

II.4.6. YeaZ

Complexe	Nb de complexes affinés	Nb de Sites	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-DOTMA	1	8	0,66;0,36;0,42; 0,20;0,17;0,17	48,75,100, 94,67,63,68	0,22	0,25	2,3
Gd-DO3A	2	6	0,74;0,30;0,33; 0,67;0,18;0,29	30;41;53; 39;48; 45	0,23	0,29	2,7

Complexe	Site	Résidus proches	Complexe	Site	Résidus proches
Gd-DOTMA	1	AspB182, HisC33	Gd-DO3A	1	AspB182, HisC33
	2	TrpD102, ArgD103		2	GluC32
	3	PheD67		3	TrpD102, ArgD103
	4	HisB33, AspC182		4	HisB33, AspC182
	5	TyrB216		5	TyrB216
	6	PheA67		6	TrpB102

Tableau 2.4.4 : Statistiques d'affinement des dérivés affinés de YeaZ. La protéine cristallise avec quatre molécules dans l'unité asymétrique, certains sites de fixation se retrouvent pour plusieurs molécules. Ces sites structurellement proches sont indiqués dans la même couleur. Les deux complexes ont la plupart des sites de fixation en commun. Les sites correspondants sont également indiqués dans la même couleur.

Les deux complexes Gd-DOTMA et Gd-DO3A ont plusieurs sites de fixation en commun. La protéine cristallise avec 4 molécules par unité asymétrique. Pour certains sites de fixation, le complexe se lie également sur des sites équivalents, structurellement proches des autres monomères. Les taux d'occupation des sites homologues sont cependant différents. Le mode de fixation a pu être affiné pour les sites de fixation principaux. Le taux d'occupation des sites minoritaires est trop faible pour pouvoir identifier le mode de fixation des complexes.

YeaZ + Gd-DOTMA (charge : -1)

Site 1 (taux d'occupation : 0,66)

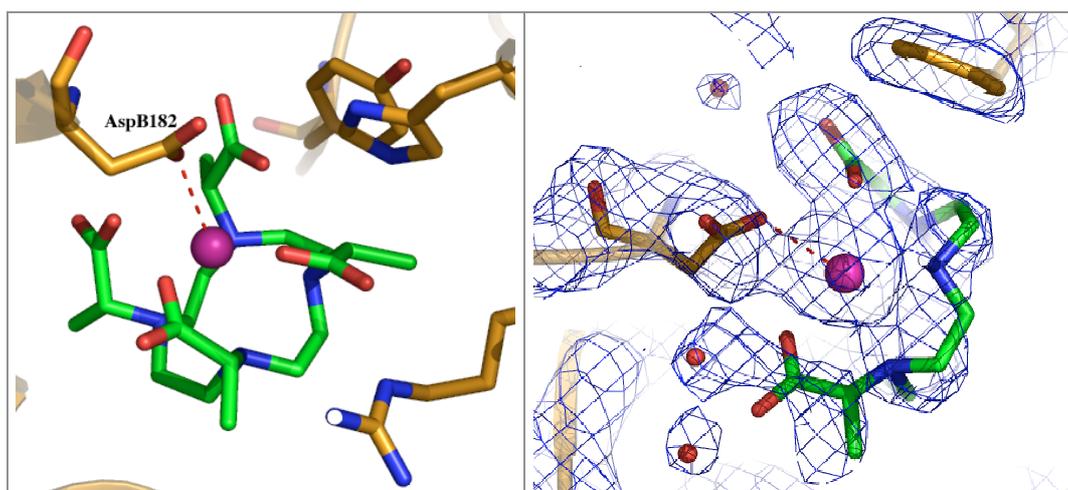


Figure 2.4.15 : Site de fixation principal du dérivé yeaZ avec Gd-DOTMA. a) Le complexe se lie via son côté ionique. Il est entouré de résidus protéiques. b) Densité 2Fo-Fc du modèle affiné.

Le site de fixation se trouve dans une cavité, entouré de résidus appartenant à différents monomères de la protéine (figure 2.4.15.a). Le complexe se lie via son côté ionique, l'ion Gd^{3+} étant coordonné par un atome d'oxygène carboxylique de l'AspB182 (Gd-OD : 2,7 Å). Le macrocycle est tourné vers le solvant et les côtés du complexe sont entourés de résidus protéiques et d'un réseau de molécules d'eau ordonnées. Comme le montre la figure 2.4.15.b, la densité 2Fo-Fc est bien définie pour certaines parties du ligand alors qu'elle est moins bonne pour d'autres parties. Après affinement du modèle, il reste un peu de densité 1Fo-Fc résiduelle.

YeaZ + Gd-DO3A (charge : 0)

Site 1 (taux d'occupation : 0,74)

Le site de fixation est le même que le site principal du dérivé de yeaZ avec Gd-DOTMA. La fixation du complexe engendre des changements de conformation de résidus du site de fixation (voir figure 2.4.16.a). Ces mouvements permettent l'interaction entre le ligand et deux résidus protéiques et la coordination de l'ion Gd^{3+} par les deux atomes d'oxygène carboxyliques de l'AspB182 qui fournit ainsi le 8^e et 9^e ligand à l'ion Gd^{3+} . En effet, malgré la relativement basse résolution des données de 2,7 Å, la carte de densité électronique montre assez clairement l'interaction entre l'atome d'oxygène du ligand et l'atome d'azote NE2 de l'HisC33 (O-NE2 : 2,7 Å) d'une part et l'interaction du même atome d'oxygène avec l'atome d'azote NE de l'ArgC31 (O-NE : 2,7 Å) d'autre part (figure 2.4.16.b). Le taux d'occupation, plus élevé pour le complexe Gd-DO3A que pour le complexe Gd-DOTMA, s'explique peut-être par la plus petite taille du complexe Gd-DO3A et par le renforcement de la fixation par les interactions ligand-protéine supplémentaires. Cet effet est particulièrement important pour le site 4 (site équivalent au site 1), pour lequel les taux d'occupation sont de 0,64 (Gd-DO3A) et de 0,20 (Gd-DOTMA) respectivement. La bien meilleure définition de la densité électronique du complexe Gd-DO3A (figure 2.4.16.b) peut être due à une orientation plus figée de ce complexe. L'affinement du modèle du complexe lié dans le site 4 (site équivalent au site principal) montre que la fixation se fait de la même manière, la densité électronique étant cependant moins bien définie.

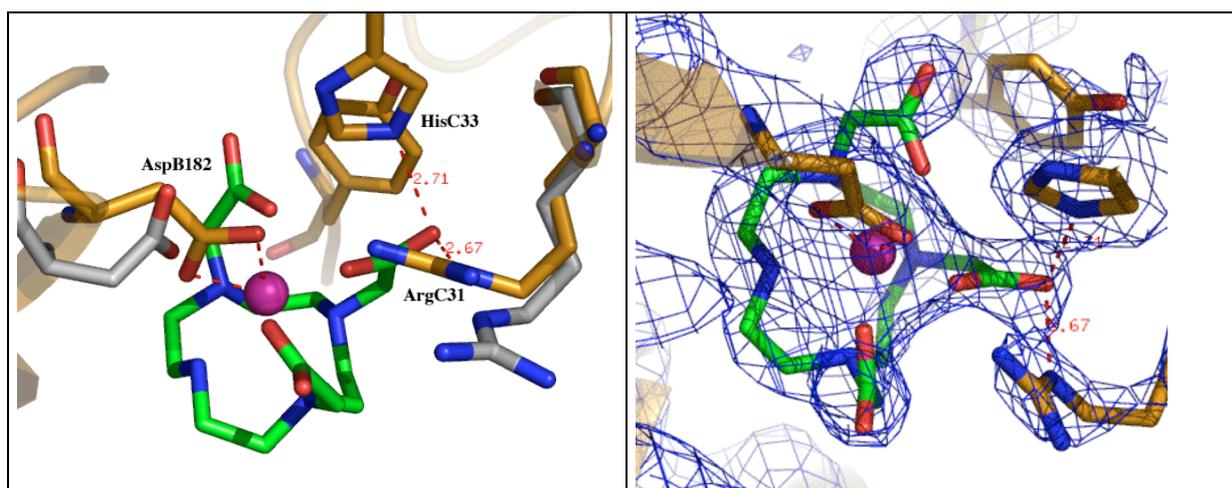


Figure 2.4.16 : Site de fixation principal du dérivé yeaZ + Gd-DO3A. a) en or : l'orientation des résidus protéiques dans le dérivé yeaZ + Gd-DO3A, en gris : leur orientation dans le dérivé yeaZ + Gd-DOTMA. b) Carte 2Fo-Fc du modèle affiné.

II.4.7. Glucose isomérase

Complexe	Nb de complexes affinés	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-DTPA	1	0,45	19	0,19	0,20	1,45
Gd-DO3A	3	0,56;0,56;0,37;0,24;0,15;0,10	22;26;21;19;15;15	0,21	0,21	1,44

Complexe	Site	Résidus proches
Gd-DO3A	4	Glu132, Arg10
	5	proche du site 3 (distance 5,3 \AA)
	6	Asp297, Arg42

Tableau 2.4.5 : Statistiques d'affinement pour les dérivés affinés de glucose isomérase

Glucose isomérase + Gd-DO3A (charge 0)

Le dérivé glucose isomérase + Gd-DO3A présente un nombre relativement élevé de six sites de fixation du complexe, dont les taux d'occupation varient de 10 à 56%. Pour tous les sites (sauf le site 5), un glutamate ou un aspartate se trouve à proximité de l'ion ainsi qu'une ou plusieurs arginines. Le taux d'occupation élevé des sites 1, 2 et 3 a permis l'affinement de la structure du complexe lié à la protéine. Il est très probable que le mode de fixation aux sites 4 et 6 soit le même que celui qui est observé pour les sites 1, 2 et 3.

Site 1 (taux d'occupation : 0,56)

Comme le montre la figure 2.4.17.a, la fixation du complexe se fait grâce à la coordination de l'ion Gd^{3+} par les deux atomes d'oxygène carboxyliques du Glu207, le macrocycle étant tourné vers le solvant. La fixation est renforcée par la formation de ponts salins entre deux atomes d'oxygène d'un même bras du ligand et les deux atomes d'azote NH1 et NH2 de l'Arg208 (O-NH: 2,8 et 2,9 \AA respectivement). Le taux d'occupation du site est proche de 50%, ce qui fait qu'il a été possible d'affiner la double conformation des deux résidus protéiques impliqués dans la fixation du complexe. Comme le montre la figure 2.4.17.b, la densité 2Fo-Fc du modèle affiné est assez bien définie.

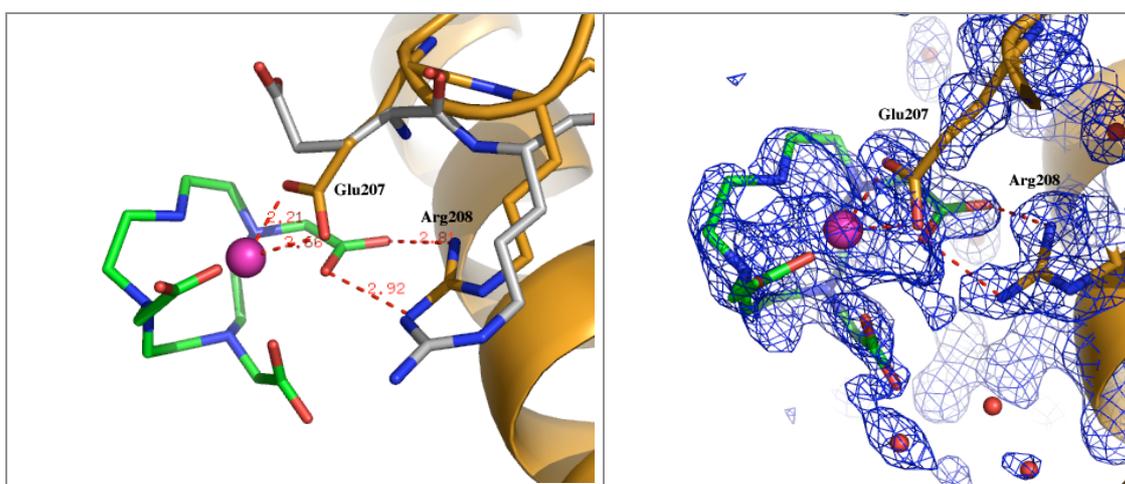


Figure 2.4.17 : Site de fixation 1 du dérivé glucose isomérase + Gd-DO3A. a) Les deux résidus en interaction avec le complexe sont en double conformation. En or : la conformation "liante", en gris : la conformation "non-liante". b) La densité 2Fo-Fc du modèle affiné est bien définie.

Site 2 (taux d'occupation : 0,56)

La coordination de l'ion se fait, de manière analogue au site 1, par le résidu Glu325 (Gd-O : 2,6 et 2,4 Å respectivement). La double conformation du résidu est montrée dans la figure 2.4.18.a. Les atomes d'oxygène de deux bras différents du ligand (atomes d'oxygène proches de l'ion) forment des ponts salins avec les atomes d'azote NH de deux arginines (O-NH(Arg374) : 2,8 Å et O-NH(Arg387) : 2,9 Å). La densité 2Fo-Fc calculée pour la structure affinée, non montrée ici, est assez bien définie, sauf pour le bras du ligand qui n'interagit pas avec la protéine.

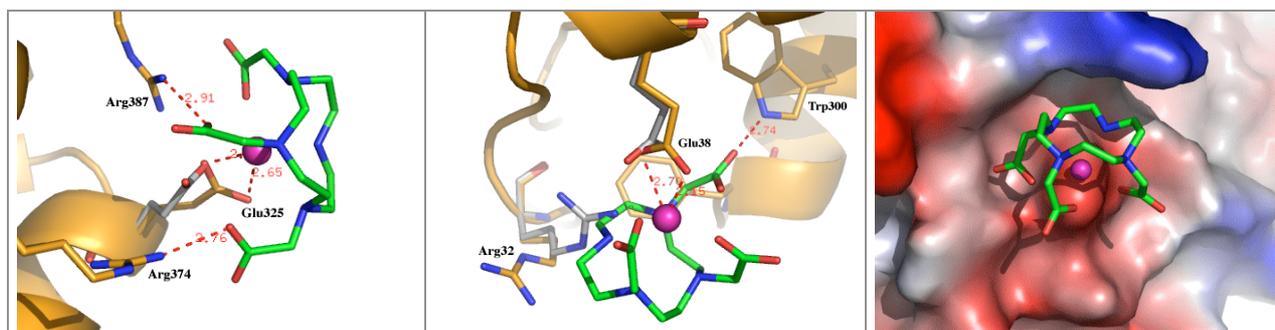


Figure 2.4.18 : a) Site de fixation 2 du dérivé glucose isomérase + Gd-DO3A. En gris, la conformation "non-liante" du résidu Glu325. b) Site de fixation 3 du dérivé glucose isomérase + Gd-DO3A. En gris, les conformations "non-liantes" des résidus voisins au site. c) Représentation en mode surface électrostatique du site 3.

Site 3 (taux d'occupation : 0,37)

La coordination de l'ion se fait de manière analogue aux sites 1 et 2 par les deux atomes d'oxygène du Glu38, dont la double conformation est indiquée dans la figure 2.4.18.b. L'Arg32 est également en double conformation, sa conformation "native" provoquerait un conflit stérique avec le ligand. Un atome d'oxygène du ligand interagit avec l'atome d'azote NE1 du Trp300 (O-NE1 : 2,7 Å). La figure 2.4.18.c montre la surface électrostatique de la protéine, bien adaptée par sa forme à la fixation du complexe. La zone de surface en contact avec le complexe est chargée négativement.

Glucose isomérase + Gd-DTPA (charge -2)

Initialement, il m'a manqué le modèle du complexe à utiliser pour cet affinement-ci, car la structure cristallographique du complexe Gd-DTPA n'était pas connue. J'ai pu résoudre ensuite la structure du complexe avec un dérivé d'une autre protéine où la densité électronique du complexe était mieux définie. Cette structure m'a servi pour continuer l'affinement du dérivé de glucose isomérase.

Dans ce dérivé, le complexe se lie sur un site unique, occupé à 45%. Comme le montre la figure 2.4.19.b, la densité électronique correspondant au complexe n'est que partiellement bien définie et présente des lacunes au niveau de la chaîne et du bras qui pointe vers le solvant. Le côté ionique du complexe est tourné vers la surface protéique. Une molécule d'eau, liée à l'ion Gd^{3+} et dont la densité est bien définie, sert de neuvième ligand (Gd-O : 2,8 Å) et ponte l'ion à la surface protéique et à d'autres molécules d'eau.

À proximité du site de fixation, une partie de densité 1Fo-Fc, relativement étendue, n'est pas occupée par des résidus protéiques. Je l'ai modélisée en plaçant le modèle d'une molécule de diméglumine, molécule qui sert de contre-ion dans la solution médicale du complexe utilisée. Le modèle de cette molécule ne permet cependant pas de remplir entièrement la densité résiduelle.

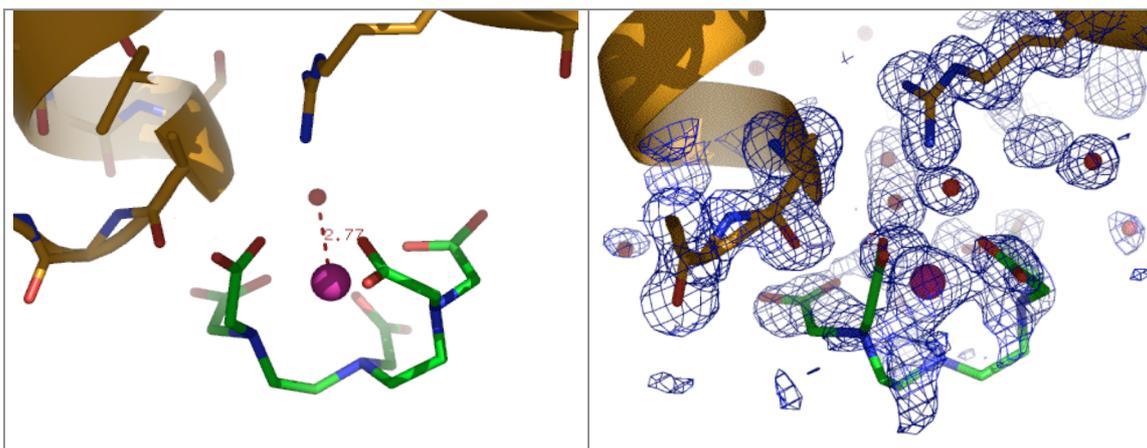


Figure 2.4.19 : Fixation du complexe Gd-DTPA dans la protéine glucose isomérase. a) Interaction du complexe avec la protéine et une molécule d'eau. b) La densité 2Fo-Fc du complexe n'est pas partout bien définie.

II.4.8. Lysozyme

Complexe ($C_{\text{complexe}} = 300 \text{ mM}$)	Nb de complexes affinis	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-HPDO3A	2	1,00;0,87	13;11	0,17	0,20	1,53
Gd-DOTA-BOM	1	0,74	22	0,22	0,25	1,53
Gd-DOTA	2	0,82;0,53	17;16	0,19	0,19	1,54
Gd-DO3A	2	0,96;0,69;0,31;0,18	38;21;17;13	0,26	0,28	1,54

Tableau 2.4.6 : Statistiques d'affinement pour les dérivés affinés de lysozyme

Le site de fixation dont le taux d'occupation est le plus élevé est identique pour les quatre complexes. Le deuxième site est identique pour trois des complexes, il est inoccupé pour le complexe Gd-DOTA-BOM. La particularité de la protéine est sa taille relativement petite et le faible contenu de solvant du cristal de $\sim 25\%$ seulement, ce qui limite le nombre de sites de fixations potentiels. Les deux sites de fixation principaux sont situés dans une cavité étroite formée par trois molécules symétriques de la protéine (voir figure 2.4.20). Les figures 2.5.21.a et b montrent plus en détail les sites de fixation 1 et 2. On remarque le bon accord entre la taille des complexes et la taille de la cavité. Les zones de surface en contact avec le complexe sont essentiellement chargées positivement.

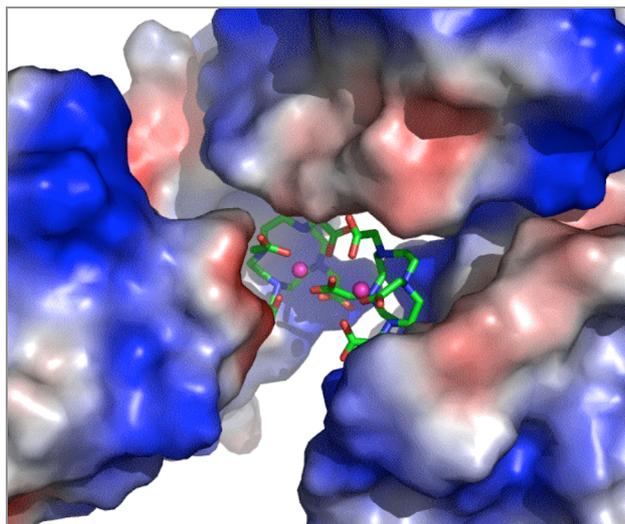


Figure 2.4.20 : Représentation en mode surface électrostatique de la cavité de fixation formée par trois molécules de protéine (avec deux molécules de complexe Gd-DOTA).

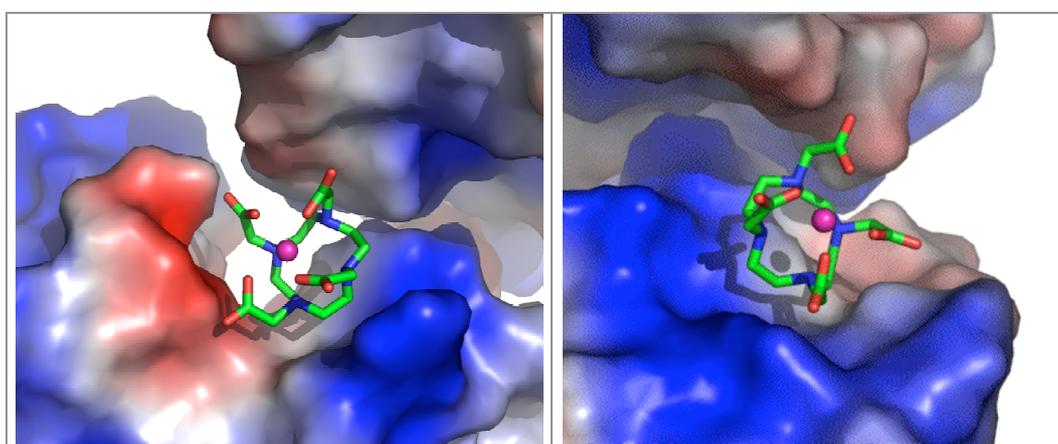


Figure 2.4.21 : a) Site de fixation 1, b) site de fixation 2 (avec des molécules de complexe Gd-DOTA).

Pour le dérivé du complexe Gd-DOTA-BOM, la structure du complexe a été modélisée par la structure du complexe Gd-DOTMA, car il n'y a pas de densité qui correspondrait au groupement (phénylméthoxy)méthyle du complexe et la structure cristallographique du complexe seul n'est pas connue.

Mode de fixation

La figure 2.4.22 montre la cavité de fixation avec les modèles affinés des différents complexes. Les quatre figures correspondent à la même perspective, ce qui permet de comparer l'orientation des différents complexes. Pour les quatre complexes, le macrocycle de la molécule liée au site 1 est en interaction hydrophobe avec le cycle aromatique du Trp62, les plans formés par les deux cycles sont parallèles. Pour les complexes Gd-HPDO3A et Gd-DO3A, la distance entre les deux plans est inférieure à 3,5 Å, elle est de $\sim 3,8$ Å pour Gd-DOTA et de ~ 4 Å pour Gd-DOTA-BOM. Dans le site 2, le macrocycle des complexes Gd-DOTA et Gd-DO3A est en interaction hydrophobe avec le Trp123, le macrocycle étant parallèle au cycle aromatique du tryptophane (distance $\sim 3,5$ Å). Pour le complexe Gd-DO3A, le macrocycle et le cycle aromatique du tryptophane sont cependant légèrement décalés. La molécule du complexe Gd-HPDO3A dans le site 2 est dans une orientation différente par rapport aux deux autres complexes. La molécule oppose son côté ionique au côté ionique du complexe du site 1. C'est un côté formé par deux bras du complexe qui se place parallèlement au Trp123. Alors que les plans formés par le macrocycle des complexes sont parallèles pour

les deux molécules de Gd-HPDO3A, ils ne le sont pas pour les complexes Gd-DO3A et Gd-DOTA. Pour une description plus détaillée du mode de fixation du complexe Gd-HPDO3A voir plus loin, au paragraphe II.4.8.a.

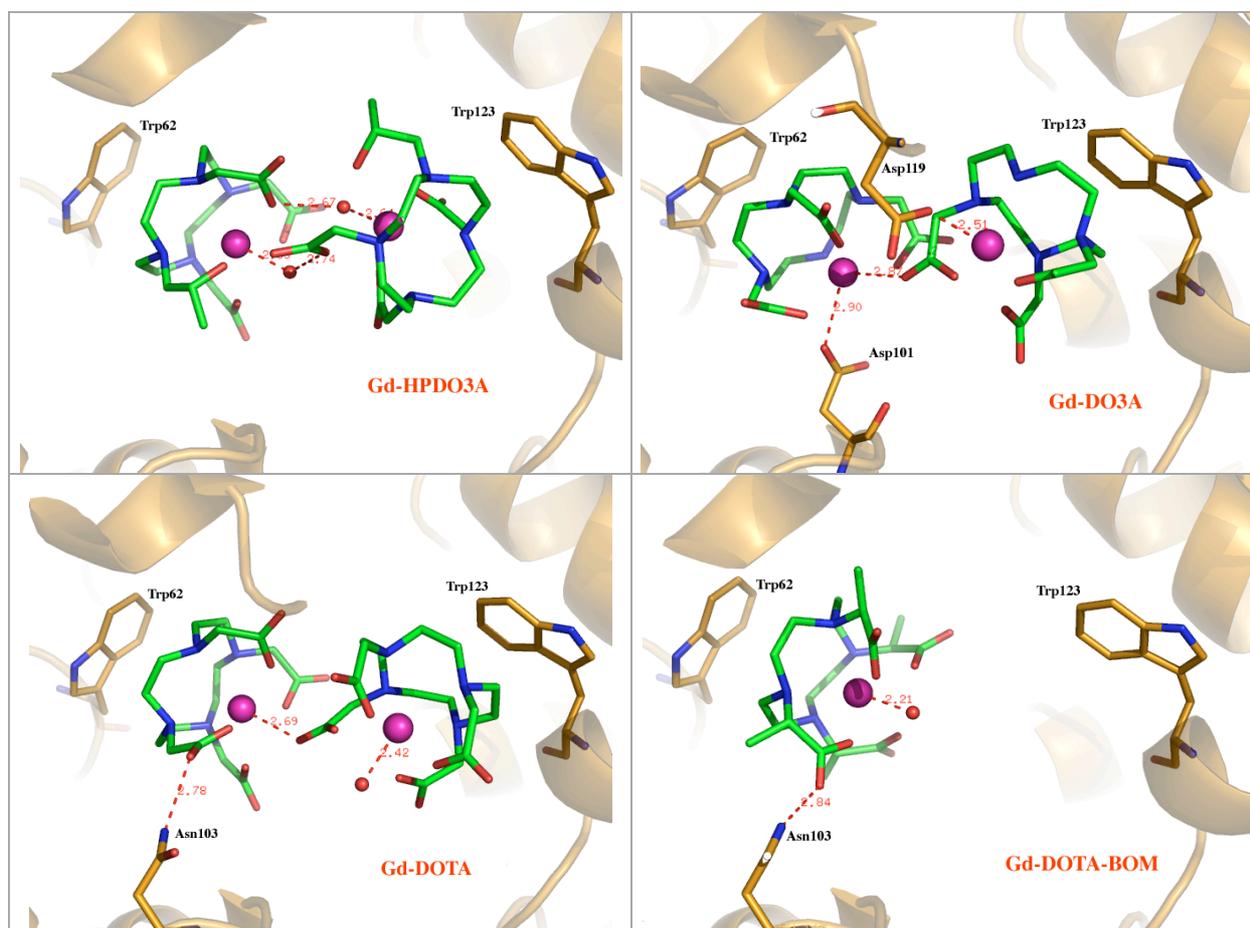


Figure 2.4.22 : Modèles affinés des différents complexes liés dans le site de fixation 1 (gauche) et 2 (droite) des dérivés du lysozyme. Les quatre figures correspondent à la même perspective.

Gd-DO3A (charge : 0)

Site 1 (taux d'occupation : 0,96)

Les deux atomes qui assurent la coordination de l'ion Gd^{3+} sont l'atome d'oxygène OD de l'Asp101 (Gd-O : 2,9 Å) et un atome d'oxygène appartenant au complexe lié dans le site 2 (O(ligand 2)-Gd(site 1) : 2,9 Å).

Site 2 (taux d'occupation : 0,69)

Un des atomes d'oxygène du ligand pointe vers l'ion Gd^{3+} du site 1. L'ion Gd^{3+} du site 2 est coordonné par un ou deux atomes d'oxygène carboxyliques de l'Asp119. La densité de la double conformation du résidu Asp119 n'est pas assez bien définie pour déterminer les interactions de manière précise.

Gd-DOTA (charge : -1)

Site 1 (taux d'occupation : 0,82)

Le neuvième ligand de l'ion Gd^{3+} est présent sous forme d'un atome d'oxygène carboxylique du complexe fixé dans le site 2 (Gd-O : 2,7 Å). Une liaison H entre un atome d'oxygène du

ligand et l'atome d'azote ND2 de l'Asn103 renforce la fixation du complexe (O-ND2 : 2,8 Å). Les molécules de complexe liées sur les sites 1 et 2 sont entourées d'un réseau de molécules d'eau ordonnées, stabilisant la fixation des complexes. La densité 2Fo-Fc du complexe dans le site 1, qui n'est pas montrée ici, est bien définie.

Site 2 (taux d'occupation : 0,53)

Le neuvième ligand de l'ion est formé par une molécule d'eau dont la densité est bien définie (Gd-O : 2,4 Å). Un des atomes d'oxygène du ligand pointe vers l'ion Gd³⁺ du premier site.

Gd-DOTA-BOM (charge : -1)

Le complexe (représenté par le modèle du complexe Gd-DOTMA) ne se lie que dans le site 1. De manière analogue au complexe Gd-DOTA, un atome d'oxygène du ligand forme une liaison H avec l'atome d'azote ND2 de l'Asn103 (O-ND2 : 2,8 Å). Le complexe est entouré d'un réseau de molécules d'eau ordonnées. Le neuvième ligand de l'ion est une molécule d'eau dont la densité est très bien définie.

La figure 2.4.23 résume les mouvements des résidus engendrés par la fixation des différents complexes.

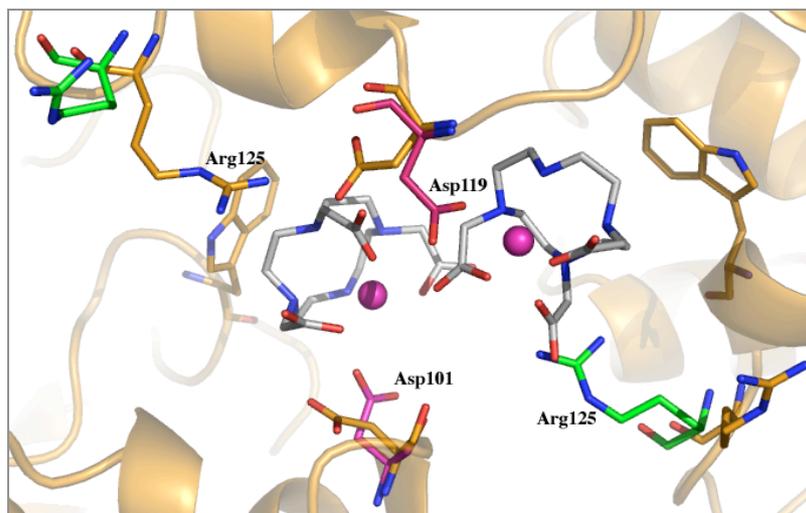


Figure 2.4.23 : Figure indiquant les mouvements de résidus protéiques engendrés par la fixation des complexes. En gris : modèle du complexe Gd-DO3A pour indiquer l'emplacement des complexes liés. En jaune : orientation générale des résidus dans les dérivés sauf mention contraire. En rouge : conformation dans le dérivé lysozyme + Gd-DO3A. En vert : orientation de l'Arg125 dans la structure native.

II.4.8.a. Le rôle des molécules d'eau ordonnées pour la fixation coopérative des deux molécules du complexe Gd-HPDO3A (charge : 0)

Les molécules de complexe liées dans le site 1 et le site 2 (taux d'occupation : 1,0 et 0,87 respectivement) ne forment aucune liaison H avec les résidus protéiques. Le neuvième ligand des ions Gd³⁺ est présent sous forme de molécules d'eau dont la densité est très bien définie pour les deux sites (O-Gd(site1) : 2,3 Å, O-Gd(site 2) : 2,6 Å). Le taux d'occupation des deux sites, élevé malgré le faible nombre de liaisons directes entre les complexes et la protéine, peut éventuellement être expliqué par le caractère coopératif de la fixation des deux molécules. En effet, les deux molécules légèrement décalées se faisant face, cette orientation permet d'établir un réseau d'interactions symétriques (voir figure 2.4.24). Ainsi, deux liaisons H sont formées entre des atomes d'oxygène des deux ligands. L'atome d'oxygène hydroxyle du bras portant le groupement méthyle interagit avec un atome d'oxygène carboxylique du

ligand situé en face (et réciproquement) (O-O : 2,7 Å). De plus, un réseau symétrique de six molécules d'eau ordonnées entre les deux molécules de complexe renforce l'interaction, toutes les molécules d'eau interagissant avec les deux molécules de complexe. La densité 2Fo-Fc des deux ligands affinés est en effet très bien définie. Ainsi il est possible de distinguer les trois bras carboxyliques des ligands du bras portant un groupement méthyle, ce qui a permis de corriger l'orientation de la molécule décrite dans Girard *et al.* (2002).

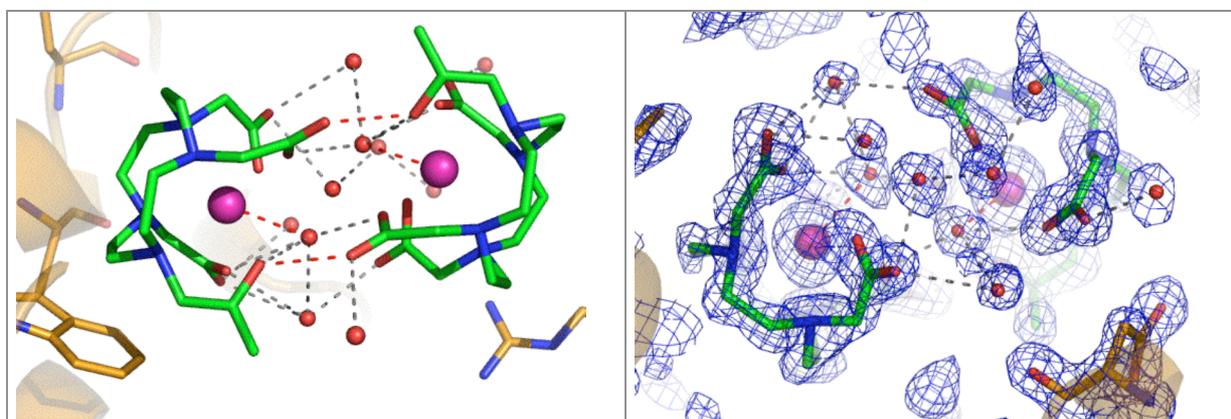


Figure 2.4.24 : a) Un réseau de molécules d'eau assure le contact entre les deux molécules de complexe. Les liaisons H sont indiquées par des traits pointillés gris. b) La densité 2Fo-Fc des molécules de complexe et des molécules d'eau est très bien définie.

II.4.8.b. Conclusions sur la sélectivité de la fixation des complexes dans les dérivés de lysozyme

Les deux complexes à ligand linéaire ne sont pas fixés dans les cristaux. Il semble que la présence du macrocycle soit nécessaire pour fixer le complexe, car il permet l'interaction hydrophobe avec le cycle aromatique du tryptophane (ou des tryptophanes). La fixation des complexes ne semble pas dépendre de la charge globale du complexe, car aussi bien des complexes neutres que des complexes chargés négativement se sont fixés.

II.4.9. Thaumatine

Complexe ($C_{\text{complexe}} = 300 \text{ mM}$)	Nb de complexes affinés	Qcns	Bcns [Å ²]	R	R _{free}	Résolution [Å]
Gd-DOTA-BOM	2	0,84; 0,48	18; 15	0,20	0,20	1,45
Gd-DTPA-BMA	1	0,66	22	0,19	0,20	1,45
Gd-DOTA	1	0,54	20	0,20	0,20	1,45
Gd-DTPA	1	0,50	15	0,19	0,20	1,45

Tableau 2.4.7 : Statistiques d'affinement pour les dérivés affinés de thaumatine

Le site de fixation principal des quatre complexes Gd-DOTA-BOM, Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA et Gd-DTPA est identique. Il s'agit d'une cavité de 14 Å de diamètre et 11 Å de profondeur dont la surface est chargée négativement (figure 2.4.25.a). Tous les complexes se lient à la protéine dans une orientation similaire, leur macrocycle ("pseudomacrocycle" pour les ligands linéaires DTPA et DTPA-BMA) étant en superposition, ainsi que, du moins approximativement, l'orientation des bras des ligands (figure 2.4.25.b). La fixation des complexes n'engendre aucun changement d'orientation de résidus protéiques. Le complexe

Gd-DOTA-BOM est le seul complexe qui se lie à un deuxième endroit de la surface protéique. Les quatre autres complexes ne se lient ni au site de fixation principal ni à aucun autre endroit.

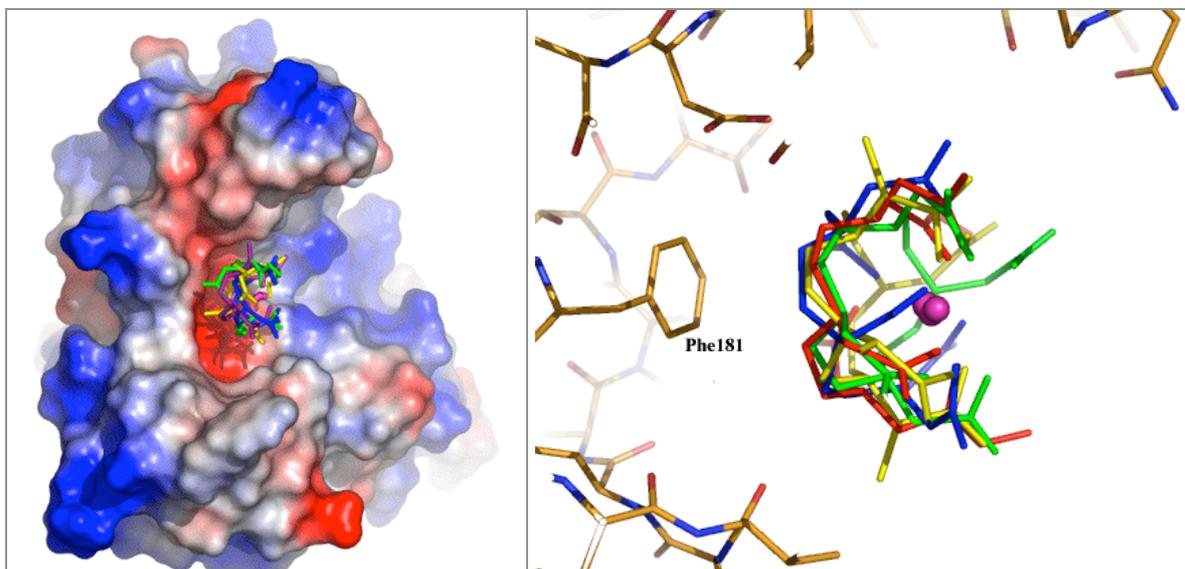


Figure 2.4.25 : a) Représentation en mode surface électrostatique du monomère de la protéine et de la cavité de fixation avec les modèles affinés des quatre complexes. b) Cavité de fixation avec les résidus protéiques voisins et la superposition des quatre complexes qui se fixent à cet endroit. En jaune : le ligand du complexe Gd-DOTA-BOM modélisé par le complexe Gd-DOTMA, en rouge : le ligand de Gd-DTPA-BMA, en bleu : le ligand de Gd-DTPA, en vert : le ligand de Gd-DOTA.

Mode de fixation - site 1

Tous les complexes se lient via le côté ligand, le macrocycle (ou "pseudomacrocycle") étant parallèle au cycle aromatique de la Phe181 de la cavité de fixation, à une distance d'environ 3,5 Å (figure 2.4.26). On remarque cependant un léger décalage pour le complexe Gd-DOTA. La fixation des complexes Gd-DTPA-BMA et Gd-DOTA met en jeu la formation d'un pont salin entre un atome d'oxygène carboxylique du ligand et l'atome d'azote NZ de la Lys49 (O-NZ : ~2.5 Å). La fixation du complexe Gd-DTPA met en jeu une liaison H entre un atome d'oxygène du ligand et l'atome d'oxygène OG de la Thr190 (O-O : 2,9 Å). Pour les quatre complexes, l'ion Gd³⁺ pointe vers le solvant. Pour trois des complexes, une molécule d'eau liée à l'ion Gd³⁺ joue le rôle de neuvième ligand. Pour le complexe Gd-DOTA, il n'y a pas de densité électronique qui indiquerait la présence d'une molécule d'eau liée à l'ion Gd³⁺. La fixation des quatre complexes implique un réseau de molécules d'eau ordonnées entre le ligand et la surface protéique. Malgré leurs taux d'occupation élevés, supérieurs à 0,5, la densité électronique des ligands est généralement mal définie. La densité permet de facilement identifier l'emplacement et l'orientation du macrocycle (ou "pseudomacrocycle"), mais elle est généralement assez "globulaire" et il est difficile de distinguer l'emplacement des bras des ligands dans la densité. Le manque de détail de la densité électronique indique probablement un désordre de rotation du ligand. Cependant, la position de l'ion Gd³⁺ ne semble pas affectée par le désordre, les valeurs du facteur d'agitation thermique étant de l'ordre de 20 Å² et le pouvoir de phasage des différents dérivés étant excellent comme le prouvent les statistiques de phasage.

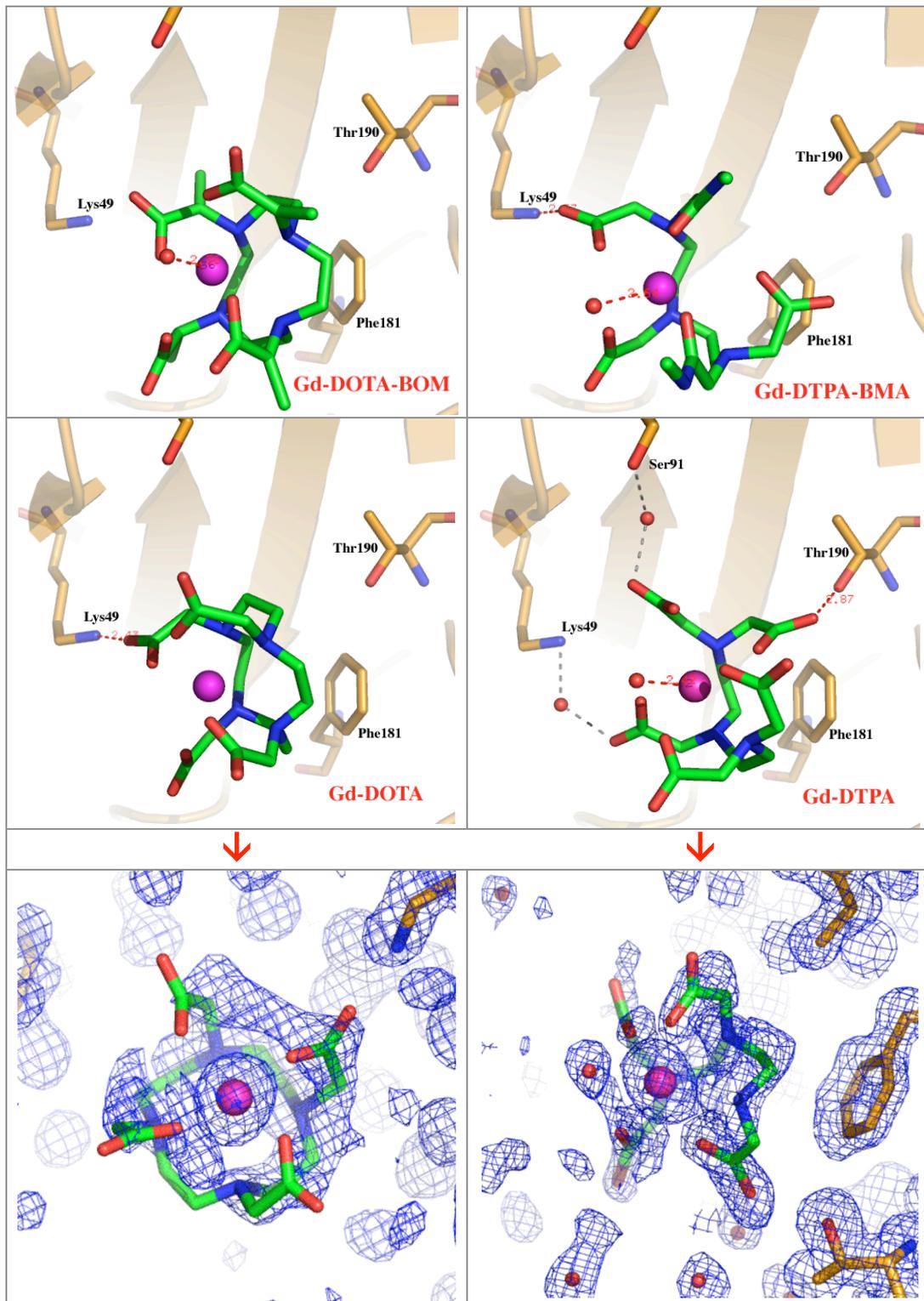


Figure 2.4.26 : a), b), c) et d) Site de fixation principal de la thaumatine et les modèles affinés des quatre complexes, le complexe Gd-DOTA-BOM étant représenté par le complexe Gd-DOTMA. Pour les complexes pour lesquels le désordre de fixation fait qu'on ne peut pas placer le modèle du ligand sans ambiguïté, la conformation qui correspond le mieux à la densité est représentée. e) et f) : Cartes de densité 2Fo-Fc des modèles affinés de e) Gd-DOTA et f) Gd-DTPA. On remarque que la densité du complexe Gd-DOTA est assez mal définie.

Gd-DOTA-BOM, le complexe avec le taux d'occupation le plus élevé présente la densité la moins bien définie. Il n'y a pas de densité indiquant l'emplacement éventuel du groupement (phénylméthoxy)méthyle, le complexe a donc été modélisé par le modèle du complexe Gd-

DOTMA. Comme on peut le voir sur la figure 2.4.26.e, la densité des bras du complexe Gd-DOTA est assez mal définie, sauf pour le bras impliqué dans un pont salin. La densité du complexe Gd-DTPA est la mieux définie de tous les complexes, bien que le complexe se lie avec le taux d'occupation le plus bas (figure 2.4.26.f). Il est possible que le ligand de ce complexe soit plus ordonné à cause de la liaison H entre le ligand et la protéine et les deux interactions par liaison H via des molécules d'eau, indiquées dans la figure 2.4.26.d. Cependant, il n'aurait pas été possible de construire le modèle du complexe à partir de la densité 1Fo-Fc de ce dérivé, et nous avons utilisé le modèle du complexe construit avec le dérivé d'une autre protéine.

Conclusions concernant le site 1

La fixation exclusive des quatre complexes ne s'explique apparemment ni par leur charge (les complexes liés portent des charges -1, -2 ou sont neutres), ni par la forme cyclique ou linéaire de leur ligand.

Gd-DOTA-BOM, site de fixation 2 (taux d'occupation : 0,48)

Le complexe Gd-DOTA-BOM se lie sur un deuxième site, d'une manière tout à fait différente du premier site (figure 2.4.27). Le complexe tourne son côté formé par deux bras du ligand vers la surface protéique, l'ion Gd^{3+} et le macrocycle étant exposés au solvant. La liaison du complexe se fait par formation de liaisons H entre deux atomes d'oxygène du ligand et les atomes d'oxygène des chaînes latérales d'une sérine et d'une tyrosine (O(ligand)-O(Ser10) : 2,8 Å, O(ligand)-O(Tyr11) : 2,5 Å). La fixation du complexe implique également un réseau de molécules d'eau ordonnées. La densité électronique qui correspond à la partie du complexe impliquée dans les liaisons H vers les résidus protéiques est relativement bien définie, alors que la densité de la partie tournée vers le solvant est très mal définie (figure 2.4.27.b). La densité 2fo-Fc de la molécule d'eau agissant comme neuvième ligand est très bien définie (Gd-O : 2,7 Å).

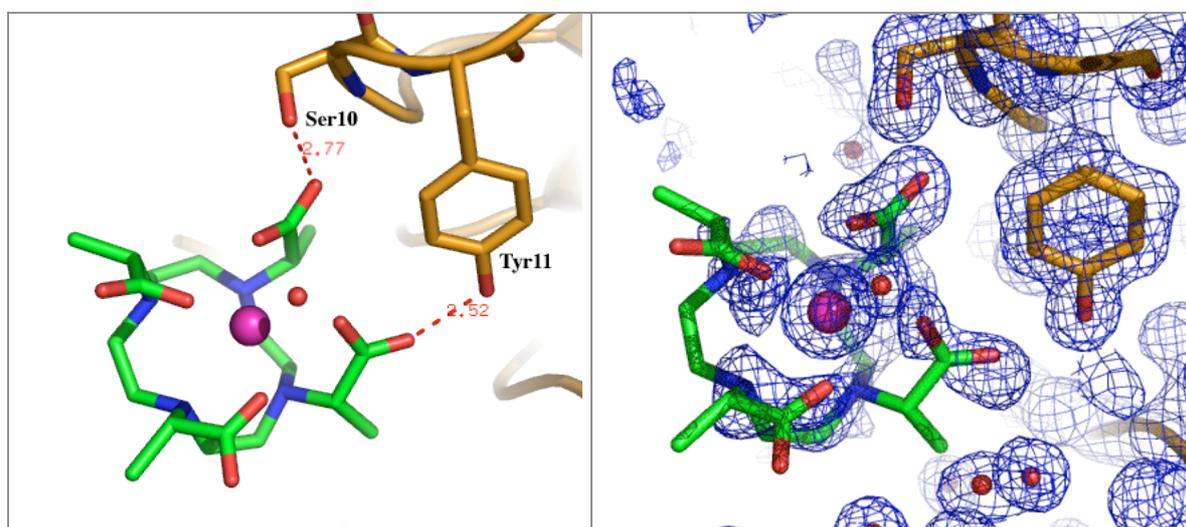


Figure 2.4.27 : a) Deuxième site de fixation du complexe Gd-DOTA-BOM. Comme il n'y a pas de densité électronique qui indiquerait l'emplacement du groupement (phénylméthoxy)méthyle du ligand, le complexe est modélisé par la structure du complexe Gd-DOTMA. b) Carte 2Fo-Fc du modèle affiné.

Conclusions

De manière analogue au site de fixation dans le lysozyme, le site 1 de ce dérivé sert de site de fixation pour plusieurs complexes à la fois. Les sites de fixation de ces deux protéines correspondent à des cavités prononcées dans la structure cristalline de la protéine.

Dans le cas de la thaumatine, on voit que ce n'est pas uniquement le taux d'occupation d'un site de fixation qui détermine l'interprétabilité de la carte de densité électronique correspondant au ligand, mais aussi la fixation du complexe dans une orientation privilégiée. Ainsi, la densité électronique des parties de ligand impliquées dans des liaisons directionnelles (liaisons H) est généralement plutôt bien définie.

II.4.10. Protéine X

	Nb de sites de fixation	Nb de complexes affinés	Qcns	Bcns [\AA^2]	R	Rfree	Résolution [\AA]
Gd-DTPA	1	1	0,99	37	0,26	0,30	2,03
Gd-DOTMA	1	1	0,65	44	0,21	0,25	2,17
Gd-HPDO3A	5	4	0,87;0,66;0,60; 0,72;0,13	33;36;31; 46;27	0,21	0,24	2,17
Gd-DO3A	6	3	0,83;0,66;0,63; 0,30;0,28;0,29	41;41;50; 44;37;41	0,22	0,25	2,17
Gd-DOTA-BOM	4	0	0,95;0,17;0,10; 0,12	38;40;39; 41	0,23	0,24	1,40
Gd-DTPA-BMA	2	0	0,34; 0,28	62; 62	0,24	0,28	2,98

Tableau 2.4.8 : Statistiques d'affinement pour les dérivés affinés de la protéine X.

Classement des sites de fixation

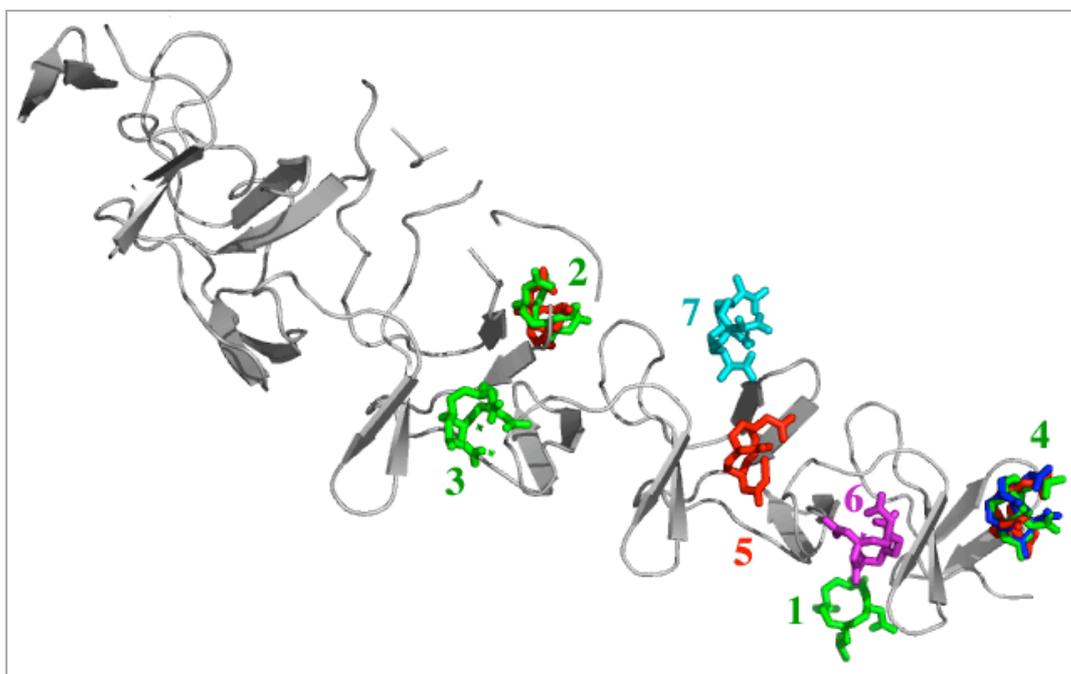


Figure 2.4.28 : Modèle affiné de la protéine X en représentation cartoon. Les sites de fixation des différents complexes sont indiqués et nommés de 1 à 7. En vert : le complexe Gd-HPDO3A, en rouge : Gd-DO3A, en magenta : Gd-DTPA, en cyan : Gd-DOTMA, en bleu : Gd-DOTA-BOM, représenté par le modèle de Gd-DOTMA.

Site 1		Site 2		Site 3		Site 4		Site 5	
complexe	Qcns								
HPDO3A	0,87	HPDO3A	0,66	HPDO3A	0,60	HPDO3A	0,72	HPDO3A	0,13
DO3A	0,30	DO3A	0,66			DO3A	0,63	DO3A	0,83
				DOTA-BOM	0,17	DOTA-BOM	0,95		

Tableau 2.4.9 : Taux d'occupation des sites 1 à 5 avec les complexes Gd-HPDO3A, Gd-DO3A et Gd-DOTA-BOM (le nom des complexe est abrégé par le sigle du ligand).