

d'occupation (Qcns), car l'affinement de Qcns et Bcns est corrélé. Ensuite, des molécules d'eau sont introduites de manière automatique dans le modèle. L'inspection du modèle et des cartes de densité électronique expérimentales, des cartes 2Fo-Fc et des cartes 1Fo-Fc, à l'aide du programme O (Jones *et al.*, 1991), permet de placer d'éventuelles petites molécules liées à la protéine dans le cristal dérivé. De telles petites molécules sont, par exemple, des molécules d'agent précipitant comme le MPD ou des ions tartrate pour les protéines glucose isomérase et thaumatine, l'inhibiteur 8-azaxanthine de l'urate oxydase ou des ions Ni²⁺ pour la protéine X.

Protéine	Lysozyme	Urate oxydase	Thaumatine	Glucose isomérase	YeaZ	YGGV	Protéine X
Code PDB	193L (1)	1WS3 (2)	1THW (3)	1XIB (4)	1OKJ (5)	1K7K (6)	*

Tableau 2.4.0 : Codes PDB des modèles de protéine initiaux utilisés pour les affinements. * La structure de la protéine n'étant pas encore publiée, son modèle nous a été fourni par R. Molina et J. Hermoso (CSIC, Madrid, Espagne). 1 : Vaney *et al.*, 1996, 2 : Retailleau *et al.*, 2005, 3 : Ko *et al.*, 1994, 4 : Carrell *et al.*, 1994, 7 : Jeudy *et al.*, 2005, 6 : Sanishvili *et al.*

II.4.2. Les modèles des complexes utilisés

Pour la majeure partie des dérivés, il aurait été impossible de construire *de novo* les modèles atomiques des complexes dans la carte de densité, car la densité électronique du ligand, fixé sur des sites occupés à moins de 100%, n'est pas suffisamment bien définie. Pour les complexes dont la structure cristallographique a été résolue auparavant, nous avons utilisé ce modèle pour l'affinement. Tel est le cas pour les complexes Gd-DTPA-BMA (Ehnebom & Pedersen, 1992), Gd-HPDO3A (Kumar *et al.*, 1994), Gd-DOTA (Dubost *et al.*, 1991) et Gd-DO3A (Chang *et al.*, 1993). Pour modéliser le complexe Gd-DOTMA, j'ai obtenu son modèle à partir de la structure du complexe Gd-DOTA, en ajoutant des groupements méthyle aux bras du ligand.

Le complexe Gd-DOTA-BOM a été modélisé par le modèle du complexe Gd-DOTMA, car le groupement (phénylméthoxy)méthyle qui distingue ce premier de ce dernier n'est visible dans aucune des cartes de densité électronique obtenues. Le dérivé de protéine X avec le Gd-DTPA a permis de déduire la structure du complexe Gd-DTPA de la structure connue de Gd-DTPA-BMA. Le calcul *de novo* de la structure des complexes à partir de la formule chimique connue n'est pas possible, car les programmes habituels utilisés pour calculer la structure 3D de petites molécules (tel le serveur ProdrG (Schuettelkopf & van Aalten, 2004)) ne gèrent pas les interactions chélatantes dans un complexe de métal.

II.4.3. Affinement avec complexes

Après inspection de la carte et du modèle obtenus après l'affinement initial, les molécules d'eau situées dans un rayon de 5 Å autour des sites des ions de gadolinium sont enlevées. On calcule la carte 1Fo-Fc correspondant à ce modèle. Le modèle du ligand est alors placé de manière à obtenir le meilleur accord possible entre le modèle et la densité électronique (on utilise la carte 1Fo-Fc et la carte de densité électronique expérimentale, cette dernière étant non-biaisée par le modèle initial). Lorsque la densité correspondant au ligand est faible, il peut être difficile de trouver la bonne orientation du modèle. La première étape consiste alors à identifier la position du macrocycle. Ensuite, on essaie d'identifier des parties de densité qui correspondent aux groupements carboxyle ou méthylamide des extrémités des bras du ligand.

Le complexe existe sous deux formes énantiomères qui se déduisent l'une de l'autre par inversion des coordonnées. Pour placer le bon modèle de complexe il faut déterminer laquelle des deux structures énantiomères se lie au site de fixation (les deux énantiomères peuvent être liés sur différents sites de fixation d'un même dérivé). Le modèle du ligand peut être ajusté dans la densité par translation et rotation de la molécule autour de l'ion Gd^{3+} , tout en gardant une distance correcte entre les atomes d'azote et d'oxygène chélatants et l'ion Gd^{3+} . Des parties du ligand peuvent être mieux placées dans la densité en leur appliquant des rotations chimiquement permises. À partir de ce dernier modèle, on calcule des fichiers de topologie et de paramètres énergétiques pour l'affinement automatique du ligand par CNS. Pour ce calcul, nous nous sommes servi du serveur HIC-Up (Hetero-compound Information Center - Uppsala (Kleywegt & Jones, 1998)) qui engendre les fichiers utilisés par CNS à partir du fichier de structure en format pdb. La signification physique des paramètres énergétiques ainsi produits est faible, car le serveur ne gère pas l'interaction des atomes chélatants avec l'ion lourd. Les résultats d'affinement automatique doivent donc être vérifiés avec précaution. Un affinement par minimisation d'énergie ("minimize") est suivi de la détermination du facteur d'agitation thermique du ligand et la détermination du taux d'occupation de l'ensemble ion + ligand. L'inspection des cartes 2Fo-Fc et 1Fo-Fc (niveaux négatif et positif) permet de vérifier l'orientation du modèle, d'ajouter à la main d'éventuelles molécules d'eau supplémentaires au voisinage du site de fixation, de déplacer des résidus protéiques et de définir d'éventuelles double conformations.

Dans le dérivé de l'YGGV avec le Gd-DOTMA le site de fixation principal se trouve sur un axe de symétrie cristallographique d'ordre 2. La molécule de complexe n'obéissant pas à cette symétrie, son orientation dans le site est statistiquement distribuée entre deux orientations possibles. Pour l'affinement automatique du modèle du complexe nous avons dû annuler les interactions de Van der Waals entre deux molécules de complexe.

Par la suite, je décris les résultats de l'affinement de la structure du complexe lié à la protéine pour les différents dérivés étudiés. Les différents dérivés sont regroupés selon la protéine utilisée.

Notes explicatives pour la suite :

La charge du complexe **isolé** est indiquée entre parenthèses.

Il est rappelé que l'ion Gd^{3+} nécessite neuf atomes de coordination dans sa première sphère de coordination. De ces neuf atomes, huit sont fournis par le ligand entourant l'ion, sauf pour le ligand DO3A, qui ne fournit que sept atomes de coordination à l'ion.

Grandeurs calculées par CNS :

R et **Rfree** : facteurs résiduel et résiduel libre (voir abréviations)

Bcns : facteur d'agitation thermique des ions de gadolinium

Qcns : taux d'occupation du site de fixation

Figures :

Toutes les figures sont préparées avec le programme PYMOL (DeLano, 2002). Ce programme permet de générer des surfaces colorées en fonction de la charge électrostatique. Toutes les surfaces électrostatiques sont à prendre avec précaution, la charge de la surface étant calculée sans prendre en compte d'effet de solvant. Sauf mention contraire, les contours des cartes de densité électronique correspondent au niveau 1σ .

Couleurs : sauf mention contraire, les atomes de carbone des modèles de ligands sont représentés en vert, ceux des résidus protéiques en or ou/et en gris (utilisation de deux

couleurs différentes si la fixation implique plusieurs molécules de protéine symétriques). L'ion Gd^{3+} est représenté en magenta.

II.4.4. Urate oxydase

	Nb complexes affinés	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-DOTMA 300 mM	1	1,01;0,29;0,21	19;23;21	0,20	0,21	1,35
Gd-DTPA-BMA 300 mM	3	0,92;0,48;0,70	13;8;9	0,19	0,20	1,45
Gd-DO3A 100 mM	0	0,19; 0,14; 0,08; 0,26; 0,21; 0,14; 0,07; 0,11; 0,17; 0,05	55;54;59; 50;45; 40;34;36; 42;29	0,22	0,23	1,45

	Résidus voisins aux sites de fixation
Gd-DOTMA	site 1 : Trp174, Lys189 site 2 : Tyr30 (5 \AA), His19 (7 \AA)
Gd-DO3A	site 1 : Glu41; site 2 : Glu213; site 3 : Glu136; site 4 : Glu249; site 5 : Lys289; site 6 : Glu139; site 7 : Asp141; site 8 : Glu196

Tableau 2.4.1 : Statistiques d'affinement des dérivés d'urate oxydase.

Avec la protéine urate oxydase, trois des complexes ont mené à des dérivés avec une très bonne fixation et permettant un phasage aisé : Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTMA et Gd-DO3A. Nous avons procédé à l'affinement de la structure des dérivés correspondant. Pour les deux premiers, les occupations des sites anomaux étaient suffisamment élevées (voir tableau 2.4.1) pour permettre de placer les modèles des ligands dans la densité électronique et d'affiner le mode de fixation. Le dérivé obtenu avec le complexe Gd-DO3A présente de nombreux sites de fixation avec des occupations de l'ordre de 20%. La faible occupation des sites fait que la densité électronique des ligands des complexes est trop peu visible pour placer et affiner la structure des ligands. Le dimère de la protéine forme un tunnel long de 50 \AA et de 12 \AA de diamètre où se situent deux des sites de fixation du complexe Gd-DTPA-BMA (voir figure 2.4.1 pour l'emplacement des différents sites de fixation).

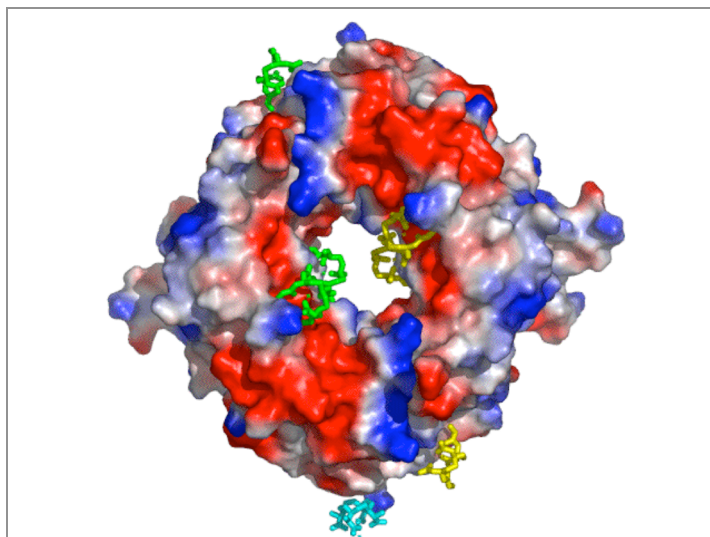


Figure 2.4.1 : Dimère d'urate oxydase formant un tunnel et l'emplacement des sites de fixation des molécules de complexe : vert Gd-DTPA-BMA (molécules symétriques par symétrie cristallographique : jaune), en cyan : Gd-DOTMA.

Description du mode de fixation des différents complexes

Gd-DOTMA (charge : 1-)

Dans le dérivé obtenu à 300 mM de Gd-DOTMA, le complexe se fixe sur trois sites, dont un avec une occupation très élevée, et les deux autres avec des occupations affinées inférieures à 30% (tableau 2.4.1). La bonne qualité de la densité électronique autour de l'ion de Gd du premier site a permis de placer le ligand et d'affiner la structure du complexe lié à la protéine.

Site principal (taux d'occupation : 1,0)

Comme le montre la figure 2.4.2, le complexe, chargé négativement, se lie via le côté de son macrocycle à une partie peu chargée de la surface, le site de fixation étant une légère cavité formée à l'interface avec une molécule de protéine symétrique. Le côté Gd^{3+} pointe vers le solvant.

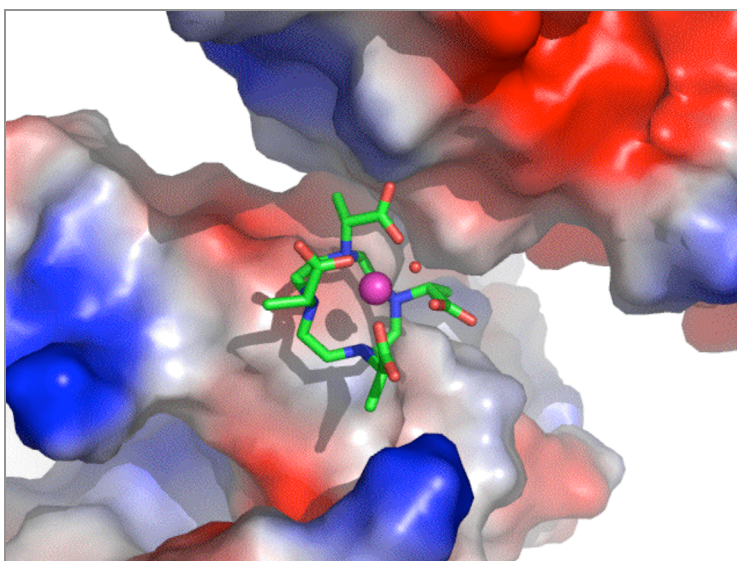


Figure 2.4.2 : Site de fixation principal du complexe Gd-DOTMA formé par deux molécules de la protéine urate oxydase. La surface voisine au complexe est peu chargée.

Comme le montre la figure 2.4.3.a, la liaison du complexe fait intervenir une interaction hydrophobe entre le macrocycle et le cycle aromatique du Trp174 (distance $\sim 3,3\text{\AA}$), les plans des deux cycles étant parallèles, un pont salin entre un atome d'oxygène carboxylique du ligand et l'atome d'azote NZ de la Lys189 ($2,9\text{\AA}$) et la coordination via les atomes d'oxygène du ligand de trois molécules d'eau. Ces molécules d'eau sont liées à d'autres molécules d'eau ordonnées entre le complexe et la surface protéique, qui ne sont pas montrées ici. Le neuvième ligand de la première sphère de coordination de l'ion Gd^{3+} est présent sous forme d'une molécule d'eau liée à l'ion ($\text{O-Gd} : 2,9\text{\AA}$) La figure 2.4.3.b montre la densité 2fo-fc de la structure affinée qui est très bien définie.

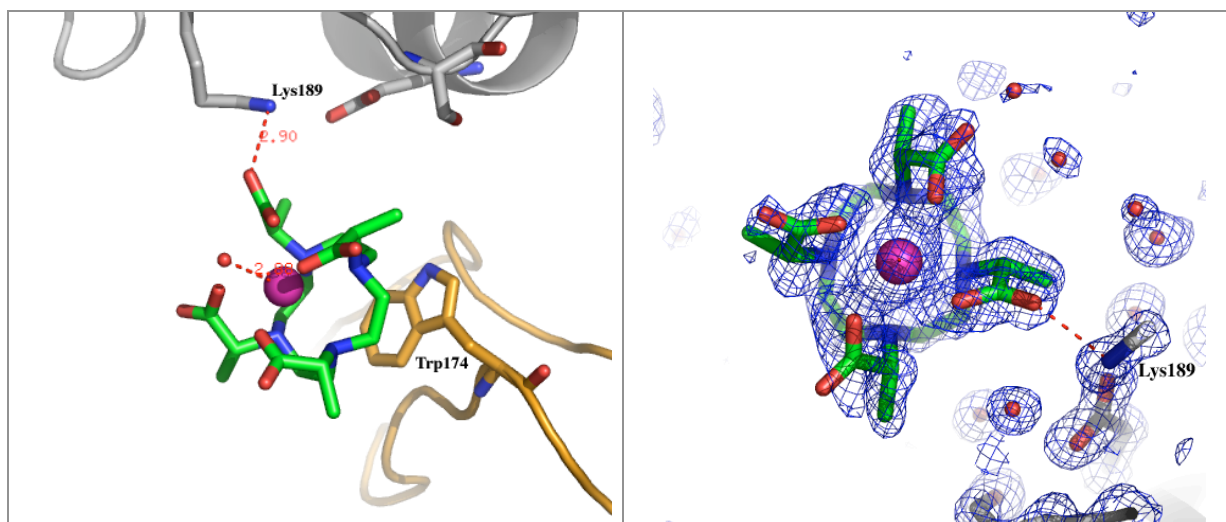


Figure 2.4.3 : Site de fixation principal du complexe Gd-DOTMA formé par deux molécules de la protéine urate oxydase. En gris, les résidus protéiques de la molécule de protéine symétrique. a) Les traits pointillés indiquent un pont salin et la coordination d'une molécule d'eau par l'ion de Gd. b) Densité 2Fo-Fc du modèle de complexe affiné.

Gd-DTPA-BMA (charge : 0)

Le complexe Gd-DTPA-BMA se lie assez fortement sur trois sites. Les occupations affinées avec CNS sont de 0,92, 0,48 et 0,70 respectivement pour les sites 1, 2 et 3 du dérivé obtenu avec 300 mM de complexe. Grâce à une densité électronique bien définie, l'affinement de la structure du complexe et l'interprétation du mode de fixation sont possibles pour les trois sites.

Site 1 et 2

Les sites 1 et 2 sont proches l'un de l'autre (distance $\text{Gd1-Gd2} : 8,4\text{\AA}$) dans le tunnel formé par le dimère de la protéine (figure 2.4.1). Comme le montre la figure 2.5.4.a, les molécules de complexe se lient à la surface de la protéine via le côté de l'ion. La surface, au site 1, est chargée négativement, sauf aux endroits où pointent les atomes d'oxygène carboxyliques extérieurs du ligand.

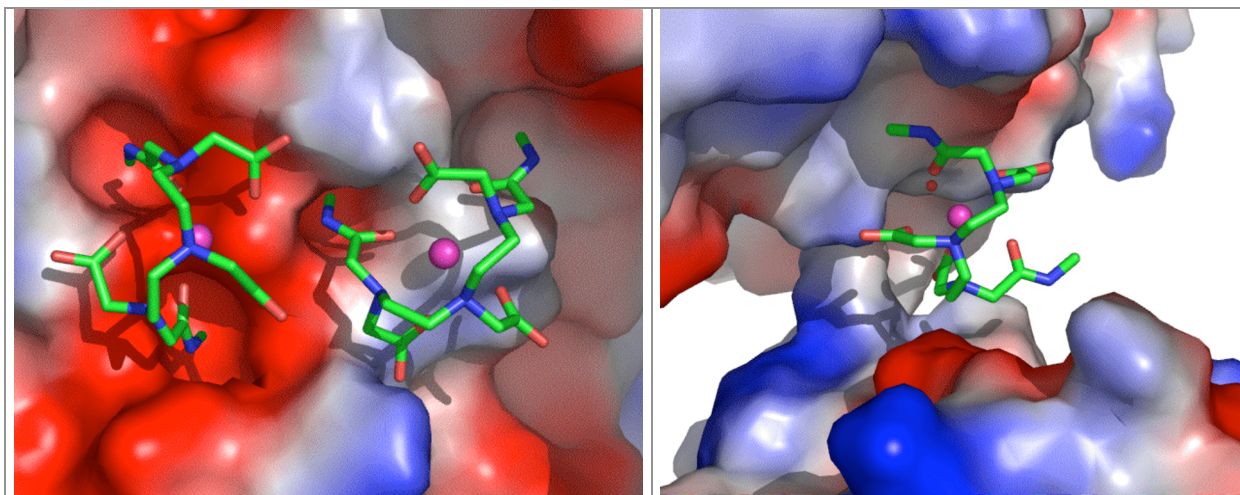


Figure 2.4.4 : De gauche à droite : a) les sites de fixation 1 et 2 et b) le site3 du dérivé urate oxydase + Gd-DTPA-BMA.

Site 1 (taux d'occupation : 0,92)

La figure 2.4.5.a montre les interactions du complexe lié au site 1 avec les résidus protéiques de la surface. La conformation des acides aminés dans la protéine native est montrée en bleu. L'ion est coordonné par un atome d'oxygène de la chaîne latérale de l'Asp133 (OD-Gd³⁺ : 2,5 Å), cet atome agissant comme 9^e ligand de l'ion. Les atomes du ligand interagissent avec la protéine : un atome d'azote du bras du ligand forme une liaison H avec l'atome d'oxygène carboxylique du Glu39 (N-OE : 2,7 Å) et un atome d'oxygène du ligand forme un pont salin avec l'atome d'azote NZ de la Lys143 (O-NZ : 2,7 Å). Le complexe est entouré d'un réseau de molécules d'eau ordonnées, dont six molécules d'eau liées aux atomes du ligand, à des distances inférieures à 3 Å, non montré ici. Pour le rôle des molécules d'eau ordonnées pour la fixation des complexes voir plus loin paragraphe II.4.5.a.

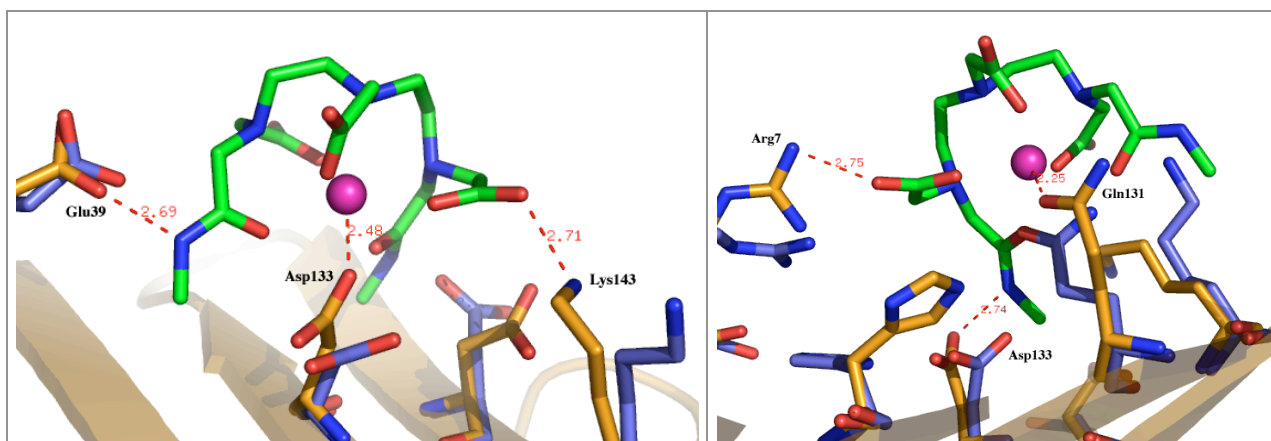


Figure 2.4.5 : Les molécules de complexe Gd-DTPA-BMA liées à la protéine urate oxydase a) sur le site de fixation 1, b) sur le site 2. En or : orientation des résidus protéiques dans le dérivé, en bleu : orientation des résidus protéiques dans la protéine native.

Site 2 (taux d'occupation : 0,48)

La figure 2.4.5.b montre le mode de fixation du complexe Gd-DTPA-BMA et la conformation des résidus dans le cristal dérivé et natif au site 2. Le site se trouve à proximité du site 1 mais son taux d'occupation est sensiblement plus bas. L'ion Gd³⁺ est coordonné par l'atome d'oxygène OE1 de Gln131 (Gd-OE1 : 2,3 Å). Une liaison H est formée entre l'atome d'azote d'un bras du ligand et un oxygène OD de l'Asp133 (N-OD : 2,7 Å). C'est ce même atome d'oxygène qui coordonne l'ion Gd³⁺ du site 1. Un pont salin existe entre un oxygène du ligand

et l'azote NZ de la Lys7 (O-NZ : 2,8 Å). Le complexe est entouré d'un réseau de molécules d'eau ordonnées, non montré ici, dont quatre molécules d'eau liées directement aux atomes du ligand, à des distances < 3 Å.

Site 1 et 2

La figure 2.4.6.a montre le modèle des complexes liés aux sites 1 et 2 et leurs interactions avec les résidus protéiques, dont celles avec l'Asp133 qui interagit avec les deux molécules de complexe. La figure 2.4.6.b montre la carte 2Fo-Fc, très bien définie, de la structure affinée du complexe lié dans le site 1 et des résidus protéiques impliqués dans les interactions. La densité correspondant à la chaîne du ligand du site 2 présente quelques lacunes.

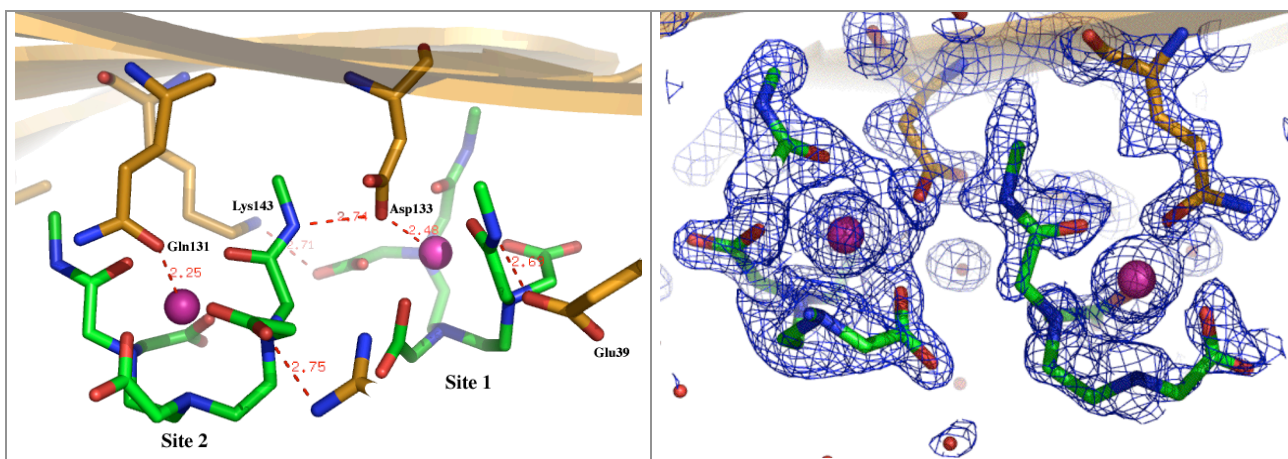


Figure 2.4.6 : a) Modèles des molécules de Gd-DTPA-BMA liés aux sites 1 et 2 et leurs interactions avec les résidus protéiques. b) La carte 2Fo-Fc des modèles affinés de la protéine et des molécules de complexe.

Site 3 (taux d'occupation : 0,70)

Le site 3 se trouve dans une cavité formée par deux molécules de protéine symétriques (voir figure 2.4.4.b). Le complexe tourne son côté ionique vers la surface protéique, mais, contrairement aux sites 1 et 2, l'ion n'est pas coordonné par un résidu protéique. Comme le montre la figure 2.4.7.a, l'ion Gd^{3+} coordonne une molécule d'eau comme 9^e ligand (Gd^{3+} -O : 2,3 Å). Cette même molécule d'eau forme des liaisons H avec l'atome d'azote de la chaîne principale de l'Asn223 (O-N : 2,9 Å) et l'atome d'oxygène OD de l'Asp222 (O-O : 2,6 Å). Un pont salin entre un atome d'oxygène du ligand et l'atome d'azote NZ de la Lys233 (O-NZ : 2,9 Å) renforce la fixation du complexe. Comme le montre la figure 2.4.7.b, la densité 2Fo-Fc de la structure affinée du complexe lié à la protéine est très bien définie, ainsi que la densité de la molécule d'eau impliquée dans la liaison. Le complexe est entouré par un réseau de molécules d'eau ordonnées, dont 8 molécules d'eau directement liées au ligand.

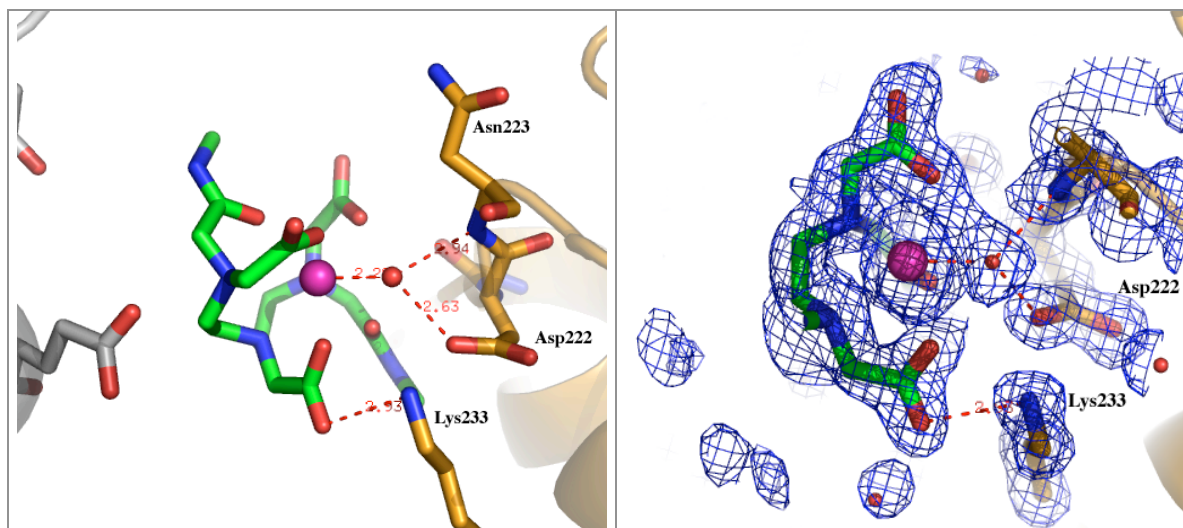


Figure 2.4.7 : a) Le complexe Gd-DTPA-BMA lié sur le site 3 de l'urate oxydase et ses interactions avec la protéine (en gris : résidus de la molécule de protéine symétrique), b) La carte 2Fo-Fc, très bien définie, du complexe affiné.

Gd-DO3A (charge : 0) :

Le dérivé obtenu avec une concentration de complexe de 100 mM présente 10 sites de fixation dont les taux d'occupation varient de 5 à 26%. Après l'affinement du modèle incluant la protéine et les molécules d'eau et l'affinement des coordonnées et des occupations des ions Gd^{3+} , la densité 1Fo-Fc correspondant aux ligands des complexes est trop faible pour placer les molécules de complexe et les affiner. L'analyse des résidus protéiques situés à proximité des sites de fixation des ions Gd^{3+} montre qu'il s'agit majoritairement de glutamates ou d'aspartates. Ceci est en accord avec le mode de fixation principal que j'ai observé pour ce complexe avec d'autres protéines (glucose isomérase, yeaZ, YGGV). Dans ce complexe, il manque deux atomes de coordination à l'ion Gd^{3+} . Avec plusieurs dérivés de ce complexe, j'ai observé que le complexe se lie de préférence via son côté ionique aux glutamates et aspartates de la surface protéique, l'ion Gd^{3+} coordonné par les deux atomes d'oxygène carboxyliques du résidu. Les deux atomes d'oxygène saturent ainsi la première sphère de coordination du Gd^{3+} .

II.4.4.a. Le rôle des molécules d'eau ordonnées pour la liaison des complexes

Exemple : Urate oxydase + Gd-DTPA-BMA 300 mM, site 3

Le plus souvent, dans le cas où la sphère de coordination de l'ion Gd^{3+} n'est pas saturée par des atomes de résidus protéiques, une molécule d'eau liée à l'ion sert de 9^e ligand. Ici, la molécule d'eau qui agit comme 9^e ligand pour l'ion Gd^{3+} forme deux liaisons H avec un atome d'oxygène et un atome d'azote de la surface protéique. Outre les molécules d'eau liées à l'ion Gd^{3+} , des molécules d'eau sont coordonnées par les atomes d'oxygène carboxyliques extérieurs des ligands (et les atomes d'azote des groupements carbamide de Gd-DTPA-BMA). Le complexe est ainsi intégré dans le réseau de molécules d'eau ordonnées entourant la surface protéique. Parfois, les molécules d'eau coordonnées par le complexe pontent le complexe à des résidus protéiques. Dans l'exemple montré sur la figure 2.4.8.a, huit molécules d'eau interagissent par liaison H avec les atomes d'oxygène et d'azote des bras du ligand, dont deux qui pontent le ligand à des atomes d'oxygène de la surface protéique. Comme le montre

la figure 2.4.8.b, la carte 2Fo-Fc correspondant aux molécules d'eau est généralement bien définie.

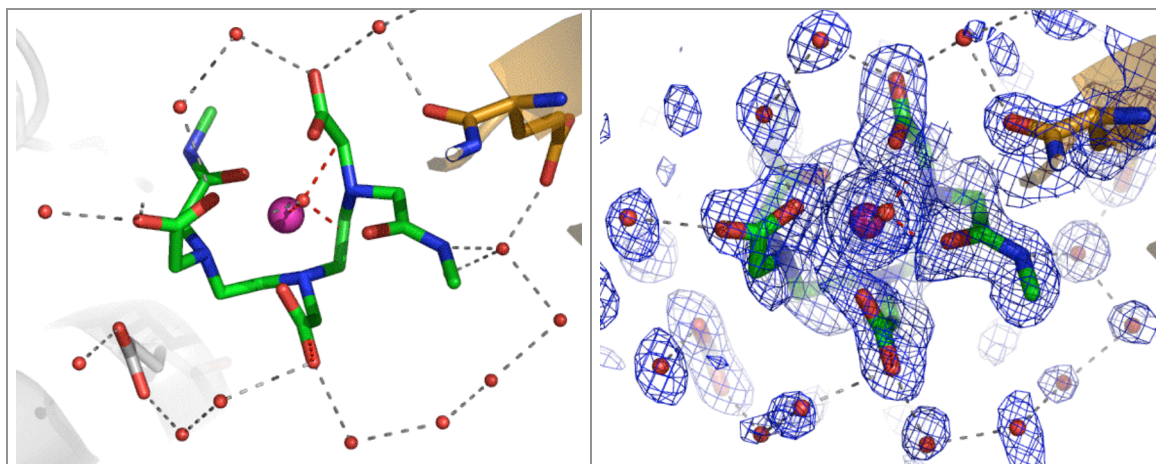


Figure 2.4.8. : a) Le complexe Gd-DTPA-BMA du site 3 du dérivé de l'urate oxydase. Les traits pointillés gris indiquent les liaisons H entre des atomes du ligand et des molécules d'eau ou des liaisons H entre deux molécules d'eau. Toutes les liaisons indiquées correspondent à des distances interatomiques < 3 Å. b) La densité 2Fo-Fc du complexe et des molécules d'eau coordonnées est très bien définie.

Pour d'autres exemples de description du rôle des molécules d'eau pour la fixation des complexes voir les affinements du dérivé du lysozyme avec le Gd-HPDO3A (chapitre II.4.9.) et de la protéine X avec le Gd-DTPA (chapitre II.4.11.).

II.4.4.b. L'apport d'un taux d'occupation élevé des sites de fixation pour identifier le mode de fixation. Comparaison de dérivés obtenus à des concentrations de complexe de 100 mM et de 300 mM.

Le tableau 2.4.2.a-c permet de comparer les valeurs de taux d'occupation des différents sites de fixation des dérivés préparés avec une concentration de complexe de 100 mM et de 300 mM. On remarque les taux d'occupation sensiblement plus élevés pour les dérivés préparés avec 300 mM de complexe.

Lysozyme +	Site	Qcns 100 mM	Bcns [Å ²] 100 mM	Qcns 300 mM	Bcns [Å ²] 300 mM
Gd-HPDO3A	1	0,81	15	1,00	13
	2	0,73	16	0,87	11
Gd-DOTA	1	0,69	29	0,82	17
	2	0,50	44	0,53	16
Gd-DO3A	1	0,57	23	0,96	38
	2	0,36	22	0,69	21
	3	0,21	18	0,31	17

Tableau 2.4.2.a : Valeurs des taux d'occupation et des facteurs d'agitation thermique affinés par SHARP des atomes de gadolinium pour les différents sites de dérivés préparés avec 100 et 300 mM de complexe pour les dérivés de lysozyme

Urate oxydase +	Site	Qsha 100 mM	Bsha [\AA^2] 100 mM	Qsha 300 mM	Bsha [\AA^2] 300 mM
Gd-DTPA-BMA	1	0,47	20	0,87	14
	2	0,28	20	0,66	15
	3	0,30	21	0,82	14

Tableau 2.4.2.b : Valeurs des taux d'occupation et des facteurs d'agitation thermique affinés par SHARP des atomes de gadolinium pour les différents sites de dérivés préparés avec 100 et 300 mM de complexe pour les dérivés d'urate oxydase

Thaumatine +	Site	Qsha 100 mM	Bsha [\AA^2] 100 mM	Qsha 300 mM	Bsha [\AA^2] 300 mM
Gd-DOTA	1	0,32	24	0,61	29
Gd-DOTA-BOM	1	0,72	29	0,93	22
Gd-DTPA-BMA	1	0,54	25	0,70	28
Gd-DTPA	1	0,31	16	0,48	16

Tableau 2.4.2.c : Valeurs des taux d'occupation et des facteurs d'agitation thermique affinés par SHARP des atomes de gadolinium pour les différents sites de dérivés préparés avec 100 et 300 mM de complexe pour les dérivés de thaumatine

L'exemple des sites de fixation 1 et 2 du dérivé de l'urate oxydase avec Gd-DTPA-BMA

Les valeurs des taux d'occupation des sites 1 et 2 sont de 0,47 et 0,28 pour le dérivé obtenu à 100 mM et sont de 0,87 et 0,66 à pour le dérivé obtenu à 300 mM de complexe. Comme le montre la figure 2.4.9.a, la densité 2Fo-Fc des complexes avec une occupation de l'ordre de 30% est très mal définie. Pour le site 2, il n'y a que quelques fragments de densité pour certains atomes d'azote ou d'oxygène. Pour le site 1, de la densité est visible pour les bras du ligand. La figure 2.4.9.b montre le dérivé à 300 mM. La carte expérimentale du site 1 est très bien définie et permet d'identifier l'emplacement des bras et de la chaîne du ligand. Pour le site 2, elle permet d'identifier l'emplacement des bouts de bras et de distinguer les deux différents types de bras. Les atomes d'azote de la chaîne sont également indiqués par des fragments de densité. La carte 2Fo-Fc du dérivé à 300 mM (figure 2.4.9.c) confirme sans ambiguïté l'orientation du modèle placé pour les deux sites, même si elle présente quelques lacunes pour le complexe du site 2. Les deux résidus coordonnant les ions Gd^{3+} (Asp133 et Gln131) sont en double conformation. Pour le dérivé à 100 mM leur conformation "liante" est minoritaire, c'est pourquoi la densité correspondante est mal définie (figure 2.4.9.a).

On peut résumer que, en utilisant un dérivé préparé avec une concentration de complexe de 300 mM au lieu de 100 mM, placer le modèle du ligand dans la densité, auparavant difficile pour le site 1 et impossible pour le site 2, devient aisé (site1) et possible (site 2) avec le dérivé à 300 mM.

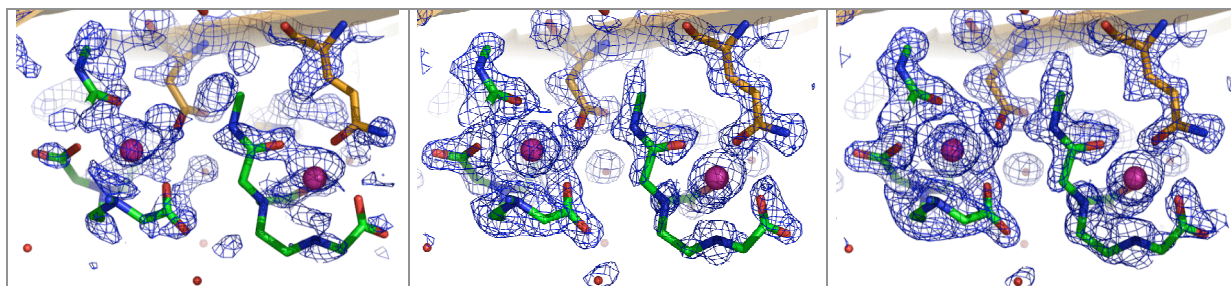


Figure 2.4.9 : Carte de densité électronique correspondant aux molécules de complexe liée à la protéine dans le dérivé urate oxydase + Gd-DTPA-BMA sur le site 1 (gauche) et 2 (droite). a) Carte 2Fo-Fc du modèle affiné pour le dérivé à 100 mM, b) Carte expérimentale pour le dérivé à 300 mM, c) Carte 2Fo-Fc du modèle affiné pour le dérivé à 300 mM.

II.4.4.c. Comparaison de la qualité des cartes expérimentales calculées avec les phases obtenues après modification de densité

Exemple : Urate oxydase + Gd-DTPA-BMA 100 mM, site 1

Les cartes de densité électronique expérimentales peuvent apporter une information importante sur l'orientation des ligands dans les dérivés. Pour des sites fortement occupés et des densités bien définies, une comparaison entre les cartes expérimentales calculées avec les phases obtenues 1) après SOLOMON et 2) après SOLOMON et DM montre qu'il y a peu de différences entre 1) et 2). Pour des sites avec des taux d'occupation faibles, les cartes calculées directement après SOLOMON semblent apporter plus d'information (voir figure 2.4.11). En effet, DM semble niveller plus fortement les zones à l'interface avec le solvant. Ceci se manifeste souvent pour des molécules d'eau présentes dans la carte après SOLOMON et absentes pour la carte après DM.

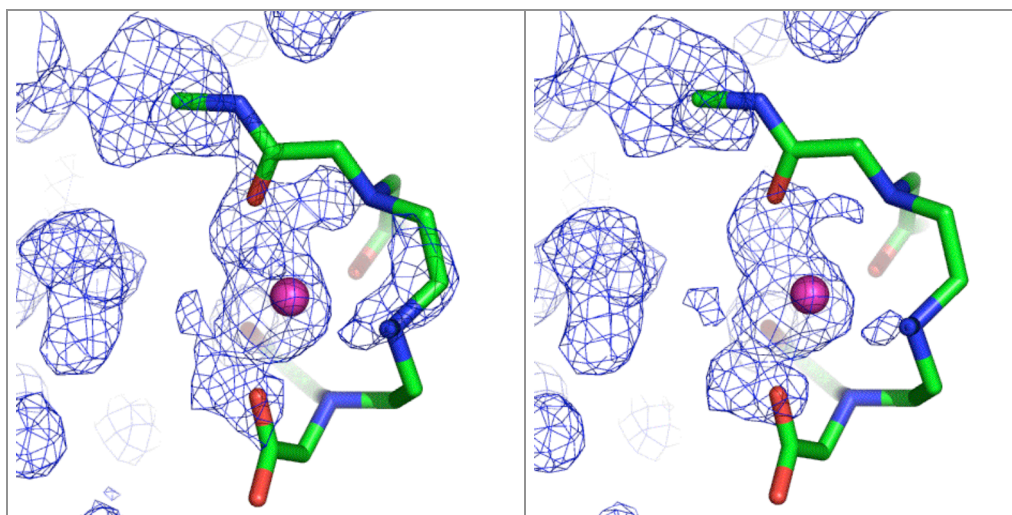


Figure 2.4.10 : Carte expérimentale (MAD) dans la région du site de fixation 1 du dérivé urate oxydase + Gd-DTPA-BMA 100 mM. a) Carte calculée avec les phases après SOLOMON, b) Carte calculée avec les phases après SOLOMON et DM. Bien que les différences soient faibles, on remarque la densité de la chaîne légèrement mieux définie en a) qu'en b).

II.4.4.d. Utilisation de l'information de phase expérimentale pour l'affinement

Exemple : Glucose isomérase + Gd-DO3A 100 mM, site 1

Généralement, les deux affinements, avec des données SAD en mode mlf, utilisant F+ et F-, d'une part et avec des données MAD phasées, en mode mlhl, d'autre part, ont convergé sans problème vers la bonne solution. Ceci n'est pas étonnant puisque nos modèles de départ étaient toujours très proches de la structure finale. L'étape critique, pour nos affinements, est de construire ou de placer le modèle du ligand dans la densité électronique (expérimentale ou 1Fo-Fc) souvent mal définie. J'ai voulu déterminer si l'information de phase expérimentale apporte des améliorations dans la définition de la carte 1Fo-Fc dans la région des parties non modélisées. J'ai donc calculé deux cartes correspondant au même modèle et aux mêmes données : une sans, et l'autre avec, utilisation de l'information de phase expérimentale. Les figures 2.5.11.a et b montrent que les cartes de densité présentent de légères différences.

Néanmoins, la carte calculée avec les phases expérimentales n'est pas mieux définie que la carte sans apport de phases expérimentales.

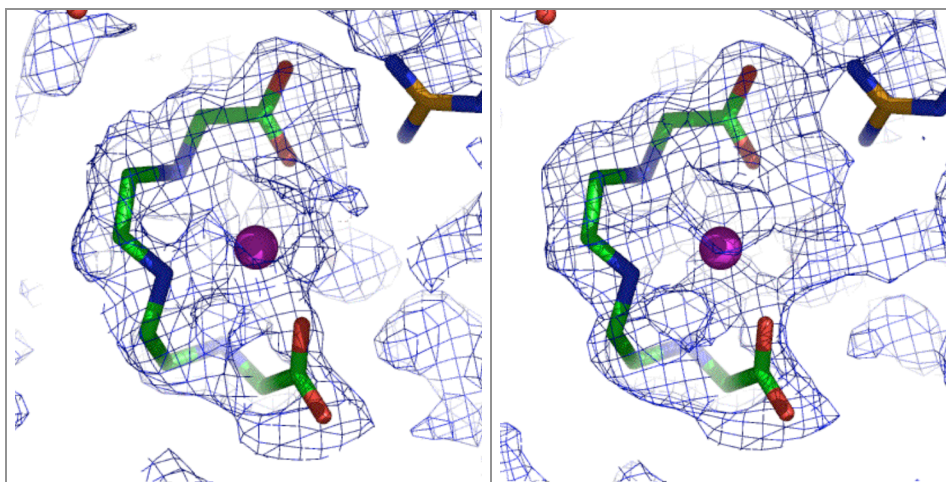


Figure 2.4.11 : Carte de densité 1Fo-Fc calculée avec le modèle affiné de la protéine mais sans placer le modèle du ligand. Pour les deux cartes, le même modèle a été utilisé. a) Carte calculée sans utiliser de l'information de phase expérimentale (mode sigmaa); b) Carte calculée en incluant de l'information de phase expérimentale (mode combine).

La figure 2.4.12 montre la carte de densité 2Fo-Fc calculée avec le modèle comprenant le complexe, a) sans et b) avec utilisation de l'information de phase expérimentale. Pour cette carte non plus, on ne peut constater de meilleure définition de la carte utilisant les phases expérimentales.

Néanmoins, l'obtention de bonnes phases expérimentales permet de calculer des cartes de densité électronique expérimentales précises. Ces dernières peuvent s'avérer utiles pour construire ou placer le modèle du ligand dans des cas où la carte 1Fo-Fc présente des ambiguïtés. La carte expérimentale peut alors apporter de l'information non biaisée par le modèle de la protéine.

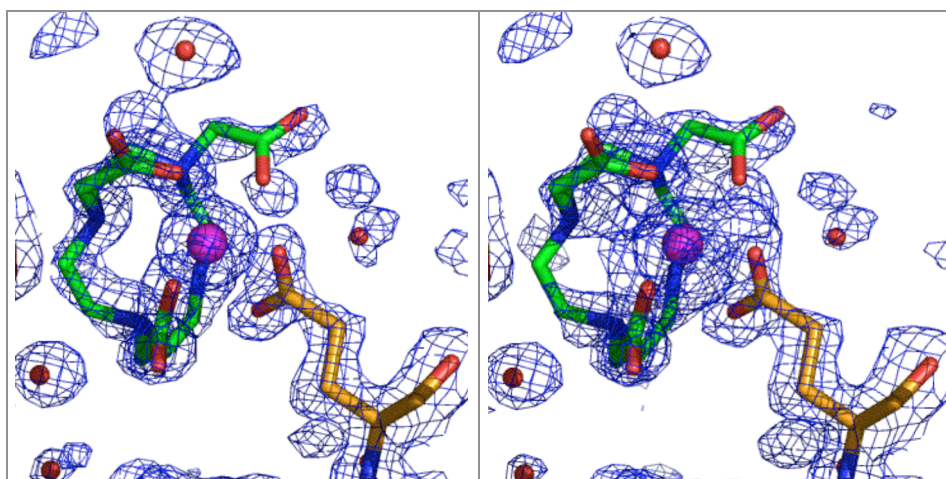


Figure 2.4.12 : Carte de densité 2Fo-Fc calculée avec le modèle affiné de la protéine et du complexe. Pour les deux cartes, le même modèle a été utilisé. a) Carte calculée sans utiliser de l'information de phase expérimentale (mode sigmaa); b) Carte calculée en incluant de l'information de phase expérimentale (mode combine).

II.4.5. YGGV

Complexe	Nb complexes affinés	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-DOTMA	1	2*0,33 ; 0,25 ; 0,17	24; 62; 49	0.28	0.33	2,70
Gd-DOTA-BOM	0	0,47 ; 0,39 ; 0,34	44 ; 40 ; 45	0.31	0.38	2,68
Gd-DO3A	1	0,51 ; 0,17 ; 0,25 ; 0,20	24 ; 45 ; 25 ; 25	0.34	0.38	2,68

Complexe	Site	Résidus proches, distances de l'ion de Gd
Gd-DOTMA	2	Tyr 84, Tyr 88, Lys101 tous à 6-7 \AA
	3	His127 (~ 7 \AA)
Gd-DOTA-BOM	1	His127 (~ 7 \AA) (= site 3 Gd-DOTMA)
	2	Tyr84 ($\sim 6-7$ \AA) (= site 2 Gd-DOTMA)
	3	Asn10 (~ 4 \AA)
Gd-DO3A	2	Tyr 84, Tyr 88, Lys101 (6-7 \AA) (= site 2 Gd-DOTMA)

Tableau 2.4.3 : Statistiques d'affinement des dérivés d'YGGV.

La résolution des données, limitée à 2,7 \AA , fait que l'interprétation de la densité électronique, l'identification d'éventuelles interactions entre les complexes et la protéine et enfin l'estimation de distances ne peuvent être effectuées avec précision.

YGGV + Gd-DOTMA (charge : -1)

Site principal (taux d'occupation : 2*0,33)

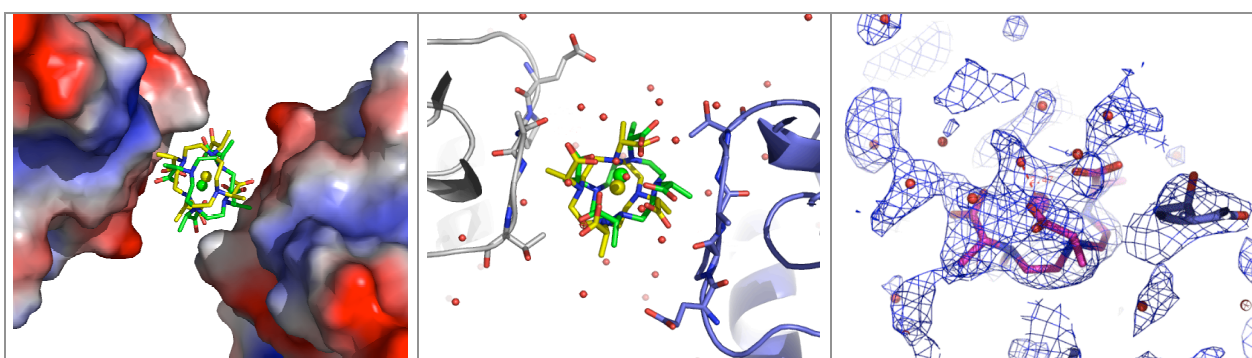


Figure 2.4.13 : Liaison du complexe Gd-DOTMA sur le site de fixation principal du dérivé d'YGGV. Le site se trouve sur un axe de symétrie cristallographique. a) Représentation en mode surface électrostatique, b) L'interaction du complexe avec la molécule, c) La carte 2Fo-Fc du modèle affiné. a) et b) En vert et en jaune : les deux molécules de complexe liées par symétrie (en réalité les deux orientations ne coexistent pas sur un même site, mais sont distribuées statistiquement).

Le site de fixation est situé sur un axe de symétrie cristallographique d'ordre 2. La molécule de complexe n'obéissant pas à cette symétrie, son orientation dans le site est statistiquement distribuée entre deux orientations possibles.

Le complexe est lié entre les chaînes principales de deux molécules de protéine symétriques (voir figure 2.4.13). Le complexe n'interagit pas directement avec la surface protéique. La densité de la molécule d'eau qui agit comme neuvième ligand de l'ion de Gd^{3+} est bien définie

(figure 2.4.13.c) (Gd-O : 2,5 Å). Le complexe est entouré de nombreuses molécules d'eau ordonnées. Comme on peut le voir sur la figure 2.4.13.c, la densité 2Fo-Fc correspondant au ligand est relativement forte. L'interprétation de la densité expérimentale et de la carte 1Fo-Fc n'est cependant pas aisée, car la densité des deux orientations du complexe est superposée. Après avoir modélisé le complexe, il reste beaucoup de densité non modélisée autour des molécules.

YGGV + Gd-DO3A (charge : 0)

Site principal (taux d'occupation : 0,51)

Le complexe est lié dans une relativement étroite cavité formée par deux molécules de protéine symétriques (figure 2.4.14.a). La faible taille de la cavité peut expliquer la fixation exclusive du plus petit complexe à cet endroit. La fixation se fait selon le mode habituellement observé pour ce complexe. L'ion Gd^{3+} est coordonné par les deux atomes d'oxygène carboxyliques de l'Asp33 (Gd-O ~2,7 Å). Les atomes d'oxygène agissent ainsi comme 8^e et 9^e ligand de l'ion de Gd. L'orientation exacte de la molécule de ligand ne peut être déterminée avec certitude, la densité électronique correspondant au ligand étant forte, mais assez mal définie (figure 2.4.14.c).

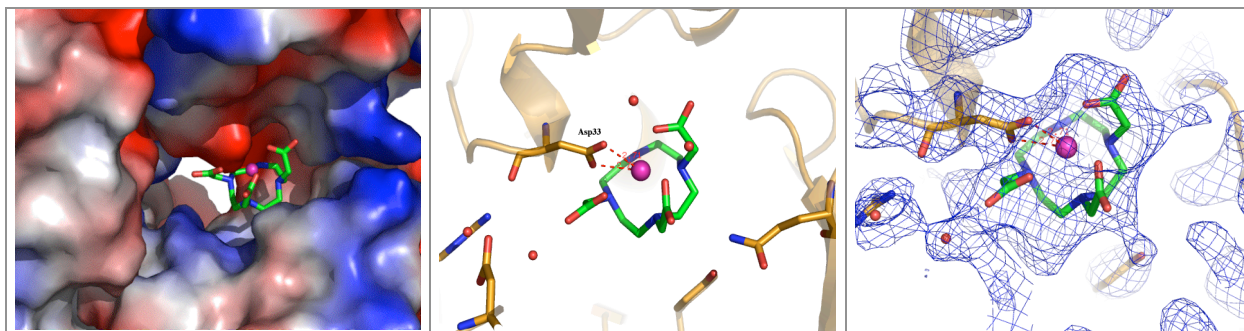


Figure 2.4.14 : Site de fixation principal du complexe Gd-DO3A dans le dérivé d'YGGV. a) La représentation en mode surface électrostatique montre l'étroite cavité de fixation, l'ion de Gd pointant vers une zone de surface fortement négative. b) L'ion est coordonné par l'Asp33. c) La carte de densité 2Fo-Fc du modèle affiné.