

Etude de la dynamique biomoléculaire sous haute pression par diffusion neutronique

Jérémie Marion

▶ **To cite this version:**

Jérémie Marion. Etude de la dynamique biomoléculaire sous haute pression par diffusion neutronique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAY091 . tel-01686695

HAL Id: tel-01686695
https://theses.hal.science/tel-01686695

Submitted on 17 Jan 2018

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.

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **PHYSIQUE/PHYSIQUE POUR LES SCIENCES DU VIVANT**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jérémie MARION

Thèse dirigée par **Judith PETERS**
préparée au sein de **L'Institut de Biologie Structurale et l'Institut Laue-Langevin**
dans **l'École Doctorale de Physique**

Etude de la dynamique biomoléculaire sous haute pression par diffusion neutronique

Thèse soutenue publiquement le **17 Décembre 2015**,
devant le jury composé de :

Monsieur Christian ROUMESTAND
Professeur à l'université de Montpellier (Rapporteur)
Monsieur Philippe OGER
Directeur de recherche au CNRS et ENS Lyon (Rapporteur)
Madame Irina MIHALCESCU
Professeur à l'université Joseph Fourier Grenoble (Présidente)
Monsieur Thomas GUTBERLET
Directeur de recherche au Helmotz-Zentrum Berlin (Membre)
Madame Judith PETERS
Professeur à l'université Joseph Fourier Grenoble (Diréctеur de thèse)

Table des matières

1 DIFFUSION NEUTRONIQUE ET TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES 8
1.1 THEORIE DE LA DIFFUSION NEUTRONIQUE 10
1.1.1 PRINCIPE DE LA DIFFUSION 11
1.1.2 DIFFUSION INCOHERENTE 16
1.1.3 SPECTROMETRE EN TEMPS DE VOL 22
1.1.4 SPECTROMETRES A RETRODIFFUSION 23
1.1.5 DIFFUSION COHERENTE 27
1.1.6 DIFFRACTOMETRE ET DIFFUSION AUX PETITS ANGLES 29

2 ETUDES SOUS HAUTE PRESSION DE SYSTEMES BIOLOGIQUES 32
2.1 INTRODUCTION GENERALE SUR LA HAUTE PRESSION EN DIFFUSION NEUTRONIQUE 34
2.2 ETUDE THERMODYNAMIQUE DU MODELE BICOUT-ZACCAI SUR UN SYSTEME MODELE 52
2.2.1 INTRODUCTION 53
2.2.2 ETUDE LA TRANSITION DYNAMIQUE DE VESICULES LIPIDIQUES MULTI-LAMELLAIRES ET BICOUCHES PAR DIFFUSION NEUTRONIQUE 53
2.2.3 CONCLUSION 69
2.3 ETUDE SOUS HAUTE PRESSION DU MOLTEN-GLOBULE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE 70
2.3.1 INTRODUCTION 70
2.3.2 ETUDE DE L'ETAT *GLOBULE FONDU* DE L'ACETYLCHOLINESTERASE HUMAINE INDUIT PAR PRESSION : CHANGEMENTS STRUCTURAUX ET DYNAMIQUES SUIVIS PAR DIFFUSION NEUTRONIQUE 70
2.3.3 CONCLUSION 80

3 CONCLUSION 81

4 REMERCIEMENTS **84**

5 ANNEXE **89**

6 RESUME DE L'OUVRAGE EN FRANÇAIS ET EN ANGLAIS **103**

INTRODUCTION

Le projet d'études de biomolécules par diffusion neutronique ouvre la voie pour obtenir de nouveaux résultats sur divers systèmes biologiques dans différentes conditions externes. Dans le présent travail, la haute pression hydrostatique et son influence sur la dynamique moléculaire sera la condition de choix. En effet, la température comme variable influence l'énergie thermique aussi bien que le volume d'un système à travers le facteur d'expansivité thermique, tandis que la pression permet d'influencer uniquement le volume par le facteur de compressibilité, ce qui donne un accès beaucoup plus direct à des effets sur la dynamique. Pourtant, la haute pression en biologie reste une approche relativement peu commune puisqu'en général réservée à l'étude des matériaux pour établir des diagrammes de phases, étudier des propriétés quantiques, rechercher des paramètres thermodynamiques, simuler des conditions géophysiques, ou étudier la résilience des matériaux. Or, certains systèmes biologiques comme les lipides subissent aussi des transitions de phases, dont certaines dépendent de la température, de la pression ou des deux variables à la fois. Leur étude est donc aussi essentielle pour obtenir une vue complète sur le comportement des membranes, par exemple, et donc des cellules sous conditions extrêmes.

Les raisons du nombre plus faible d'expériences sous haute pression sont diverses, entre autres, cela est dû à la difficulté expérimentale pour développer des porte-échantillons susceptibles de contenir les échantillons et de subir la pression, comme des enclumes de diamant utilisées en spectroscopie par rayons X en géophysique, par exemple. Cependant, une fois de telles difficultés technologiques surmontées, les résultats peuvent apporter différentes informations : La première problématique qui peut être abordée d'un point de vue plutôt physique revient à observer les systèmes biologiques comme des systèmes modèles pour en extraire un certain nombre de paramètres physiques. Bien qu'étrange d'un point de vue biologique à première vue pour comprendre la fonctionnalité d'un biosystème, son fonctionnement, son positionnement dans l'organisme, sa récurrence, sa structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire quand il s'agit d'une protéine, son origine génétique etc., l'approche physique d'un système apporte un certain nombre de données quantitatives différentes qui permettent d'une part de qualifier des systèmes proches les uns par rapport aux autres pour les comparer, mais aussi de les estimer de façon absolue et d'en déduire les propriétés inhérentes. Ces paramètres peuvent être divers : résilience du système à une force externe, énergie interne, etc... De plus, l'obtention de paramètres thermo-

dynamiques permet entre autres une classification systématique des systèmes.

Un second aspect d'intérêt plus biologique accessible par les expériences sous pression est celui de l'adaptation biologique des organismes vivants dans les fonds marins. Une grande partie de la biosphère terrestre vit actuellement dans les fonds marins (bien que d'après les recherches sur le sujet il reste difficile d'estimer leur quantité exacte [1]). Comprendre l'adaptation des organismes vivants dans ces environnements par rapport à leurs différentes composantes comme les membranes cellulaires, leur environnement interne, ou l'adaptation de leurs protéines révèle de passionnants défis, car peu de faits sont connus aujourd'hui.

De telles études permettent aussi d'aborder de nouveaux paramètres d'importance en biologie via la haute pression, mais de manière plus phénoménologique pour construire une vision du système plus complète. Les protéines d'une manière générale fonctionnent uniquement grâce à différents facteurs qui sont la structure, la dynamique et l'hydratation. Ces trois facteurs sont co-dépendants et liés entre eux et créent la différence entre un polypéptide et une protéine fonctionnelle. l'essentiel du travail présenté suit deux facteurs, la dynamique et la structure, pour établir des schémas récurrents ou non en biologie au travers de la haute pression.

La diffusion neutronique en tant qu'outil de mesure révèle toute son importance pour l'étude de systèmes de petite taille à l'échelle d'une protéine ou même de sa dynamique interne à l'échelle atomique. l'étude structurale et dynamique aidée d'études comparatives avec d'autres techniques permet d'observer en détail les variations de ces systèmes. En effet, un paramètre tel que la pression peut provoquer des états métastables, déstabiliser la structure tertiaire ou simplement dénaturer la protéine. La diffusion neutronique permet d'observer ces phénomènes en détail pour fournir de nouvelles informations. l'expérience peut même être poussée jusqu'à l'utilisation de cellules biologiques entières pour caractériser leur stabilité sous pression. d'autres expériences peuvent s'intéresser aux effets synergiques de la pression et de l'encombrement, du milieu dans lequel sont placés les biosystèmes, de la température, ou d'une modification du système lui-même. Ainsi le sujet laisse place à une large palette d'observations possibles.

Dans une première partie, le travail présentera la théorie de la diffusion neutronique [2] en détail agrémenté de commentaires sur ce qui est observé comment et pourquoi, au travers d'une partie théorique et d'une partie instrumentale. l'introduction théorique permet l'élaboration et la compréhension des phénomènes de diffusion qui sont abordés dans ce manuscrit. Le travail de recherche sera articulé à travers trois articles publiés et un en préparation pour être soumis permettant de progresser sur certains aspects de la haute pression en biologie par diffusion neutronique. Le projet est divisé en deux parties distinctes : d'une part l'étude de la dynamique de lipides étudiée par diffusion incohérente [3] en la mettant en relation avec la thermodynamique, d'autre part une étude phénoménologique de l'obtention d'un état méta-stable protéique sur l'acétylcholinestérase à travers la haute pression. Ces différents vecteurs de travail amèneront à une conclusion sur les futures pistes possibles du projet en

soulevant au passage nombre de questions nouvelles et passionnantes.

Chapitre 1

DIFFUSION NEUTRONIQUE ET TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES

L'idée d'une particule neutre à l'intérieur du noyau de l'atome a été théorisée en 1911 par Rutherford. Il fallut encore 21 années supplémentaires avant que James Chadwick ne le découvre expérimentalement ouvrant ainsi une nouvelle porte dans l'exploration même de l'intérieur de la matière. Cette particule obtint son nom gr,ce à ses propriétés électriques puisqu'elle est dépourvue de charge. Néanmoins elle n'est pas dépourvue de moment magnétique ni de moment diélectrique ce qui a donné lieu à la mise en place d'expériences particulières. Elle possède un spin d'un demi. Tout cela fait qu'elle possède des propriétés particulières pour l'étude de la dynamique des protons. Nous reviendrons ultérieurement sur ce sujet pour digresser sur les théories associées.

La diffusion neutronique est reconnue depuis plusieurs décennies comme technique de pointe pour l'investigation de la matière à l'échelle de l'atome, et plus particulièrement dans des domaines tels que la physique du solide, le magnétisme, les phénomènes de transition de phase de l'eau, les états superfluides, la tomographie etc. Néanmoins la biophysique représente en diffusion neutronique un champ de recherche exploré plus récemment [4]. La communauté scientifique autour de la biologie a commencé à s'intéresser à la diffusion neutronique pour les propriétés du neutron et ses interactions particulières avec les noyaux d'hydrogène notamment. Les échantillons biologiques étant constitués en grande partie d'hydrogène, les neutrons sont donc un parfait outil d'analyse pour des systèmes dont la complexité et la difficulté de production et de conservation demandent parfois des informations de type novateur pour comprendre leur fonctionnement et leurs propriétés.

La diffusion neutronique donne accès à différents types d'informations aux travers d'expériences qui dépendent de plusieurs paramètres définis par l'instrument et l'énergie des neutrons eux-mêmes. Les deux informations sont de type structural et dynamique et peuvent dans certains cas répondre à des questionnements de poids en biologie. Pourtant la technique elle-même est à la fois coûteuse en temps et en argent et que de rares centres de recherche dans le monde ont à leur disposition un réacteur nucléaire ou une source à spallation d'envergure. Dans ces centres, il existe souvent des programmes d'appel d'offres pour obtenir du temps de faisceau pour faire des expériences sur les lignes. Pourtant une expérience neutronique contient une richesse d'informations et peut fournir des indices sur divers problèmes.

Dans le cadre de notre étude, la plupart des expériences réalisées sont des expériences de diffusion neutronique sous haute pression pour mettre en avant sa viabilité expérimentale et scientifique comme outil d'exploration dans le domaine de la biophysique. De nombreuses expériences complémentaires et comparatives sont également présentées pour corréler ou non les résultats obtenus. Ce type d'analyse multi-technique permet entre autre d'avoir une compréhension phénoménologique plus approfondie des molécules étudiées. La raison du couplage de différentes techniques permet d'avoir une vision d'ensemble du phénomène. Des expériences telles que la calorimétrie différentielle pour caractériser des transitions de phase ou de dichroïsme circulaire pour quantifier et estimer des paramètres structuraux pour des protéines restent des outils de prédilection pour des études préliminaires ou postérieures aux expériences neutroniques qui ont été menées. Ces expériences complémentaires restent néanmoins, dans le cadre de ce travail, des outils de validation et de comparaison.

1.1 THEORIE DE LA DIFFUSION NEUTRONIQUE

L'intérêt de la dualité onde-corpuscule révèle toute sa puissance pour les expériences de diffusion dans le cadre d'interaction rayonnement matière pour caractériser tout type d'échantillon. Chaque type de source peut être utilisée suivant les besoins de l'étude. Les rayonnements électromagnétiques (des plus énergétiques comme les gammas jusqu'aux moins énergétiques sub-micro ondes), les particules alpha, les électrons ou les neutrons peuvent être utilisés à des fins diverses suivant la nature de l'échantillon, sa taille, ses caractéristiques externes et internes. Pour comprendre à quel champ d'investigation correspondent les neutrons nous devons considérer que le choix d'un outil d'analyse adapté dépend d'un certain nombre de paramètres dont nous faisons ici une liste non exhaustive :

- l'interaction doit être suffisamment forte entre la particule-onde et l' échantillon pour donner une information significative sur le système, d'une manière générale. Par analogie en optique par exemple, la lumière va être diffusée de façon conséquente par des objets de dimension similaire à la longueur d'onde du rayonnement incident. Ceci définira les limites spatiales de notre étude en définissant la longueur d'onde incidente.

-L'interaction doit aussi être suffisamment faible avec le système. Bien que le concept puisse paraître étrange, une particule interagissant trop fortement avec le système peut suivant les cas être diffusée un nombre multiple de fois perdant par la même occasion l'information utile que l'on recherchait dans l'expérience (la direction de diffusion), soit être absorbée ce qui rend la mesure encore plus complexe en altérant l'énergie interne du dit système. On citera comme exemple le cas des rayons-X qui ont des effets dévastateurs sur la matière organique ionisant l'ensemble des protéines étudiées après une exposition trop conséquente les détruisant par la même occasion. (Ce point particulier sera discuté ultérieurement en relation avec l'efficacité des spectromètres neutroniques.)

-La particule-onde doit être facilement détectable ce qui améliore la validation de la mesure. Dans le cadre des neutrons, les détecteurs sont des conteneurs remplis de gaz d'hélium-3 (^3He) à savoir l'isotope d'hélium (le noyau possède un neutron de moins que l'helium trouvé en majorité à l'état naturel). La section efficace (σ) correspond à une surface généralement donnée en barn ($10^{-24}cm^2$), on peut voir celle-ci comme une surface opposée au rayonnement. Ainsi la section efficace d'absorption est très importante dans le cas de l'hélium-3 lors de la réaction suivante :

$$n +^3 He \rightarrow^3 H +^1 H + 0.764MeV. \tag{1.1.1}$$

H est l'atome d'hydrogène, ^3H et ^1H sont respectivement les isotopes de celui-ci (à savoir que ^1H est l'isotope trouvé en grande majorité dans la nature), n est le neutron. Cette absorption crée un gaz chargé détectable par différence de tension mesurée dans le gaz. Ces détecteurs ont des temps morts plusieurs ordres inférieurs à l'intervalle de temps entre deux comptages successifs. Ainsi

le gaz d'helium sous pression à l'intérieur des détecteurs rend la détection très efficace.

L'ensemble de ces considérations peut créer des complications techniques et expérimentales suivant les observations recherchées. Nous présenterons plus avant des instruments qui ont été utilisés dans le cadre de ce travail. Les caractéristiques de ceux-ci vont être définies par certaines limitations physiques à la fois instrumentales et associées à l'utilisation d'un flux de neutrons. Plus concrètement une source à spallation avec un flux pulsé aura une conception instrumentale différente d'un instrument auprès d'un réacteur nucléaire. Dans le cadre de ces études il sera intéressant de pouvoir changer la longueur d'onde et l'énergie incidentes qui nous donneront accès à des échelles de temps et d'espace appropriées aux études d'échantillons biologiques. à cause de sa masse, le neutron a des caractéristiques associées à une particule non-relativiste, soit :

$$E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m}, \tag{1.1.2}$$

où E représente l'énergie, k le module du vecteur d'onde, m la masse du neutron et $\hbar$ la constante de Planck. Cette relation permettra de calculer le temps de vol pour le neutron puisque sa longueur d'onde, $\lambda = 2\pi/k$, donnera accès via son énergie, définie par l'énergie cinétique, à sa vitesse et donc à son temps de vol. Cela permettra de définir l'énergie transférée entre un état initial et un état final et permettra aussi l'analyse des intensités mesurées suivant les instruments. Ainsi la sélection des neutrons incidents et émergents révèleront des informations sur notre échantillon. Cela nous conduit au phénomène de diffusion qui nous intéresse, et qui caractérise l'état de notre échantillon.

1.1.1 PRINCIPE DE LA DIFFUSION

Pour comprendre le principe de diffusion on doit tout d'abord introduire la notion d'angle solide ($\Delta\Omega$) qui nous permet de faire l'analyse de ce que l'on va observer. Le neutron sera défini par son vecteur d'onde incident $\overrightarrow{k_i}$ et son moment transféré par l'échantillon $\vec{Q}$ tel que $\hbar\vec{Q} = \vec{k_i} - \vec{k_f}$, où $\vec{k_f}$ est le vecteur d'onde diffusé. La mesure sera en réalité un simple comptage d'intensité durant un temps défini par un flux multiplié par une surface tel que pour un flux J défini dans des coordonnées polaires (r : rayon, θ angle azimutal, φ angle planaire) et le temps t :

$$I(t) = r^2.\Delta\Omega.J(t, r, \theta, \varphi). \tag{1.1.3}$$

Il sera utile de représenter cela géométriquement pour avoir une idée de comment conceptualiser un instrument, par exemple, et quel détecteur mesure quel angle solide $\Delta\Omega$ (cf. Fig 1). La surface grise représentera $r^2\Delta\Omega$.

La façon dont une particule va interagir avec un élément de l'échantillon peut être vu comme une surface d'opposition qui va dévier et/ou changer l'énergie du diffuseur. Cette surface sera appelée section efficace et est déterminée par la nature de l'échantillon et de ses composantes. Elle définira finalement un rapport

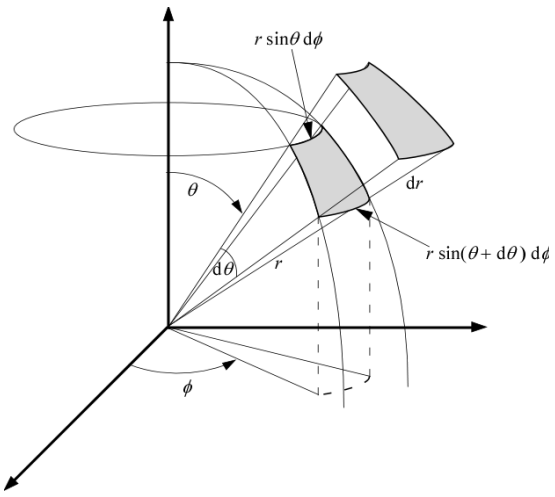


FIGURE 1.1.1 – Géométrie d'une expérience de diffusion.

de flux diffusé dans un élément d'espace $\Delta\Omega$ par rapport au flux initial. Si l'on ajoute en addition l'échange d'énergie on obtient la section efficace différentielle de diffusion, soit :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f} = \frac{flux\, diffusé\, dans\, \Delta\Omega\, avec\, une\, énergie\, [E_f; E_f + dE_f]}{flux\, initial\, d'énergie\, E_i}. \quad (1.1.4)$$

La double intégrale de cette expression par rapport à l'angle solide et par rapport à l'énergie E_f nous donnera donc la section efficace totale. Celle-ci sera intrinsèquement liée aux propriétés de notre échantillon et par conséquent aux informations que nous souhaitons étudier :

$$\sigma_{tot} = \iint\limits_{E,\Omega_{tot}} \frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f} d\Omega dE_f. \quad (1.1.5)$$

D'un point de vue quantique on peut représenter le phénomène de diffusion comme un passage d'un état initial à un état final décrit par un opérateur d'évolution $\hat{U}_I$. La diffusion donnera l'information que l'on recherche telle que la fonction d'onde ψ :

$$\psi_{\vec{k},\vec{k'}} = \left\langle \vec{k_f} \left| \hat{U}_I(t,t') \right| \vec{k_i} \right\rangle. \quad (1.1.6)$$

L'opérateur d'évolution $\hat{U}_I$ contiendra l'information sur le système intrinsèquement défini par les éléments de cette matrice. On pourra associer dans le cadre d'une représentation d'onde en mécanique quantique la probabilité de présence définie par la fonction d'onde avec la section efficace différentielle de diffusion.

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f} \propto \mid \psi \mid^2. \quad (1.1.7)$$

Deux approximations entrerons en ligne de compte pour expliquer l'origine de ce résultat qui nous intéresse, à savoir l'approximation de Born et le fait que la portée du potentiel d'interaction est faible par rapport à la distance à laquelle on l'observe. Ce résultat relie directement l'amplitude à une propriété de l'échantillon ce qui est la base des travaux que nous évoquerons ultérieurement.

L'approximation de Born correspond à l'idée d'une perturbation "minime" du flux incident par la cible ce qui se décrit par le phénomène de diffusion simple par opposition à un phénomène de diffusion multiple. C'est la raison pour laquelle nous avons évoqué précédemment que l'interaction doit être suffisamment faible entre le flux incident et la cible. C'est en effet ce que l'on observe sur un échantillon, c'est à dire que la proportion de diffusion multiple est extrêmement faible par rapport à une diffusion unique. La diffusion multiple peut être calculée mais reste souvent négligeable dans le cadre de nos études où le phénomène de diffusion est un évènement rare par rapport au flux incident. On se limitera ainsi à un seul évènement de diffusion.

La seconde considération physique faite correspond en optique à l' approximation de Fraunhofer. Dans le cadre des neutrons la portée de l'interaction est de très courte distance ($10^{-14} - 10^{-15}m$) comparée à la longueur d'onde de l'ordre de l'Angström ($10^{-10}m$) pour des neutrons qu'on définira comme *lents* dont la dénomination exacte sera : neutrons thermiques ou froids pour ces ordres de grandeur. L'évènement de diffusion de l'onde plane crée donc une onde sphérique dont la source est comme ponctuelle. On mesurera ainsi la somme de toutes les ondes sphériques créées par l'évènement de diffusion.

Les équations 1.1.8 et 1.1.9 dans l'approximation de Born nous amènerons donc à considérer la règle d'or de Fermi pour la probabilité de transition du flux incident en flux diffusé par l'opérateur matriciel de transition $\hat{T}$ tel que la section efficace de diffusion différentielle peut être décrite de la façon suivante :

$$(\frac{d\sigma}{d\Omega})_{\vec{k_i}\to\vec{k_f}} = (\frac{4\pi^2 m}{\hbar})^2 \left|\left\langle \vec{k_f} \left| \hat{T} \right| \vec{k_i} \right\rangle\right|^2. \tag{1.1.8}$$

La règle d'or de Fermi donne la probabilité de transition entre l'état initial et l'état final telle que la densité de probabilité de transition d'état "w" :

$$w_{\vec{k_i}\to\vec{k_f}} = \frac{2\pi}{\hbar} \left|\left\langle \vec{k_f} \left| \hat{T} \right| \vec{k_i} \right\rangle\right|^2 \rho(E_f). \tag{1.1.9}$$

ρ correspondra à la densité d'états égale à : $mk/\hbar^2$ [2]. Et d'une manière encore plus générale si le flux incident échange de l'énergie avec la cible nous considérerons ce qui est appelé l'équation maîtresse avec $\delta(E_f - Ei)$ la fonction de Dirac garantissant la conservation de l'énergie :

$$(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f})_{\vec{k_i}\to\vec{k_f},\lambda_i\to\lambda_f} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{\rho(E_f)}{J_{\vec{k_i}}} \left|\left\langle \vec{k_f}, \lambda_f \left| \hat{T} \right| \vec{k_i}, \lambda_i \right\rangle\right|^2 \delta(E_f - E_i). \tag{1.1.10}$$

La question pertinente à ce stade du cheminement théorique est comment relier la norme de notre fonction d'onde au carré ($|\psi|^2$), qui sera l'intensité que l'on

mesure pour une énergie finale donnée, aux propriétés intrinsèques de l'échantillon que contient l'opérateur d'évolution $\hat{T}$. Dans le cadre de l'approximation de Born nous pourrons nous limiter à un potential statique soit : $\hat{T} \rightarrow V$ et l'angle solide $\Omega \rightarrow 1$ [2]. Toute l'information sera décrite par ce potentiel V.

Ce potentiel d'interaction pour un ensemble de particules est décrit non plus d'un point de vue matriciel mais d'un point de vue de somme de potentiels discrets. La suite des explications nécessite l'introduction du paramètre de longueur de diffusion b. Pour un élément diffusif de notre échantillon, la longueur de diffusion correspond à une distance qui pourrait être associée à un rayon dans le cas de diffusion sur une sphère dure. Dans le cas d'une diffusion d'onde cette longueur est intrinsèquement liée à la portée de l'interaction entre la particule sonde et la cible (Ce nombre contient une partie complexe qui correspond à un déphasage ou à l'absorption suivant les caractéristiques du faisceau). Cela nous amène à décrire ce qui est connu comme le pseudo-potential de Fermi pour un ensemble de j particules de longueurs de diffusion b_j et de positions $\vec{R_j}$, dans une direction $\vec{r}$ du flux incident dans l'espace tel que :

$$V(\vec{r}) = \sum_{j=1} (\frac{2\pi\hbar^2}{m}) b_j \delta(\vec{r} - \vec{R_j}). \tag{1.1.11}$$

L'ensemble des modifications successives à la description du potentiel de Fermi est essentiellement de l'ordre du changement de référentiel par transformée de Fourier et de dissocier les parties radiales associées aux positions des éléments diffuseurs : $\vec{R_i}$, et de : $\vec{r_j} = \vec{r} - \vec{R_j}$. L'extensivité des calculs n'apporte rien dans la discussion présente mais il sera important pour le souci du détail d'en prendre note [2]. Aidé du pseudo potentiel de Fermi inclus dans l'équation maîtresse (cf. éq. 10) et des diverses transformations mathématiques discutées ci-dessus nous obtenons ce qui est connu comme section efficace conditionnelle [2] avec $\vec{Q}$ le moment transféré :

$$(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f})_{\vec{k_i} \rightarrow \vec{k_f}, \lambda_i \rightarrow \lambda_f} = \frac{k_f}{k_i} \left| \sum_{j=1}^{N} b_j \left\langle \lambda_f \left| e^{i\vec{Q}.\vec{R_j}} \right| \lambda_i \right\rangle \right|^2 \delta(E_f - E_i + (E_{\lambda_i} - E_{\lambda_f})). \tag{1.1.12}$$

Cette expression analytique a le grand avantage de mettre maintenant en lien les propriétés intrinsèques de l'échantillon (périodicité, constitution, dynamique etc...) directement avec une quantité diffusée en considérant les échanges énergétiques. Ceci étant dit nous ne pouvons discrétiser les neutrons diffusés et quelle est l'origine de l'évènement de diffusion considérée (les chapitres sur l'instrumentation nous aiderons à clarifier la discrétisation des éléments observés plus avant). Nous obtenons en résumé une intensité en fonction de l'énergie et du moment transféré.

La notion finale à introduire est ce qui est appelée fonction de diffusion. Celle-ci tire son origine du résultat de l'équation précédente (cf. éq. 1.1.12). L'échange énergétique contenu dans la fonction delta de Dirac sera représenté

par une transformée de Fourier en temps par une constante de probabilité d'être dans un état : $p(\lambda_i)$. Les éléments de matrice contenu dans la norme au carré de l'opérateur : $e^{i\vec{Q}.\vec{R}}$, seront assemblés en une double somme. Toutes ces transformations mathématiques sont d'importance et dépendent d'un certain nombre d'approximations dans lequel nous considérons la validité du travail que nous entreprenons. Ainsi le résultat final, la fonction de diffusion : $S(Q,\omega)$,(où $\hbar\omega = E_f - E_i$) qui est à proprement parler ce que nous allons mesurer, découle de l'ensemble de ces considérations théoriques et pratiques. ($\vec{R_0}$ est le vecteur de position au temps t = 0).

$$S(Q,\omega) = \frac{1}{2\pi\hbar}\sum_{\lambda_i} p(\lambda_i) \sum_{j,j'=1}^{N} b_j b_{j'}^* \int_{-\infty}^{+\infty} dt \left\langle \lambda_i \left| e^{-i\vec{Q}\vec{R}_{j'}^0} e^{i\vec{Q}\vec{R}_j(t)} \right| \lambda_i \right\rangle e^{-i\omega t}. \tag{1.1.13}$$

Les probabilités $p(\lambda_i)$ pourront être comprises comme les probabilités statistiques de l'échantillon d'être dans un état particulier. La somme de tous les états peut être en thermodynamique, par exemple, la fonction de partition canonique : Z. On notera cependant que l'on n'a pas accès ici aux états finaux du système et à l'implication du phénomène de diffusion comme perturbateur du système.

Cette fonction de diffusion découle de la décomposition des termes de la matrice de l'équation 1.1.13 et de l'intégration du delta de Dirac tel que :

$$(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f})_{\vec{k_i}\to\vec{k_f},\lambda_i\to\lambda_f} = \frac{k_f}{k_i} S(Q,\omega). \tag{1.1.14}$$

La fonction de diffusion (éq. 1.1.14) est utilisable pour toute expérience de diffusion. Ce point néanmoins pose problème car cela signifie que toutes les excitations et toutes les corrélations dans le système sont sources d'évènements de diffusion quel qu'en soit l'origine. Nous n'avons pas de moyen de discrétiser ici les évènements de façon explicite à partir de la théorie. (Cette question sera néanmoins évoquée dans les chapitres 1.2 et 1.5).

La théorie exposée jusqu'ici sera notre point de départ pour les études entreprises dans ce travail. La particularité des neutrons est que l'interaction est nucléaire. Par conséquent l'évènement de diffusion est dépendant de l'état de spin du noyau et de son nombre de nucléons. Ce dernier détail a une implication importante, car elle permet entre autres de faire des remplacements isotopiques pour faire des variations de contraste, par exemple. L'orientation du spin pourra donner lieu à une sélection magnétique des neutrons dans certains cas. Cette particularité inhérente est présente dans le facteur de forme sur la somme appliquée aux longueurs de diffusion (éq. 1.1.13). Nous éviterons l'étude complète des phénomènes de spin, néanmoins il est important d'expliquer comment calculer les longueurs de diffusion pour calculer les facteurs de forme. Notre point de départ sur la somme des termes $b_j b_{j'}^*$ est la dissociation de $j = j'$ et $j \neq j'$. Ainsi

la somme devient en moyennant sur l'ensemble des éléments de notre échantillon (en tenant compte qu'il n'y a pas de corrélation entre la position R_j et la longueur de diffusion b_j, ainsi qu'une distribution homogène d'états de spin)

$$\sum_{j,j'=1}^{N} \overline{b_j b_{j'}^*} = \sum_{j,j'=1}^{N} \overline{b_j}.\overline{b_j^*} + \sum_{j}^{N} (\overline{b_j^2} - (\overline{b_j})^2). \tag{1.1.15}$$

La première somme du résultat de l'équation 1.1.15 représentera ce que l'on dénommera comme les longueurs de diffusion associées à la diffusion dite : cohérente. La seconde partie sera associée à la diffusion dite : incohérente. Le terme "incohérent" correspond conceptuellement à une cohérence entre un élément de l'échantillon et lui-même, en quelque sorte une "auto-cohérence".

Le développement théorique jusqu'à ce point nous sert de point de départ pour définir les fonctions de corrélation et autres considérations physiques ou théoriques dans le reste de ce travail, notamment pour les chapitres (1.2) (1.5) et la partie expérimentale (III).

1.1.2 DIFFUSION INCOHERENTE

La diffusion incohérente trouve son origine dans la fonction de diffusion (éq. 1.1.15). L'information intéressante qui se trouve dans celle-ci peut être vue comme l'interaction entre l'onde ou le paquet d'ondes et une particule ou un ensemble de particules et leur état dynamique. Par exemple, des ensembles de vibrations collectives ou : phonons vont échanger de l'énergie avec l'onde incidente si tant est que les neutrons ont une longueur d'onde appropriée pour cela. La dynamique peut être également échangée individuellement dans le cas particulier où la particule sondée reste dans une fenêtre d'espace-temps qui peut être vue par un instrument donné. (Si la particule sondée échappe complètement de la fenêtre spatio-temporelle de l'onde incidente, l'interaction est nulle). Ces postulats de départ et leur exploitation dépendent de la question à savoir comment arriver de la fonction de diffusion à l'extraction de l'information voulue. La diffusion cohérente ou incohérente, et en pratique tous les phénomènes de diffusion peuvent être mesurés en même temps, car si l'on compte tous les neutrons diffusés on obtient tout simplement la section efficace totale de toutes les caractéristiques possibles de notre échantillon. Les premières considérations sont de type théorique (celles qui nous intéressent dans cette sous-section 1.2), les secondes sont de type instrumental (sous-sections 1.3,1.4).

La caractéristique très intéressante d'un point de vue biophysique de la diffusion incohérente est l'interaction nucléaire de type spin-spin entre le neutron et l'atome d'hydrogène ou plutôt son noyau, qui est de type singulet. Les échantillons biologiques étant composé de façon significative d'atome d'hydrogènes répartis de façon homogène dans l'échantillon, l'hydrogène devient ainsi un outil d'étude de choix dans le cadre de la biophysique. Cette interaction spin-spin se traduit par une interaction très forte en terme de section efficace. Le tableau 1 aide à mettre en perspective les proportions entre les différentes sections effi-

caces concernées (en barn : $10^{-24} cm^2$) pour un échantillon de type biologique, par exemple [5].

Element	Section efficace cohérente	Section efficace incohérente	Section efficace d'absorption
H	1,7583 b	80,27 b	0,3326 b
D	5,592 b	2,05 b	0,000519 b
N	11,03 b	0,5 b	1,91 b
O	4,232 b	0 b	0,001 b
C	5,559 b	0 b	0.00353 b

Tableau 1.1 – Sections efficaces d'éléments récurrents en biologie ainsi que du deutérium.

Nous pouvons facilement comparer un certain nombre de sections efficaces d'un point de vue quantitatif et leur donner une implication physique ainsi qu'expérimentale. La première implication est tout simplement que la section efficace de diffusion incohérente est écrasante pour l'hydrogène (de 40 à 160 fois plus que pour les autres atomes). Cela devient pourtant problématique pour les expériences de diffraction ou pour les expériences aux petits angles que nous évoquerons dans la sous-section 1.5, dédiée à la diffusion cohérente où la présence d'hydrogène crée un bruit de fond problématique. Par contre dans le cas d'études de la diffusion incohérente et de la signification pour un échantillon biologique qui est pour ainsi dire grandement constitué d'hydrogène cela reste extrêmement avantageux.

Un second point important pour l'homologue isotopique de l'hydrogène "D" ou deutérium est qu'il est un diffuseur incohérent beaucoup moins "intense". Cette particularité très importante nous permettra donc soit de travailler avec des protéines deutérées pour observer l'eau, soit inversement de travailler en solution d'eau lourde pour négliger fortement les contributions incohérentes de celle-ci. (On notera l'interaction incohérente complètement nulle pour l'oxygène et le carbone due simplement à un nombre de nucléons pair et donc une interaction spin-spin "quasiment" nulle).

Ces considérations d'un point de vue physique restent de l'orde théorique et ne correspondent pas à une expérience pratique, puisque, en pratique l'ensemble des particules diffuse dans n'importe quelle direction de l'espace avec des échanges d'énergie. Sans information préalable sur le système ou une sélection des phénomènes de diffusion observés les résultats peuvent être et sont parfois non concluants d'un point de vue expérimental. Pour cela les premiers expérimentateurs en neutronique tel que Brockhouse ou concepteurs d'instruments se sont aidés à la fois de la théorie et des fonctions dites d'auto-corrélation, mais aussi d'un design instrumental ingénieux pour accéder à des types particuliers d'information sur les systèmes. Ceci nous donnera l'occasion d'expliciter ces idées dans les sous-sous-sections 1.2.1, 1.2.2 pour la théorie et 1.3 et 1.4 pour les explications instrumentales de certains des instruments sur lesquels les expériences ont été réalisées.

L'ensemble de la discussion jusqu'ici nous permet de nous plonger dans le

coeur du problème et des équations qui nous ont permis de traiter l'essentiel des expériences pour traiter de la dynamique moléculaire des protéines que nous avons souhaité étudier. Ces deux théories sont dérivées de l'équation générale de la diffusion (éq. 1.1.14).

DIFFUSION QUASI-ELASTIQUE

La diffusion quasi-élastique découle d'une manière plus générale de la diffusion inélastique au sens large. Les échanges d'énergie seront pris en compte entre le neutron et l'échantillon. La dénomination quasi-élastique provient simplement d'un échange d'énergie limité entre le neutron et le diffuseur. Ce point particulier nous permettra d'extrapoler, via des modèles choisis avec soin suivant les échantillons étudiés, un certain nombre de paramètres sur les mouvements des diffuseurs (coefficient de diffusion, temps de résidence, ...) et par quel type de mouvement ils sont affectés. Revenons un peu en arrière à l'équation de la diffusion générale pour aborder les points intéressants pour notre discussion actuelle.

L'équation générale de la diffusion (éq. 1.1.14) peut être maintenant dissociée en parties distinctes. Ces différentes parties contiennent l'information structurale ou l'information liée aux informations incohérentes comprises dans le système (Attention l'incohérence n'est toujours pas une incohérence de faisceau neutronique mais bien une propriété intrinsèque de l'échantillon). Tous les développements théoriques sont présents dans différents ouvrages de référence [6, 7].

$$S(\vec{Q},\omega) = \frac{1}{2\pi}\iint dt.dr^3 re^{i(\vec{Q}.\vec{r}-\omega.t)}G(\vec{r},t) + \frac{1}{2\pi}\iint dt.dr^3 re^{i(\vec{Q}.\vec{r}-\omega.t)}G_s(\vec{r},t). \tag{1.1.16}$$

Il convient d'expliciter chaque terme de l'équation 1.1.16 pour prendre pleine mesure de son utilité expérimentale. La première partie concerne la diffusion cohérente où $G(\vec{r},t)$ et $G_s(\vec{r},t)$ sont la fonction de corrélation et la fonction d'auto-corrélation définies par Van Hove et Lovesey [8, 9, 10] telles que pour un nombre N de particules en dynamique classique où $\vec{r}, \vec{R}_i(t)$ sont le vecteur de position et le vecteur position de la particule i à un temps t donné :

$$G(\vec{r},t) = \frac{1}{N}\sum_{i,j}\left\langle \delta(\vec{r} - \vec{R}_i(t) + \vec{R}_j(0))\right\rangle, \tag{1.1.17}$$

$$G_s(\vec{r},t) = \frac{1}{N}\sum_{i}\left\langle \delta(\vec{r} - \vec{R}_i(t) + \vec{R}_i(0))\right\rangle. \tag{1.1.18}$$

Cette formulation permet de dissocier l'ensemble des contributions des différents types de diffusion et leur différentes origines. Le développement mathématique complet ne sera pas évoqué ici, mais nous pouvons évoquer les considérations physiques à son origine pour établir quelles formules nous utiliserons.

Il est à noter que nous ignorerons la partie cohérente dans nos expériences où les systèmes étudiés dans un cadre dynamique seront tout simplement soit en solution soit en gel amorphe. Sans organisation structurale seule une petite fraction cohérente est toujours présente, mais la corrélation sur de courtes distances est limitée et la cohérence sur de grandes distances s'observe à de très petits moments transférés ce qui ne nous concerne pas sur des instruments de spectroscopie neutronique haute résolution qui n'ont pas accès à ces gammes angulaires. Nous négligerons donc ces contributions ou nous les attribuerons à du bruit de fond. (Bien entendu si une formation crystalline de l'eau, par example, intervient même si on est en présence d'eau lourde va créer des pics de Bragg qui peuvent devenir gênant pour le traitement). Les contributions inélastiques du système seront néanmoins toujours présentes dans une certaine mesure et contribueront d'une manière générale aux grands échanges énergétiques et pourront être utilisés dans certains cadres [11]. Cela se décrit de manière théorique pour la fonction de diffusion incohérente :

$$S_{inc}(\vec{Q},\omega) = e^{-Q^2\langle u_v^2\rangle}[A_0(\vec{Q})R(\omega) + S_{inc}^{qel}(\vec{Q},\omega) \otimes R(\omega)] + B(Q). \qquad (1.1.19)$$

La fonction de résolution $R(\omega)$, a été inclue pour donner une énergie de résolution finie dans un cadre experimental. La fonction $B(Q)$ correspond à la fonction de diffusion inélastique indépendante du temps, donc au bruit de fond. La partie $A_0(\vec{Q})$ correspond au facteur de structure incohérent élastique (EISF). La partie $S_{inc}^{qel}(\vec{Q},\omega)$ multipliée par l'exponentielle correspond à la fonction de diffusion quasi-élastique. La partie exponentielle correspond au facteur de Debye-Waller.

Il s'en suivra une représentation simple pour percevoir les différentes contributions que nous avons évoquées précédemment dans la figure 1.1.2, incluant les contributions cohérentes que nous évoquerons dans la sous-section 1.5.

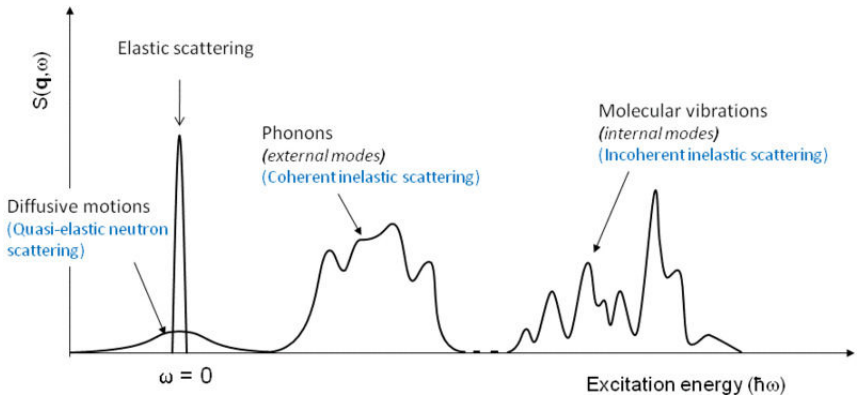


FIGURE 1.1.2 – Représentation schématique d'un spectre neutronique complet.

Nos études porteront essentiellement sur la partie élastique et quasi-élastique du spectre généralisé qui nous donne accès à des informations de type dynamique

expérimenté par notre système. Il est à noter que les vibrations moléculaires seront perçues dans le cadre de scans inélastiques mais restent dans un très grand nombre de cas inexploitables pour des systèmes amorphes en solution comme des protéines puisqu'un très grand nombre de mouvements entreront en compétition dans des domaines énergétiques similaires.

Cela nous mène à une analyse centrée sur les parties élastiques et quasi-élastiques uniquement pour les cas qui nous concerneront dans cette étude. Suivant les échantillons, les conditions du milieu ainsi que les échelles de temps et les échelles angulaires investiguées nous utiliserons des modèles adaptées aux études que nous poursuivons. Ces modèles sont développés de façon théorique pour correspondre à des réalités physiques. Le désavantage de tels modèles intervient pour le problème du choix et lesquels sont les plus adaptés. L'étendue des données quasi-élastiques permettent une analyse complète d'un grand nombre de paramètres néanmoins comme tout affinage mathématique il reste soumis aux problèmes de divergences et la surnumération du nombre de paramètres faussant les résultats. Les modèles utilisés pour ce genre d'étude seront disséqués au cas par cas.

DIFFUSION ELASTIQUE

L'étude de la diffusion incohérente élastique est l'essentiel du travail poursuivi et présenté dans cet ouvrage.

La partie théorique provient des fonctions d'auto-corrélation et de comment les adapter pour un spectromètre modifié pour une expérience de mesure en mode élastique. Les équations que nous développerons ici sont à l'origine de la plupart des traitements effectués dans ce travail.

La diffusion élastique : $S_{inc}^{el}(Q, \omega = 0)$ est un cas limite de la diffusion incohérente centrée sur un échange énergétique nul entre le neutron et sa cible. Le développement mathématique complet ne sera pas évoqué ici, néanmoins l'origine de ce développement prend sa source dans la partie incohérente (éq. 1.1.18, 1.1.20). Nous pouvons décrire la fonction de diffusion intermédiaire $I(Q,t)$ qui est la transformée de Fourier en temps de $S(Q,\omega)$ telle que :

$$I(Q,t) = \sum_{i}^{N} x_i \int d\vec{r}.e^{i\vec{Q}.\vec{R}_i(t)} e^{-i\vec{Q}.\vec{R}_i(0)} G_s(\vec{r},t).P_i^{eq}(\vec{R}_i(0)). \qquad (1.1.20)$$

Cela décrit la fonction de diffusion intermédiare pour un type de particule dans un état "i", tel que x_i représente la proportion de population dans l'état dynamiquement équivalent "i" (la somme sur i étant normalisée à 1). $P_i^{eq}(\vec{R_i}(0))$ représente la partition canonique en thermodynamique d'un ensemble de particules dans un état énergétique E_i. La limitation au domaine énergétique $\omega = 0$ permettra une simplification de cette équation d'un point de vue théorique (d'un point de vue expérimental cette limitation sera obtenue par différentes caractéristiques instrumentales qui seront développées dans la sous-section 1.4). Ceci

peut se traduire pour un ensemble dynamiquement équivalent "i" par :

$$I_i(\vec{Q},t) = \left\{ A_{0i}(\vec{Q}) + \left[1 - A_{0i}(\vec{Q})\right] C_i(\vec{Q}) \right\} .F_{DW}(\vec{Q}), \tag{1.1.21}$$

où $A_{0i}(\vec{Q})$ est l'EISF évoquée précédemment telle que :

$$A_{0i}(\vec{Q}) = \left| \left\langle e^{i\vec{Q}.\vec{R}_i} \right\rangle \right|^2, \tag{1.1.22}$$

$C_i(\vec{Q},t)$ est la fonction de corrélation incohérente telle que :

$$C_i(\vec{Q},t) = \frac{\left\langle e^{i\vec{Q}.\vec{R_i}(t)} e^{-i\vec{Q}.\vec{R_i}(0)} \right\rangle - \left| \left\langle e^{i\vec{Q}.\vec{R}_i} \right\rangle \right|^2}{1 - \left| \left\langle e^{i\vec{Q}.\vec{R}_i} \right\rangle \right|^2}, \tag{1.1.23}$$

et $F_{DW}(\vec{Q})$ représente le facteur de Debey-Waller qui décrit les vibrations thermiques.

Pour s'approprier plus facilement cette équation d'une manière théorique et expérimentale, il sera plus évident de se placer dans une limite $\vec{Q} \to 0$ ce qui correspond à de grandes échelles et $t \to \infty$ où les atomes d'hydrogène auront effectués leur relaxation. Cette limitation à de très petits moments transférés est une approximation mathématique [3] appelée approximation de diffusion gaussienne qui nous permet de traduire la fonction intermédiaire de diffusion en moyennant sur toutes les directions angulaires par :

$$I(Q,t) \cong \sum_{i=1}^{N} x_i . e^{\frac{-Q^2}{3} \left\langle u_i^2 \right\rangle [1 - C_i(t)]}. \tag{1.1.24}$$

Nous introduirons ici le paramètre $\left\langle u^2 \right\rangle$ qui correspond à un déplacement carré moyen. Il peut être assimilé à une surface effective qu'occupe notre noyau d'hydrogène dans l'espace autour d'une position centrale. Celle-ci sera perçue par le neutron dans le cadre de ces approximations uniquement si la particule est dans cette surface durant le temps de résolution de l'instrument. Tout mouvement d'un noyau d'hydrogène dans une fenêtre d'espace et de temps inférieure à celle de l'instrument est perçu et crée un phénomène de diffusion. Tout mouvement au delà de cette fenêtre échappe à la résolution accessible par l'instrument et peu diffuser mais ne sera pas perçu par l'instrument. Par conséquent tout mouvement "trop lent" diffuse, puisque perçu comme immobile. Tout mouvement confiné dans une surface "trop petite" diffuse également jusqu'à atteindre un moment transféré Q très grand ce qui correspond dans l'espace réel à de petites distances. D'une manière simplifiée un noyau d'hydrogène parfaitement immobile (ie. T = 0K) diffuse de manière complètement homogène quel que soit la direction de l'espace. En revanche dès qu'il "échappe" à la fenêtre de résolution spatio-temporelle de l'instrument il ne diffusera plus dans ces gammes. Bien entendu les deux informations seront perçues puisque complémentaires l'une de l'autre et uniquement une proportion entre 0% et 100% des noyaux d'hydrogène sont susceptibles de diffuser (i.e. si très peu de neutrons sont comptés dans une

gamme spatio-temporelle cela signifie une dynamique importante conduisant potentiellement à changer d'instrument pour vérifier cette hypothèse).

Il est à noter que cette expression n'est valide que dans le cadre des approximations que nous avons évoquées (ce qui se retranscrit par : $Q^2.\langle u^2 \rangle \lesssim 2$) qui permettent notamment de simplifier la fonction de corrélation incohérente (calcul non-évoqué ici) afin de redéfinir l'équation (éq.1.1.22). Il sera à noter que nous n'avons pas ici une gaussienne mais bien une somme de gaussiennes due notamment au fait de la multiplicité des états "i". Le résultat n'est évidement pas une gaussienne mais pourra être utilisé comme tel dans certaines limites. Ces derniers sont de type expérimentaux et permettront de redéfinir l'expression (éq. 25) dans le cadre des expériences ce qui sera évoqué ultérieurement dans les sous-sections 1.3,1.4 et la Partie III.

1.1.3 SPECTROMETRE EN TEMPS DE VOL

Les spectromètres en temps de vol se basent sur un principe simple de sélection spatio-temporelle d'un flux de neutrons. La vitesse du neutron dépend de son énergie suivant la formule 1.1.21 dérivée de la formule 1.1.2 telle que :

$$\lambda = 3.956.\frac{1}{v}, \tag{1.1.25}$$

où λ est la longueur d'onde en Angström et v la vitesse du neutron. Cette relation simple permet de faire une sélection sur les spectromètres en temps de vol via un système de "choppers" (ou sectionneurs en français). Le temps de vol d'une énergie souhaitée est calculée et correspond à une certaine vitesse. Connaissant celle-ci deux choppers consécutifs peuvent choisir la longueur d'onde souhaitée pour faire une expérience de diffusion. Il sera à noter que toutes les harmoniques d'ordre "n" supérieures en énergie seront aussi "autorisées" à passer via ce système. Il sera donc ajouté à ce système plusieurs choppers destinés à l'élimination des longueurs d'onde harmoniques pour des considérations d'ordre géométriques. L'analogie optique serait d'obtenir un faisceau quasi-monochrome. La résolution énergétique de ce genre d'instrument dépend du design de l'ensemble de l'instrument de même que de sa résolution angulaire. Le temps de vol des neutrons permettra de savoir quels échanges énergétiques ils ont subi en estimant à quel temps "$t + \Delta$t" ils arrivent sur le détecteur. Un neutron gagnant de l'énergie arrive plus vite qu'un neutron ayant diffusé élastiquement et un neutron arrivant après aura perdu de l'énergie.

IN5

Le spectromètre multi-chopper IN5 fut construit en 1973 à l'Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France) d'après le concept de R. Scherm et T. Springer [12]. Le fonctionnement suit celui des spectromètres en temps de vol décrit précédemment. L'instrument comporte un certain nombre de caractéristiques, néanmoins nous ne survolerons que celles intéressantes pour le sujet dans le tableau 2.

Longueur d'onde incidente	1,8Å-20Å
Résolution d'énergie élastique à 5Å	$\sim 100\mu eV$
Flux à 5Å	$6,83.10^5 n.cm^{-2}.s^{-1}$
Moment transféré maximum	$11{,}48/\lambda_0\ \mathring{A}^{-1}$
Moment transféré minimum	$0,2/\lambda_0 \mathring{A}^{-1}$

Tableau 1.2 – IN5 Caractéristiques techniques

Les caractéristiques les plus importantes sont l'étendu des moments transférés étudiables ainsi que la résolution en énergie ΔE qui donne accès via le principe d'incertitude d'Heisenberg à la résolution temporelle accessible de l'instrument :

$$\Delta E.\Delta t \gtrsim \frac{\hbar}{2}. \tag{1.1.26}$$

Le spectromètre possède un design commun avec les autres spectromètres du même type (cf. Fig. 3). L'instrument IN5 ne possède qu'un seul moniteur d'entrée qui sert à normaliser les comptages par unité de temps et par détecteur par rapport au flux incident du réacteur qui est fluctuant [13]. Il possède 6 choppers : 2 pour créer des pulses de neutrons polychromatiques, un pour supprimer les harmoniques, un pour supprimer les pulses diffusés par les choppers précédents et enfin 2 choppers en contre-rotation pour sélectionner une longueur d'onde monochromatique. L'ensemble du système est optimisé pour permettre une utilisation maximum du flux réacteur. Les neutrons vont ensuite traverser l'échantillon et être comptés par le banc de détecteurs. Le temps $t \pm \Delta t$ avec lequel ils vont arriver nous donnera l'échange d'énergie subi : $\hbar\omega$.

1.1.4 SPECTROMETRES A RETRODIFFUSION

Les spectromètres à rétrodiffusion reposent sur un principe différent des spectromètres en temps de vol décrits précédemment. Ces instruments permettent souvent l'accès à des énergies de résolution beaucoup plus faible (ie. des temps beaucoup plus grands). Le principe est d'utiliser un faisceau monochromatique ou quasi-monochromatique qui sera diffusé par l'échantillon, rétro-diffusé par un ensemble d'analyseurs et renvoyé sur les détecteurs en repassant par l'échantillon. Les propriétés de ces cristaux analyseurs définiront les caractéristiques de l'instrument comme sa résolution en énergie et à la fois l'étendue des moments transférés observables par l'instrument. Il est à noter que les possibilités de diffusion multiple sont augmentées dans ce genre d'instrument puisque les neutrons diffusés traversent deux fois l'échantillon au lieu d'une. Les neutrons seront comptés par un banc de détecteurs placé non pas après mais avant l'échantillon subséquent au fait que les neutrons seront rétro-diffusés.

La résolution énergétique sera donnée par la vibration de maille des réseaux des cristaux utilisés avec une réflexion de Bragg. La relation de Bragg (cf.

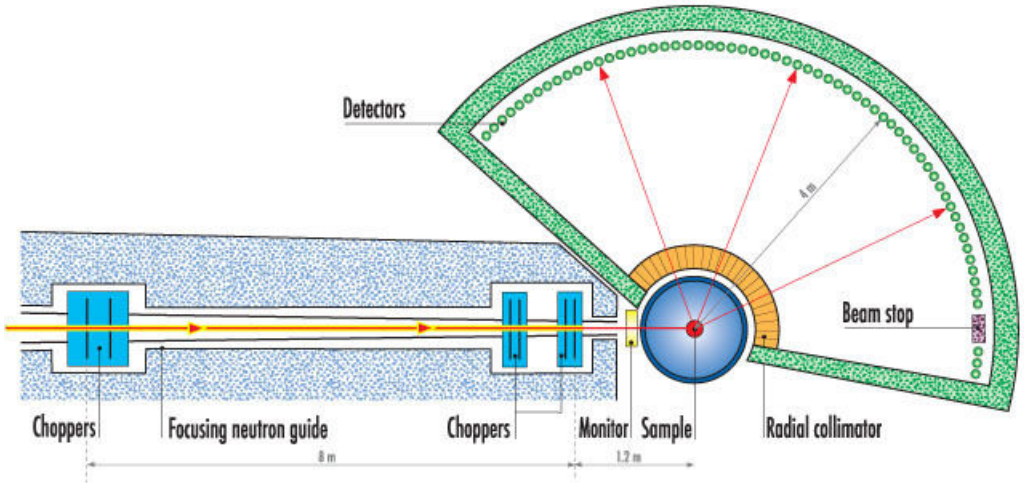


FIGURE 1.1.3 – Schématisation de l'instrument IN5

éq. 1.1.27), où d est la distance de la maille cristalline et θ l'angle de Bragg, nous permettra de définir la résolution en énergie en différenciant l'équation. Ceci nous amènera par conséquence à la résolution temporelle accessible par l'instrument.

$$\lambda = 2.d.sin(\theta), \tag{1.1.27}$$

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{2\Delta\lambda}{\lambda} = 2.cot(\theta).\Delta\theta + \frac{2\Delta d}{d}. \tag{1.1.28}$$

En se plaçant dans un cas pratiquement optimal de rétrodiffusion à 90° le paramètre cotangente à dépendance angulaire sera nul, nous laissant une énergie de résolution dépendante uniquement de l'acceptance énergétique du cristal analyseur due à son paramètre de maille.

Faire une mesure inélastique sur les spectromètres de rétrodiffusion ne se fera donc pas par le biais du temps d'arrivée du neutron puisque tout neutron diffusé sera *analysé* par les cristaux et le faisceau sera donc quasi monochrome par nature et donc aura une vitesse déterminée. Deux systèmes différents peuvent donc être mis en place pour ce genre de mesure :

Longueur d'onde incidente	2,23Å
Résolution d'énergie élastique à 2,23Å	$\sim 8\mu eV$
Flux à 2,23Å	$2.10^4 n.cm^{-2}.s^{-1}$
Moment transféré maximum	$4{,}9\mathring{A}^{-1}$
Moment transféré minimum	$0{,}2\mathring{A}^{-1}$

Tableau 1.3 – IN13 Caractéristiques techniques

- avoir un monochromateur monté sur moteur doppler, ainsi tout les neutrons envoyés ne seront pas monochromes mais d'énergie très proche. Ainsi reprenant le principe du temps de vol tout neutron analysé sera monochrome néanmoins ceux ayant changés d'énergie arriveront avant ou après ceux ayant diffusés élastiquement ;

-faire varier l'énergie incidente du flux de neutrons en faisant varier le réseau cristallin du monochromateur en le chauffant ou refroidissant. Tout neutron compté par les détecteurs reste un neutron avec la longueur d'onde voulue, mais il a néanmoins échangé de l'énergie avec la cible ayant gagné ou perdu de l'énergie suivant l'énergie sélectionnée en entrée.

Il sera à noter que ces instruments utilisent aussi des choppers qui ont pour but d'établir quand compter les neutrons qui sont diffusés par un pulse gr,ce au temps de vol de ceux-ci et éliminer tous les temps de comptage hors de ces intervalles (harmoniques supérieurs etc...).

Instrument IN13

L'instrument IN13 a été conçu en 1978 à l'Institut Laue-Langevin (Grenoble, France) [14] dans le but d'obtenir un instrument à très haute résolution énergétique avec une gamme observable de moments transférés très importante. Ce rétro-spectromètre fonctionne sur la base scientifique décrite précédemment avec un cristal monochromateur en calcium difluoride (CaF_2) utilisant le plan de symétrie (422) pour la réflexion de Bragg afin de sélectionner un faisceau monochrome. On pourra faire varier l'énergie de celui-ci en changeant la température du monochromateur qui est placé dans un cryo-four. Les cristaux analyseurs sont de la même composition que ceux du monochromateur et placés de façon sphérique pour réfléchir de façon optimale avec un angle de Bragg à 90° afin que les neutrons soient comptés par les détecteurs (cf. Fig. 1.1.4).

Nous ne présentons ici qu'une partie des caractéristiques utiles pour les travaux que nous avons entrepris.

Cet instrument est principalement dédié à l'étude de systèmes biologiques du fait de sa résolution temporelle de 100ps qui permet d'observer essentiellement des changements dynamiques vibrationelles dans les protéines, lipides, cellules entières et systèmes composites étudiés [15, 16, 17]. D'autres études plus en rapport avec la chimie moléculaire constituent l'autre part des travaux menés [18, 19, 20] .

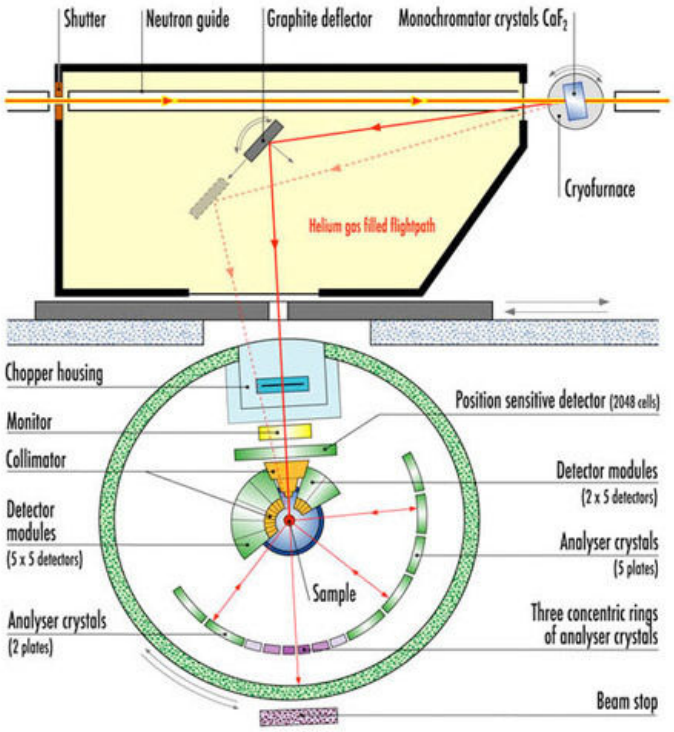


FIGURE 1.1.4 – Schématisation de l'instrument IN13

Instrument IN16

Basé sur le même principe que l'instrument IN13 décrit précédemment, l'instrument IN16 (ILL, Grenoble France) est un spectromètre à très haute résolution qui permet d'accéder à des temps d'observation de l'ordre de la nanoseconde. Cet instrument a été démantelé récemment pour laisser place à son successeur grandement optimisé en terme de flux et pour aussi changer de resolution dans le futur pour atteindre une dizaine de nanosecondes de résolution. Le système de fonctionnement de l'instrument IN16 était très similaire à celui de IN13, la différence réside dans l'utilisation d'un système doppler pour la monochromatisation du flux. Selon le déphasage doppler le flux peut être optimisé afin de déphaser les longueurs d'ondes trop longues au trop courtes. Le fonctionnement schématique est décrit dans la figure ci-dessous (cf. Fig. 1.1.4).

Nous ne présentons ici qu'une partie des caractéristiques utiles pour les travaux que nous avons entrepris (c.f. Tableau 1.1.4).

Il est à noter que le moment angulaire transféré à très petits angles est très proche du domaine d'étude angulaire à petits angles (SANS : small angle neutron scattering). Le temps d'observation de 1ns permet d'accéder à des dynamiques en biologie qui seront associées à des mouvements dits "lents" de type

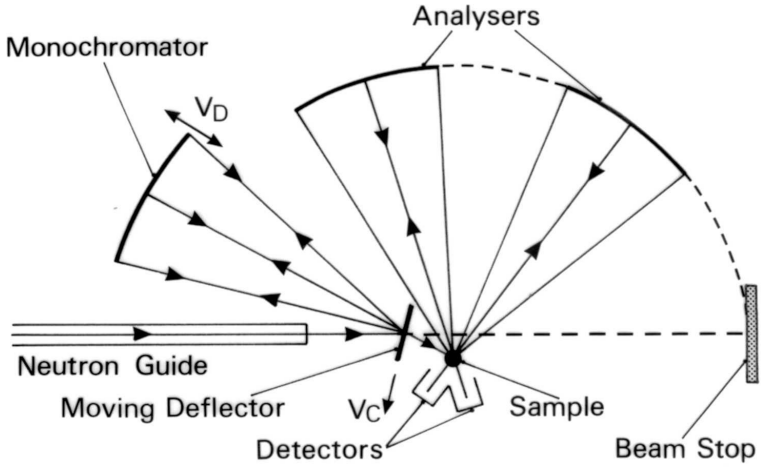


FIGURE 1.1.5 – Schématisation de l'instrument IN16

Longueur d'onde incidente	6.27Å
Résolution d'énergie élastique à 6,27Å	$\sim 0,85\mu eV$
Flux à 6,27Å	$3,8.10^4 n.cm^{-2}.s^{-1}$
Moment transféré maximum	$1,8\mathring{A}^{-1}$
Moment transféré minimum	$0,1\mathring{A}^{-1}$

Tableau 1.4 – Instrument IN16 Caractéristiques techniques

translationnel, par exemple. De nombreuses études ont été menées sur les effets d'encombrement des protéines, par exemple [21] (crowding en anglais).

1.1.5 DIFFUSION COHERENTE

La diffusion cohérente peut être utilisée pour résoudre des structures cristallines ce qui constitue une grande partie des études menées. Néanmoins les cristaux de protéines sont relativement compliqués à produire, surtout dans le cas des neutrons où les cristaux doivent être de taille millimétrique, par exemple. Une autre approche de la diffusion cohérente peut être d'obtenir des informations moyennées sur les tailles et formes des objets étudiés. Ceci représentera la diffusion aux petits angles par diffusion neutronique (SANS) et permettra d'observer des informations de type structural à l'échelle de la dizaine d'Angström (10Å-100Å).

DIFFUSION AUX PETITS ANGLES

La diffusion aux petits angles donne accès à des informations structurales sur des objets dans un milieu. Le SANS et SAXS (Small angle X-Ray scattering) se

basent sur un contraste de longueur de diffusion entre l'objet étudié et le milieu dans lequel il est. Un exemple concret dans le cas des neutrons est la deutération partielle d'une protéine pour obtenir une variation de contraste en utilisant des tampons soit hydrogénés soit deutérés. Cette technique permet de travailler avec des protéines en solution et donne donc une information structurale de la protéine dans un état "natif" (d'autres techniques telles que la résonance magnétique nucléaire, spectroscopie diéléctrique, etc... peuvent également utiliser des conditions similaires). Par contraste, la diffraction où les cristaux de protéines sont nécessaires pour obtenir des informations, créent des conditions où les protéines perçoivent les effets de crowding et les effets des températures cryogéniques qui peuvent altérer cet état natif.

Pour expliquer le fonctionnement de la diffusion aux petits angles il est important de raisonner dans l'espace réciproque, ainsi les petits moments transférés correspondent à de grandes distances. Suivant cette considération physique les distances interatomiques deviennent négligeables dans ces échelles et l'on passera à une diffusion d'un milieu continu avec une densité de longueur de diffusion ρ. Dans une considération où les échanges énergétiques sont nuls $\omega = 0$, on obtient à partir de la partie cohérente de l'équation 1.1.16 :

$$I(\vec{Q}) = V. \iiint e^{-i\vec{Q}.\vec{r}} dr. G(\vec{r}). \tag{1.1.29}$$

V représente le volume total irradié, $\vec{Q}$ le moment transféré tel que $\mid \vec{Q} \mid = 4\pi/\lambda.sin\theta$ avec 2θ l'angle de diffusion. La fonction d'autocorrélation G est définie telle que :

$$G(\vec{r}) = \frac{1}{V} \iiint \rho(\vec{r_0})\rho(\vec{r_0} + \vec{r}) d\vec{r_0}, \tag{1.1.30}$$

ce qui exprime la corrélation entre 2 densités mesurées séparées par une distance $\vec{r}$, dans un volume général V.

Suivant le système étudié (taille des objets, forme des objets, concentration, interaction entre les objets, polydispersité) un certain nombre de modèles répondent à une réalité physique que l'on souhaite étudier. Dans le cas de ces travaux, le modèle a été limité à une situation où la concentration de protéines dans le solvant est relativement faible (ce qui limite les interactions possibles) telle que I(Q)=P(Q)F(Q) ou P est le facteur de forme et F le facteur de structure des ensembles présents. Dans le cas de la non-corrélation S(Q)=1 et nous pouvons ainsi nous limiter à une étude sur des particules isolées dans la zone de Guinier nous donnant un rayon de gyration R_g de la protéine :

$$I(Q) \approx I_0 e^{-\frac{Q^2.R_g^2}{3}}. \tag{1.1.31}$$

Il convient d'être prudent, car ce modèle ne fonctionne que dans le cas où Q.R<1 [22]. Cette partie exclue ainsi un bonne partie de la mesure aux petits angles mais nous aide à connaître de manière approchée le rayon de gyration de notre protéine. Si le système subit une modification comme une agrégation, un dépliement etc... il sera néanmoins difficile d'extraire une donnée valable sauf

l'information sur le changement structural et à quelle : température, pression, pH etc... il se produit peut être observé très rapidement. La connaissance structurale de la forme de la protéine en premier lieu peut aussi donner des informations supplémentaires sur les modifications observées. Dans un cadre plus approfondi que Dimitri Svergun a développé sur l'étude de la diffusion aux petits angles on pourra, par exemple, faire correspondre un certain nombre de structures considérées comme "valides" connaissant par avance la chaîne protéique [23, 26].

1.1.6 DIFFRACTOMETRE ET DIFFUSION AUX PETITS ANGLES

Les instruments de diffusion aux petits angles et les diffractomètres peuvent être considérés comme différents néanmoins ils se basent sur le même principe de diffusion d'un faisceau quasi-monochromatique sur un objet dont on veut étudier les propriétés structurales.

Instrument D16

L'instrument D16 (ILL, Grenoble France) [24] présente la particularité intéressante de pouvoir déplacer son détecteur afin d'observer à la fois l'information aux petits angles mais également l'information structurale à plus grands angles afin d'observer des facteurs de structure tels que des pics de Bragg. On pourrait voir des structures partiellement ordonnées observant le rayon de gyration mais aussi l'espace occupé par chaque couche gr,ce aux distances de répétition dans l'espace du système. Cet instrument dispose d'un détecteur placé sur un rail circulaire (cf. Fig. 1.1.6) permettant de se placer dans l'ensemble des régions en Q accessibles que l'on souhaite explorer (cf. Tableau 1.1.6).

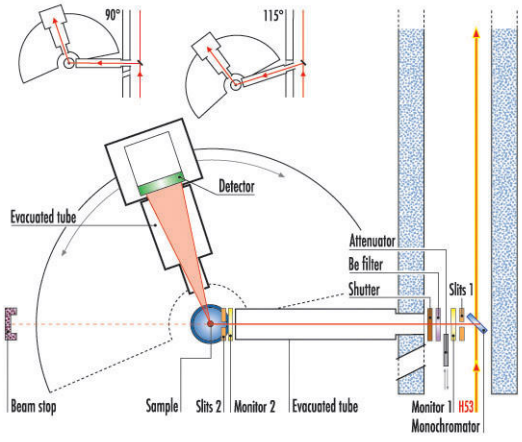


FIGURE 1.1.6 – Schématisation de l'instrument D16

Longueur d'onde incidente	3,335Å
Flux à 6,27Å	$10^7 n.cm^{-2}.s^{-1}$
Moment transféré maximum	$2{,}5\mathring{A}^{-1}$
Moment transféré minimum	$0{,}01\mathring{A}^{-1}$

Tableau 1.5 – D16 Caractéristiques techniques

Cet instrument est dédié à l'étude d'un vaste ensemble de matériaux : colloides, lipides, polymères, etc... D'une manière générale un grand nombre de domaines utilisant des matériaux composites peuvent être couverts puisque cet instrument offre à la fois la possibilité d'étudier des caractéristiques intrinsèques à très petites échelles mais aussi à plus grande échelle jusqu'à l'ordre de quelques nanomètres.

Instrument D11

L'instrument D11 (ILL, Grenoble France) [25] suit le même principe mais est uniquement dédié à l'étude du SANS avec un détecteur dont la position par rapport à l'échantillon est réglable en distance permettant ainsi de se placer dans une région angulaire dédiée à la taille de particules, distributions, interactions, dispersités etc... que l'on souhaite (cf. Fig. 1.7).

Longueur d'onde incidente	4,5Å-40Å
Flux maximum	$1,2.10^8 n.cm^{-2}.s^{-1}$
Monochromacité $\Delta\lambda/\lambda$	$\sim 10\%$
Moment transféré maximum	$1{,}00\mathring{A}^{-1}$
Moment transféré minimum	$3.10^{-4}\mathring{A}^{-1}$

Tableau 1.6 – D11 Caractéristiques techniques

La très grande précision instrumentale de cet instrument est donnée par le détecteur placé entre 1,5 et 40,5 mètres de distance de la cible permettant à la fois une grande résolution angulaire mais aussi une gamme angulaire excellente (cf. Tab. 6).

Cet instrument n'est pas particulièrement dédié à la biologie et est utilisé pour les sciences de la matière en générale, les biomolécules, le magnétisme, les interfaces et les polymères.

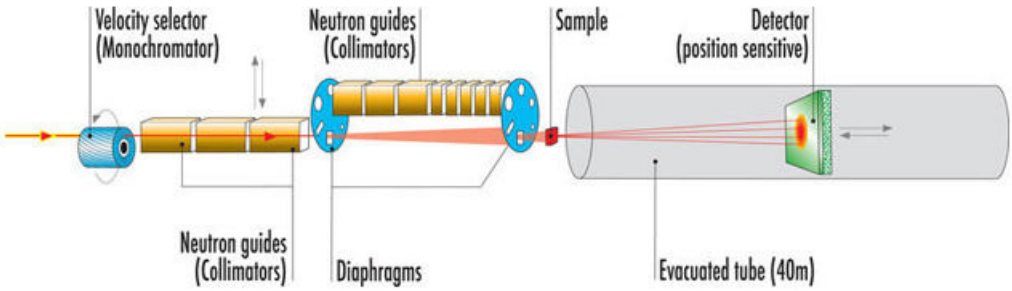


FIGURE 1.1.7 – Schématisation de l'instrument D11

Chapitre 2

ETUDES SOUS HAUTE PRESSION DE SYSTEMES BIOLOGIQUES

La haute pression reste un sujet récent mais néanmoins moins en vue en biologie [28]. L'une des raisons principales est que les systèmes biologiques étudiés dans leur état natif sont rarement amenés à subir ce genre de stress excepté pour les organismes extêmophiles (i.e. les organismes vivants dans des conditions de haute pression, haute température, basse température, haute salinité etc...). Néanmoins l'étude systématique d'un certain nombre de systèmes et de leur propriétés sous haute pression est révélateur d'un nombre d'aspects structuraux et dynamiques non négligeables. La seconde raison provient de la difficulté technique de la haute pression en soi : il faut à la fois développer et adapter un système haute pression à la diffusion neutronique.

Les organismes vivants présents sur Terre ont trouvé les moyens de s'adapter à toutes sorte d'environnements depuis l'apparition de la vie sur terre. Comment ces différents organismes se sont adaptés aux différentes conditions de vie qu'ils affrontaient est une question passionnante. L'état actuel des recherches en haute pression laisse penser qu'un certain nombre de facteurs peuvent intervenir dans cette adaptation [27]. Provient-elle de l'adaptation des membranes cellulaires ? Et si oui en quoi sont elles différentes des membranes d'organismes similaires vivant à pression ambiante ? D'autres pistes pourraient aussi indiquer que des cofacteurs protègent les biomolécules des effets de la pression pour les stabiliser [29]. L'adaptation génétique pour produire des protéines adaptées à la pression est aussi une possibilité clé. Le champ de recherche sur l'adaptation aux conditions extrêmes est particulièrement vaste et nécessite une étude au cas par cas de chaque type d'organisme, chaque type d'environnement multipliant le nombre de paramètres au fur et à mesure que le nombre de conditions à tester augmente.

Deux options s'offrent à nous dans la compréhension du phénomène de l'adaptation. Nous pouvons soit tester directement des organismes provenant

des fonds marins pour comprendre l'adaptation qu'ils subissent en apportant des caractérisations biochimiques, structurales, dynamiques etc... Soit aborder une approche qui est plus théorique et requiert de caractériser les effets de la pression sur des sytèmes modèles nous permettant de développer des modèles mathématiques et des comportements types en expérimentant de façon systématique la multiplicité des conditions pour observer d'une façon phénomènologique mais aussi quantitative et comparative les effets de la pression. Ces deux approches permettent de couvrir une partie de ce sujet extrêmement vaste tout en étant deux visions complémentaires du même sujet. Dans le cadre de ce travail nous avons choisi d'aborder la partie la plus théorique du spectre de cette étude. En démarrant avec l'étude de systèmes plus simples et déjà bien caractérisé pour les effets de la température sur ceux-ci nous pouvons nous diriger plus avant avec des systèmes et des conditions de plus en plus complexes.

Le chapitre 1.1 aborde la haute pression en diffusion neutronique pour des biosystèmes et couvre à travers d'un article accepté pour un livre sur la haute pression le cadre du travail, la technique, les corrections et quelques expériences entreprises pour développer une couverture générale sur la haute pression. La publication 2 couvre des études entreprises sur la viabilité d'un modèle thermodynamique développé en diffusion neutronique pour étudier les transitions dynamiques. Ce papier contient les études menées sur des ensembles lipidiques dans différentes conditions expérimentales. Une étude sur l'acétylcholinestérase est décrite dans le chapitre 4 et recoupe une étude dynamique et structurale sur un des états particuliers des protéines connu sous le nom de molten-globule (globule fondu).

2.1 INTRODUCTION GENERALE SUR LA HAUTE PRESSION EN DIFFUSION NEUTRONIQUE

(Article à paraitre dans un ouvrage collectif publié par le réseau Haute Pression du CNRS)

Hautes pressions et dynamique des systèmes biologiques

M. Trovaslet-Leroy[1], N. Martinez[2,3], J. Marion[2,4], J. Peters[2, 3, 4]

[1] *Institut de Recherche Biomédicale des Armées, F-38700 La Tronche, France*

[2] *Institut Laue Langevin, F-38042 Grenoble Cedex 9, France*

[3] *Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie Structurale, F-38042 Grenoble Cedex 9, France*

[4] *Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble Cedex 9, France*

1. Introduction

Pression et température standards (1bar et 298K) ne sont que des conditions particulières dans la nature qui nous entoure. En effet, des zones de pressions élevées existent tout autour de nous (fond des océans, sources hydrothermales, intérieurs planétaires,…). Au même titre que l'analyse des effets de la température, l'étude des effets de la pression, bien que peu réalisée jusqu'à présent, est donc importante et tout à fait essentielle pour une complète compréhension des molécules du vivant. Depuis quelques années, l'accélération des progrès technologiques a permis l'amélioration des techniques de mesure des propriétés des systèmes biologiques sous pression (voir, p.ex., Fourme *et al.*, 2012). Ces développements ont suscité un intérêt accru pour ce paramètre dans de nombreux domaines fondamentaux et/ou appliqués (Rivalain *et al.*, 2010).

Pour obtenir des informations sur la dynamique moléculaire des systèmes biologiques sous haute pression hydrostatique (HP), la diffusion incohérente de neutrons est une méthode de choix même si la combinaison de la diffusion neutronique et de la HP est techniquement et analytiquement difficile. Dans cet article, nous présenterons brièvement les techniques et méthodes qui ont été mises au point pour ce type d'études. Après avoir décrit la cellule HP développée pour faire des mesures de diffusion incohérente de neutrons (permettant d'atteindre des pressions de 7kbar), des exemples de son utilisation pour l'étude de la dynamique de différents systèmes biologiques seront détaillés.

2. La diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des systèmes biologiques : quelques généralités

Structure, dynamique et fonction sont trois notions intimement liées pour la plupart des macromolécules biologiques. En effet, ces systèmes sont animés par une grande variété de mouvements. Ces derniers peuvent s'étaler sur des gammes de temps allant de la femto-seconde à la seconde avec des amplitudes pouvant être comprises entre le centième et la centaine d'Ångström. Tandis que les vibrations atomiques locales ont par exemple lieu sur des échelles de la picoseconde, la plupart des réactions enzymatiques ont des temps caractéristiques de l'ordre de la milli- ou de la micro-seconde. La diffusion incohérente de neutrons nous permet de « voir » les mouvements moléculaires qui se produisent avec des amplitudes de l'ordre de l'Ångström, sur des gammes de temps allant de la pico- à la nano-seconde. Ces temps sont typiquement ceux mis en jeu pour des mouvements moléculaires locaux tels que la rupture de liaison hydrogène ; les transitions entre les excitations discrètes locales de petites sous-unités moléculaires et les processus plus lents des mouvements collectifs de parties massives de l'ensemble macromoléculaire. Enfin, il a été proposé que ces « mouvements élémentaires locaux » pourraient aussi être à l'origine de changements conformationnels de plus grande amplitude (jusqu'à une centaine d'Ångström) se produisant sur des temps plus longs (jusqu'à la seconde) (Henzler-Wildman et Kern, 2007). Ainsi, la diffusion de neutrons apparaît comme une technique de choix, non-destructive, pour étudier les dynamiques des systèmes biologiques (Zaccai, 2000).

Les neutrons thermiques ou froids possèdent une énergie (respectivement 0,025eV et comprise entre $5x10^{-5}$ et 0,025eV) et une longueur d'onde (entre 0.1 et 20Å) correspondantes aux amplitudes et énergies associées aux mouvements atomiques des macromolécules biologiques. Les neutrons ne sont pas chargés, ce qui leur permet de pénétrer profondément dans la matière et d'interagir directement avec les noyaux de celle-ci. Comme la section efficace de diffusion incohérente des noyaux d'hydrogène domine largement celle des autres atomes et isotopes, la diffusion neutronique représente essentiellement un signal dû à la dynamique moyennée des atomes d'hydrogène. Ceux-ci sont répartis uniformément au sein des structures biologiques et représentent près de la moitié des atomes présents dans les macromolécules. Les protons permettent donc de retracer les mouvements des groupements chimiques auxquels ils sont liés comme, par exemple, les mouvements des chaines latérales des acides aminés. Par ailleurs, il est possible de renforcer et/ou masquer le signal provenant d'une partie du système en ayant recours à la deutériation spécifique, car le deutérium donne un signal incohérent très faible par rapport à celui de l'hydrogène (de l'ordre de 40 fois moins important). Le remplacement des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium permet donc de

masquer le signal des parties deutérées et d'accéder à la dynamique spécifique des parties hydrogénées de systèmes complexes (Wood *et al.*, 2010).

Les interactions neutrons - atomes donnent lieu à deux types de diffusion distincts : ***La diffusion cohérente*** reflète la corrélation entre la position de l'atome i au temps 0 et celle de l'atome i' au temps t. Autrement dit, elle permet de caractériser l'interaction entre paires d'atomes différents et renseigne sur les positions des noyaux à différents temps. Elle donne donc des informations sur les effets collectifs, structuraux ou dynamiques, au sein de l'échantillon. Au contraire, ***la diffusion incohérente*** dépend de la corrélation entre la position de l'atome i au temps 0 et celle du même atome au temps t. Elle permet d'étudier les mouvements moléculaires au sein des molécules biologiques. Les interactions peuvent se faire sans ou avec transfert d'énergie, ce qui permet la distinction entre diffusion ***élastique***, ***quasi-élastique*** ou ***inélastique*** (Figure 1). Le pic élastique représente le signal des neutrons qui ont interagi avec l'échantillon sans échanger d'énergie avec les atomes. Il renseigne sur des mouvements locaux. Autour de ce pic, se trouve l'élargissement quasi-élastique qui correspond à de petites quantités d'énergie transférées entre le neutron et l'atome et des mouvements de diffusion ou de rotation. Enfin, la région inélastique est associée à des transferts d'énergie finis et donne lieu à des pics clairement séparés du pic élastique qui sont associés à des excitations collectives comme des phonons.

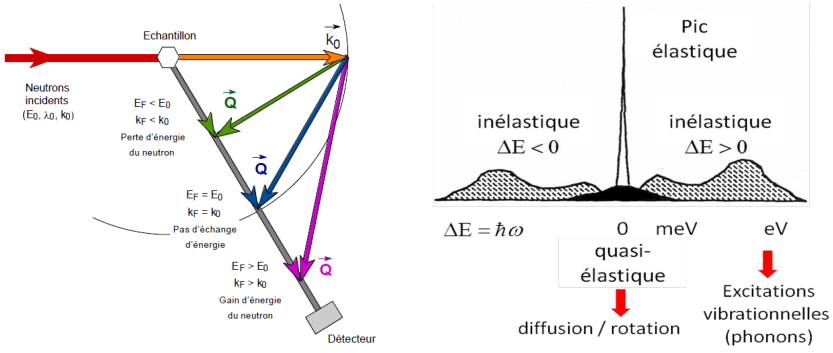


Figure 1: Diffusion de neutrons élastique, quasi-élastique ou inélastique et mouvements associés.

3. IN13 : un instrument approprié pour l'étude de la dynamique des systèmes biologiques sous hautes pressions

La diffusion de neutrons fait appel à l'utilisation de grands instruments. A Grenoble, nous disposons du réacteur à haut flux de l'Institut Laue-Langevin (ILL) (Figure 2-A). Une trentaine d'instruments (diffractomètres, spectromètres et autres) y est accessible pour des utilisateurs internes et externes (pour plus de détails concernant les instruments et leurs caractéristiques, se reporter à www.ill.eu). Le temps de faisceau y est attribué sur demande et la sélection se fait deux fois par an.

Le spectromètre à rétrodiffusion IN13 (Figure 2-B) est un instrument CRG (« Collaborative Research Group ») particulièrement dédié aux études biologiques[1]. Il est financé et géré grâce à une collaboration entre le CNR (Italie), le CEA, le CNRS et l'Université Joseph Fourier (France). Depuis 2007, de nombreux efforts ont été faits par l'équipe IN13 et les techniciens de l'ILL pour développer un équipement HP bien adapté à la diffusion neutronique. Les contraintes concernent surtout les matériaux qui peuvent être utilisés, car il faut faire un compromis entre une faible absorption de neutrons et une bonne résistance mécanique du porte-échantillon à la pression. L'équipement, décrit dans cet article et plus en détail dans (Peters *et al.*, 2012), est aussi à disposition pour des utilisations sur d'autres instruments de l'ILL.



A B

Figure 2: A - Vue de l'ILL avec son réacteur à gauche de l'image. B - Spectromètre neutronique à rétrodiffusion IN13 (températures de 5 à 550K et pressions de 1 à 7kbar).

[1] http://www.ill.eu/instruments-support/instrumentsgroups/instruments/in13/characteristics/

3.1. Le contrôleur HP

L'équipement HP est piloté par un contrôleur de pression (la Figure 3 en montre une photo et une vue schématique) dont les composantes proviennent de NovaSwiss, Zurich, Suisse. La baie consiste en un multiplicateur électrique qui génère une pression ensuite transmise de façon hydrostatique à l'échantillon grâce au Fluorinert™ (Sidorov et Sadykov, 2005). Deux vannes permettent de charger le multiplicateur avec le liquide. La précision de pression atteinte est de 30bar.

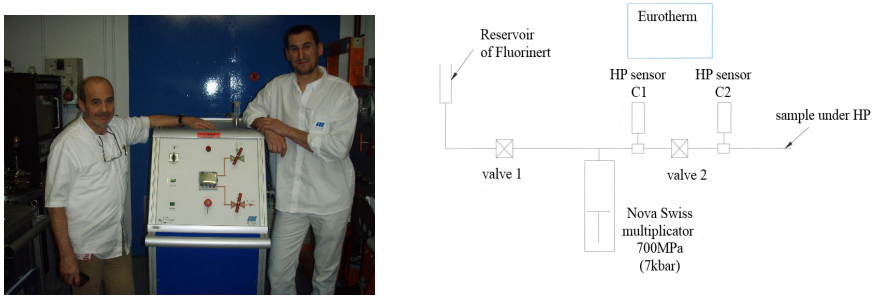


Figure 3: Photo et schéma d'un contrôleur HP.

3.2. La canne porte-échantillon et la cellule HP

La cellule cylindrique (Figure 4B et C) contenant l'échantillon en solution est montée sur la canne HP (Figure 4A). Cette dernière inclut un capillaire rempli de Fluorinert™ qui transmet la pression. Pour éviter que ce liquide ne gèle dans le cryostat, le capillaire est isolé thermiquement et chauffé.

La conception de la cellule reprend un design du groupe de M.C. Bellissent-Funel (Figure 4-B+C) du Laboratoire Léon Brillouin (LLB) à Paris (Appavou *et al.*, 2005). Nous avons cependant utilisé un alliage d'aluminium hautement résistant (7049-T6) au lieu d'un alliage en cuivre-béryllium. L'aluminium est un matériau quasi-transparent pour les neutrons et permet donc de minimiser l'absorption des neutrons. Deux cellules ont été réalisées avec le même diamètre interne de 6mm : l'une avec un diamètre externe de 15mm permettant d'atteindre une pression de 7kbar, l'autre avec un diamètre externe de 10mm pouvant aller jusqu'à 1.5kbar. Après usinage, elles ont été autofrettées, c. à d. soumises à une haute pression qui génère une déformation plastique de la paroi interne pour augmenter la tenue en fatigue, puis anodisées pour renforcer leur résistance à l'usure.

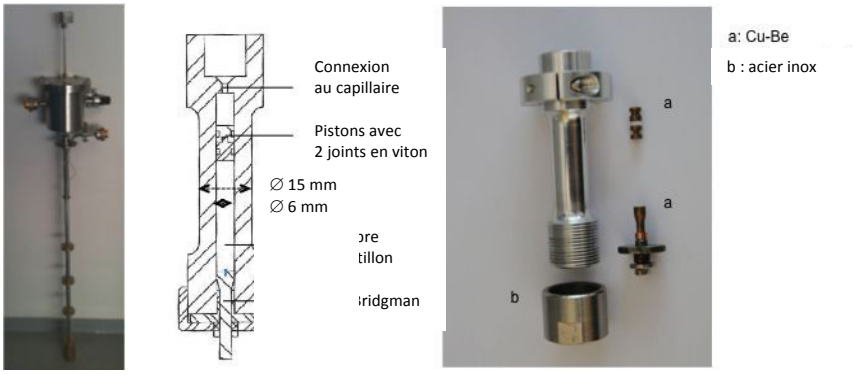


Figure 4: A – Canne porte-échantillon. B et C – Schéma et cellule cylindrique pour les mesures HP.

Pour réduire le volume d'échantillon et donc diminuer les effets d'absorption et de diffusion multiple rendant le traitement de données fastidieux, un insert cylindrique en aluminium de 4mm de diamètre et de 30mm de hauteur est introduit dans la cellule. Comme la hauteur totale de la chambre intérieure de la cellule est de 60mm, le piston qui transmet la pression ne touche et n'endommage pas l'insert. Ainsi l'épaisseur de l'échantillon ne dépasse pas 1-2mm dans toute la largeur du faisceau. La grande symétrie de la forme cylindrique simplifie le chargement de l'échantillon, le nettoyage de la cellule et le calcul des corrections dues à l'absorption et à la diffusion multiple. L'échantillon doit être en solution pour permettre une transmission homogène de la pression. Le volume nécessaire est d'environ 1ml.

3.4. Expériences et traitement des données

L'une des difficultés expérimentales de la diffusion de neutrons découle de la faiblesse de l'interaction entre le neutron et l'atome. Sur IN13, le flux de neutrons est relativement faible (environ 2.10^4 neutrons/cm^2/s) et la section du faisceau couramment utilisée (3 x 4 cm^2) doit être réduite à cause de la forme de la cellule HP. Ainsi pour avoir des statistiques de mesure correctes, plus d'une centaine de mg d'échantillon (qui ne doit pas être cristallin ou monodisperse) est utilisée et des mesures de 5 à 10 heures par point de pression sont réalisées. De plus, pour corriger et normaliser correctement les résultats, des mesures de la cellule vide, d'une barre de vanadium et du tampon doivent être faites. Enfin, pour traiter les données, nous utilisons le logiciel DAVE (Azuah *et al.*, 2009) pour

calculer les paramètres f_i correspondants à des coefficients d'absorption (Bée, 1988) et résoudre l'équation suivante :

$$I = \frac{\left(I_{mesuré}^{échantillon} - I_{tampon} \frac{f_{\mathrm{csc}}}{f_{cc}} \right) f_{ssc}}{\left(I_{vanadium} - I_{vide}^{cellule} \frac{f_{cvc}}{f_{cc}} \right) f_{vvc}} \quad . \qquad (1)$$

Ici I est l'intensité théorique de l'échantillon seul, $I_{mesuré}^{échantillon}$, I_{tampon} et $I_{vanadium}$ sont les intensités mesurées expérimentalement en présence de la cellule et $I_{vide}^{cellule}$ est l'intensité expérimentale de la cellule vide. Les paramètres f_i désignent les coefficients d'absorption qui doivent être calculés pour chaque angle de diffusion avec f_{cc} étant le coefficient correspondant à la cellule vide, f_{cvc} étant le coefficient de la cellule en présence du vanadium et f_{vvc} le coefficient du vanadium en présence de la cellule, f_{csc} étant le coefficient de la cellule en présence de l'échantillon et f_{ssc} le coefficient de l'échantillon en présence de la cellule.

Si la diffusion est uniquement élastique, ceci donne accès à une intensité de neutrons en fonction de l'angle de diffusion Θ (avec Θ/2 étant l'angle entre le vecteur d'onde incident $\vec{k}_0$ et le vecteur d'onde sortant $\vec{k}_F$), qui peut être converti en moment transféré Q entre le neutron et la cible selon la formule $Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\Theta)$, où λ est la longueur d'onde utilisée (λ = 2.3Å pour IN13). La résolution instrumentale en énergie ΔE (8μeV pour IN13) détermine la fenêtre en temps accessible Δt (environ 100ps pour IN13) et peut être calculée selon le principe d'incertitude temps-énergie de Heisenberg. L'approche la plus simple pour obtenir une information sur la dynamique moléculaire de l'échantillon consiste en l'application de l'approximation Gaussienne (Rahman *et al.*, 1962) qui suppose des mouvements Gaussiens autour de la position d'équilibre des atomes. L'intensité s'écrit alors

$$I(Q0 \pm \Delta E) \approx e^{-\frac{1}{3}\langle u^2 \rangle Q^2} , \qquad (2)$$

où $\langle u^2 \rangle$ représentent les déplacements carrés moyens atomiques. Ils peuvent être extraits en utilisant la relation

$$\left\langle u^2 \right\rangle \approx -3\frac{\partial \ln I(Q0 \pm \Delta E)}{\partial Q^2} \ . \qquad (3)$$

L'approximation Gaussienne est strictement valable pour Q→0, et elle est justifiée tant que $<u^2>Q^2 \leq 1$ (Réat *et al.*, 1997). Grâce à la section efficace incohérente dominante des atomes d'hydrogène, les $<u^2>$ représentent essentiellement les mouvements des protons ainsi que des groupements moléculaires auxquels ils sont liés. Ils peuvent alors être étudiés en fonction de paramètres externes comme la température ou la pression.

4. Quelques exemples d'applications

4.1. L'étude des lipides sous HP

Les lipides, une composante essentielle des membranes cellulaires, sont des systèmes biologiques particulièrement sensibles à la HP (Somero, 1992). Ils ont été étudiés de façon détaillée dans le passé et sont donc bien caractérisés. Ils subissent plusieurs transitions de phase en fonction de la température et de la pression qui peuvent être mesurées par différentes méthodes expérimentales : calorimétrie différentielle à balayage (Heimburg, 2007), résonance paramagnétique d'électrons (Trudell *et al.*, 1975), dilatométrie (Nagle et Wilkinson, 1978 ; Macdonald, 1978), transmittance de lumière (Ichimori *et al.*, 1998 ; Krishna Prasad *et al.*, 1987) et diffusion aux petits angles de neutrons ou rayons X SANS/SAXS (Winter et Pilgrim, 1989 ; Winter et Jeworrek, 2009). Nous avons utilisé comme système de référence le ***1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)*** pour montrer le potentiel de la diffusion neutronique dans ce domaine.

La tendance générale du diagramme (T,p) des transitions des lipides ne dépend que peu de la longueur de leurs chaînes (Winter et Dzwolak, 2005), mais les lipides avec plus de 14 atomes de carbone/chaîne peuvent former des phases hexagonales sous HP. Pour éviter la formation de pics de Bragg correspondants à cette structure, nous nous sommes donc concentrés sur le DMPC qui ne contient que 14 atomes de carbone/chaîne. Il a été préparé dans un état multilamellaire et deux expériences ont été faites sur le spectromètre à rétrodiffusion IN13 et sur le diffractomètre à petits moments transférés D16[2] (Figure 5A) (Trapp *et al.,* 2013). Ces travaux ont permis d'établir un diagramme (T,p) de la pré-transition et de la transition de phase principale du DMPC (Figure 5B). L'analyse des données montre une variation des températures de pré-transition et de transition de phase en fonction de p de (10.4 ± 1.0) K/1000 bar et de (20.0 ± 0.5) K/1000 bar, respectivement. Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs que l'on trouve dans la

[2] http://www.ill.eu/instruments-support/instrumentsgroups/instruments/d16/characteristics/

littérature (Trudell *et al.*, 1975 ; Nagle et Wilkinson, 1978; Macdonald, 1978 ; Ichimori *et al.*, 1998 ; Krishna Prasad *et al.*, 1987 ; Winter et Pilgrim, 1989) et montrent donc notre capacité à utiliser la diffusion neutronique pour ces études.

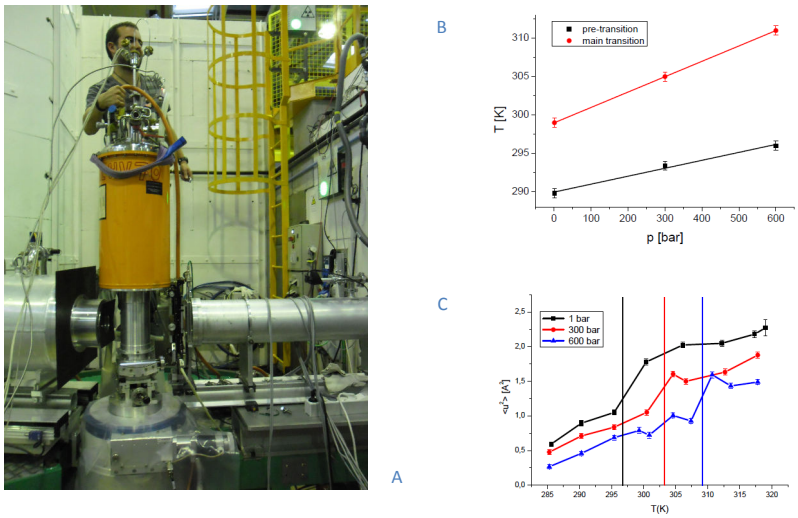


Figure 5: A – Cryostat et canne HP sur D16. B – Diagramme (T,p) de la pré-transition et de la transition de phase principale du DMPC (données D16). C – Déplacements carrés moyens du DMPC en fonction de T et p (données IN13).

La Figure 5-C montre les déplacements carrés moyens atomiques ($\langle u^2 \rangle$) du DMPC. Ils augmentent linéairement en fonction de la température, car l'énergie thermique fournie à l'échantillon permet des mouvements d'amplitudes de plus en plus grandes. Par contre, autour des températures de transition de phase principale correspondant aux trois pressions étudiées (marquées par des barres verticales de la même couleur que la courbe dans la figure), les déplacements carrés moyens font un bond. La transition entre la phase d'ondulation et la phase liquide-cristalline est alors accompagnée d'une nette augmentation de la flexibilité des lipides. Grâce à la diffusion de neutrons, nous avons donc reproduit efficacement des données de la littérature et réussi à coupler des grandeurs thermodynamiques à des informations sur la dynamique moléculaire de nos échantillons biologiques.

Les lipides présentent une phase supplémentaire qui peut seulement être atteinte par l'application de la HP (Ichimori et al., 1998). Elle correspond à un enchevêtrement des

différentes chaînes lipidiques les unes dans les autres lors de l'application de la pression. Sur D16, un instrument de diffraction nous permettant de mesurer des distances inter-atomiques, nous avons cherché à voir cette phase spécifique pour des liposomes de DMPC, à 35°C, en travaillant dans une configuration de diffusion aux petits angles (SANS) de l'instrument. Ce mode de fonctionnement nous permet de mesurer l'intensité dans un domaine de moments transférés faibles, correspondants à des distances caractéristiques dans l'échantillon de l'ordre du nm dans l'espace réel.

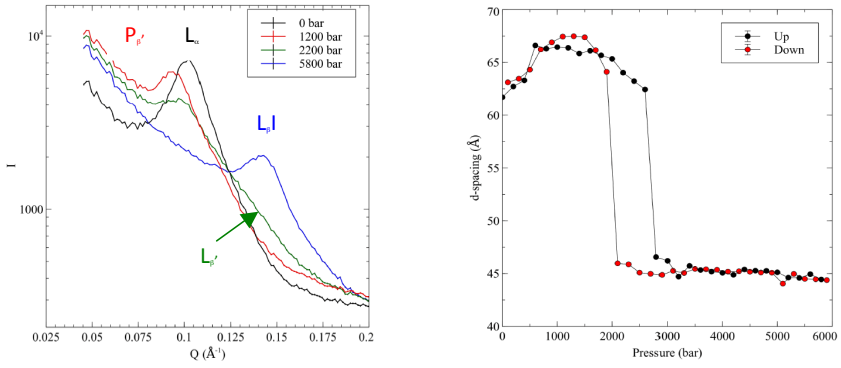


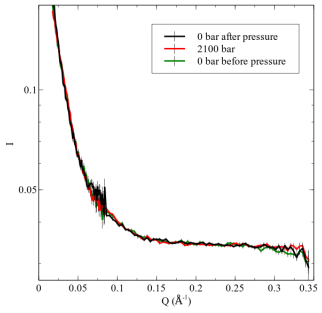
Figure 6: A - Intensité sommée radialement diffusée par le DMPC sous HP. B – Distance réticulaire extraite en fittant l'intensité pour la montée et la descente de la pression.

En sommant l'intensité diffusée radialement, on obtient alors I(Q), qui est une fonction décroissante avec des pics autour des moments transférés correspondants aux distances réticulaires entre les couches des structures multilamellaires. La Figure 6-A montre que nous pouvons en effet retrouver les 4 phases lipidiques (dans l'ordre croissant de la pression à 35°C, on a : phase liquide cristalline L_α, phase d'ondulation $P_{\beta'}$, phase gel $L_{\beta'}$ et phase d'intrication $L_\beta I$) avec des distances réticulaires entre couches lipidiques proches de celles que l'on peut trouver dans la littérature (Ichimori *et al.*, 1998). De plus, nous trouvons des différences entre les distances réticulaires « up » (montée en pression) et « down » (diminution de la pression) (Figure 6-B), ce qui reproduit un comportement d'hystérèse bien connu pour les lipides (D'Angelo *et al.*, 2008).

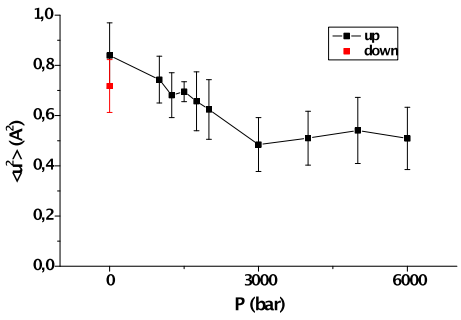
4.2. L'étude du dépliement des protéines sous HP

Les mécanismes de dépliement des protéines sous HP ne sont pas définitivement éclaircis et actuellement de nombreux travaux s'intéressent à ce point particulier. L'une de nos études les plus ambitieuses est d'analyser la dénaturation hyperbare de l'***acétylcholinestérase humaine*** (hAChE). Il s'agit d'une protéine globulaire dont chaque sous-unité a une masse molaire d'environ 64kDa. Cette enzyme hydrolyse le neurotransmetteur acétylcholine : elle joue donc un rôle essentiel dans les synapses cholinergiques, notamment dans le système nerveux et les jonctions neuromusculaires des vertébrés. Sa fonction est vitale, ce qui explique la toxicité de ses inhibiteurs (pesticides organophosphorés, armes de guerre,…) (Trapp *et al.*, 2012). Le comportement sous pression de l'hAChE a d'ores et déjà été étudié par électrophorèse et fluorescence (Cléry-Barraud *et al.*, 2002) : un état intermédiaire de type globule fondu a alors été observé vers 1500bar.

Dans le but de mieux caractériser cet intermédiaire, deux études différentes ont été réalisées. Au cours de la première expérience, jusqu'à 2100bar, sur D11, la diffusion aux petits angles en fonction de la pression est analysée dans le but de comprendre les différents changements structuraux de l'enzyme qui peuvent avoir lieu. Notre hypothèse de départ était qu'un état globule fondu devrait être détectable par SANS car si cet intermédiaire méta-stable possède la structure secondaire de l'état natif, sa structure tertiaire n'est pas conservée. Ces changements globaux auraient dû être facilement détectables, car ils modifient la structure sur des longueurs de l'ordre du nm. Au cours de notre expérience, aucune modification structurale de l'hAChE n'a pourtant été observée (Figure 7A). De plus, après retour à pression atmosphérique, nous avons montré par dichroïsme circulaire que l'enzyme avait toujours sa forme native.



A



B

Figure 7 : A - Etude SANS de hAChE réalisée sur D11 : aucune modification structurale n'est visible jusqu'à 2100bar. B - : Déplacements carrés moyens vs. pression (les mesures ont été réalisées à température ambiante sur IN13).

Pour la seconde expérience, sur IN13, des pressions plus importantes allant jusqu'à 6kbar ont été testées. Les déplacements carrés moyens atomiques ($<u^2>$) diminuent en fonction de la pression appliquée à l'échantillon (Figure 7B), ce qui traduit la réduction de la flexibilité de la protéine sous l'influence de la pression et ce qui reste cohérent avec le principe de Le Châtelier. La réduction des $<u^2>$ est considérable, puisque leurs valeurs passent de 0.85Å^2 à pression ambiante à 0.5Å^2 à partir de 3kbar, soit une diminution de 40% environ. Comme les protéines sont des structures relativement rigides et compactes, une telle diminution des vibrations des atomes d'hydrogène peut paraître surprenante. Des comparaisons avec d'autres protéines globulaires sont donc nécessaires ; malheureusement, il n'existe aujourd'hui que très peu de données sur la dynamique moléculaire des protéines sous HP.

Une petite variation des $<u^2>$ est aussi visible autour de 1.7kbar. Elle pourrait être une indication de la présence du globule fondu, pourtant elle reste inférieure à la précision de la mesure et ne permet donc aucune conclusion définitive. Après 3kbar, les $<u^2>$ tendent vers une valeur constante. Ceci pourrait être du à un équilibre entre les effets de la HP réduisant la flexibilité de la protéine et le dépliement de cette dernière qui la rendrait à nouveau plus flexible. A l'heure actuelle, nous n'avons donc apparemment pas réussi à reproduire l'état de globule fondu précédemment observé. Il est fort probable que les conditions expérimentales mises en œuvre pour la diffusion de neutrons (tampons réalisés en D_2O, concentrations de l'échantillon beaucoup plus importantes que pour les électrophorèses et/ou l'analyse de la fluorescence) ne permettent pas d'atteindre cet intermédiaire. Toutefois, des expériences et analyses complémentaires sont toujours en cours au laboratoire.

Notre seconde thématique concerne une petite protéine globulaire de 14kDa environ, dont les modifications d'activité et de structure sous HP ont largement été étudiées : le ***lysozyme*** (Groβ et Jaenicke, 1991 ; Groβ *et al.*, 1993 ; Kornblatt *et al.*, 1995). L'expérience a été réalisée à température ambiante sur le spectromètre IN16[3] de l'ILL qui dispose d'une fenêtre en temps de 1ns environ. Dans ce cas, les intensités sommées, qui sont inversement proportionnelles à la racine carrée des déplacements carrés moyens,

[3] http://www.ill.eu/instruments-support/instrumentsgroups/instruments/IN16/characteristics/

augmentent de façon différente en fonction de la gamme de pressions considérée (Figure 8). Les changements les plus importants sont alors visibles pour les plus faibles pressions. Cette transition semble comparable à la transition dynamique couramment observée en fonction de la température pour les protéines (Doster *et al.*, 1989). Les atomes passent alors de mouvements purement harmoniques à des mouvements anharmoniques aux alentours de 220K. Contrairement à l'effet de la température, la pression provoque une diminution des déplacements carrés moyens avec une transition considérable autour de 600bar. Bien qu'il existe des travaux antérieurs concernant le lysozyme sous pression (Meinhold *et al.*, 2007 ; Ortore *et al.*, 2009), une telle transition en fonction de la pression n'a encore jamais été prouvée expérimentalement. Or, les simulations par dynamique moléculaire de Meinhold *et al.* (2007) ont été réalisées sur des échelles de temps qui ne sont pas les mêmes que celles accessibles sur IN16 et, dans leurs travaux, Ortore *et al.* (2009) n'ont pas utilisé un pas en pression suffisamment fin pour être directement comparable à nos résultats. Des études complémentaires sont donc encore nécessaires pour confirmer nos premiers résultats.

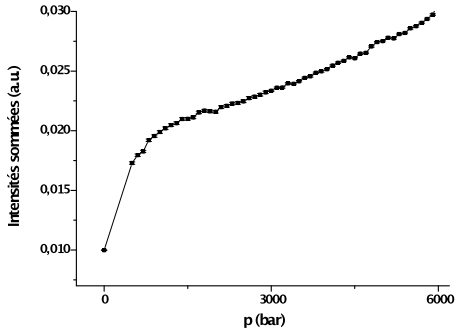


Figure 8 : Intensités sommées vs. pression mesurées sur IN16 pour le lysozyme.

La troisième macromolécule étudiée sous HP est la ***β-lactoglobuline***, pour laquelle existe déjà des études par diffusion neutronique aux petits angles (Ortore *et al.*, 2006 ; Loupiac *et al.*, 2006 ; Osaka *et al.*, 2008). La Figure 9 montre, par le biais de l'augmentation du rayon de giration (rayon moyenné par rapport au centre de masse de la protéine), le dépliement de cette dernière. En fonction de la pression, les zones hydrophobes de la β-lactoglobuline sont donc de plus en plus exposées au solvant. Le rayon de giration de la protéine augmente plus fortement aux alentours de 2800bar, indiquant une modification de la

structure tertiaire de la protéine. Cet état est irréversible, car nous n'avons pas constaté de diminution du rayon de giration lors du retour à pression ambiante (point rouge sur la Figure 9). Nous avons contrôlé les structures secondaires de l'échantillon par des expériences de dichroïsme circulaire après l'expérience neutronique : nous avons ainsi confirmé que la protéine conservait encore de la structure malgré l'exposition à la pression indiquant qu'il n'y a pas eu dénaturation structurale complète. (Résultats non montrés ici). Cet état particulier de dépliement partiel méta-stable pourrait donc correspondre à un état de globule fondu (Yang *et al.*, 2001), dont les propriétés ont montré des résultats intéressants pour la stabilité des protéines et des applications possibles pour les aliments (Lönnerdal et Lien, 2003). Il sera intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre ces modifications structurales et la dynamique sous HP à différentes échelles de temps.

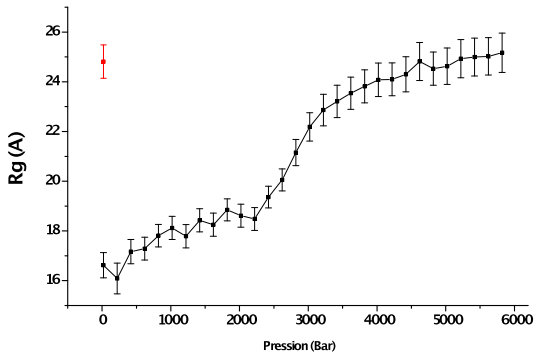


Figure 9 : Evolution, en fonction de la pression, du rayon de giration de la β-lactoglobuline (données D16). Le point rouge indique le retour à pression ambiante.

5. Conclusion

Alors que température et pression sont deux variables thermodynamiques aussi importantes l'une que l'autre, les études en fonction de la HP sont encore assez rares aujourd'hui. Ceci est essentiellement dû aux difficultés technologiques liées à la mise en œuvre de telles expériences. Récemment, nous avons développé un équipement HP pouvant être utilisé en combinaison avec la diffusion neutronique. Depuis deux ans, nous avons principalement entrepris des études structurales et de dynamique moléculaire de

lipides (DMPC) et de protéines (acétylcholinestérase, lysozyme, β-lactoglobuline). Ces travaux ont été réalisés sur différents instruments de l'ILL à Grenoble. Nos premiers résultats, présentés brièvement ici, confirment l'excellent fonctionnement et l'efficacité des cellules HP développées pour mener à bien notre approche.

Remerciements : *Nous remercions la DGA (contrats REI n° 2009340023, DGA/SSA 08co501 et BioMedef 0 PDH-2-NRBC-3-C-301) et la DTRA (contrat HDTRA1-11-C-0047) pour leurs supports financiers du projet sur l'hAChE. Pour les multiples discussions fructueuses et l'aide durant les expériences, nous remercions Marcus Trapp (HZB/Uni HD), Thomas Gutberlet (HZB), Bruno Demé (ILL), Bernhard Frick (ILL), Moeava Tehei (AINSE/Univ. de Wollongong), Patrick Masson et Florian Nachon (IRBA La Tronche) et Lars Meinhold. Finalement nous adressons tous nos remerciements à Mathieu Lemé (technicien de IN13) et au groupe de SANE de l'ILL pour toute l'aide pendant le développement de l'équipement HP : nous remercions notamment Jean-Luc Laborier, Claude Payre, Jean-Paul Gonzales, Simon Baudoin, Nadir Belkhier et Eddy Lelièvre-Berna.*

Bibliographie

Appavou M.S., Gibrat G., Bellissent-Funel M.C., Plazanet M., Pieper J., Buchsteiner A. et Annighöfer A. (2005) Journal of Physics: Condensed Matter **17**, 3093-3099.

Azuah R.T., Kneller L.R., Qiu Y., Tregenna-Piggott P.L.W., Brown C.M., Copley J.R.D. et Dimeo R.M. (2009) J. Res. Natl. Inst. Stan. Technol. **114**, 341.

Bée M (1988) Quasielastic Neutron Scattering:Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science. Adam Hilger, Philadelphia.

Cléry-Barraud C., Ordentlich A., Grosfeld H., Shafferman A. et Masson P. (2002) Eur. J. Biochem. **269**, 4297-4307.

D'Angelo G., Wanderlingh U., Nibali V.C., Crupi C., Corsaro C. and Di Marco G. (2008) Phil. Mag. **88**, 4033 – 4046.

Doster W., Cusack S. et Petry W. (1989) Nature **337**, 754-755.

Fourme R., Hamel G., Loupiac C., Perrier-Cornet J.M., Pin S., Roche J., dans "Hautes pressions: les nouveaux enjeux", publications MRCT, CNRS, 2012, 30 – 56.

Groβ M. et Jaenicke R. (1991) FEBS **284** (1), 87-90.

Groβ M., Auerbach G. et Jaenicke R. (1993) FEBS **321** (2, 3), 256-260.

Heimburg T. (2007) Thermal Biophysics of Membranes*,* Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Henzler-Wildman K. et Kern D. (2007) Nature **450**, 964-972.

Ichimori H., Hata T., Matsuki H. et Kaneshina S. (1998) Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1414**, 165–174.

Kornblatt J.A., Kornblatt M.J. et Hoa G.H.B. (1995) Biochemistry **34**, 1218-1223.

Krishna Prasad S., Shashidhar R., Gaber B. et Chandrasekhar S. (1987) Chemistry and Physics of Lipids **43**, 227–235.

Lönnerdal B. et Lien E.L. (2003) Nutrition Reviews **61**, 295 – 305.

Loupiac C., Bonetti M., Pin S. et Calmettes P. (2006) Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics **1764**, 211 – 216.

Macdonald A. (1978) Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **507**, 26–37.

Meinhold L., Smith J.C., Kitao A. et Zewail A.H. (2007) Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 17261-17265.

Nagle J. et Wilkinson D. (1978) Biophysical Journal **23**, 159–175.

Ortore M.G., Spinozzi F., Carsughi F., Mariani P., Bonetti M. et Onori G. (2006) Chemical Physics Letters **418**, 342 – 346.

Ortore M.G., Spinozzi F., Mariani P., Paciaroni A., Barbosa L.R.S., Amenitsch H., Steinhart M., Ollivier J. et Russo D. (2009) Journal of the Royal Society Interface **6**, 619-634.

Osaka N., Takata S., Suzuki T., Endo H. et Shibayama M. (2008) Polymer **49**, 2957 – 2963.

Peters J., Trapp M., Hughes D., Rowe S., Demé B., Laborier J-L., Payre C., Gonzales J-P., Baudoin S., Belkhier N. et Lelièvre-Berna E. (2012) High Pressure Research **32**, 97-102.

Rahman A., Singwi K.S. et Sjölander A. (1962) Physical Reveiw **126**, 986-996.

Réat V., Zaccai G., Ferrand C. et Pfister C. (1997) Proceedings of a Workshop on Inelastic and Quasielastic Neutron Scattering in Biology, 117–122.

Rivalain N., Roquain J. et Demazeau G. (2010) Biotechnology Advances **28**, 659-672.

Sidorov V.A. et Sadykov R.A. (2005) Journal of Physics: Condensed Matter **17**, 3005-3008.

Somero G.N. (1992) Annual Review of Physiology **54**, 557-577.

Trapp M., Trovaslet M., Nachon F., Koza M.M., van Eijck L., Hill F., Weik M., Masson P., Tehei M. et Peters J. (2012) The Journal of Physical Chemistry B **116**, 14744-14753.

Trapp M., Marion J., Tehei M., Demé B., Gutberlet T. et Peters J. (2013) Physical Chemistry Chemical Physics, soumis à la publication.

Trudell J.R., Payan D.G., Chin J.H. et Cohen E.N. (1975) Proceedings of the National Academy of Sciences **72**, 210–213.

Winter R. et Pilgrim W.-C. (1989) Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie **93**, 708–717.

Winter R. et Dzwolak W. (2005) Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **363**, 537-563.

Winter R. et Jeworrek C. (2009) Soft Matter **5**, 3157–3173.

Wood K., Tobias D.J., Kessler B., Gabel F., Oesterhelt D., Mulder F.A.A., Zaccai G. et Weik M. (2010) Journal of the American Chemical Society **132**, 4990-4991.

Yang J., Dunker A.K., Powers J.R., Clark S. et Swanson B.G. (2001) Journal of Agric. Food Chem. **49**, 3236-3243.

Zaccai G. (2000) Science **288**, 1604-1607.

2.2 ETUDE THERMODYNAMIQUE DU MODELE BICOUT-ZACCAI SUR UN SYSTEME MODELE

L'un des intérêts de la haute pression est de pouvoir fournir des modèles thermodynamiques complets des systèmes étudiés. D'un point de vue théorique un modèle a été proposé pour étudier les effets de la température sur la dynamique étudiée par diffusion neutronique afin de lier celle-ci à des paramètres de thermodynamiques. Néanmoins de tels modèles soulèvent d'importantes questions et méritent d'être testés sur des systèmes modèles pour vérifier leur compatibilité avec une réalité expérimentale.

Le modèle Bicout-Zaccai à été proposé [32] afin de répondre à la problématique des transitions thermodynamiques à basse température de systèmes de polymères. Le modèle est basé sur la transition entre deux états thermodynamiques non équivalents avec une transition d'ordre supérieur à un. La transition dynamique est un phénomène à l'échelle atomique où la température aux alentours de 200K permet un passage de mouvements très localisés et faibles à une bien plus grande liberté de mouvement passé ces températures. Le sujet de la transition dynamique a été au fil des années grandement discuté et digressé et il reste encore à ce jour au même titre que les transitions vitreuses un domaine d'intérêt. Le modèle en lui même mets en lien la différence en énergie libre de Gibbs pour passer la barrière entre deux potentiels différents pour deux populations dynamiques non-équivalentes. Le modèle assume une transition entre des états purement vibratoires à des états dynamiques non-harmoniques. Ces états anharmoniques soulèvent plusieurs questions : quelle est l'énergie requise pour effectuer la transition, quelle est la vitesse à laquelle celles-ci interviennent. Ces points restent néanmoins à clarifier.

En vue de tester le modèle nous avons utilisé un lipide de référence qui a été étudié de façon exhaustive : le DMPC 14 :0 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Ceci nous permettant d'adresser ces points en partie. L'étude est la suite d'expériences entreprises peu avant dans le groupe de recherche [31].

2.2.1 INTRODUCTION

L'étude thermodynamique des systèmes fournit un grand nombre d'informations sur ses caractéristiques intrinsèques et permet de comparer quantitativement celui-ci à des systèmes similaires. Poursuivant cet objectif il est important de tester les modèles sur certains phénomènes et comparer à des informations déjà connues sur ce-dit système. Dans le cas présent l'article présenté adresse des réponses sur le phénomène de la transition dynamique dans les systèmes lipidiques par rapport à la température pour pouvoir plus tard adapter ces modèles en haute pression et vérifier leur viabilité de façon subséquente.

Pour tester le modèle, le lipide DMPC 14 :0 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) a été utilisé à différentes hydratations. Il a également été utilisé du DMPC-d54 contenant 54 deutériums sur les chaînes remplaçant les protons pour comparer les différentes dynamiques moléculaires entre les chaînes lipidiques et les têtes. L'ensemble des 4 expériences ont été faites sur le spectromètre à rétrodiffusion IN13 par diffusion élastique. Ces expériences ont été réalisées de 4 à 300K pour observer le phénomène de transition dynamique et comparer quantitativement les différents résultats et leurs implications. Les quatre échantillons sont sous forme de poudre hydratée,et de bicouche multilamellaire pou le DMPC-d54, et les trois autres de DMPC à différentes hydratations. Les différents échantillons permettent de tester la validité thermodynamique des mêmes échantillons à différentes hydratations mais aussi pour différentes populations de protons observées à travers l'échantillon deutéré. Ainsi la comparaison des valeurs thermodynamique sur les systèmes lipidiques, leur variation d'enthalpie et d'entropie permet d'éprouver le modèle et de le mettre en relation avec des comparaisons d'ordre pratique.

2.2.2 ETUDE LA TRANSITION DYNAMIQUE DE VESICULES LIPIDIQUES MULTI-LAMELLAIRES ET BICOUCHES PAR DIFFUSION NEUTRONIQUE

(Article à soumettre)

The dynamical transition of lipid multi-lamellar bilayers studied by incoherent neutron scattering

J. Marion[1,2] , F. Natali[3], Y. Gerelli[2], E. Kats[2], D. J. Bicout[2,4], and J. Peters[1,2*]

[1]Univ. Grenoble Alpes, IBS, 71 avenue des Martyrs, CS 10090, 38044 Grenoble, France

[2]Institut Laue-Langevin, 71 avenue des Martyrs, CS 20156, 38042 Grenoble cedex 9, France

[3]CNR-IOM, OGG, 71 avenue des Martyrs, CS 20156, 38042 Grenoble cedex 9, France

[4] Biomathématiques et épidémiologie, EPSP – TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525 Université Joseph Fourier, Grenoble, VetAgro Sup Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

* corresponding author: peters@ill.fr

Abstract

The present study is the application of a two-state model formerly developed by Bicout and Zaccai [32] to describe the dynamical transition visible in the atomic mean square displacements in terms of thermodynamic parameters. The data were extracted from elastic incoherent neutron scattering measurements on three lipid membranes in various hydration states and one partially per-deuterated lipid membrane, and fitted by the model. The dynamical transition appears to occur before the phase transitions for all lipid samples. Therefore, one may question which parts of lipid molecules are mainly involve in the dynamical transition, heads or tails or both? We found clear differences between the samples which were hydrated to various levels and between fully protonated membranes and partially deuterated membranes, whose investigation permits to highlight the motions of the headgroups rather than the tails

Abbreviations:

T_d: dynamical transition temperature

DMPC: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

MSD: mean square displacement

MLB: multi-lamellar bilayer

EINS: elastic incoherent neutron scattering

Introduction

Biomolecules are composed of thousands of atoms which are arranged in a non-ordered way. The secondary structures are mostly bound by covalent interactions, thus rather strong bonds, but the tertiary structures are dominated by weak interactions as hydrogen bonds or van der Waals interactions. It is therefore impossible to predict the dynamics of such complex systems, at best averaged values of the motional amplitudes can be evaluated. Moreover the atoms are not arranged periodically as in a crystal, thus amplitudes in a given direction cannot be easily calculated. In contrary, each atom is bound to at least one neighbour, sometimes to more, by interactions which make the connections more or less flexible. Using the very useful harmonic oscillator model in a first approximation, these bindings can be represented as springs which maintain the atoms together and allow limited vibrations or rotations, whereas others are forbidden as for instance certain rotations around the main chain axis in the amino acids. It is a huge task to investigate or predict all possible motions in such systems, but promising attempts were done through incoherent neutron scattering and molecular dynamics simulations [33].

Incoherent neutron scattering consists in measuring interferences between neutrons scattered by one and the same nucleus at different times, thus it reflects averaged single particles motions in time and space [3]. In contrary, coherent scattering requires an order in space and time so that many particles participate due to constructive interference. However, as the single particles are interconnected, the motion of one of them will influence the state of the neighbouring particles. There exist examples of successful normal mode calculations to account for such effects [34], nevertheless it remains difficult to conclude about how cooperative the processes are, e.g. how many particles experience the same dynamics in the potential $V(\vec{r})$.

M. Bée has shown by molecular dynamics simulations on hexamethylethane [35] that different kind of motions can be separated, as they occur typically on clearly separated time scales and corresponding amplitudes are of different sizes. Indeed internal molecular vibrations, reorientations and translational diffusion happen on time scales observable by incoherent neutron scattering, namely in the range between 1 ps and 1 ns. Combining several neutron spectrometers with different energy-time resolutions permits therefore to get access to such classes of motions, when they exist in a given sample. For instance, long-range displacements can only be observed in samples in solution.

The nature of movements depends also on external conditions as temperature or pressure [36, 31]. It was established in the late eighties that the very reduced molecular motions at low, cryogenic temperature (< 150 K) can be interpreted as local harmonic motions and described by one harmonic potential. Around 200 K one observes an onset of much larger motions which was analyzed by Doster et al. [11] in terms of a double-well potential model. Based on that picture, Frauenfelder et al. [37] developed the conformational substate model in which the proteins are moving in a single harmonic oscillator potential at low temperature, but can cross the potential barrier at higher temperature when their energy exceeds the activation energy. Their motions become therefore non-harmonic and the particles acquire a higher flexibility. However, not all particles cross the barrier exactly at the same temperature, there is a distribution whose *a priori* unknown width can be inferred from the data.

In the present study we focus on multi-lamellar bilayers (MLB) formed by pure DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) lipids at very different hydration states. They are known to undergo consecutive phase transitions from the most ordered lamellar crystalline phase, passing first from the gel to the ripple phase (around 287 K for DMPC) to reach finally the fluid phase at highest temperature (around 297 K) corresponding to the physiological state in cells. However, when raising the cryogenic temperature from low values we observed that hydrated MLB exhibit a dynamical transition, too, where molecular dynamics start to increase sharply. Such dynamical transition was investigated with a model developed by Bicout & Zaccai [32] to probe the effect of cooperativity between the particles undergoing non-harmonic motions and how long it takes for the populations to follow the transition. How this dynamical cooperativity is distributed over the biomolecule is still a matter of investigation. In the context of MLB samples, we are further investigating whether the dynamical transition mainly involves either heads or tails or the whole lipid molecule.

Materials and Methods

Sample preparation

DMPC powder was purchased either from Lipoid (Ludwigshafen, Germany) or from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) and used as received. DMPC highly-oriented MLB were prepared on Si wafers and hydrated with heavy water. We used the “rock and roll” method following a protocol described by Tristram-Nagle et al. [38] in which DMPC powder was

deposited on a Si(111) wafer of dimensions 30x40x0.38 mm^3 by evaporating from a trifluoroethanol:chloroform mixture (2:1, v/v). After deposition, the wafer was dried over silica gel for 2 days in a desiccator. One sample was let dry as it, another one was only slightly rehydrated (around 2- 3 water molecules per lipid) and the third sample was rehydrated from pure D_2O at 40 °C to achieve a high hydration level (more than 12 water molecules per lipid). In addition we also fully hydrated an MLB sample from partially deuterated lipids, e.g. the hydrogen atoms in the alkyl chains were exchanged against deuterium to highlight the head groups, only. The sample characteristics are summarized in Table 1. One wafer contained a total amount of about ≈ 35 mg of lipids. The MLB samples were then placed in slab-shaped aluminum sample holders. Sample cells were sealed using indium wire and the weight of the sample was monitored before and after the experiment, with no change observed indicating a stable level of hydration.

	Dry MLB	Dry intermediate MLB	MLB	DMPC-d54 MLB, deuterated chains
Main phase transition temperature T_m	> 340 K	340 K	297 K	297 K
Hydration level (water molecules per lipid)	≈ 0	2 – 3	> 12	> 12

Table 1: Some characteristics of DMPC MLB.

Elastic Incoherent Neutron Scattering

Elastic incoherent neutron scattering (EINS) measurements as a function of temperature were performed on the thermal (λ = 2.23 Å) high-energy resolution backscattering spectrometer IN13 [39] (ILL, Grenoble, France), characterized by a very large momentum transfer range ($0.2 < Q < 4.9$ $Å^{-1}$) with a good and nearly Q-independent energy resolution (8 μeV FWHM). IN13, therefore, allows accessing the space and time windows of 1-6 Å and 0.1 ns respectively. Fixed energy window (FEW) scans were recorded from 20 to 340 K with a continuous temperature ramp of 0.6 K/min between 20 and 100 K, 0.45 K/min between 100 and 280 K and 0.15 K/min between 280 and 340 K. Data reduction was performed using the Large Array Manipulation Program (LAMP) available at the ILL [40]. They were corrected

by normalizing the raw data to the neutron flux, subtracting the background given by the spectrum of the empty cell, and finally normalizing to a vanadium spectrum.

Incoherent neutron scattering is largely dominated by hydrogen atoms, because their incoherent scattering cross section is at least 40 times higher than for any other type of atom present in biological samples [5]. Moreover, about 50 % of the atoms in biological systems are hydrogen atoms. The MSD thus reflect the averaged atomic motion of hydrogen atoms, which are mostly homogeneously distributed in biological macromolecules and inform over local atomic vibrations and translations of static positions.

EINS data is related to the normalized elastic intensity I within the instrumental time window τ through

$$S_{inc}^{el}(Q) \approx I(Q,\tau) = \sum_{\alpha=1}^{N} x_\alpha \exp\left\{-\frac{1}{3}Q^2 < r_\alpha^{\,2} > \left[1 - C_\alpha(\tau)\right]\right\}, \qquad (1)$$

where x_α is the fraction of particles experiencing the same dynamics and therefore takes into account dynamical polydispersity, Q is the module of the momentum transferred between the incident and scattered neutron, $< r_\alpha^{\,2} >$ the equilibrium mean square displacement and $C_\alpha(\tau)$ accounts for the stationary position relaxation function (for more details see [32]). In the absence of dynamical polydispersity, $x_\alpha = 1$, all atoms are dynamically equivalent and undergo the same transition. As it was shown in the same reference, the MSD $<R^2(T)>$, which takes into account fluctuations of all particles in the system within τ, is given by

$$< R^2(T) > = -3 \left.\frac{d \ln S_{inc}^{el}(Q)}{dQ^2}\right|_{Q=0} = \sum_{\alpha=1}^{N} x_\alpha < r_\alpha^{\,2} > \left[1 - C_\alpha(\tau)\right]. \qquad (2)$$

It signifies that $C_\alpha(\tau)$ is a constant for a given instrument and rescales the observed MSD, so that one can assume without loss of generality that $C_\alpha(\tau) = 0$.

To simplify the approach and following the ideas exposed in the introduction, only two types of conformational fluctuations will be considered here: small local motions around equilibrium positions of the atoms (rotations are ignored) and movements on a larger scale accounting, for instance, for motions induced by interactions allowing the particle to agitate inside a cage defined by neighbours or produced by fluctuations of the centre-of-mass of the whole protein. We consider thus vibrational and translational motions of the atoms in each conformational sub-state so that the particle's trajectory can be split into two contributions, $\vec{r}(t) = \vec{r}_v(t) + \vec{r}_t(t)$. Whereas the vibrational motions are harmonic in both small and large conformational cages, but with different frequencies accounting for their respective sizes, the

translational motions are situated in a double-well structure and non-harmonic. Accordingly, the elastic incoherent structure factor contains the two motional contributions, too.

One shows further that within the Gaussian approximation [41, 42] and neglecting quantum effects due to zero-point fluctuations eq. (2) can be transformed into [1]

$$< R^2(T) > = \sum_{\alpha=1}^{N} x_\alpha \left\{ \phi_\alpha(T) \frac{k_B T}{k_{1\alpha}} + \left[1 - \phi_\alpha(T)\right] \frac{k_B T}{k_{2\alpha}} \right\}, \qquad (3)$$

where k_B is the Boltzmann constant and $k_{1\alpha}$ and $k_{2\alpha}$ are force constants according to [16]. The probability to find a class α of atoms in a given conformational cage at lower temperature corresponding to the smaller vibrational motion is given by ϕ_α, and $(1 - \phi_\alpha)$ is the complementary probability to find it in the higher temperature state corresponding to the larger fluctuation type of motion. ϕ_α is defined by:

$$\varphi_\alpha = \frac{1}{1 + e^{-\beta \Delta G_\alpha}} \qquad \text{with } \Delta G_\alpha = \Delta H_\alpha - T\Delta S_\alpha . \qquad (4)$$

$\beta^{-1} = k_B T$ is the thermal energy, and ΔG_α, ΔH_α and ΔS_α are the differences between the free energy, enthalpy and entropy for the system in the large and small cages. Neglecting explicitly the polydispersity of the sample, Bicout et Zaccai [32] suggested a simplified model

$$\left\langle R^2(T) \right\rangle = \phi(T) \frac{k_B T}{k_1} + (1 - \phi(T)) \frac{k_B T}{k_2}, \qquad (5)$$

where $\phi = \sum_{\alpha=1}^{N} x_\alpha \phi_\alpha$ and k_1 and k_2 are effective force constants which are functions of x_α, ϕ_α, $k_{1\alpha}$ and $k_{2\alpha}$ and thus functions of temperature. They are defined as

$$\begin{cases} k_1^{-1} = k_{vs}^{-1} + k_{ts}^{-1} \\ k_2^{-1} = k_{vl}^{-1} + k_{tl}^{-1} \end{cases}, \qquad (6)$$

where the indices stand for v as vibrational motions, t as translational motions, s as small and l as large. They are the resulting force constants (from both the vibration and translation) to particle motions in small and large conformational cages.

According to eq. (5) $\phi(T)$ represents the population at low temperature corresponding to the force constant k_1 and $(1 - \phi(T))$ the population at high temperature corresponding to the force constant k_2. One commonly defines the transition temperature T_d where the free energy difference ΔG is zero, i.e., a compensation between enthalpy and entropy occurs, so that $\phi(T_d) = 0.5$. However, to follow the evolution from one state to the other, it was empirically introduced a temperature T_0 at which a fraction of 10% of large fluctuations is reached corresponding to the onset of the free energy barrier crossover and thus the dynamical

transition [32]. Then $(1 - \phi(T_0)) = 0.1$, what permits to calculate the associated temperature. The ratio $(1 - \phi(T))/\phi(T)$ is a measure for the proportion of large-to-small amplitude fluctuations of the protein molecule.

Results

Mean square displacements

Four different DMPC samples were measured on IN13: fully hydrated MLB, dry MLB, MLB in an intermediate hydration state and partially deuterated MLB (DMPC-d54) where the Hydrogen atoms of the alkyl chains were exchanged against Deuterium so that the head groups only were visible. All samples were measured over the temperature range 20 – 340 K. Figure 1 shows the MSD extracted according to eq. (2) but neglecting polydispersity and setting $C_\alpha(\tau) = 0$, otherwise the data would be overfitted. The Q-range corresponding to the Gaussian approximation was identified to be 0.29 – 2.2 $Å^{-1}$.

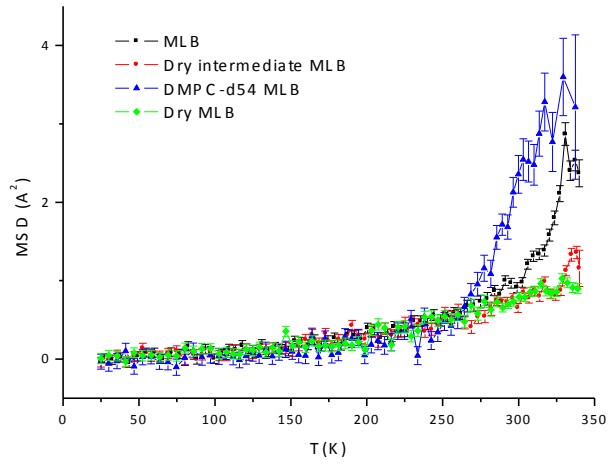
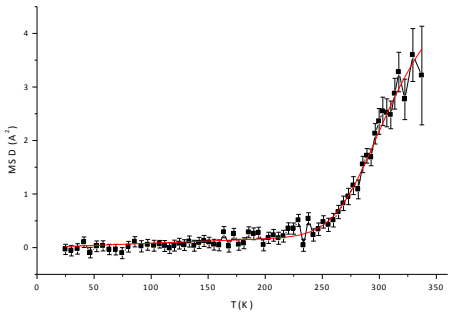


Figure 1: *MSD of fully hydrated MLB, dry MLB, MLB in an intermediate hydration state and partially deuterated MLB (DMPC-d54). Data were extracted from the Q-range (0.29 $Å^{-1}$ < Q < 2.2 $Å^{-1}$). Lines connecting the data points are guide to the eyes.*

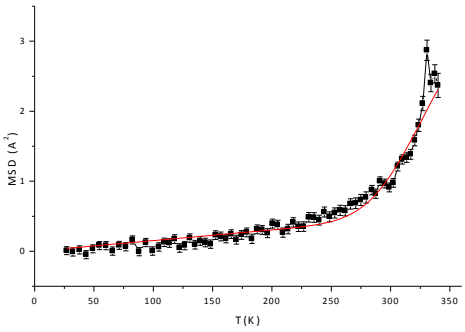
The MSD are associated with the sample flexibility and the transition stands for a measure of the fluctuations in this temperature region, as explained in more details in a publication by M. Rheinstädter et al. [43]. In the low temperature region, where the motions are harmonic, all

samples present very similar motions. In contrary, the onset of the dynamical transition, corresponding to the temperature T_0, highly depends on the hydration state of the sample. The fully hydrated DMPC-d54 MLB exhibits first the transition starting from ~ 260 K. The transition of the fully hydrated ordered membranes is less sharp and seems to be shifted in temperature leading to an onset of the transition around 275 K. In fact, it is difficult to hydrate the membranes completely homogeneously and it might be that the headgroups, which are moreover in direct contact with water, are seen in average as more flexible. For the less hydrated samples, the onset starts much earlier (around 175 and 190 K, respectively), but the transition itself becomes visible for the dry intermediate MLB only around 340 K and does not appear at all for the dry sample, where it was reported to be around 357 K [44]. The MSD at high temperature indicate a high flexibility of the lipids, what was already documented in other publications [45, 46]. However, the data do not permit to conclude directly about the cooperativity or not of the particles. Therefore the model of Bicout-Zaccai eq. (5) [32] was used to fit the individual sample curves to extract the corresponding thermodynamic parameters.

MLB DMPC-d54



MLB



Dry Dry intermediate

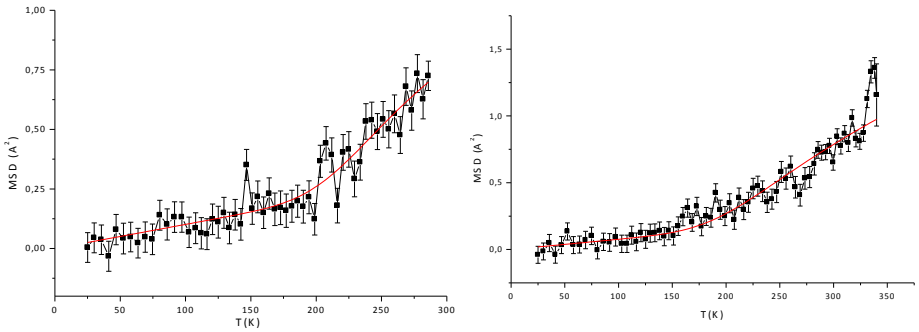


Figure 2: *Best fits of the MSD of all MLB samples according to eq. (5).The extracted fit parameters are summarized in table 2.*

	DMPC-d54 MLB	MLB	Dry MLB	Dry intermediate MLB
T_d	297 (7) K	326 (2) K	242 (73) K	250 (50) K
ΔH (J/mol)	34547 (5400)	34500 (3300)	16200 (3500)	10700 (1500)
ΔS (J/mol/K)	116 (18)	106 (10)	67 (14)	43 (6)
T_0	256 (6) K	275 (2) K	190 (40) K	175 (24) K
k_1 (N/m)	0.84 (13)	0.45 (7)	0.68 (11)	0.90 (14)
k_2 (N/m)	0.053 (6)	0.069 (8)	0.24 (3)	0.20 (2)

Table 2: *Summary from the parameters obtained from the best fits to data in Figure 2. The errors in parentheses apply to the same amount of digits in the fit results.*

Discussion

Some systematics can be derived from the fit parameters: all force constants k_1 are higher than the force constants k_2 what translates the fact that the lipids become more flexible at higher temperature when crossing the free energy barrier and starting non-harmonic motions. T_0 is below T_d as expected by definition, but the difference between them changes with the hydration state of the sample. Whereas Bicout et al. [32] found T_d higher than the highest temperature reached in a neutron experiment, the dry DMPC samples present rather low T_d values as the enthalpy and entropy differences are also significantly lowered compared to the wet samples. Lipid bilayer membranes are indeed forced into close proximity due to dehydration so that interaction bond breaking and formation are suppressed compared to their

hydrated forms. The tendency of getting smaller differences in energy and entropy and lower transition temperature values for dry samples is, however, the same as in Bicout's paper [32].

The hydration affects both harmonic and anharmonic dynamics, i.e., harmonic force constants and free energies (enthalpies and entropies) associated to crossing of barriers. The Figs.3 – 5 below investigate these issues.

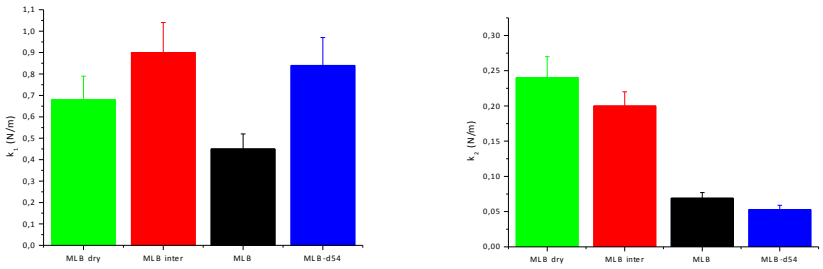


Figure 3: *Comparison of the force constants k_1 and k_2 for the four samples. The samples are ordered from left to right with increasing hydration.*

In figure 3, the effective force constants k_1 and k_2 according to eq. (5) are compared for the four samples. The values for k_1 do not show any systematic behaviour with respect to hydration, as the motions are confined in a small cage at low temperature and harmonic, so not much degrees of freedom are accessible and hydration does not play any specific role. The values are smaller than for typical globular proteins, but lipids are indeed known to have a high flexibility compared to proteins [46 and references therein] and therefore lower force constants. The k_2 values are slightly higher than reported in the literature [31], but eq. (5) was used here to fit the data in contrast to what is usually found in publications where a strict linear fit according to [30] is applied. The force constant in the large conformational cage is much higher. Interestingly, k_2 exhibits a decrease with the hydration degree.

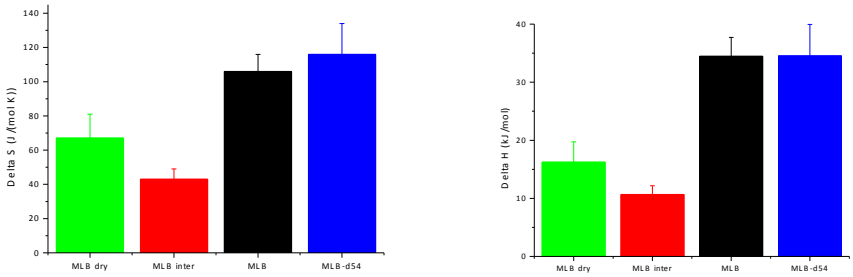


Figure 4: *Comparison of the differences in entropy and enthalpy between the large and small conformational cage for the four samples with increasing hydration from left to right.*

In figure 4, the differences in entropy and enthalpy for the four samples are reported. A clear discrepancy for the two groups of samples (dry against hydrated) appears showing the need of more energy in case of hydrated samples to overcome the energy barrier. The enthalpy differences for the hydrated samples are extremely similar and around 34.5 kJ/mol what exceeds the values found for the total enthalpy change in multi-lamellar vesicles of about 29.6 kJ/mol [47] when crossing pre- and main phase transition. Moreover there does not seem to exist significant differences in the thermodynamic parameters of multi-lamellar vesicles, large unilamellar vesicles and MLB [48, 49]. It seems therefore that more energy is requested to cross the energy barrier corresponding to the dynamical transition than for the phase transitions.

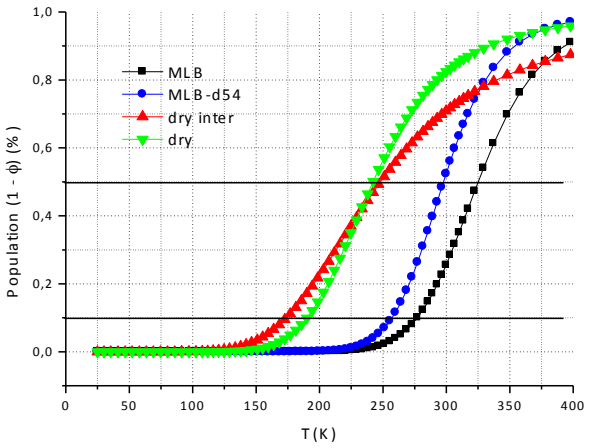


Figure 5: *Fraction of the large fluctuation population as function of temperature for the four samples. The horizontal lines are guide to the eyes and represent 10 and 50% of population, respectively.*

Figure 5 is a representation and extrapolation to higher temperatures of the fraction of the large fluctuation population (1 - ϕ(T)) as function of temperature. Indeed at very low, non physiological, temperature all lipids are in the conformational cage corresponding to harmonic motions only, but the particles acquire sufficient energy at different temperature to present the onset of the dynamical transition and the number of particles crossing the barrier increases differently depending on the sample hydration state. The 10 and 50% percentages are indicated by horizontal lines. They permit to estimate the temperature where the dynamical transition starts (around 10 % at T_0) and where half of the population crossed the barrier (at T_d). The temperature where the transition sets in seems to depend significantly on the hydration, but the completely dry sample undergoes faster the transition than the intermediate dry sample what indicates a higher degree of cooperativity among the particles, certainly due to the tighter packing of the lipids. The partially deuterated lipids have deuterated chains, but the head group is protonated. Such MLB samples show also a higher cooperativity than the totally protonated ones, what can be explained by the higher flexibility of the carbon chains which are mainly hidden here.

The question remains why such a two-state model seems to be sufficient for a satisfactory description of the dynamics. Obviously, a two-state model including effective force constants describes rather well the mean square displacements as function of temperature and the introduction of further states would reduce the corresponding energy and entropy variations by the number of these states, but not contribute significant new information. To exclude artefacts due to the finite instrumental response time, the samples should be probed with an extremely slow scan rate. In fact, modern calorimeters are able to scan samples with a rate of the order of mK/s whereas for neutron scattering it was about 2 – 10 times more (see Elastic Incoherent Neutron Scattering). Therefore, according to R. L. Biltonen [50], there might be three possibilities why a transition appears with a finite width in place of a first-order transition: i) the intrinsic rate of the transition is slow, ii) the samples are not of sufficient purity or iii) there exist a distribution of vesicles with different T_d. Biltonen made several tests on uni-lamellar vesicles compared to multi-lamellar vesicles and ruled out the possibilities (ii) and (iii). In the case of calorimetric measurements he also refuted the first hypothesis, but this might not longer be true for neutron scattering techniques. Transition rates are known to be of

the order of ms to s, which are time ranges comparable to the scan rate in calorimeters. Neutrons probe the sample within a time window determined by the instrumental energy resolution. Concretely, IN13 has an energy resolution of about 8 μeV (FWHM) corresponding to a time window up to 100 ps. The particles which diffuse the neutrons are exhibiting trajectories over much longer times, but the method provides only inside about 100 ps time ranges and the motions executed during these periods. This inherent measurement time is much shorter than the transition time. However, the MSD will appear larger within the time window when the particles crossed the potential barrier and are now in a broader potential well. More and more particles will acquire the energy requested for the crossover, but due to the intrinsic rate of the transition the higher cage will be continuously populated and the MSD increase. Within the precision of such an elastic incoherent neutron scattering experiment, it is therefore not essential to introduce the polydispersity of the particles, unless evident characteristics of various populations justify it, as for instance the labelling of certain particles by an H/D exchange as shown in Bicout's paper [32].

Conclusions

EINS experiments on four different lipid samples permitted to apply a two-state model developed by Bicout et al. [32] and to validate such an approach to analyse the extracted mean square displacements as function of temperature. Thermodynamic quantities as the enthalpy and entropy differences and the transition temperature were determined and discussed in comparison to values found in the literature. As the model describes in a satisfactory way the data, we discussed that the time window probed by the incoherently scattered neutrons is very short in comparison to typical intrinsic transition rates so that it seems judicious to neglect the possible polydispersity of the particles and to assume a first-order like transition.

Acknowledgements

We acknowledge the ILL for the allocation of beam time.

2.2.3 CONCLUSION

Les différentes comparaisons des systèmes nous amènent à considérer le potentiel du modèle puisque les échantillons moins hydratés présentent des valeurs d'enthalpie proches mais décroissantes avec le taux d'hydratation et la variation d'enthalpie. La comparaison entre l'ensemble des protons de chaînes plus ceux de tête avec ceux uniquement des têtes restent néanmoins difficile à exploiter. Malgré la force du modèle l'incertitude statistique inhérente à la diffusion neutronique qui comporte un flux faible en comparaison avec d'autres techniques rend difficile cette comparaison. D'autre part, le modèle reste très grandement lié à l'utilisation des constantes de force du système, surtout à haute température, qui peuvent difficilement être extrapolées puisque les échantillons biologiques supportent relativement mal des températures supérieures à 330K. Le modèle reste pourtant concluant et amène à considérer la population de protons comme un ensemble thermodynamique. En effet les déplacements carrés moyens de la diffusion incohérente élastique reste une technique basée sur l'observation de populations d'hydrogène dynamiquement équivalents. Le temps d'observation de la technique de l'ordre de 100ps est très inférieur au temps d'une transition de premier ordre, par exemple, nous permettant d'exclure la polydispersité de l'ensemble des hydrogènes diffusants. Ceci amène à considérer la question du lien entre l'atome lui-même et ce que le système lipidique expérimente en son entier et comment les deux sont liés.

Le modèle dans son ensemble fournit des résultats cohérents et sensibles pour la transition dynamique et peut maintenant être testé dans un cadre plus large en haute pression sur un système expérimentant une transition entre deux états non-équivalents entre deux puits de potentiel.

2.3 ETUDE SOUS HAUTE PRESSION DU MOLTEN-GLOBULE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

2.3.1 INTRODUCTION

La protéine acétylcholinestérase est une protéine dégradant l'acétylcholine dans les synapses du cerveau permettant de faire l'interface chimique à la jonction synaptique. Cette protéine est intéressante pour la recherche sur la dégradation des fonctions cérébrales ainsi que pour les composés organophosphorés bloquant son activité dans le cadre d'usage militaire. Cette protéine possède une très grande activité de plusieurs milliers de réactions enzymatiques par seconde, néanmoins il semble que les études structurales permettent de penser que le site actif de l'enzyme présente un état conformationnel ne permettant pas le passage de l'acétylcholine dans celle-ci. Des études en dynamique ont ensuite étés menées en réponse pour comprendre ce qui permet d'expliquer son fonctionnement [51, 52].

Dans le cadre de ce travail nous avons poursuivi une étude sous haute pression de la dynamique de la protéine pour reproduire l'état dit de molten-globule [53] se produisant vers 1750Bar d'après des études sur l'activité menées précédemment [54]. L'étude fut poursuivie avec deux techniques différentes, d'une part SANS sur l 'instrument de l'ILL D11 et d'autre part EINS sur l'instrument ILL IN13. L'investigation par diffusion aux petits angles a été menée de 1bar à 2100bar. Le rayon de gyration à 1 bar fut confirmé pour être correspondant aux bonnes proportions de monomères, dimères, tétramères pour l' acétylcholinestérase humaine. Celui-ci correspondant à celui des études menées sur les cristaux d'acétylcholinestérase mesurés en diffraction. L' expérience révèle une compression globale jusqu'à 11% à 900bar suivi d'une décompression de ce point jusqu'à 2100bar. Cette décompression est synonyme d'un dépliement de la structure tertiaire qui est associée à cet état de molten-globule (MG). Pour compléter cette observation l'étude fut menée sur le rétrospectromètre IN13 de 1bar à 6000bar afin d'observer les différents états traversés par la protéine au cours de l'expérience. L'état natif (N) suivi d'un état molten-globule à 1750bar pour plus tard atteindre un état dénaturé de la protéine (U pour "unfolded"). L'ensemble suggère un passage par 4 états différents qui sont discutés dans l'article [55].

2.3.2 ETUDE DE L'ETAT *GLOBULE FONDU* DE L'ACETYLCHOLINESTERASE HUMAINE INDUIT PAR PRESSION : CHANGEMENTS STRUCTURAUX ET DYNAMIQUES SUIVIS PAR DIFFUSION NEUTRONIQUE

PCCP

PAPER



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 3157

Pressure-induced molten globule state of human acetylcholinesterase: structural and dynamical changes monitored by neutron scattering†

J. Marion,‡[ab] M. Trovaslet,‡[ac] N. Martinez,[ab] P. Masson,[ad] R. Schweins,[b] F. Nachon,[ab] M. Trapp[ef] and J. Peters*[ab]

Received 8th July 2014,
Accepted 11th December 2014

DOI: 10.1039/c4cp02992e

www.rsc.org/pccp

We used small-angle neutron scattering (SANS) to study the effects of high hydrostatic pressure on the structure of human acetylcholinesterase (hAChE). At atmospheric pressure, our SANS results obtained on D11 at ILL (Grenoble, France) give a radius of gyration close to that calculated for a mixture of monomers, dimers and tetramers of the enzyme, suggesting a good agreement between hAChE crystal structure and its conformation in solution. Applying high pressure to the sample we found a global compression of about 11% of the enzyme up to a pressure of 900 bar and then again an extension up to 2.1 kbar indicating unfolding of the tertiary structure due to a molten globule (MG) state. On the other hand, we studied the influence of pressure up to 6 kbar on the dynamics of this enzyme, on the backscattering spectrometer IN13 at ILL. For the first time, we used elastic incoherent neutron scattering (EINS) to probe the differences between hAChE in its folded state (N), its high-pressure induced MG state and its unfolded state (U). Especially around the MG state at 1750 bar we found a significant increase in the dynamics, indicating a partial unfolding. A four-step-model is suggested to describe the changes in the protein.

1. Introduction

One of the most intriguing goals of high-pressure studies is the characterization of folding and unfolding processes of proteins.[1] In fact, pressure is generally considered as a potential denaturant of biomolecules, with the great advantage that it affects mainly the volume of the system, whereas temperature denaturation involves changes in both the volume and the thermal energy.[2] Moreover, while pressure denaturation of proteins is generally reversible up to pressure values well above those existing on Earth's biosphere (about 1 kbar at the bottom of the deepest trench of the ocean, 1 bar = 0.1 MPa), temperature denaturation of proteins appears often more violent in its influence on the tertiary and secondary structures and may result in irreversible aggregation, and chemical deterioration.

The classical Lumry–Eyring's two-state model seems to be insufficient to describe in detail protein folding or unfolding processes.[3,4] Under certain mild conditions, at least one intermediate state between the fully folded native state (N) and the fully unfolded state (U) may exist. This intermediate is named molten globule state (MG). Its main common properties are (1) the presence of a significant amount of secondary structure, (2) the absence of most of the specific tertiary structure produced by the tight packing of side chains, (3) compactness of the protein molecule that swells with a radius of gyration 10–30% larger than that of the native state, and (4) the presence of a loosely packed hydrophobic core that increases the hydrophobic surface accessible to solvent.[5–7]

The present study is devoted to the MG transition of human acetylcholinesterase. This enzyme has a paramount physiological importance because it terminates the action of the neurotransmitter acetylcholine in central nervous system, peripheral nervous system ganglia, and at neuromuscular junctions.[8–10] Numerous MG states have already been described during thermal, chemical and/or high-pressure-induced unfolding of cholinesterases (*Torpedo californica* acetylcholinesterase, human butyrylcholinesterase, human acetylcholinesterase)[11–15] and of other proteins.[16–19] During high-pressure denaturation of human acetylcholinesterase (hAChE), the enzyme that plays a central role in the cholinergic system by rapidly hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine, several enzyme conformational and functional alterations

[a] *Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France. E-mail: peters@ill.fr*
[b] *Institut Laue Langevin, F-38042 Grenoble Cedex 9, France*
[c] *Institut de Recherche Biomédicale des Armées, F-91223 Brétigny sur Orge, France*
[d] *Kazan Federal University, Lab of Neuropharmacology, 420008 Kazan, Russian Federation*
[e] *Angewandte Physikalische Chemie, Universität Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany*
[f] *Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, 14109 Berlin, Germany*
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4cp02992e
‡ These authors contributed equally to this work.

were observed. These pressure-induced changes have already proved the presence of a MG state between 1 and 2 kbar.[15] Characteristics of this pressure-induced MG intermediate have been studied intensively (ANS binding, electrophoresis mobility under pressure, hydrodynamic volume, activity) by these authors. Though MGs are unstable transient states, little is known about the dynamics of these partially folded states. The molecular dynamics which can be probed on the time scales accessible by incoherent neutron scattering (a few ps up to a few ns) corresponds to diffusional processes. It was established over the last decades that protein dynamics is associated to its conformational flexibility,[20,21] which is mandatory for enzyme catalysis and molecular activity,[22] shortly for its function. However, most proteins are only functional in their folded state, against being non-functional in the unfolded state. MGs are intermediate states which lost part of their structure, but not necessarily their activity which can be modulated considerably. Therefore supposing a dynamics-function-activity relation, knowledge of the dynamics of MG states would be highly important to characterize such modulations.

In the case of cholinesterases no information is available on the dynamics of MGs so far. Yet, MG transition of these enzymes can occur under standard conditions of pressure and temperature upon binding of specific ligands or reactive chemicals.[11,13] Also, a naturally occurring point mutation has been found to lead to a cholinesterase variant that is in a conformational state similar to MG.[23] Therefore, it was of great interest to access a method capable of providing information on the dynamics of acetylcholinesterase MG transition. Our study was performed under pressure in the range 10^{-3} to 6 kbar.

For this purpose, incoherent neutron scattering offers a method to study molecular dynamics with the advantage of measuring average atomic motions within a given length-time window, which depends on the specific resolution parameters of the instrument. The incoherent neutron scattering intensity is dominated by the signal arising from hydrogen. This is due to the hydrogen incoherent scattering cross section, which is one order of magnitude larger than that of all other elements usually occurring in biological matter, and also of its isotope deuterium.[24] The technique thus probes local molecular dynamics, arising mainly from amino acids sidechains, averaged over the whole macromolecule. hAChE contains a high proportion of hydrogen, 4673 of a total of 9470 atoms. The incoherent cross section of the hydrogen atoms thus corresponds to 99.8% of the total incoherent cross section and to 92.6% of the total scattering of the sample (without the D_2O hydration layer). As we are measuring in solution, heavy water represents about 90% of the total volume, but the contribution to the incoherent scattering remains negligible.

There have already been extensive applications of neutron scattering to dynamics' studies of several different biological systems.[21,25] However, compared to other techniques, such studies are still scarce, mainly because of the need of a relatively high sample amount (about 100–200 mg of pure proteins) to get a reasonable signal-to-noise ratio and the restricted availability of intense neutron sources. This is all the more true when combining neutron scattering with high pressure, as high pressure cells adapted to these scattering techniques became only recently available.[26–29]

Thus, the main challenge of our study was to better characterize the structure and dynamics of MG state formed during high-pressure-induced denaturation of hAChE. Firstly, from SANS experiments, the overall conformation of hAChE was observed up to 2.1 kbar (the highest possible value with the present high hydrostatic pressure (HHP) equipment for SANS at the ILL) by measuring its radius of gyration. Unfortunately, higher pressure could currently not be reached, therefore no structural information was accessible about the unfolded state. Secondly, we used EINS to follow the high-pressure-induced modifications in the dynamics of hAChE, up to 6 kbar, the maximum accessible with the corresponding HHP cell.

2. Materials and methods

2.1 Sample preparation

Production and purification of the full-length recombinant hAChE were executed as described previously in ref. 30. An additional size-exclusion chromatography on Superdex-200 in ammonium acetate buffer (25 mM, pH 7.4) allowed the removal of minor aggregated proteins and desalting. The stock solution of enzyme was then extensively dialyzed against deuterated ammonium acetate buffer (25 mM, pD is around 7 so the pH is about 6.6,[31] because heavy water is less dissociated and a weaker acid than light water) until almost all accessible hydrogen atoms were exchanged against deuterium to avoid a significant signal contribution from the surrounding buffer.

For SANS experiments, 3 ml of a 0.4 mg ml^{-1} protein solution was prepared by dilution of the enzyme stock solution in a deuterated ammonium acetate buffer 25 mM with a pD close to 7 (corresponding to a pH of 6.6). The protein concentration was determined from its absorbance at 280 nm using a molar extinction coefficient of 1.7 for 1 mg ml^{-1} of protein.[32]

For EINS experiments, after a 24 h-lyophilisation step of the enzyme stock solution, about 200 mg of protein powder was dried over P_2O_5 and hydrated by D_2O vapor exchange. For this experiment, the hydration was adjusted to be about 2 g D_2O per g protein. Due to this very high degree of hydration, a gel was formed which was loaded into the high pressure cell. The sample volume was further filled up with D_2O to permit a uniform distribution of the applied pressure. The sample volume was evaluated to be about 9.6% of the total volume.

2.2 Nondenaturating 10% polyacrylamide gel electrophoresis

Before and after the SANS experiment, protein analysis was carried out by native electrophoresis on 10% acrylamide/bis-acrylamide gels (Mini-Protean Precast Gels, Biorad). Electrophoresis buffer was Tris/glycine (41 mM/0.533 M) pH 8.4. All samples were diluted in running buffer containing sucrose (40%) and bromophenol blue as a tracking dye (0.05%) in order to obtain a correct protein concentration (some μg protein per lane). All samples were loaded twice onto the gel and, after electrophoresis, the gel was cut into two parts: the first one was stained

 This journal is © the Owner Societies 2015

with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1 and 2) and the second one was stained for cholinesterase activity according to the method of Karnovsky and Roots[33] (lanes 3 and 4). Acetylthiocholine (1 mM) was then used as substrate and the gel was immersed in the reaction mixture for a few minutes at room temperature. AChE activity bands appeared as red-brown bands.

2.3 Small angle neutron scattering experiment

SANS experiments were performed on D11 (ILL, Grenoble, France)[34] in order to observe the structural conformational changes induced by pressure. For this work, we carried out measurements using two sample-detector distances, *e.g.* 2.5 and 10 m, with collimation distances of 5.5 m and 10.5 m respectively. The neutron wavelength was set to λ = 4.6 Å and a wavelength resolution $\Delta\lambda/\lambda$ of 9%. The magnitude of the scattering vector Q was ranging from 0.0086 to 0.3432 Å^{-1}. The sample was illuminated with an 8 mm diameter neutron beam. Scattered neutrons were detected with a position-sensitive ^{3}He detector which is composed of an active area of 128 × 128 pixels with a size of 7.5 × 7.5 mm each. All data are normalized to absolute intensities in units of 1/cm by measuring H_2O of 1 mm path-length as secondary calibration standard, which is cross-calibrated against H/D polymer blends; the wavelength-dependent effective differential cross section of H_2O for the D11 detector is $d\Sigma/d\Omega$ = 0.903 cm^{-1}. Data were recorded at ambient pressure both in a Hellma cell and in the high pressure cell to validate the equipment. In the ESI,† Fig. S1 represents these two curves as Kratky plots.[35]

Data reduction was done using the ''SANS treatment macro'' of the LAMP software developed at the ILL. First, the two-dimensional data are reduced, as first step an electronic background (measurement of a beam blocker like cadmium) was taken off of all data. Also, data were transmission-corrected and the empty pressure cell has been subtracted. As the scattering intensities were isotropic, a radial averaging of the two-dimensional data was performed with respect to the centre of the incoming neutron beam, yielding the presented one-dimensional scattering curves. Last, the normalized solvent scattering curve has been subtracted from the normalized sample scattering curves. The solvent has been measured in the pressure cell and as a function of pressure, too. As the intensities did not differ as a function of pressure, the different solvent scattering curves were averaged to minimize the intensity error bars and the obtained scattering curve was subtracted from all sample scattering curves. The incoherent background was not subtracted, but taken into account through a fitting parameter within the Guinier fits that were done using SASVIEW.

The sample was loaded in the SANS pressure cell (described in ref. 29). The applied pressure ranged from 1 bar to 2.1 kbar. The pressure was then released with a velocity of about 1 kbar min^{-1} and the measurement was started again after 5 minutes.

The Guinier approximation[36] permits to extract the radius of gyration R_G, which is a measure for the moment of inertia, thus the dimensions of an object, through:

$$I(\vec{Q}) \approx \bar{b}^2 V^2 e^{-\frac{Q^2 R_G^2}{3}}, \quad (1)$$

where $\bar{b}$ is the average scattering length and V the volume of the object. The well-known Guinier approximation holds for small values of momentum transfer Q, which corresponds to the initial linear slope of the scattering curve in the representation of $\ln I$ *vs.* Q^2.[37] The intensity I_0 at $Q \to 0$ is thus proportional to V^2.

2.4 Elastic incoherent neutron scattering experiment

The experiment was performed on the backscattering spectrometer IN13 (ILL, Grenoble, France).[38] IN13 was configured with a 2.23 Å incoming neutron wavelength and 0.2 to 4.9 Å^{-1} momentum transfers, corresponding to an energy resolution of 8 μeV and allowing to probe local motions up to 100 ps. We used the Gaussian approximation[39]

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx \exp\left(-\frac{1}{3}\langle u^2\rangle Q^2\right) \quad (2)$$

in order to treat the data in a 0.8–2.7 Å^{-1} Q-range and to extract the atomic mean square displacements (MSD) $\langle u^2\rangle$ from the neutron intensities I. Similar to the Guinier approximation, it is valid for small Q-values, *e.g.* when $\sqrt{\langle u^2\rangle Q^2} \leq \sqrt{2}$. ΔE designates here the instrumental energy resolution.

To obtain the intensities scattered by the sample only for the SANS and EINS experiments, the scattering from the empty sample holder with the buffer (D_2O) was subtracted. The data were normalized to the totally incoherent scatterer vanadium and absorption corrections based on the formula of Paalman–Pings[40] were applied. For SANS, 1 mm thick H_2O was used as secondary calibration standard (cross-calibrated against H/D polymer blends); the differential scattering cross section of H_2O for the D11 detector at 4.6 Å is 0.908 cm^{-1}. The complete data reduction for SANS and EINS was carried out using the LAMP software available at ILL.[41] Additional linear corrections were made assuming that the compressibility of heavy water results in a 20% volume decrease when going from 1 to 6000 bar. We neglected, however, the protein compressibility due to the fact that hAChE represented only 9.6% of the total volume, for a density of 1.40 (g cm^{-3})[42] and that typical compressibilities of globular proteins in solution would give rise to linear compression of about 3%, only.[43] The illuminated sample area was 10 × 21 mm^2 for the EINS experiments and a circle of 8 mm diameter for the SANS experiments. With raising pressure, more and more proteins were thus pushed into the beam due to the volume reduction and led to a slight increase of the scattered intensity, which was then renormalized. Calculations of the absorption coefficients were made using the program DAVE[44] in order to verify that they do not change with the Q value. Furthermore we evaluated with the same software multiple scattering effects; they were negligibly small in the present case.

3. Results and discussion

3.1 SANS experiments

Fig. 1 shows SANS curves of hAChE measured on D11 at 1 bar, 300 bar, 2100 bar and again at 1 bar. The curves at 600, 900, 1200 and 1800 bar were all close to the 2100 bar data and are

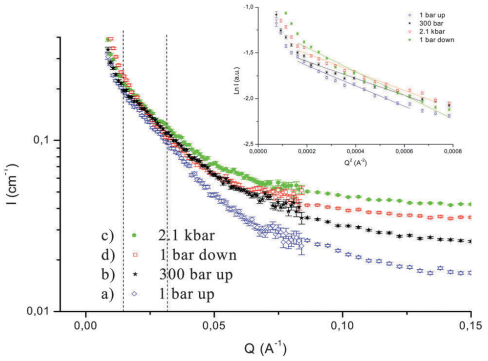


Fig. 1 Neutron intensity *vs.* the scattering vector magnitude Q measured at (a) 1 bar (in blue, open diamond), (b) 300 bar (in black, filled star), (c) 2.1 kbar (in green, filled circle) and (d) after pressure release (in red, open square). The insert shows the corresponding Guinier plots. The dashed vertical lines highlight the Q-range used to the extract them.

not shown here. After releasing the pressure, the intensity was not relaxing exactly to the starting values.

We extracted radii of gyration and the intensities I_0 (see Fig. 2) through Guinier plots of $\ln(I)$ against Q^2. For that we used Q-ranges from 0.012 to at the most 0.029 Å^{-1} to stay below $R_G \times Q < 1.45$.

hAChE is a globular protein of a molecular weight of 67.8 kDa. The theoretical value for R_G of the hAChE dimer crystal structure could be estimated by analyzing the three-dimensional truncated hAChE crystallographic data 3LII[45] or 4EY4[46] with the CRYSON program.[47] This led to a R_G = 37.63 or 38.15 Å for the dry enzyme (respectively for 3LII and 4EY4) and to R_G = 45.72 or 46.27 Å for the same proteins including a 3 Å-thick hydration shell. We therefore estimated the total increase of the radius due to the hydration shell by the difference of the two values to be about 7 Å. The electrophoresis (see Fig. 3) permitted to determine, that in the present case we have a mixture of monomers, dimers and tetramers. Their radii of gyration were calculated to be 26.9, 45.7 and 53.7 Å, respectively, assuming that $(R_G^2)_{dimer} = 2(R_G^2)_{monomer}$ and $(R_G^2)_{tetramer} = 2(R_G^2)_{dimer}$ and adding the hydration shell again at the end. Finally, we evaluated the average radius of gyration of the mixture according to[48]

$$\langle R_G^2 \rangle = \sum_i M_i c_i (R_G^2)_i \Big/ \sum_i M_i c_i \qquad (3)$$

where M_i are the molecular weights and c_i the concentrations of the three species. According to Fig. 3 we estimated 10% of monomers, 60% of dimers and 30% of tetramers yielding a value of 53.6 Å when including the hydration shell. This result is rather close to the experimental one of 57.8 Å, when considering that the estimate of the different concentrations is very rough. We neglected willingly the aggregates, because we ignore their composition and therefore their radius of hydration, but taking them into account would still increase the average radius of gyration and bring it in even closer agreement with the experimental value.

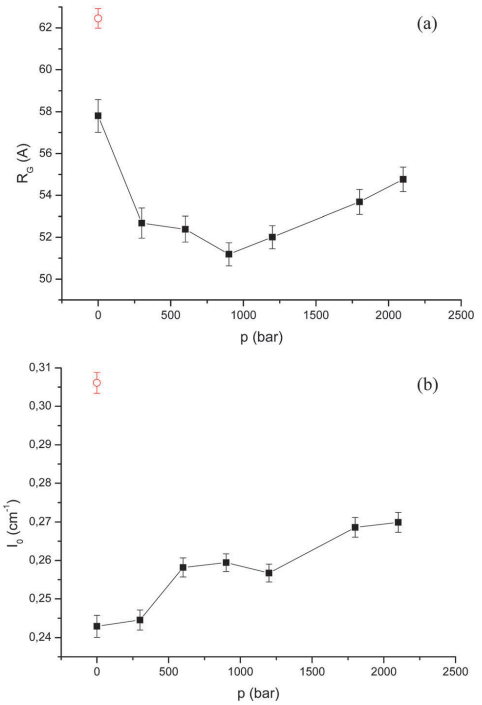


Fig. 2 (a) The radius of gyration and (b) intensity at $Q \rightarrow 0$ *vs.* applied pressure. The red point (open circle) corresponds to the values after releasing pressure.

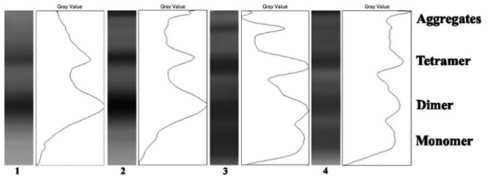


Fig. 3 Native electrophoresis and densitometry profiles obtained from protein samples before (lanes 1 and 3) and after (lanes 2 and 4) pressure experiment. Samples were loaded twice onto the gel and after electrophoresis, the gel was cut into two parts: the first one was stained with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1 and 2) and the second one was stained for cholinesterase activity according to the method of Karnovsky and Roots[33] (lanes 3 and 4).

The R_G of hAChE decreases first for pressures up to 900 bar (R_G = (57.8 ± 0.8) Å at atmospheric pressure *vs.* R_G = (51.2 ± 0.6) Å around 900 bar, corresponding to a maximum decrease of about 11%). The global compression of a few per cent is thus rather small, but because $V = 4\pi\,(5/3)^{3/2} R_G^3/3$ for a spherical protein,

 This journal is © the Owner Societies 2015

a small change in the radius (dR_G) can correspond to a significant change in volume $dV \approx 27\ R_G^2 dR_G$. It could have been the consequence of a dissociation of the oligomers, but Clery *et al.*[14] and Clery-Barraud *et al.*[15] investigated cholinesterases under high pressure by electrophoresis and never found any indication for such effects. Volume reduction is indeed expected under pressure application according to Le Chatelier's principle, but the radius rises again above 900 bar and this up to 2100 bar (by about 7%), the highest pressure value we could reach with the pressure equipment actually available on D11. We relate the increase in size to a signature of the MG state which should be located around 1750 bar according to ref. 15 and correspond to a partial unfolding.

We did furthermore SANS data analysis through a Kratky plot, representing $I \times Q^2$ as a function of Q,[35] after subtraction of the incoherent background (see Fig. S2 of the ESI†). The results show that the chosen range for the Guinier plots corresponds to a range where the intensities have very small error bars, even after subtraction of the incoherent background. At ambient pressure, the Kratky plot resembles a bell shaped profile, as expected for a globular protein. At 2.1 kbar the points at high Q values increase slightly bringing them closer to a plateau shaped profile when the protein presumably starts to unfold. However, the precision of our data does not permit further exploitation and there is no real gain in information from this kind of data evaluation.

Activity measurements carried out before and after the high-pressure SANS experiment suggest that pressure-induced changes are mainly reversible in the tested pressure range. To confirm this result, protein analysis was carried out by native electrophoresis on T = 10% acrylamide/bis-acrylamide gels (Mini-Protean Precast Gels from Biorad) (see Fig. 3). Proteins were revealed by Coomassie Brilliant Blue staining (lanes 1 and 2) and the Karnovsky and Roots method[33] allowed us to detect cholinesterase activity (lanes 3 and 4). The native electrophoresis indicated that both initial and high-pressure treated hAChE preparations contained active monomer, dimer, tetramer and aggregates. The main observed difference was the pressure-induced formation of more aggregates after high-pressure treatment. As they were active, they were not denatured and their 3D-structure was not disturbed. This finding is in agreement with Fig. 2, which shows much higher values for the radius of gyration and I_0 after pressure release. The SANS scattering curves shown in Fig. 1 are obtained after subtraction of an averaged buffer intensity. All data are fully reduced, *i.e.* put on an absolute scale according to well-known and internationally agreed SANS data reduction procedures. The normalized buffer intensities were showing slight variations, but no pressure dependence (as to be expected). Therefore, the buffer measurements were averaged to gain in statistical accuracy. The remaining plateau at high Q is therefore caused by the incoherent scattering contribution of the proteins in solution. This does not contain any information on the structure of the proteins, it is only related to the total mass concentration of protein in solution (regardless of the fractions of mono-, di-, tetramers and clusters). Radii of gyration were obtained from the initial part of the scattering curves only, as stated above up to a Q of 0.029 $Å^{-1}$ to stay below $R_G \times Q < 1.45$.

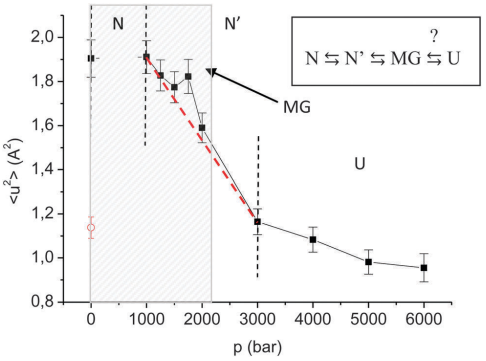


Fig. 4 Mean square displacement of hAChE, measured on IN13, at different pressures up to 6 kbar. The red point (open circle) corresponds to the MSD after releasing pressure. The red dashed line is guidance to the eye to illustrate the straight slope of this part of the curve. The dashed region corresponds to the pressure domain covered by the SANS measurement. The sketch on the right side illustrates the 4-step-model, N being the native, N′ the transitional intermediates, MG the molten globule and U the unfolded state.

3.2 EINS experiments

Fig. 4 shows MSD of hAChE measured on IN13 as a function of pressure extracted from the Q-domain of 0.8 $Å^{-1} < Q < 2.7\ Å^{-1}$, corresponding to amplitudes between 2.3 and 8 Å. Water dynamics appears mainly at the smallest Q-values, which were excluded here from the data analysis. The dynamics taken into account corresponds therefore mainly to internal motions, global motions of the protein setting in at longer times (around 1 ns), although small contributions from such movements being not excluded as discussed in more detail in ref. 49.

As already observed in EINS experiments carried out with other proteins under pressure (lysozyme,[50] trypsin and β-lactoglobulin,[51] for example), we monitored a global reduction in protein fluctuations suggesting a loss of protein mobility. This effect cannot be attributed to oligomerization, because EINS is not sensitive to it in the time range of about 100 ps accessible here as discussed in ref. 30. Almost no variation was visible up to 1 kbar (native state N), then a pronounced change in the MSD values (more than 50% variation) occurred in the low-pressure range tested (ensemble of transitional intermediate states N′, up to 3 kbar). At 1750 bar (exactly in the range of pressure where the MG state of hAChE has previously been described,[15] but shifted by about 200–300 bar to higher pressure, because we worked in D_2O instead of H_2O, which has a stabilizing effect[52]), an increase of the MSD value was perceived indicating that this intermediate state corresponds to a much higher flexibility. Due to the large error bars of the MSD values (caused by the high pressure cell thickness induced absorptions) the point at 1750 bar could still be interpreted as deviation within the error limits of the experiment and be in agreement with a gradual decrease up to 3000 bar. However, the difference between the value lying exactly on the slope and the measured point at 1750 bar corresponds to about three times the standard deviation σ (thus $p < 0.05$ according to a t-test,

compare Fig. 4) so that it is significant. Neutron scattering experiments constitute moreover an average over a huge number of particles, so that the method inherently represents statistical thermodynamics. In ref. 15, an onset in loss in activity was observed above 1500 bar indicating the start of denaturation. At higher pressures (between 3 and 6 kbar), the slope of the MSD changed again and the variations in flexibility were less pronounced. This suggests that, in this pressure range, the unfolded state of hAChE U was reached and therefore a reduction of flexibility due to pressure competed with an increase of flexibility due to unfolding. We thus concluded that, for the first time, we measured differences in dynamics between hAChE in its folded state, its high-pressure-induced molten globule state and its unfolded state. This clearly proves that EINS is a sensitive tool to investigate the pressure dependence of protein conformational fluctuations.

After pressure release, the initial value of the mean square displacement was not recovered (see Fig. 4), suggesting an irreversible denaturation of hAChE in agreement with earlier determinations of a pressure above 3 kbar necessary for a complete denaturation.[15]

4. Conclusions

In summary, the effect of increasing HHP to human acetylcholinesterase can be described by a four-step model. First at low pressure (1 bar–1 kbar), the MSD of the hydrogen atoms are only slightly affected. Pressure does not seem to have an impact on the tertiary structure in this pressure range. We conclude that the protein rigidity is strong, but the compression clearly influences the large-scale structure as measured by SANS. Secondly, in the range from 1–3 kbar, the global decrease of the MSD reveals that higher pressure reduces significantly the degrees of freedom at the atomic scale due to both Le Châtelier's principle and the reduction of the cavities inside the inner parts of the proteins.[53]

We identified a molten globule state at 1750 bar as a third step, since it clearly occurred before unfolding starts. Its signature is a substantial increase of flexibility despite the tendency of pressure to reduce the MSD. In parallel the large scale structure shows an increase of the radius of gyration and the volume which are extended over a broader pressure range. In the fourth step at high pressure (3–6 kbar) the protein will face two competitive effects – Le Châtelier's principle reducing the degrees of freedom at the atomic scale on one side, and the unfolding process exposing large hydrophobic parts of the protein to water invading the inner cavities (above 3 kbar)[54] and allowing an increase in the degrees of freedom. This explains the almost linear behavior of the MSD above 3 kbar.

The reversibility of high hydrostatic pressure effects upon proteins is still a debated question. However, during the EINS experiment and after a 6 kbar pressure application the protein showed a decrease in the general MSD indicating irreversibility as the protein loses its functionality being denatured.

The molten globule state is particularly hard to find and corresponds to a very specific pressure range as shown by the change in molecular dynamics probed with EINS. Further experiments such as quasi-elastic neutron scattering (QENS), which furnish more precise information on motion geometry, will help to better characterize this intermediate state dynamically. Thermodynamic investigations of acetylcholinesterase would shed even more light on the facts that lead to the trapping of the protein in a molten globule state since it appears that the type of molten globule depends on the denaturing agent/parameter and can be different for each protein.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Direction Générale de l'Armement (contracts REI no. 2009340023, DGA/SSA 08co501 and BioMedef 0 PDH-2-NRBC-3-C-301). Jérémie Marion was supported by a PhD scholarship from the French Ministry for Research and Technology. We gratefully acknowledge Thomas Gutberlet (HZB), Bruno Demé (ILL), Bernhard Frick (ILL), Moeava Tehei (IHMRI) and Lars Meinhold for fruitful discussions and their technical help. Finally, we thank Mathieu Lemé (ILL) and all members of the SANE group (Jean-Luc Laborier, Claude Payre, Jean-Paul Gonzales, Simon Baudoin, Nadir Belkhier and Eddy Lelièvre-Berna) for their help during the development of the high-pressure equipment. This work benefited from SasView software, originally developed by the DANSE project under NSF award DMR-0520547 [http://www.sasview.org/].

Notes and references

1 J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. García-Moreno E. and C. A. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **109**, 6945–6950.
2 G. Gibrat, G. Hui Bon Hoa, C. T. Craescu, L. Assairi, Y. Blouquit, B. Annighöfer, R. P. May and M.-C. Bellissent-Funel, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2014, **1844**, 1560–1568.
3 J. Somkuti, M. Bublin, H. Breiteneder and L. Smeller, *Biochemistry*, 2012, **51**, 5903–5911.
4 J. Somkuti, Z. Mártonfalvi, M. S. Z. Kellermayer and L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2013, **1834**, 112–118.
5 H. Christensen and R. H. Pain, *Eur. Biophys. J.*, 1991, **19**, 221–229.
6 G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas and R. I. Gilmanshin, *Biopolymers*, 1991, **31**, 119–128.
7 D. I. Kreimer, R. Szosenfogel, D. Goldfarb, I. Silman and L. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **91**, 12145–12149.
8 J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker and I. Silman, *Science*, 1991, **253**, 872–879.
9 S. Darvesh, D. A. Hopkins and C. Geula, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003, **4**, 131–138.
10 I. Silman and J. L. Sussman, *Chem.-Biol. Interact.*, 2008, **175**, 3–10.

 This journal is © the Owner Societies 2015

11 E. A. Dolginova, E. Roth, I. Silman and L. M. Weiner, *Biochemistry*, 1992, **31**, 12248–12254.
12 J. Eichler, D. I. Kreimer, L. Varon, I. Silman and L. Weiner, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 30093–30096.
13 L. Weiner, D. Kreimer, E. Roth and I. Silman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **198**, 915–922.
14 C. Clery, F. Renault and P. Masson, *FEBS Lett.*, 1995, **370**, 212–214.
15 C. Clery-Barraud, A. Ordentlich, H. Grosfeld, A. Shafferman and P. Masson, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 4297–4307.
16 Y. Kobashigawa, M. Sakurai and K. Nitta, *Protein Sci.*, 1999, **8**, 2765–2772.
17 J. Zhang, X. Peng, A. Jones and J. Jonas, *Biochemistry*, 1995, **34**, 8631–8641.
18 G. J. A. Vidugiris, J. L. Markley and C. A. Royer, *Biochemistry*, 1995, **34**, 4909–4912.
19 K. Ruan, R. Lange, N. Bec and C. Balny, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **239**, 150–154.
20 W. Doster, S. Cusack and W. Petry, *Nature*, 1989, **337**, 754–756.
21 G. Zaccai, *Science*, 2000, **288**, 1604–1607.
22 S. Sacquin-Mora, P. Sebban, V. Derrien, B. Frick, R. Lavery and C. Alba-Simionesco, *Biochemistry*, 2007, **46**, 14960–14968.
23 H. Delacour, S. Lushchekina, I. Mabboux, A. Bousquet, F. Ceppa, L. M. Schopfer, O. Lockridge and P. Masson, *PLoS One*, 2014, **9**, e101552.
24 V. F. Sears, *Neutron News*, 1992, **3**, 26–37.
25 F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik and G. Zaccai, *Q. Rev. Biophys.*, 2002, **35**, 327–367.
26 M. S. Appavou, G. Gibrat, M.-C. Bellissent-Funel, M. Plazanet, J. Pieper, A. Buchsteiner and B. Annighöfer, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2005, **17**, 3093–3099.
27 M. S. Appavou, S. Busch, W. Doster, A. Gaspar and T. Unruh, *Eur. Biophys. J.*, 2011, **40**, 705–714.
28 J. Peters, M. Trapp, D. Hughes, S. Rowe, B. Demé, J.-L. Laborier, C. Payre, J.-P. Gonzales, S. Baudoin, N. Belkhier and E. Lelievre-Berna, *High Pressure Res.*, 2011, **32**, 97–102.
29 J. P. Hanrahan, M. P. Copley, K. J. Ziegler, T. R. Spalding, M. A. Morris, D. C. Steytler, R. K. Heenan, R. Schweins and J. D. Holmes, *Langmuir*, 2005, **21**, 4163.
30 J. Peters, M. Trovaslet, M. Trapp, F. Nachon, F. Hill, E. Royer, F. Gabel, L. van Eijck, P. Masson and M. Tehei, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 6764–6770.
31 P. K. Glasoe and F. A. Long, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 188–190.
32 T. L. Rosenberry and D. M. Scoggin, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 5643–5652.
33 M. J. Karnovsky and L. A. Roots, *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, **12**, 219–221.
34 P. Lindner and R. Schweins, *Neutron News*, 2010, **21**, 15–18.
35 V. Receveur-Bréchot and D. Durand, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012, **13**, 55–75.
36 A. Guinier and G. Fournet, *Small Angle Scattering of X-rays*, New York, 1955.
37 P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch and D. I. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, **36**, 1277–1282.
38 F. Natali, J. Peters, D. Russo, S. Barbieri, C. Chiapponi, A. Cupane, A. Deriu, M. T. Di Bari, E. Farhi, Y. Gerelli, P. Mariani, A. Paciaroni, C. Rivesseau, G. Schiro and F. Sonvico, *Neutron News*, 2008, **19**, 14–18.
39 A. Rahman, A. K. S. Singwi and A. Sjölander, *Phys. Rev.*, 1962, **126**, 986–996.
40 H. H. Paalman and C. J. Pings, *J. Appl. Phys.*, 1962, **33**, 2635–2639.
41 http://www.ill.eu/instruments-support/computing-forscience/cs-software/all-software/lamp/.
42 S. Bon, M. Huet, M. Lemonnier, F. Rieger and J. Massoulié, *Eur. J. Biochem.*, 1976, **68**, 523–530.
43 K. Gekko and H. Noguchi, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 2706–2714.
44 R. T. Azuah, L. R. Kneller, Y. Qiu, P. L. W. Tregenna-Piggott, C. M. Brown, J. R. D. Copley and R. M. Dimeo, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 2009, **114**, 341.
45 H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry and J. L. Sussman, *Chem.-Biol. Interact.*, 2010, **187**, 10–22.
46 J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin and J. J. Height, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 10282–10286.
47 D. I. Svergun, S. Richard, M. H. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin and G. Zaccai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 2267–2272.
48 C. Tanford, *Physical chemistry of macromolecules*, Wiley and Sons Inc., NY, 1961.
49 M. Trapp, M. Trovaslet, F. Nachon, M. M. Koza, L. v. Eijck, F. Hill, M. Weik, P. Masson, M. Tehei and J. Peters, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 14744–14753.
50 M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, A. Paciaroni, L. R. S. Barbosa, H. Amenitsch, M. Steinhart, J. Ollivier and D. Russo, *J. R. Soc., Interface*, 2009, **6**(Suppl 5), S619–634.
51 A. Filabozzi, A. Deriu, M. T. Di Bari, D. Russo, S. Croci and A. Di Venere, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1804**, 63–67.
52 P. Masson and C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1041**, 223–231.
53 E. Girard, R. Kahn, M. Mezouar, A. C. Dhaussy, T. W. Lin, J. E. Johnson and R. Fourme, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 3562–3571.
54 Y. Fu, V. Kasinath, V. R. Moorman, N. V. Nucci, V. J. Hilser and A. J. Wand, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 8543–8550.

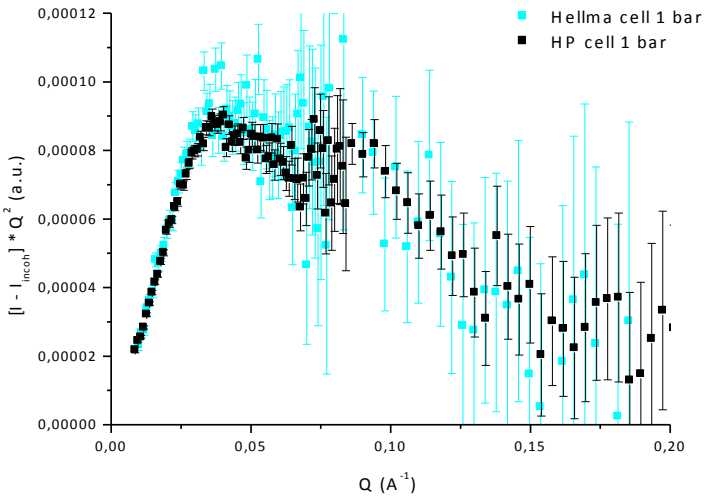
This journal is © the Owner Societies 2015

Electronic Supporting Information (ESI)

Marion et al.

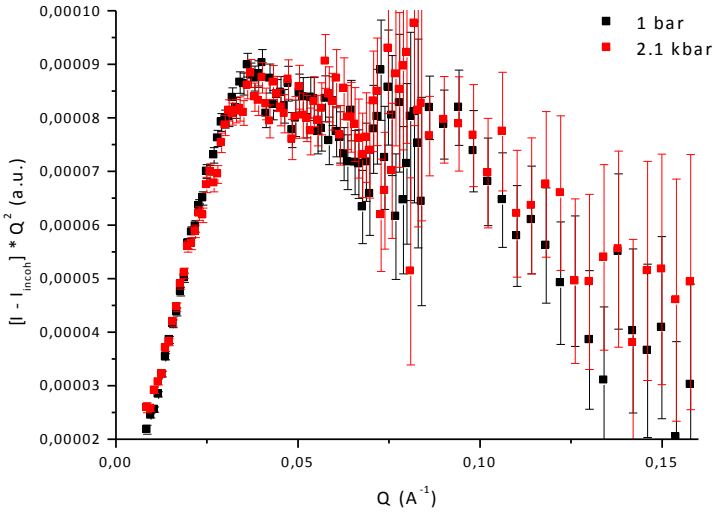
SANS data can, after subtraction of the incoherent background, be represented plotting the normalised intensity I multiplied with the squared value of the momentum transfer Q. This type of plot is named Kratky plot (Kratky, O.; Porod, G. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas- Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 1949, 68, 1106-1122) and was first used in polymer science. It is particularly useful for polymers that have a Gaussian coil conformation and thus a Q^{-2} slope in small angle scattering data, which yields a plateau in a Kratky plot. Furthermore, Kratky plots can also be used for proteins; a folded protein which means a compact particle, shows a bell-shaped curve in a Kratky representation.

1 Kratky plot of data collected at ambient pressure in a Hellma cell and in the high pressure cell.



1

2 Kratky plot of the data corrected for the incoherent background at ambient pressure and 2.1 kbar, both being in the high pressure cell.



2

2.3.3 CONCLUSION

Les données regroupées à la fois sur la partie structurale à grande échelle et sur la partie dynamique des protons de la protéine hAChE répondent à la problématique du molten-globule et des différents états.

hAChE suit quatre états différents sous les effets de la pression suivant les données obtenues par SANS et EINS. Le premier état correspond à une rigidité importante du système étant peu fléxible jusqu'à 1000bar. Cette zone de pression garde la protéine dans un état proche de l'état natif et répond au principe de Le Ch,telier sur les effets de la pression (ie. plus la pression appliquée sur un système est forte plus le volume accessible est réduit) bien que cela affecte peu la dynamique des protons en moyenne. La suite du processus révèle à la fois une augmentation du rayon de gyration mais aussi un abaissement linéaire de la dynamique et donc une réduction de la flexibilité. Ce phénomène s'explique par le début d'un changement dans la structure tertiaire dû à la réduction des cavités internes de la protéine [56, 57] . Les protons ainsi exposés répondent donc à une réduction de la dynamique en étant exposés à moins de degrés de libertés. Le molten globule intervient dans cet état intermédiaire qui n'a pas encore atteint le point de dépliement à 1750bar. Cet état contrevient au principe de Le Châtelier sur les effets de la pression, la dynamique étant accrue impliquant de surcroit une flexibilité accrue. Cet état est symptomatique d'un état de globule fondu où la protéine n'est pas encore dénaturée, mais n'est plus fonctionelle. Le processus de réduction dans cet état de compression intermédiaire se poursuit ensuite pour finir à 3000bar. Bien que la diffusion aux petits angles ne fournit pas d'information sur l'échelle de pression de 3000 à 6000 bar la diffusion élastique indique néanmoins un dépliement de la protéine exposant les protons à l'eau lourde environnante créant un accroissement des degrés de liberté ceci étant contre-balancé par les effets de la pression qui réduit ceux-ci. Ainsi la dynamique reste relativement stable de 3000 à 6000 bar, affectant peu la dynamique. La vérification apportée pour cela est donnée par le point de vérification retour à 1bar fournissant une dynamique grandement affaiblie par comparaison à l'état natif de la protéine.

La pression au travers d'une étude à la fois structurale et dynamique permet d'observer un processus complet de dénaturation non chimique qui par conséquent agit sur la conformation protéique puisque n'agissant que sur le volume que celle-ci occupe. Cela permet d'en observer les aspects et de caractériser les différents états à travers des valeurs moyennes apportées par les deux types d'expériences.

La difficulté pour obtenir les états de globule fondu sur les protéines reste suffisamment complexe et dépend de la protéine considérée principalement, rendant la reproductibilité expérimentale et la généralisation difficile. Néanmoins les résultats étant concluants le projet pourrait être poursuivi par une étude quasi-élastique pour observer comment ces degrés de liberté sont modifiés au cours des différentes étapes et quel type de population de protons change au cours des différentes pressions que le système subit.

Chapitre 3

CONCLUSION

Les différents travaux abordés couvrent une petite partie de l'ensemble des études biologiques possibles en haute pression, néanmoins ces études présentent un point de départ pour des études futures de la haute pression en biologie étudiée par diffusion neutronique.

Une première partie du projet consiste à utiliser la spectroscopie incohérente élastique et vérifier sa validité pour extraire des informations thermodynamiques sur des échantillons biologiques. Le projet a donc comporté deux parties distinctes, la première étant liée à une étude standard sur le DMPC sous pression présentée en Annexe [31] établissant les changements structuraux mais aussi dynamiques prouvant la viabilité de la diffusion neutronique pour définir des informations sensibles sous haute pression. La seconde partie concerne les articles présentés dans la partie III chap. 4 visant à la vérification quantitative d'un modèle thermodynamique de transition entre deux états non équivalents adapté pour les déplacements carrés moyens des atomes d'hydrogène. La seconde partie permet d'établir une hiérarchisation des différents échantillons et de leur transition dynamique ainsi que les différentes populations de protons. La suite du projet ciblera une étude sous haute pression du modèle (non-présenté ici) comparé avec la technique de calorimétrie à perturbation de pression. Le projet ayant progressé grandement, cela permet dorénavant d'établir de nouvelles expériences sur des échantillons non-modèle pour apporter des informations thermodynamiques supplémentaires via la dynamique de ces systèmes.

Un certain nombre de questions est soulevé à la suite de ces résultats concluants pour la suite du projet. La première de celle-ci concerne la diffusion incohérente élastique et l'utilisation du modèle sur celle-ci. Les protons observés dans les expériences restent dynamiquement équivalents, ainsi ce sont les seuls à diffuser. Cela n'implique pas que tous les protons sont visibles à tout moment dans toutes les régions de l'espace. Ainsi que l'utilisation de la thermodynamique pour un ensemble dynamiquement équivalent est justifiée il serait intéressant de vérifier au travers de différentes résolutions et à travers de mesures quasi-élastiques exactement le nombre protons qui "échappent" aux résolutions d'espace et de temps

de l'instrument au cours de ces transitions. D'autre part l'ensemble de la population de protons observée fait partie intégrante du biosystème étudié, mais ne représente pas le système au complet. Il sera ainsi intéressant de développer pour la suite du projet une base théorique et expérimentale pour élaborer la liaison atomique et macroscopique d'un point de vue thermodynamique pour modéliser les interactions, leurs forces et à quel point elles sont codépendantes. La faisabilité d'un tel projet requiert néanmoins un grand nombre de travaux théoriques de modélisation multi-échelles mais aussi un nombre exhaustif d'expériences où la précision de mesure serait clé pour la réussite d'une telle entreprise rendant celle-ci extrêmement fastidieuse.

L'autre partie du projet concerne l'établissement de modifications protéiques à travers la pression et comment le processus se développe pour chaque protéine. Cette partie du projet reste beaucoup moins sujette à l'établissement de modèles. Dans le cas de l'acétylcholinestérase humaine nous avons démontré avec succès la présence d'un état de globule fondu par des observations expérimentales à la fois macrostructurales mais aussi par le biais de la dynamique interne de la protéine. Cela permet d'établir un schéma avec les différentes étapes que cette protéine subit au cours d'une exposition à la pression. D'autres projets menés en parallèle pour la protéine béta,-lactoglobuline ont montré l'obtention en plusieurs étapes d'un dépliement partiel et cinétique dépendant de la pression au travers d'études structurales et dynamiques sur différentes résolutions (l'ensemble des données nécessitant encore des traitements supplémentaires n'ont pas été présentées dans ce document). Le projet mené avec Roland Winter [58], par exemple, montré l'effet baro-protecteur du crowding sur les modifications dynamiques et structurales du lysozyme. L'ensemble de ces travaux montre que chaque étude sous pression sur une protéine est grandement dépendante de la protéine utilisée, des concentrations mais aussi des tampons utilisés avec en partie des dénaturants pour obtenir des états métastables de globule fondu pour une protéine. D'autre paramètres comme le temps d'exposition mais aussi la vitesse d'exposition à la pression rentrent également en ligne de compte lors de ce genre d'expériences. Cet ensemble de considérations complexifie la mise en place de ces dernières. Néanmoins la diffusion neutronique permet en complément d'autres techniques de renforcer les informations sur les études menées sous haute pression sur de tels systèmes permettant une compréhension un peu plus complète de ceux-ci.

La compréhension de la dénaturation au travers de la pression reste un challenge pour le moins entier qui pourra fournir des indices sur le pliement protéique au travers du phénomène inverse. Avec l'avancée des techniques de traitements *ab initio* de Dimitri Svergun [59] pour simuler des conformations possibles pour une protéine donnée avec une structure primaire bien définie il serait potentiellement possible d'accumuler les données de dénaturation partielle par la pression mais aussi des données dynamiques au travers de données élastiques et quasi-élastiques pour obtenir une vision encore plus complète du dépliement protéique.

La technique de diffusion neutronique prouve son efficacité pour répondre à

des problèmes de différentes natures sous un angle nouveau qui peuvent apporter des réponses complémentaires mais aussi mettre à jour de nouvelles informations. Pour ce faire les systèmes doivent néanmoins être assez bien caractérisés pour connaître préalablement que chercher et où le chercher si la réponse existe. La technique présente en effet la difficulté inhérente d'avoir à disposition une quantité suffisante d'échantillon mais aussi un temps de faisceau susceptible d'amener des statistiques concluantes pour être utilisables. La haute pression en diffusion neutronique offre un angle d'exploration de la dynamique moléculaire en termes expérimentaux pour compléter des informations à la fois phénoménologiques mais aussi qualitatives pour comparer les systèmes entre eux et établir leur stabilité ou instabilité au travers des effets de la pression. Une autre part de l'exploration par haute pression permet de donner un cadre thermodynamique à différents systèmes et de pouvoir les comparer avec de la calorimétrie, par exemple, renforçant la validité des résultats ou amenant des informations parfois différentes et nouvelles complétant cette image. De nombreuses techniques permettent d'étudier la dynamique mais sur différents types de liaisons comme en RMN, ou différentes échelles de temps etc... il en va de même pour les études structurales. Ainsi la combinaison d'une grande variété de techniques et de simulations sont nécessaires pour compléter les connaissances sur les effets de la pression sur les biomolécules et sur l'adaptation biologique. Ce chemin de la découverte est long mais est à n'en point douter passionnant.

Chapitre 4

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier le professeur Judith PETERS (UJF), pour ses conseils avisés et son enthousiasme sur les sujets entrepris. Je tiens également à remercier l'école doctorale qui m'a fourni l'opportunité de poursuivre ce projet de trois ans au sein de l'Institut de Biologie Structurale et au sein de l'Institut Laue Langevin. Je remercie également les collaborateurs que j'ai eu au cours de ces années, notamment Nicolas Martinez pour son aide et ses discussions autour des sujets que j'ai eu à traiter mais aussi Jörg PIEPER, ainsi que Marie TROSVALET, Patrick MASSON, Dominique BICOUT, Thomas GUTBERLET, Gerald KNELLER. Je tiens à remercier également Mathieu LEME, Mathieu MORIN, David HESS, Isabelle GRILLO pour leur aide pour préparer les expériences.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier les membres du jury de la thèse Pr. Christian Roumestand, Dr. Philippe Oger, tous deux rapporteurs et le Pr. Irina Mihalcescu et Dr. Thomas Gutberlet pour leur présence dans le jury.

Bibliographie

[1] Campbell, Neil A. ; Brad Williamson ; Robin J. Heyden (2006). "Biology : Exploring Life", Boston, Massachusetts : Pearson Prentice Hall

[2] Schober H. (2010) *Collection SFN,* **10,** 159–336.

[3] Bicout D. (2005) *J. Phys. IV France*, **130**, 115–132.

[4] Neutron Scattering in Biology, Editors : J. Fitter, T. Gutberlet, J. Katsaras, Springer, 2006.

[5] Varley F. Sears, NIST (1992) *Neutron News,* **3**, No. 3, 29-37.

[6] Bée M. (1988) Quasielastic neutron scattering'.

[7] Fanchon E., Geissler E., Hodeau J.-L., Regnard J.-R., Timmins P. A. (2000) "Structure and Dynamics of Biomolecules" *Oxford Uni. Press,* **4**, 161-180.

[8] Van Hove L. (1954) *Phys. Rev.,* **95**, 249.

[9] Van Hove L. (1958) *Physica,* **24**, 404.

[10] Lovesey S. (1984) "Theory of thermal neutron scattering from condensed matter" *International Series of Monographs on Physics,* **72**, Oxford Science, Oxford

[11] Doster W., Cusack S., & Petry W. (1989) "Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering", *Nature*, **337** , 754-756.

[12] Scherm R., Springer T. (1967) "Proposal of a Multiple Chopper for the Investigation of Very Small Energy Transfert", *IFF J‡°lilch,* No. CONF-660925.

[13] Williams, M.M.R. (1974), "Random processes in nuclear reactors", Pergamon

[14] Heidemann A., Buevoz J.L. (1977) "IN13 : A high energy resolution spectrometer for short wavelengths", Internal Report.

[15] Falourd, X., Natali, F., Peters, J., & Foucat, L. (2014) "Molecular mobility in Medicago truncatula seed during early stage of germination : Neutron scattering and NMR investigations", *Chemical Physics*, **428**, 181-185.

[16] Knoll, W., Peters, J., Kursula, P., Gerelli, Y., & Natali, F. (2014) "Influence of myelin proteins on the structure and dynamics of a model membrane with emphasis on the low temperature regime", *The Journal of chemical physics*, ***141***, No. 20, 205101.

[17] Trapp, M., Marion, J., Tehei, M., Demé, B., Gutberlet, T., & Peters, J. (2013) "High hydrostatic pressure effects investigated by neutron scattering on lipid multilamellar vesicles", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **15**, No.48, 20951-20956.

[18] Cupane, A., Fomina, M., Piazza, I., Peters, J., & Schir‡≤, G. (2014). "Experimental evidence for a liquid-liquid crossover in deeply cooled confined water", *Physical review letters*, **113**, No. 21, 215701.

[19] Migliardo, F., Caccamo, M. T., & Magazô, S. (2013). "Thermal Properties Investigation on Systems of Biophysical Interest by EINS and Wavelet Analysis", *J. Phys. Chem. Biophys.*, **3**, No. 118, 2161-0398.

[20] Amann-Winkel, K., Löw, F., Handle, P. H., Knoll, W., Peters, J., Geil, B., ... & Loerting, T. (2012) "Limits of metastability in amorphous ices : the neutron scattering Debye–Waller factor", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **14**, No.47, 16386-16391.

[21] Grimaldo, M., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Seydel, T., & Schreiber, F. (2014) "Diffusion and Dynamics of γ-Globulin in Crowded Aqueous Solutions", *The Journal of Physical Chemistry B*, **1184**, No. 25, 7203-7209.

[22] A. Guinier and G. Fournet, Small Angle Scattering of X-rays, New York, 1955.

[23] Svergun D. I., (1999) "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing" *Biophysical Journal*, **76**, No.6, 2879-2886.

[24] Description D16 https ://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/d16/

[25] Description D11 https ://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/d11/

[26] Svergun, D. I. & Nierhaus, K. H. (2000) "A Map of Protein-rRNA Distribution in the 70 SEscherichia coli Ribosome", *Journal of Biological Chemistry*, **275**, No.19, 14432-14439.

[27] Oger, P. and Jebbar, M., The many ways of coping with pressure, Res. Microbiol. 161, 799 - 809 (2010).

[28] Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Balny, C. (1996) "High pressure effects on protein structure and function" *Proteins-Structure Function and Genetics*, **24**, No.1, 81-91.

[29] Jaenicke, Rainer. "Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions." *EJB Reviews* (1991). Springer Berlin Heidelberg, 1991. 291-304.

[30] Zaccai G. (2000) "How soft is a protein ? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering" *Science*, **288**, No.5471 , 1604-1607.

[31] Trapp, M., Marion, J., Tehei, M., Demé, B., Gutberlet, T., & Peters, J. (2013) "High hydrostatic pressure effects investigated by neutron scattering on lipid multilamellar vesicles" *Physical Chemistry Chemical Physics*, **15**, No.48, 20951-20956.

[32] D. Bicout and J. Zaccai, Protein flexibility from the Dynamical Transition : A Force Constant Analysis. Biophys. J. 80 : 1115 – 1123, 2001.

[33] B. Aoun et al., Direct comparison of elastic incoherent neutron scattering experiments with molecular dynamics simulations of DMPC phase transitions, Eur. Phys. J. E 39 (2016), 48 and references therein.

[34] M. Monkenbusch, D. Richter and R. Biehl. 2010. Observation of Protein Domain Motions by Neutron Spectroscopy. Chem. Phys. Chem. 11 : 1188 – 1194.

[35] M. Bée. 2003. Application de la diffusion inélastique aux systèmes désordonnés. J. Phys. IV France 111 : 259 – 296.

[36] Tehei, M., et al., Adaptation to extreme environments : macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering, EMBO rep. 5, 66 - 70 (2004).

[37] Frauenfelder, H., F. Parak, and R. D. Young. 1988. Conformational substates in proteins. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17 :569 –572.

[38] S. Tristram-Nagle, Y. Liu, J. Legleiter and John F. Nagle, Biophys. J. 2002, 83, 3324-

[39] Natali, F., Peters, J. ; Russo, D. ; Barbieri, S. ; Chiapponi, C. ; Cupane, A. et al. IN13 backscattering spectrometer at ILL : Looking for motions in biological macromolecules and organisms. Neutron News 19, 14–18 (2008).

[40] Richard, D. ; Ferrand, M., and Kearley, G.J. Analysis and visualisation of neutron-scattering data. J. Neutron Res. 4, 33-39 (1996).

[41] A. Guinier and G. Fournier. Small-angle scattering of X-rays. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, USA, 1955.

[42] A. Rahman, K. S. Singwi, and A. Sjölander. Theory of slow neutron scattering by liquids. I. Phys Rev 126 (3) :986-996, 1962

[43] M. C. Rheinstädter, T. Seydel, F. Demmel and T. Salditt, Phys. Rev. E : Stat., Nonlinear Soft Matter Phys., 2005, 71, 061908.

[44] A.V. Popova, and D.K. Hincha, BMC Biophysics, 2011, 4, 11.

[45] M. Trapp, T. Gutberlet, F. Juranyi, T. Unruh, B. Demé, M. Tehei, and J. Peters. Hydration dependent studies of highly aligned multilayer lipid membranes by neutron scattering. J. Chem. Phys., 133(16) :164505–7, October 2010.

[46] J. Peters, M.T. Giudici-Orticoni, G. Zaccai and M. Guiral, Dynamics measured by neutron scattering correlates with the organization of bioenergetics complexes in natural membranes from hyperthermophile and mesophile bacteria, Eur. Phys. J. E (2013) 36 : 78

[47] J. Peters, J. Marion, F. Becher, M. Trapp, T. Gutberlet, D. J. Bicout, T. Heimburg, Thermodynamics of lipid large unilamellar vesicles in presence of sterols at high hydrostatic pressure, to be submitted.

[48] T. Heimburg. Thermal Biophysics of Membranes. Wiley, Weinheim, 2007.

[49] H. Ebel, P. Grabitz and T. Heimburg. 2001. Enthalpy and volume changes in lipid membranes. 1. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants. J. Phys. Chem. B, 105 : 7353-7360

[50] R.L. Biltonen, A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholilid bilayer membranes : their potential role in biological function, J. Chem. Thermodyn. 22 (1990) 1 – 19.

[51] Fuxreiter, M., & Warshel, A. (1998) "Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase : computer simulation studies", *Journal of the American Chemical Society*, **120**, No.1, 183-194.

[52] Zhang, Y., Kua, J., & McCammon, J. A. (2003) "Influence of structural fluctuation on enzyme reaction energy barriers in combined quantum mechanical/molecular mechanical studies", *The Journal of Physical Chemistry B*, **107**, No.18, 4459-4463.

[53] Ohgushi, M., & Wada, A. (1983). "'Molten-globule state' : a compact form of globular proteins with mobile side-chains" *FEBS letters*, **164**,No.1, 21-24.

[54] C. Clery-Barraud, A. Ordentlich, H. Grosfeld, A. Shafferman and P. Masson, Eur. J. Biochem., 2002, 269, 4297–4307.

[55] Marion, J., Trovaslet, M., Martinez, N., Masson, P., Schweins, R., Nachon, F., ... & Peters, J. (2015) "Pressure-induced molten globule state of human acetylcholinesterase : structural and dynamical changes monitored by neutron scattering" *Physical Chemistry Chemical Physics*, **17**, No.5, 3157-3163.

[56] Weber, G., & Drickamer, H. G. (1983) "The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules", *Quarterly reviews of biophysics*, **16**, No.01, 89-112.

[57] Heremans, K., & Smeller, L. (1998) "Protein structure and dynamics at high pressure", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1386**, No.2, 353-370.

[58] Erlkamp, M., Marion, J., Martinez, N., Czeslik, C., Peters, J., & Winter, R. (2015). "Influence of Pressure and Crowding on the Sub-Nanosecond Dynamics of Globular Proteins", *The Journal of Physical Chemistry B*, **119**, No.14, 4842-4848.

[59] Dmitri I. Svergun, Maxim V. Petoukhov, Michel H.J. Koch, Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering, Biophys. J. 80 (2001) 2946 - 2953.

Chapitre 5

ANNEXE

La partie annexe contient deux articles publiés au cours des travaux de la thèse.

Le premier article publié par M. Trapp & al. servit de travail préparatoire dans le cadre de mon travail pour la suite des développements expérimentaux menés sur les lipides et la thermodynamique ultérieurement présentés dans la Partie III.

Le second article publié par M. Erlkamp et al. concerne le travail en collaboration avec le groupe de Roland Winter sur l'influence baroprotectrice de la concentration étudiée en dynamique sub-nanoseconde sur les protéines globulaires.

PCCP

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

High hydrostatic pressure effects investigated by neutron scattering on lipid multilamellar vesicles

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 20951

Marcus Trapp,[ab] Jérémie Marion,[cde] Moeava Tehei,[fg] Bruno Demé,[d] Thomas Gutberlet[b] and Judith Peters*[cde]

Received 2nd July 2013,
Accepted 25th October 2013

DOI: 10.1039/c3cp52762j

www.rsc.org/pccp

The effects of high hydrostatic pressure on the structure and dynamics of model membrane systems were investigated using neutron scattering. Diffraction experiments show shifts of the pre- and main-phase transitions of multilamellar vesicles of 1,2-dimyristoyl-*sn-glycero*-3-phosphocholine (DMPC) to higher temperatures with increased pressure which are close to results observed previously by other techniques, namely (10.4 ± 1.0) K kbar^{-1} and (20.0 ± 0.5) K kbar^{-1} for the two transitions. Backscattering spectroscopy reveals that the mean square displacements in the liquid phase are about 10% smaller at 300 bar and about 20% smaller at 600 bar compared to atmospheric pressure, whereas in the gel phase below the main phase transition the mean square displacements show a smaller difference in the dynamics of the three pressure values within the studied pressure range.

1. Introduction

Life as we know it takes place on the surface of the earth, but about 75% of the biosphere lies at a depth of 1000 m sea level or even below. This corresponds to a pressure of 100 bar or more (1 bar = 0.1 MPa), hence life has to find strategies to adapt to these extreme conditions. It was found that membranes are particularly sensitive to pressure changes.[1] Lipids are essential components of cell membranes and undergo several transitions between different lamellar states. The commonly observed L_c lamellar crystalline phase is the most ordered one at low temperature, but will not be investigated in the experiments presented here. In the $L_{\beta'}$ phase, the 'gel' phase, the lipid chains are ordered in the all-*trans* configuration. The prime indicates that the alkyl chains are tilted with respect to the bilayer normal. The high degree of chain order leads to a quasi-crystalline order. The $P_{\beta'}$ phase or 'ripple' phase is formed prior to the main phase transition. It exhibits one dimensional ripples on the membrane surface. Close to the main phase transition, a co-existence as rafts of L_α domains in a $P_{\beta'}$ continuum and of $P_{\beta'}$ domains in a L_α continuum with increasing temperature was observed.[2] Finally the L_α phase, the liquid-disordered or fluid phase, corresponds to the physiological state in cells. Indeed, the higher flexibility in this phase permits the membranes to accomplish their biological function.

High hydrostatic pressure (HHP) increases not only the order of the lipid chains and therefore the temperatures of the phase transitions, but also the number of possible phases can be increased under specific conditions. One way to counteract the rigidifying effect of HHP to maintain membranes in the physiological state is the incorporation of lipids with unsaturated chains or of molecules that increase the membrane fluidity. In fact, the cells have the capacity to adapt the lipid composition of their membranes by a metabolic response. The kinked chain of unsaturated lipids decreases the chain ordering and thus lowers the transition temperature T_m[3] helping in this way the organisms to survive under HHP conditions. Higher concentrations of unsaturated lipids were indeed found in organisms from the deep sea.[4,5]

Membrane fluidity plays also a key role in the activity of membrane bound proteins. For instance, the activity of the multi-drug resistant transporters LmrA[6] and HorA[7] strongly depends on the phase behavior of the surrounding lipids. The gel phase, induced by HHP, leads to a drastic inhibition of the transporters and consequent cell death. HHP was also used in food processing and preservation. For instance, pressure of up to 6 kbar is used to inactivate microorganisms and enzymes while sensorial characteristics are preserved.[8]

Structural investigations using neutron diffraction in combination with high hydrostatic pressure have been performed quite a while ago for single component membranes,[5,9,10] also a

[a] *Angewandte Physikalische Chemie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg, Germany*
[b] *Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Lise-Meitner Campus, Hahn-Meitner-Platz 1, 14109 Berlin, Germany*
[c] *Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. E-mail: peters@ill.fr*
[d] *Institut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France*
[e] *University Joseph Fourier, UFR PhITEM, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France*
[f] *University of Wollongong, School of Chemistry, NSW 2522, Australia*
[g] *Centre for Medical Bioscience, Australian Institute of Nuclear Science and Engineering (AINSE), Menai, NSW, Australia*

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

variety of small angle studies of single and multicomponent membranes can be found in the literature.[11,12]

In contrast to structural investigations, incoherent neutron scattering studies focus on the dynamics of the system under investigation. Compared to structural information available, the knowledge of the dynamical behavior of biomolecules under HHP and especially membranes is still scarce.[13–15] This fact can be attributed to experimental challenges combining high pressure with spectroscopic neutron techniques, but also to the increased measuring times when comparing coherent with incoherent techniques.

To shed light on the potential of incoherent neutron scattering for such explorations, we have studied single component model membranes of 1,2-dimyristoyl-*sn-glycero*-3-phosphocholine (DMPC), a system which allows us to compare our findings with results obtained by other techniques such as differential scanning calorimetry (DSC) or molecular dynamics (MD) simulations.[16,17] Here we investigated first the phase behavior of DMPC as a function of pressure and temperature using neutron diffraction and small angle neutron scattering (SANS) measurements. Second, elastic incoherent neutron scattering was employed in order to study the dynamical response to pressure.

The neutron diffraction measurements confirmed results close to earlier measurements mentioned above.

In addition, we correlated the structural changes with atomic mean square displacements (MSDs) extracted from neutron backscattering experiments to study the influence of HHP on the molecular dynamics level. The MSDs revealed a reduction under HHP compared to ambient conditions and a sudden rise linked to the phase transitions.

2. Materials and methods

2.1 Sample preparation

Fully protonated DMPC powder was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and used as received. For the neutron experiments, lipid powder was hydrated in a desiccator from a pure D_2O atmosphere for at least two days at 40 °C.[18] In order to assure fully hydrated multilamellar vesicles (MLVs) and a homogeneous pressure transmission, D_2O was added after filling the pressure cell with the hydrated lipids. DSC measurements were performed before and after the neutron experiments (results not shown), in both cases the data showed the well-known phase diagram of DMPC.

2.2 High pressure cell

A cylindrical pressure cell made of a high-tensile aluminum alloy (7049-T6), a material which is mainly transparent for neutrons, was especially developed for neutron experiments. The cell consists of a cylinder with an inner diameter of 6 mm and an outer diameter of 10 mm, leading to a thickness of 4 mm and a maximum pressure capacity of 1.5 kbar. The sample volume was reduced using a cylindrical aluminum insert of 4 mm diameter. A detailed description of the pressure cells and the high pressure equipment can be found in Peters *et al.*[19] Technical test experiments were successful, and the present investigations with model membranes were part of this process.

2.3 Neutron scattering measurements

Diffraction measurements of DMPC were performed at the instrument D16 of the ILL.[20] The incident wavelength was set to 4.75 Å and small momentum transfers Q (between 0.05 and 0.15 $Å^{-1}$) were recorded to access typical repeat distances d (about 60 Å and more). The temperature was controlled using a cryofurnace. Temperature scans in the range from 280 to 320 K were recorded in steps of 1 K at three different pressure values, ambient pressure, 300 and 600 bar. The temperature domain covered thus the gel, the ripple and the fluid phases of the lipids. The sample was equilibrated for 10 minutes at each temperature prior to the 15 minutes data recording. With a second pressure cell it was possible to reach values up to 6 kbar. The corresponding diffraction data will be presented in a later publication.

The thermal backscattering spectrometer IN13 at ILL[21,22] was used to explore the dynamics of DMPC. Its instrumental elastic energy resolution of $\Delta E \approx 8$ μeV gives access to a pico- to nanosecond timescale for the molecular dynamics whereas the space window comprises a few Ångstrom. The time window allows us only to probe small local motions, but it has been shown experimentally[23] and by simulations[24,25] that for biological systems a hierarchy of motions exists. Thus movements at different time scales correlate and span over many orders of magnitude from bond vibrations on the femto-second scale up to large domain motions on the millisecond scale. Fixed energy window (FEW) scans were recorded in a temperature range from 285 to 318 K at the same three pressure values used on D16. After 15 minutes of equilibration, typical counting times were 6 h in the gel phase and 10 h in the liquid phase. For data correction also the empty high pressure cell, the cell filled with D_2O as well as the cell filled with a vanadium sheet were measured.

Data reduction was performed using the Large Array Manipulation Program (LAMP) available at the ILL.[26] Absorption, self-shielding and multiple scattering corrections were calculated for the dynamics measurements using a program developed by Petrillo *et al.*[27,28] The program described in the articles was originally written for the analysis of neutron diffraction data collected for a sample in a complex cell made of n concentric cylinders and later on modified for data collected in the same type of cell for the analysis of elastic and quasi-elastic scattering data. The latter version was used for our analysis.

Elastic incoherent neutron scattering data are analyzed through the scattering function $S(Q,0 \pm \Delta E)$. Assuming a normal distribution of the atoms around their average position it reduces in terms of the Gaussian approximation[29–31] to:

$$S(Q, 0 \pm \Delta E) \approx \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2\langle u^2\rangle\right). \quad (1)$$

Here $\langle u^2\rangle$ are the average atomic mean-square displacements (MSD). The MSD values are obtained for each temperature/pressure point from the slope of the logarithm of the scattered intensities $S(Q, 0 \pm \Delta E)$ plotted *versus* Q^2 according to

$$\langle u^2\rangle = -3\frac{\partial \ln S(Q, 0 \pm \Delta E)}{\partial Q^2}. \quad (2)$$

 This journal is © the Owner Societies 2013

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

This approximation is strictly speaking only valid for $Q \rightarrow 0$, but can be extended to $\langle u^2 \rangle Q^2 < 1$.[32] Accordingly, in this study the fit range was restricted to the linear range in the low Q regime between 0.55 Å^{-1} and 1.47 Å^{-1}.

Incoherent neutron scattering is largely dominated by hydrogen atoms, because their incoherent scattering cross section is much higher than the signal of any other type of atom present in biological samples.[33] The MSDs thus reflect the averaged atomic motion of hydrogen atoms, which are mostly homogeneously distributed in biological macromolecules and inform in a first approach over local atomic vibrations. They are associated with the sample flexibility[34] *via* the fluctuation–dissipation theorem.[35]

An effective mean force constant, representing the resilience of the system against temperature changes, can be calculated from the MSDs through

$$\langle k_{\mathrm{eff}} \rangle = 0.00138 \left(\frac{\mathrm{d}\langle u^2 \rangle}{\mathrm{d}T} \right)^{-1} \quad (3)$$

according to ref. 36. $\langle k_{\mathrm{eff}} \rangle$ is obtained in units of N m^{-1}, when the $\langle u^2 \rangle$ are in Å^2 and T is in Kelvin.

The accessible window in time and space depends on the instrumental resolution and the available Q-range, respectively. In the case of IN13 the observation time lies around 100 ps for a length scale between about 1 and 30 Å. Thus local motions are the aim of our investigation. Obviously, such motions within the lipid chains are particularly sensitive to pressure, as phase transitions correspond mainly to a rearrangement of the chains and are translated through a sudden increase of the MSDs.

3. Results

3.1 Neutron diffraction

After calibration the data were radially integrated. The repeat distance d was calculated according to Bragg's law

$$d = \frac{2\pi}{Q} \quad (4)$$

fitting a Gaussian curve to the first order Bragg peaks. At the pre-transition a sudden increase in d from 60 to about 70 Å was observed (Fig. 1). Corresponding values for the temperature of the pre-transition T_{p} can be found in Table 1.

The increased value of d in the $P_{\beta'}$ phase is caused by the formation of ripples in the plane of the bilayer.[38] The jump in d is slightly less pronounced with increasing pressure. Winter and Jeworrek[11] state that the compression of a bilayer would provoke a lateral shrinking and an increase in thickness. However, this is not reflected in the d-spacings measured on D16. A possible explanation can be a reduced inter-bilayer water thickness due to the elevated hydrostatic pressure.[39] This finding is also supported by hydration dependent results from quasi-elastic and elastic incoherent neutron scattering on DMPC,[40,41] where T_{m} is shifted as well to higher temperatures as the dynamics are hindered due to insufficient hydration. At temperatures higher than the pre-transition, the repeat distances decrease during melting at the $P_{\beta'}/L_{\alpha}$-transition,

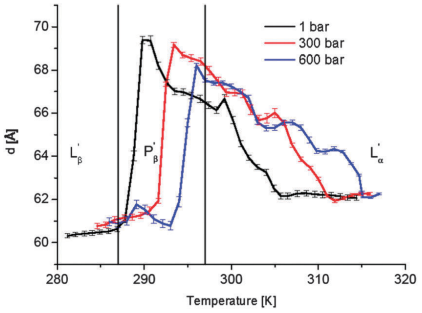


Fig. 1 Repeat distance d for DMPC MLVs as a function of temperature and pressure. Lines are guide to the eyes. The two vertical black lines indicate the literature values for the two phase transition temperatures at atmospheric pressure. As the neutron experiments were carried out in D_2O the transition temperatures are shifted to higher values compared to H_2O.[37]

Table 1 Temperatures of the pre- (T_{p}) and main (T_{m}) phase transition for pure DMPC. Also given the repeat distance closely above the pre-transition and well above the main phase transition. Note that d after the pre-transition decreases with pressure, whereas d in the L_{α} phase stays constant

Pressure (bar)	T_{p} (K)	d after pre-transition (Å)	T_{m} (K)	d in the L_{α} phase (Å)
1	290	69.4 ± 0.2	297	62.2 ± 0.1 (314 K)
300	293	69.2 ± 0.1	303	62.3 ± 0.1 (316 K)
600	296	68.2 ± 0.1	309	62.1 ± 0.1 (316 K)

and drops at the main phase transition, until a constant value for d is reached in the liquid phase. The values for d in the L_{α} phase at 315 K for the three different pressure values show a value around 62.2 Å. A typical value for the repeat distance of fully hydrated DMPC in the liquid phase at ambient pressure found *e.g.* with X-ray scattering lies around 62.6 Å.[42]

Fig. 2 shows values for T_{p} and T_{m} as a function of pressure. From linear fits to the data, values of $\mathrm{d}T_{\mathrm{p}}/\mathrm{d}p$ of (10.4 ± 1.0) K/1000 bar and $\mathrm{d}T_{\mathrm{m}}/\mathrm{d}p$ of (20.0 ± 0.5) K/1000 bar were obtained, which are close to values given in the literature and extracted through various experimental techniques.[10,12,43–46]

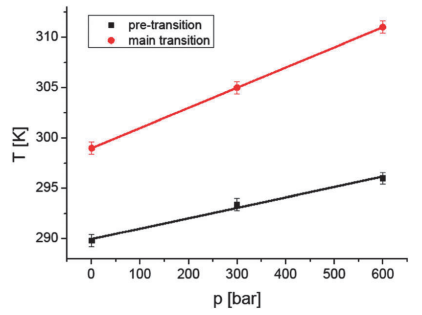


Fig. 2 p, T phase diagram of DMPC MLVs in excess of D_20.

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

3.2 Spectroscopy

3.2.1 Elastic neutron scattering. Fig. 3 represents the raw data of the elastic neutron intensities for DMPC summed over all accessible scattering angles (corresponding to a range of 0.29 $Å^{-1} < Q <$ 4.98 $Å^{-1}$). Data were corrected for multiple scattering and normalized to vanadium. In contrast to the MSDs, where the Gaussian approximation has to be fulfilled, the integrated intensities are not restricted to the Q-region below 1.47 $Å^{-1}$. The slopes of the summed intensities show no change around the transition from the gel to ripple phase, whereas a drastic decrease in intensity can be observed around the main phase transition. The drop in intensity at the main phase transition becomes less pronounced with increasing pressure, hence the molecular flexibility is reduced. This is also underlined by the increase of the elastic intensity with increasing pressure, showing that the atoms are more confined, moving less and thus scattering the neutrons more elastically.

3.2.2 Mean square displacements. Contrary to the summed elastic intensities the MSDs decrease with pressure. The results for DMPC MLVs including all corrections (absorption, self-shielding and multiple scattering) are shown in Fig. 4. Multiple scattering corrections showed a negligible effect compared to self-shielding and absorption. The same was found for elastic scans of membrane systems reported by Busch *et al.*[47]

Again no change in the slope of the MSDs is observed around the pre-transition. The main phase transition, where the $\langle u^2 \rangle$ show a sudden jump to higher values, is shifted to higher temperatures as pressure is raised. The jump in the dynamics is clearly correlated with the main phase temperature and both show the same evolution to higher temperatures under pressure. As the MSDs are associated with the sample flexibility, the transition stands for a measure of the fluctuations in this temperature region, as explained in more detail in a publication by M. Rheinstädter *et al.*[48] The absolute values of the MSDs are reduced in the liquid phase with increasing pressure indicating more confined motions under pressure.

Using time resolved fluorescence spectroscopy Bernsdorff *et al.* found an increase in fluorescence lifetime at the pressure induced

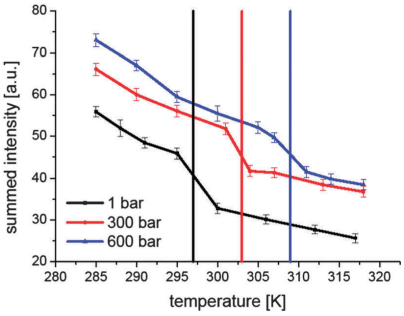


Fig. 3 Summed elastic intensities of DMPC on IN13. Data are summed over the complete Q-range available on IN13 (0.29 $Å^{-1} < Q <$ 4.98 $Å^{-1}$). Vertical lines indicate the temperature of the corresponding main phase transition in the color corresponding to the data points. Lines connecting the data points are guide to the eyes.

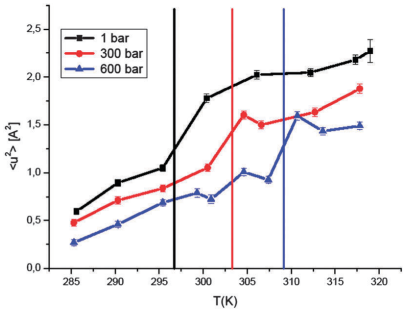


Fig. 4 Mean square displacements of DMPC calculated according to eqn (2). Vertical lines indicate the temperature of the main phase transition at the corresponding pressure and the corresponding color, respectively; lines connecting the data points are guide to the eyes.

Table 2 Effective force constants calculated for DMPC below and above the main phase transition temperature. The value of k_{eff} above T_m at 600 bar was obtained from a fit of only two points. Therefore, no error is given

Pressure (bar)	$\langle k_{eff} \rangle$ below T_m (N m^{-1})	$\langle k_{eff} \rangle$ above T_m (N m^{-1})
1	0.015 ± 0.002	0.025 ± 0.010
300	0.019 ± 0.003	0.021 ± 0.003
600	0.017 ± 0.002	0.051

phase transition of DPPC. This effect was interpreted as a greater headgroup hydration in the liquid-crystalline phase due to an increased disorder. Hence, pressure induces a dehydration of the headgroup which results in a reduced mobility of the lipids.[39]

Effective mean force constants were extracted according to eqn (3), which account for the resilience of the sample below and above the main phase transition (see Table 2). The values are extremely low compared to typical numbers for biological membranes, proteins or lipoproteins,[49–51] thus corresponding to a very high flexibility of the sample.

The force constants extracted from our elastic measurements are almost equal within error bars in the gel and the fluid phase ranging between 0.015 and 0.025 N m^{-1} indicating that the increase of the MSDs is linear and nearly equal in both regimes due to the rise of thermal energy in the system. Only around the main phase transition the dynamics is thus enhanced due to higher fluctuations. A very slight tendency to higher force constants at all pressure values in the fluid phase compared to the gel phase is noticed. We speculate that this reduction in the dynamics in the liquid phase even if it stays within the error bars of the experiment is due to a higher degree of order induced by the applied high pressure. The sample stability shows almost no pressure dependence in the pressure range investigated here.

4. Results

4.1 Neutron diffraction

The main phase transition as a function of pressure has been investigated over years by a number of independent techniques

 This journal is © the Owner Societies 2013

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

such as *e.g.* electron paramagnetic resonance,[43] dilatometry,[44,45] light transmittance[10,46] and SANS/SAXS.[11,12] All of these studies find values for dT_m/dp in the range of 20 K kbar^{-1} to 25 K kbar^{-1}, typical for melting phenomena of hydrocarbon chains[52] and only slightly depending on their exact chain length.[44] Krishna Prasad and coworkers[10] and Ichimori *et al.*[46] found slopes for the pre-transition of DMPC dT_p/dp ranging from 12 to 14 K kbar^{-1}. Thus our values obtained from linear fitting the data in Fig. 2 agree with the values found in the literature. The slightly smaller values extracted here may be due to the small number of data points in this study compared to other methods and to inertia of the lipids against temperature changes. The results obtained by neutron diffraction thus reproduce the values checked independently between many experimental techniques and characterize the sample for the neutron spectroscopy measurements.

4.2 Neutron spectroscopy

Summed elastic intensities of DMPC measured on IN13 are shown in Fig. 3. The pre-transition from the gel to ripple phase is neither visible in the integrated elastic intensities nor in the mean square displacements (*cf.* Fig. 3 and 4). This reflects the fact that the pre-transition does not have a detectable influence on the system fluctuations in the observed time and space window. In contrast, the main phase transition is clearly visible as a sudden drop of intensity (see Fig. 3) and a sudden increase of the MSDs (see Fig. 4) indicating an enhanced flexibility of the system in the liquid phase, which is, however, coupled to a higher stability as established by the increased force constant in that state.

The higher intensity with rising pressure observed in Fig. 3 may have two reasons: (1) the increased amount of scattering centers in the beam, due to the compression of the sample or (2) the motion of hydrogen atoms, which contribute with about 94% to the incoherent scattering from the lipids, enters the time window of the spectrometer under HHP. The first point was investigated by transmission measurements performed at 285 K for all three pressure values. Within experimental errors the obtained transmission values agreed for all pressures, thus the number of scattering centers in the neutron beam stays constant. The second point and according to Le Chatelier's principle, an increase in pressure provokes a decrease in volume and thus a damping of atomic motions.[53] Therefore, hydrogen atoms which do not contribute at atmospheric pressure to the elastic, but to the quasi-elastic signal enter the elastic space-time window of IN13 at elevated pressure, hence the elastic intensity increases. Moreover, this fact can be an explanation for the less pronounced drop of elastic intensity at the main phase transition with increasing pressure seen in Fig. 3. The applied pressure reduces the mobility of the hydrogen and therefore increases the elastic signal.

Similar trends can be observed for the mean square displacements shown in Fig. 4. Due to the densely packed lipid chains below the main phase transition the pressure effect on the dynamics in the gel and ripple phase is indeed minimal compared to the effect in the liquid phase, which can be seen from the fact that the MSDs just below the transition show similar values in contrast to values above T_m.

5. Conclusions

The current study investigated the influence of hydrostatic pressure on the structure and dynamics of the model membrane system DMPC. Neutron diffraction was used to address structural aspects, whereas neutron backscattering spectroscopy was employed to probe the dynamics in the pico- to nanosecond time range. Both methods proved the potential of neutron scattering approaches to study temperature and HHP effects on biomolecules. In agreement with previous studies the diffraction data showed a shift of the main phase transition of (20.0 ± 0.5) K/1000 bar and of the pre-transition of (10.4 ± 1.0) K/1000 bar. The external hydrostatic pressure shows a similar effect as reduced hydration on membranes,[40,41] both limiting the possible motions of the lipids.

Neutron spectroscopy showed that the atomic mean square displacements under HHP are about 10–20% smaller than at atmospheric pressure. The results serve as a benchmark for future experiments and simulations addressing in particular pressure effects on natural membranes and membrane–protein complexes and may clarify the role the membrane matrix plays *e.g.* in combination with protein deactivation upon applying pressure. Looking at other techniques, such as NMR,[54–59] where high pressure techniques became accessible earlier, a wide field of applications in protein[60] and membrane biophysics can be addressed in the future.

Acknowledgements

We acknowledge the ILL for the allocation of beam time in the framework of a long term proposal. M. Trapp was supported by a PhD scholarship from the French Ministry for Research and Technology. M. Tehei acknowledges the financial support from the Access to Major Research Facilities Program which is a component of the International Science Linkages Program established under the Australian Government's innovation statement, Backing Australia's Ability. We thank P. Masson for his careful reading of the manuscript and his precious advices. We are grateful to the SANE group of the ILL and particularly to J.-L. Laborier and C. Payre for building the pressure cell and for their technical support with the high pressure equipment.

Notes and references

1 G. N. Somero, *Annu. Rev. Physiol.*, 1992, **54**, 557–577.
2 C. L. Armstrong, M. A. Barrett, L. Toppozini, N. Kucerka, Z. Yamani, J. Katsaras, G. Fragneto and M. C. Rheinstädter, *Soft Matter*, 2012, **8**, 4687–4694.
3 D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 2002, **1595**, 367–381.
4 A. R. Cossins and A. G. Macdonald, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1986, **860**, 325–335.
5 P. T. T. Wong, D. J. Siminovitch and H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1988, **947**, 139–171.

Published on 28 October 2013. Downloaded by Brown University on 27/10/2014 12:11:37.

6 H. Teichert, N. Periasamy, R. Winter and R. F. Vogel, *High Pressure Res.*, 2009, **29**, 344–357.
7 H. M. Ulmer, H. Herberhold, S. Fahsel, M. G. Ganzle, R. Winter and R. F. Vogel, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 1088–1095.
8 M. L. M. Lopes, V. L. Valente Mesquita, A. C. N. Chiaradia, A. A. R. Fernandes and P. M. B. Fernandes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, **1189**, 6–15.
9 L. F. Braganza and D. L. Worcester, *Biochemistry*, 1986, **25**, 2591–2596.
10 S. Krishna Prasad, R. Shashidhar, B. P. Gaber and S. C. Chandrasekhar, *Chem. Phys. Lipids*, 1987, **43**, 227–235.
11 R. Winter and C. Jeworrek, *Soft Matter*, 2009, **5**, 3157–3173.
12 R. Winter and W.-C. Pilgrim, *Ber. Bunsen-Ges.*, 1989, **93**, 708–717.
13 A. Filabozzi, A. Deriu, M. T. Di Bari, D. Russo, S. Croci and A. Di Venere, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2010, **1804**, 63–67.
14 M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, A. Paciaroni, L. R. S. Barbosa, H. Amenitsch, M. Steinhart, J. Ollivier and D. Russo, *J. R. Soc., Interface*, 2009, **6**, S619–S634.
15 W. Doster and R. Gebhardt, *Chem. Phys.*, 2003, **292**, 383–387.
16 M. J. Janiak, D. M. Small and G. G. Shipley, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 6068–6078.
17 B. Griepernau and R. A. Böckmann, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 5766–5778.
18 S. Busch, C. Smuda, L. C. Pardo and T. Unruh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3232–3233.
19 J. Peters, M. Trapp, D. Hughes, S. Rowe, B. Demé, J.-L. Laborier, C. Payre, J.-P. Gonzales, S. Baudoin, N. Belkhier and E. Lelievre-Berna, *High Pressure Res.*, 2011, **32**, 97–102.
20 http://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/d16/.
21 http://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/in13/description/instrument-layout/.
22 F. Natali, J. Peters, D. Russo, S. Barbieri, C. Chiapponi, A. Cupane, A. Deriu, M. T. Di Bari, E. Farhi, Y. Gerelli, P. Mariani, A. Paciaroni, C. Rivasseau, G. Schirò and F. Sonvico, *Neutron News*, 2008, **19**, 14–18.
23 K. Henzler-Wildman and D. Kern, *Nature*, 2007, **450**, 964–972.
24 G. R. Kneller and K. Hinsen, *J. Chem. Phys.*, 2004, **121**, 10278–10283.
25 G. R. Kneller, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 2641–2655.
26 http://www.ill.eu/data_treat/lamp/the-lamp-book/.
27 C. Petrillo and F. Sacchetti, *Acta Crystallogr., Sect. A: Fundam. Crystallogr.*, 1990, **46**, 440–449.
28 C. Petrillo and F. Sacchetti, *Acta Crystallogr., Sect. A: Fundam. Crystallogr.*, 1992, **48**, 508–515.
29 A. Guinier and G. Fournier, *Small-angle scattering of X-rays*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 1955.
30 A. Rahman, K. S. Singwi and A. Sjölander, *Phys. Rev.*, 1962, **126**, 986–996.
31 F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik and G. Zaccai, *Q. Rev. Biophys.*, 2003, **35**, 327–367.
32 V. Réat, G. Zaccai, C. Ferrand and C. Pfister, *Functional Dynamics in Purple Membranes*, 1997.
33 V. F. Sears, *Neutron News*, 1992, **3**, 26–37.
34 G. Zaccai, *J. Non-Cryst. Solids*, 2011, **357**, 615–621.
35 H. B. Callen and T. A. Welton, *Phys. Rev.*, 1951, **83**, 34–40.
36 G. Zaccai, *Science*, 2000, **288**, 1604–1607.
37 G. Lipka, B. Z. Chowdhry and J. M. Sturtevant, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 5401–5406.
38 J. Eisenblätter and R. Winter, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 956–966.
39 C. Bernsdorff, A. Wolf, R. Winter and E. Gratton, *Biophys. J.*, 1997, **72**, 1264–1277.
40 M. Trapp, F. Juranyi, M. Tehei, L. van Eijck, B. Demé, T. Gutberlet and J. Peters, *Spectroscopy*, 2010, **24**, 461–466.
41 M. Trapp, T. Gutberlet, F. Juranyi, T. Unruh, B. Demé, M. Tehei and J. Peters, *J. Chem. Phys.*, 2010, **133**, 164505–164507.
42 N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle and J. F. Nagle, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 2626–2637.
43 J. R. Trudell, D. G. Payan, J. H. Chin and E. N. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, 210–213.
44 J. F. Nagle and D. A. Wilkinson, *Biophys. J.*, 1978, **23**, 159–175.
45 A. G. Macdonald, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1978, **507**, 26–37.
46 H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1998, **1414**, 165–174.
47 S. Busch and T. Unruh, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2011, **23**, 254205.
48 M. C. Rheinstädter, T. Seydel, F. Demmel and T. Salditt, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2005, **71**, 061908.
49 G. Nagy, J. Pieper, S. Krumova, L. Kovacs, M. Trapp, G. Garab and J. Peters, *Photosynth. Res.*, 2012, **111**, 113–124.
50 K. Wood, U. Lehnert, B. Kessler, G. Zaccai and D. Oesterhelt, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 194–202.
51 C. Mikl, J. Peters, M. Trapp, K. Kornmueller, W. J. Schneider and R. Prassl, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 13213–13215.
52 A. Würflinger and G. M. Schneider, *Ber. Bunsen-Ges.*, 1973, **77**, 121–128.
53 L. Meinhold, J. C. Smith, A. Kitao and A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 17261–17265.
54 X. Peng and J. Jonas, *Biochemistry*, 1992, **31**, 6383–6390.
55 X. Peng, A. Jonas and J. Jonas, *Biophys. J.*, 1995, **68**, 1137–1144.
56 B.-S. Lee, S. A. Mabry, A. Jonas and J. Jonas, *Chem. Phys. Lipids*, 1995, **78**, 103–117.
57 J. Jonas, C. L. Xie, A. Jonas, P. J. Grandinetti, D. Campbell and D. Driscoll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**, 4115–4117.
58 J. Jonas and A. Jonas, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1994, **23**, 287–318.
59 J. Eisenblätter, A. Zenerino and R. Winter, *Magn. Reson. Chem.*, 2000, **38**, 662–667.
60 J. Roche, J. Ying, A. S. Maltsev and A. Bax, *ChemBioChem*, 2013, **14**, 1754–1761.

 This journal is © the Owner Societies 2013

THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B

Article

pubs.acs.org/JPCB

Influence of Pressure and Crowding on the Sub-Nanosecond Dynamics of Globular Proteins

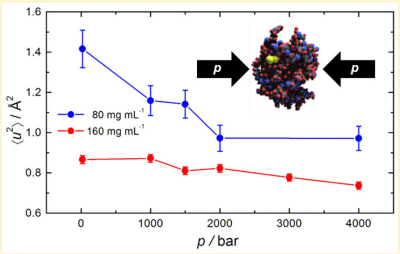
M. Erlkamp,[†] J. Marion,[‡,§] N. Martinez,[‡,§] C. Czeslik,[†] J. Peters,[‡,§] and R. Winter*[,†]

[†]Physical Chemistry I – Biophysical Chemistry, Department of Chemistry and Chemical Biology, TU Dortmund University, Otto-Hahn-Str. 6, 44227 Dortmund, Germany

[‡]Université Grenoble Alpes, IBS, 71 avenue des Martyrs, CS 10090, 38044 Grenoble, France

[§]Institut Laue-Langevin, 71 avenue des Martyrs, CS 20156, 38042 CEDEX 9 Grenoble, France

ABSTRACT: The influence of high hydrostatic pressure on the internal sub-nanosecond dynamics of highly concentrated lysozyme in aqueous solutions was studied by elastic incoherent neutron scattering (EINS) up to pressures of 4 kbar. We have found, with increasing pressure, a reduction in the dynamics of H atoms of folded lysozyme, suggesting a loss in protein mobility that follows a change in the local energy landscape upon the increase in packing density. Moreover, the amplitude of the protein fluctuations depends drastically on the protein concentration, and protein structural and interaction parameters as well as the dynamical properties are affected by pressure in a nonlinear way. A significant reduction of the mean squared displacement of H atoms occurs already at rather low pressures of a few hundred bars for lysozyme in bulk water solution. This trend is lifted at ~2 kbar, which is probably due to a solvent-mediated effect. Conversely, for high protein concentrations (e.g., 160 mg mL^{-1}), that is, under strong self-crowding conditions, as they are also encountered in the biological cell, strong restriction of the dynamics of protein motions takes place, reducing the mean squared displacement of H atoms by 60% and rendering its pressure dependence almost negligible. These results are also important for understanding the pressure stability of highly concentrated protein solutions in organisms thriving under hydrostatic pressure conditions such as in the deep sea, where pressures up to the kbar level are reached.



INTRODUCTION

Owing to their intrinsically low thermodynamic stability against unfolding (generally with free energy changes ΔG° < 20–40 kJ mol^{-1}), proteins are sensitive to small variations in their environmental conditions, such as temperature, pressure, hydration, pH, ionic strength, and the presence of cosolutes.[1] Whereas the effect of temperature on proteins is rather well documented, that of pressure is comparatively less studied.[2−10] A thorough understanding of the stability of proteins requires the study of both, temperature and pressure effects, however. Moreover, in the present view of proteins as dynamic objects, which encompasses internal motions to fulfill their specific functions, it became also clear that it is crucial to study the effect of pressure on protein dynamics as well.[11,12] Such studies, both theoretical and experimental, are still scarce.[13−18] What is known so far, is that high hydrostatic pressure (HHP) reduces atomic fluctuations of proteins and slows down their diffusive and relaxational motions in the kbar range.[13,14] Here we discuss pressure conditions, where the proteins are still in their natively folded state. Most globular proteins unfold at pressures above about 4–6 kbar.[2−10]

From a thermodynamic point of view, the extensive conjugate variable related to pressure is the volume, and changing the pressure exerted on a system permits a fine-tuned exploration of its energy landscape through small volume changes. Moreover, fluctuations in volume have been shown to inevitably influence the molecular length scale and lead to variations in both the topology and the dissipation characteristics.[14] For amino acid residues of globular proteins, these fluctuations occur on the sub-nanosecond time scale. Therefore, pressure-induced variations in the protein energy landscape may be important for substate alterations and hence of functional relevance.[14] Moreover, investigating pressure effects is also of relevance for understanding the behavior of biological matter under extreme environmental conditions, such as in the deep sea where pressures up to the kbar level (1 kbar = 100 MPa) and beyond are encountered.[19,20]

From a cell biology point of view, there is an increasing interest in studies of the behavior of proteins in highly crowded solutions to mimic intracellular environments.[21−24] A distinctive property of the biological cell is that its chemical processes proceed in a medium, whose volume is occupied by proteins and other biopolymers to an extent of about 20–30%. Such

Received: January 31, 2015
Revised: March 11, 2015

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

conditions are able to cause significant alterations of the conformational stability and biological activity of proteins. Knowledge of protein−protein interactions in condensed fluid phases is also crucial for understanding processes like protein crystallization, aggregation, and fibrillation.[25−33] Owing to the importance of such crowding studies, we set out to explore the effect of self-crowding, that is, high protein concentrations, on the sub-nanosecond dynamics of the protein lysozyme upon compression up to pressures of 4 kbar.

Using small-angle X-ray scattering (SAXS) in combination with liquid-state theoretical approaches, we have already studied the structural properties of lysozyme and its intermolecular interactions at high concentration and high hydrostatic pressure.[25−28] From the SAXS intensities as a function of the momentum transfer Q, $I(Q)$, the attractive part of the interaction potential, J, could be derived by fitting a modified DLVO (Derjaguin−Landau−Verwey−Overbeek) model in the mean spherical approximation (MSA) to the structure factor data.[25] The appearance of a correlation peak, at momentum transfer Q_{corr}, which originates from repulsive protein−protein interaction of the highly positively charged (protein charge Z = 8) lysozyme molecules, is clearly visible around 0.7 nm^{-1}. Remarkably, as depicted in the inset of Figure 1, a more or less shallow maximum of $Q_{corr}(p)$ as a function of

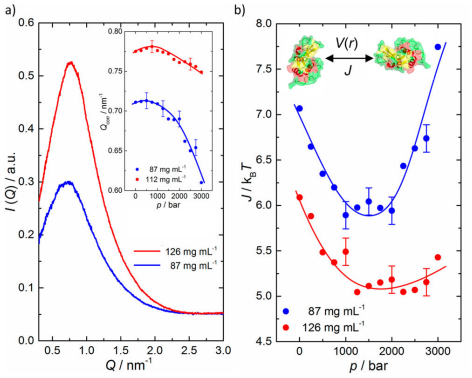


Figure 1. (a) Representative SAXS curves, $I(Q)$, of lysozyme solutions at two different concentrations at ambient temperature (Q is the momentum transfer). The inset shows the pressure dependent shift of position of the correlation peak, Q_{corr} (at T = 293 K). (b) Depth of the attractive well, J, of the interaction potential $V(r)$ of the two lysozyme solutions as a function of pressure at different protein concentrations obtained by fitting the experimental data to the DLVO-potential within the MSA approximation (modified from Grobelny et al.[29]). The lines are shown to guide the eye.

pressure, p, is observed. A strong decrease of Q_{corr} at high pressures is observed for concentrations below 100 mg mL^{-1}, only. It has been suggested that the maximum and unexpected subsequent decrease of Q_{corr} as well as the corresponding minimum in $J(p)$ (Figure 1b) must be related to solvent-mediated changes in intermolecular correlations and/or some kind of (dynamic) clustering of the protein molecules, which has in fact been discussed for concentrated lysozyme solutions.[34−38]

In contrast, information about the dynamics under such self-crowding conditions, in particular also at high pressure conditions, is still lacking. On short time scales (<1 ns), this flexibility has often been characterized by the thermal fluctuations of atomic positions as determined using simulation and scattering techniques.[12−18,39−44] These fluctuations are partly conformational, i.e., involving transitions between energy wells, and partly "elastic", that is, the dynamics is confined within single energy wells. In this study, we used elastic incoherent neutron scattering (EINS) to quantify the sub-nanosecond dynamics of lysozyme at medium to high protein concentrations. Incoherent neutron scattering at proteins probes primarily averaged single-particle dynamic motions of hydrogen atoms on length scales of the order of Angstroems and time scales ranging from ps to ns, as hydrogen has an incoherent neutron scattering cross section much larger than other atoms. In a model-independent approach, the analysis yields values of the mean squared displacement (MSD) of atomic motions, $\langle u^2 \rangle$, reflecting a variety of hydrogen atomic motions (vibrations, rotations, diffusive motions) in lysozyme on a time scale faster than about 1 ns (which is defined by the energy resolution of the instrument). Combining neutron scattering of lysozyme with molecular dynamics simulations it has recently been shown that protein atoms in the 10 ps to 1 ns time range undergo confined motion decomposable into three distinct classes: localized diffusion, methyl group rotations (3-fold rotational jumps), and jumps excluding methyl group rotations.[37]

The method employed here has already been shown to reveal interesting temperature dependent results. One of the dynamical phenomena observed is the so-called "dynamical transition", which has been observed in hydrated proteins as a rise of the measured MSD at a temperature around 220 K.[40,41,45] At low temperatures, the MSD follows the typical trend of low-frequency vibrational motions. Following an enhancement of motion amplitudes at 125 K attributed to the (hydration independent) rotational motion of methyl groups, the dynamical transition is registered at a temperature of $T \approx$ 220 K, which is associated with the onset of new higher-amplitude motions (in particular of hydrophilic groups in which the hydration water plays a determining role). It was shown that hydration (hydration levels $h = m_{water}/m_{protein}$ larger than about 0.4) and temperature were both necessary to allow such "high amplitude nonharmonic movements" in the sample,[46] which are correlated with the activity of the protein. Moreover, it was concluded that internal motions are different in hydrated powders and in solution, suggesting that internal protein motions are sensitive to the surrounding water, beyond the hydration shell.[43,47] It has also been shown that Hofmeister salts, via setting the hydrophobic/hydrophilic properties of the protein−water interface, control conformational fluctuations even in the interior of the typical membrane transport protein bacteriorhodopsin.[48]

In this study, we used the IN13 backscattering spectrometer at the Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble, France) to measure by elastic incoherent neutron scattering the atomic MSD, $\langle u^2 \rangle$, at two largely different lysozyme concentrations (80 and 160 mg mL^{-1}), including strong self-crowding conditions, as a function of pressure up to 4 kbar (400 MPa).

MATERIALS AND METHODS

Hen egg white lysozyme was purchased from Alpha Aesar and used without further purification. Lysozyme was dissolved in

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

D_2O (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany), and the pD value was adjusted to 7.4 ± 0.1 by adding DCl (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) solution to the sample. The pD value of each sample was determined with a conventional pH-electrode by adding 0.4 to the pH-meter reading.[49] The initial protein concentration was 80 mg mL^{-1}. The higher concentrated protein solution was prepared in a dialysis bag (Pur-A-Lyzer, MWCO = 3.5 kDa, Sigma-Aldrich) applying osmotic pressure over 17.5 h at room temperature under constant stirring. This is a mild method to prepare also highly supersaturated metastable protein solutions.[50] Polyethylene glycol (PEG, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) with a molar mass of 35 kDa was used as main component of the dialysis buffer, which was adjusted to pD 7.4. As buffer solution, BisTris (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) at a concentration of 50 mM was used, which is a pressure stable buffer over a wide pressure range.[51] This relatively high buffer concentration was needed to keep the pD value constant at the high protein concentrations used. The protein concentrations were determined by UV−Vis spectroscopy using an extinction coefficient of 2.64 mL mg^{-1} cm^{-1}.[52]

The EINS experiment was carried out at the backscattering spectrometer IN13[53] at the ILL, Grenoble, with high hydrostatic pressure (HHP) equipment developed by the instrument scientists in collaboration with the Services for Advanced Neutron Environment (SANE) group. The HHP devices are specifically conceived for neutron scattering studies of samples in solution and comprise a pressure controller, a sample stick and the cell.[54] The cylindrical cell was built of an aluminum alloy of high tensile strength (7075-T6), it is 9 mm thick and can withstand pressure loads up to 7 kbar. To reduce the sample volume and thus absorption and multiple scattering effects, a small cylindrical aluminum insert was introduced into the cell together with the sample. The cell volume (about 1 mL) was finally filled up with the buffer (D_2O + 50 mM BisTris) to homogeneously transmit the pressure. By using D_2O as the solvent EINS is dominated by the protein dynamics. The HHP is transmitted using the oily liquid Fluorinert[55] that was tested to be completely inert and which is separated from the sample by a piston. All measurements were carried out at room temperature. To obtain a reasonable signal-to-noise ratio in spite of the cell thickness and the rather high neutron absorbance, each pressure point was measured for 12 h at the lower protein concentration and for 8 h at the higher concentration. The data were saved every hour, thereby permitting to check that the samples did not change with time. Pressure was controlled and constantly adjusted by a pump with an accuracy of about 30 bar.

The thermal backscattering spectrometer IN13[53] provides access to high momentum transfers ($0.2 < Q < 4.9$ $Å^{-1}$) with an almost Q-independent energy resolution of 8 μeV (fwhm), due to an incident wavelength of $\lambda = 2.23$ Å. Thus, IN13 spans the space and time windows of 1−6 Å and 0.1 ns allowing to probe local molecular motions. To obtain the intensities scattered by the sample only for the EINS experiments, the scattering from the empty sample holder and the buffer was subtracted. To this end, we evaluated that the lower concentrated sample contained 0.0578 mL of lysozyme per milliliter of solution and the higher concentrated sample contained 0.1105 mL of lysozyme per milliliter, and subtracted only the buffer present in each sample. The data were then normalized to the totally incoherent scatterer vanadium. The complete data reduction for EINS was carried out using the LAMP software available at ILL.[56]

RESULTS AND DISCUSSION

To extract the atomic mean squared displacements, $\langle u^2 \rangle$, as a function of pressure, we use the Gaussian approximation for the scattered neutron intensity, $I(Q)$, as a function of momentum and energy transfer[57]

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx I_0 \, e^{-Q^2\langle u^2\rangle/3} \quad (1)$$

in the Q-range 0.5−2.3 $Å^{-1}$ (momentum transfer $Q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$, where λ is the wavelength of the neutrons and 2θ is the scattering angle), where ΔE designates the instrumental energy resolution. For $Q \to 0$, the Gaussian approximation is strictly valid, and it holds up to $\langle u^2 \rangle Q^2 \approx 1$. Here, the condition was exceeded, but the data points still show a rather linear Q-dependence (see Figure 2) and we verified that smaller Q-ranges gave very similar results (with larger error bars), thus the approximation was justified.[58] High pressure data are generally more noisy than data extracted from temperature scans in conventional sample environments due to absorption and background scattering of the pressure cell.

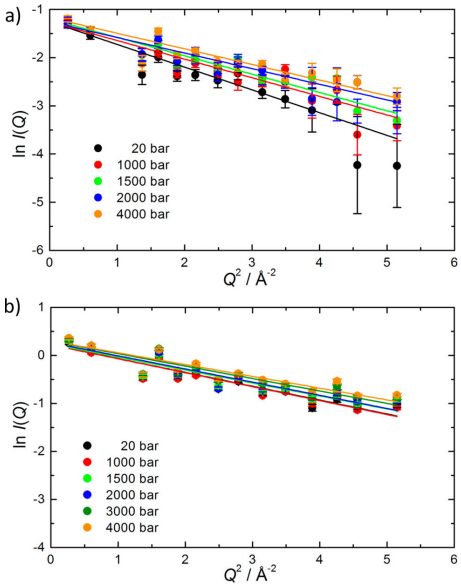


Figure 2. Semilogarithmic plot of the incoherent neutron scattering intensities, $I(Q)$, as a function of Q^2 for the 80 mg mL^{-1} (a) and the 160 mg mL^{-1} (b) lysozyme sample. Solid lines are fits according to eq 1.

The MSD can be obtained for each pressure from the slope of the semilogarithmic plot. Figure 3a and b shows the EINS intensities (eq 1) summed over the same Q-range as used for the Gaussian approximation and the MSD analysis of the two samples, respectively. The summed intensities depend on the mass of the sample in the beam and are therefore much higher for the higher concentrated sample. On the contrary, the MSD depends only on the slope of the logarithmic intensities *vs* Q^2.

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

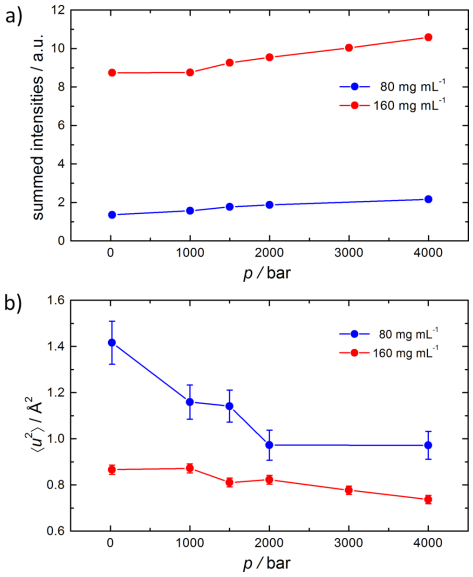


Figure 3. Summed EINS intensities (a) and mean squared displacements, $\langle u^2 \rangle$ (b) of 80 and 160 mg mL^{-1} lysozyme samples as a function of pressure at room temperature, evaluated in the Q-range of 0.5−2.3 Å^{-1}.

For both samples, the summed EINS intensities increase with pressure, reflecting the expected volume reduction upon compression via a decrease of motional amplitudes. Remarkably, the magnitude and the pressure dependence of the MSD are very different for the two protein concentrations. Overall, the flexibility of the sample at 160 mg mL^{-1} is much less sensitive to pressure; the MSD decreases from 0.87 to 0.74 Å^2 over a pressure range of 4 kbar ($\sim -3 \times 10^{-2}$ Å^2 kbar^{-1}), only. Conversely, the MSD of lysozyme in the lower concentrated solution exhibits a MSD of the H atoms at ambient pressure of ∼1.4 Å^2, that is, owing to the self-crowding effect, and decreases by ∼60% up to 2 kbar. Under such solution conditions, the volume fraction of lysozyme has increased from 6 to 11% (v/v), which translates into mean interatomic distances of about 5 nm. Using a hydrodynamic radius of R_h = 1.95 nm for the lysozyme molecule, this corresponds to a thickness of about five water layers between neighboring protein molecules. Under such concentrated solution conditions, bulklike properties of the solvent are probably largely absent. In the lower concentrated protein solution, the MSD decreases drastically with increasing pressure up to about 2 kbar (at a rate of $\sim -2 \times 10^{-1}$ Å^2 kbar^{-1}). At higher pressures, the MSD does not change significantly anymore.

Assuming that this decrease in H atom mobility with increasing pressure is related to the reduction in accessible volume, i.e., $\langle u^2 \rangle(p) = (V/V_0)^{2/3}$, with V_0 being the intrinsic volume of the protein at ambient pressure, and using the relations $\beta = -(\partial \ln V/\partial p)_T$ and $\mu = \partial \beta^{-1}/\partial p$, where β is the isothermal compressibility of the protein and μ is the Moelwyn-Hughes nonlinearity index, the following equation can be derived

$$\langle u^2 \rangle(p) = C_1(\mu p + C_2)^{-2/(3\mu)} \quad (2)$$

where C_1 and C_2 are integration constants.[14,59] Fits of the $\langle u^2 \rangle(p)$ data yield μ-values of about 0.4 and 4 for the low and highly concentrated lysozyme solutions, respectively (an ideal harmonic system would correspond to μ = 1, a pressure independent compressibility to μ = 0). These results indicate that the intrinsic compressibility as obtained from the MSD data of lysozyme in bulk solution is not only strongly pressure dependent, but also markedly affected by the intermolecular interactions present under strong crowding conditions.

We will now discuss the dynamic behavior in connection with the corresponding structural properties and intermolecular interaction potential of the lysozyme molecules under the two different solution conditions as briefly mentioned above (Figure 1 in the Introduction). By measuring the scattering pattern at both highly concentrated and highly diluted lysozyme solutions, the structure factor $S(Q)$ could be determined from SAXS intensities, $I(Q)$, and the interaction potential, $V(r)$, was derived by fitting a modified DLVO model in the MSA approximation to the structure factor data.[25] Figure 1b shows the depth of the attractive part of the interaction potential, J, from fits to the experimental data as a function of pressure. As displayed in Figure 1b for the two protein concentrations, J decreases, as expected, with increasing protein concentration, resulting from increasing repulsive interactions. At a pressure of about 1.5−2 kbar, J increases again. As changes in the response of proteins to a pressure increase may also be related to changes in the properties of water, we had concluded that this nonlinear behavior and minimum in $J(p)$ might arise from the evolving collapse of the second hydration shell of water and the penetration of non-hydrogen bonded water molecules into the first hydration shell upon pressurization, that is, due to changes in the medium-range structure of bulk water that starts to rearrange in this pressure range, which is also accompanied by changes in the transport properties of water.[60−63] At high protein concentrations, the minimum in $J(p)$ becomes much shallower, and finally vanishes approaching protein concentrations of 200 mg mL^{-1}, indicating the pressure-induced change in the water structure being less effective in such highly concentrated protein solutions and/or a significant change in interaction forces (e.g., emergence of hydration repulsion, many-body effects) at these short distances.

Such nonlinearity in the interaction potential of lysozyme at medium to high concentrations is also reflected in the dynamic properties of the protein. Compression of the positively charged lysozyme molecules leads to an increase in repulsive interactions and a corresponding decrease of the MSD, that is, a decrease of the intrinsic dynamics of the system. A trend reversal is observed around 2 kbar, in the intermolecular structure factor and interactions as well as in the dynamical properties. Such behavior might be attributed to changes in the hydrogen-bond network structure of bulk water which starts to change markedly in this pressure range.

We may compare these results with literature data availabe for lower concentrated protein solutions only.[13−17] Inelastic neutron scattering experiments on lysozyme solutions revealed a nonlinear influence of pressure on the vibrational density of states.[17] An analogous dynamical change has been observed for water and stems from the distortion of its tetrahedral structure under pressure. These findings are also in line with the pressure-induced increase of the effective force constant of lysozyme in aqueous solution determined by Meinhold and

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

colleagues, and the decrease of the number of low-frequency modes of crystalline SNase upon compression.[13,14] Results by Calandrini and co-workers, based on MD simulations and quasielastic neutron scattering, on lysozyme revealed that pressure up to 3 kbar reduces the amplitude of motions by about 20%,[15,16] and Ortore et al. found a marked decrease of the MSD at pressures of a few hundred bar as well.[18]

Conversely, in the highly concentrated protein solution, intermolecular interactions have become rather pressure insensitive and dynamical properties drastically damped. Interestingly, at high lysozyme concentrations, thermodynamic properties of the protein solution have been found to change significantly as well. For example, in 10 and 20 wt % lysozyme solutions, the coefficient of thermal expansion and its temperature dependence decrease drastically, which is thought to result from increasing intermolecular interactions and accompanying changes of the hydration shell at these high protein concentrations.[64,65] Hence, these data suggest a correlation between pressure effects on the structure of water and the internal H atom mobility of the protein. In fact, Hong et al. have shown that the effect of surface hydration increases the volume of the localized single-well diffusion and that the diffusive motions are coupled in such a way that the hydration effect is able to propagate from the protein surface into the dry core.[43] Finally, we may even speculate that fast dynamics modes are of less importance to the function of proteins since they are damped under crowding conditions similar to those found in live cells. These findings may hence also be of interest for interpreting retardation effects of enzymatic reactions in crowded environments.[66]

Please note that there is no direct correlation between the MSD of the H atoms determined here and the apparent or partial molar volume of the protein as measurable by densitometry. The apparent volume of the solute molecule in solution can be divided into the intrinsic volume and the contribution of the surrounding solvent. The former can be dissected into the van der Waals volume of the molecule and the internal and interfacial void volume.[67,68] As the fast water dynamics in the hydration shell can be hardly seen in the IN13 time window, we can at least state that the MSD is proportional to the intrinsic volume of the solute.

To conclude, we have found a reduction in H atom sub-nanosecond dynamics of folded lysozyme with increasing pressure, suggesting a loss in protein internal mobility that follows a corresponding change in the local energy landscape as the packing density increases. Moreover, the amplitude of these fluctuations depends drastically on the protein concentration, and protein structural and interaction parameters as well as the dynamical properties of the protein are affected by pressure in a nonlinear way. A significant reduction of the mean squared displacement of H atoms occurs already at rather low pressures of a few hundred bars for lysozyme in bulk water solution.[13,14] This trend is lifted at ∼2 kbar, which is probably due to significant changes in the structural properties of bulk water, that is, due to a solvent-mediated effect. In this pressure regime, protein−protein interactions are modified as well. Conversely, for very high protein concentrations (e.g., at 160 mg mL^{-1}), the interaction potential turns rather insensitive to compression. This might not be too surprising, as in this concentration range intermolecular distances have decreased to a few water layers, only. For such thin hydration layers, whose structural properties are largely influenced by the surface properties of the protein molecule (e.g., by electrostriction effects upon hydration of charged and polar surface groups), no bulk-like solvent properties may be expected anymore. As clearly evidenced by the drastic decrease of the MSD, such tight crowding conditions, which are also prevailing in the biological cell, strongly restrict the sub-nanosecond dynamics of protein motions, reducing the mean squared displacement of H atoms by 60% and rendering its pressure dependence almost negligible. In other words, the protein dynamics seems to be slaved to the solvent fluctuations and its pressure dependence. These findings are thus also of importance for understanding the high stability of concentrated protein solutions (as they occur intracellularly) in organisms thriving under hydrostatic pressure conditions such as in the deep sea, where pressures up to the kbar level and beyond are encountered.[69]

AUTHOR INFORMATION

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the DFG (FOR 1979 and the Cluster of Excellence RESOLV (EXC 1069)) are gratefully acknowledged. We thank the ILL for allocation of beam time for the LTP 8-4 project.

REFERENCES

(1) Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*; W. H. Freeman: New York, 1999.

(2) Weber, G.; Drickamer, H. G. The Effect of High Pressure upon Proteins and Other Biomolecules. *Q. Rev. Biophys.* **1983**, *16*, 89−112.

(3) Royer, C. A. Revisiting Volume Changes in Pressure-Induced Protein Unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 201−209.

(4) Winter, R.; Lopes, D.; Grudzielanek, S.; Vogtt, K. Towards an Understanding of the Temperature/Pressure Configurational and Free-Energy Landscape of Biomolecules. *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41−97.

(5) Meersman, F.; Smeller, L.; Heremans, K. Protein Stability and Dynamics in the Pressure−Temperature Plane. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 346−354.

(6) Akasaka, K. Probing Conformational Fluctuation of Proteins by Pressure Perturbation. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1814−1835.

(7) Silva, J. L.; Oliveira, A. C.; Vieira, T. C. R. G.; de Oliveira, G. A. P.; Suarez, M. C.; Foguel, D. High-Pressure Chemical Biology and Biotechnology. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7239−7267.

(8) Mishra, R.; Winter, R. Cold- and Pressure-Induced Dissociation of Protein Aggregates and Amyloid Fibrils. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6518−6521.

(9) Trapp, M.; Marion, J.; Tehei, M.; Demé, B.; Gutberlet, T.; Peters, J. High Hydrostatic Pressure Effects Investigated by Neutron Scattering on Lipid Multilamellar Vesicles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 20951−20956.

(10) Marion, J.; Trovaslet, M.; Martinez, N.; Masson, P.; Schweins, R.; Nachon, F.; Trapp, M.; Peters, J. Pressure-induced Molten Globule State of Human Acetylcholinesterase: Structural and Dynamical Changes Monitored by Neutron Scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3157−3163.

(11) Frauenfelder, H.; Parak, F.; Young, R. D. Conformational Substates in Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 451−479.

(12) Zaccai, G. How Soft is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering. *Science* **2000**, *288*, 1604−1607.

(13) Meinhold, L.; Smith, J. C. Pressure-Dependent Transition in Protein Dynamics at about 4 kbar Revealed by Molecular Dynamics Simulation. *Phys. Rev. E* **2005**, *72*, 061908.

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

(14) Meinhold, L.; Smith, J. C.; Kitao, A.; Zewail, A. H. Picosecond Fluctuating Protein Energy Landscape Mapped by Pressure Temperature Molecular Dynamics Simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17261−17265.
(15) Calandrini, V.; Hamon, V.; Hinsen, K.; Calligari, P.; Bellissent-Funel, M.; Kneller, G. R. Relaxation Dynamics of Lysozyme in Solution under Pressure: Combining Molecular Dynamics Simulations and Quasielastic Neutron Scattering. *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 289−297.
(16) Calandrini, V.; Kneller, G. R. Influence of Pressure on the Slow and Fast Fractional Relaxation Dynamics in Lysozyme: A Simulation Study. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 065102.
(17) Lerbret, A.; Hedoux, A.; Annighofer, B.; Bellissent-Funel, M.-C. Influence of Pressure on the Low-Frequency Vibrational Modes of Lysozyme and Water: A Complementary Inelastic Neutron Scattering and Molecular Dynamics Simulation Study. *Proteins* **2013**, *81*, 326−340.
(18) Ortore, M. G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Paciaroni, A.; Barbosa, L. R. S.; Amenitsch, H.; Steinhart, M.; Ollivier, J.; Russo, D. Combining Structure and Dynamics: Non-Denaturing High-Pressure Effect on Lysozyme in Solution. *J. R. Soc., Interface* **2009**, *6*, 619−634.
(19) Daniel, I.; Oger, P.; Winter, R. Origins of Life and Biochemistry under High-Pressure Conditions. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858−875.
(20) Meersman, F.; Daniel, I.; Bartlett, D. H.; Winter, R.; Hazael, R.; McMillan, P. F. High-Pressure Biochemistry and Biophysics. *Rev. Mineral. Geochem.* **2013**, *75*, 607−648.
(21) Minton, A. P. How can Biochemical Reactions within Cells Differ from those in Test Tubes? *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2863−2869.
(22) Ellis, R. J. Protein Misassembly: Macromolecular Crowding and Molecular Chaperones. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *594*, 1−13.
(23) Ravindra, R.; Zhao, S.; Gies, H.; Winter, R. Protein Encapsulation in Mesoporous Silicate: The Effects of Confinement on Protein Stability, Hydration, and Volumetric Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12224−12225.
(24) Erlkamp, M.; Grobelny, S.; Winter, R. Crowding Effects on the Temperature and Pressure Dependent Structure, Stability and Folding Kinetics of Staphylococcal Nuclease. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 5965−5976.
(25) Schroer, M. A.; Markgraf, J.; Wieland, D. C. F.; Sahle, C. J.; M? ller, J.; Paulus, M.; Tolan, M.; Winter, R. Nonlinear Pressure Dependence of the Interaction Potential of Dense Protein Solutions. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 178102.
(26) Möller, J. Reentrant Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Solutions at Elevated Hydrostatic Pressures. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 028101.
(27) Schroer, M. A.; Zhai, Y.; Wieland, D. C. F.; Sahle, C. J.; Nase, J.; Paulus, M.; Tolan, M.; Winter, R. Exploring the Piezophilic Behavior of Natural Cosolvent Mixtures. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 11413−11416.
(28) Möller, J.; Schroer, M. A.; Erlkamp, M.; Grobelny, S.; Paulus, M.; Tiemeyer, S.; Wirkert, F. J.; Tolan, M.; Winter, R. The Effect of Ionic Strength, Temperature, and Pressure on the Interaction Potential of Dense Protein Solutions: From Nonlinear Pressure Response to Protein Crystallization. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2641−2648.
(29) Grobelny, S.; Erlkamp, M.; Möller, J.; Tolan, M.; Winter, R. Intermolecular Interactions in Highly Concentrated Protein Solutions upon Compression and the Role of the Solvent. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 22D506.
(30) Stradner, A.; Sedgwick, H.; Cardinaux, F.; Poon, W. C. K.; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. Equilibrium Cluster Formation in Concentrated Protein Solutions and Colloids. *Nature* **2004**, *432*, 492−495.
(31) Dumetz, A. C.; Chockla, A. M.; Kaler, E. W.; Lenhoff, A. M. Protein Phase Behavior in Aqueous Solutions: Crystallization, Liquid-Liquid Phase Separation, Gels, and Aggregates. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 570−583.
(32) Seeliger, J.; Werkmüller, A.; Winter, R. Macromolecular Crowding as a Suppressor of Human IAPP Fibril Formation and Cytotoxicity. *PloS One* **2013**, *8*, e69652.
(33) Roosen-Runge, F.; Hennig, M.; Zhang, F. M.; Jacobs, R. M.; Sztucki, M.; Schober, H.; Seydel, T.; Schreiber, F. Protein Self-Diffusion in Crowded Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11815−11820.
(34) Stradner, A.; Cardinaux, F.; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. Do Equilibrium Clusters Exist in Concentrated Lysozyme Solutions? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, E75.
(35) Shukla, A.; Mylonas, E.; Di Cola, E.; Finet, S.; Timmins, P.; Narayanan, T.; Svergun, D. I. Absence of Equilibrium Cluster Phase in Concentrated Lysozyme Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5075−5080.
(36) Porcar, L.; Falus, P.; Chen, W.-R.; Faraone, A.; Fratini, E.; Hong, K.; Baglioni, P.; Liu, Y. Formation of the Dynamic Clusters in Concentrated Lysozyme Protein Solutions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 126−129.
(37) Cardinaux, F.; Zaccarelli, E.; Stradner, A.; Bucciarelli, S.; Farago, B.; Egelhaaf, S. U.; Sciortino, F.; Schurtenberger, P. Cluster-Driven Dynamical Arrest in Concentrated Lysozyme Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7227−7237.
(38) Liu, Y.; Porcar, L.; Chen, J.; Chen, W.-R.; Falus, P.; Faraone, A.; Fratini, E.; Hong, K.; Baglioni, P. Lysozyme Protein Solution with an Intermediate Range Order Structure. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7238−7247.
(39) Gabel, F.; Bicout, D.; Lehnert, U.; Tehei, M.; Weik, M.; Zaccai, G. Protein Dynamics Studied by Neutron Scattering. *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 327−367.
(40) Vural, D.; Hong, L.; Smith, J. C.; Glyde, H. R. Long-Time Mean-Square Displacements in Proteins. *Phys. Rev. E* **2013**, *88*, 052706.
(41) Roh, J. H.; Curtis, J. E.; Azzam, S.; Novikov, V. N.; Peral, I.; Chowdhuri, Z.; Gregory, R. B.; Sokolov, A. P. Influence of Hydration on the Dynamics of Lysozyme. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2573−2588.
(42) Hong, L.; Glass, D. C.; Nickels, J. D.; Perticaroli, S.; Yi, Z.; Tyagi, M.; O'Neill, H.; Zhang, Q.; Sokolov, A. P.; Smith, J. C. Elastic and Conformational Softness of a Globular Protein. *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 028104.
(43) Hong, L.; Smolin, N.; Lindner, B.; Sokolov, A. P.; Smith, J. C. Three Classes of Motion in the Dynamic Neutron-Scattering Susceptibility of a Globular Protein. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 148102.
(44) Hong, L.; Cheng, X.; Glass, D. C.; Smith, J. C. Surface Hydration Amplifies Single-Well Protein Atom Diffusion Propagating into the Macromolecular Core. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 238102.
(45) Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. Dynamical Transition of Myoglobin Revealed by Inelastic Neutron Scattering. *Nature* **1989**, *337*, 754−756.
(46) Paciaroni, A.; Cinelli, S.; Cornicchi, E.; De Francesco, A.; Onori, G. Fast Fluctuations in Protein Powders: The Role of Hydration. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *410*, 400−403.
(47) Magazù, S.; Migliardo, F.; Benedetto, A.; Mondelli, C.; Gonzalez, M. A. Thermal Behaviour of Hydrated Lysozyme in the Presence of Sucrose and Trehalose by EINS. *J. Non-Cryst. Solids* **2011**, *357*, 664−670.
(48) Szalontai, B.; Nagy, G.; Krumova, S.; Fodor, E.; Pali, T.; Taneva, S. G.; Garab, G.; Peters, J.; Der, A. Hofmeister Ions Control Protein Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 4564−4572.
(49) Covington, A. K.; Paabo, M.; Robinson, R. A.; Bates, R. G. Use of the Glass Electrode in Deuterium Oxide and the Relation Between the Standardized pD (paD) Scale and the Operational pH in Heavy Water. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700−706.
(50) Bouchoux, A.; Cayemitte, P.-E.; Jardin, J.; Gésan-Guiziou, G.; Cabane, B. Casein Micelle Dispersions under Osmotic Stress. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 693−706.
(51) Kitamura, Y.; Itoh, T. Reaction Volume of Protonic Ionization for Buffering Agent. Prediction of Pressure Dependence of pH and pOH. *J. Solution Chem.* **1987**, *16*, 715−725.
(52) Steiner, R. F. Structural Transitions of Lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *79*, 51−63.
(53) Francesca, N.; Peters, J.; Russo, D.; Barbieri, S.; Chiapponi, C.; Cupane, A.; Deriu, A.; Di Bari, M. T.; Farhi, E.; Gerelli, Y.; et al. IN13

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

Backscattering Spectrometer at ILL: Looking for Motions in Biological Macromolecules and Organisms. *Neutron News* **2008**, *19*, 14−18.
(54) Peters, J.; Trapp, M.; Hughes, D.; Rowe, S.; Demé, B.; Laborier, J.-L.; Payre, C.; Gonzales, J.-P.; Baudoin, S.; Belkhier, N.; et al. High Hydrostatic Pressure Equipment for Neutron Scattering Studies of Samples in Solutions. *High Pressure Res.* **2012**, *32*, 97−102.
(55) Sidorov, V. A.; Sadykov, R. A. Hydrostatic Limits of Fluorinert Liquids Used for Neutron and Transport Studies at High Pressure. *J. Phys.: Condens. Matter* **2005**, *17*, S3005−S3008.
(56) Richard, D.; Ferrand, M.; Kearley, G. J. Analysis and Visualisation of Neutron-Scattering Data. *J. Neutron Res.* **1996**, *4*, 33−39.
(57) Rahman, A.; Singwi, K. S.; Sjölander, A. Theory of Slow Neutron Scattering by Liquids. I. *Phys. Rev.* **1962**, *126*, 986−996.
(58) Tehei, M.; Daniel, R.; Zaccai, G. Fundamental and Biotechnological Applications of Neutron Scattering Measurements for Macromolecular Dynamics. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 551−558.
(59) Kharakoz, D. P. Protein Compressibility, Dynamics, and Pressure. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 511−525.
(60) Soper, A. K. Structures of High-Density and Low-Density Water. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 2881−2884.
(61) Mallamace, F.; Corsaro, C.; Mallamace, D.; Vasi, C.; Stanley, H. E. The Thermodynamical Response Functions and the Origin of the Anomalous Behavior of Liquid Water. *Faraday Discuss.* **2014**, *167*, 95−108.
(62) Ludwig, R. Water: From Clusters to the Bulk. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1808−1827.
(63) Cupane, A.; Fomina, M.; Piazza, I.; Peters, J.; Schiro, G. Experimental Evidence for a Liquid-Liquid Crossover in Deeply Cooled Confined Water. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 215701-1−215701-5.
(64) Zhai, Y.; Okoro, L.; Cooper, A.; Winter, R. Applications of Pressure Perturbation Calorimetry in Biophysical Studies. *Biophys. Chem.* **2011**, *156*, 13−23.
(65) Suladze, S.; Kahse, M.; Erwin, N.; Tomazic, D.; Winter, R. Probing Volumetric Properties of Biomolecular Systems by Pressure Perturbation Calorimetry (PPC)—The Effects of Hydration, Cosolvents and Crowding. *Methods* **2014**, DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.08.007.
(66) Pastor, I.; Pitulice, L.; Balcells, C.; Vilaseca, E.; Madurga, S.; Isvoran, A.; Cascante, M.; Mas, F. Effect of Crowding by Dextrans in Enzymatic Reactions. *Biophys. Chem.* **2014**, *185*, 8−13.
(67) Voloshin, V. P.; Kim, A. V.; Medvedev, N. N.; Winter, R.; Geiger, A. Calculation of the Volumetric Characteristics of Biomacromolecules in Solution by the Voronoi-Delaunay Technique. *Biophys. Chem.* **2014**, *192*, 1−9.
(68) Voloshin, V. P.; Medvedev, N. N.; Smolin, N.; Geiger, A.; Winter, R. Disentangling Volumetric and Hydrational Properties of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 1881−1890.
(69) Lauro, F. M.; Bartlett, D. H. Prokaryotic Lifestyles in Deep Sea Habitats. *Extremophiles* **2008**, *12*, 15−25.

DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b01017
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX−XXX

Chapitre 6

RESUME DE L'OUVRAGE EN FRANÇAIS ET EN ANGLAIS

La poursuite de nouveaux angles de recherche est depuis toujours l'un des facteurs clés du progrès scientifique. Au travers de ce travail, nous amenons de nouveaux éléments permettant d'ouvrir une discussion sur la dynamique moléculaire et la structure des biomolécules, étudiées par diffusion neutronique sous haute pression. Le projet d'étude s'axe sur différents sujets ayant pour dénominateur commun la haute pression en biologie. L'intérêt de la haute pression en biologie n'est pas a priori évident ; pourtant, un grand nombre de points stimulent ce champ d'investigation. Une partie conséquente de la biosphère subit un environnement sous haute pression : les organismes barophiles des grands fonds marins subissent des conditions de stress uniques, qui soulèvent des questions sur l'adaptation biologique. D'autre part, la haute pression trouve un intérêt concret dans l'agro-alimentaire pour la conservation alimentaire ou, nouvellement, la conservation de vaccins. Cependant, ces recherches se situent en aval des travaux qui nous intéressent dans cet ouvrage. La thèse présentée donne une vision plus théorique, ou phénoménologique, de processus tels que des états métastables protéiques, leur dénaturation, ou encore l'étude de la transition dynamique, aux travers d'expériences adaptées au besoin du sujet entrepris. Un tel travail ne permet pas de couvrir toutes les informations nécessaires pour aborder une vision globale du sujet. L'ouvrage se concentre donc sur l'étude par diffusion neutronique des effets de la pression en biophysique pour élaborer de nouvelles possibilités de recherches, qui seront discutées ici.

Seeking new research options have always been the heart of scientific progress. Through this work, new elements are introduced to start a discussion about molecular dynamics and biomolecule structure studied by high pressure experiments with neutron scattering. The project explores different subjects all gathered around the high pressure topic. High pressure interest in biology might seem quite surprising : however, a large amount of points justifies its investigation. A large part of the biosphere undergoes high pressure stress due to the fact of its presence in the deep sea, raising questions about biological adaptation to a high pressure environment, for example. High pressure has raised interest in the last decades on other purposes like food conservation or vaccine conservation. These research fields are theoretical and phenomenological events. The manuscript covers different areas such as dynamical transition or metastable states and denaturation of proteins through experiments designed to the need of the research. Such a field requires a gigantic amount of investigation while restraining the possibilities of generalisation. Thus, the work is focused on neutron scattering as a probe for high pressure studies in biophysics in order to elaborate new research clues in the field dealt with.