

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1
SCIENCES ET GEOGRAPHIE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée et soutenue publiquement par

Meike STELTER

Le 12 décembre 2005

**Étude de complexes à forte diffusion anormale
pour la détermination rapide de la structure
de protéines par la méthode MAD**

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs	M. Marc SCHILTZ M. Jorge NAVAZA
Examinatrice	Mme Eva PEBAY-PEYROULA
Directeurs de thèse	M. Richard KAHN M. Jean VICAT

Thèse préparée au Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire
de l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre ÉBEL

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Cristallographie des Macromolécules, dirigé par Otto Dideberg. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de son soutien durant les mois de transition. Je le remercie également de ses conseils sur la cristallographie pour ma thèse ou à l'occasion de présentations.

Je tiens à remercier les membres du jury de thèse : Marc Schiltz, Jorge Navaza et Éva Pebay-Peyroula d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à Marc de m'avoir appris beaucoup de choses à travers ses corrections au manuscrit et ses questions lors de la soutenance. Merci à Éva également pour sa lettre de recommandation.

Je remercie mes directeurs de thèse Richard Kahn et Jean Vicat pour leur disponibilité, leur aide et leur confiance. Je vous souhaite tout le mieux pour l'avenir.

Merci à Eric Girard qui m'a appris les bases pratiques de la cristallographie et de qui j'ai hérité le sujet.

Bonne continuation à Guillaume Pompidor pour la thèse et après. J'ai beaucoup apprécié les discussions que nous avons pu avoir.

Je remercie Juan Hermoso et Rafael Molina Monterrubio pour leur collaboration. Juan, merci beaucoup également pour ton aide et ta lettre de recommandation. Muchas gracias Rafa. Et je suis désolée de ne pas avoir pu être plus disponible au cours de ma dernière année de thèse.

Merci à Pier Lucio Anelli et Jean-François LeBas de m'avoir fourni les complexes de gadolinium.

Je remercie Sandra Jeudy et Chantal Abergel pour la collaboration sur la protéine yeaZ et les conseils qu'elles m'ont donnés. Merci également pour les cristaux de YGGV.

Je remercie les gens qui m'ont aidé avec les différentes méthodes physico-chimiques : Merci beaucoup à Rémy Sounier pour toutes les expériences de RMN effectuées et également pour avoir essayé de m'expliquer les résultats.

Merci à Antoine Royant pour les expériences de luminescence au cryobench. C'était un plaisir de travailler avec toi et de nager avec toi (même si j'ai abandonné les cours). Bonne continuation en longueurs.

*Je remercie Viviana pour son aide avec les gels natifs et plus généralement pour tous ses efforts grâce auxquelles le LCM fonctionne. Plein de bonheur à la future Maman.
Je remercie Corinne Houles et Pierre LeParloüer pour leur aide avec le biacore et la calorimétrie respectivement.*

Je remercie tous les membres du LCM et du LPM de leur aide et de la bonne compagnie.

Merci Laurence pour les conseils en cristallographie.

Merci Pauline de m'avoir supporté comme voisine de bureau et bonne dernière année de thèse.

Merci Philippe pour ta compréhension et ton humour.

Merci aux collègues (moniteurs ou non) de mon année : Hélène, Grégory, Jacques, Mickaël pour votre présence agréable que ce soit en préparant la fête de la science ou à d'autres occasions, j'ai beaucoup apprécié votre compagnie.

Partie I. Introduction

I.0. Introduction	1
I.1. La détermination de la structure de macromolécules par diffraction des rayons X	2
I.1.1. Le problème de la phase en cristallographie des protéines	2
I.1.2. La méthode du remplacement moléculaire	2
I.1.3. Les méthodes directes	3
I.1.4. Les méthodes de substitution isomorphe	3
I.1.5. Les méthodes utilisant la diffraction anormale	4
I.1.6. Comparaison des méthodes de phasage expérimental	5
I.2. La diffusion anormale	6
I.2.1. Présentation du phénomène	6
I.2.2. La brisure de la loi de Friedel	8
I.2.3. Les différences dispersives	9
I.3. Détermination de la position des atomes lourds et phasage	10
I.3.1. Phasage avec la méthode SAD	10
I.3.2. Procédures d'amélioration de phase	11
I.3.3. Le signal anormal	12
I.4. Obtention de cristaux dérivés pour le phasage par des méthodes de remplacement isomorphe ou par des méthodes de diffusion anormale	13
I.4.1. Choix de l'atome lourd et de la longueur d'onde du rayonnement X incident	13
I.4.2. Accessibilité du seuil, grandes longueurs d'onde	14
I.4.3. Seuils d'absorption et raies blanches	15
I.4.4. Revue de méthodes habituelles pour obtenir des dérivés pour le phasage par des méthodes de remplacement isomorphe ou de diffusion anormale	16
I.4.5. Dégâts d'irradiation	18
I.4.6. Comparaison des méthodes d'obtention de dérivés anomaux	20
I.5. Utilisation de complexes de lanthanides pour obtenir des dérivés	22
I.5.1. Présentation des complexes de gadolinium utilisés	23
I.5.2. Chimie de coordination de Gd(III)	24
I.5.3. La diffusion anormale des lanthanides	25
I.5.4. Obtention de cristaux dérivés à l'aide de complexes de gadolinium.	25
I.5.5. Dégâts d'irradiation II	27
I.5.6. Conclusions	28

Partie II. Étude cristallographique

II.0. Introduction	29
II.1. Cristallisation des protéines	29
II.1.1. Choix des protéines tests	29
II.1.2. Cristallisation des protéines	30
II.1.3. Conditions de cristallisation des différentes protéines	32
II.1.4. Obtention de cristaux dérivés à une concentration de complexe de 300mM	38
II.2. Acquisition et traitement des données de diffraction	39
II.2.1. Acquisition des données de diffraction	39
II.2.2. Stratégie de l'acquisition des données	40
II.2.3. Utilisation du robot de montage de cristaux sur BM30A	40
II.2.4. Traitement des données de diffraction	41
II.2.5. Conditions d'enregistrement et statistiques d'intégration de données pour les différents dérivés	41
II.3. Obtention des phases expérimentales	46
II.3.1. Estimation de la fixation et détermination des sites de fixation	46
II.3.2. Détermination des phases	47
II.3.3. Procédé de phasage des données obtenues sur BM30A	47
II.3.4. Évaluation du succès du phasage	48
II.3.5. Résultats de phasage avec les différents dérivés	49
II.3.6. Exemples de cartes de densité électronique expérimentale	52
II.3.7. Exemple de résolution de structure d'une protéine de structure jusque-là inconnue	54
II.3.8. Synthèse des résultats des essais de phasage	56
II.3.9. Conclusions	59
II.4. Caractérisation du mode de fixation des complexes dans les protéines	60
II.4.1. Affinement initial	60
II.4.2. Les modèles des complexes utilisés	61
II.4.3. Affinement avec complexes	61
II.4.4. Urate oxydase	63
II.4.5. YGGV	73
II.4.6. YeaZ	75
II.4.7. Glucose isomérase	77
II.4.8. Lysozyme	79
II.4.9. Thaumatine	83
II.4.10. Protéine X	88
II.4.11. Résultats sur la fixation des complexes	95
II.5. Conclusions	97

Partie III. Méthodes physico-chimiques pour détecter la fixation d'un complexe sur une protéine

III.0. Méthodes physico-chimiques pour caractériser la fixation des complexes sur des protéines - Introduction	99
III.0.1. Difficultés liées aux caractéristiques des complexes utilisés	100
III.0.2. Considérations expérimentales	100
III.1. Calorimétrie de titrage isotherme	101
III.1.1. Introduction	101
III.1.2. Étude de l'association d'une solution de lysozyme avec le complexe Gd-HPDO3A par calorimétrie de titrage isotherme	103
III.1.3. Conditions expérimentales	103
III.1.4. Résultats	105
III.1.5. Conclusion	108
III.2. Expériences de résonance plasmonique de surface	108
III.3. Électrophorèse de gels d'acrylamide natifs	109
III.3.1. Préparation des gels	109
III.3.2. Préparation du gel pour la migration du lysozyme de blanc d'œuf de poule	116
III.3.3. Résultats obtenus avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule	110
III.3.4. Essais d'électrophorèse de gels natifs avec d'autres protéines	111
III.3.5. Conclusions	112
III.4. Expériences de résonance magnétique nucléaire	113
III.4.1. Introduction	113
III.4.2. Détection de la fixation d'un complexe sur une protéine	113
III.4.3. Expériences de RMN 1D avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule et les complexes Gd-HPDO3A et Lu-HPDO3A	114
III.4.4. Préparation des échantillons	114
III.4.5. Spectres 1D ¹ H	115
III.4.6. Protéine avec le complexe Gd-HPDO3A	117
III.4.7. Protéine avec le complexe Lu-HPDO3A	119
III.4.8. Interprétation des spectres	121
III.4.9. Spectres 2D ¹ H- ¹ H NOESY	122
III.4.10. Spectres 2D ¹ H- ¹ H NOESY de lysozyme et de lysozyme avec 100 mM de Lu-HPDO3A	123
III.4.11. Interprétation des spectres	126
III.4.12. Conclusions sur les expériences RMN 1D et 2D	126

III.5. La luminescence des lanthanides	127
III.5.1. Propriétés photophysiques des ions de lanthanides trivalents	127
III.5.2. But : détecter la fixation de nos complexes sur les protéines	129
III.5.3. Expériences de luminescence avec des complexes et des ions de lanthanides avec des cristaux et des solutions de protéine	131
III.5.4. Conditions expérimentales	132
III.5.5. Expériences de luminescence	134
III.5.6. Spectre de fluorescence d'un cristal et d'une solution de protéine native	134
III.5.7. Résultats d'expériences préliminaires avec des ions de lanthanides	136
III.5.8. Expériences avec les complexes de lanthanides	139
III.5.9. Conclusions et perspectives pour les expériences de luminescence des lanthanides	145
III.6. Conclusions sur les différentes méthodes physico-chimiques testées	147
IV. Conclusions et perspectives	149
Références	150
Annexe 1 La carte de Patterson des atomes lourds	I
Annexe 2 Comparaison de la fixation des complexes pour des cristaux dérivés de glucose isomérase obtenus en présence de différents agents précipitants	IV

Notes explicatives

Le mot **complexe** désigne la molécule composée de l'atome lourd (ion Gd^{3+}) et du ligand qui chélate l'atome lourd. Le **ligand** est la molécule qui chélate l'atome lourd dans les complexes et le **dérivé** correspond à l'ensemble formé par le complexe lié à la protéine.

Abréviations

MIR : Multiple Isomorphous Replacement

SIR : Single Isomorphous Replacement

MAD : Multiple-wavelength Anomalous Diffraction

SAD : Single-wavelength Anomalous Diffraction

MIRAS : Multiple Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering

SIRAS : Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering

TF : transformée de Fourier

DO3A : acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane 1,4,7-triacétique

DOTA : acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane 1,4,7,10-tétraacétique

DOTA-BOM: acide (phénylméthoxy)méthyl-1,4,7,10-tétrazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique

DTPA : acide di-éthylène-tri-amine pentaacétique

DTPA-BMA : acide 1,3-bis-méthylamide di-éthylène-tri-amine pentaacétique

DOTMA : acide 1,4,7,10-tétraméthyl-1,4,7,10-tétraazacyclododecane 1,4,7,10-tétraacétique

HPDO3A : acide 10-(2-hydroxypropyl)- 1,4,7,10-tétraazacyclododecane 1,4,7-triacétique

HPSA-DO3A : acide 10-(2-((hydroxy-1-(hydroxyméthyl)éthyl)amino)-1-(hydroxyméthyl)-2-oxoéthyl)- 1,4,7,10-tétraazacyclododecane 1,4,7-triacétique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

PEG : polyéthylène glycol

Définition des indicateurs statistiques calculés par les programmes utilisés :

XDS (Kabsch, 1993)

S_norm/S_ano : le rapport des écarts type $\sigma(I)$ des réflexions générales calculés pour :

S_norm : la loi de Friedel respectée et **S_ano** : la loi de Friedel brisée.

Des valeurs supérieures à 1,0 indiquent une fixation du diffuseur anomal.

SCALA (CCP4, Collaborative Computational Project, 1994)

$$R_{fac} = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_j - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j |I_j|}$$

avec : $\langle I \rangle$: valeur moyenne des intensités des réflexions équivalentes.

$$R_{ano} = \frac{\sum_{hkl} |\langle I^+ \rangle - \langle I^- \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I^+ \rangle + \langle I^- \rangle}$$

avec : $\langle I^+ \rangle$ et $\langle I^- \rangle$: valeurs moyennes, sur l'ensemble des mesures, de chacune des réflexions I^+ et I^- .

SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997; Bricogne *et al.*, 2003)

Le facteur de qualité (FOM) correspond à l'inverse de l'étendu de la distribution de probabilité du facteur de structure complexe. Une valeur élevée indique la réussite du phasage.

Pour le programme SHARP, le facteur de qualité s'obtient par (M. Schiltz, EPF-Lausanne, communication) :

$$FOM = \frac{\langle |F(\mathbf{h})| \rangle}{\langle |F(\mathbf{h})| \rangle} = \frac{\iint F(\mathbf{h}) P[F(\mathbf{h})] dXdY}{\iint |F(\mathbf{h})| P[F(\mathbf{h})] dXdY}$$

où $F(\mathbf{h})$ désigne le facteur de structure complexe et $P[F(\mathbf{h})]$ sa distribution de probabilité.

SOLOMON (Abrahams, 1997), **DM** (Cowtan & Main, 1996)

La distribution de probabilité de facteur de structure complexe se résume à la distribution de probabilité de la phase $P(\alpha)$, le module du facteur de structure étant constant.

Le facteur de qualité s'écrit alors :

$$FOM = \left| \frac{\int P(\alpha) \exp(i2\pi\alpha) d\alpha}{\int P(\alpha) d\alpha} \right|$$

DM

$$R_{libre} = \frac{\sum |\rho_{obs} - \rho_{calc}|}{\sum |\rho_{obs} + \rho_{calc}|}$$

Facteur résiduel dans l'espace direct, calculé à partir de régions de protéine et de solvant qui ne sont pas incluses dans la modification de densité.

CNS (Brünger *et al.*, 1998)

$$R = \frac{\sum_{hkl} \|F_{calc}(hkl) - F_{obs}(hkl)\|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|}$$

Résiduel qui permet de suivre l'évolution de l'affinement.

R_{free} : même expression que R mais calculé avec les réflexions qui ne sont pas incluses dans le processus de l'affinement (typiquement 5% des réflexions). Il constitue un indicateur non-biaisé de l'avancement de l'affinement.

Partie I.

Introduction

