussienne de couleur grise a été utilisée pour représenter la contribution des autres conformations. Cependant, elle n'a pas été prise en compte dans le calcul des ratios. Cette bande spectrale peut être attribuée à la conformation en feuillet bêta. Les paramètres de cette gaussienne ont été laissés variables afin que le programme fournisse un meilleur ajustement des points provenant de la PDF.

C) Densité de probabilité (PDF)

1) Bande amide I

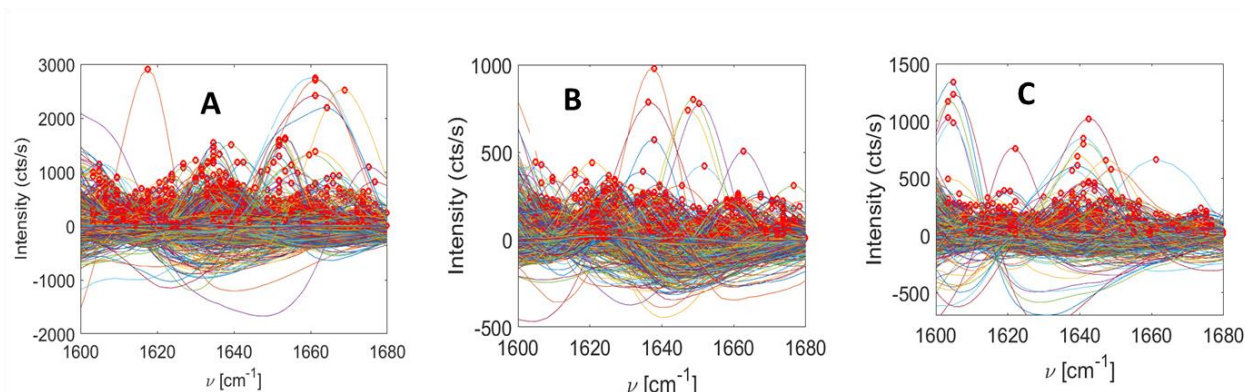


Figure 25/ zoom sur la bande amide I de 3000 spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7.6 B) pH 4.5 C) pH 3.

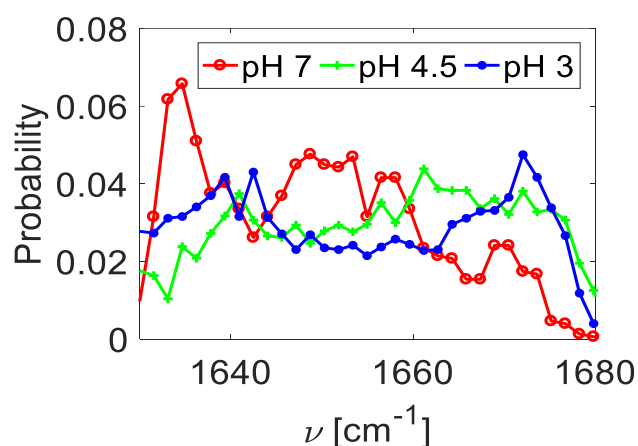


Figure 26/ densité de probabilité de 3000 spectres SERS de la BSA dans la bande amide I en fonction du pH et pour une température de 22°C : bleu : pH 3 ; vert : pH 4.5; rouge : pH 7.6.

Le zoom sur la bande amide I (Figure 25 et Figure 26) permet d'observer que la BSA a trois contributions hélicoïdales : une contribution libre majoritaire, une contribution adsorbée et une autre contribution que nous qualifierons par la suite.

Le pic majoritaire observé entre 1650 et 1660 cm^{-1} est caractéristique de la forme libre de la BSA. (Cette forme est celle de la protéine lorsqu'elle est dissociée de ses ligands ou de toute autre molécule à laquelle elle peut se lier. Dans cette forme, la BSA est complètement autonome et peut avoir des propriétés et des comportements qui diffèrent de celles de la protéine liée.)

Le deuxième pic observé à 1642 cm^{-1} , qui fluctue jusqu'à 1650 cm^{-1} , est associé à la forme adsorbée de l'hélice, correspondant à une interaction entre la protéine et les particules d'or. Ce pic est plus prononcé à pH 3, ce qui est une preuve supplémentaire d'une adsorption importante.

Un pic important entre 1635 cm^{-1} et 1640 cm^{-1} est observé. Son interprétation reste sujet à controverse. Certaines techniques d'analyse le relient au pic de l'eau solide, tandis que d'autres

suggèrent qu'il représente plutôt une autre forme d'hélice : l'hélice 3_{10} [135,136]. C'est un type de structure secondaire caractérisé par une torsion hélicoïdale plus serrée et plus courte par rapport à l'hélice α plus courante. Elle est appelée " 3_{10} " car elle implique généralement trois résidus d'acides aminés par tour, ce qui donne une répétition hélicoïdale de 10 résidus d'acides aminés. Dans le cas de l'albumine sérum bovin (BSA), l'existence et l'importance de l'hélice 3_{10} dans la BSA ne font pas consensus. Nous observons que l'intensité de ce pic diminue et qu'il s'élargit progressivement à mesure que l'acidité du milieu augmente.

La largeur des pics est associée à un mélange conformationnel des structures protéiques. Les hélices les plus stables ont une largeur de bande de 15 cm^{-1} , tandis que les autres hélices ont une largeur de 38 cm^{-1} [137].

La perte d'énergie ou le décalage vers les basses fréquences (de 10 à 15 cm^{-1}) peut s'expliquer de deux manières : d'abord, d'un point de vue chimique, par un transfert de charge entre les molécules et la surface [138] ; ensuite, par l'augmentation de l'indice optique autour de la particule, passant localement de 1.33 à 1.4, ce qui entraîne un déplacement de la résonance vers des énergies plus faibles.

Proche du point isoélectrique de la protéine et des nanoparticules, les protéines ne sont pas électrostatiquement chargées, ce qui rend difficile leur affinité avec le substrat. En effet, à ce pH, la dynamique est très différente de celle observée précédemment. Le pic à 1635 cm^{-1} est presque inexistant, et la structure hélicoïdale présente une faible contribution de la molécule libre avec des raies très larges s'étalant de 1638 à 1662 cm^{-1} . En revanche, le pic à 1640 cm^{-1} est nettement plus prononcé, ce qui montre qu'à ce pH intermédiaire, la protéine n'est effectivement pas repoussée et peut donc interagir avec la surface des nanoparticules.

Quant à la structure aléatoire, située entre 1670 et 1680 cm^{-1} , elle augmente avec l'acidité du milieu. Compte tenu des différentes attributions associées aux structures secondaires et de cette croissance de la structure aléatoire, des interrogations subsistent quant à la nature exacte de cette bande. Cette bande suscite de nombreuses interrogations : **est-elle vraiment liée à la structure désordonnée ? Le désordre est-il lié à l'agrégation protéique ?** Les réponses à ces questions seront fournies lors du calcul de la teneur en hélice, feuillet et structure aléatoire ou désordonnée.

2) Bande amide II

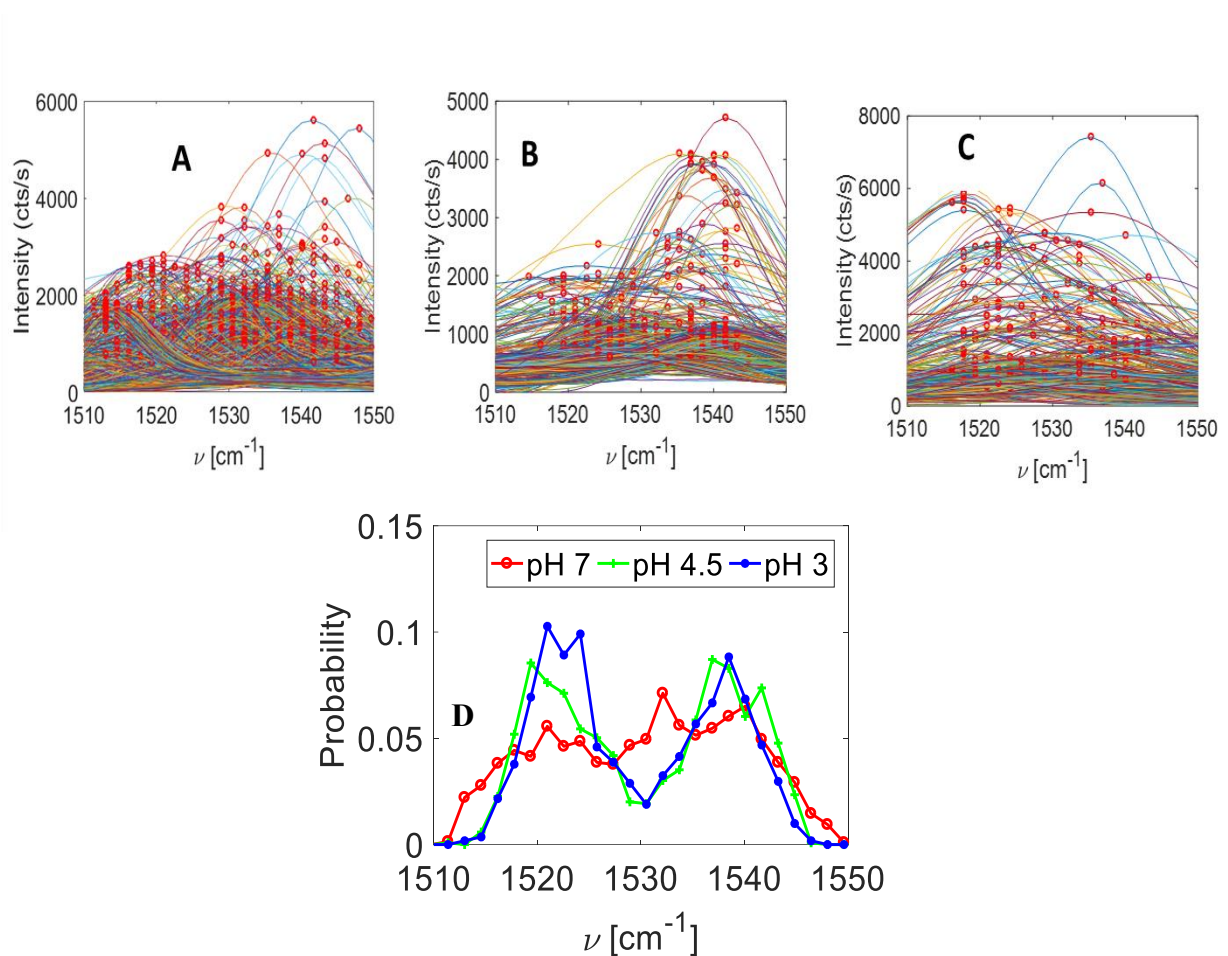


Figure 27/ zoom sur la bande amide II des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3 et D) Densité de probabilité de ces spectres SERS de la BSA dans la bande amide II en fonction du pH : bleu : pH 3 ; vert : pH 4,5 ; rouge : pH 7,6.

La Figure 27 montre qu'à pH 7 les spectres sont beaucoup plus fluctuants en position qu'en intensité.

La PDF permet d'observer les deux conformations de manière distincte. Une conformation en feuillet bien centrée autour de 1520 cm⁻¹ et une conformation en hélice centrée autour de 1540 cm⁻¹.

La bande correspondant au feuillet β est faible et représentée par un pic large caractéristique des fluctuations. Comparée au pH 7,6, les pics associés à ces feuillets observés dans les pH 4.5 et 3 sont plus fins. On observe une augmentation du nombre de feuillet lorsque le pH du milieu diminue.

La signature des hélices α est centrée à 1540 cm⁻¹ quel que soit la valeur du pH ; on observe donc ici une seule contribution de la forme hélice.

3) Bande amide III

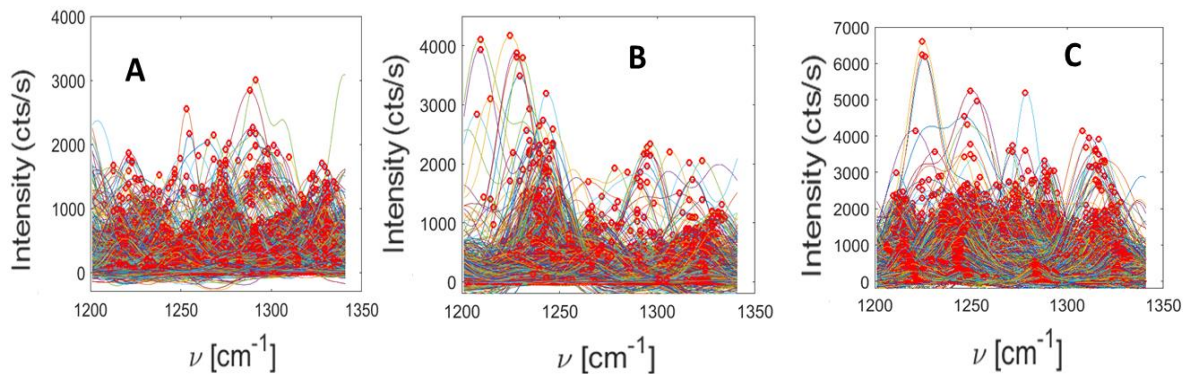


Figure 28/ zoom sur la bande amide III des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3.

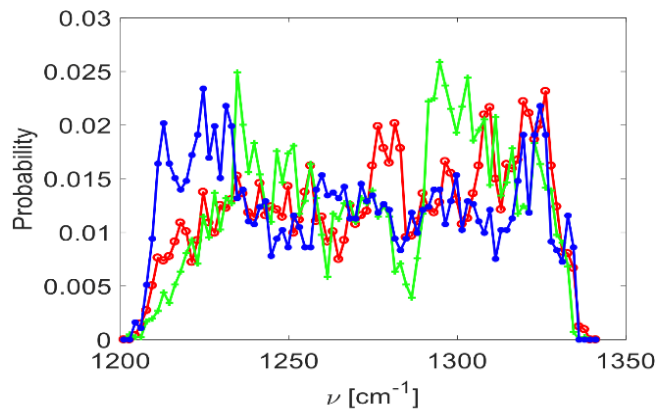


Figure 29/ densité de probabilité des précédents spectres SERS de la BSA dans la bande amide III en fonction du pH : bleu : pH 3 ; vert : pH 4,5 ; rouge : pH 7,6.

Il a longtemps été démontré que la bande amide III est une bande complexe très dépendante de la nature du champ de force, de la nature des chaînes latérales et de la liaison hydrogène. Cette complexité la rendant d'une utilité limitée pour l'extraction d'informations structurales.

La bande amide I semble moins riche en spectres que la bande amide III. Cette richesse spectrale peut être due aux effets de résonance et de la sensibilité de notre montage optique. Contrairement à la bande amide I, l'intensité spectrale dans cette amide III croît avec l'acidité du milieu. L'attribution des raies n'est pas évidente dans ce cas à cause du chevauchement et des fluctuations de raies d'où l'utilisation préférentielle de la PDF.

L'amide III semble donner une structure plus fine avec une succession de pics aigus entre 1200 et 1220 cm^{-1} qui sont caractéristique des liaisons peptidiques dans la protéine. Ces caractéristiques spectrales compliquées sont gouvernées à la fois par la contribution des chaînes latérales et par les modes des liaisons peptidiques dont la diversité est plus grande que pour les hélices.

La Figure 29 montre qu'à pH 7 la bande correspondant au feuillet β est faible comparée au pH 4,5 qui elle aussi est plus faible qu'à pH 3. Entre 1250 et 1260 cm^{-1} , Un pic de forte densité

observé à 1250 cm^{-1} est visible et plus marqué à pH 4,5 ; alors qu'il semble s'affiner à pH 7 il semble inexistant à pH 3.

La signature des hélices α ($1285\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$) à pH 7,6 est une combinaison de trois raies bien que plus marquée à 1285 cm^{-1} ; cette signature est retrouvée à pH 4,5 avec un pic large centré à 1300 cm^{-1} légèrement décalé de 5 cm^{-1} par rapport au pH 7. La finesse de ce pic observée à pH 3 semble être attribuée à une diffusion limitée par l'adsorption de la protéine.

D) Tri par les composantes principales : PCA

1) Bande amide I

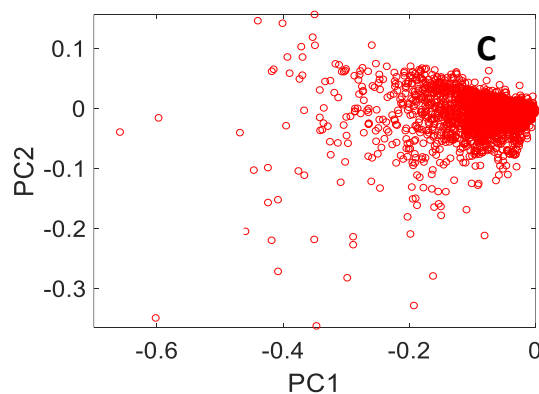
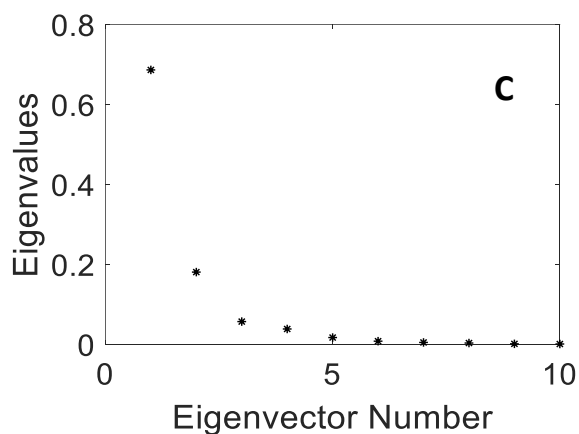
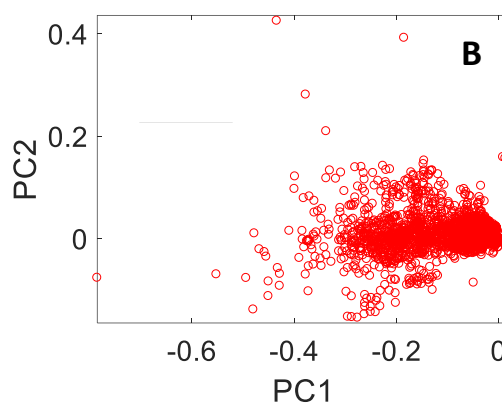
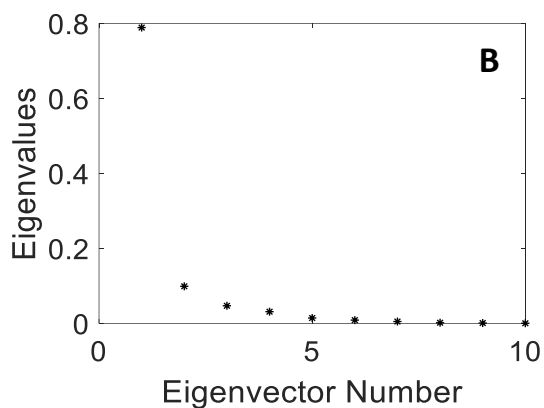
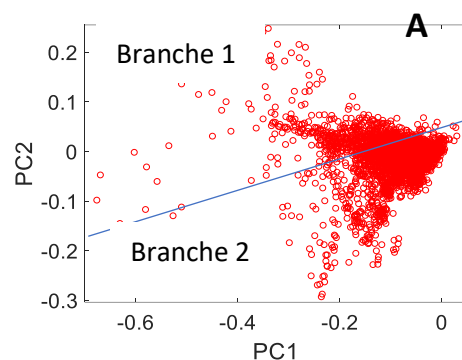
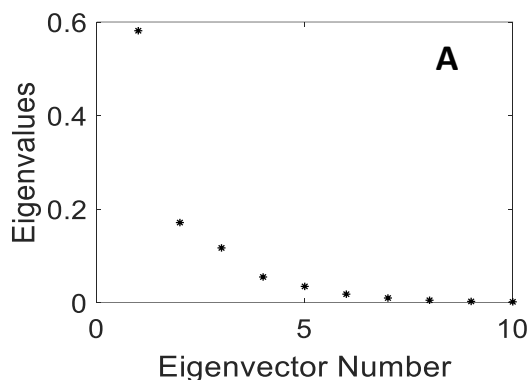


Figure 30/ contribution des valeurs propres donnée par la PCA des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C calculée sur un ensemble de 3000 spectres de la BSA dans la bande amide I et représentation 2D de cette PCA : A) pH 7 B) pH 4,5 C) pH 3.

Nous avons utilisé l'analyse en composantes principales (PCA) pour évaluer la complexité des spectres de la protéine BSA dans la bande amide I. Cette complexité est marquée par les changements de conformation de la BSA à la surface des nanoparticules. Les premières valeurs déterminées sont celles des vecteurs propres, qui permettent une meilleure description de la série spectrale.

Nous avons identifié cinq vecteurs propres correspondant à cinq valeurs propres non nulles (voir Figure 30A). Parmi ces valeurs, quatre peuvent être utilisées, car la quatrième ne représente qu'environ 5% de la variance. Nous considérerons les deux contributions supérieures à 10%. En ce qui concerne la décomposition dans l'espace 2D en utilisant les deux principales composantes principales, la Figure 30A montre que les spectres d'intensité variable sont répartis selon deux branches, qui représentent le nombre de familles présentes dans les spectres. L'amplitude des valeurs propres indique que la première composante principale représente environ 58% des données et la deuxième environ 20%. Le poids des trois dernières composantes est inférieur ou égal à 10%. Une contribution de 78% quantifie les fluctuations représentées par l'étalement des spectres dans la représentation 2D.

Dans la Figure 30B, l'amplitude des valeurs propres montre que la première composante principale représente environ 80% des données et la deuxième environ 10%. Les autres composantes ont un poids inférieur à 5% et peuvent donc être négligées. Cette forte contribution de 90% quantifie le manque de fluctuations représentées par l'accumulation des spectres dans la représentation 2D. Comparativement au pH 7, les spectres à pH 4,5 présentent moins de fluctuations et une seule famille est observée.

En ce qui concerne la Figure 30C, l'amplitude des valeurs propres montre que la première composante principale représente environ 70% des données et la deuxième environ 20%. Les autres composantes ont un poids inférieur à 5% et peuvent donc être négligées. Cette forte contribution de 90% quantifie le manque de fluctuations représentées par l'accumulation des spectres dans la représentation 2D. Comparativement au pH 7, les spectres à pH 3 présentent moins de fluctuations et une seule famille est observée. Cependant, ils fluctuent néanmoins davantage qu'à pH 4,5.

La PCA apparaît comme un premier indicateur des fluctuations ou de la complexité des spectres. Cependant, elle ne fournit pas d'informations sur la nature des structures secondaires. Nous constatons que lorsque la BSA adopte une forme globulaire (pH 7), les fluctuations sont plus importantes que lorsqu'elle s'adsorbe sur des nanoparticules. Les spectres sont moins fluctuants près du point isoélectrique (PI). L'inconvénient majeur de cette méthode est la perte d'informations liée à la dimension limitée par le nombre de valeurs propres. En raison de la linéarité des composantes principales, l'interprétation des résultats devient complexe.

2) Bande amide II

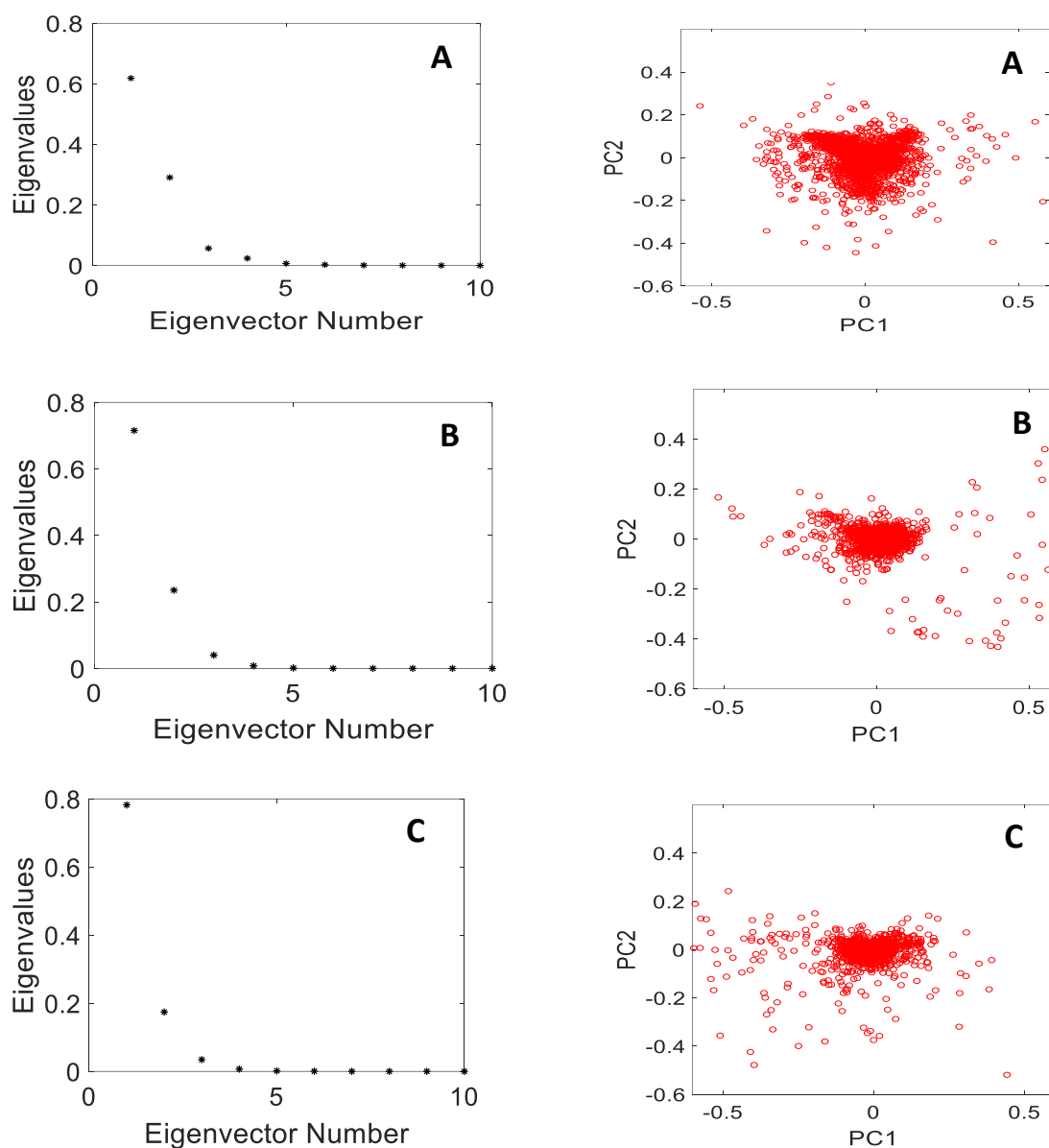


Figure 31/ contribution des valeurs propres donnée par la PCA des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C calculée sur un ensemble de 3000 spectres de la BSA dans la bande amide II et représentation 2D de cette PCA : A) pH 7 B) pH 4,5 C) pH 3.

En ce qui concerne la bande amide II, l'analyse en composantes principales (PCA) révèle les résultats suivants :

À pH 7 (voir Figure 31A), nous observons deux valeurs propres, la première représentant environ 60% de la variance et la deuxième d'environ 30%. La décomposition de ces valeurs propres dans l'espace montre une seule famille de spectres concentrée en un seul point, ce qui indique une dynamique peu fluctuante.

Aux pH 4,5 (voir Figure 31B) et pH 3 (voir Figure 31C), deux valeurs propres permettent également de décrire la dynamique spectrale. Dans ces cas, les fluctuations sont moins importantes qu'à pH 7, et les spectres sont plus étalés.

3) Bande amide III

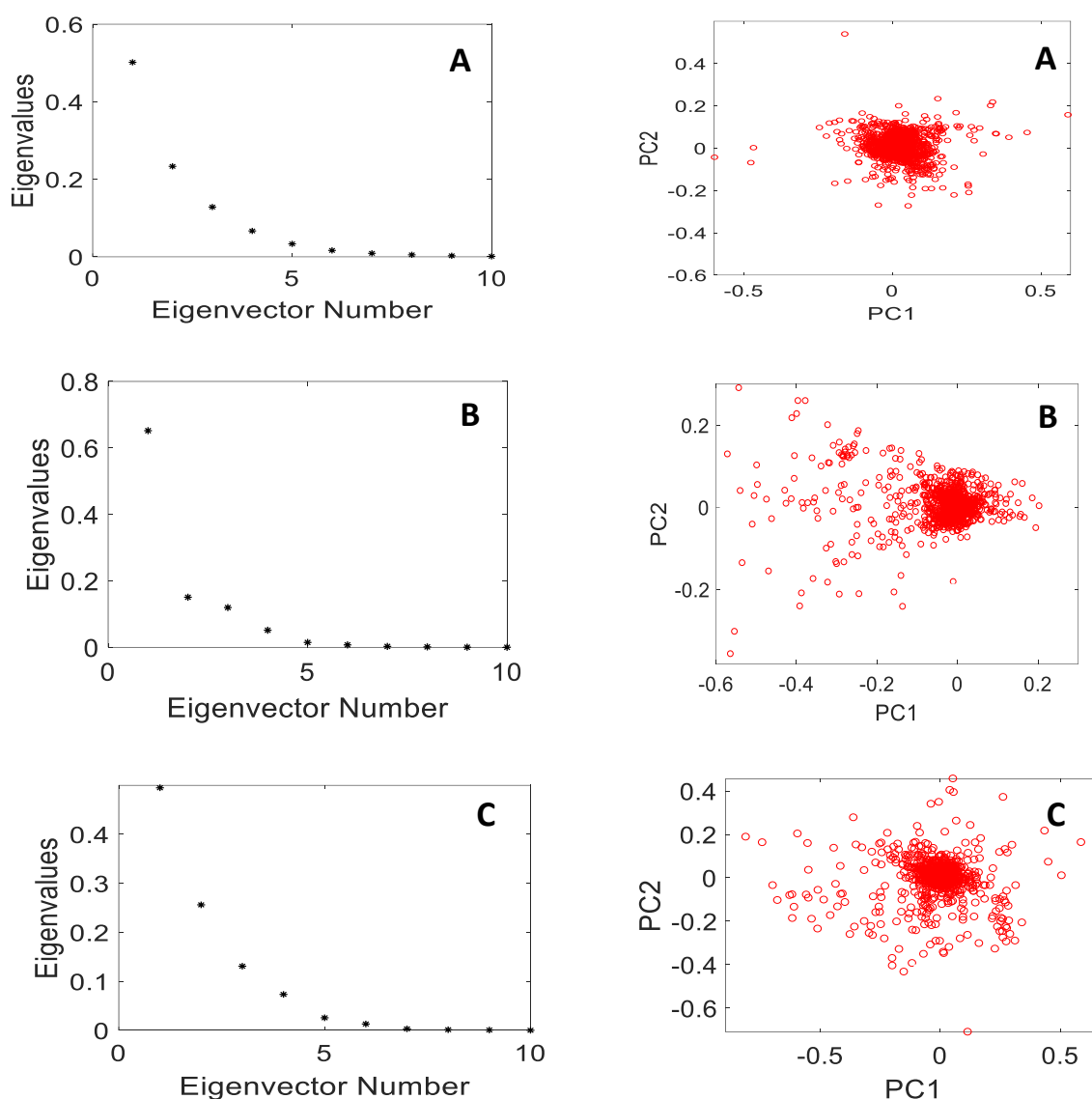


Figure 32/ contribution des valeurs propres donnée par la PCA des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C calculée sur un ensemble de 3000 spectres de la BSA dans la bande amide III et représentation 2D de cette PCA : A) pH 7 B) pH 4,5 C) pH 3.

Dans la bande amide III, la décomposition en valeurs propres révèle quatre valeurs propres non nulles : À pH 7 (voir Figure 32A), la première valeur propre contribue d'environ 50%, la deuxième contribue à hauteur de 20%, tandis que les deux autres ont une contribution inférieure ou égale à 10%. Considérant les contributions supérieures à 10%, la décomposition dans l'espace 2D montre une seule famille de spectres.

À pH 4,5 (voir Figure 32B), une seule valeur propre domine avec une contribution de 60%. Les trois autres valeurs propres ont des contributions inférieures à 20%. Les spectres présentent une intensité très peu variable et s'étalent sur une plage de 60%.

Pour le pH 3 (voir Figure 32C), la première composante contribue à 50% de la variance, la deuxième à 25%, et les deux dernières ont des contributions inférieures ou égales à 10%. Considérant les contributions supérieures à 10%, une seule famille de spectres d'intensité variable est observée.

Conclusion

En conclusion, bien que toutes ces bandes amides fournissent des informations sur la structure secondaire des protéines, en mettant l'accent sur leurs différentes conformations, nous avons remarqué une perte d'information dans la description de la bande amide II. Cette perte peut être attribuée au faible nombre de conformations de la structure secondaire observé dans cette bande. Les bandes amides I et III, étant plus corrélées, seront privilégiées dans la suite de ce manuscrit, tandis que les informations fournies par la bande amide II seront négligées. Nous avons constaté que l'utilisation de différentes méthodes de description ne permet pas à la PCA de déterminer le taux de conformations des structures secondaires. Par conséquent, nous opterons pour l'utilisation d'une méthode statistique basée sur la fonction de distribution de probabilité (PDF) afin d'obtenir une évaluation plus approfondie de la structure secondaire et de ses différentes conformations.

E) Répartition des conformations de la structure secondaire

La stabilité des protéines est déterminée par la présence et la répartition des différentes conformations de structures secondaires. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour calculer le pourcentage de chaque conformation, telles que le décompte des conformations ou le calcul de l'aire basé sur la déconvolution en série de gaussiennes. Cette déconvolution est réalisée en utilisant la largeur des bandes Raman et en se centrant sur les valeurs des pics caractéristiques de chaque conformation.

Les fréquences Raman correspondantes à chaque conformation sont dénotées par νI pour l'hélice α , νII pour le feuillet β et νIII pour la structure aléatoire. L'aire ou le nombre de structures observées par spectre est noté A . La probabilité pour une molécule de se trouver dans l'une de ces conformations est définie par la relation suivante :

$$\text{Somme} = A(\nu I) + A(\nu II) + A(\nu III) \quad (16)$$

La probabilité $P\alpha$ d'être dans l'hélice alpha est donnée par :

$$P\alpha = \frac{A(\nu I)}{\text{Somme}} \quad (17)$$

La probabilité $P\beta$ d'être dans le feuillet bêta est donnée par :

$$P\beta = \frac{A(\nu II)}{\text{Somme}} \quad (18)$$

La probabilité $Prand$ d'être dans la structure aléatoire est donnée par :

$$Prand = \frac{A(\nu III)}{\text{Somme}} \quad (19)$$

Pour chaque conformation, représentée par i de 1 à 3, $A(\nu i)$ représente l'aire de la bande amide associée à cette conformation. Afin de s'assurer que chaque molécule se trouve dans l'une de ces trois conformations, la relation suivante est établie :

$$P\alpha + P\beta + Prand = 1 \quad (20)$$

1) Etat de l'art : Spectres cumulés

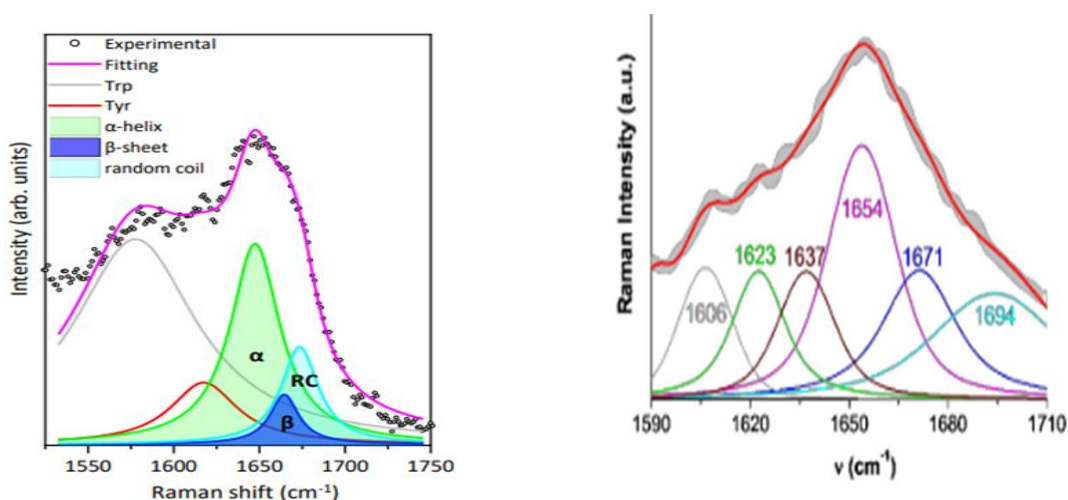


Figure 33/ décomposition en série de gaussiennes de la bande amide I des spectres SERS de la BSA issue des références [136] et [117] respectivement. Les différentes conformations de la structure secondaire y sont représentées.

La Figure 33 présente la décomposition des spectres SERS de la BSA obtenus dans différentes conditions environnementales, comme décrit dans la littérature.

La Figure 33A montre la décomposition des spectres SERS de la BSA après dilution dans une solution de PBS pour obtenir une concentration micro molaire. Les spectres ont été obtenus en mélangeant cette solution avec des nanoparticules d'argent de 70 nm de diamètre. La déconvolution est basée sur la moyenne de 50 spectres acquis pendant une durée de 30 secondes. Le pic le plus intense correspond à la structure en hélice, centré à 1650 cm^{-1} . La raie centrée à 1665 cm^{-1} correspond au feuillet bêta, tandis que la raie centrée à 1675 cm^{-1} correspond à la structure aléatoire.

La Figure 33B présente la décomposition de la moyenne de 300 spectres de la BSA, enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 785 nm et une puissance de 150 mW. La concentration de la BSA dans la solution est de l'ordre du milli molaire, et le solvant utilisé est le PBS. Le fond spectral a été corrigé et lissé à l'aide d'un programme d'analyse de spectre utilisant une fonction Stavisky-Golay avec 15 points. Les spectres ont été déconvolués en ajustant les bandes Raman de la BSA à l'aide d'une somme de fonctions de pseudo-Voigt (gaussiennes et lorentziennes, en contributions égales). Les positions et largeurs des bandes ont été contraintes dans des limites raisonnables. Dans cette déconvolution, la raie centrée à 1617 cm^{-1} a été attribuée au feuillet bêta, tandis que la raie centrée à 1639 cm^{-1} a été attribuée à la structure aléatoire. Les raies centrées à 1670 et 1688 cm^{-1} ont été attribuées aux structures "beta turn". Le pic le plus intense correspond à la structure en hélice, centré à 1654 cm^{-1} .

Dans ces deux articles, on observe que l'ajustement en série de gaussiennes ne correspond pas très bien aux pics observables, car les centres des gaussiennes correspondant aux différentes structures secondaires ne correspondent généralement à aucun pic clair. Cependant, malgré les différences dans l'attribution des raies, à l'exception de l'hélice, le calcul du taux de structure secondaire est en accord avec ceux obtenus par le Raman classique et le CD. Dans un premier temps, nous tenterons d'appliquer cette méthode de traitement des spectres pour vérifier sa concordance avec nos propres données.

2) Ajustement des pics moyens

Détermination de la répartition des conformations dans la structure secondaire de nos spectres

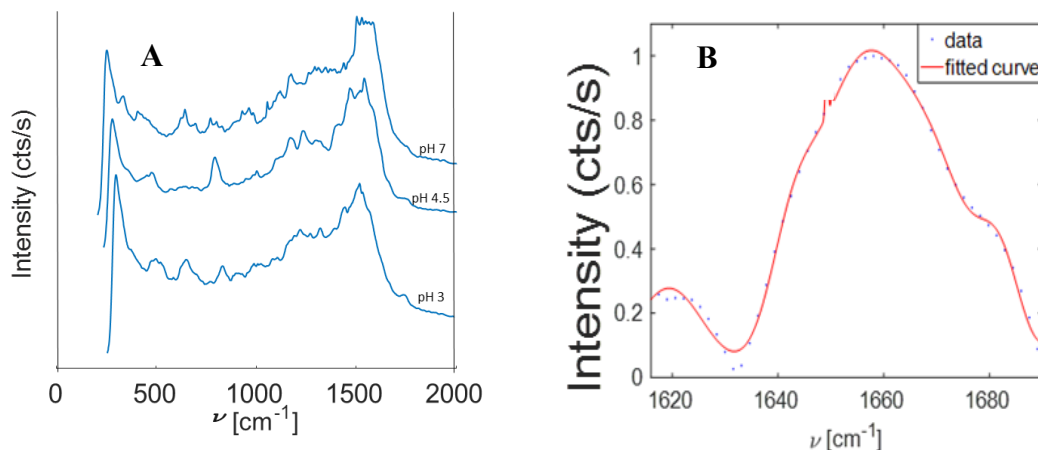


Figure 34/ A) spectre cumulé de 3000 spectres de la BSA obtenus à 22°C pour différents pH ; B) Ajustement par des gaussiennes de la somme normalisée dans la bande amide I pour le pH 7.

Sur la Figure 34A, il est évident qu'un cumul ou une somme des spectres ne permet pas de suivre les fluctuations précédemment observées. En effet, ce cumul montre des spectres pratiquement identiques pour les différentes valeurs de pH. En revanche, sur la Figure 34B, nous avons effectué un ajustement par des gaussiennes dans le but de déterminer les différents taux de structures secondaires. Malheureusement, malgré le calcul de l'aire sous les gaussiennes en utilisant les bornes issues de la référence [136], les résultats obtenus ne correspondent pas à nos attentes. Nous avons obtenu un taux de structures en hélices de 49 %, un pourcentage de structures en feuillets de 33 % et un pourcentage de structures aléatoires de 16 %. Cette méthode, bien qu'elle ait fait ses preuves dans la littérature pour quelques dizaines de spectres, ne convient donc pas au traitement de nos propres données.

Étant donné les multiples fluctuations observées dans nos spectres, une méthode plus statistique semble donc plus appropriée. L'identification du feuillet bêta et de la structure aléatoire, qui présentent des signaux faibles, conduit à des erreurs. Le choix de la méthode de calcul du taux d'hélicité a été motivé par la volonté de réduire ces erreurs.

3) Décomposition des probabilités des spectres individuels

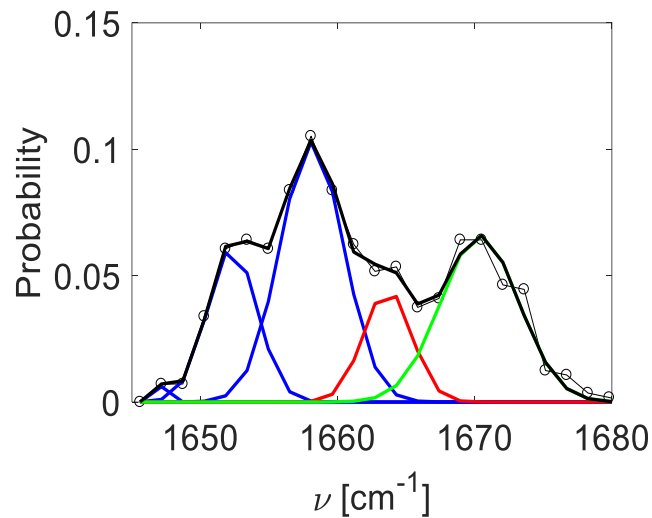


Figure 35/ décomposition en séries de Gaussiennes de la PDF des spectres individuels de la BSA obtenus à 22°C pour le pH 7 dans la bande amide I.

Les trois principales conformations sont l'hélice α (représentée en bleu), le feuillet β (représenté en rouge) et la structure aléatoire (représentée en vert).

La Figure 35 présente une déconvolution en séries de gaussiennes des spectres individuels de la BSA. Contrairement à la méthode précédente basée sur la décomposition de la moyenne cumulée des spectres, l'utilisation des spectres individuels permet une identification plus précise des fenêtres de fréquences Raman. Cette nouvelle méthode de déconvolution, plus robuste, sera donc étendue aux différents pH afin de déterminer le taux de conformation des structures secondaires.

Les différentes conformations protéiques, telles que les formes globulaires, en cigare ou dénaturées, fournissent des informations sur les différentes formes prises par les protéines, en particulier pour celles qui sont stables. Bien que l'ajustement des spectres ne soit pas nécessaire, l'élargissement des bandes présente des fluctuations qui revêtent une importance capitale pour la détermination de l'hétérogénéité statistique des hélices, des feuillets et des structures aléatoires.

4) Discussion sur les hélices non attribuées

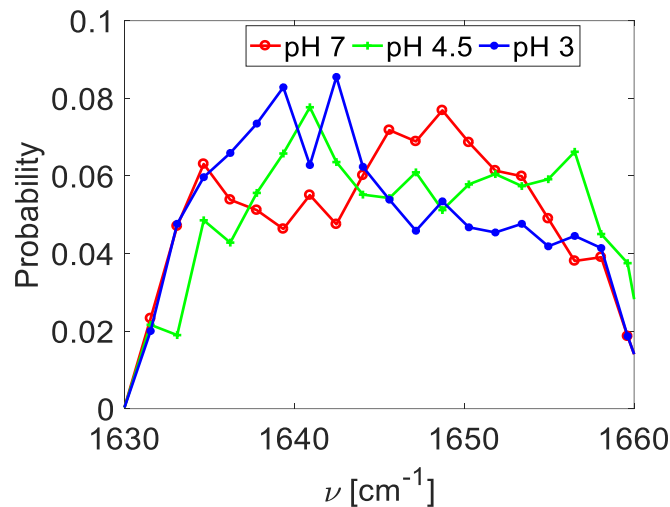


Figure 36/ zoom sur la PDF représentant les différentes formes hélices observées dans les spectres individuels de la BSA obtenus à 22°C pour les pH 7,6, 4,5 et 3 dans la bande amide I.

La figure ci-dessus représente un zoom sur la PDF de la bande caractéristique de la conformation en hélice que nous avons obtenue lors de l'acquisition des spectres de la BSA en fonction du pH.

Il apparaît que les hélices sont de natures variées dépendant de la valeur du pH à pH 7,6, nous distinguons un pic caractéristique de la forme hélice 3_{10} de l'hélice située aux alentours de 1635 cm^{-1} ; un pic large (1642-1660 cm^{-1}) représentant un mélange de conformations hélicoïdales donc l'une est l'hélice adsorbée située entre 1642 et 1650 cm^{-1} et l'autre la forme libre de l'hélice située entre 1650 et 1660 cm^{-1} .

La courbe à pH 4,5, on observe principalement deux contributions de la forme hélice : la forme hélice 3_{10} et la forme libre. Cette dernière est moins marquée que la précédente.

En ce qui concerne le pH 3, seule la contribution en hélice 3_{10} est prédominante. Cependant, on observe une faible contribution des formes libres et adsorbées.

En conclusion, l'analyse de la BSA fait intervenir trois formes d'hélices distinctes dont la contribution est dépendante de la nature du milieu environnemental. Pour la suite des analyses, nous nous intéresserons uniquement à la forme libre qui est commune par son existence à toute variations ou modifications des conditions environnementales.

V) Effet de l'environnement

A) Effets du pH

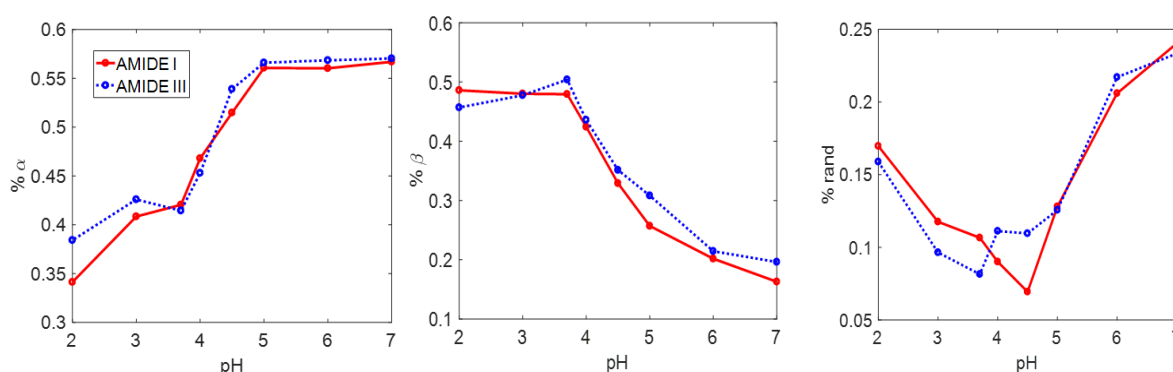


Figure 37/ évolution du taux de conformation de la structure secondaire de la BSA en fonction du pH.

Bien que la position de l'hélice soit généralement estimée à 1655 cm^{-1} par toutes les méthodes, il convient également de mentionner l'existence de l'hélice 3_{10} , qui se situe à 1641 cm^{-1} et est souvent considérée comme correspondant à la forme adsorbée de l'hélice à la surface.

Le spectre mesuré à pH 7,6 est la combinaison de deux contributions : celle de la BSA libre en solution et celle de la BSA adsorbée. Le spectre de la BSA adsorbée indique une diminution de l'hélicité de la BSA, bien que la forme spectrale reste peu modifiée.

La variation du pourcentage de structures secondaires (%α, %β, %rand) en fonction du pH (Figure 37) révèle de nombreuses informations, dont la première est la corrélation entre l'amide I et de l'amide III.

Conformément à la littérature, nous observons qu'entre pH 4,5 et pH 7,6, où la BSA adopte une structure globulaire, le pourcentage d'hélices α varie de 50% à 58%, ce qui confirme une bonne attribution des bandes Raman.

En dessous du pH 4,5, un changement de conformation de la protéine se produit (passage de la conformation normale à la conformation en forme de cigare). L'hélicité diminue pour atteindre moins de 45% à pH 4 et moins de 30% à pH 2. Ces deux niveaux correspondent respectivement à une forme en cigare (forme F) et à une forme allongée (forme E).

Le nombre de structure en feuillet et en structure aléatoire augmente donc avec l'acidité du milieu contrairement aux hélices [140]. Cependant, la courbe de l'évolution de la structure aléatoire a une forme cloche où le fond correspond à une forte affinité entre molécule et substrat.

Le diagramme de l'hélicité fait ressortir deux transitions de phase : la première à pH 4,5 et la seconde à pH 3,7.

B) Effets de la température

Dans cette partie, nous suivons les étapes décrites précédemment lors de l'étude de l'effet du pH ; cependant, nous excluons les études sur la bande amide II ainsi que les analyses en composantes principales. Ainsi donc, une première analyse consistera à étudier les fluctuations de spectres pour trois températures (22°C , 40°C et 55°C) puis à l'aide de la décomposition des

probabilités des spectres individuels, nous déterminerons le taux de conformations de structures secondaires.

1) *Densité de probabilité*

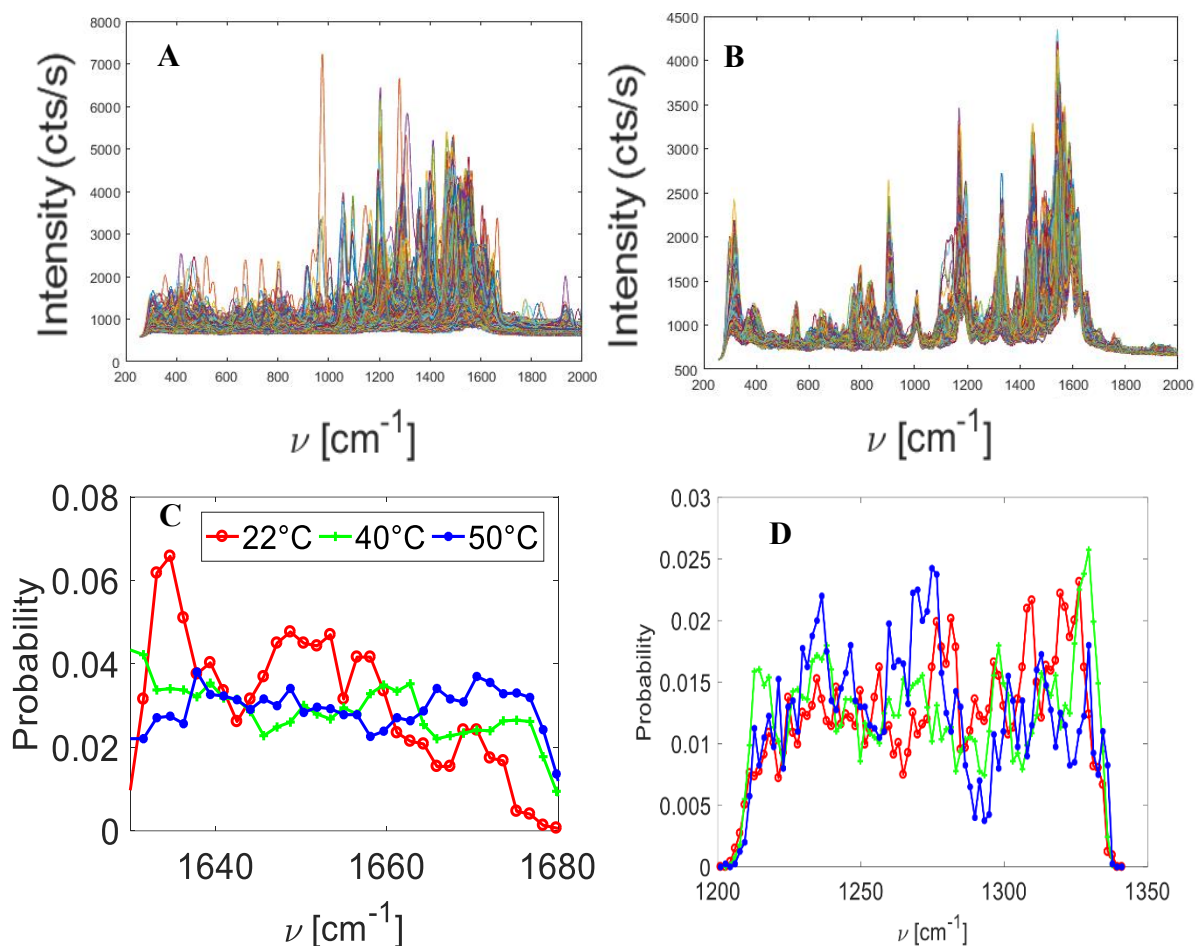


Figure 38/ accumulation des spectres SERS de la BSA obtenus à pH 7.6 pour différentes valeurs de températures : A) 40°C B) 50°C et différentes PDF de ces spectres issues des bandes amide I (C) et amide III (D).

Les PDF des différentes températures sont représentées en section annexes parties C et D pour les bandes amides I et III respectivement. L'augmentation de la température dans les molécules biologiques engendre divers changements, dont la dénaturation qui est particulièrement significative pour les protéines. Ce processus de dénaturation débute autour de 40°C, et au-delà de 45°C, les protéines se déplient et les groupes hydrophobes réagissent.

La formation d'agrégats protéiques induits par l'élévation de la température se produit selon deux principaux mécanismes : d'une part la conversion d'une hélice en une structure β agrégée, favorisée par des interactions électrostatiques, conduisant à la formation d'agrégats solubles relativement petits, et d'autre part la formation d'agrégats de plus grande taille par des interactions hydrophobes.

Les variations de température affectent également les mécanismes d'adsorption de la protéine à la surface. Des études ont d'ailleurs démontré que le chauffage de la BSA entraîne des modifications des liaisons disulfures au sein des molécules, via des réactions d'échange entre les liaisons SH-SS.

En observant la Figure 38B, il est généralement constaté qu'une augmentation de la température réduit les fluctuations spectrales, les spectres présentant moins de raies et une dynamique plus reproductible. Cependant, on observe un mélange de conformations, notamment une bande intense entre 1400 et 1600 cm^{-1} et trois raies très intenses à 350, 970 et 1195 cm^{-1} .

Bien que l'acidité du milieu et la haute température favorisent la dénaturation, le spectre observé à haute température est nettement différent de celui observé à pH 3. Cependant, la méthionine apparaît dans les deux cas comme un acide aminé liant la protéine à la surface. Dans l'ensemble, l'augmentation de la température entraîne une diminution de la densité de probabilité de la bande α à 1655 cm^{-1} , tandis que la bande β à 1670 cm^{-1} devient prédominante.

La dynamique spectrale de la protéine à différentes températures est similaire à celle observée à différents pH, mais à 50°C, on observe une diminution des pics de l'eau et de l'hélicité [135]. À cette température, un pic apparaît à 1665 cm^{-1} . Il convient de noter qu'à des températures plus élevées, la dénaturation de la BSA se traduit par la disparition de la raie à 1654 cm^{-1} correspondant à l'hélice et par l'augmentation des deux bandes à 1616 et 1680 cm^{-1} correspondant à la formation de la structure en feuillet ordonnée non native associée à l'agrégation.

À 40°C (Figure 38A), le spectre présente une fluctuation importante dans la plage de 1000 à 1700 cm^{-1} , bien que l'on observe une perte de raies dans la plage de 260 à 1000 cm^{-1} . Cependant, le pic très intense observé dans la bande α (Figure 38C) est décalé à 1658 cm^{-1} et la densité du feuillet est moins importante qu'à 50°C.

À basse température, la BSA présente une augmentation de la structure secondaire, en particulier la structure Alpha. Une comparaison avec l'adsorption électrostatique montre une forte similitude entre les spectres observés à pH 4.5 et ceux observés à 40°C, ce qui suggère une conformation similaire de la protéine pour ces deux paramètres.

L'amide III (Figure 38D) présente de nombreuses raies fluctuantes, ce qui rend la délimitation des bandes difficile. Plusieurs pics permettent de suivre l'évolution de la contrainte thermique. La position des pics à 1280, 1290, 1310 et 1330 cm^{-1} dans la bande α est très sensible aux variations de température, et le pic à 1310 cm^{-1} , déjà identifié dans l'étude du pH, peut également être utilisé pour évaluer la teneur en hélice. La perte de structure en hélice est clairement visible.

Dans la bande β , la densité croît au fur et à mesure que la température augmente. Cette augmentation est en accord avec les résultats obtenus précédemment lors de l'étude des effets électrostatiques.

La caractérisation de la structure aléatoire n'est pas ici très évidente. Cette bande est donc plus sensible aux effets thermiques.

2) Teneur en conformation de la structures secondaires

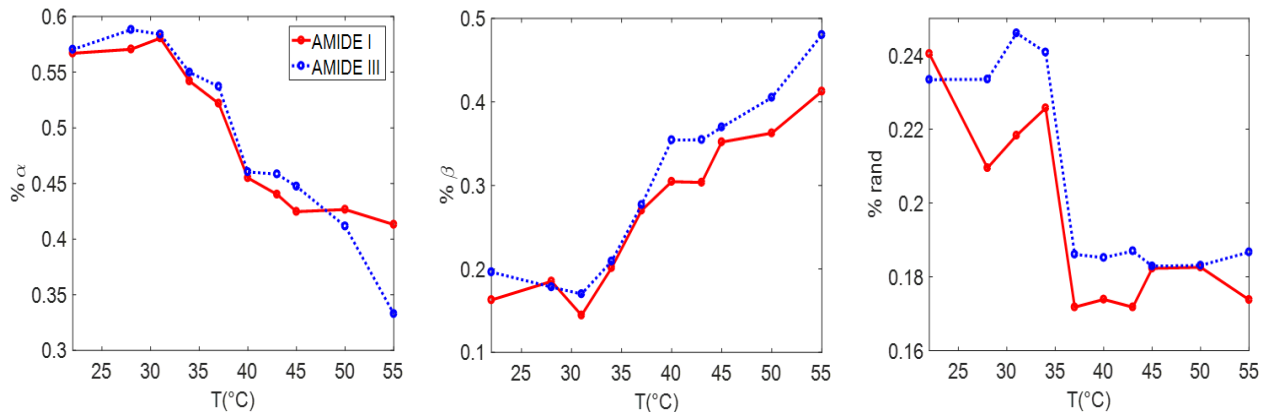


Figure 39/ évolution du taux de conformation de la structure secondaire de la BSA en fonction de la température.

Dans la Figure 39, on observe une évolution similaire entre la contrainte thermique et la contrainte électrostatique (pH). L'augmentation de la température conduit à une transition de phase plus rapide entre la phase globulaire jusqu'à 37°C et la phase allongée au-dessus de 45°C. La forme en cigare (% = 50%) ne serait présente que temporairement vers 40°C.

La structure en hélice est particulièrement affectée par la température, avec une différence de 8% entre l'amide I et l'amide III à 55°C.

Avec l'augmentation de la température, le nombre de structures beta augmente, tout comme le taux d'agrégation. La corrélation entre les effets de la température et du pH est également confirmée lors de la détermination du taux de structures secondaires. Cependant, on observe une différence dans la forme de la courbe de la structure aléatoire : l'absence de la forme en cloche (dont le minimum est situé à pH 4) indique que l'adsorption est fortement influencée par la charge de la protéine.

Cette observation confirme nos conclusions antérieures sur le plan électrostatique : la forme en cigare à pH 4 semble être mieux adsorbée qu'à 40°C.

VI) Conclusion

En conclusion, ce chapitre a permis de mettre en place une méthode expérimentale novatrice pour déterminer les différentes structures d'une protéine à partir de ses spectres individuels. Cette méthode a été validée en comparant nos résultats à ceux de la littérature, démontrant ainsi sa fiabilité et sa pertinence. Nous avons examiné en détail la répartition des conformations de la protéine en fonction de son environnement, notamment le pH et la température. Nous avons observé des variations significatives dans les structures secondaires, en particulier les hélices et les feuillets, en réponse à ces paramètres environnementaux. De plus, nous avons étudié

l'adsorption de la protéine sur des nanoparticules d'or, révélant son influence sur les structures protéiques.

Nous avons démontré que les acides aminés hydrophobes favorisent la liaison avec la surface lorsque la protéine est dénaturée ou adopte une conformation en cigare, tandis que les acides aminés hydrophiles influencent davantage la forme normale de la protéine. Nous avons utilisé différentes méthodes de caractérisation pour décrire et analyser nos spectres. Cependant, par un processus d'élimination, nous avons adopté la méthode d'ajustement basée sur la densité de probabilité, qui permet de mieux suivre les fluctuations spectrales. Cette méthode nous a permis de déterminer la richesse des différentes conformations de la structure secondaire en analysant les différentes fenêtres Raman des bandes amides I et III. Nous avons identifié plusieurs raies de nature inconnue, mais l'observation la plus surprenante a été la présence de multiples raies correspondant à différentes formes de conformation en hélice α .

Toute cette richesse spectrale est un avantage de l'étude des spectres à l'échelle des molécules uniques. Nous avons établi un lien direct entre le taux de ces conformations et la structure tertiaire de la protéine, ce qui indique que la connaissance du pourcentage de conformations de structure secondaire peut être d'une grande importance pour identifier la conformation générale de la protéine (normale, en cigare, dénaturée).

Les effets de l'agrégation de la protéine n'ont pas été étudiés dans ce manuscrit. Toutefois, il convient de noter que l'agrégation des protéines est étroitement liée aux conditions environnementales et à la durée de l'expérience. Cette approche expérimentale a permis d'obtenir une meilleure compréhension de la dynamique structurale des protéines et de son lien avec l'environnement. Nous avons pu déterminer les conditions favorables à la formation de différentes conformations protéiques, ce qui ouvre la voie à des applications dans divers domaines, dans le domaine de la biologie structurale. La BSA étant une protéine globulaire, il convient de se demander si nous pouvons généraliser l'utilisation de notre méthode d'analyse et nos résultats à toutes les formes de protéines. Le chapitre suivant fournira des éléments de réponse à cette question, car nous y étudierons l' α -synucléine, qui est une protéine intrinsèquement désordonnée.

CHAPITRE 5 | ADSORPTION DE L' α -SYNUCLEINE SUR DES NANOPARTICULES D'OR : CARACTERISATION DES CONFORMATIONS DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

Les protéines intrinsèquement désordonnées représentent un tiers de l'ensemble des protéines.

Grâce à leur flexibilité, elles s'adaptent à de nombreux partenaires physiologiques et adoptent une multitude de conformations. Leur dysfonctionnement peut conduire à de nombreuses pathologies telles que les cancers et les maladies neurodégénératives [137].

Ces protéines dont la fonction n'est pas bien définie sont connues pour avoir peu ou pas de structure secondaire en milieu aqueux. Parmi cette classe de protéines, nous avons l'alpha-synucléine responsable de la maladie de Parkinson. L'un des défis majeurs est de suivre les changements de conformation qui se produisent au sein de ces macromolécules.

La structure secondaire de l' α -synucléine humaine sera étudiée dans ce chapitre.

Nous allons dans un premier temps présenter l'état de l'art de l' α -synucléine puis nous verrons les effets de l'environnement sur la caractérisation des structures primaires et secondaires respectivement. La caractérisation de la structure secondaire fera état de différentes méthodes analytiques permettant d'ajuster et de mieux expliquer les fluctuations observables. Une quatrième partie de ce chapitre mettra en évidence les différents taux de conformations observées dans les structures secondaires en fonctions des paramètres tels que le pH et la température

I) Structure physico-chimique de l'Alpha Synucléine

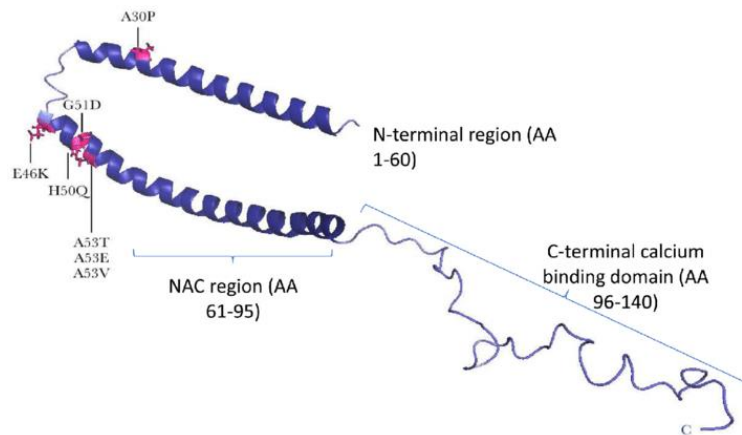


Figure 40/ structure tridimensionnelle de l' α -synucléine [141].

Cette partie fera état de la découverte des synucléines, de leurs propriétés ainsi que de leurs fonctions.

Les protéines intrinsèquement désordonnées sont des protéines qui manquent de structure tridimensionnelle stables. Parmi cette classe protéique figure l' α -synucléine.

L' α -Synucléine est une petite protéine pré-synaptique composé de 140 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 14 kDa que l'on retrouve majoritairement dans le cerveau.

Sa fonction est jusqu'à nos jours incertaine. Elle fait partie de la grande famille des protéines à laquelle appartient la β et la γ -synucléine. Les synucléines sont des protéines nativement dépliées mais seule l' α -synucléine est sujette à la fibrillation. L'intérêt pour la l' α -synucléine a récemment augmenté car elle est la composante majeure du corps de Levy, des inclusions intra cytoplasmique qui sont les marqueurs neuropathologiques de la maladie de Parkinson.

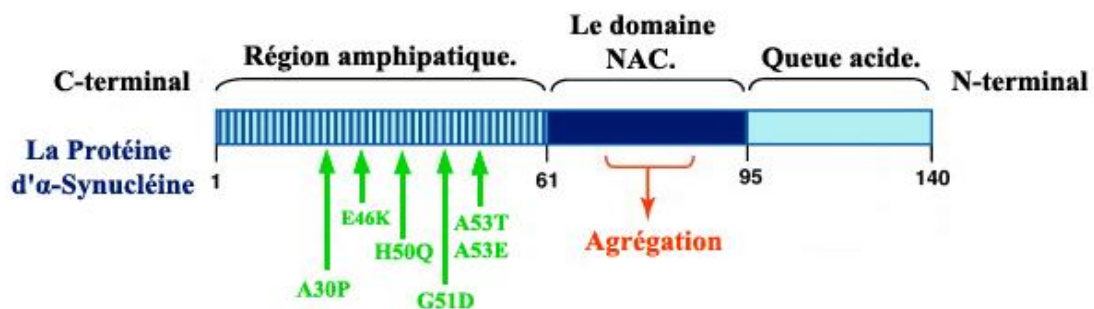
Deux mutations (A53T et A30T) dans le gène codant l' α -synucléine sont responsable de la forme précoce de la maladie de Parkinson. L' α -synucléine bien qu'étant non structurée, il a été démontré qu'elle a tendance à adopter la conformation hélicoïdale dans les régions N-terminal et NAC (Non Amyloïde β -Compotent) lorsqu'elle est liée aux membranes lipidiques et aux vésicules. Plusieurs études ont montré que le taux d'agrégation de l' α -synucléine dépend des conditions environnementales et est accéléré par divers facteurs tels : un faible pH et la présence des polyamines biogènes (composés organiques de charge positive issus des acides aminés et dont le dysfonctionnement est responsable de nombreuses pathologies).

II) Historique des Synucléines

La première description a été faite en 1988. A ce moment, la synucléine était décrite comme une protéine présente à la fois dans la partie présynaptique des neurones et au niveau des noyaux des cellules ; d'où leur nom de Synucléine (contraction de synapses et nucleus qui signifie noyau) [142]. Bien que la localisation nucléaire ait été invalidée par la suite [143] , le nom

synucléine est resté inchangé. En 1994, deux formes de synucléines furent caractérisées : la première, composée de 140 acides aminés identique aux précurseurs du NAC et la deuxième, composée de 134 acides aminés homologue de la phosphoneuroprotéine-14 du rat. Elles furent nommées respectivement α et β -synucléine [144]. Un troisième membre de la famille des synucléines sera décrit en 1997, impliqué dans le cancer du sein et appelé γ -synucléine [145]. Cette dernière, composée de 127 acides aminés possède 55% d'homologie avec l' α -synucléine [146]. Seule l' α -synucléine a été décrite comme impliquée dans les synucléinopathies. L' α -synucléine est une protéine exprimée de manière constitutive dans l'organisme (à l'exception du foie) avec une expression importante dans le cerveau [144]. Elle représente avec la β -synucléine 0.1 à 0.2% des protéines totales du cerveau [147].

III) Séquence de l' α -synucléine



La séquence de l' α -synucléine peut être divisée en trois domaines :

- Le domaine N-terminal qui contient les acides aminés de 1 à 60 ; quatre parties des sept répétitions imparfaites de six acides aminés KTKEGC de la protéine ainsi que les six mutations liées à des formes familiales de synucléinopathies.
- Le domaine central composé des résidus 61 à 95 qui correspond à la région du NAC et composé d'acides aminés hydrophobes. Ce domaine contient trois des sept répartitions imparfaites des six acides aminés de la protéine.
- Le domaine C-terminal comprenant les résidus 96 à 140 ainsi que les sites de la principale phosphorylation (S129) de l' α -synucléine. Ce domaine est chargé négativement. L' α -synucléine est décrite comme ayant une structure naturellement non repliée mais compacte afin de protéger la région NAC [148 ,149].

Elle possède des similarités de séquence avec une apolipoprotéine lui permettant d'interagir avec les membranes. Ainsi, en présence des lipides, les 100 premiers résidus se structurent en hélice α pour former une épingle à cheveux liée à la membrane. La partie C-terminale reste libre et peut servir de lien avec des partenaires [150].

- *Rôle de l' α -synucléine*

Elle n'a toujours pas de fonction clairement définie. Cependant, il est fortement suggéré qu'elle serait impliquée dans le trafic vésiculaire au niveau des synapses. Ce trafic pourrait se faire par la propriété de l' α -synucléine à induire un amincissement et une courbure des membranes

lorsqu'elle y est liée [151]. Toutefois, il n'est pas clair si l' α -synucléine agit sur l'endocytose ou l'exocytose.

IV) Caractérisation de la structure primaire

a) Protocol expérimental

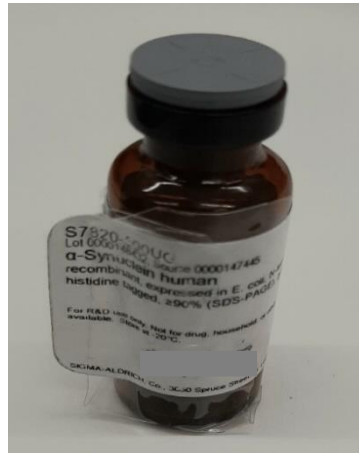


Figure 41/ α -Synucléine en poudre de poids moléculaire 14 KDa provenant de Sigma Aldrich.

Pour nos expériences, nous avons utilisé de l' α synucléine d'un poids moléculaire de 14 kDa, provenant de Sigma Aldrich. Nous avons préparé des solutions de PBS (mélange de NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) à différentes valeurs de pH. Les différents niveaux d'acidité ont été obtenus en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Les conditions environnementales ont été variées : huit conditions de pH ont été sélectionnées, allant du pH 2 (dénaturation de la protéine) au pH 7,6 (pH physiologique [99]). Les températures ont été variées de 22 °C à 55 °C (température de dénaturation [100]).

Afin d'apprécier les fluctuations de signal issues d'une seule molécule et de supprimer les effets de moyennes généralement présents lorsqu'un grand nombre de molécules est sondé simultanément, les concentrations de l' α -synucléine ont été ajustées pour être dans le régime de la molécule unique.

Notre premier objectif a été d'enregistrer la signature spectrale de la protéine.

L'objectif ici est de déterminer les acides aminés majoritaires observés lors de l'adsorption de l' α -synucléine sur des colloïdes d'or. L'approche consiste à enregistrer les spectres de cette protéine pour différentes valeurs de pH. L'analyse des raies permettra de mettre en évidence les sources de fluctuations ainsi que les acides aminés majoritairement observés.

b) Résultats

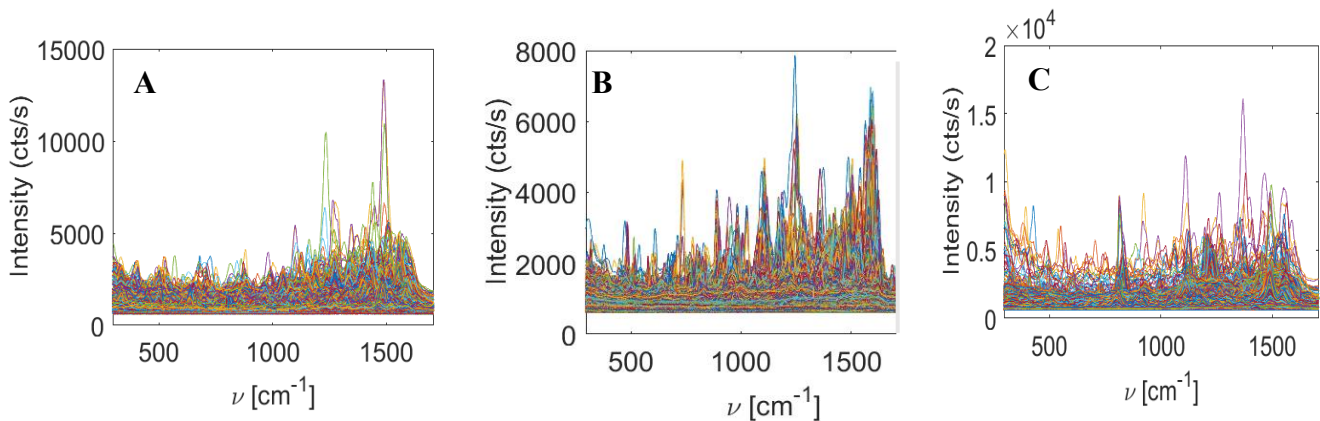


Figure 42/ accumulation des spectres SERS de l' α -synucléine obtenue à une température de 22°C et pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3.

La Figure 42 présente les spectres SERS de l' α -synucléine entre 260 et 1680 cm^{-1} .

À pH 7,6 (Figure 42A), les spectres sont moins fluctuants qu'à pH 4,5 (proche du point isoélectrique de la synucléine qui est de 4,7 [152]). Comme mentionné dans le chapitre précédent, les raies entre 260 et 1200 cm^{-1} connues pour avoir une faible énergie et pour être plus sensibles à l'environnement (température, pH) semblent être inexistantes. Cela signifie qu'à pH physiologique, la synucléine n'est pas bien adsorbée.

Après 1200 cm^{-1} , on observe un mélange de raies difficilement identifiables en raison des effets de fluctuations à la fois en fréquence et en intensité.

À pH 4,5 (Figure 42B), les fluctuations de fréquences sont moins importantes et les spectres plus reproductibles. Dans la région de basse énergie, les spectres les plus intenses sont attribués à la proline, à l'acide aspartique et à l'acide glutamique (**respectivement situés à 812, 939 et 1117 cm^{-1}** [112]), tous principalement exprimés dans la région C-terminale de l' α synucléine. L'acide glutamique et l'acide aspartique présentent un groupe carboxylique libre adapté à l'interaction avec les nanoparticules d'or [153]. Ces acides aminés sont également responsables du maintien de la solubilité.

La synucléine est donc liée à la surface par les acides aminés chargés négativement qui se trouvent dans la région C-terminale et le processus d'adsorption majeur est fortement observé près du point isoélectrique de cette protéine. Bien que les raies soient toutes aussi fluctuantes les unes que les autres, les spectres apparaissent dans une dynamique reproductible ; on note deux raies de très fortes intensités associées respectivement au feuillet bêta (1248 cm^{-1}) de l'amide III et au feuillet bêta associé à l'agrégation (1606 cm^{-1}).

La Figure 42C montre les spectres bruts à pH 3. Une multitude de raies très fluctuantes sont observées. L'environnement très acide est donc plus favorable à l'apparition de différentes conformations. Cette richesse spectrale nous renseigne sur le comportement très adsorbé de la synucléine. Quatre raies de forte intensité correspondant à l'acide aspartique, l'acide glutamique, la lysine et la glycine sont facilement identifiables. Ces acides aminés sont principalement

exprimés dans tous les domaines de la synucléine et confirment les résultats sur l'adsorption maximale.

c) Conclusion

Plusieurs recherches ont montré que les molécules plus grosses s'adsorbent facilement sur la surface [154]. Cependant, la synucléine est une petite protéine avec un petit rayon hydrodynamique mais elle semble s'adsorber plus facilement que la BSA qui est une grande protéine. Nous pouvons donc conclure, en accord avec d'autres chercheurs, que les protéines moins stables, telles que celles ayant moins de liaisons transversales intramoléculaires, peuvent se déplier davantage et former plus de points de contact avec la surface [155] : le dépliage d'une protéine expose donc plus de points de contact entre la protéine et la surface.

Son interaction avec la surface s'effectue par l'intermédiaire des acides aminés tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique.

Le chevauchement des spectres rendant difficile l'identification et l'analyse de la structure secondaire, nous avons d'abord décomposé les différentes fréquences Raman en bandes amides, que nous avons ensuite analysées pour vérifier et expliquer les effets des fluctuations sur les conformations (α -hélices, β -feuillettes, et structures aléatoires) des structures secondaires.

La section suivante fait état des différentes méthodes d'analyses de la structure secondaire. Dans un premier temps, nous présenterons quelques méthodes bibliographiques utilisées. Dans la suite, une description de la structure secondaire sera faite à l'aide de la PDF et de la PCA. Enfin nous déterminerons la teneur en conformation de la structure secondaire des spectres individuels.

V) Caractérisation de la structure secondaire

A) Quelques méthodes bibliographiques

Nous présentons ici un tableau récapitulatif de quelques méthodes ayant permis de déterminer le taux de structures secondaires de l'alpha synucléine. Dans ce tableau, il est remarqué que la teneur en conformation de la structure secondaire varie d'une méthode à une autre et en fonction des paramètres tels que la concentration de la solution.

Techniques	Méthodes de calcul de la teneur en conformations de la structure secondaire	Teneur en conformation	Conditions expérimentales	Références
SERS	Aire sous les histogrammes	α (1650-1657 cm^{-1}) β (1662-1665 cm^{-1}) random(autour de 1671 cm^{-1}) α (13.3%) β (8.4%) random(78.3%) α (15.1%) β (9.5%) random(75.4%)	50 spectres ; AgNPs ; PBS ; pH 7 2mM ; 250mM	[116]
Raman	Aire sous les histogrammes	α (1628-1678 cm^{-1}) β (1640-1690 cm^{-1}) random(1655-1700 cm^{-1}) α (48%) β (15%) random(37%) α (34%) β (39%) random(27%)	10mM ; HCl pH 7.5 ; 0% MeOH 17% MeOH	[156]
IR	Décompte du nombre de structure	α (1655 cm^{-1}) β -parallèle(1624 cm^{-1}) β -antparallèle(1694 cm^{-1}) α (1-2%) β -parallèle(82%) β -antparallèle(17%) α (22%) β -parallèle(44%) β -antparallèle (31%)	pH 7 ; mM Jour 2 Jour 8	[157]

CD	Dérivée seconde et aire des gaussiennes Dérivée seconde et aire des gaussiennes	α (1654 cm^{-1}) β (1667 cm^{-1}) random(1682 cm^{-1}) α (45%) β (33%) random (22%)	mM ; pH 7.5 ; 25°C	[158]
----	--	---	----------------------------------	-------

Tableau 10// récapitulatif des différentes méthodes expérimentales issues de la littérature ainsi que des teneurs en conformations de la structure secondaire fournies par chaque méthode.

B) Densité de probabilité

1) Analyse de la bande amide I

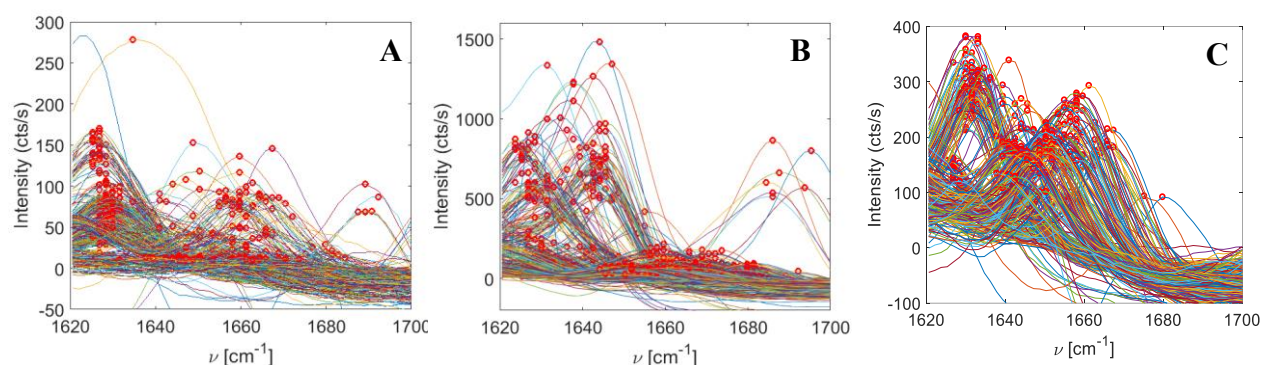


Figure 43/ zoom sur la bande amide I des spectres SERS de l' α -synucléine obtenus à une température de 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3.

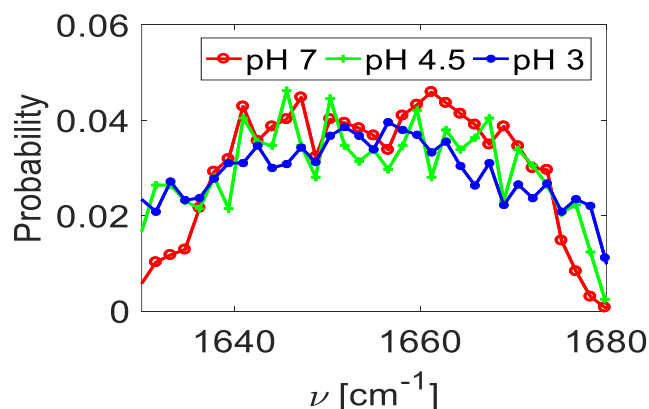


Figure 44/ densité de probabilité des spectres SERS précédents de l' α -synucléine observés dans la bande amide I en fonction du pH.

Nous présentons ici une analyse plus détaillée de la structure secondaire avec l'étude des bandes amides I et III. La première méthode est celle de la densité de probabilité elle sera suivie de l'analyse en composantes principales puis nous déterminerons la teneur en conformation de la structure secondaire.

Comme précédemment, un zoom sur la bande amide I permet d'observer la richesse spectrale des structures secondaires :

A pH 7 (Figure 43A), les raies à 1630 cm^{-1} caractéristiques de la structure hélice 3_{10} est dominante. Deux autres structures non facilement dissociables sont la structure en hélice- α et le feuillet β . cependant, ce mélange de structure est dominé par la structure hélice centrée à 1657 cm^{-1} tandis que la structure en feuillet est retrouvée majoritairement à 1663 cm^{-1} . L'analyse macroscopique montre donc que dans la bande amide I, à pH 7,6, les spectres adoptent deux conformations : l'hélice α et le feuillet β . Ces deux conformations signifient que dans un environnement physiologique, l' α -synucléine a une chaîne polypeptidique typique substantiellement dépliée.

A pH 4,5 (Figure 43B), le nombre de spectres et donc de structures secondaires augmente. Tout d'abord, la bande β devient plus large et la structure hélicoïdale semble disparaître.

Le changement le plus évident est l'augmentation de l'intensité et l'apparition d'un nouvel élargissement important de la raie au voisinage de 1640 cm^{-1} correspondant à la structure en hélice 3_{10} due à l'effet d'adsorption. Par rapport au pH 7,6, les structures aléatoires (1675 cm^{-1}) sont plus visibles dans ce milieu acide.

Le nombre de structures de type bêta turn ($1680\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) augmente également : preuve de la forte agrégation des molécules de protéines.

En regardant la Figure 43C, on se rend compte de la forte croissance du nombre de spectres. A ce pH, on remarque également un déplacement des raies de 10 cm^{-1} vers les basses énergies. La structure majoritaire est donc la structure en feuillet correspondant à la structure du feuillet bêta ordonné [92].

2) Analyse de la bande amide III

La fonction densité de probabilité est meilleure pour observer et analyser les fluctuations spectrales et le mélange de structures dans la bande amide III :

L'augmentation de l'acidité réduit les pics caractéristiques de la liaison peptidique de la protéine (1200 et 1220 cm^{-1}) en effet, les raies caractéristiques sont plus marquées au pH physiologique. Ainsi, les chaînes latérales et les modes de liaisons peptidiques n'agissent pas en milieu acide en ce qui concerne les protéines intrinsèquement désordonnées, contrairement aux protéines stables.

La Figure 46 montre que le nombre de structures en feuillets bêta augmente avec l'acidité du milieu ; le doublet de pics dans la bande $1225\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ est dû aux fluctuations de positions de la structure. A pH 7, ce doublet est marqué par un pic large représentatif du mélange des structures.

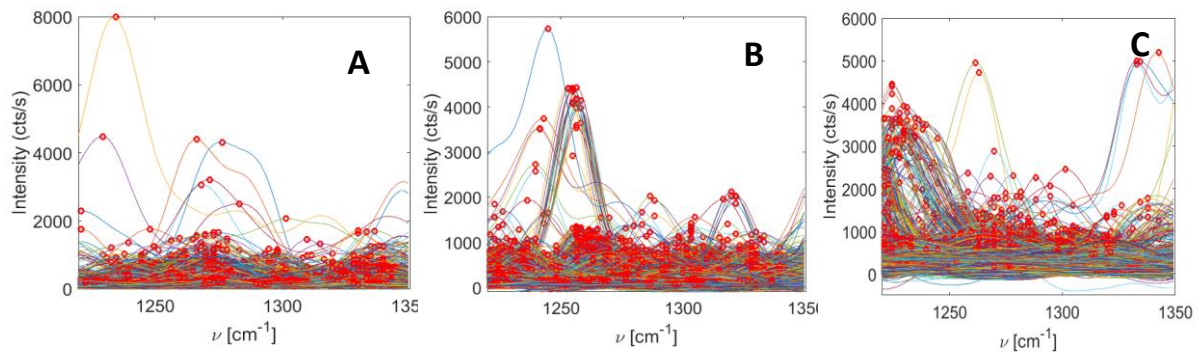


Figure 45/ zoom sur la bande amide III des spectres SERS de l' α -synucléine obtenus à une température de 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH7.6 B) pH 4.5 C) pH 3.

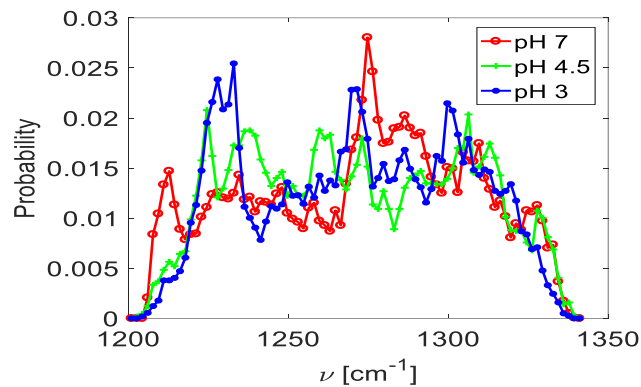


Figure 46/ densité de probabilité des spectres SERS précédents de l' α -synucléine dans la bande amide III.

La largeur des bandes hélices- α (1285-1310 cm^{-1}) diminue avec l'acidité. En milieu fortement acide (pH 3), la raie correspondant à l'hélice α est centrée à 1300 cm^{-1} . La finesse de ce pic observée à pH 3 semble être attribuée à une diffusion limitée par l'adsorption des protéines.

En conclusion, dans la bande amide III, les fluctuations sont plus visibles pour le décalage Raman comme pour la variation de l'intensité. Le nombre de structures en feuillets β (1220-1250 cm^{-1}) et aléatoires (1250-1260 cm^{-1}) augmente tandis que l'hélicité diminue avec l'acidité.

C) Tri par les composantes principales : PCA

La PCA a été utilisée pour évaluer la complexité des conformations de spectres dans la bande amide I de l' α synucléine. Les premières valeurs déterminées sont celles des vecteurs propres qui permettent de mieux décrire la série spectrale.

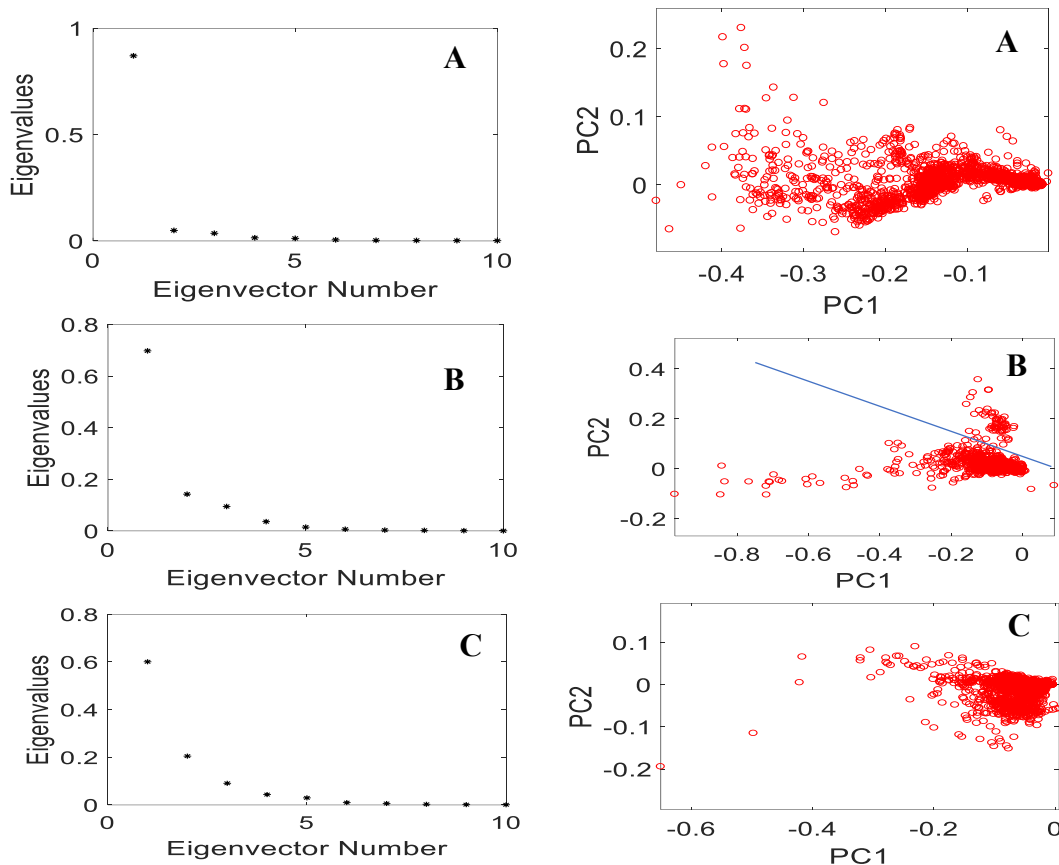


Figure 47/ contribution des valeurs propres donnée par la PCA à 22°C calculée sur un ensemble de 3000 spectres dans la bande amide I de la Synucléine et représentation 2D de cette PCA : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3.

Nous distinguons à pH 7 (Figure 47A) un seul vecteur propre correspondant à une valeur propre non nulle. Cette valeur propre a une contribution de 90% et témoigne du manque de fluctuations dans les spectres. La représentation 2D de la PCA présente trois familles de spectres dont deux s'étalent spectralement suivant deux axes différents et une famille qui semble être un mélange des deux autres. Même s'il n'y a qu'une composante, nous représenterons en 2D la PCA afin de pouvoir la comparer avec les autres valeurs de pH.

A pH 4,5 (Figure 47B), nous avons quatre vecteurs propres pouvant être utilisés pour décrire les spectres. L'amplitude des valeurs propres montre que la première composante principale représente environ 70% de la variance des données, la deuxième environ 18% et la troisième environ 10%. La quatrième représente moins de 5% de la variance. Les valeurs en dessous de 10% étant considérées comme faible, La décomposition dans l'espace 2D sur les deux composantes principales montre les spectres d'intensité variable repartis suivant deux branches qui représentent le nombre de familles présent dans les spectres.

Les conformations peuvent être décrites à pH 3 (Figure 47C) par trois vecteurs propres car le poids des dernières composantes est inférieur à 10%. Une contribution à 58% quantifie les fluctuations représentées par l'étalement d'une seule famille de spectres sur la représentation 2D. L'analyse de la PCA montre que le degré de fluctuations augmente avec l'acidité du milieu dans les structures de l'alpha synucléine.

D) Répartition des conformations de la structure secondaire

1) Etat de l'art : Spectres cumulés

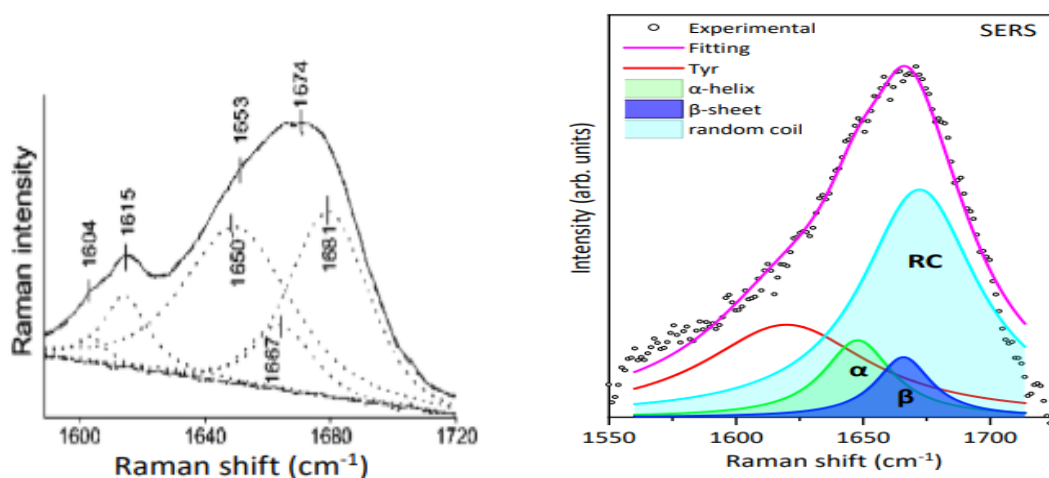


Figure 48/ décomposition des spectres Raman et SERS de l'alpha synucléine issue des références [122] et [136] respectivement.

La Figure 48 présente la décomposition en série de gaussienne des spectres Raman et SERS de l'alpha synucléine ainsi que les différentes assignations de leurs structures secondaires. La Figure 48A est une décomposition sur une moyenne de spectres de la synucléine diluée dans le solvant Tris HCl à une concentration milli-molaire et acquis avec un laser de 647 nm de longueur d'onde de puissance 800mW. L'ajustement a été réalisé à l'aide de la méthode non linéaire des moindres carrés de Levenberg-Marquardt. Les pics ont été sélectionnés avec une largeur de bande à mi-hauteur (BWHH) de 25 cm^{-1} .

La figure 48B est une représentation de la moyenne d'un spectre décomposée de la synucléine diluée dans le PBS à une concentration micro-molaire et mélangée à une solution de nanoparticules d'argent. La durée d'acquisition du spectre est de 1 seconde et le laser exciteur utilise une longueur d'onde de 532 nm.

L'observation faite est celle de la correspondance des différentes bandes Raman : En effet, pour les deux publications, les hélices α ont leur centre de gaussienne fixé à 1650 cm^{-1} ; le feuillet beta est centré à 1667 cm^{-1} et la structure aléatoire à 1675 cm^{-1} . Le taux de ces structures secondaires a été calculé en considérant l'aire sous les gaussiennes. Les résultats obtenus pour les différentes structures sont très différents : alors que le Raman classique fournit un taux en hélice α de 48%, un taux en feuillet β de 15% et un taux en structures aléatoires de 37%, le SERS lui permet d'obtenir un taux d'hélice α de 13%, un taux de feuillet β de 8% et un taux de structure aléatoire de 78%.

Sachant que l'alpha-synucléine doit son caractère désordonné au nombre de ses résidus ou région intrinsèquement désordonnée qui est d'environ 50, l'on s'interroge ici sur l'exactitude de la méthode SERS. Dans la suite, nous exploiterons la méthode statistique précédemment utilisée au chapitre 4 pour déterminer le taux de structure secondaire de nos spectres SERS pour différents pH et températures.

2) Décomposition des probabilités des spectres individuels

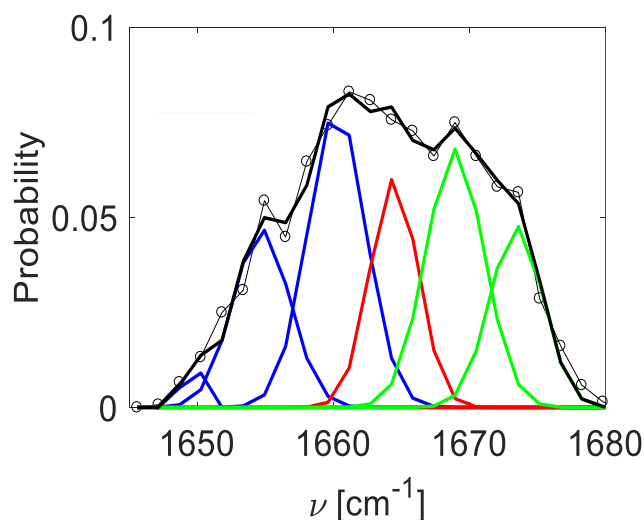


Figure 49/ A) décomposition en séries de Gaussiennes de la PDF des spectres individuels de l' α -synucléine obtenus à 22°C pour le pH 7 dans la bande amide I.

Les trois principales conformations sont l'hélice alpha (représenté en bleu), le feuillet bêta (représenté en rouge) et la structure aléatoire (représentée en vert).

La Figure 49 présente une décomposition en séries de gaussiennes des spectres individuels de l' α synucléine. Contrairement à la méthode précédente basée sur la décomposition de la moyenne cumulée des spectres, l'utilisation des spectres individuels permet une identification plus précise des fenêtres de fréquences Raman. Cette nouvelle méthode de décomposition, plus robuste, sera donc étendue aux différents pH afin de déterminer le taux de conformation des structures secondaires.

Le nombre de structures secondaires à l'échelle nanométrique peut être estimé en comptant le nombre de structures secondaires individuelles. Mais, dans notre cas, nous avons utilisé un ajustement de bande gaussienne pour prévenir les variations et révéler les différences de structure secondaire dans les différentes conformations. **Ces courbes d'ajustement par des gaussiennes peuvent être consultées dans la section annexe parties E et F de ce manuscrit.**

VI) Effets de l'environnement

L'objectif ici est de montrer comment évolue les conformations de la structure secondaire dans un premier temps en fonction du pH puis d'effectuer les analyses en faisant varier la température.

A) Effet du pH

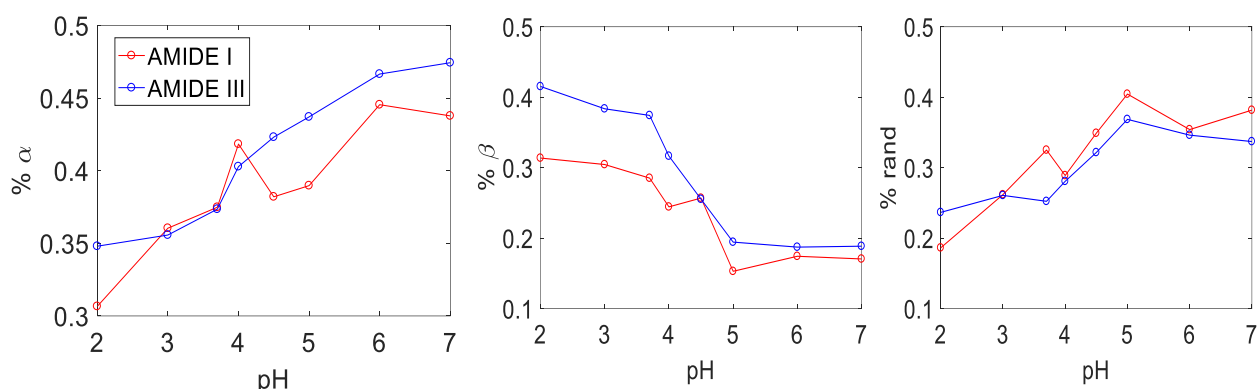


Figure 50/ variation de la teneur en conformation de la structure secondaire de l' α -synucléine en fonction du pH dans les bandes Amide I (courbe rouge) et Amide III (courbe bleue) toutes obtenues à 22°C.

Même si la structure de la synucléine n'est pas connue, on peut établir à partir de ces résultats qu'il existe un pH (supérieur à 4) pour lequel la conformation de la protéine est modifiée.

Cependant, la charge de la protéine affecte plus la structure en hélice (entre pH 4,5 et 7) et la structure en feuillet (entre pH 4 et pH 2) que la structure aléatoire. Ces modifications sont observées par les variations entre les différentes bandes amides.

L'évolution du contenu en hélice est représentée en fonction du pH (Figure 50).

Le fait que nous trouvons expérimentalement à 22°C et pH 7.6 un pourcentage en hélice α de 48% dans les deux amides confirme la bonne attribution des pics et ceci est en accord avec les attentes macroscopiques de la littérature [159][156].

Nous avons observé une transition de phase dans les deux bandes d'amides entre pH 5 et pH 4. Dans ce milieu, la variation de l'hélicité diminue de 45 à 40% dans l'amide III et de 43 à 35% dans l'amide I. Cette diminution se produit plus lentement dans l'amide III que dans l'amide I.

Selon la littérature, la forme oligomérique de la synucléine ne contient pas plus de 35% de structure en feuillets. Nos résultats vont dans le même sens puisque nous avons trouvé une augmentation de la quantité de structure en feuillets avec une solution acide. Cette augmentation signifie que dans des conditions acides, la charge nette importante de la synucléine est neutralisée, ce qui la rend beaucoup plus sujette à l'agrégation, qui est favorable à la formation de fibrilles responsables de la maladie de Parkinson.

Comme la fibrillation se produit dans la région NAC, nous confirmons l'hypothèse selon laquelle la protéine synucléine s'étend sur la surface préférentiellement à travers les feuillets β et lorsque l'adsorption est maximale [159].

En ce qui concerne la structure aléatoire, nous avons vu que dans l'amide I, le pourcentage varie de 33 à 24%. L'amide III est plus sensible au désordre qui diminue de 39 à 19% d'une solution neutre à une solution acide. La structure aléatoire se réarrange lentement en structures en feuillets β solubles et agrégées qui finissent par précipiter sous forme d'amyloïde.

B) Effets de la température

Dans cette partie, nous suivrons les étapes décrites précédemment lors de l'étude de l'effet du pH ; cependant, nous excluons les études sur la bande amide II ainsi que les analyses en composantes principales. Ainsi donc, une première analyse consistera à étudier les fluctuations de spectres pour trois températures (22°C, 40°C et 55°C) puis à l'aide de la décomposition des probabilités des spectres individuels, nous déterminerons le taux de conformations de structures secondaires.

1) Densité de probabilité

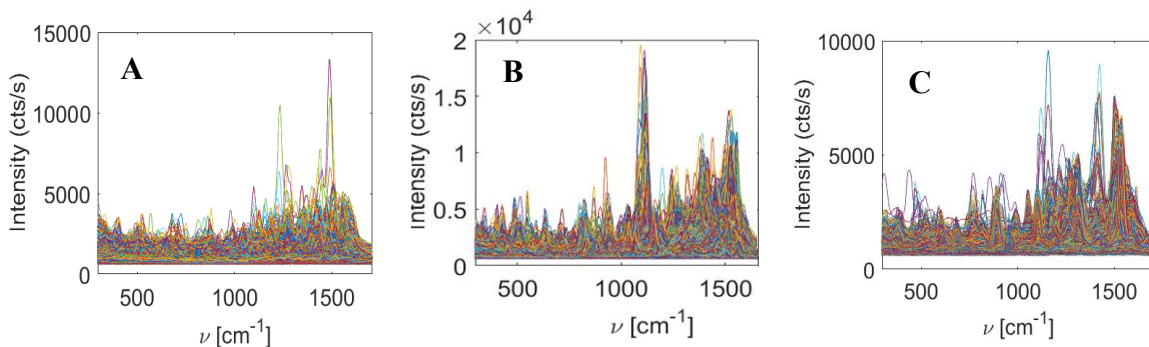


Figure 51/ accumulation de 3000 spectres SERS de l' α -synucléine obtenus à pH 7.6 pour différentes valeurs de température : A) 22°C B) 40°C C) 55°C.

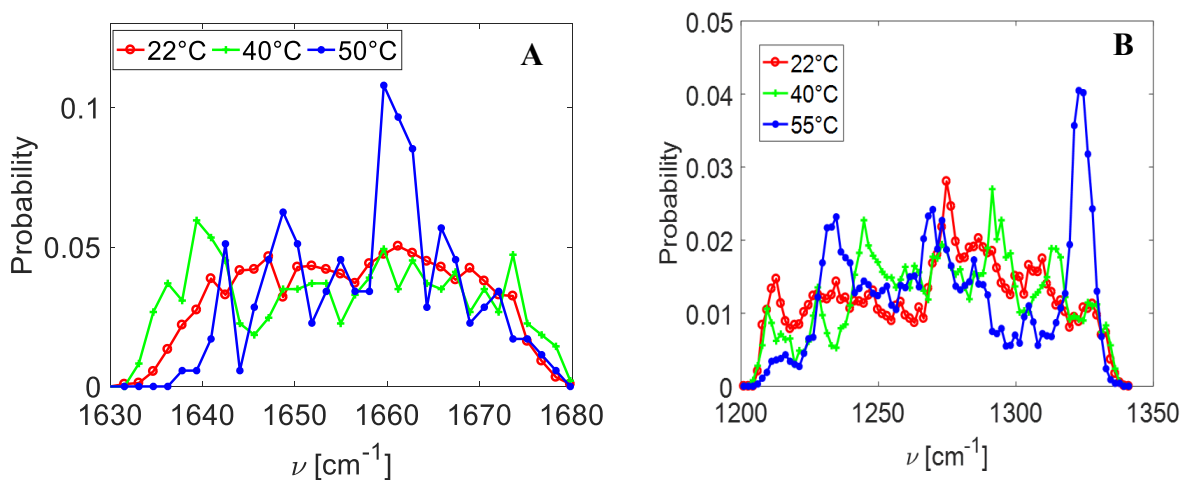


Figure 52/ différentes PDF issues des spectres SERS précédents de l' α -synucléine issues de la bande amide I (A) et la bande amide III (B).

La Figure 51 représente les spectres bruts de l' α -synucléine à différentes températures.

Bien que l'environnement acide et la température élevée favorisent la dénaturation, les spectres observés ici sont clairement différents de ceux observés à pH 3. En effet, à pH 3, le nombre de raies est réduit donc la charge de la protéine est un facteur majeur dans l'adsorption et la dénaturation.

L'augmentation de la température entraîne de nombreuses fluctuations de fréquence et d'intensité dans les spectres des protéines. Entre 260 et 1000 cm^{-1} , l'augmentation du nombre de raies reflète un contact important entre la surface et la protéine.

En effet, on observe une augmentation du nombre de raies dont la dynamique semble reproductible à 40°C (Figure 51B) ; bien que le nombre de raies soit assez important, on observe une raie de forte intensité à 1100 cm^{-1} . Une comparaison avec l'adsorption électrostatique (figure 43B) montre une forte similitude entre les spectres observés à pH 4,5 et ceux observés à 40°C. La conformation de la protéine est donc la même pour ces deux paramètres.

Les fluctuations de fréquence sont plus importantes à 50°C mais l'intensité est réduite. Par rapport à la haute température, on remarque à l'échelle macroscopique qu'il n'y a pas de corrélation avec la basse température. L'intensité fluctue en fonction de la position et ne semble pas reproductible.

Un zoom sur la bande amide I (Figure 52A) montre une diminution du pic de l'hélice 3_{10} (1635-1640 cm^{-1}). Cependant, il apparaît plus large à 40°C et décalé de 2 cm^{-1} à 55°C. La bande correspondant à l'hélice est plus large à 22 et 40°C ; la bande fine correspondant à l'hélice reflète l'unicité de la structure. L'observation la plus frappante est celle de la raie à 1660 cm^{-1} correspondant à la structure ordonnée du feuillet bêta observée à 55°C.

Dans la bande amide III (Figure 52B), le nombre de spectres de feuillets (1220-1250 cm^{-1}) est plus important à 55°C et centré à 1245 cm^{-1} ; on observe un décalage de cette structure vers 1250 cm^{-1} à 40°C alors que le pic apparaît large à 22°C.

Le nombre de structure de structures aléatoires (1250-1265 cm^{-1}) varie très peu pour les trois températures mais s'affine lorsque la température augmente ; le nombre d'hélice diminue avec l'augmentation de la température.

La ligne de haute intensité (1325 cm^{-1}) observée à 55°C est la ligne du tryptophane qui reflète l'hydrophobicité de la protéine.

Les bandes amides sont extrêmement affectées par les variations thermiques : dans l'amide I, la raie à 1640 cm^{-1} se déplace vers la basse énergie avec l'augmentation de la température tandis que dans l'amide III, la bande β se déplace vers la haute énergie.

La dénaturation thermique est en corrélation avec l'effet du pH, car une augmentation de la température induit une stabilité de la conformation structurale de la synucléine. Cependant, la largeur de bande à 1640 cm^{-1} est beaucoup plus importante à pH 4.5 qu'à 40°C, ce qui révèle que la charge de la protéine joue un rôle important dans l'interaction avec la surface. La température élevée (55°C) présente un pic important près de 1658 cm^{-1} attribué à la conformation stable du feuillet β et qui est en corrélation avec celui observé à pH 3, bien que beaucoup plus large.

2) Tri par les composantes principales : PCA

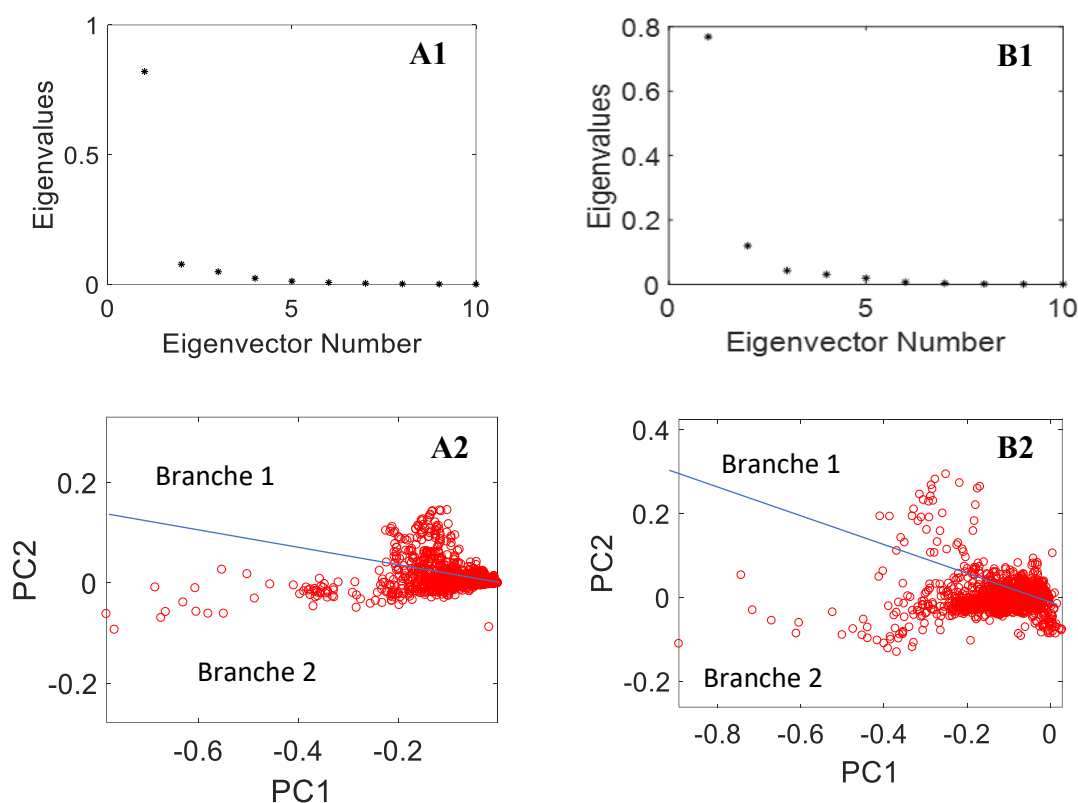


Figure 53/ contribution des valeurs propres donné par la PCA à pH 7.6 calculée sur un ensemble de 3000 spectres dans la bande amide I de la Synucléine et représentation 2D de cette PCA : A) 40°C B) 48°C.

L'on peut estimer le nombre de vecteurs propres exploitables pour les deux températures à 2 ; à 40°C (Figure 53 A1-A2), la première composante est de l'ordre de 80% et la deuxième de 7%. Les spectres sont très peu fluctuants et la représentation 2D de la PCA montre deux catégories principales de spectres repartis suivant deux axes différents.

Sur la Figure 53 (B1-B2) (48°C), la première composante du vecteur propre est associée à une valeur propre de l'ordre de de 78% et la deuxième représente environ 15% de la variance. Sur la représentation 2D, on observe deux familles de spectres qui s'étalent majoritairement sur une aire d'environ 50%.

Cette méthode par analyse des composante principales ne nous renseigne que sur l'étalement des spectres ainsi que sur leurs degrés de fluctuations.

Nous présentons dans la suite les résultats obtenus lors du calcul de la teneur en conformation secondaire par la méthode de décomposition en séries de gaussiennes des spectres individuels. **Les courbes d'ajustements sont présentées dans la section annexe parties G et H.**

3) Teneur en conformation de la structure secondaire

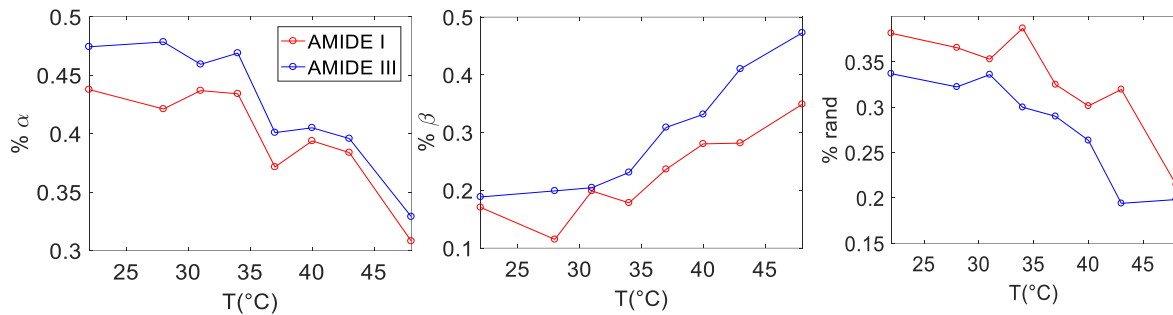


Figure 54/ variation de teneur en conformation de la structure secondaire de l' α -synucléine en fonction du pH dans les bandes Amide I (courbe rouge) et Amide III (courbe bleue).

Si l'on considère l'effet de la température, le taux de structure hélicoïdale reste constant entre 25 et 34°C.

La phase de transition est observée à 37°C et 43°C. Une température élevée induit une augmentation du taux de fibrillation en raison de l'augmentation du nombre de structures β . Cette augmentation est le résultat d'une augmentation des interactions hydrophobes.

Après dénaturation par la chaleur, la teneur en structure aléatoire a diminué.

Il s'agit d'une observation très importante qui correspond au processus par lequel l' α -synucléine nativement dépliée se transforme en une conformation de repliement partiel, avec une quantité significative de structure β [160-161].

Ces résultats indiquent que pendant l'adsorption des protéines à la surface, les changements structuraux des protéines, quel que soit leur état natif initial, suivent le cours d'une augmentation de la structure en feuillet β et d'une diminution du contenu α -hélicoïdal.

VII) Conclusion

En conclusion, dans ce chapitre, nous avons étudié l'adsorption de l' α -synucléine sur les nanoparticules d'or en suspension colloïdale en faisant varier le pH et la température du milieu. Nous avons examiné en détail la répartition des conformations de la protéine en fonction de son environnement, notamment le pH et la température. Nous avons observé des variations significatives dans les structures secondaires, en particulier les hélices et les feuillets, en réponse à ces paramètres environnementaux. De plus, nous avons étudié l'adsorption de la protéine sur des nanoparticules d'or, révélant son influence sur les structures protéiques.

En première observation, nous avons établi que l' α -synucléine s'étend sur la surface préférentiellement à travers les feuillets beta et que les acides aminés chargés négativement (proline, acide glutamique et acide aspartique) présents dans sa structure et principalement exprimés dans la région C-terminale s'expriment de manière plus intense dans les spectres.

Cependant, seuls les acides glutamiques et aspartiques possédant un groupe carboxylique libre favorisent l'interaction avec les nanoparticules d'or et jouent un rôle important dans le maintien de la solubilité.

Nous avons utilisé différentes méthodes de caractérisation pour décrire et analyser nos spectres. Cependant, par un processus d'élimination, nous avons adopté la méthode d'ajustement basée sur la densité de probabilité, qui permet de mieux suivre les fluctuations spectrales. Cette méthode nous a permis de déterminer la richesse des différentes conformations de la structure secondaire en analysant les différentes fenêtres Raman des bandes amides I et III. La détermination du taux de conformation de la structure secondaire nous a permis d'établir que l'alpha-synucléine dans des conditions de haute température ou en milieu fortement acide adoptait une conformation quelque peu stable en comparaison à sa conformation native.

La méthode d'analyse des structures secondaires que nous proposons peut être considérée comme générale pour toutes les formes de protéines, car nous l'avons validée à la fois pour l'étude des protéines stables et des protéines intrinsèquement désordonnées.

CHAPITRE 6 | DYNAMIQUE ET COMPLEXITE CONFORMATIONNELLE DE L' α -SYNUCLEINE : ANALYSE SYSTEMIQUE DES PROPRIETES INTRINSEQUEMENTS DESORDONNEES EN FONCTION DU pH ET DE LA TEMPERATURE

Le chapitre 6 explore une approche novatrice et prometteuse dans le domaine de la biologie structurale et de la biophysique, axée sur la caractérisation du désordre des protéines. De nombreuses protéines ne suivent pas de structures tridimensionnelles rigides et bien définies, mais plutôt des structures flexibles et en constante évolution. Ce phénomène, couramment désigné sous le nom de "désordre protéique", est maintenant reconnu comme une caractéristique essentielle de la fonction biologique de certaines protéines.

L'approche systémique adoptée dans ce chapitre est particulièrement pertinente car elle prend en compte les interactions complexes entre les différentes parties de la protéine, ainsi que leur impact sur la stabilité globale de la structure. Cette méthodologie nous permet d'examiner la protéine dans son ensemble, en prenant en considération ses différents états conformationnels et les transitions qui les relient.

En utilisant le formalisme des chaînes de Markov et le calcul de l'entropie de Shannon, nous sommes en mesure d'établir des liens significatifs entre les différentes conformations de la structure secondaire d'une protéine, tout en quantifiant statistiquement le niveau de désordre associé à ces interactions. Cette approche offre une vision globale de la flexibilité et de la plasticité des protéines, des informations cruciales pour comprendre leur interaction avec d'autres molécules et leur rôle dans des voies de signalisation complexes.

De plus, l'approche systémique nous permet d'explorer le désordre protéique dans divers contextes environnementaux, tels que le pH et la température. Cela nous offre une compréhension plus approfondie de la régulation du désordre et de son importance fonctionnelle dans des contextes biologiques spécifiques.

L'objectif central de ce chapitre est d'étudier la stabilité des différentes conformations de la structure secondaire en utilisant principalement l'approche systémique. Dans une première section, nous présenterons les méthodes qui seront employées, en abordant l'historique de la découverte de cette méthodologie, puis en expliquant comment appliquer le formalisme des chaînes de Markov et calculer l'entropie de Shannon. Ces approches nous permettront tout d'abord d'établir le lien entre les différentes conformations de la structure secondaire, puis de quantifier statistiquement le désordre résultant de ces interactions.

La deuxième section sera consacrée à la présentation des résultats obtenus lors de l'analyse de la BSA en fonction du pH et de la température, respectivement.

Enfin, la dernière section sera dédiée aux résultats sur l' α -synucléine, clôturant ainsi cette exploration approfondie du désordre protéique.

I) Différentes méthodes d'analyse

A) Découverte de la systémique

La complexité des macromolécules peut être expliquée à la fois par la répétition de leurs structures et par leur dynamique intrinsèque.

L'émergence de l'approche systémique remonte aux années 1950, à la suite des travaux de plusieurs chercheurs du MIT. Cette méthodologie révolutionnaire permet la modélisation de systèmes complexes sans réduire leur nature réelle à une simplification excessive. Son principe fondamental repose sur la compréhension des interactions dynamiques entre les éléments constitutifs [162][163]

Contrairement à l'approche analytique, la systémique se concentre sur une vision globale tout en accordant une attention particulière aux effets des interactions, plutôt qu'à leur nature intrinsèque, comme l'a souligné Joel de Rosnay.

L'étroite corrélation entre la flexibilité d'une macromolécule et sa réactivité, à la fois à l'échelle locale et globale, est un élément crucial à prendre en compte dans notre analyse des macromolécules biologiques.

Dans le cadre de la thèse, nous avons choisi d'adopter une approche systémique qui semble être la plus appropriée. Nous envisageons de relier les informations extraites de la détermination des conformations, en nous appuyant sur notre compréhension de la bande amide I. Chaque conformation sera considérée comme un élément du système, et notre objectif premier sera d'identifier les relations qui les unissent. Notre démarche se concentrera davantage sur l'exploration des interactions entre les éléments constitutifs plutôt que sur l'examen individuel de ces éléments.

B) Les chaînes de Markov

Pour mettre en évidence ces relations, nous utilisons le formalisme des chaînes de Markov. C'est un processus stochastique où une séquence d'événements successifs dépend uniquement de l'état présent et n'est pas influencée par les états passés, à l'exception de l'état immédiatement précédent. Cette propriété est appelée la "propriété de Markov" ou la "propriété de mémoire sans passé". Elle signifie que l'évolution future du processus dépend uniquement de l'état actuel et non de l'historique complet des états.

Formellement, une chaîne de Markov est définie par un ensemble fini d'états $\{S_1, S_2, \dots, S_n\}$ et une matrice de transition T , où T_{ij} représente la probabilité de passer de l'état S_i à l'état S_j en une étape de temps. Les éléments de la matrice de transition T sont généralement des probabilités dans l'intervalle $[0, 1]$ et chaque ligne de la matrice T doit sommer à 1, car à chaque étape, le système doit se trouver dans l'un des états possibles.

Nous considérons les chaînes de Markov à temps discret : l'évolution du système se fait en sautant d'un état à un autre à des instants définis. La matrice de transition T spécifie alors les probabilités de transition entre les différents états à chaque pas de temps.

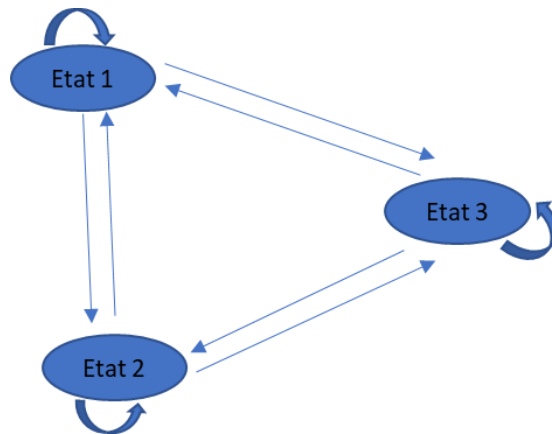


Figure 55/ illustration du modèle de Markov à trois états.

Une fois que l'on a construit la matrice de transfert d'une chaîne de Markov, on peut représenter graphiquement les interactions entre les différents états à l'aide d'un diagramme de Markov, également connu sous le nom de graphe de Markov.

Le diagramme de Markov est un outil visuel qui permet de mieux comprendre les transitions entre les états d'une chaîne de Markov. Dans ce diagramme, chaque état est représenté par un nœud (ou sommet) du graphe, et les transitions entre les états sont représentées par des flèches dirigées d'un nœud à un autre.

Les flèches dans le diagramme de Markov indiquent la probabilité de transition entre deux états. L'épaisseur des flèches peut être proportionnelle à la probabilité de transition. Les flèches plus larges indiquent une probabilité plus élevée de passer d'un état à un autre, tandis que les flèches plus fines indiquent une probabilité plus faible.

Le diagramme de Markov permet de visualiser les dépendances entre les états et de mettre en évidence les chemins possibles dans le processus. Il peut être utilisé pour analyser la dynamique et l'évolution du système représenté par la chaîne de Markov, ainsi que pour identifier les états qui jouent un rôle central ou qui exercent une influence prépondérante sur les transitions.

En utilisant le diagramme de Markov, on peut observer des propriétés intéressantes du système, telles que les états récurrents (qui peuvent être atteints à partir d'eux-mêmes), les états transitoires (qui ne peuvent être atteints qu'à partir d'autres états, mais pas d'eux-mêmes), ainsi que les états absorbants (qui ne peuvent être quittés une fois atteints).

Afin de mieux visualiser les différentes transitions entre les états, nous représenterons schématiquement les interactions à l'aide de diagrammes de Markov.

Les variables d'état (feuillet, hélice, ...) seront reliées par des flèches qui indiquent la probabilité de transition observée d'un état vers un autre, c'est-à-dire que chaque flèche est associée à la probabilité de transition pour qu'un état suive un autre dans le spectre.

Étant donné que la construction manuelle de ces chaînes de Markov n'est pas aisée, nous avons utilisé un logiciel adapté à Matlab.

L'utilisation de seuils dans le contexte d'un diagramme de Markov vise à réduire la complexité du graphe en limitant le nombre de transitions représentées. Cette approche est souvent adoptée

lorsque le diagramme initial devient trop dense et difficile à interpréter, surtout lorsque le système étudié comporte un grand nombre d'états et de transitions.

Lorsqu'on applique un seuil sur les probabilités de transition, on élimine les transitions dont la probabilité est inférieure au seuil choisi. Nous avons utilisé des seuils de 1 %, 2 % et 3 %. Il est essentiel de noter que l'utilisation de seuils doit être effectuée avec prudence. Un seuil trop bas pourrait entraîner une perte d'informations importantes, tandis qu'un seuil trop élevé pourrait conduire à une simplification excessive, rendant le diagramme moins représentatif du système réel. Nous avons finalement retenu le seuil de 3 % des spectres, qui s'est avéré être le modèle le mieux adapté. En supprimant les transitions peu probables, le diagramme devient plus clair et plus lisible. Cela facilite la compréhension globale des tendances et des relations importantes entre les différents états. Les transitions conservées dans le diagramme représentent les chemins les plus probables et les événements les plus saillants du processus étudié. En éliminant les transitions moins probables, on met davantage l'accent sur les aspects du système qui exercent une influence plus marquée.

Dans le contexte spécifique mentionné, où des seuils de 3% ont été utilisés, cela signifie que seules les transitions ayant une probabilité égale ou supérieure à 3% ont été conservées dans le diagramme de Markov. Ces seuils ont été choisis de manière à rendre le diagramme plus compréhensible tout en préservant les transitions les plus significatives.

Pour faciliter l'analyse, nous avons choisi de classer les états en trois niveaux d'importance, en nous basant sur les éléments diagonaux T_{ii} de la matrice de transfert. Les états majoritaires, qui sont présents de manière significative, sont colorés en rouge. Les états qui semblent minoritaires mais qui sont présents plus de 0,5 seconde sont colorés en vert. Enfin, les états transitoires, dont les spectres n'apparaissent pas fréquemment sur la diagonale, sont représentés en bleu.

C) Entropie de Shannon

Pour estimer l'entropie S du système, qui représente la quantité d'information, nous utilisons l'expression donnée par Claude Shannon en 1948 [164][165][166]:

$$S = - \sum_{i=1}^N (P_i * \ln(P_i)) \quad (21)$$

Ici, P_i représente la densité de probabilité de l'événement i et N est le nombre maximal d'états de la structure. Pour calculer $S(k)$ à chaque itération k , nous avons besoin des éléments $T_{ij}(k)$ de la matrice de transfert que nous estimons. Avant cela, nous normalisons les éléments T_{ii} de la section précédente pour obtenir les probabilités de passage, ou encore les flux d'informations. La matrice de transition associée à une chaîne de Markov à N états est une matrice carrée $T = T_{ij}(k)$ d'ordre N , où T_{ij} représente le poids de la transition allant de l'état i à l'état j . T_{ii} représente le poids des états récurrents.

La probabilité P_{ik} d'obtenir chaque élément i du système lors de l'événement k est donnée par l'équation :

$$P_i(k) = \frac{T_{ij}(k)}{(\sum_{j=1}^N T_{ij}(k))} \quad (22)$$

L'entropie de Shannon pour l'état i est définie par l'équation :

$$S(k) = - \sum_{i=1}^{Nk} [P_i(k) * \ln P_i(k)] \quad (23)$$

Le temps d'acquisition de chacun de nos spectres étant de 0.5 seconde, nous avons acquis une série de N_k (600) spectres. Nous les avons analysés en calculant l'entropie de structure de chaque spectre pour une durée $t_k = k*0.5$.

L'entropie S est une mesure cruciale pour évaluer la complexité et l'information contenue dans le système. Elle nous permet de quantifier la variabilité et la diversité des états structuraux présents dans les protéines étudiées. En calculant l'entropie à différentes itérations (k), nous pouvons également observer comment la complexité du système évolue dans le temps et comment il atteint un équilibre ou une stabilité au fil des itérations.

II) Résultats des analyses : cas de la BSA

Afin d'appliquer la méthode systémique pour étudier la stabilité des différentes conformations de la structure secondaire des protéines, nous commencerons par examiner la protéine BSA (Albumine Sérique Bovine). Cette approche novatrice nous permettra d'analyser en profondeur la flexibilité et la dynamique de la BSA.

En utilisant le formalisme des chaînes de Markov et le calcul de l'entropie de Shannon, nous mettrons en évidence les interactions complexes entre les différentes conformations de la BSA en fonction des variations de pH et de température respectivement. Trois valeurs de pH (7,6 ; 4,5 et 3) et de températures (22°C, 40°C et 55°C) ont été choisies car elles permettent d'identifier les différentes conformations normales, en cigare et étendues de la protéine.

Cette approche globale nous permettra de déterminer comment la BSA s'adapte à son environnement et de comprendre les mécanismes de régulation qui sous-tendent ses transitions conformationnelles.

En faisant varier les paramètres environnementaux, les structures réagissent et émettent en retour différentes informations, c'est ce qu'on appelle le rétrocontrôle. Ce rétrocontrôle peut être positif si le système cherche à accentuer un effet et entre ainsi dans une dynamique de changement (local), ou négatif s'il cherche à atténuer cet effet pour maintenir un équilibre stationnaire.

Notre objectif ici est donc de mettre en évidence ces boucles de régulation du système et de comprendre comment la protéine s'adapte à son environnement, potentiellement par des transformations conformationnelles.

Nous nous intéressons particulièrement à la diversité des éléments et à leurs relations. Nous examinons si le niveau de complexité augmente pour offrir davantage de réponses face à la contrainte environnementale appliquée, ce qui place le système hors de son équilibre initial.

En explorant ces variations de pH et de température, nous cherchons à déterminer comment la protéine réagit et s'adapte structurellement pour maintenir sa fonction et son équilibre dans des environnements différents. Cette approche nous permettra de mieux comprendre la plasticité de la protéine et son rôle adaptatif face aux changements environnementaux, en révélant les mécanismes de régulation et les transitions conformationnelles qui contribuent à cette adaptabilité.

A) Influence du pH sur les chaînes de Markov

pH 7,6 ; T=22°C

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ and
α	264	14	3	0	3	1	0
β	15	44	15	1	4	1	3
rand	3	8	66	3	5	1	0
$\alpha \beta$	4	4	1	8	4	2	2
α rand	2	4	5	4	9	4	2
β rand	0	3	0	4	4	1	0
$\alpha \beta$ and	0	1	1	2	1	0	0

pH 4,5; T=22°C

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ and
α	92	86	27	16	14	14	4
β	13	7	61	27	21	21	5
rand	2	49	12	14	2	2	5
$\alpha \beta$	2	24	4	4	14	14	1
α rand	5	32	13	13	8	8	4
β rand	0	14	10	10	12	12	2
$\alpha \beta$ rand	0	3	3	3	2	3	1

pH 3 ; T=22°C

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ and
α	350	86	27	16	14	14	4
β	84	289	61	27	21	21	5
rand	34	49	14	14	2	2	5
$\alpha \beta$	17	24	4	4	14	14	1
α rand	15	32	13	13	8	8	4
β rand	9	14	10	10	12	12	2
$\alpha \beta$ rand	6	3	3	3	2	3	1

Tableau 11/ matrices de transfert issue de l'analyse des spectres SERS de la BSA obtenus à une température de 22°C° pour différentes valeurs de pH : pH 7,6 ; pH 4,5 ; pH 3 ; rouge : structures dominantes ; vert : structures intermédiaires ; bleu : structures de passage ; α : alpha ; β : beta ; rand : random.

Les Tableau 11 présentent des structures de même dimension (7x7) pour la BSA à différents pH (7,6, 4,5 et 3) :

À pH 7,6, la lecture du tableau révèle une seule structure majoritaire (structure en hélice) ; deux structures intermédiaires et trois structures de passages. Les conformations en feuillet β et les structures aléatoires sont moins fréquentes et les éléments non diagonaux montrent une variation très faible entre les transitions.

Nous observons à pH 4,5, une structure hélice α dominante ainsi que six structures de passages.

À pH 3, on observe deux structures majoritaires sans structure intermédiaire, mais l'information la plus importante se trouve au niveau des transitions entre structures : le nombre de spectres transitant d'une structure à une autre est nettement plus élevé qu'à pH 7.

Intéressons-nous à présent aux différents diagrammes de Markov construits à partir des matrices de transfert précédentes (cf Figure 56).

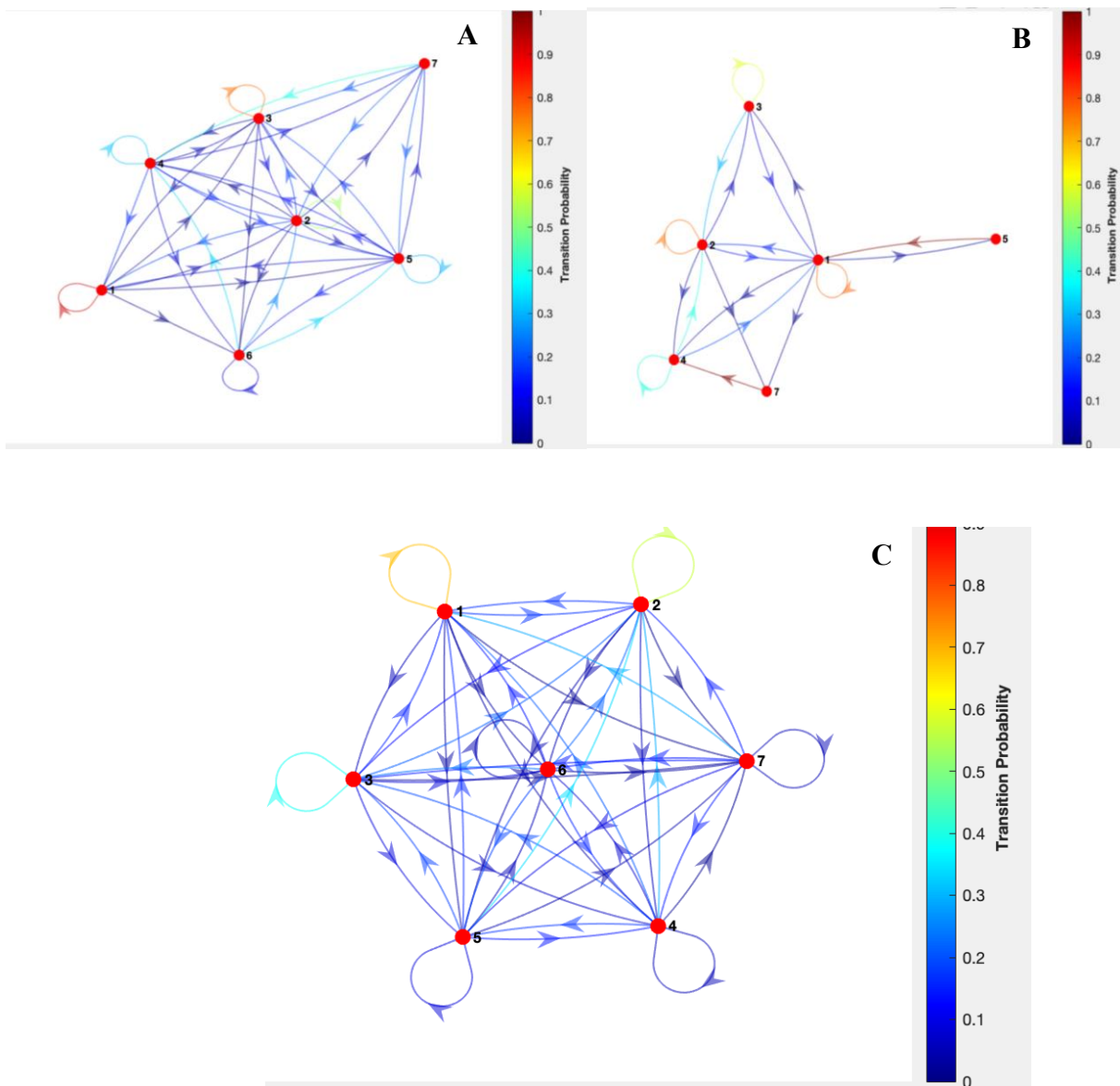


Figure 56/ diagrammes de Markov des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3 ; 1 : α ; 2 : β ; 3 : random ; 4 : $\alpha + \beta$; 5 : $\alpha + \text{random}$; 6 : $\beta + \text{random}$; 7 : $\alpha + \beta + \text{random}$.

Le nombre élevé d'interactions entre les états rend la structure très complexe, témoignant du degré de désordre présent. Le niveau de désordre apparaît plus élevé à pH 3, lorsque l'adsorption est maximale et que la protéine est dénaturée, par rapport au pH physiologique où la protéine adopte une forme globulaire. Une certaine stabilité est observée lorsque la protéine est sous forme de cigare.

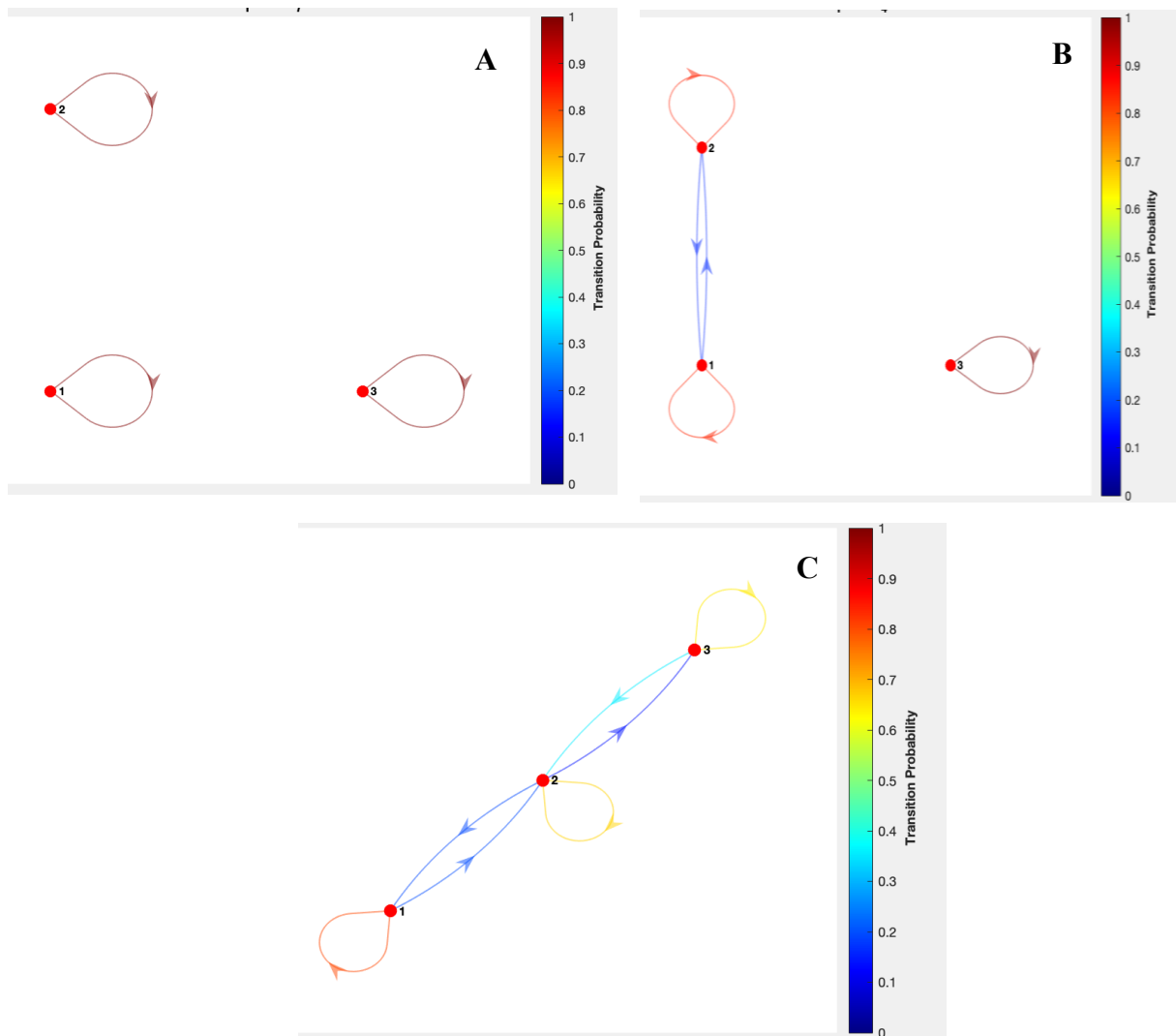


Figure 57/ diagrammes de Markov simplifié des spectres SERS de la BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3 ; 1 : α ; 2 : β ; 3 : random ; 4 : $\alpha + \beta$; 5 : $\alpha + \text{random}$; 6 : $\beta + \text{random}$; 7 : $\alpha + \beta + \text{random}$.

Afin de simplifier les diagrammes de Markov (Figure 57), nous avons cherché à construire un modèle théorique pour obtenir une vision globale des interactions les plus probables par application d'un seuil de 3%. Notre objectif ici est de reconnaître des boucles de rétroaction significatives dans le système.

Nous avons défini les éléments dominants de la structure aux nœuds des réseaux et les éléments satellites qui n'interagissent qu'avec un seul élément.

Les boucles de rétroaction à polarité positive sont celles où la variation d'un élément se propage tout au long de la boucle, renforçant ainsi la variation initiale. On les appelle boucles amplificantes, et elles peuvent avoir un comportement explosif (croissance exponentielle) ou implosif (décroissance rapide). Dans tout modèle de dynamique des systèmes, coexistent des boucles de rétroaction négative et des boucles de rétroaction positive.

La structure de la BSA (Figure 57) apparaît très simple pour les trois différents pH. Cependant, à pH physiologique (Figure 57A), elle se limite à trois structures sans interaction entre elles, ce

qui indique une certaine stabilité avec une équiprobabilité de présence de 86%. La forme globulaire de la BSA semble donc peu dynamique à ce pH.

À pH 4,5 (Figure 57B), le niveau de complexité est plus élevé par rapport à pH 7,6, avec une interaction relativement faible entre la structure en hélice et celle en feuillet bêta ; 20% des spectres ont une probabilité de passer d'une structure en hélice à une structure en feuillet. La structure aléatoire est stable et indépendante des autres. Près de son point isoélectrique, où la quantité de groupes chargés négativement et positivement est égale, la BSA subit une réduction de taille due à l'attraction des groupes de charges différentes, induisant une dépendance entre les hélices (composées d'acides aminés polaires) et les feuillets (composés majoritairement d'acides aminés hydrophobes). Les états hélice vers feuillet et feuillet vers hélice étant instables, ils définissent une boucle de rétroaction à polarité neutre, contribuant à l'équilibre structural.

À pH 3 (Figure 57C), le niveau de complexité est plus élevé. La stabilité de l'hélice est de 80%, tandis que celle des structures en feuillet et aléatoire est de 60%, valeurs réduites par l'acidité du milieu. Cette acidité n'affecte pas seulement la stabilité des structures individuelles, mais également celle de la protéine dans son ensemble. Le diagramme montre deux interactions faibles entre structures : l'interaction entre hélices et feuillets, à 20%, indique une faible fluctuation entre ces deux positions. La seconde interaction, à 20%, représente le nombre de spectres transitant de la structure en feuillet vers la structure aléatoire, confirmant nos hypothèses sur la dynamique structurale du feuillet. L'observation la plus significative ici est l'interaction marquée (40%) entre la structure aléatoire et le feuillet, indiquant une dynamique plus importante dans les structures aléatoires. Comparativement à la Figure 33, nous émettons l'hypothèse que dans un milieu acide, la structure aléatoire se transforme en une forme aléatoire de haute fréquence. Cette variation énergétique peut être attribuée aux effets de l'adsorption de la protéine à la surface, entraînant un déplacement Raman d'environ 15 cm^{-1} , ou à l'excès de charges positives qui se développent à l'intérieur de la protéine [167].

Deux boucles de rétrocontrôle sont présentes entre les structures : une boucle formée de structures instables et une boucle de rétrocontrôle négative. Les boucles de rétroaction négatives sont caractérisées par une variation sur un élément se propageant tout au long de la boucle, aboutissant à une variation de signe opposé sur cet élément. Ce comportement entraîne une action autocorrective, où toute variation sur l'un des éléments de la boucle tend à s'annuler. Ces boucles stabilisatrices visent à amener asymptotiquement la structure correspondante vers un état d'équilibre.

En résumé, l'application de la méthode systémique aux différentes conformations de la BSA à divers pH a permis de mettre en évidence des interactions complexes entre les structures et de mieux comprendre les mécanismes de régulation qui sous-tendent ses transitions conformationnelles. Les variations de pH ont un impact significatif sur les diagrammes de Markov, affectant la stabilité et la dynamique structurale de la protéine. Ces analyses fournissent un aperçu approfondi de la flexibilité de la BSA et de son adaptation à des environnements différents.

B) Influence du pH sur l'entropie de structure

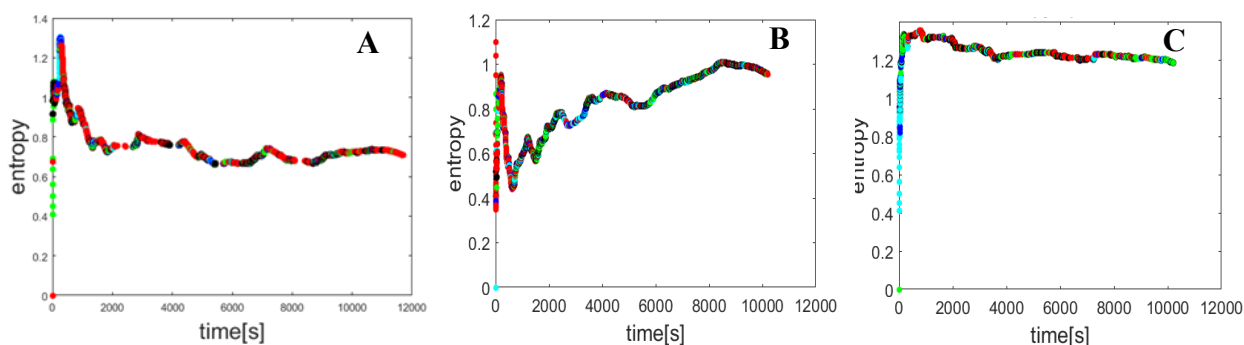


Figure 58/ dynamique de l'entropie pour 5000 spectres SERS de BSA obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3. Chaque point représente un spectre ayant une conformation spécifique dont les plus importantes sont : hélices α couleur rouge ; feuillet β couleur verte et random couleur bleu.

Nous avons jusqu'à présent une vision statique des structures, mais nous allons maintenant intégrer la dimension temporelle pour analyser l'évolution dynamique de ces structures. La durée et l'irréversibilité entrent en jeu en tant que dimensions fondamentales. Nous allons considérer les notions de flux et d'équilibre des flux. Parce que la causalité devient circulaire, l'analyse temporelle induit la notion de finalité de la structure, autrement dit les objectifs du système. En biologie, cela correspond à ce que l'on appelle la fonction du système. Nous utiliserons par la suite l'entropie de Shannon pour déterminer la quantité d'information présente dans ces structures.

L'objectif ici est de suivre l'évolution de l'entropie au cours du temps. La Figure 58 représente l'entropie de structure obtenue à partir du Tableau 11. On observe quatre phases distinctes :

- Une croissance rapide pendant les premières secondes.
- Une décroissance d'entropie d'environ 500 s. Quelques oscillations d'une période d'une dizaine de secondes sont également observées.
- Suivie d'une croissance entropique plus lente à pH 4,5.
- Une entropie qui semble se stabiliser à une valeur de 0,7 pour le pH 7, 1 pour le pH 4,5 et à une valeur plus élevée de 1,2 pour le pH 3.

Essayons de trouver une origine à ces superpositions de comportements entropiques.

Selon le second principe de la thermodynamique, pour un système isolé, l'entropie S ne peut que croître au cours du temps. L'augmentation de S signifie physiquement un étalement de la structure, correspondant dans notre cas à une augmentation du nombre d'états. La diminution de l'entropie, également appelée néguentropie, traduit un système forcé ouvert sur son environnement avec un apport d'énergie extérieure qui induit une variation du système. Les hypothèses peuvent être multiples : une adsorption de surface (hypothèse la plus probable), où la période pourrait traduire une affinité de la molécule avec le substrat d'or. Notre faisceau laser peut également constituer un bain thermique et favoriser la perte d'entropie. Plus la molécule serait petite, plus elle serait rapidement sensible à ces transformations. C'est dans la croissance entropique que l'on observe les plus grandes différences.

A pH 3, la protéine semble être gouvernée par une croissance de type logistique : l'entropie croît au départ de manière exponentielle mais augmente plus lentement avec le temps. Cela indiquerait la sous-jacente d'une loi de puissance : une multiplication de nombreux petits facteurs. En revanche, aux pH 7 et 4,5, on observe une loi plus simple : l'équilibre est plus vite atteint. Ces conclusions vont dans le sens que le désordre de la BSA est bien supérieur à pH 3 qu'aux pH physiologique et proche du point isoélectrique. Cette entropie très élevée est une preuve que les états de la structure sont non prédictibles et donc ne fournissent pas assez d'informations.

La décroissance observée dans les 50 premières secondes à pH 7,6 (respectivement 4,5) ne se retrouve pas à pH 3. La tendance est à une diminution très lente pour la forme globulaire, contrairement à la forme étendue où l'entropie augmente, et ceci plus rapidement qu'à pH 7,6.

De ces observations, il ressort donc que l'adsorption d'origine électrostatique est bien responsable de la néguentropie observée à pH 7,6 (respectivement 4,5). Cela n'interdit pas l'adsorption de type physique par des forces de type van der Waals avec le substrat ; cependant, l'interaction est plus faible et donc prendra plus de temps avant d'atteindre un équilibre. Les effets stériques sont néanmoins facilités, et la forme en cigare multiplie donc le nombre des interactions.

Nous observons ainsi une succession d'adsorption et de désorption, entraînant un arrangement progressif de l'adsorption de la protéine sur le substrat. L'entropie diminue au cours du temps et tend à se stabiliser au bout de 2000 secondes vers une valeur très faible proche de 0,7 (Figure 58A).

A pH 4,5, le temps de stabilisation est plus élevé (plus de 4000 secondes). Les protéines n'étant pas chargées électrostatiquement, l'affinité entre les molécules et le substrat est plus difficile. L'entropie, d'une valeur de 1 bit (Figure 58B), est due aux nombreuses interactions entre les structures et à la présence de la boucle de rétrocontrôle.

Étant donné que les boucles sont plus nombreuses à pH 3, on observe un degré de désordre plus important, caractérisé par une entropie de 1,2 (Figure 58C). La signature de l'adsorption est beaucoup plus faible car l'équilibre est atteint beaucoup plus rapidement.

En comparaison aux valeurs obtenues précédemment, nous pouvons dire qu'une baisse de pH tend à augmenter le nombre d'états et donc le degré de désordre des structures protéiques : cela s'explique par une hausse des valeurs maximales de l'entropie.

L'analyse temporelle des structures de la BSA révèle des comportements dynamiques complexes et des phénomènes d'adsorption et de désorption qui varient en fonction du pH. L'évolution de l'entropie met en évidence les changements dans la structure et la dynamique de la protéine au fil du temps. Ces observations permettent de mieux comprendre comment la protéine s'adapte à son environnement et comment ses conformations se modifient en réponse à des stimuli externes.

L'utilisation de l'entropie de Shannon comme mesure de l'information présente dans les structures permet de quantifier le degré de désordre et de complexité des différentes conformations de la BSA. L'entropie élevée à pH 3 indique une plus grande incertitude quant aux états structuraux et met en évidence la présence de multiples configurations possibles. En

revanche, les pH physiologique (pH 7) et proche du point isoélectrique (pH 4,5) montrent une tendance vers un équilibre plus rapide, avec une entropie relativement plus basse.

Ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes de régulation et d'adaptation de la BSA en fonction de son environnement. L'analyse systémique des structures et de leur évolution dans le temps ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude des protéines et de leur fonctionnement dans des conditions variables, fournissant ainsi des informations essentielles pour la compréhension des processus biologiques.

C) Influence de la température sur les chaînes de Markov

T=40°C ; pH 7,6

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	$\alpha \beta$ rand
α	413	72	5	2	5	0
β	72	280	35	2	1	0
Rand	28	36	135	1	1	0
$\alpha \beta$	4	0	0	3	3	0
α rand	4	3	0	1	0	1
$\alpha \beta$ rand	0	0	1	0	0	0

T=50°C ; pH 7,6

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	$\alpha \beta$ and
α	102	14	2	4	0	1
β	15	81	13	0	0	0
Rand	0	12	51	0	0	0
$\alpha \beta$	2	0	0	7	3	0
α rand	3	1	0	0	1	1
$\alpha \beta$ rand	0	0	0	2	0	0

Tableau 12/ matrice de transfert issue de l'analyse des spectres SERS de la BSA obtenus à pH 7,6 pour différentes valeurs de températures : 40°C ; 50°C ; rouge : structures dominantes ; vert : structures intermédiaires ; bleu : structures de passage ; α : alpha ; β : beta ; rand : random.

Les Tableau 12 représentent les différentes matrices de transfert de taille 6X6 des spectres SERS de la BSA obtenus aux températures 40°C et 50°C respectivement.

A 40°C, les spectres présentent trois structures dominantes (hélices α , feuillets β et structures aléatoires) ainsi qu'une structure de passage caractérisée par des spectres présentant à la fois des conformations hélices α et feuillets β .

A 50°C, les spectres présentent trois structures dominantes (hélices α , feuillets β et structures aléatoires) dont le nombre est inférieur à celui observé à 40°C ; nous observons ici deux structures de passage caractérisées par les spectres possédant un mélange de conformations hélices α et feuillets β d'une part et hélices α plus structures aléatoires d'autre part.

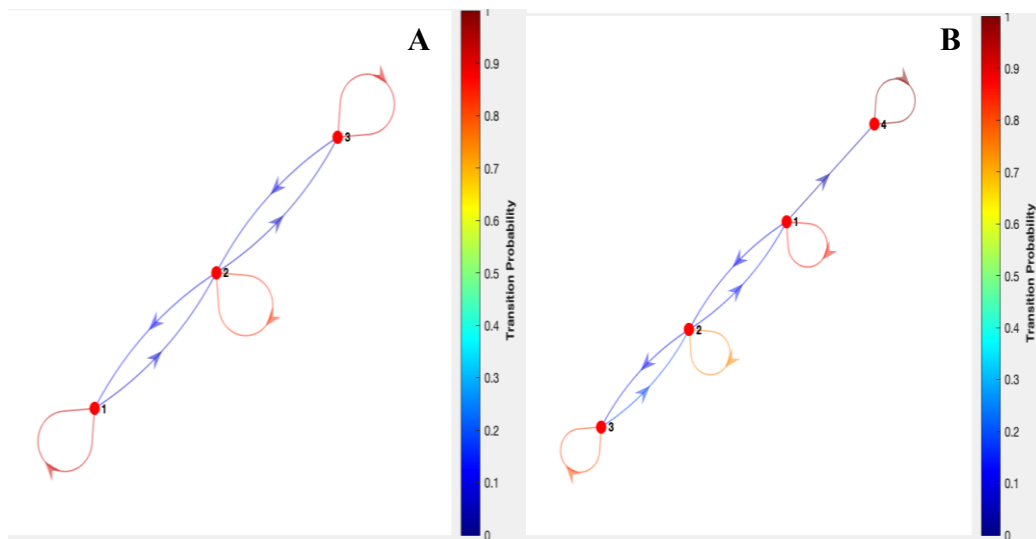


Figure 59/ diagrammes de Markov simplifié issus des matrices de transfert précédente des spectres de la BSA obtenus à pH 7,6 pour différentes valeurs de températures :A) 40°C B) 50°C; 1 : α ; 2 : β ; 3 : random ; 4 : $\alpha + \beta$; 5 : $\alpha + \text{random}$; 6 : $\beta + \text{random}$;7 : $\alpha + \beta + \text{random}$.

Dans cette partie, nous avons examiné les matrices de transfert et les diagrammes simplifiés pour les températures de 40°C et 50°C.

Au niveau de 40°C (Figure 59A), nous observons une interaction de niveau faible entre la structure en hélice et celle en feuillet beta ; 20% des spectres ont une probabilité de passer d'une structure en hélice à une structure en feuillet et vice versa. La structure aléatoire est en interaction avec la structure en feuillet avec la même probabilité de transition. Les structures présentent une équiprobabilité de stabilité (80%) et sont maintenues par deux boucles de rétrocontrôle neutre. Ce résultat est en corrélation avec celui obtenu à pH 4,5.

À 50°C (Figure 59B), nous observons quatre conformations reliées par des interactions de faible niveau, bien que la stabilité soit variable d'une structure à une autre. Les structures alpha et random sont équiprobables (80%), tandis que la structure beta présente une probabilité de présence sans interaction de 60%. Le mélange structural alpha et beta apparaît avec une probabilité plus élevée que les autres. La dynamique transitoire est la même entre les hélices et les feuillets beta ; cependant, la transition des structures aléatoires vers les feuillets est plus importante que celle observée dans le sens inverse : preuve du caractère hautement dynamique des structures aléatoires précédemment mentionnées en milieu très acide. L'augmentation de la température fait apparaître une transition des hélices vers un mélange de conformation alpha/beta. Le système ici est maintenu grâce à deux boucles : une boucle de rétrocontrôle neutre et une boucle de rétrocontrôle négative.

Ainsi, au sein de la BSA, la conformation globulaire représente la forme la plus stable ; proche du point isoélectrique, la stabilité est moindre et une boucle de rétrocontrôle neutre permet le maintien des structures en hélice et en feuillet dites instables. Un comportement plus complexe est observé en milieu acide (parallèlement à haute température) où la tentative de maintien d'équilibre fait intervenir deux boucles : la dénaturation protéique entraîne donc le passage de

la forme stable à une forme faiblement désordonnée. Nous évaluerons dans la suite, grâce au calcul de l'entropie de structure, le degré de désordre induit par les différentes interactions dans les structures de la BSA.

L'analyse des structures à différentes températures révèle comment la stabilité et la dynamique des conformations de la BSA changent en réponse aux variations de température. La présence de boucles de rétrocontrôle dans les diagrammes de Markov suggère une régulation complexe des structures en fonction de la température.

En utilisant l'entropie de Shannon, nous pourrions quantifier le degré de désordre induit par ces interactions et comprendre comment la température influe sur la complexité structurale de la BSA. Cette approche systémique permet de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents qui gouvernent le comportement dynamique des protéines en réponse à des changements environnementaux.

D) Influence de la température sur l'entropie de structure

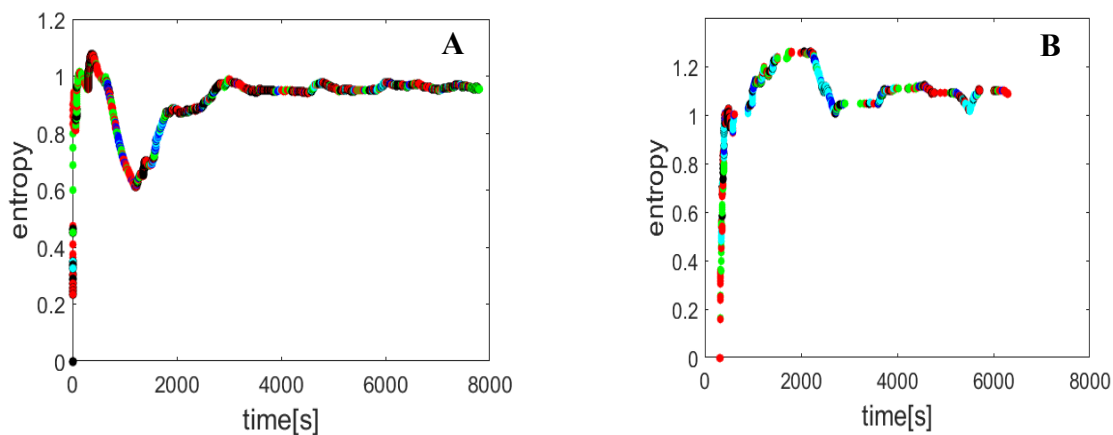


Figure 60/ dynamique de l'entropie pour 3000 spectres SERS de BSA obtenus à pH 7,6 pour différentes valeurs de températures : A) 40°C B) 50°C. Chaque point représente un spectre ayant une conformation spécifique dont les plus importantes sont : hélices α couleur rouge ; feuillet β couleur verte et random couleur bleu.

La Figure 60 présente la dynamique de l'entropie à pH 7.6 pour les températures de 40°C et 50°C. La décroissance observée à 40°C est attribuable aux effets d'adsorption. Bien que le nombre d'états soit différent pour les deux températures, l'entropie se stabilise à une valeur de 1 au bout de 2000 secondes à 40°C (Figure 60A) et continue à croître lentement et de manière continue pour atteindre une valeur maximale de 1,1 à 50°C (Figure 60B). La croissance exponentielle de l'entropie à 50°C indique une forte dynamique dans la série de spectres riche en structures secondaires (α , β , random).

En résumé, l'application de la méthode systémique à l'étude de la BSA nous a permis de mettre en évidence des boucles de rétrocontrôle, tantôt neutres, tantôt négatives, jouant un rôle crucial dans la régulation des conformations de la protéine. Nous avons également observé des

variations significatives du degré de désordre en fonction des conditions environnementales, notamment le pH et la température. Ces changements dans la complexité structurale peuvent avoir des implications importantes pour la fonction et la stabilité de la BSA dans différents milieux biologiques.

Dans la suite de cette étude, nous allons explorer l'application de la méthode systémique à l'analyse de l' α -synucléine, une autre protéine d'intérêt dont les propriétés structurales et fonctionnelles sont essentielles pour la compréhension des maladies neurodégénératives. Nous chercherons à identifier les boucles de rétrocontrôle spécifiques et à évaluer le degré de désordre associé à cette protéine dans différentes conditions. Cette approche systémique continue de se révéler prometteuse pour étudier les protéines complexes et leurs comportements dynamiques, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux.

III) Résultats des analyses : cas de l' α -synucléine

Après avoir examiné en détail les propriétés structurales de la BSA et identifié les boucles de rétrocontrôle régulant ses conformations en fonction du pH et de la température, nous allons maintenant appliquer la même approche systémique à une molécule d'intérêt : l' α -synucléine. Cette protéine est bien connue pour être intrinsèquement désordonnée, ce qui signifie qu'elle ne possède pas de structure tridimensionnelle bien définie dans son état natif.

En raison de cette nature désordonnée, nous nous attendons à observer des amplifications des propriétés déjà observées dans l'étude de la BSA. En effet, l' α -synucléine étant une protéine hautement dynamique et capable d'adopter différentes conformations en réponse à son environnement, nous anticipons une plus grande complexité dans les diagrammes de Markov associés à cette protéine.

L'analyse temporelle de l'évolution des structures de l' α -synucléine devrait révéler des changements significatifs en fonction des variations de pH et de température, reflétant sa nature intrinsèquement désordonnée. Nous pourrions observer des transitions rapides entre différentes conformations, ainsi qu'une plus grande variabilité dans les interactions entre les états.

A) Influence du pH sur les chaînes de Markov

pH 7,6 ; T=22°C

	α	β	Rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ rand
α	614	78	79	5	23	6	1
β	72	129	77	4	14	3	0
rand	73	8	318	8	34	5	3
$\alpha \beta$	5	5	7	1	4	1	0
α rand	38	12	38	2	15	3	0
β rand	4	2	2	2	2	0	0
$\alpha\beta$ rand	0	1	1	0	0	0	0

pH 4,5 ; T=22°C

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ rand
α	137	15	17	9	23	4	5
β	17	28	15	5	9	0	2
rand	21	11	60	2	13	2	1
$\alpha \beta$	7	1	4	1	13	1	5
α rand	24	9	13	12	31	3	5
β rand	3	1	1	2	4	0	0
$\alpha\beta$ rand	6	2	1	3	5	0	1

pH 3 ; T=22°C

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ rand
α	45	9	0	0	0	0	0
β	7	36	2	0	0	0	0
rand	2	2	17	0	0	0	0
$\alpha \beta$	0	0	0	0	0	0	0
α rand	0	0	0	0	0	0	0
β rand	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha\beta$ rand	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 13/ matrices de transfert des spectres SERS de l' α -synucléine obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : pH 7,6 ; pH 4,5 ; pH 3 ; rouge : structures dominantes ; vert : structures intermédiaires ; bleu: structures de passage; α : alpha; β : beta; rand: random.

Après avoir exploré les matrices de transfert et les diagrammes de Markov pour l' α -synucléine à différents pH (physiologique, 4,5 et 3), nous constatons une remarquable complexité dans ses structures, en accord avec sa nature intrinsèquement désordonnée.

À pH 7,6, nous avons observé une matrice de transfert de taille 7x7, avec trois structures dominantes (hélice, feuillet, et aléatoire) ; une structure intermédiaire ainsi que des interactions variées entre les états non diagonaux. Lorsque nous passons à pH 4,5, la matrice (7x7) est caractérisée par une structure majoritaire (hélice), trois structures intermédiaires ainsi que de plusieurs structures transitant d'une conformation à une autre. Enfin, à pH 3, la taille de la matrice est réduite (3x3) à trois états intermédiaires, indiquant une complexité moindre.

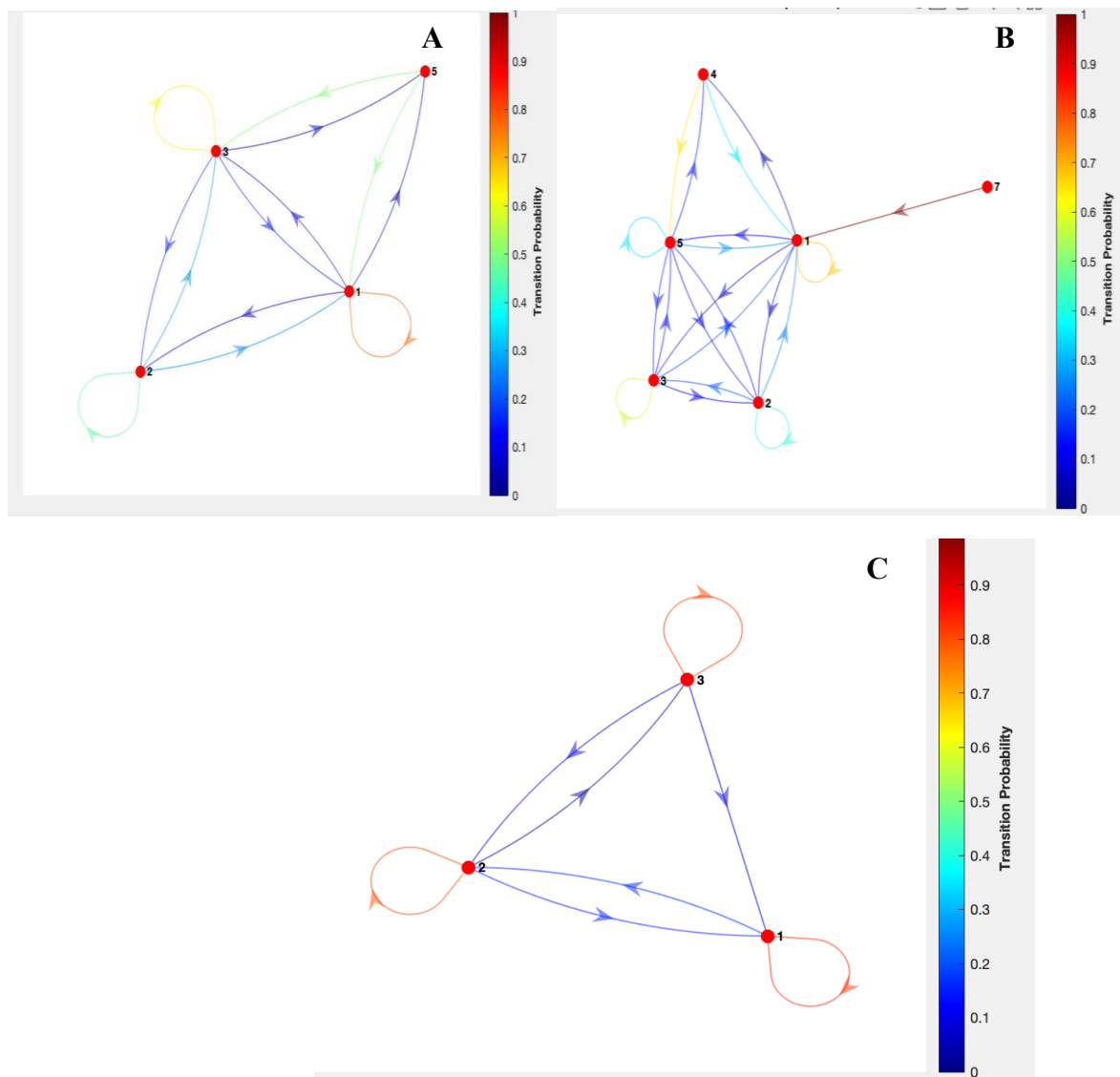


Figure 61/ diagrammes de Markov issus des matrices de transfert précédentes des spectres SERS de l' α -synucléine obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7.6 B) pH 4.5 C) pH 3; 1: α ; 2: β ; 3: random; 4: $\alpha + \beta$; 5: $\alpha + \text{random}$; 6: $\beta + \text{random}$; 7: $\alpha + \beta + \text{random}$

Les diagrammes de Markov dérivés de ces matrices révèlent des dynamiques différentes pour chaque pH.

À pH physiologique, l' α -synucléine présente une stabilité relative avec une dynamique plus marquée au sein des feuillets β .

À pH 4,5, la protéine adopte quatre structures, avec une dynamique importante entre les hélices et les structures aléatoires, ainsi qu'entre les hélices et le mélange structural.

Enfin, à pH 3, les structures en feuillets sont moins stables, et une relation linéaire entre les structures instables est mise en évidence, associée à une quasi-stabilité souvent attribuée aux phénomènes d'adsorption et d'agrégation. Ces résultats suggèrent que les protéines intrinsèquement désordonnées comme l' α -synucléine adoptent des comportements dynamiques plus complexes que les protéines stables.

Leur capacité à explorer rapidement différentes conformations en réponse aux variations de leur environnement les rend particulièrement intéressantes pour étudier les mécanismes moléculaires liés aux maladies neurodégénératives.

En poursuivant notre approche systémique, nous espérons mieux comprendre les interactions et les transitions structurelles de l' α -synucléine, ouvrant ainsi de nouvelles pistes pour la recherche de traitements ciblés pour les maladies associées à cette protéine.

Comme mentionné dans le chapitre précédent, la complexité des matrices de transfert reflète le degré de désordre et de complexité observé dans les structures des protéines. Ainsi, les diagrammes de Markov seront plus complexes à pH 7 et pH 4,5 qu'à pH 3.

Les diagrammes représentés sur la Figure 61 sont dérivés des matrices de transfert représentées dans le Tableau 13. Les états stationnaires (ceux sur la diagonale) sont aux nœuds des diagrammes et les états transitoires sont représentés par des flèches.

Sur ces diagrammes (Figure 61), il est facile de remarquer que le nombre de transitions et d'états est plus élevé à pH 4,5. Dans un environnement très acide, l' α -synucléine semble donc adopter une conformation plutôt stable ; le degré de désordre est maximal près du point isoélectrique de la protéine.

La complexité de ces diagrammes sera mieux appréciée sur les diagrammes réduits (Figure 62). Ces diagrammes synthétisent les interactions entre les différentes structures de l' α -synucléine à trois pH distincts, offrant une vue d'ensemble claire et concise de ses comportements dynamiques en fonction des conditions environnementales.

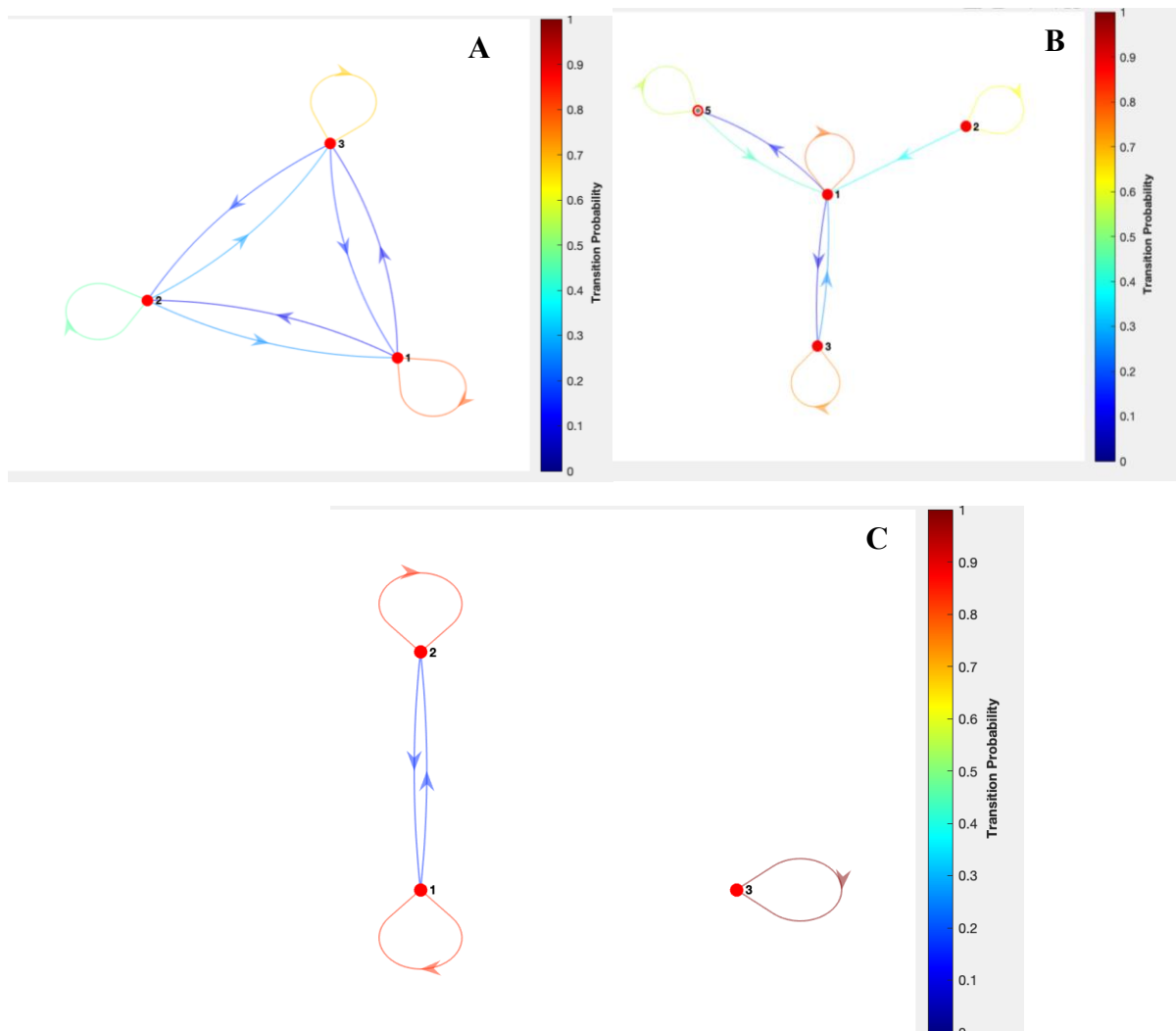


Figure 62/ diagrammes de Markov simplifiés issus des diagrammes précédents des spectres SERS de l' α -synucleine obtenus à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3; 1 : α ; 2 : β ; 3 : random ; 4 : $\alpha + \beta$; 5: α +random ; 6 : $\beta + \text{random}$; 7 : $\alpha + \beta + \text{random}$.

En examinant la structure simplifiée de l' α -synucleine pour les trois pH, des différences marquantes apparaissent.

Au pH physiologique (Figure 62A), l'hélice présente une probabilité de stabilité de 80%, les feuillets de 45%, et la structure aléatoire de 70%. Trois boucles de rétroaction modulent les transitions entre ces structures : la première, de polarité neutre, est formée par des interactions faibles (20%) entre les hélices et les structures aléatoires, rendant ces conformations relativement instables. Deux boucles de polarité négative sont ensuite observées : l'une entre les hélices et les feuillets, avec une transition de 40% des spectres entre ces structures dans les deux sens, et l'autre entre les feuillets et les structures aléatoires, également avec une transition de 40% dans les deux sens. La dynamique est ainsi plus accentuée au sein du feuillet β , où les interactions avec d'autres conformations sont plus fréquentes.

À pH 4,5 (Figure 62B), la diversité structurale s'accroît avec la présence de quatre structures : l'hélice stable à 80%, le feuillet à 75% de stabilité, la structure aléatoire à 75%, et un mélange de structures hélice et aléatoire avec une stabilité de 50%. La dynamique est maintenant

représentée par deux boucles de polarité négative : la première, entre les hélices et les structures aléatoires, conduit à une transition de 20% entre ces deux conformations, et la seconde, entre les hélices et le mélange structurel, induit une transition de 20% des hélices vers le mélange et 40% dans la direction opposée. La structure en feuillet continue d'interagir principalement avec les hélices, avec une probabilité de 40%. Ces résultats concordent avec nos observations précédentes, montrant une augmentation du nombre de structures secondaires, reflétant une augmentation du désordre entre les molécules.

Dans un environnement très acide (Figure 62C), la complexité des interactions est réduite. La stabilité des hélices et des feuillets est de 80%, tandis que celle des structures aléatoires atteint 90%. La structure aléatoire, relativement indépendante des autres conformations, interagit néanmoins à un niveau modéré avec la structure en feuillet bêta, avec une transition de 20% entre les deux structures. À pH 3, nous observons une relation linéaire entre les structures instables, marquée par une boucle de rétroaction à polarité neutre. L'acidité transforme donc les structures en feuillets en structures faiblement instables, illustrant une forme de "quasi-stabilité" qui est davantage attribuée, dans la littérature, aux effets d'adsorption et aux phénomènes d'agrégation des molécules de protéines.

Ainsi, les résultats obtenus pour l' α -synucléine, en tant que protéine intrinsèquement désordonnée, montrent une dynamique complexe, sensible aux variations de pH. Cette flexibilité conformationnelle pourrait être liée à des rôles fonctionnels essentiels dans la régulation de processus cellulaires spécifiques. Par conséquent, la compréhension approfondie de ces comportements dynamiques ouvre la voie à de nouvelles perspectives dans la recherche sur les maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, et pourrait s'avérer cruciale pour le développement de thérapies ciblées visant à moduler les conformations bénéfiques de l' α -synucléine et à prévenir la formation d'agrégats pathologiques.

En poursuivant notre analyse, nous avons constaté que les résultats obtenus pour l' α -synucléine, en tant que protéine intrinsèquement désordonnée, présentent des caractéristiques dynamiques distinctes par rapport aux protéines stables étudiées précédemment. En effet, les protéines intrinsèquement désordonnées sont connues pour leur capacité à adopter une multitude de conformations flexibles et dynamiques, leur permettant d'interagir avec une grande variété de partenaires moléculaires et de jouer des rôles fonctionnels importants dans la régulation cellulaire.

Les diagrammes de Markov réduits (Figure 62) nous révèlent une diversité de conformations de l' α -synucléine à différents pH.

Au pH physiologique, nous observons une répartition équilibrée entre les hélices, les feuillets et les structures aléatoires, illustrant la flexibilité de cette protéine dans des conditions normales. Les boucles de rétroaction modulent les transitions entre ces conformations, reflétant ainsi une dynamique significative entre les différentes structures.

À pH 4,5, la complexité des interactions augmente, avec quatre conformations distinctes. Les hélices et les feuillets conservent leur stabilité, mais la structure aléatoire et le mélange de structures hélice/structure aléatoire gagnent en importance. Cette diversité accrue de conformations pourrait être liée à des conditions légèrement acides, qui pourraient faciliter l'exploration de multiples états conformationnels.

Enfin, à pH 3, nous observons une réduction de la complexité, avec trois conformations intermédiaires. L'acidité conduit à une relation linéaire entre les structures instables, générant une forme de stabilité relative dans cet environnement très acide. Cependant, il est important de noter que cette "quasi-stabilité" observée chez l' α -synucléine intrinsèquement désordonnée est différente de la stabilité des structures rigides typiques des protéines stables.

Cette différence de comportement dynamique entre les protéines stables et les protéines intrinsèquement désordonnées soulève une question cruciale : **comment cette flexibilité conformationnelle influence-t-elle les fonctions biologiques de l' α -synucléine dans le contexte de la maladie de Parkinson et d'autres pathologies associées ?**

En étudiant les propriétés dynamiques de l' α -synucléine, nous nous attendons à amplifier les caractéristiques déjà observées pour les protéines stables, car les protéines intrinsèquement désordonnées ont une capacité intrinsèque à explorer un éventail beaucoup plus large de conformations. Cette flexibilité pourrait être un facteur clé dans la régulation de la formation d'agrégats et d'interactions spécifiques avec d'autres protéines impliquées dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson.

Ainsi, en combinant les connaissances acquises sur la BSA avec l'analyse détaillée de l' α -synucléine, nous espérons mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux propriétés dynamiques des protéines et leurs implications dans les maladies neurodégénératives. Cette avancée pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ciblées visant à moduler le comportement conformationnel de l' α -synucléine et d'autres protéines intrinsèquement désordonnées, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies neurologiques complexes.

B) Influence du pH sur l'entropie de structure

Regardons à présent la dynamique de l'entropie pour l' α -synucléine en Figure 63. Un point représente l'entropie d'un spectre de l' α -synucléine. Les différentes structures secondaires sont représentées par des couleurs : en rouge, l'entropie des spectres ayant une structure en hélice ; en bleu, une structure en feuillet ; en vert, une structure aléatoire ; et en cyan, le mélange de différentes structures.

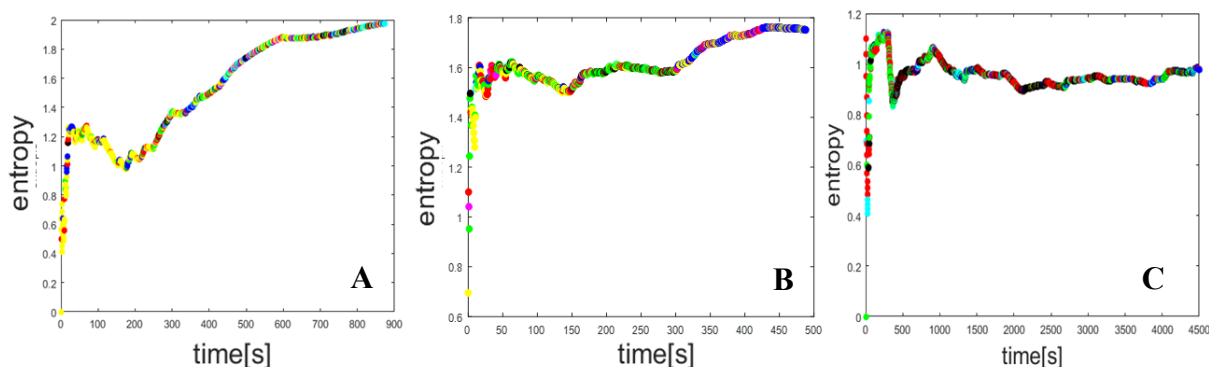


Figure 63/ dynamique de l'entropie des spectres SERS de l' α -synucléine observés à 22°C pour différentes valeurs de pH : A) pH 7,6 B) pH 4,5 C) pH 3. Chaque point représente un spectre ayant une conformation spécifique.

La figure 63 présente l'évolution de l'entropie de la structure obtenue à partir du Tableau 13. Cette évolution montre quatre phases distinctes :

1. Une croissance rapide pendant les premières secondes : Cette phase initiale est marquée par une augmentation rapide de l'entropie. Cela indique une forte dynamique structurale et une diversité d'états dans les molécules d' α -synucléine, conduisant à un degré élevé de désordre entre les molécules.
2. Une décroissance de l'entropie d'environ 100 s : Après la phase de croissance rapide, l'entropie commence à décroître pendant environ 100 secondes. Cette diminution peut être attribuée à des interactions spécifiques entre les structures secondaires de l' α -synucléine, qui peuvent réduire le nombre d'états accessibles et induire une certaine régularité.
3. Une entropie qui semble se stabiliser à une valeur proche de 1 pour pH 3 : À pH physiologique, l'entropie continue de croître lentement et ne semble pas atteindre la stabilité, même après 800 secondes. Cela reflète une forte dynamique structurale et une grande variabilité des états de la protéine, rendant les états de la structure non prédictibles et ne fournissant pas suffisamment d'informations.
4. Une entropie qui se stabilise après 100 secondes à une valeur d'environ 1,6 pour pH 4,5 : À pH 4,5, l'entropie croît lentement, et le système atteint finalement l'équilibre avec une valeur d'entropie proche de 1,6. Cette valeur reflète l'étalement de la structure et l'augmentation du nombre d'états possibles. Dans ce cas, le système est considéré comme fermé. Cependant, une oscillation est observée pendant les 100 premières secondes, suggérant un second cas où les molécules sont adsorbées. Dans ce scénario, l'adsorption des molécules sur un substrat induit des oscillations, et l'équilibre est atteint plus rapidement que dans le cas de forte adsorption.

L'évolution de l'entropie est faible à pH 4,5, ce qui est surprenant étant donné le nombre de boucles de rétroaction observées à ce pH. On s'attendrait à une entropie plus élevée, proche de celle observée à pH 7, mais les effets d'adsorption semblent être compensés à pH 4,5, ce qui entraîne une stabilité plus rapide.

Cependant, à pH 7 et 4,5, la diminution due aux effets d'adsorption disparaît, ce qui n'est pas le cas à pH 3. À pH 3, on observe à la fois des phénomènes d'adsorption et de désorption, et donc

un arrangement progressif de l'adsorption de l' α -synucléine sur le substrat. L'entropie augmente avec le temps et tend à se stabiliser après 500 secondes à une valeur assez faible proche de 1. Cette diminution du pH réduit le nombre de structures et favorise une conformation partiellement stable de l' α -synucléine.

En conclusion, l'étude de l'entropie de l' α -synucléine montre que cette protéine intrinsèquement désordonnée présente une forte dynamique structurelle, conduisant à un degré élevé de désordre entre les molécules. L'effet dynamique est amplifié à pH physiologique, ce qui rend les états de la structure non prédictibles. À pH 4,5, malgré une augmentation de l'entropie, les effets d'adsorption influencent la stabilité du système, tandis qu'à pH 3, les phénomènes d'adsorption et de désorption contribuent à la faible stabilité de la protéine. Ces résultats mettent en évidence l'importance de prendre en compte la dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées dans leur compréhension globale et leurs interactions avec l'environnement.

C) Influence de la température sur les chaînes de Markov

T=40°C ; pH 7,6

	α	β	rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ rand
α	84	4	4	1	3	3	1
β	7	21	12	1	7	4	3
rand	3	12	20	3	1	2	1
$\alpha \beta$	2	1	1	3	2	1	1
α rand	2	10	8	2	7	5	2
β rand	2	5	1	0	7	2	0
$\alpha\beta$ rand	3	1	0	1	4	0	4

T=48°C ; pH 7,6

	α	β	Rand	$\alpha \beta$	α rand	β rand	$\alpha \beta$ rand
α	203	21	8	11	9	1	2
β	24	198	30	7	3	2	2
Rand	14	30	56	3	5	0	0
$\alpha \beta$	15	8	0	23	11	2	17
α rand	6	4	9	15	8	1	3
β rand	2	1	0	1	2	0	0
$\alpha\beta$ rand	1	2	0	15	6	0	16

Tableau 14/ matrice de transfert issue de l'analyse des spectres SERS de l' α -Synucléine obtenus à pH 7,6 pour différentes valeurs de températures : 40°C ; 48°C ; rouge : structures dominantes ; vert : structures intermédiaires ; bleu : structures de passage ; α : alpha ; β : beta ; rand : random

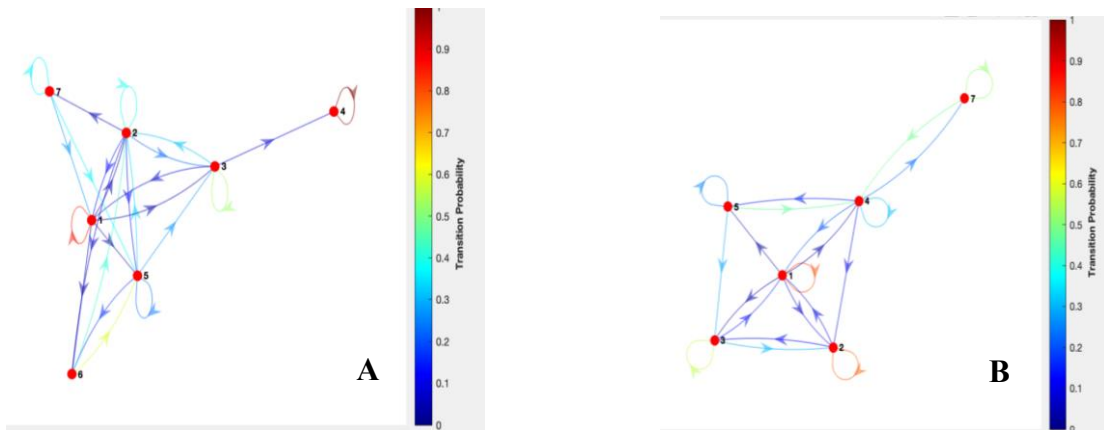


Figure 64/ diagrammes de Markov simplifiés issus des matrices de transfert précédentes des spectres de l' α -synucleine obtenus à pH 7,6 pour différentes valeurs de températures : A) 40°C B) 48°C; 1 : α ; 2 : β ; 3 : random ; 4 : $\alpha + \beta$; 5 : α +random ; 6 : $\beta + random$; 7 : $\alpha + \beta + random$.

Le Tableau 14 représente les matrices de transfert de taille 7X7 de la synucléine à pH 7.6 aux températures de 40°C et 48°C (Tableau 14). A 40°C, nous avons une matrice avec un seul élément majoritaire diagonal (rouge) et à 48°C, deux éléments majoritaires. Le nombre de transition est très élevé pour les deux températures.

D) Influence de la température sur l'entropie de structure

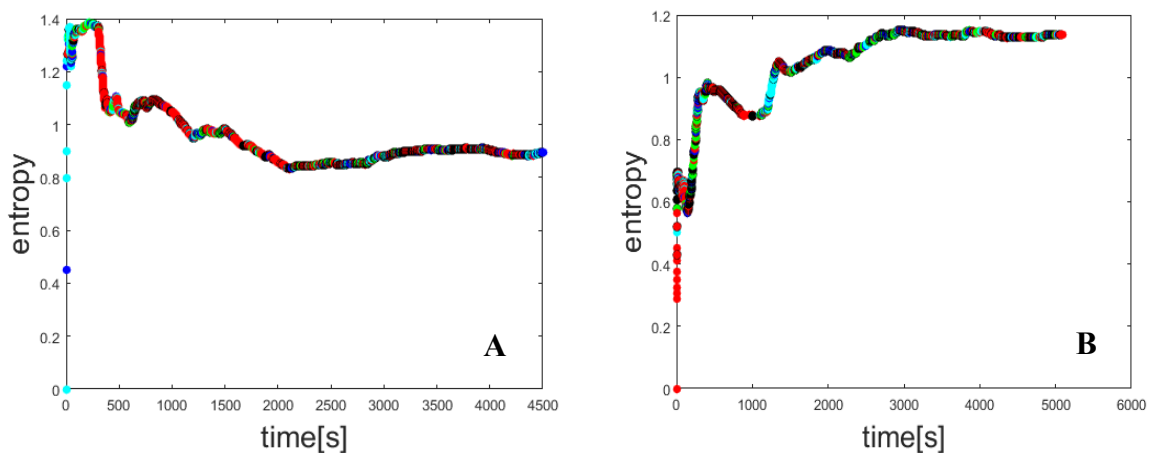


Figure 65/ dynamique de l'entropie pour 9000 spectres SERS de l' α -synucleine obtenus à pH 7.6 pour différentes valeurs de températures : A) 40°C B) 48°C.

La figure 65 présente la dynamique de l'entropie à pH 7,6 pour 9000 spectres à deux températures différentes : 40°C et 48°C.

À 40°C (figure 65A), l'entropie de l' α -synucléine croît très rapidement et atteint une valeur de 1,4, puis elle diminue lentement pour se stabiliser à environ 1. Cette valeur correspond à

l'entropie typique des protéines faiblement stables, comme observé dans le chapitre 4. Ce résultat était prévisible étant donné que les diagrammes de Markov pour cette température ne présentaient qu'une seule boucle de rétroaction.

La diminution observée à 40°C est attribuable aux effets d'adsorption. L'adsorption de l' α -synucléine sur un substrat conduit à une réduction de l'entropie en rendant les molécules plus régulières dans leur arrangement, limitant ainsi le nombre d'états accessibles.

En revanche, à une température plus élevée de 48°C (figure 65), on observe une croissance de l'entropie qui tend à se stabiliser autour d'une valeur de 1,2. Cette entropie est certes faible, mais elle est en accord avec nos hypothèses selon lesquelles les températures élevées tendent à rendre l' α -synucléine partiellement ordonnée. L'augmentation de l'entropie par rapport à la température de 40°C est due à la plus grande variabilité des états de la protéine à des températures plus élevées, ce qui se traduit par une entropie plus élevée.

A partir de cette entropie, il est possible de compter le nombre de structures secondaires présentes dans chaque échantillon expérimental. De plus, il est intéressant de noter que l'équilibre est atteint plus rapidement à des températures élevées. Cela indique que les hautes températures favorisent une plus grande flexibilité et diversité structurale de l' α -synucléine, lui permettant d'atteindre un état d'équilibre plus rapidement qu'à des températures plus basses.

En conclusion, l'étude de l'entropie de l' α -synucléine à différentes températures révèle que des températures élevées augmentent la dynamique structurale de la protéine, entraînant une entropie plus élevée. En revanche, à des températures plus basses, les effets d'adsorption réduisent l'entropie en induisant un ordonnancement partiel des molécules. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la température dans la régulation des propriétés structurales de l' α -synucléine et soulignent le rôle crucial de la dynamique conformationnelle dans les processus biologiques associés à cette protéine

IV) Conclusion

En conclusion, ce chapitre a été dédié à l'étude approfondie de la structure et de la dynamique de l' α -synucléine, une protéine intrinsèquement désordonnée dont la pertinence est cruciale pour la compréhension de nombreuses pathologies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson. En utilisant une approche basée sur les diagrammes de Markov, nous avons analysé l'évolution de la structure et de l'entropie de l' α -synucléine en fonction du pH et de la température, deux facteurs clés qui influencent son comportement conformationnel.

Tout d'abord, nous avons étudié la protéine sérique bovine (BSA) en tant que référence, afin de valider notre approche méthodologique. Les résultats obtenus avec la BSA nous ont permis de confirmer que les diagrammes de Markov sont des outils efficaces pour caractériser la complexité structurale des protéines et pour appréhender les transitions conformationnelles entre différentes structures secondaires. Nous avons établi que la forme globulaire de la BSA n'est pas très dynamique contrairement à la forme cigare qui présente des conformations en hélice et en feuillet instable. Cependant, les différents diagrammes de Markov ainsi que le calcul

de l'entropie ont confirmé les résultats précédemment observés dans le chapitre 4 qui prévoyaient que le désordre s'accroissait dans les protéines stables lorsque le milieu devenait acide.

Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l' α -synucléine et avons analysé son comportement en fonction du pH. Nous avons observé que le pH avait un impact significatif sur le nombre et la stabilité des structures secondaires présentes dans la protéine. À pH physiologique, l' α -synucléine adopte une conformation hautement dynamique, caractérisée par une entropie élevée, favorisant ainsi une grande flexibilité moléculaire. En revanche, à des pH acides, l' α -synucléine tend à adopter une conformation moins désordonnée et plus stable, suggérant une diminution de la dynamique structurelle. Ceci confirme que les structures de cette protéine s'ordonnent lorsque l'acidité du milieu augmente. Comparé à la BSA, ici, les feuillets beta sont les conformations les plus instables.

De plus, nous avons examiné l'effet de la température sur la dynamique de l' α -synucléine. À des températures élevées, la protéine montre une plus grande variabilité structurale avec une entropie plus élevée, tandis qu'à des températures plus basses, les effets d'adsorption induisent une réduction de l'entropie, conduisant à un ordonnancement partiel des molécules.

Les connaissances acquises au cours de ce chapitre ouvrent la voie à de futures investigations pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent l' α -synucléine et pour explorer les implications de ses propriétés structurales dans les maladies neurodégénératives. Une meilleure caractérisation de l' α -synucléine pourrait fournir des pistes prometteuses pour le développement de thérapies ciblées visant à moduler son comportement conformationnel et à contrôler son rôle potentiellement délétère dans les pathologies associées.

Une perspective dans l'étude de la teneur en conformations secondaires serait d'utiliser le programme Simbiology pour évaluer le temps de stabilisation et d'équilibre de ces conformations. Après analyse, nous avons établi que les conformations en structures secondaires de la BSA parviennent à se stabiliser en atteignant des pourcentages précédemment obtenus au chapitre 4 pour des temps de l'ordre de 600 secondes. En revanche, dans le cas de l' α -synucléine, ces conformations ne tendent pas vers une stabilité car nous observons des intermittences sous forme discrète tant pour des temps faibles que pour des temps de simulation de quelques heures.

CONCLUSION GENERALE

Le parcours de cette thèse a été une exploration passionnante des mystères liés à la structure et à la dynamique des protéines, notamment lorsqu'elles interagissent avec des nanoparticules colloïdales d'or. Ces investigations revêtent une importance cruciale non seulement pour la biologie et la biophysique, mais également pour la médecine, en vue du développement de dispositifs médicaux innovants et parfaitement compatibles avec les systèmes biologiques. Cette conclusion générale synthétise les principaux enseignements de chaque chapitre et met en évidence les perspectives.

La spectroscopie Raman met en évidence expérimentalement que la structure des protéines, à la fois tridimensionnelle et quaternaire est d'une importance cruciale pour leur fonction biologique.

Au niveau de la structure tertiaire, nous avons constaté que chaque protéine possède une architecture spécifique, une sorte de pliage unique qui lui confère ses propriétés et sa fonction particulières (cas spécifique des protéines stables). Chaque pli et torsion de la protéine contribue à sa fonction précise dans l'organisme. Nous avons également exploré la structure quaternaire, qui se réfère aux interactions entre plusieurs chaînes polypeptidiques pour former une protéine fonctionnelle. Cette structure supérieure peut impliquer des sous-unités identiques ou différentes qui se combinent pour accomplir des tâches complexes.

Cependant, notre exploration de la structure des protéines ne s'est pas limitée aux protéines bien ordonnées et structurées. Nous avons également plongé dans le monde intrigant des protéines intrinsèquement désordonnées. Ces protéines défient la conception traditionnelle de la structure protéique, car elles ne suivent pas les schémas de pliage rigides que l'on trouve généralement. Au lieu de cela, elles sont hautement flexibles et dynamiques, adoptant une multitude de conformations en réponse à leur environnement. Cela élargit considérablement notre compréhension de la complexité structurale des protéines, en ouvrant la porte à de nouvelles opportunités de recherche.

Ces découvertes sur la structure des protéines a jeté les bases de nos travaux futurs, en nous incitant à explorer comment cette diversité structurale se traduit par des fonctionnalités biologiques variées. Elles soulignent également l'importance de comprendre les protéines dans leur ensemble, depuis leur structure la plus fondamentale jusqu'à leur rôle essentiel dans les processus biologiques, une compréhension qui pourrait un jour conduire à des avancées médicales et biotechnologiques révolutionnaires.

Dans le quatrième chapitre, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la structure secondaire des protéines, en nous concentrant particulièrement sur l'albumine sérique bovine (BSA). Au cours de cette exploration, nous avons utilisé une combinaison puissante de la méthode de Spectroscopie Raman exaltée de Surface (SERS) et de la microfluidique pour analyser de manière approfondie les modifications de la BSA en réponse à des variations de pH et de température.

Cette partie de la recherche a été essentielle pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la BSA est une protéine largement étudiée et utilisée comme modèle en biologie, ce qui en fait un sujet

idéal pour approfondir notre compréhension des structures secondaires protéiques. Ensuite, en utilisant la méthode SERS, nous avons été en mesure d'explorer les propriétés moléculaires de la BSA à l'échelle des molécules individuelles, offrant ainsi une résolution sans précédent dans l'analyse des structures protéiques.

L'une des questions clés abordées dans ce chapitre était de savoir comment la structure secondaire d'une protéine est liée à sa conformation globale. Les résultats ont clairement montré que ces deux aspects sont étroitement interdépendants. Lorsque nous avons modifié les conditions environnementales, en ajustant le pH et la température, nous avons observé des changements significatifs dans la structure secondaire de la BSA. Ces modifications sont importantes car elles influencent directement la conformation tridimensionnelle globale de la protéine.

Plus spécifiquement, à mesure que le pH changeait, nous avons observé des transitions de phases fascinantes de la BSA. Ces transitions ont été caractérisées par des changements conformationnels spectaculaires, allant de la forme globulaire à une forme plus étalée et dénaturée. Ces observations confirment la sensibilité de la BSA aux variations du pH, ce qui a des implications potentielles dans des contextes biologiques où les conditions acides ou alcalines sont prédominantes.

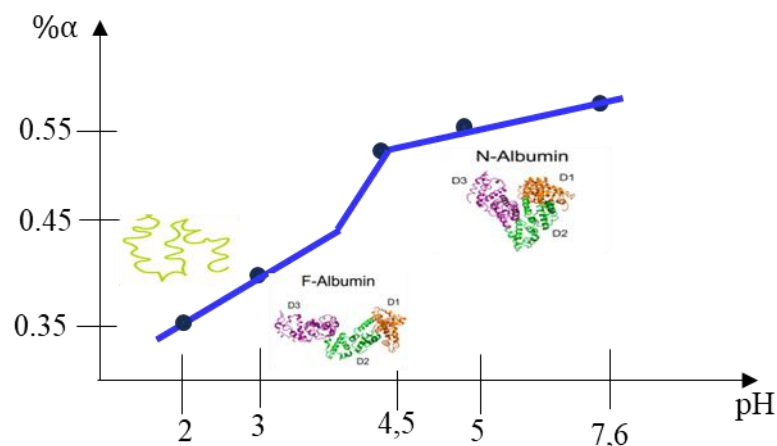


Figure 66/ identification des différentes conformations de la BSA en fonction de la teneur en hélice α .

De même, l'effet de la température a été minutieusement étudié, révélant que des températures plus élevées favorisaient la dénaturation de la BSA. Ces résultats sont en corrélation avec des travaux antérieurs sur les protéines, montrant que l'augmentation de la température peut entraîner une augmentation de l'entropie conformationnelle, contribuant ainsi à la déstabilisation de la structure native.

Nous avons mis en lumière des processus intriqués pour comprendre en profondeur les interactions entre les protéines et les nanoparticules, en mettant particulièrement l'accent sur l'influence significative des paramètres environnementaux tels que le pH et la température. Tout le long de cette thèse, nous avons tenté de comprendre comment les nanoparticules interagissent avec les protéines dans des conditions différentes, ce qui a permis de révéler un éventail impressionnant de résultats. Nous avons découvert que ces interactions complexes ne sont pas

simplement des phénomènes passifs, mais qu'elles sont fortement régies par des facteurs externes.

Nous avons soulevé l'importance cruciale de la taille et de la forme des nanoparticules dans le processus d'adsorption des protéines. Nous avons constaté que ces caractéristiques des nanoparticules jouent un rôle déterminant dans la cinétique d'adsorption et dans les conformations adoptées par les protéines une fois adsorbées. Ces découvertes ne sont pas seulement des éléments de connaissance académique, mais elles ont le potentiel de transformer notre capacité à concevoir des dispositifs médicaux plus sûrs et plus performants, ouvrant ainsi la voie à des avancées significatives dans le domaine de la biotechnologie et de la médecine.

L'étude de l' α -synucléine s'est révélée fascinante en comparaison de celle de la BSA. Cette protéine est intrinsèquement désordonnée, ce qui signifie qu'elle ne suit pas une structure tridimensionnelle rigide bien définie, mais plutôt qu'elle existe dans un état hautement flexible et dynamique.

L'une des questions clés que nous avons abordées dans ce chapitre concerne la façon dont l' α -synucléine réagit aux variations de pH et de température. Ces facteurs environnementaux ont été soigneusement choisis car ils sont susceptibles de refléter des conditions biologiques pertinentes, notamment au niveau des tissus cérébraux où les maladies neurodégénératives se développent. Les résultats de nos expériences ont révélé une plasticité conformationnelle remarquable de l' α -synucléine en réponse à ces variations.

Tout d'abord, en ce qui concerne les fluctuations du pH, nous avons constaté que l' α -synucléine réagit de manière significative. À un pH physiologique, cette protéine intrinsèquement désordonnée adopte une conformation hautement dynamique. Cela se traduit par une entropie élevée, ce qui favorise une grande flexibilité moléculaire. En revanche, lorsque le pH devient acide, l' α -synucléine tend à adopter une conformation moins désordonnée et plus stable. Cette observation suggère une diminution de la dynamique structurale de la protéine en réponse à l'acidité.

Cette réactivité de l' α -synucléine au pH a des implications importantes, notamment dans le contexte de la maladie de Parkinson. En effet, des conditions acides peuvent être présentes dans certaines régions cérébrales, et notre étude suggère que cela pourrait avoir un impact sur le comportement conformationnel de l' α -synucléine et, par conséquent, sur sa capacité à s'associer à d'autres molécules ou à former des agrégats pathologiques.

En ce qui concerne la température, nos résultats ont également fourni des informations cruciales. À des températures élevées, l' α -synucléine a montré une plus grande variabilité structurale, avec une entropie plus élevée. Cela suggère que des températures élevées peuvent induire un comportement plus flexible de l' α -synucléine, ce qui pourrait avoir des implications dans des contextes biologiques où la chaleur est un facteur prédominant.

Nous avons développé au chapitre 6 une approche qui s'est avérée pertinente et prometteuse dans les domaines de la biologie structurale et de la biophysique, car elle nous permet de mieux appréhender globalement le comportement des protéines hautement flexibles et dynamiques, qu'elles soient stables ou intrinsèquement désordonnées.

Le désordre protéique est désormais reconnu comme une caractéristique essentielle de la fonction biologique de certaines protéines. Contrairement aux protéines qui adoptent des

structures tridimensionnelles rigides et bien définies, de nombreuses protéines présentent des structures flexibles et en constante évolution. Pour caractériser ce désordre, l'approche systémique que nous avons introduite se révèle particulièrement appropriée, car elle tient compte des interactions complexes entre les différentes parties de la protéine et de leur influence sur la stabilité globale de la structure.

Au cœur de cette méthodologie se trouvent les chaînes de Markov, un outil puissant pour modéliser les transitions entre les différentes conformations de la structure secondaire d'une protéine. En calculant l'entropie de Shannon, nous sommes en mesure de quantifier de manière statistique le niveau de désordre présent dans la protéine. Cette approche nous donne ainsi une vision globale de la flexibilité et de la plasticité de la protéine, des informations cruciales pour comprendre comment elle interagit avec d'autres molécules et participe à des voies de signalisation complexes.

Les résultats obtenus avec la BSA ont confirmé que les diagrammes de Markov sont des outils efficaces pour caractériser la complexité structurale des protéines et pour appréhender les transitions conformationnelles entre différentes structures secondaires. Nous avons pu démontrer que la forme globulaire de la BSA n'est pas très dynamique, contrairement à la forme en cigare qui présente des conformations en hélice et en feuillet instable. De plus, les différents diagrammes de Markov ainsi que le calcul de l'entropie ont confirmé que le désordre s'accroît dans les protéines stables lorsque le milieu devenait acide.

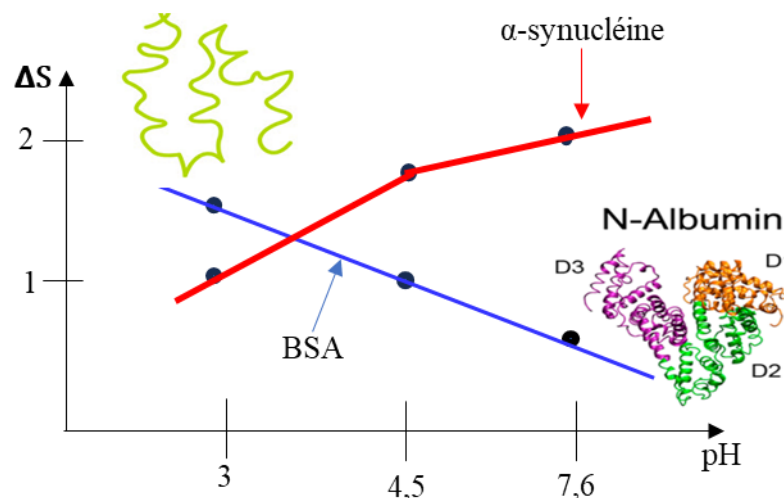


Figure 67/ variation d'entropie de la BSA et de la synucléine en fonction du pH : la BSA tend vers une conformation désordonnée en milieu acide ; le phénomène contraire est observé pour l'α-synucléine.

Ensuite, en se concentrant sur l'α-synucléine, nous avons pu observer comment cette protéine intrinsèquement désordonnée réagissait aux variations de pH et de température. Nos résultats ont montré que l'α-synucléine tendait à adopter une conformation plus stable en milieu acide, avec une diminution de l'entropie et une augmentation de la quantité de structure en feuillets. Cette observation a confirmé que les structures de cette protéine s'ordonnent lorsque l'acidité du milieu augmente.

Les recherches menées au cours de cette thèse marquent un jalon important dans la compréhension complexe des protéines et de leurs interactions avec les nanoparticules, mais elles ne représentent que le début d'un vaste domaine d'étude. Plusieurs axes de recherche

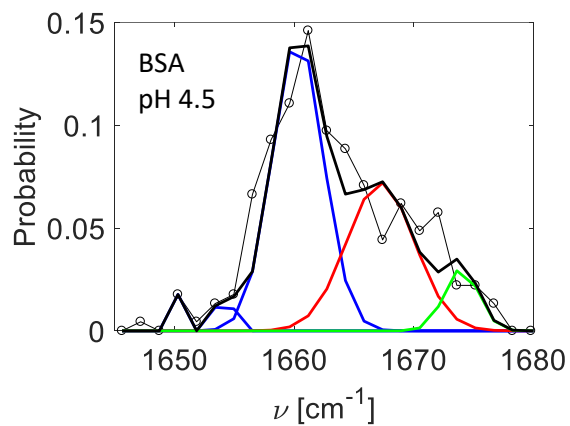
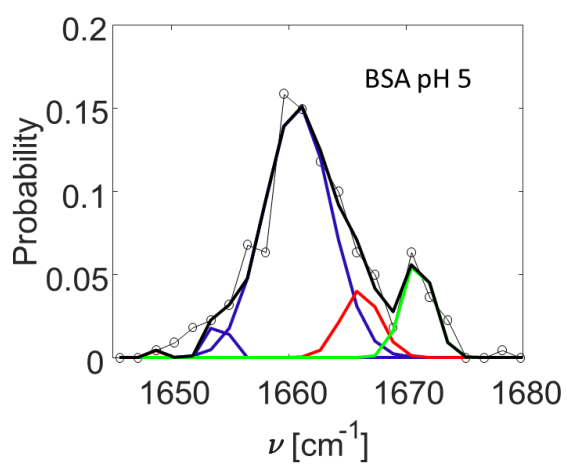
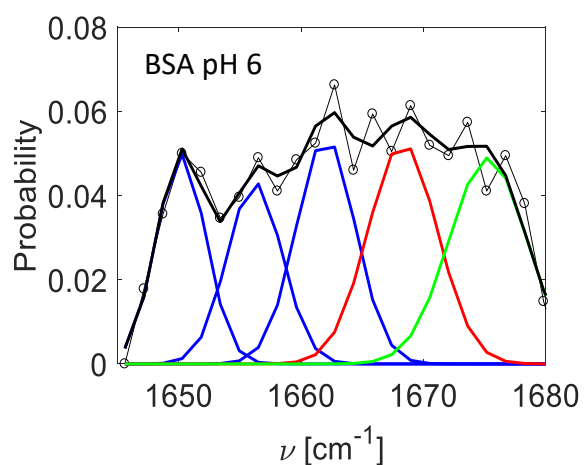
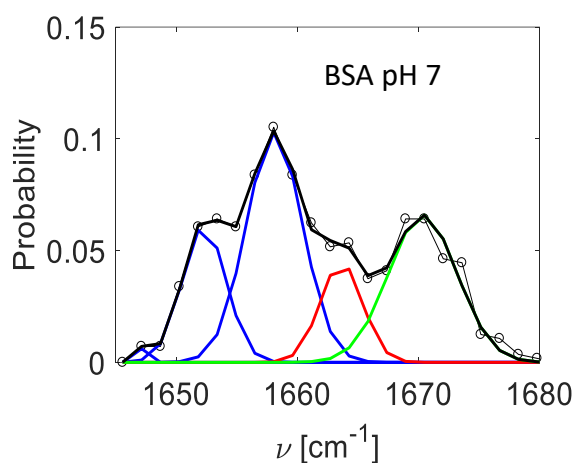
prometteurs peuvent être envisagés pour approfondir ces connaissances et les appliquer à des domaines clés de la biologie, de la biophysique et de la médecine :

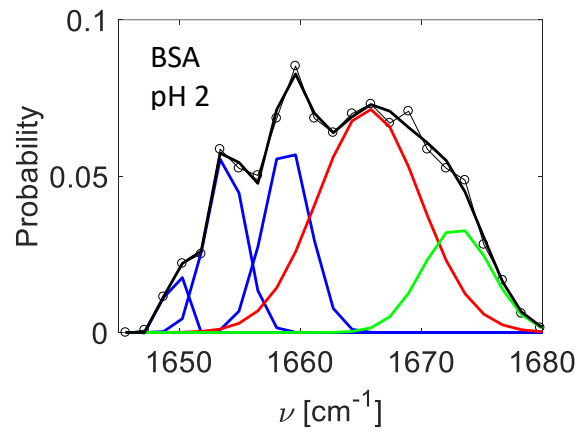
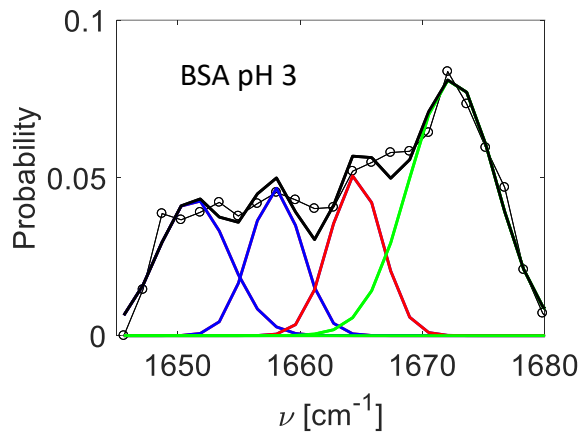
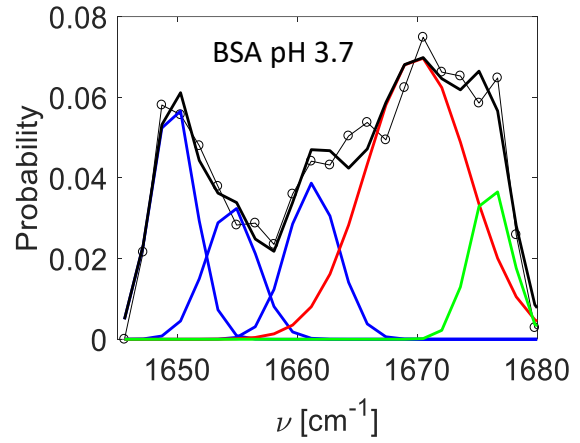
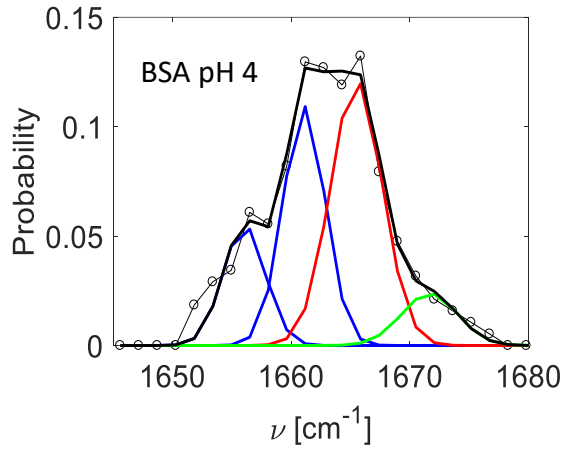
1. **Mécanismes d'agrégation protéique** : une direction de recherche potentielle consiste à explorer en détail les mécanismes d'agrégation des protéines. Les interactions entre les protéines et les nanoparticules peuvent favoriser l'agrégation, un processus lié à de nombreuses maladies neurodégénératives. Comprendre comment les nanoparticules influencent ces mécanismes d'agrégation pourrait conduire à de nouvelles stratégies pour prévenir ou traiter ces affections.
2. **Applications à d'autres protéines** : les méthodes et les approches développées au cours de cette thèse peuvent être étendues à l'étude d'autres protéines. Chaque protéine a des caractéristiques uniques, et en utilisant des techniques similaires, il est possible d'explorer comment différentes protéines interagissent avec des nanoparticules et comment ces interactions peuvent être modulées.
3. **Caractérisation de l' α -synucléine** : poursuivre la caractérisation de l' α -synucléine dans le contexte des maladies neurodégénératives est essentiel. Comprendre comment cette protéine se comporte dans différents environnements, notamment dans le cerveau, pourrait avoir des implications cruciales pour le développement de thérapies visant à moduler son comportement et à traiter des pathologies telles que la maladie de Parkinson.
4. **Nanotechnologie et médecine** : les connaissances acquises sur les interactions protéine-nanoparticule ont des applications potentielles dans le domaine médical. La conception de dispositifs médicaux biocompatibles peut bénéficier de ces découvertes pour améliorer l'efficacité des traitements et minimiser les effets secondaires.

En résumé, cette thèse a jeté les bases de recherches futures passionnantes. L'exploration des interactions protéine-nanoparticule, la caractérisation de la structure et de la dynamique protéiques, ainsi que l'application de méthodologies innovantes ouvrent la voie à de nouvelles découvertes et à des avancées importantes dans divers domaines scientifiques et médicaux. Ces travaux suggèrent que la compréhension des protéines et de leurs interactions complexes avec les nanoparticules continuera d'éclairer notre connaissance du monde biologique et de ses implications pour la santé humaine.

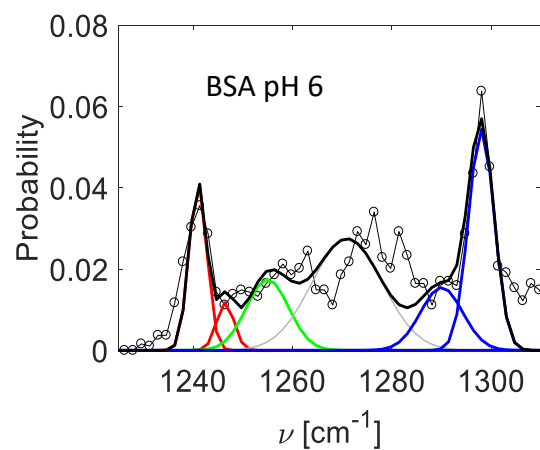
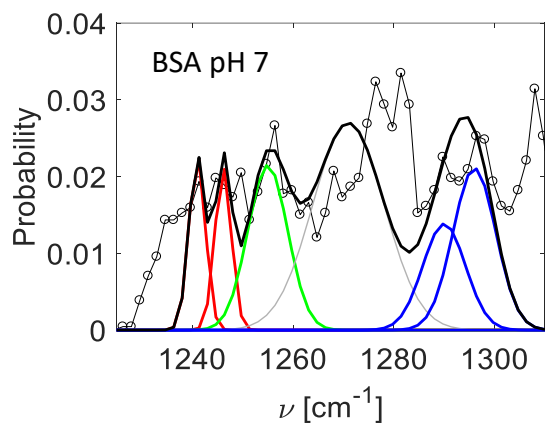
ANNEXE

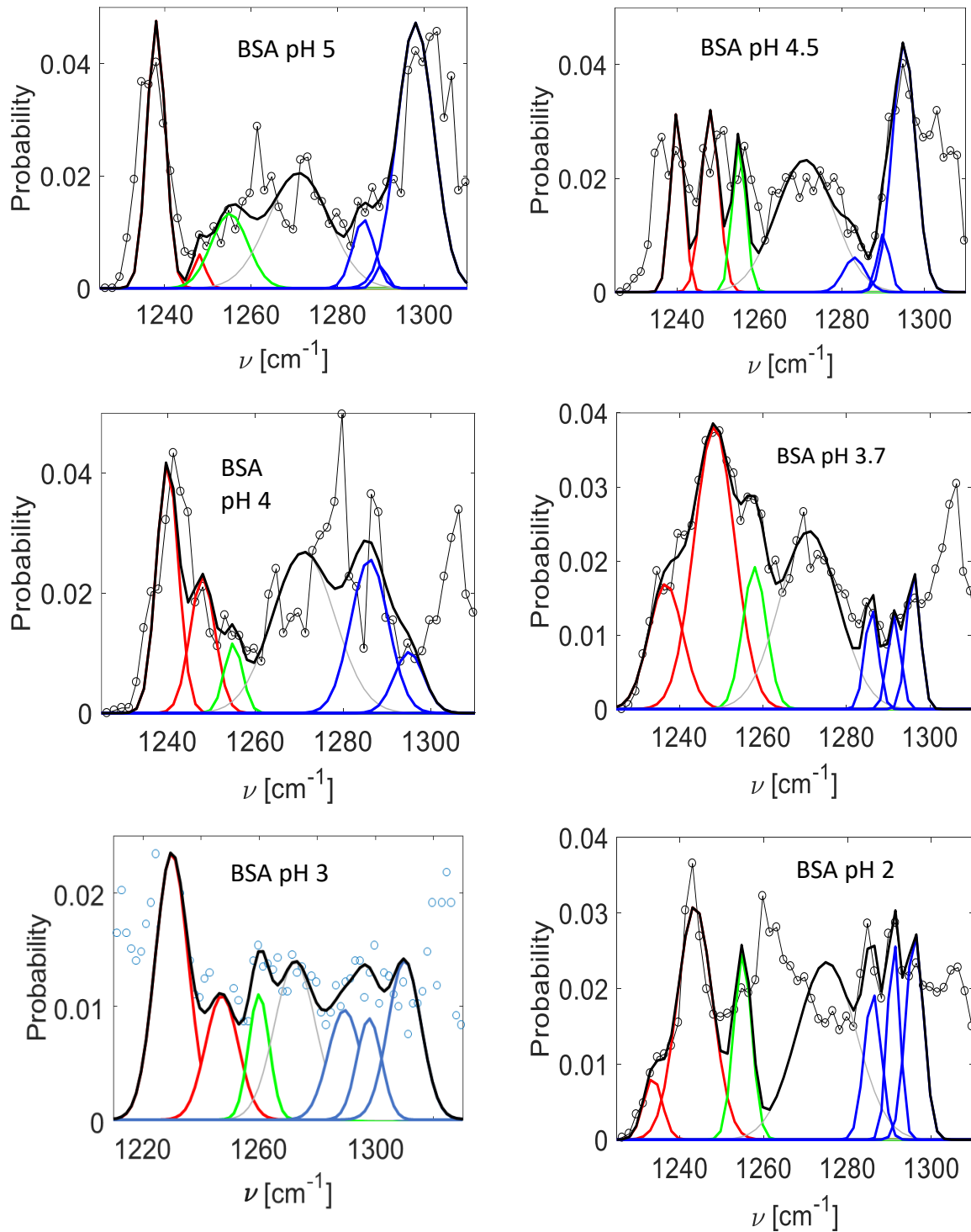
Partie A : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la BSA en fonction du pH : bande amide I



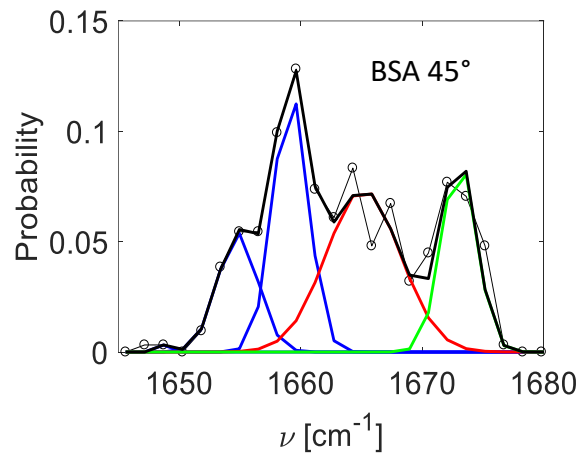
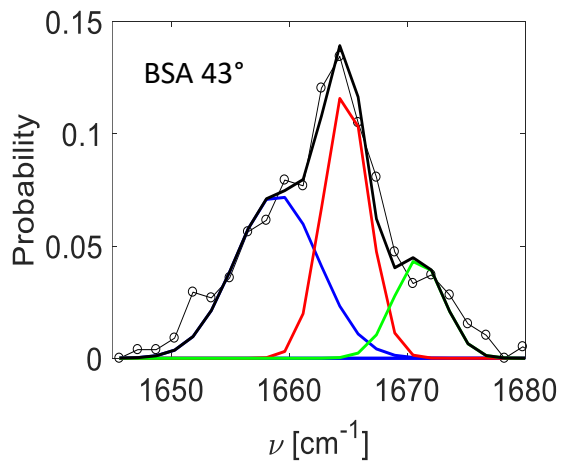
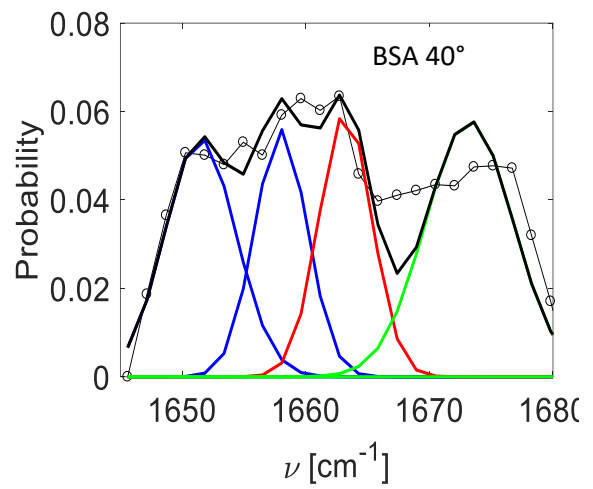
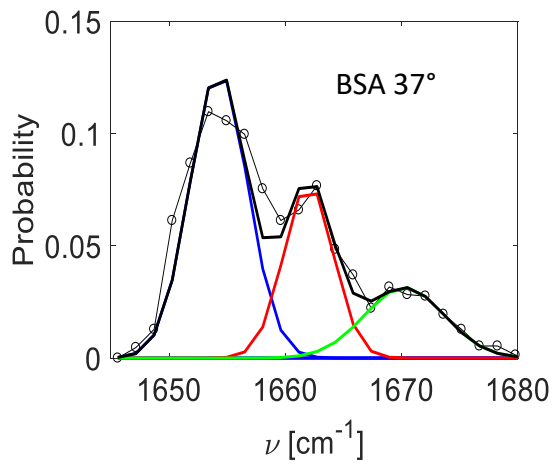
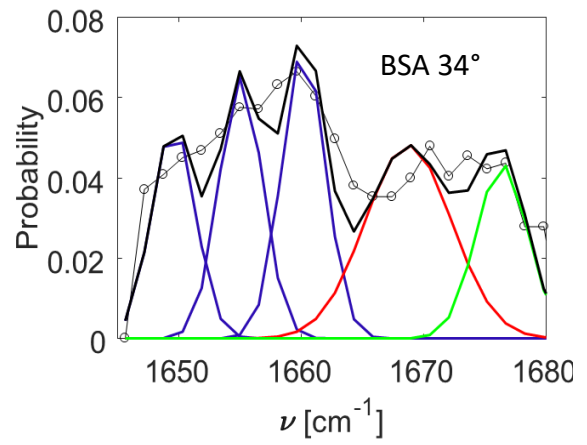
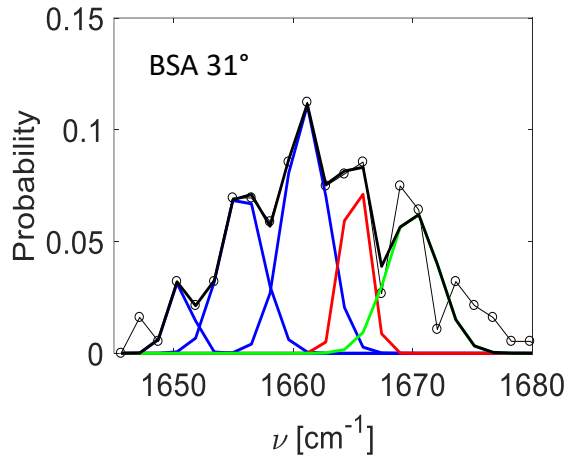


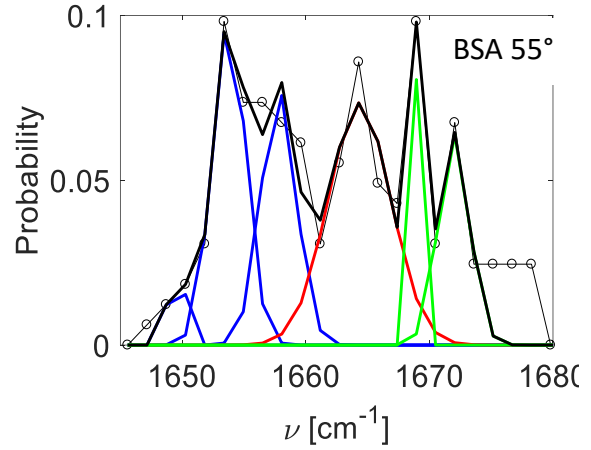
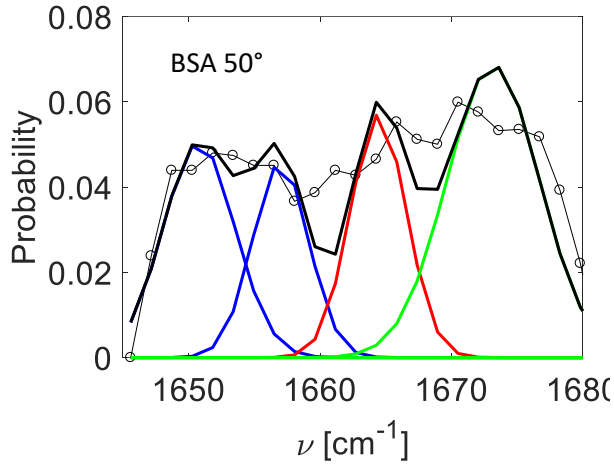
Partie B : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la BSA en fonction du pH : bande amide III



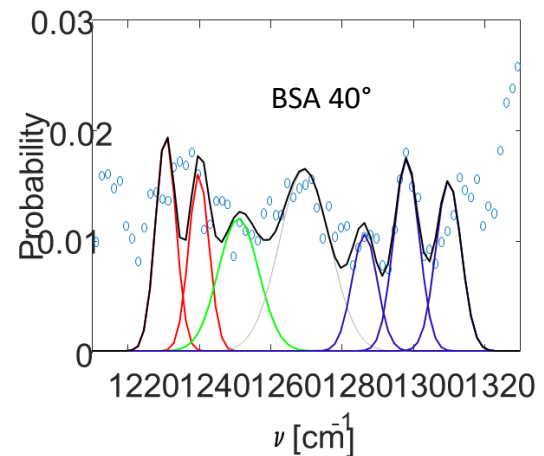
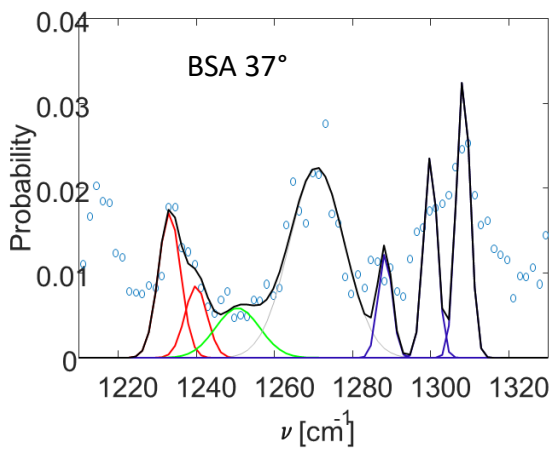
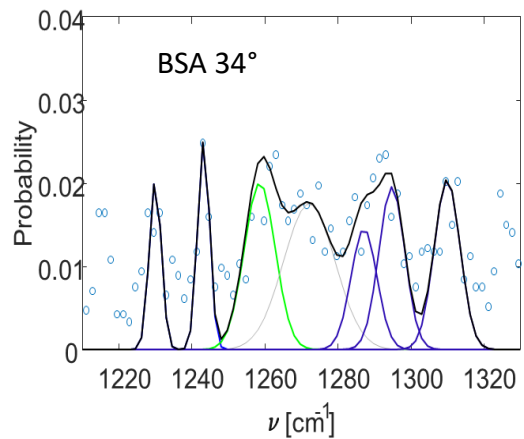
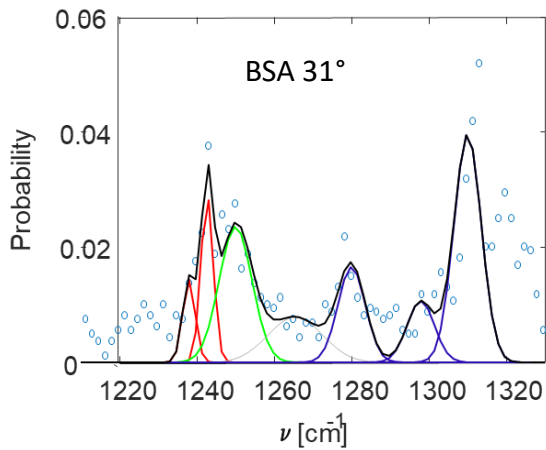


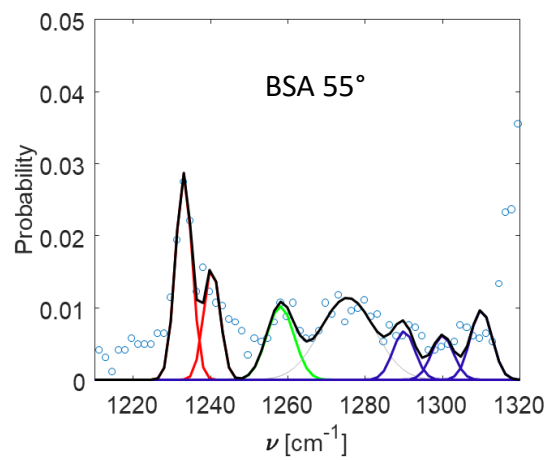
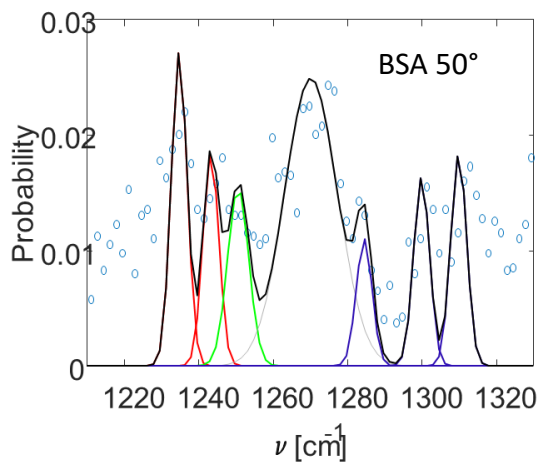
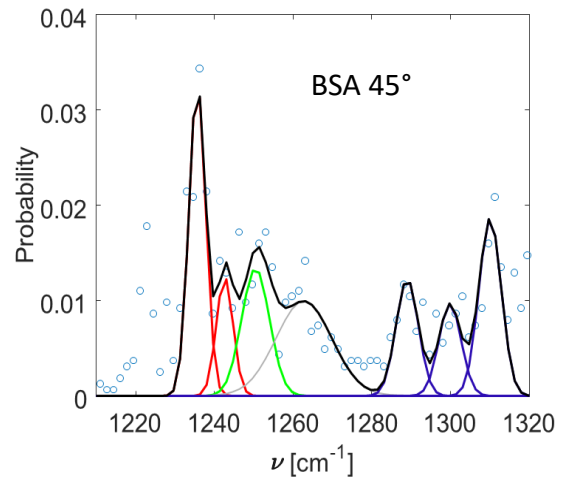
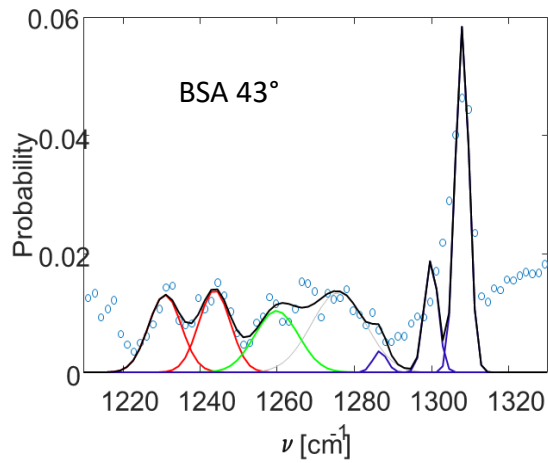
Partie C : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la BSA en fonction de la température : bande amide I



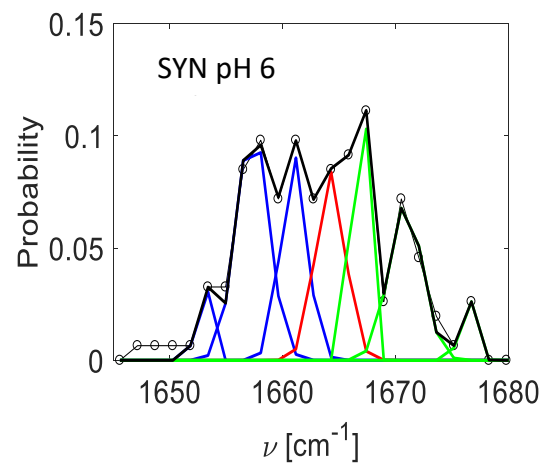
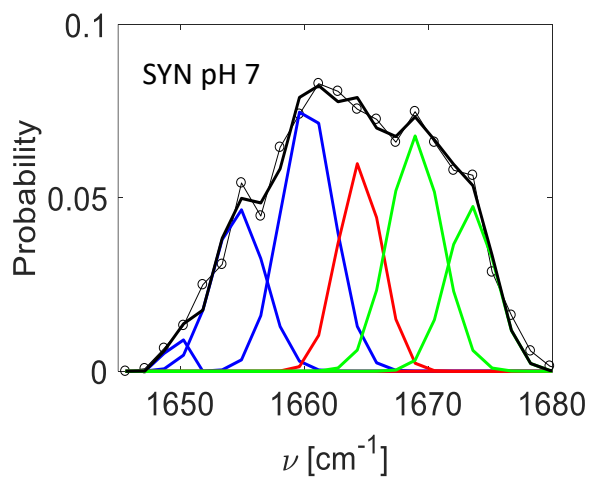


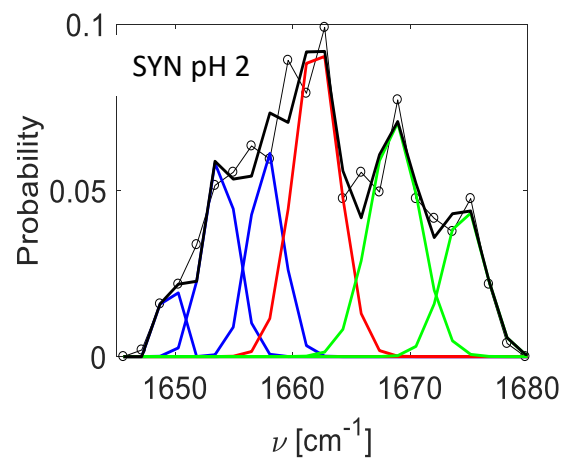
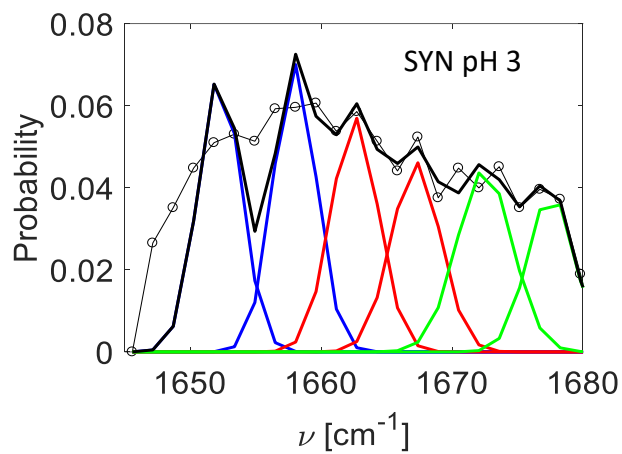
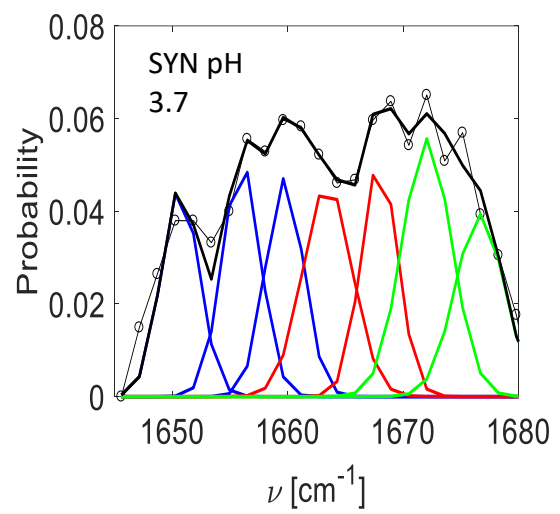
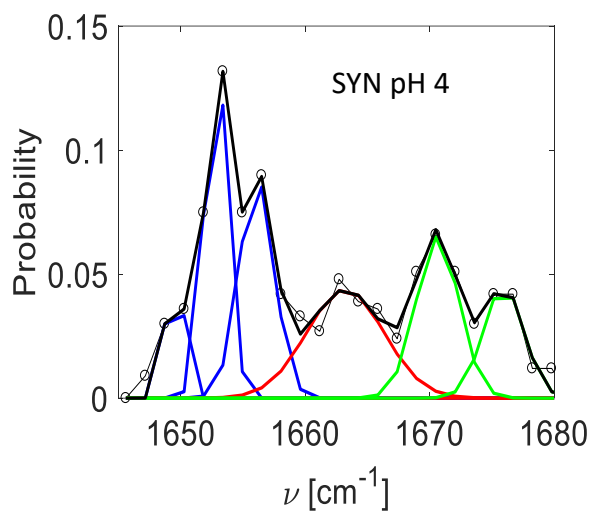
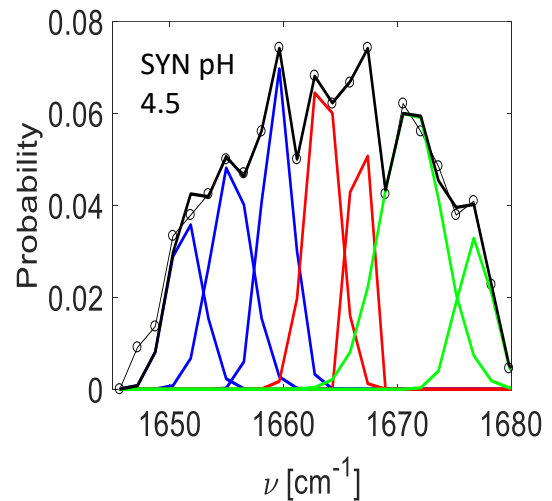
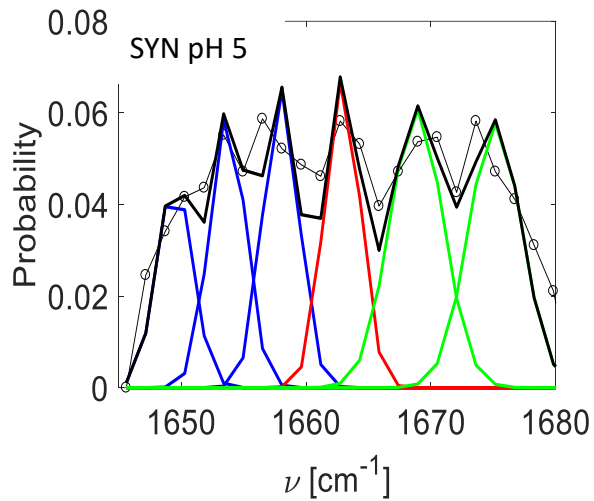
Partie D : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la BSA en fonction de la température : bande amide III



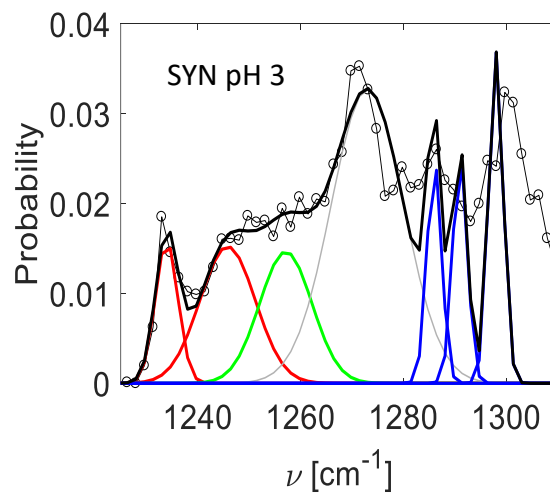
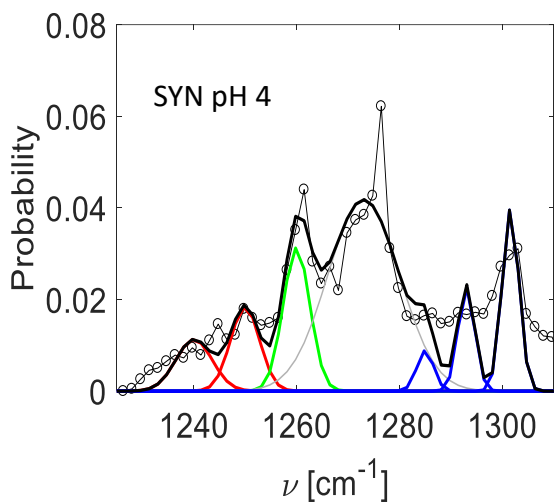
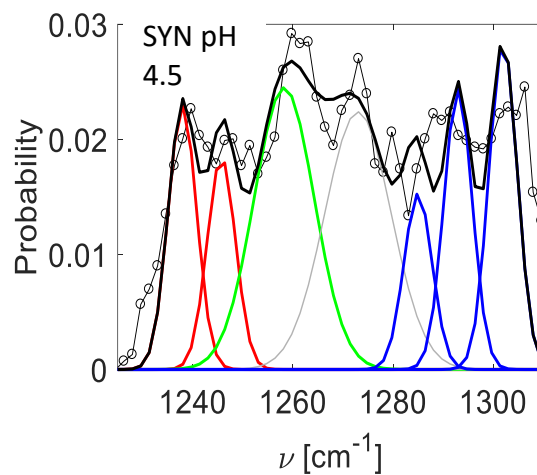
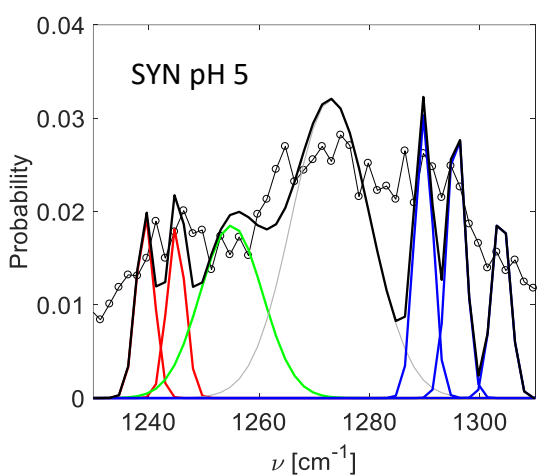
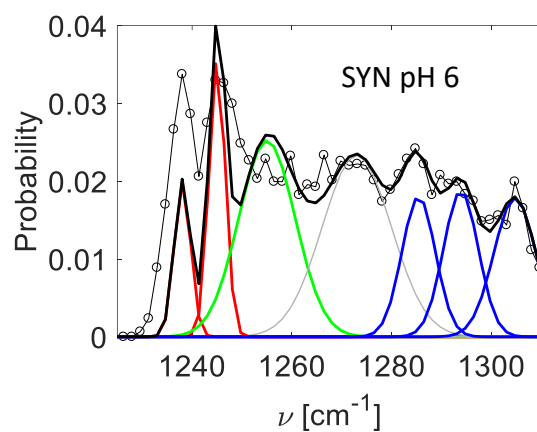
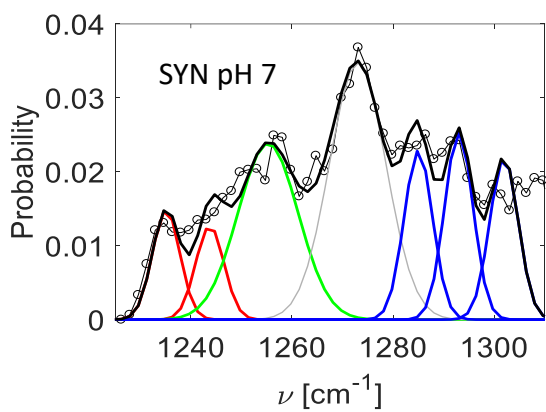


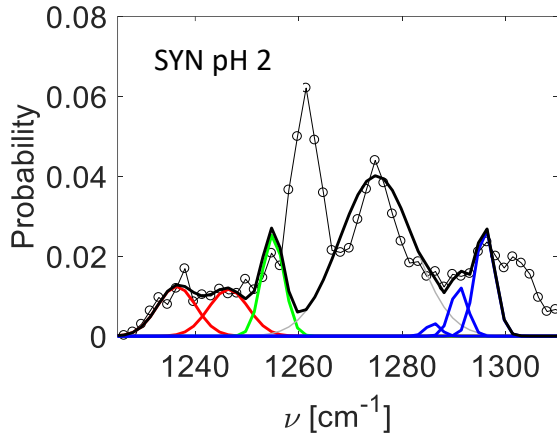
Partie E : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la Synucléine en fonction du pH : bande amide I



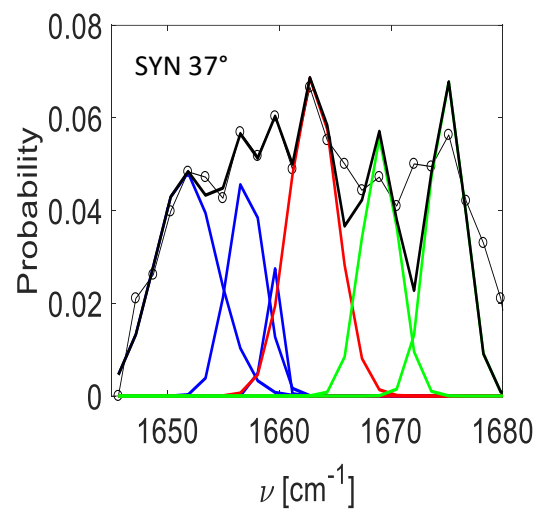
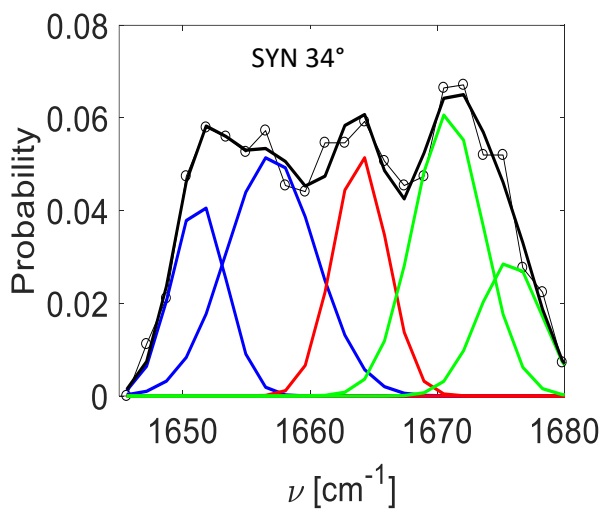
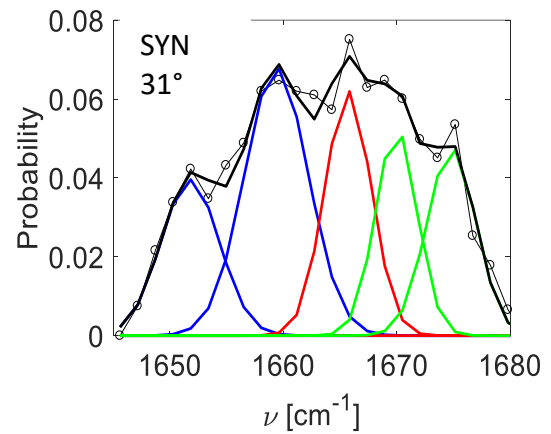
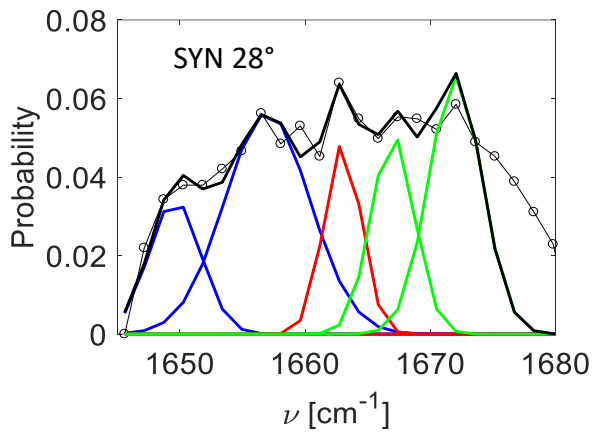


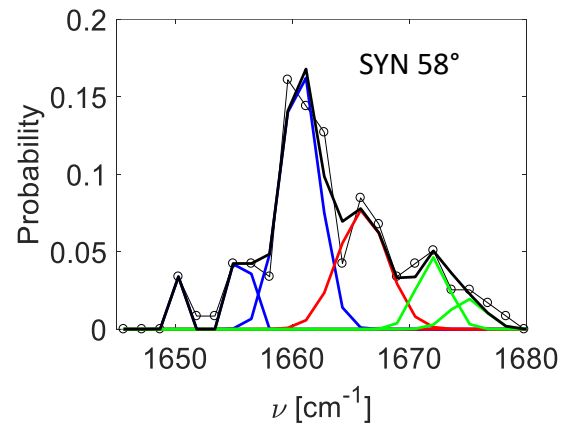
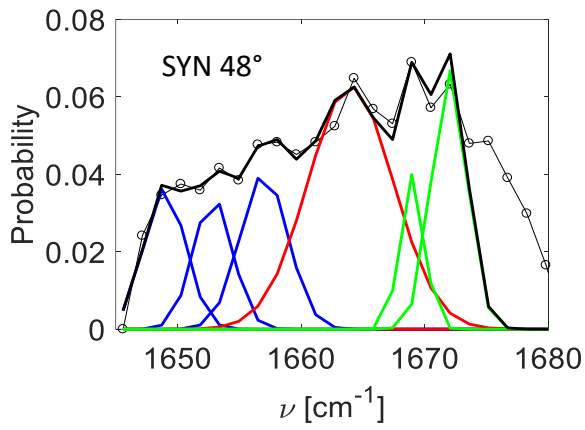
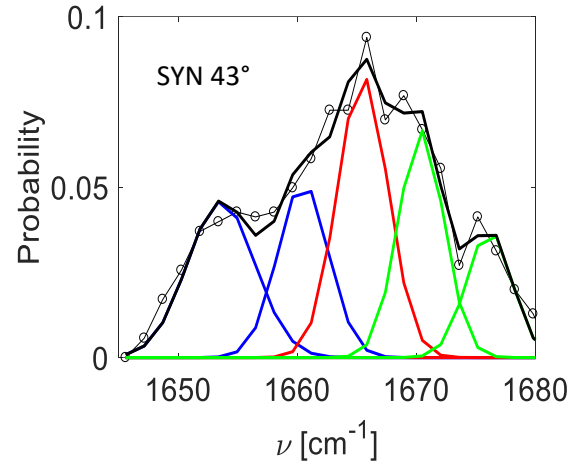
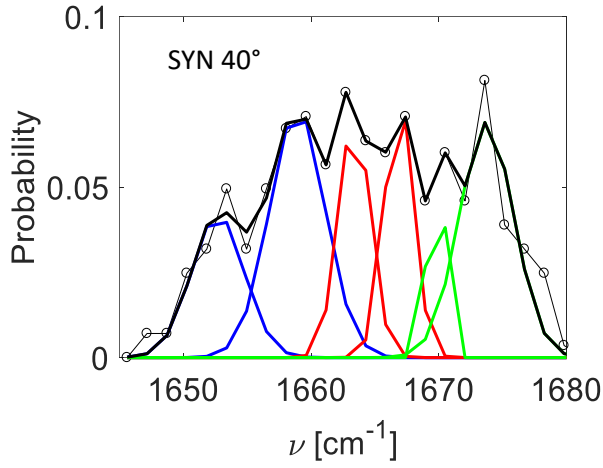
Partie F : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la Synucléine en fonction du pH : bande amide III



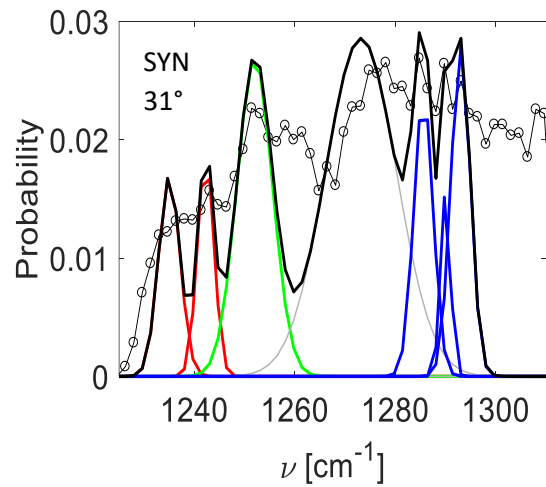
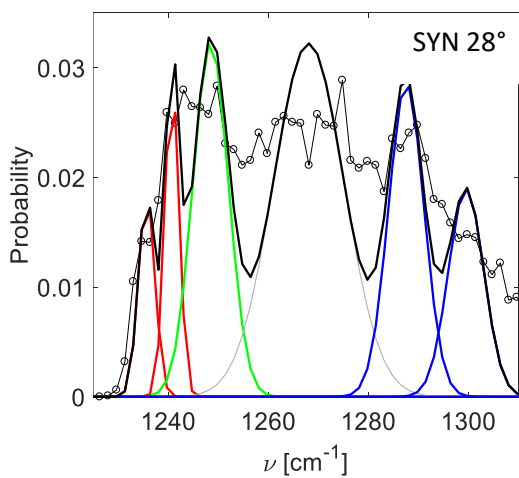


Partie G : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la Synucléine en fonction de la température : bande amide I

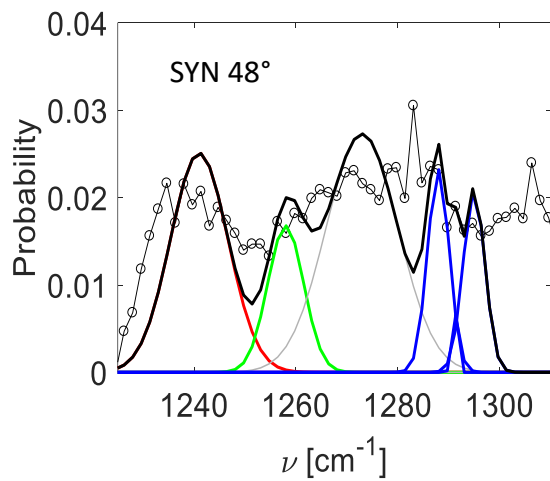
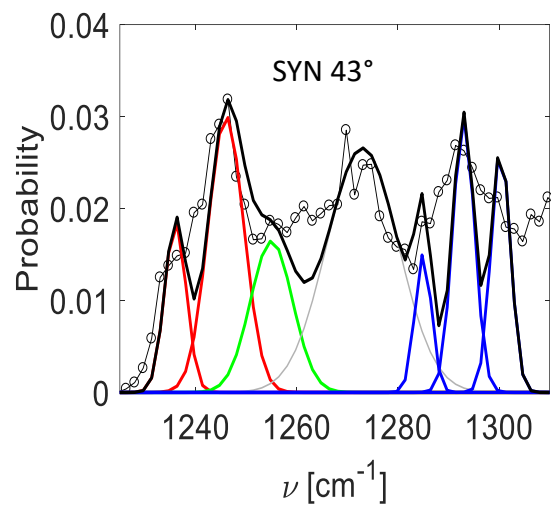
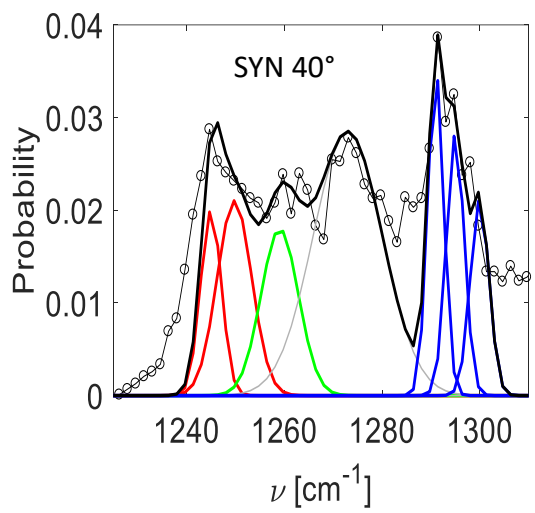
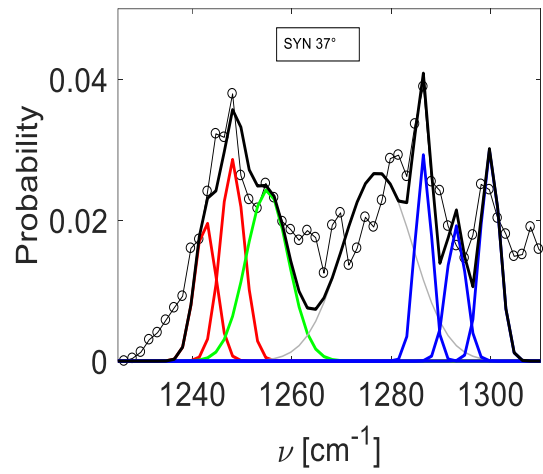
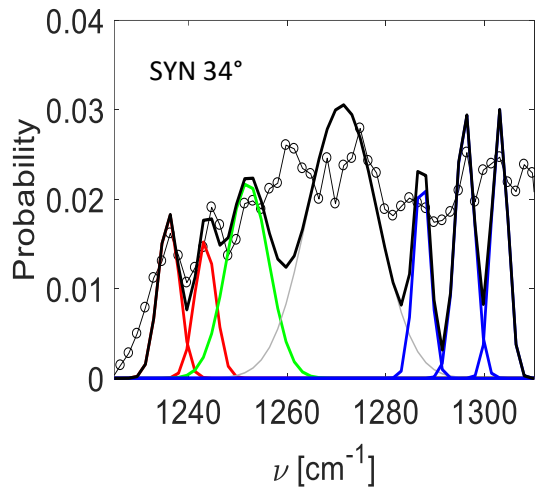




Partie H : Ajustement par les gaussiennes des densités de probabilité de la Synucléine en fonction de la température : bande amide III



SYN 37°



Références

- [1] J. (Tanford, C., & Reynolds, *A history of proteins*. 2003.
- [2] R. Boubeva, "Understanding tyrosine kinase domain plasticity through identification of protein residues involved in the control of the conformational transition," 2011.
- [3] H. J. Rheinberger, *Systèmes expérimentaux et choses épistémiques-ARN de transfert et ribosomes*. 2017.
- [4] F. Élie, "Analyse d'urine," pp. 1–11, 2009.
- [5] M. H. Odièvre, C. Lapouméroulie, and J. Elion, "Effect of hydroxyurea on adhesion proteins in sickle cell anemia," *Arch. Pediatr.*, vol. 16, no. 2, pp. 95–98, 2009, doi: 10.1016/j.arcped.2008.11.003.
- [6] U. Kikkawa, K. Ase, K. Ogita, and Y. Nishizuka, "The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion," *Gan To Kagaku Ryoho.*, vol. 13, no. 3 Pt 2, pp. 861–869, 1986.
- [7] S. Jaisson, A. Desmons, L. Gorisse, and P. Gillery, "Vieillesse moléculaire des protéines: Quel rôle en physiopathologie ?," vol. 33, no. Figure 1, pp. 176–182, 2017.
- [8] K. U. Linderstrom-Lang, "How is a protein made?," *Sci. Am.*, vol. 189(3), pp. 100–107, 1953.
- [9] P. EDMAN, "UNWINDING THE PROTEIN," *Carlsb. Res. Commun.*, vol. 42, pp. 1–9, 1976.
- [10] P. Koehl, "Protein structure classification," *Rev. Comput. Chem.*, vol. 22, pp. 1–55, 2006.
- [11] W. A., "The alpha-helix as an electric macro-dipole," pp. 1–63, 1976.
- [12] C. Chothia, M. Levitt, and D. Richardson, "Structure of proteins: packing of α -helices and pleated sheets," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 74, no. 10, pp. 4130–4134, 1977, doi: 10.1073/pnas.74.10.4130.
- [13] A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, and A. A. Makarov, "Polyproline-II helix in proteins: Structure and function," *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 12, pp. 2100–2132, 2013, doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.018.
- [14] M. Novotny and G. J. Kleywegt, "A survey of left-handed helices in protein structures," *J. Mol. Biol.*, vol. 347, no. 2, pp. 231–241, 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.01.037.
- [15] H. S. Chan and K. A. Dill, "Origins of structure in globular proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 16, pp. 6388–6392, 1990, doi: 10.1073/pnas.87.16.6388.
- [16] V. Den Bout, "GJVIIt-," vol. 268, no. August, 1977.
- [17] D. W. Weatherford and F. R. Salemme, "Conformations of twisted parallel beta-sheets and the origin of chirality in protein structures.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 1, pp. 19–23, 1979, doi: 10.1073/pnas.76.1.19.
- [18] M. L. Chiusano *et al.*, "Second codon positions of genes and the secondary structures of proteins. Relationships and implications for the origin of the genetic code," *Gene*, vol. 261, no. 1, pp. 63–69, 2000, doi: 10.1016/S0378-1119(00)00521-7.
- [19] Kuo Chen Chou and H. A. Scheraga, "Origin of the right-handed twist of β -sheets of poly(LVal) chains," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 22 II, pp. 7047–7051, 1982, doi:

10.1073/pnas.79.22.7047.

- [20] A. Merabet, "Influence du pH sur le spectre d'absorption des protéines fluorescentes: cas de la CERULEAN," 2012.
- [21] J. Yon-kahn, G. Hervé, and J. Yon-kahn, "La structure des protéines La structure des protéines".
- [22] I. D. Kuntz, G. M. Crippen, P. A. Kollman, and D. Kimelman, "Calculation of protein tertiary structure," *J. Mol. Biol.*, vol. 106, no. 4, pp. 983–994, 1976, doi: 10.1016/0022-2836(76)90347-8.
- [23] A. Singh, R. Kaushik, A. Mishra, A. Shanker, and B. Jayaram, "ProTSAV: A protein tertiary structure analysis and validation server," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1864, no. 1, pp. 11–19, 2016, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.10.004.
- [24] D. Pantaloni, "Glutamate dkshydrogknase," vol. 8, pp. 292–302, 1969.
- [25] L. U. Pierre, E. T. Marie, and A. Abraham, "Caractérisation et analyse évolutive des répétitions intragéniques : une étude au niveau des gènes , des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles," 2008.
- [26] A. Duclos *et al.*, "Propagation ultrasonore dans des gels modélisant les tissus biologiques To cite this version : HAL Id : hal-03378606 Propagation ultrasonore dans des gels mod ´ elisant les tissus biologiques Abstract ;," 2021.
- [27] F. Saulnier, F. Ferrera, A. Choukri, J. M. Girardet, and G. Linden, "Estimation de la dénaturation des protéines par spectrofluorimétrie d'absorption moléculaire : applications aux lactosérums industriels," *Lait*, vol. 71, no. 4, pp. 511–518, 1991, doi: 10.1051/lait:1991439.
- [28] A. PIERRE, G. BRULE, and J. FAUQUANT, "Influence des traitements thermiques sur les propriétés physicochimiques des rétentats obtenus par ultrafiltration de lait de vache et de lait de chèvre. II. Modifications des propriétés rhéologiques du lait de vache," *Lait*, vol. 58, no. 579–580, pp. 575–594, 1978, doi: 10.1051/lait:1978579-58033.
- [29] R. GOUTEFONGEA, "INFLUENCE DU PH ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA SOLUBILITÉ DES PROTÉINES MUSCULAIRES DU PORC," *Bioch. Biophys*, vol. 11, no. 2, pp. 233–234, 1971.
- [30] K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, J. M. Broering, and J. F. Chaparro-Riggers, "Stability of biocatalysts," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 220–225, 2007, doi: 10.1016/j.cbpa.2007.01.685.
- [31] R. Jaenicke and G. Bohm, "The stability of proteins in extreme environments. Current opinion in structural biology," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 738–748, 1998.
- [32] B. K. Shoichet, W. A. Baase, R. Kuroki, and B. W. Matthews, "A relationship between protein stability and protein function," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 2, pp. 452–456, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.2.452.
- [33] D. E. Koshland, "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 98–104, 1958, doi: 10.1073/pnas.44.2.98.
- [34] "https://www.cas.org/fr/resources/cas-insights/drug-discovery/intrinsically-disordered-proteins-covid-19."
- [35] et al. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the

- formation of the scrapie prion proteins.," 1993.
- [36] P. E. Wright and H. J. Dyson, "Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm," *J. Mol. Biol.*, vol. 293, no. 2, pp. 321–331, 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3110.
- [37] J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton, and D. T. Jones, "Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life," *J. Mol. Biol.*, vol. 337, no. 3, pp. 635–645, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.02.002.
- [38] V. N. Uversky, C. J. Oldfield, and A. K. Dunker, "Intrinsically disordered proteins in human diseases: Introducing the D 2 concept," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, no. May 2014, pp. 215–246, 2008, doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924.
- [39] É. Delaforge, M. Blackledge, and R. Jensen, "Protéines intrinsèquement désordonnées Une clé pour de multiples serrures," no. C, pp. 41–47, 2016.
- [40] K. K., "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure.," vol. 6(2), pp. 87–103, 1989.
- [41] A. Gruet, "Proteines Intrinsequement Desordonnees: De La Mutagenèse Aléatoire À La Relation Structure-Fonction," *École Prat. Des Hautes Études*, p. 26, 2012.
- [42] O. Awile, A. Krisko, I. F. Sbalzarini, and B. Zagrovic, "Intrinsically disordered regions may lower the hydration free energy in proteins: A case study of nudix hydrolase in the bacterium *Deinococcus radiodurans*," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 7, p. 12, 2010, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000854.
- [43] B. Surpeta, C. E. Sequeiros-Borja, and J. Brezovsky, "Dynamics, a powerful component of current and future in silico approaches for protein design and engineering," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 8, 2020, doi: 10.3390/ijms21082713.
- [44] D. K. Katherine Henzler-Wildman, "Dynamic personalities of proteins," no. 450, pp. 964–972, 2007.
- [45] N. Triou, "Le 'problème de repliement des protéines' résolu par une intelligence artificielle," 2020.
- [46] V. Kovalska *et al.*, "Induced CD of iron(ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins," *Metallomics*, vol. 11, no. 2, pp. 338–348, 2019, doi: 10.1039/c8mt00278a.
- [47] J. Yon-Kahn, "Protein folding: in vitro studies," vol. 21, no. 6–7, pp. 601–607, 2005.
- [48] L. V. Mayuri Sadoine, Maxime Steisel, "printemps des sciences," 2009.
- [49] R. G. Reed, F. W. Putnam, and T. Peters, "Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin," 1980.
- [50] F. A. Tompa P, "Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins," p. 359, 2009.
- [51] S. S. Gibbs EB, Cook EC, "Application of NMR to studies of intrinsically disordered proteins," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 628, pp. 57–70, 2017.
- [52] K. R., "NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically disordered proteins," vol. 241, pp. 74–85, 2014.
- [53] V. M. Allison JR, Varnai P, Dobson CM, "Determination of the free energy landscape of α -synuclein using spin label nuclear magnetic resonance measurement," no. 131:18314–26,

2009.

- [54] B. M. Jensen MR, Ruigrok RW, "Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR," *Curr Opin Struct Biol.*, no. 23(3):426-35, 2013.
- [55] Y. Ji *et al.*, "DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components," *ACS Omega*, vol. 5, no. 15, pp. 8572–8578, 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b04421.
- [56] F. N. Fu, D. B. DeOliveira, W. R. Trumble, H. K. Sarkar, and B. R. Singh, "Secondary structure estimation of proteins using the amide III region of fourier transform infrared spectroscopy: application to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin," *Appl. Spectrosc.*, vol. 48, no. 11, pp. 1432–1441, 1994, doi: 10.1366/0003702944028065.
- [57] M. Osawa, K. I. Ataka, K. Yoshii, and Y. Nishikawa, "Surface-enhanced infrared spectroscopy: The origin of the absorption enhancement and band selection rule in the infrared spectra of molecules adsorbed on fine metal particles," *Appl. Spectrosc.*, vol. 47, no. 9, pp. 1497–1502, 1993, doi: 10.1366/0003702934067478.
- [58] Z. Zhang, T. Imae, H. Sato, A. Watanabe, and Y. Ozaki, "Surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced infrared absorption spectroscopic studies of a metalloporphyrin monolayer film formed on pyridine self-assembled monolayer-modified gold," *Langmuir*, vol. 17, no. 15, pp. 4564–4568, 2001, doi: 10.1021/la001700k.
- [59] D. Enders, T. Nagao, A. Pucci, T. Nakayama, and M. Aono, "Surface-enhanced ATR-IR spectroscopy with interface-grown plasmonic gold-island films near the percolation threshold," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 11, pp. 4935–4941, 2011, doi: 10.1039/c0cp01450h.
- [60] F. Neubrech, A. Pucci, T. W. Cornelius, S. Karim, A. García-Etxarri, and J. Aizpurua, "Resonant plasmonic and vibrational coupling in a tailored nanoantenna for infrared detection," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 101, no. 15, pp. 2–5, 2008, doi: 10.1103/PhysRevLett.101.157403.
- [61] C. V. Raman and K. S. Krishnan, "A new type of secondary radiation [11]," *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, 1928, doi: 10.1038/121501c0.
- [62] N. Felidj, "Diffusion Raman exaltée de surface (DRES) ou Surface enhanced Raman scattering (SERS) Principes, quelques exemples".
- [63] R. Singer and W. Kiefer, "Scanning Multichannel Raman Spectroscopy," no. March, 2014.
- [64] L. A. Lyon *et al.*, "Raman Spectroscopy," vol. 2700, no. 98, pp. 341–362, 1998.
- [65] E. B. Hanlon *et al.*, "Prospects for in vivo Raman spectroscopy," *Phys. Med. Biol.*, vol. 45, no. 2, 2000, doi: 10.1088/0031-9155/45/2/201.
- [66] H. G. M. Edwards, *Modern Raman spectroscopy—a practical approach*. Ewen Smith and Geoffrey Dent. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2005. Pp. 210. ISBN 0 471 49668 5 (cloth, hb); 0 471 49794 0 (pbk), vol. 36, no. 8. 2005. doi: 10.1002/jrs.1320.
- [67] K. Nakamoto and C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*. 1994. doi: 10.1016/c2009-0-21238-4.
- [68] "<https://www.lise.upmc.fr/Raman>."
- [69] "www.sciencefrance.com/techniques/RAMAN/RAMAN.html."
- [70] I. I. Katrin Kneipp, Yang Wang,* Harald Kneipp,† Lev T. Perelman and and M. S. F. Ramachandra R. Dasari, "Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman

- Scattering (SERS)," *Indian J. Urol.*, vol. 18, no. 2, pp. 195–197, 2002.
- [71] A. J. M. M. Fleischmann, P.J. Hendra, "Raman Spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," vol. 2, p. 26, 1974.
- [72] C. Julien, "Fluorescence et Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) de molécules individuelles," 2004.
- [73] J. R. Lombardi and R. L. Birke, "A unified approach to surface-enhanced raman spectroscopy," *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 14, pp. 5605–5617, 2008, doi: 10.1021/jp800167v.
- [74] S. Schlücker, "Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 53, no. 19, pp. 4756–4795, May 2014, doi: 10.1002/anie.201205748.
- [75] R. H. RITCHIE, "Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films," *Phys. Rev.*, vol. 106 N.5, no. 5, p. 8, 1956, [Online]. Available: <https://journals.aps.org/pr/pdf/10.1103/PhysRev.106.874><https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.106.874>
- [76] S. Unser, I. Bruzas, J. He, and L. Sagle, "Localized surface plasmon resonance biosensing: Current challenges and approaches," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 7, pp. 15684–15716, 2015, doi: 10.3390/s150715684.
- [77] P. N. Njoki *et al.*, "Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 40, pp. 14664–14669, 2007, doi: 10.1021/jp074902z.
- [78] R. J. C. Brown, J. Wang, and M. J. T. Milton, "Electromagnetic modelling of Raman enhancement from nanoscale structures as a means to predict the efficacy of SERS substrates," *J. Nanomater.*, vol. 2007, 2007, doi: 10.1155/2007/12086.
- [79] A. Otto, "Theory of first layer and single molecule surface enhanced raman scattering (SERS)," *Phys. Status Solidi Appl. Res.*, vol. 188, no. 4, pp. 1455–1470, 2001, doi: 10.1002/1521-396X(200112)188:4<1455::AID-PSSA1455>3.0.CO;2-4.
- [80] D. Courjon *et al.*, "Le champ proche optique . Theorie et applications," 2011.
- [81] A. Otto, "Surface-enhanced Raman scattering: 'Classical' and 'Chemical' origins," no. 111, pp. 289–418, 1984, doi: 10.1007/3-540-11942-6_24.
- [82] G. Haran, "Single-molecule Raman spectroscopy: A probe of charge transfer and plasmonic fields," *AIP Conf. Proc.*, vol. 1267, no. 8, pp. 59–60, 2010, doi: 10.1063/1.3482699.
- [83] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, and R. P. Van Duyne, "Surface-enhanced Raman spectroscopy," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 601–626, 2008, doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814.
- [84] L. Boubekeur-Lecaque, N. Felidj, and M. Lamy de la Chapelle, "Comprendre. La diffusion Raman exaltée de surface," *Photoniques*, no. 90, pp. 41–44, 2018, doi: 10.1051/photon/20189041.
- [85] J. D. Judy, N. V. K. V. P. Tollamadugu, and P. M. Bertsch, "Pin Oak (*Quercus palustris*) Leaf Extract Mediated Synthesis of Triangular, Polyhedral and Spherical Gold Nanoparticles," *Adv. Nanoparticles*, vol. 01, no. 03, pp. 79–85, 2012, doi: 10.4236/anp.2012.13011.
- [86] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, "Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in," *J. Chem. Soc.*, pp. 801–802, 1994.

- [87] J. Yon-kahn, "M / S : médecine sciences Repliement des protéines : études in vitro Protein folding : in vitro studies Repliement des protéines : études in vitro," 2020.
- [88] I. Haidar *et al.*, "Highly stable silica-coated gold nanorods dimers for solution-based SERS," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 47, pp. 32272–32280, 2016, doi: 10.1039/c6cp06218k.
- [89] P. Cochard, C. Centre, U. P. S. Universit, and P. S. Philippe, "La microscopie confocale _____," pp. 43–55.
- [90] J. Clement, "Analyse Stochastique d ' un nouveau système dynamique non-linéaire : La Diffusion Raman exaltée de surface," 2018.
- [91] S. J. Amina and B. Guo, "A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 9823–9857, 2020, doi: 10.2147/IJN.S279094.
- [92] B. Fazio *et al.*, "SERS detection of Biomolecules at Physiological pH via aggregation of Gold Nanorods mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating," *Sci. Rep.*, vol. 6, Jun. 2016, doi: 10.1038/srep26952.
- [93] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoin, "61.<sers A Comprehensive Study.pdf>," no. i, pp. 13794–13803, 2007.
- [94] A. B. Dufour, "Stat 3: Analyse en Composantes Principales," *Cours*, pp. 1-34Dufour, A. B. (2009). Analyse en Composantes P, 2009, [Online]. Available: papers://70ce533b-ad63-49cd-9ebe-6f8cc73deddb/Paper/p484
- [95] F. Husson, S. Lê, and J. Pagès, "Analyse en Composantes Principales (ACP)," *Anal. données avec R*, pp. 27–28, 2016.
- [96] L. Adumeau, "Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques To cite this version : HAL Id : tel-01674168 L ' UNIVERSITÉ DE BORDEAUX," 2018.
- [97] Farrugia A, "utilisation Albumine en médecine clinique: tradition ou thérapeutique?," vol. 24, no. 1, pp. 53–63, 2010.
- [98] B. Meloun, L. Morávek, and V. Kostka, "Complete amino acid sequence of human seminal plasma β -inhibin. Prediction of post Gln-Arg cleavage as a maturation site," *FEBS Lett.*, vol. 175, no. 2, pp. 349–355, 1984, doi: 10.1016/0014-5793(75)80242-0.
- [99] L. Lartundo-Rojas and M. P. Marcus, "THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) INFLUENCE DE L'ADSORPTION DE PROTEINE (BSA) SUR LE COMPORTEMENT ÉLECTROCHIMIQUE ET LA COMPOSITION DE SURFACE D'UN ALLIAGE Fe-17Cr EN SOLUTION AQUEUSE," 2007.
- [100] T. J. Peters and R. C. Feldhoff, "Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Isolation and characterization of tryptic fragments.," *Biochemistry*, vol. 14, no. 15, pp. 3384–3391, Jul. 1975, doi: 10.1021/bi00686a015.
- [101] J. Yon-kahn, "des protéines : études in vitro," vol. 21, pp. 601–608, 2005.
- [102] K. A. Dill, "Dominant Forces in Protein Folding.," *Perspect. Biochem.*, vol. 29, pp. 7133–7155, 1990.
- [103] F. T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, vol. 323, no. 3. 1993.
- [104] M. G. Privalov PL, "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration.," *J Mol Biol.*, vol. 20, pp. 232(2):660–79, 1993.

- [105] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, 2012, doi: 10.1038/nnano.2012.207.
- [106] A. Salvati *et al.*, "Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 2, pp. 137–143, 2013, doi: 10.1038/nnano.2012.237.
- [107] M. Mahmoudi, "The need for improved methodology in protein corona analysis," *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, pp. 8–11, 2022, doi: 10.1038/s41467-021-27643-4.
- [108] T. Cedervall *et al.*, "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 7, pp. 2050–2055, 2007, doi: 10.1073/pnas.0608582104.
- [109] M. P. Monopoli *et al.*, "Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 8, pp. 2525–2534, Mar. 2011, doi: 10.1021/ja107583h.
- [110] A. E. Nel *et al.*, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, Jul. 2009, doi: 10.1038/nmat2442.
- [111] C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, and W. C. W. Chan, "Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 4, pp. 2139–2147, Feb. 2012, doi: 10.1021/ja2084338.
- [112] Y. Zhao, M. Iarossi, A. F. De Fazio, J. A. Huang, and F. De Angelis, "Label-Free Optical Analysis of Biomolecules in Solid-State Nanopores: Toward Single-Molecule Protein Sequencing," *ACS Photonics*, vol. 9, no. 3, pp. 730–742, 2022, doi: 10.1021/acsp Photonics.1c01825.
- [113] G. Wang, C. Yan, S. Gao, and Y. Liu, "Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 103, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109856.
- [114] A. Michnik, K. Michalik, and Z. Drzazga, "Michnik, Michalik, Drzazga_2005_Stability of bovine serum albumin at different pH," vol. 80, pp. 399–406, 2005.
- [115] J. E. Clément, A. Leray, A. Bouhelier, and E. Finot, "Spectral pointillism of enhanced Raman scattering for accessing structural and conformational information on single protein," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 1, pp. 458–466, Dec. 2016, doi: 10.1039/c6cp06667d.
- [116] X. Dai *et al.*, "Optical tweezers-controlled hotspot for sensitive and reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy characterization of native protein structures," *Nat. Commun.*, no. 2021, pp. 1–9, doi: 10.1038/s41467-021-21543-3.
- [117] I. Matei, C. M. Buta, I. M. Turcu, D. Culita, C. Munteanu, and G. Ionita, "Bovine Serum Albumin Solution," no. lii, 2019.
- [118] A. Baral, L. Satish, D. P. Das, H. Sahoo, and M. K. Ghosh, "Construing the interactions between MnO₂ nanoparticle and bovine serum albumin: Insight into the structure and stability of a protein-nanoparticle complex," *New J. Chem.*, vol. 41, no. 16, pp. 8130–8139, 2017, doi: 10.1039/c7nj01227f.
- [119] A. Bhogale, N. Patel, J. Mariam, P. M. Dongre, A. Miotello, and D. C. Kothari, "Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 113, pp. 276–284, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.021.

- [120] Q. Yang, J. Liang, and H. Han, "Probing the interaction of magnetic iron oxide nanoparticles with bovine serum albumin by spectroscopic techniques," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 30, pp. 10454–10458, 2009, doi: 10.1021/jp904004w.
- [121] P. Andrášková, K. M. Šišková, Š. Michetschlägerová, K. Jiráková, M. Kubala, and D. Jiráček, "The effect of fatty acids and bsa purity on synthesis and properties of fluorescent gold nanoclusters," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/nano10020343.
- [122] S. W. Benson ;) K *et al.*, "Applications of Nuclear Magnetic Res-onance Spectroscopy In Organic Chemistry," Pergamon Press, Hulsgen and D. Ott, 1967. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [123] N. Alizadeh-Pasdar, S. Nakai, and E. C. Y. Li-Chan, "Principal component similarity analysis of Raman spectra to study the effects of pH, heating, and κ -carrageenan on whey protein structure," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 21, pp. 6042–6052, Oct. 2002, doi: 10.1021/jf0116956.
- [124] S. Inoue, "Biophysical chemistry," *Kobunshi*, vol. 60, no. 1, pp. 7–8, 2011, doi: 10.1039/9781847550002-00321.
- [125] K. V. Abrosimova, O. V. Shulenina, and S. V. Paston, "FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin," in *Journal of Physics: Conference Series*, Nov. 2016, vol. 769, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/769/1/012016.
- [126] E. G. Ferrer, A. Bosch, O. Yantorno, and E. J. Baran, "A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 16, no. 7, pp. 3878–3886, 2008, doi: 10.1016/j.bmc.2008.01.060.
- [127] X. J. Shi, D. Li, J. Xie, S. Wang, Z. Q. Wu, and H. Chen, "Spectroscopic investigation of the interactions between gold nanoparticles and bovine serum albumin," *Chinese Sci. Bull.*, vol. 57, no. 10, pp. 1109–1115, 2012, doi: 10.1007/s11434-011-4741-3.
- [128] R. Su, W. Qi, Z. He, Y. Zhang, and F. Jin, "Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process," *Food Hydrocoll.*, vol. 22, no. 6, pp. 995–1005, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.05.021.
- [129] R. C. Feldhoff and T. Peters, "Fragments of Bovine Serum Albumin Produced by Limited Proteolysis. Isolation and Characterization of Peptic Fragments," *Biochemistry*, vol. 14, no. 20, pp. 4508–4514, 1975, doi: 10.1021/bi00691a027.
- [130] M. Winiewska, K. Szewczuk-Karpisz, and D. Sternik, "Adsorption and thermal properties of the bovine serum albumin-silicon dioxide system," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 120, no. 2, pp. 1355–1364, May 2015, doi: 10.1007/s10973-014-4300-7.
- [131] I. M. Vlasova and A. M. Saletsky, "Raman spectroscopy in investigations of secondary structure of human serum albumin at binding of nanomarkers of fluorescein family," *Laser Phys.*, vol. 20, no. 9, pp. 1844–1848, 2010, doi: 10.1134/s1054660x10170160.
- [132] H. S. Davies *et al.*, "Secondary structure and glycosylation of mucus glycoproteins by raman spectroscopies," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 23, pp. 11609–11615, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03095.
- [133] R. P. Kengne-Momo *et al.*, "Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications," *Int. J. Spectrosc.*, vol. 2012, no. i, pp. 1–7, 2012, doi: 10.1155/2012/462901.
- [134] A. Sadat and I. J. Joye, "Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman

- spectroscopic analysis of proteins," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 17, 2020, doi: 10.3390/app10175918.
- [135] L. Perillo *et al.*, "Monitoring biochemical and structural changes in human periodontal ligaments during orthodontic treatment by means of micro-Raman spectroscopy," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 2, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/s20020497.
- [136] L. C. Serpell, J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, and R. A. Crowther, "Fiber diffraction of synthetic α -synuclein filaments shows amyloid-like cross- β conformation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 9, pp. 4897–4902, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.9.4897.
- [137] R. Huehne and J. Suehnel, "The Jena Library of Biological Macromolecules - JenaLib," *Nat. Preced.*, no. April 2009, pp. 1–2, 2009, doi: 10.1038/npre.2009.3114.1.
- [138] Y. Wang *et al.*, "Exploring the effect of intermolecular H-bonding: A study on charge-transfer contribution to surface-enhanced Raman scattering of p-mercaptobenzoic acid," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 19, pp. 10191–10197, 2014, doi: 10.1021/jp5025284.
- [139] X. Dai *et al.*, "Optical tweezers-controlled hotspot for sensitive and reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy characterization of native protein structures," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21543-3.
- [140] B. Fehér *et al.*, "Effect of pH on the conformation of bovine serum albumin - gold bioconjugates," *J. Mol. Liq.*, vol. 309, p. 113065, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.113065.
- [141] H. Houlden, H. T. Whittaker, Y. Qui, and C. Bettencourt, "Multiple system atrophy: Genetic risks and alpha-synuclein mutations," *F1000Research*, vol. 6, no. November, 2017, doi: 10.12688/f1000research.12193.1.
- [142] L. Maroteaux, J. T. Campanelli, and R. H. Scheller, "Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal," *J. Neurosci.*, vol. 8, no. 8, pp. 2804–2815, 1988, doi: 10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988.
- [143] J. Burré, M. Sharma, and T. C. Südhof, "Cell biology and pathophysiology of α -synuclein," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 8, no. 3, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a024091.
- [144] R. Jakes, M. G. Spillantini, and M. Goedert, "Identification of two distinct synucleins from human brain," *FEBS Lett.*, vol. 345, no. 1, pp. 27–32, 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00395-5.
- [145] K. E. Carnazza *et al.*, "Synaptic vesicle binding of α -synuclein is modulated by β - and γ -synucleins," *Cell Rep.*, vol. 39, no. 2, 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110675.
- [146] M. Goedert, R. Jakes, and M. Grazia, "The Synucleinopathies : Twenty Years On," vol. 7, 2017, doi: 10.3233/JPD-179005.
- [147] G. M. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, "Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies," 1998.
- [148] P. H. Weinreb, W. Zhen, A. W. Poon, K. A. Conway, and P. T. Lansbury, "NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded," *Biochemistry*, vol. 35, no. 43, pp. 13709–13715, 1996, doi: 10.1021/bi961799n.
- [149] S. M. Hernandez, E. B. Tikhonova, and A. L. Karamyshev, "Protein-Protein Interactions in Alpha-Synuclein Biogenesis: New Potential Targets in Parkinson's Disease," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 12, no. March, pp. 1–8, 2020, doi: 10.3389/fnagi.2020.00072.

- [150] E. R. Bendor JT, Logan TP, "The function of α -synuclein. *Neuron*," vol. 6, p. 79, 2013.
- [151] P. Alam, L. Bousset, R. Melki, and D. E. Otzen, "A-Synuclein Oligomers and Fibrils: a Spectrum of Species, a Spectrum of Toxicities," *J. Neurochem.*, vol. 150, no. 5, pp. 522–534, 2019, doi: 10.1111/jnc.14808.
- [152] V. N. Uversky, J. Li, and A. L. Fink, "Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 14, pp. 10737–10744, Apr. 2001, doi: 10.1074/jbc.M010907200.
- [153] C. Wang *et al.*, "Versatile structures of α -synuclein," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 9, no. JUNE. Frontiers Research Foundation, Jun. 20, 2016. doi: 10.3389/fnmol.2016.00048.
- [154] N. VIGEANT, "effets de la diminution de la teneur en protéines et de l'ajout d'additifs sur les propriétés de foisonnement de la crème à fouetter U.H.T," 2001.
- [155] S. Damodaran, "In situ measurement of conformational changes in proteins at liquid interfaces by circular dichroism spectroscopy," *Anal Bioanal Chem*, pp. 182–188, 2003, doi: 10.1007/s00216-003-1873-6.
- [156] N. C. Maiti, M. M. Apetri, M. G. Zagorski, P. R. Carey, and V. E. Anderson, "Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: α -Synuclein," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 8, pp. 2399–2408, Mar. 2004, doi: 10.1021/ja0356176.
- [157] T. Dou and D. Kourouski, "Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine Uniquely Modify the Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers Formed in Their Presence at the Early Stages of Protein Aggregation," 2022, doi: 10.1021/acschemneuro.2c00355.
- [158] A. Mondal, S. Dolui, S. Dhabal, A. Bhattacharjee, and C. Nakul, "Structure Specific Neurotoxicity of α -Synuclein Oligomer," 2020.
- [159] F. Sevgi *et al.*, "Marker-free imaging of α -synuclein aggregates in a rat model of parkinson," 2021.
- [160] V. N. Uversky, J. R. Gillespie, and A. L. Fink, "Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiologic conditions?," *Proteins*, vol. 41, no. 3, pp. 415–427, Nov. 2000, doi: 10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7.
- [161] A. Guzzo, P. Delarue, A. Rojas, A. Nicolai, G. G. Maisuradze, and P. Senet, "Missense Mutations Modify the Conformational Ensemble of the α -Synuclein Monomer Which Exhibits a Two-Phase Characteristic," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, Nov. 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.786123.
- [162] H. R. De Bézieux, I. Epf-z, and D. E. A. Formation, "La Méthodologie Systémique," pp. 1–22, 2004.
- [163] "Les Fondements Théoriques De L'Approche Systémique.," *Encycl. Universalis*, pp. 7–39, 1991.
- [164] C. E. Shannon, "Shannon- Mathematical Theory of Communication," vol. 27, no. May, pp. 379–423, 2020.
- [165] C. E. Shannon, "A Mathematical Theory of Communication," *Bell Syst. Tech. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 379–423, 1948, doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- [166] A. Mohammad-djafari, "Entropie en Traitement du Signal Entropy in Signal Processing arXiv : physics / 0111021v1 [physics . data-an] 6 Nov 2001".
- [167] R. Kun, M. Szekeres, and I. Dékány, "Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 96,

no. 3, pp. 1009–1017, 2009, doi: 10.1007/s10973-009-0040-5.