



HAL
open science

Développements méthodologiques en biocristallographie : Diffusion anormale et complexes de lanthanides Biophysique sous hautes pressions

Eric Girard

► **To cite this version:**

Eric Girard. Développements méthodologiques en biocristallographie : Diffusion anormale et complexes de lanthanides Biophysique sous hautes pressions. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier - Grenoble I, 2011. tel-01577783

HAL Id: tel-01577783

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01577783>

Submitted on 28 Aug 2017

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.

Habilitation à Diriger des Recherches (DHDR)
Université Joseph Fourier, Grenoble
UFR de Physique

**Développements méthodologiques en
biocristallographie :
Diffusion anormale et complexes de lanthanides
Biophysique sous hautes pressions**

Eric Girard
Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, Grenoble, France

Soutenu le 6 Octobre 2011

Membres du Jury :

Dr. Mirjam Czjzek (Rapporteur)
Pr. Claudine Mayer (Rapporteur)
Pr. Mohamed Jebbar (Rapporteur)
Dr. Giuseppe Zaccai (Examineur)
Dr. Olivier Maury (Examineur)
Dr Richard Kahn (Examineur)

Remerciements

Je souhaiterais remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser au cours de mes 13 années de recherche et plus particulièrement celles qui ont contribué au travail présenté dans ce manuscrit :

- Les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que pour leur participation à la soutenance.
- Mes mentors, Roger Fourme, Richard Kahn et Jean Vicat, qui m'ont permis d'être le scientifique que je suis.
- Tous les collaborateurs (ils se reconnaîtront) passé, présent et futur, que ce soit pour la thématique sur les lanthanides ou celle concernant la haute pression, sans qui une part importante de ce travail n'aurait pas été possible.
- Nos acolytes du noyau dur de la bio-cristallographie sous haute pression, Anne-Claire Dhaussy et Mohamed Mezouar.
- Une mention spéciale pour les thésards de l'équipe, Marie-Laure Chesne-Seck, Meike Stelter, Guillaume Pompidor et Romain Talon.
- Les membres du LCM, du LPM et maintenant de l'équipe ELMA.
- Mes anciens collègues de SOLEIL, en particulier Andrew Thompson, Pierre Legrand, Bill Shepard, Patrick Gourhant, Lucile Roussier et Denis Duran.
- Enfin, mon épouse, Sonia, et nos deux fils, Télhiau et Loann-Mac, pour leur soutien et leur patience au cours de toutes ces années parsemées de soirées et week-end studieux et parsemées d'expériences synchrotron parfois longues, de nuit ou de week-end, expériences sans lesquelles ce travail n'aurait pas été possible.

Tables des matières

INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE I : UTILISATION DES LANTHANIDES EN BIOCRISTALLOGRAPHIE	8
INTRODUCTION :	8
I.1. LANTHANIDE VERSUS SELENIUM	10
I.2. POURQUOI LES LANTHANIDES SONT-ILS SOUS-UTILISES EN BIO-CRISTALLOGRAPHIE ?	11
I.3. LES COMPLEXES DE LANTHANIDES ISSUS DE L'IMAGERIE MEDICALE	12
I.4. LES COMPLEXES LUMINESCENTS DE LANTHANIDES	14
I.5. COMMENT DETECTER LA FIXATION DES COMPLEXES DE LANTHANIDE AVANT L'EXPERIENCE DE DIFFRACTION ?	17
I.6. ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LA FIXATION DES COMPLEXES DE LANTHANIDE.....	18
I.7. PROTEINES DE STRUCTURES INCONNUES DETERMINEES A L'AIDE DES COMPLEXES.....	24
I.8. LA DIFFUSION ANOMALE DANS UN PROJET BIOLOGIQUE	29
I.9. RESULTATS NON ESCOMPTEES : EPISODE I.....	31
I.10. LE FUTUR.....	34
CHAPITRE II : BIOPHYSIQUE SOUS HAUTES PRESSIONS	38
INTRODUCTION :	38
II.1. PIEZOPHILIE	38
II.2. CAPTURE ET ETUDE D'ETATS CONFORMATIONNELS.....	41
II.3. BIOTECHNOLOGIE	43
II.4. BIOCRISTALLOGRAPHIE SOUS HAUTE PRESSION : INSTRUMENTATION.....	44
II.5. BIOCRISTALLOGRAPHIE SOUS HAUTE PRESSION : CONDITIONS EXPERIMENTALES.	48
II.6. PLATEFORME SOUS HAUTE PRESSION DE L'IBS.	50
II.7. EXPERIENCES REALISEES A L'AIDE DE LA CELLULE A ENCLUMES DIAMANT.....	51
II.8. ETUDE SOUS HAUTE PRESSION DE LA CAPSIDE DU CPMV	54
II.9. ETUDE SOUS HAUTE PRESSION DE LA FORME A DE L'ADN	56
II.10. ETUDE SOUS HAUTE PRESSION DE L'URATE OXYDASE	59
II.11. RESULTATS NON ESCOMPTEES : EPISODE II.....	65
II.12. LE FUTUR	68
CONCLUSION	74
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76

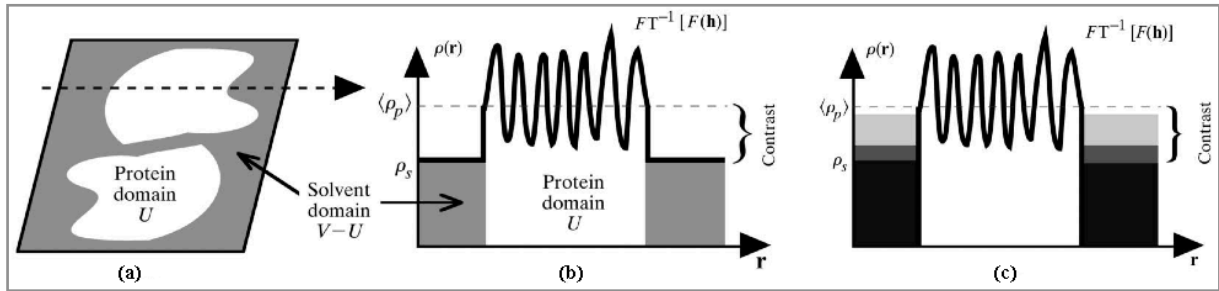
Introduction

Introduction

Depuis le début de ma thèse en 1998, mon activité de recherche s'est orientée vers des développements méthodologiques en cristallographie des macromolécules biologiques. Ces développements s'articulent autour de deux thématiques qui sont l'utilisation de complexes de lanthanide pour la détermination des structures à travers les méthodes mettant en œuvre la diffusion anormale et l'utilisation des hautes pressions hydrostatiques.

Je fais ici le choix d'expliquer l'historique de mon cheminement en espérant que cela puisse servir à un étudiant qui lira ce manuscrit, car ce cheminement illustre ce qu'est la recherche fondamentale, sans idée préconçue d'une quelconque application industrielle ou sociétale à court ou moyen terme, mais en étant vigilant à la possibilité qu'elle puisse conduire à une application.

Après un stage de Maîtrise (Master1) effectué au CEA de Grenoble qui m'a permis de (re)découvrir le monde des protéines, puisque l'étude portait sur la simulation de spectre RPE d'une catalase, j'ai suivi le DEA national de Cristallographie et RMN Biologique, formation qui a malheureusement disparu avec la mise en place du système LMD. Mon sujet de stage de DEA (Master2) portait sur le développement de la méthode MASC, pour Multi-wavelength Anomalous Solvent Contrast (Fourme et al., 1995; Ramin et al., 1999; Shepard et al., 2000). D'un point de vue théorique, cette méthode met à profit une variation de contraste obtenue en modifiant le signal anormal d'un agent de contraste (un diffuseur anormal) aléatoirement dispersé dans le solvant d'un cristal. La variation du signal anormal, et donc la variation de contraste, sont obtenues par variation de l'énergie du faisceau incident au voisinage de l'un des seuils d'absorption du diffuseur anormal. Cette variation de contraste fournit de l'information à basse résolution sur la macromolécule composant le cristal en permettant en principe d'obtenir son enveloppe.



Représentation 2D d'une maille, de volume V , d'un cristal qui contient un domaine ordonné U correspondant à la protéine et le domaine désordonné $V-U$ représentant le solvant. La flèche en pointillé indique une coupe de cette maille représentée en (b) où l'on observe l'évolution de la densité électronique. (c) Densité électronique pour l'ensemble de la maille où trois densités électroniques du solvant sont représentées. (Adaptés de Shepard et al (2000)).

D'un point de vue expérimental, il fallait trouver un diffuseur anormal qui puisse être introduit à forte concentration dans le cristal sans se fixer sur la protéine. Les expériences initiales (Ramin et al., 1999; Shepard et al., 2000) ont montré que les sels d'atomes lourds n'étaient pas adéquats pour ce type d'expérience car ils se fixent en général plus ou moins fortement à la protéine. Afin de contourner le problème, l'idée a été d'utiliser des molécules contenant le diffuseur anormal qui puissent être dispersées dans le solvant à très forte concentration. La première de ces molécules, testée pendant mon stage de DEA, était une sulfobétaïne (Vuillard et al., 1995) contenant un atome de brome. Cette molécule a pu être introduite à forte concentration (0,72 M) dans les cristaux de lysozyme, protéine test. Nous n'avons pas détecté de fixation sur la protéine. Malheureusement le faible signal anormal de l'atome de brome ne permettait pas d'obtenir un effet MASC suffisant.

Ces expériences préliminaires permirent de définir les caractéristiques de la molécule idéale pour les expériences MASC. Cette dernière devait porter un fort diffuseur anormal (présentant de préférence une « raie blanche » dans le spectre d'absorption tels le sélénium, le platine, l'osmium ou les lanthanides), être soluble dans l'eau au-delà de 1 M, être stable dans les conditions physico-chimiques que l'on rencontre au cours d'une cristallisation (pH, salinité etc...) et posséder une charge globale neutre afin de limiter les interactions avec les zones chargées de la protéine.

C'est ainsi que, après une année de Service National et une expérience biologique fascinante (la naissance de notre fils aîné), débuta ma thèse avec trois mois intenses de bibliographie à la recherche de « La Molécule ». Très rapidement mes recherches m'ont conduit à des molécules utilisées dans le milieu médical : molécules contenant du platine pour la radiothérapie et complexes de lanthanides utilisés comme agents de contraste en Imagerie par

Résonance Magnétique. Ce sont ces complexes de lanthanides qui se sont avérés les plus prometteurs et que j'ai étudiés par la suite.

Le premier de ces complexes, le Gd-HPDO3A (voir Figure 1.2, page 11), était une molécule qui respectait les critères MASC définis plus haut. J'ai donc produit des cristaux de lysozyme de blanc d'œuf de poule en présence de 100 mM de ce complexe. J'ai enregistré des données de diffraction et... déception totale : la carte de Patterson anormale révéla un énorme pic indiquant une très forte fixation du complexe sur la protéine. Il s'ensuivit une dizaine de jours de dépression, puisque l'effet observé était aux antipodes du résultat recherché. Le renouveau vint d'une discussion avec Laurent Chantalat, qui effectuait un post-doctorat dans l'équipe d'Otto Dideberg à l'IBS. Cette discussion peut se résumer par « Le cristal obtenu a l'air d'être un excellent dérivé lourd. Pourquoi ne pas essayer de déterminer la structure *ab initio* ? ». Ce qui fut fait avec l'aide de Laurent qui proposa de résoudre la structure par la méthode SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction), appelée à l'époque méthode SAS et qui émergeait (Girard et al., 2002). La structure put être déterminée sans problème à partir de données enregistrées avec le générateur à rayons X du laboratoire.

Ma thèse changea alors brutalement de direction pour une étude systématique, sur différentes protéines, de plusieurs complexes de lanthanides afin de déterminer leur domaine d'utilisation, leur fixation et leur mode d'interaction avec les protéines.

Depuis, cette thématique se poursuit au sein de l'équipe et a conduit à trois nouvelles thèses, Meike Stelter (2002-2005), Guillaume Pompidor (2004-2007) et celle de Romain Talon (soutenance prévue Octobre 2011) que je co-encadre. Il convient d'ajouter la thèse de Marie-Laure Chesne (1999-2002) qui a étudié des complexes d'uranyle.

Après ma thèse, j'ai effectué deux post-doctorats courts : le premier concernait l'apport de phases expérimentales dans la détermination de l'interaction d'inhibiteurs d'une β -lactamase ; le second, financé par la société Bracco Imaging, concernait l'étude d'une molécule d'intérêt pharmaceutique sur une protéine humaine.

J'ai ensuite effectué un post-doctorat sur la ligne de bio-cristallographie Proxima 1 au centre de rayonnement synchrotron SOLEIL où je suis arrivé au démarrage de la construction des bâtiments. J'ai été recruté en tant que scientifique de ligne sur Proxima 1, avant de rejoindre l'Institut de Biologie Structurale en 2007.

Et les hautes pressions en biophysique dans tout cela ? Et bien, j'ai découvert cette thématique à la fin de ma thèse. En effet, le projet de bio-cristallographie sous haute pression (HPMX pour High-Pressure Macromolecular Crystallography) a été initié en 1999-2000 par Roger Fourme et Isabella Ascone (LURE, Orsay puis Synchrotron Soleil - Saint Aubin) avec l'aide

de Mohamed Mezouar (ESRF - Grenoble). La première expérience a eu lieu fin 2000. Or Roger Fourme et Richard Kahn ont un long passé commun avec, en particulier, la première détermination (Kahn et al., 1985) de la structure d'une protéine par la méthode MAD (Multiwavelength Anomalous Diffraction), une méthode qui a révolutionné la cristallographie des protéines, et le développement de la méthode MASC. Il était donc naturel que Roger fasse partie de mon jury de thèse et que Richard me demande de participer à la première expérience haute pression, compte tenu de son implication. Par la suite, et en parallèle avec le travail autour de la mise en place de la ligne Proxima 1, le développement de la bio-cristallographie sous haute pression fut mon projet de recherche en tant que post-doctorant Soleil et reste, maintenant, une partie extrêmement forte de mon activité de recherche comme indiqué par la suite.

Ce manuscrit est donc naturellement organisé en deux chapitres. Le premier résume l'activité de recherche autour des lanthanides, avec un éclairage particulier sur les résultats obtenus par notre dernier doctorant, Romain Talon. Le second décrit l'intérêt des hautes pressions en biologie et les développements effectués en bio-cristallographie et plus généralement en biophysique des hautes pressions. Chaque chapitre comporte une partie décrivant les perspectives que j'envisage pour chacune des deux thématiques ainsi qu'une partie « Application » décrivant des valorisations qui ont bénéficié de cette recherche méthodologique et des développements techniques associés ce qui me permettra de revenir sur le second paragraphe de cette introduction.

Chapitre I

Utilisation des lanthanides en biocristallographie

Chapitre I : Utilisation des lanthanides en biocristallographie

Introduction :

Même si bon nombre des structures actuellement déposées dans la Protein Data Bank (PDB) sont déterminées par remplacement moléculaire, le phasage expérimental reste nécessaire pour déterminer la structure de protéines présentant un nouveau repliement et/ou qui diffèrent significativement des modèles existants. Au cours des 15 dernières années, les méthodes utilisant la diffusion anormale, c'est à dire la méthode SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction) et la méthode MAD (Multi-wavelength Anomalous Diffraction), ont largement remplacé les méthodes utilisant le remplacement isomorphes (SIR/MIR pour Single/Multiple Isomorphous Replacement) devenant ainsi les méthodes de choix pour la détermination *de novo* de la structure des macromolécules biologiques. Une recherche dans la PDB avec les mots clé « SAD or MAD or SIRAS or MIRAS or anomalous » conduit à 11530 structures sur les 64784 structures obtenues par cristallographie des rayons X. Deux éléments d'importance décisive dans l'utilisation de la dispersion anormale ont été le développement des sources synchrotron de seconde puis de troisième génération, émettant un rayonnement X intense et de longueur d'onde ajustable, et l'incorporation du sélénium dans les méthionines (Doublie, 1997; Hendrickson et al., 1990).

En diffraction de rayons X, la diffusion anormale, ou diffusion résonante, est un phénomène présent à toute énergie des photons incidents mais qui n'est d'intensité appréciable qu'au voisinage d'un des seuils d'absorption (K, L, M) d'une espèce atomique du cristal. La diffusion anormale introduit un déphasage de l'onde diffusée, ce qui se traduit dans l'expression du facteur de diffusion atomique, qui devient un nombre complexe et s'exprime de la manière suivante :

$$f = {}^0f + {}^\lambda f' + i {}^\lambda f''$$

où 0f est la partie normale du facteur de diffusion atomique indépendant de la longueur d'onde qui correspond au facteur de diffusion pour un rayonnement de grande énergie par rapport aux énergies des électrons dans l'atome, et où ${}^\lambda f'$ et ${}^\lambda f''$ sont respectivement les parties réelle et imaginaire de la contribution anormale au facteur de diffusion. La présence de signal anomal conduit à la brisure de la loi de Friedel et à l'apparition des paires de Bijvoet

que l'on exploite pour déterminer la sous-structure des diffuseurs anomaux puis la structure de la protéine étudiée.

Toutefois, il n'est pas toujours facile d'incorporer des sélénométhionines, ou plus récemment des sélénocystéines (Salgado et al., 2011; Sanchez et al., 2002; Strub et al., 2003; Walden, 2010) dans la protéine. Des méthodes alternatives consistent à utiliser une sous-structure d'éléments intrinsèques à la protéine native (métaux dans le cas des métallo-protéines, soufre des méthionines et des cystéines) ou d'atomes lourds introduits par des méthodes classiques comme le platine, le mercure, l'or, qui peuvent être utilisés aussi bien comme atomes lourds et comme centres anomaux. Je citerai ici l'idée originale des éléments de la solution de cristallisation (détectable à l'aide d'un spectre de fluorescence X) et dont on ne se doute pas toujours qu'ils puissent contribuer au phasage (arsenic du cacodylate, nickel, iode...).

Dans le tableau périodique des éléments, les lanthanides se situent du lanthane ($Z = 57$) au lutétium ($Z = 71$). Ces atomes présentent une coordination singulière puisqu'ils peuvent avoir de 3 à 11 atomes dans leur première sphère de coordination. Leur coordination privilégiée est de 9 atomes, ce qui conditionne leurs interactions avec les protéines comme décrit par la suite. Du point de vue de leur diffusion anormale, les lanthanides présentent une forte raie blanche dans leur seuil d'absorption L_{III} (Figure 1.1). Une raie blanche correspond à un pic marqué dans le spectre d'absorption d'un atome et se produit lorsque l'énergie du rayonnement incident correspond à l'énergie de transition de l'électron vers un état lié du continuum. Ainsi la présence de raies blanches pour des transitions K, L et M est attribuée à l'existence d'un grand nombre d'états accessibles dans le continuum (Brown et al., 1977). C'est Coster (Coster, 1924) qui dénomma ces pics, raies blanches, du fait de leur aspect sur les négatifs photographiques. Dans le cas des seuils L, la présence de raie blanche est liée à la présence d'états inoccupés dans la bande de valence d. Ainsi dans le cas des lanthanides, comme la bande 5d est totalement inoccupée, l'amplitude de la raie blanche est importante et identique pour tous ces éléments ce qui conduit à de très fortes contributions anormales de l'ordre de 30 électrons pour f' et pour f'' .

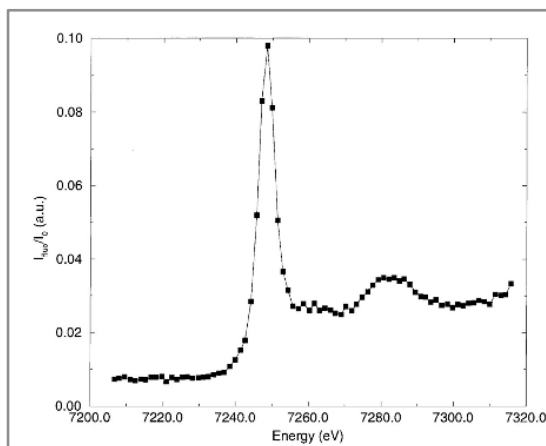


Figure 1.1 : Spectre d'absorption enregistré au seuil d'absorption L_{III} du gadolinium.

I.1. Lanthanide versus sélénium

Comme indiqué dans l'introduction, le sélénium est le diffuseur anomal le plus utilisé. Il apparaît donc logique de comparer les lanthanides à ce diffuseur anomal pour démontrer leur pouvoir de phasage. Pour cela, considérons le rapport de Bijvoet qui fournit la contribution anormale au facteur de structure global.

Nous avons montré (Girard et al., 2003) que ce rapport peut être exprimé de la manière suivante :

$$\frac{\Delta F^{\pm}}{F} = \frac{1}{Z_{eff}} \left(\frac{2 \sum_j q_j^2 (f_j'')^2}{N_p} \right)^{1/2}$$

où N_p est le nombre d'atomes de la protéine possédant un facteur de diffusion moyen Z_{eff} , q_j et f_j'' sont respectivement le taux d'occupation et la contribution imaginaire au facteur de diffusion atomique du diffuseur anomal j , ΔF^{\pm} est la différence anormale (différence de Bijvoet) qui est la différence des amplitudes d'une paire de Friedel $|F(hkl)| - |F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$, et F la valeur moyenne des amplitudes d'une paire de Friedel $F = \frac{1}{2} (|F(hkl)| + |F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|)$.

Si l'on suppose des taux d'occupation identiques pour les diffuseurs anomaux, et si l'on considère que les données de diffraction sont enregistrées au seuil d'absorption correspondant (la contribution imaginaire f_j'' vaut, respectivement, environ 10 et 30 électrons pour le sélénium et pour les lanthanides), cette formule montre clairement qu'un site lanthanide totalement occupé permettra de déterminer la structure d'une protéine 9 fois plus grande

qu'un site sélénium totalement occupé, ce qui montre clairement l'intérêt de ce type d'atome en terme de pouvoir phasant.

De même, pour les techniques combinant signal anomal et signal isomorphe (méthodes MIRAS – SIRAS pour Multiple - Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering), les lanthanides fournissent un fort signal isomorphe puisqu'ils possèdent environ 64 électrons (57 électrons pour le lanthane à 70 électrons pour le lutétium) comparé au 34 électrons du sélénium.

Les lanthanides sont donc clairement des atomes lourds particulièrement intéressants pour la détermination *de novo* des structures de macromolécules biologiques. Pourtant ils n'ont été que peu exploités à ce jour...

I.2. Pourquoi les lanthanides sont-ils sous-utilisés en bio-cristallographie ?

Comme indiqué précédemment, les lanthanides possèdent une coordination particulière pouvant accueillir de 3 à 11 atomes dans leur première sphère de coordination. La coordination privilégiée est de 9 atomes. Cette coordination est difficile à satisfaire à la surface d'une protéine et ce, d'autant plus que les acides aminés favorables à ce type de coordination sont principalement les aspartates et les glutamates avec leur fonction acide. Ainsi, l'utilisation de sels de lanthanide endommage généralement les cristaux de protéines.

Toutefois leur utilisation est possible dans le cas des protéines possédant un site de fixation du calcium. En effet, dans ce cas précis, l'atome de lanthanide se substitue à l'atome de calcium. Cette particularité a été exploitée lors des premières expériences MAD (Kahn et al., 1985; Weis et al., 1991).

Des solutions ont été proposées pour introduire des lanthanides dans les cristaux de protéines. Nagem et al. (2001) ont proposé d'utiliser les sels de lanthanides via la méthode du trempage rapide (« short cryo-soak » (Dauter et al., 2000)). Cette méthode développée initialement pour utiliser les sels d'halogénure (NaCl, NaI, NaBr) consiste à tremper pendant un temps très court, inférieur à la minute, les cristaux dans une solution très concentrée, au delà du molaire, du sel utilisé. Dans le cas du sel de lanthanide, cette méthode introduit encore une dégradation rapide des cristaux. Purdy et al. (2002) ont proposé d'utiliser une liaison covalente entre des complexes de lanthanide, dérivés des complexes décrits au paragraphe suivant où le complexe assure une coordination complète du lanthanide, et la protéine par l'intermédiaire d'une fonction réactive thiol permettant la création de ponts disulfure entre la fonction thiol et des cystéines libres de la protéine. Enfin, Silvaggi et al. (2007) ont proposé l'utilisation d'un tag

fixant un ou deux lanthanides (LBT pour lanthanoid-binding tag). Le LBT est fondé sur une séquence peptidique qui peut être introduite dans les protéines par les techniques de biologie moléculaire classiques (Allen and Imperiali, 2010).

I.3. Les complexes de lanthanides issus de l'imagerie médicale

Afin d'introduire des lanthanides dans les cristaux de protéines, l'approche de l'équipe a été d'utiliser des complexes de lanthanides développés pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les quatre complexes commerciaux (Gd-HPDO3A, Gd-DOTA, Gd-DTPA et Gd-DTPABMA) ainsi que des complexes dérivés de ces derniers ont été testés (Figure 1.2).

Ces complexes sont formés d'un ligand (Figure 1.2) qui chélate un atome de lanthanide. Le ligand fournit ainsi l'essentiel de la coordination du lanthanide.

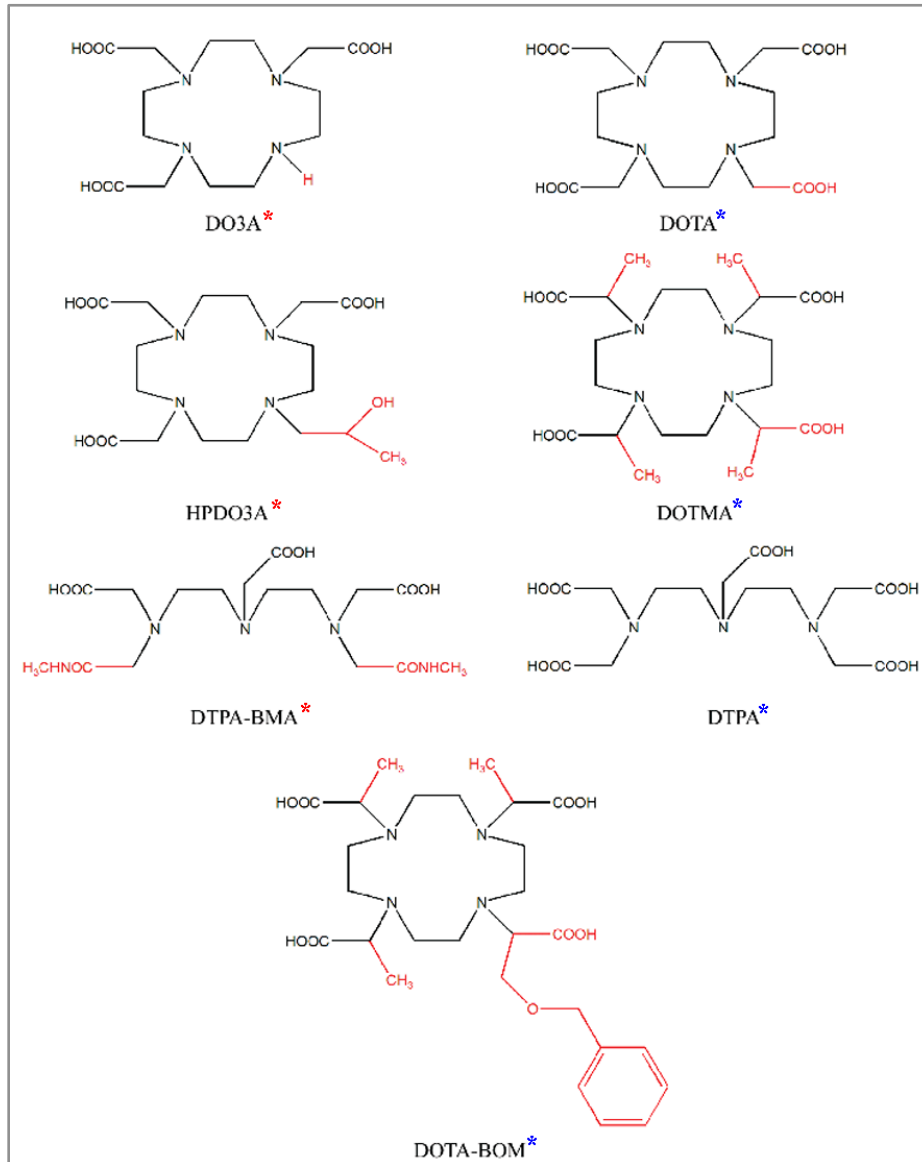


Figure 1.2 : Complexes issus de l'imagerie par résonance magnétique.

DO3A, acide 1,4,7,10- tetraazacyclododecane-1,4,7-triacétique;

DOTA, acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra- acétique;

HPDO3A, acide 10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacétique;

DOTMA, acide α,α,α,α-tetraméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique;

DTPA- BMA, acide diéthylentriaminepentaacétique bisméthylamide;

DTPA, acide diéthylentriaminepentaacétique;

DOTA-BOM, acide (phénylméthoxy)méthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique.

Ces complexes sont fortement solubles dans l'eau. Ils sont stables sur une très large gamme de pH (de 2 à 11) et l'affinité élevée du ligand pour le lanthanide conduit à des complexes extrêmement stables dans des solutions salines, y compris des solutions contenant des cations divalents à forte concentration (ils sont injectés aux patients à forte concentration). Ces complexes sont donc bien adaptés aux conditions physico-chimiques rencontrées aux cours des cristallisations de protéines. Certains de ces complexes sont électriquement neutres (indiqué par un astérisque rouge sur la Figure 1.2), d'autres sont chargées négativement (astérisque bleu). Ces complexes sont introduits soit par co-cristallisation, soit par trempage et s'utilisent à forte concentration (100 mM) sans que la cristallisation soit perturbée ou que les cristaux soient abimés.

I.4. Les complexes luminescents de lanthanides.

L'idée sous-jacente liée à la recherche et à l'utilisation de ce type de molécules était de pouvoir détecter une éventuelle incorporation dans les cristaux de manière rapide. La première approche, étudiée au cours de la thèse de Marie-Laure Chesne, s'appuie sur des colorants utilisés dans l'industrie textile par exemple (Figure 1.3). Ces molécules sont capables de fixer un ion uranyle, l'uranium présentant une diffusion anormale encore plus importante que les lanthanides. Malheureusement l'introduction de telles molécules dans les cristaux s'est avérée assez difficile, même si l'une d'entre elles a permis la détermination de la structure d'une protéine humaine de fonction et séquence inconnue puisque elle était « un contaminant » de la protéine ciblée, la paroxonase humaine (Contreras-Martel et al., 2006; Morales et al., 2006).

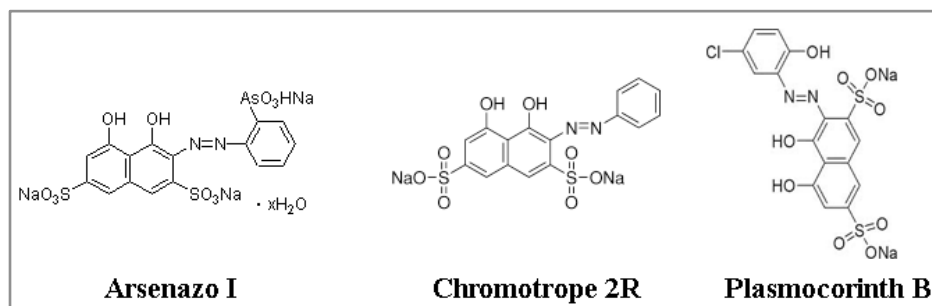


Figure 1.3 : Représentation de quelques molécules capable de chélater l'ion uranyle.

Toutefois cette approche a ouvert la voie vers la recherche de nouvelles molécules facilement détectables et à la seconde approche étudiée initialement dans le cadre de la thèse de

Guillaume Pompidor. Cette approche s'appuie sur une molécule, le tris-dipicolinate (Dipicolinate (DPA) = pyridine-2,6-dicarboxylate), qui forme en présence d'ions lanthanide un complexe non cagé à 3 ligands DPA pour un ion lanthanide possédant une charge globale 3- (Figure 1.4). Ainsi, pour certains lanthanides, ce complexe présente une forte luminescence dans le visible lorsqu'il est soumis à de la lumière dans le proche ultraviolet. Suivant le lanthanide chélaté, on observe ainsi une luminescence dans le vert pour le terbium, ou dans le rouge pour l'euporium (Figure 1.5).

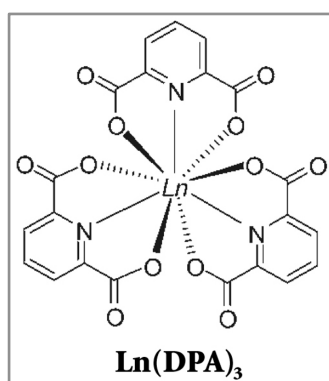


Figure 1.4 : Le tris-dipicolinate (DPA, acide pyridine-2,6-dicarboxylique) de lanthanide

Au cours de sa thèse (Soutenance prévue en 2011), Romain Talon a étudié des molécules dérivées du DPA. Ces molécules sont synthétisées par l'équipe dirigée par Arnaud Gautier (Laboratoire de synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique, Clermont-Ferrand) et sont obtenues par chimie dites « click » (Kolb and Sharpless, 2003; Kolb et al., 2001; Lewis et al., 2002). Ainsi sur le cycle pyridine du DPA est greffé un noyau triazole puis une fonction chimique supplémentaire. Trois de ces complexes ont été étudiés (Figure 1.5). Comparés au DPA, ils présentent une luminescence encore plus importante.

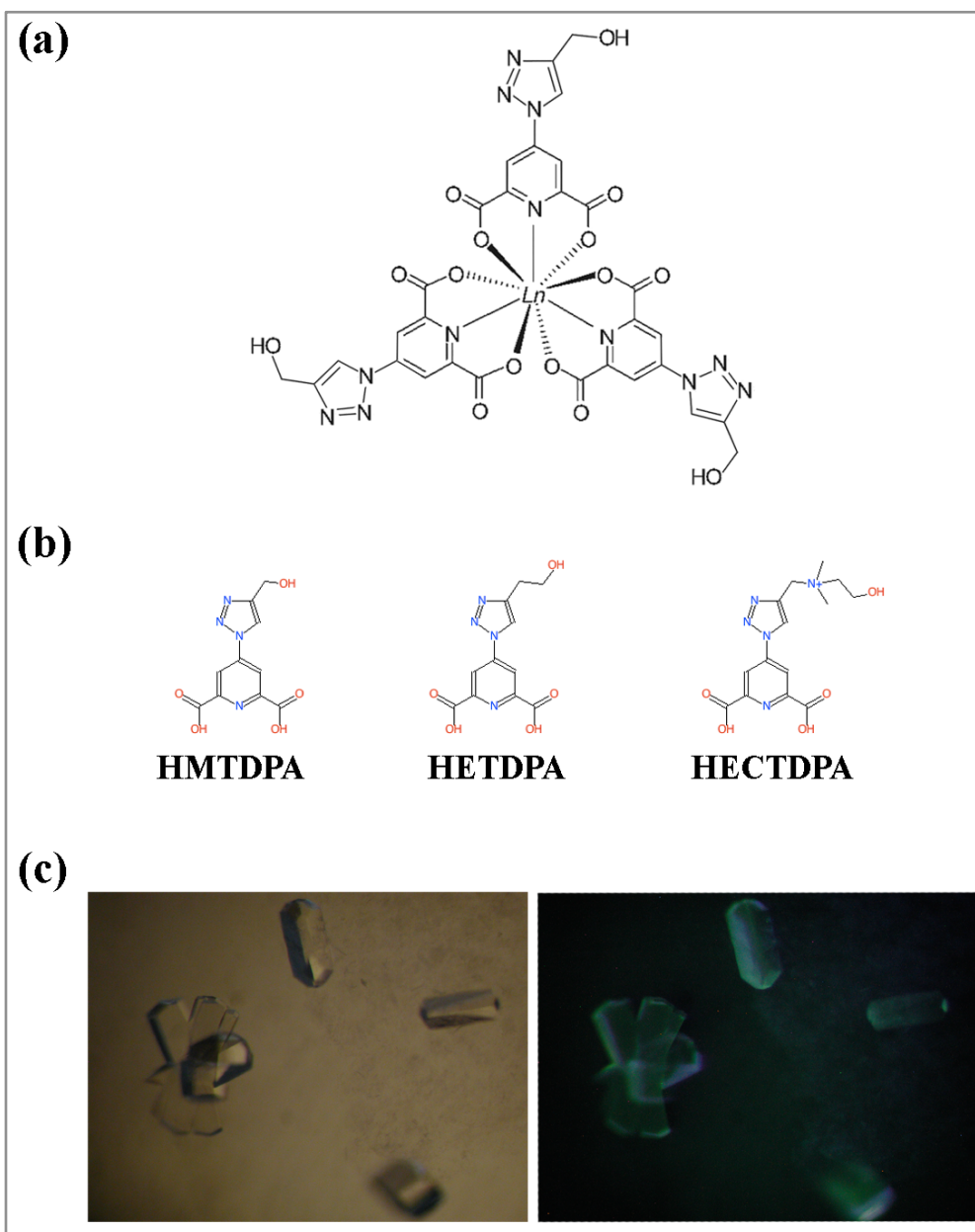


Figure 1.5 : (a) Le complexe Ln-(HMTDPA)₃ ; (b) Les différents ligands issus du DPA étudiés par Romain Talon, HMTDPA : acide 4-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylique, HETDPA : acide 4-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylique, HECTDPA : N-((1-(2,6-dicarboxypyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium ; (c) Cristaux de lysozyme co-cristallisés en présence de Eu(HMTDPA)₃³⁻ observés en lumière blanche, à gauche, et sous illumination UV (315 nm) à droite

Comparés aux complexes issus de l'IRM, les complexes fondés sur le DPA présentent aussi une bonne solubilité dans l'eau, de 4 mM (Ln(HETDPA)₃³⁻) à 220 mM (Ln(DPA)₃³⁻) en passant par 80 mM (Ln(HMTDPA)₃³⁻), mais la constante d'affinité du ligand pour le lanthanide est plus faible. Ainsi, la présence de sels à fortes concentrations ou la présence de

cations divalents conduit à la dissociation du complexe. En revanche, comme indiqué précédemment, ces molécules sont toutes luminescentes ce qui permet de détecter leur présence dans les cristaux de protéines par simple illumination avec une lampe UV (Figure 1.5) sans passer par l'enregistrement de données de diffraction comme pour les complexes IRM.

Ceci m'amène à aborder le problème de la détection de la fixation de ces molécules.

I.5. Comment détecter la fixation des complexes de lanthanide avant l'expérience de diffraction ?

Comme indiqué précédemment, dans le cas des complexes luminescents, une éventuelle incorporation dans les cristaux de protéines peut être détectée par illumination de ces derniers sous une lampe à UV. Toutefois, cela ne garantit pas une fixation suffisante à la protéine.

L'idéal serait de pouvoir détecter la fixation des complexes sur les protéines en solution avant le processus de cristallisation afin de déterminer quel est le meilleur complexe à utiliser. Il est bon de rappeler ici que les complexes ont des masses moléculaires qui varient de 500 Da (Ln-DO3A) à plus de 1000 Da (Ln(HMTDPA)₃³⁻).

Dans la littérature (Boggon and Shapiro, 2000; Lott et al., 2003), l'utilisation de l'électrophorèse de gels de polyacrylamide natifs et l'utilisation de la spectrométrie de masse pour cribler de potentiels dérivés d'atomes lourds ont été proposées. Ainsi à la fin de ma thèse, nous avons évalué la possibilité de mesurer cette fixation par spectrométrie de masse en collaboration avec Frédéric Halgand de l'ICSN de Gif-sur-Yvette. Nous avons montré qu'il était possible de détecter l'association non covalente des complexes IRM avec différentes protéines. En revanche, il est difficile d'établir par cette méthode la spécificité de l'interaction et de comparer les différents complexes entre eux. En effet, le processus même d'ionisation tend à renforcer certaines interactions (interactions ioniques/complexes électriquement chargés) au détriment des interactions de van der Waals (voir paragraphe suivant sur les modes d'interaction). Au cours de sa thèse, Meike Stelter a évalué l'utilisation de différentes méthodes physico-chimiques : RMN 1D et 2D, électrophorèse de gels de polyacrylamide natifs, calorimétrie de titrage isotherme (ITC), résonance plasmonique de surface (RPS - Biacore), et expériences de luminescence en solution et dans les cristaux en utilisant le montage expérimental « Cryobench » (Ursby et al., 2002). Elle a montré qu'il est difficile de corréler l'observation en solution et celle dans le cristal. Ceci peut s'expliquer par le fait que les complexes étudiés se fixent aux protéines par des interactions non covalentes avec des

affinités faibles liées à leur mode de fixation. Toutefois, un certain nombre des techniques citées ci-dessus sont en plein développement et il est à envisager de reprendre les tests menés par Meike Stelter au regard de ces évolutions.

En résumé, nous n'avons pas trouvé, jusqu'à présent, une méthode physico-chimique permettant une détection fiable des complexes c'est-à-dire en accord avec les taux de fixation des complexes tels que ceux observés dans les cristaux. Deux hypothèses peuvent être proposées. La première est que l'empilement cristallin a une influence beaucoup plus importante qu'escomptée. Ainsi la formation de poche par le processus même de cristallisation peut expliquer pourquoi le taux de fixation est très élevé, car impliquant plusieurs molécules de protéine par exemple, et que, finalement, la détection en solution est plus difficile, car plus faible, puisque n'impliquant qu'une molécule par exemple. La seconde est que notre compréhension du mode de fixation de ces complexes n'est pas totale, en particulier en ce qui concerne l'influence des conditions de cristallisation, de la nature des résidus présents à la surface de la protéine, et donc de la surface électrostatique, et éventuellement celle du solvant.

Par conséquent, une étape à moyen terme est la compréhension fine des modes de fixation de ces molécules afin de développer de nouveaux ligands.

1.6. Etat de nos connaissances sur la fixation des complexes de lanthanide.

Mon but dans ce paragraphe n'est pas de faire une liste exhaustive des différents modes de fixation de l'ensemble des complexes sur lesquels nous travaillons, mais de me focaliser sur quelques molécules, pour illustrer la variabilité des interactions que nous rencontrons. Pour cela, je vais m'intéresser à trois molécules, le Ln-HPDO3A, le Ln-DO3A et le Ln(DPA)₃³⁻.

Le Ln-HPDO3A est une molécule électriquement neutre et elle possède une molécule d'eau dans la première sphère de coordination du lanthanide. Le ligand HPDO3A présente une face hydrophobe (le macrocycle) et une face hydrophile (les fonctions carboxyles et la molécule d'eau). Lorsque cette molécule se fixe avec de forts taux d'occupation (> 80%), nous avons toujours observé le même mode de fixation. Comme illustré sur la Figure 1.6, ce mode de fixation implique un contact hydrophobe entre le macrocycle du ligand et des résidus hydrophobe de la protéine. Cette interaction de van der Waals est renforcée par un réseau de liaisons hydrogène impliquant les fonctions carboxyles, des molécules d'eau et des résidus au voisinage du site de fixation.

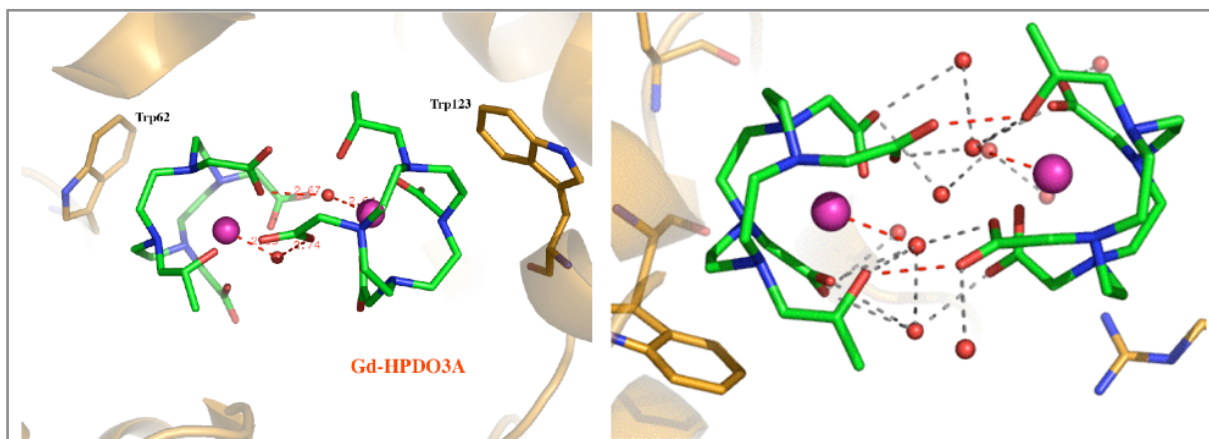


Figure 1.6 : Mode d'interaction du Gd-HPDO3A observé dans les cristaux de lysozyme de blanc d'œuf de poule montrant, à gauche, l'interaction hydrophobe avec les tryptophanes Trp62 et Trp123 (de la molécule symétrique) et, à droite, le réseau de liaisons hydrogène impliquant les molécules d'eau.

Lorsque la fixation est fore, nous avons toujours observé deux complexes à proximité l'une de l'autre avec une distance d'environ 6 Å entre les deux atomes de lanthanide, les deux molécules étant en contact par leur face hydrophile qui participent au réseau de liaisons hydrogène. Il est à noter que la molécule d'eau servant de 9^{ième} ligand est impliquée dans ce réseau de liaisons hydrogène.

Le Ln-DO3A est aussi une molécule électriquement neutre et possède une structure très similaire au HPDO3A. Ce complexe possède le même macrocycle, donc la même face hydrophobe, et une face hydrophile. La différence entre les deux molécules provient de l'absence du bras hydroxy-propyl présent dans le HPDO3A. Cette absence conduit à la présence de deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination. Alors que l'on aurait pu supposer un mode de fixation similaire au HPDO3A impliquant le caractère hydrophobe de la molécule, c'est un autre mode de fixation que nous avons observé. Le Ln-DO3A se fixe sur les résidus aspartate et glutamate des protéines (Figure 1.7). En effet, en chassant une des deux molécules d'eau, la fonction carboxylate de ces deux acides aminés fournit une coordination plus stable au lanthanide, qui devient similaire à ce que l'on observe avec les autres complexes (HPDO3A – DOTA).

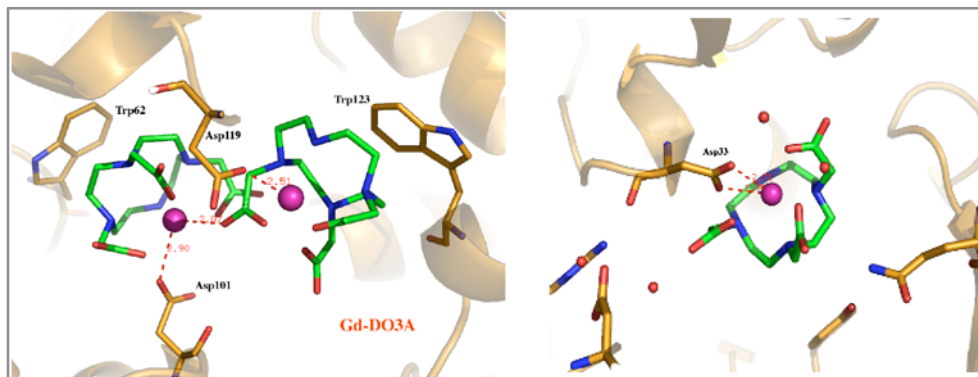


Figure 1.7 : Mode d'interaction du Gd-DO3A observé dans les cristaux de lysozyme de blanc d'œuf de poule (à gauche), et dans les cristaux de YGGV (Collaboration C. Abergel, IGS, Marseille, Non publié, à droite). Dans ce dernier cas, la distance entre les atomes d'oxygène de l'Asp33 et le Gd est de l'ordre de 2,7 Å

Si l'on compare les deux complexes Ln-HPDO3A et le Ln-DO3A, on constate que les deux modes de fixation observés sont différents, avec des molécules aux structures similaires. Ainsi, la fixation du Ln-HPDO3A implique un contact hydrophobe avec la protéine. La présence du Ln-HPDO3A forme ainsi un écran au solvant et « protège » les zones hydrophobes de la protéine qui sont exposées. L'énergie totale du système physico-chimique protéine – Ln-HPDO3A est donc plus faible. Le caractère énergétiquement défavorable de posséder des zones hydrophobes à la surface de la protéine est d'autant plus important que la force ionique du solvant est importante. Ceci est en accord avec la forte fixation du Ln-HPDO3A lorsque les conditions de cristallisation contiennent de fortes concentrations de sels. Dans le cas du Ln-DO3A, la situation est différente, puisque le gain énergétique est en priorité en faveur du complexe qui, par le remplacement d'une des molécules d'eau, fournit une coordination plus stable au lanthanide sans pour autant déstabiliser la protéine puisque les aspartates et les glutamates sont des acides aminés généralement impliqués dans des ponts salins et des liaisons hydrogène. Ce mode de fixation est en accord avec des sites de fixation multiples dont le taux de fixation est de l'ordre de 50 % et plus moins indépendant des conditions de cristallisation (sels ou PEG). Toutefois, si les grandes lignes des modes de fixation sont comprises pour ces deux molécules, il reste parfois des cas de protéines où aucune fixation n'est observée, ce qui indique que des modulations dont les causes ne sont pas encore bien comprises.

Le tris-dipicolinate de lanthanide $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ est un complexe chargé 3-. Au cours de sa thèse, Guillaume Pompidor en a analysé le mode d'interaction. Ce complexe se fixe aux arginines présentes dans la protéine (Figure 1.8). L'interaction implique des liaisons

hydrogène entre les groupes carboxylate des ligands dipicolinate et des résidus donneurs et des interactions hydrophobes (interaction p-p) entre les cycles DPA et des résidus aromatiques (Pompidor et al., 2010; Pompidor et al., 2008).

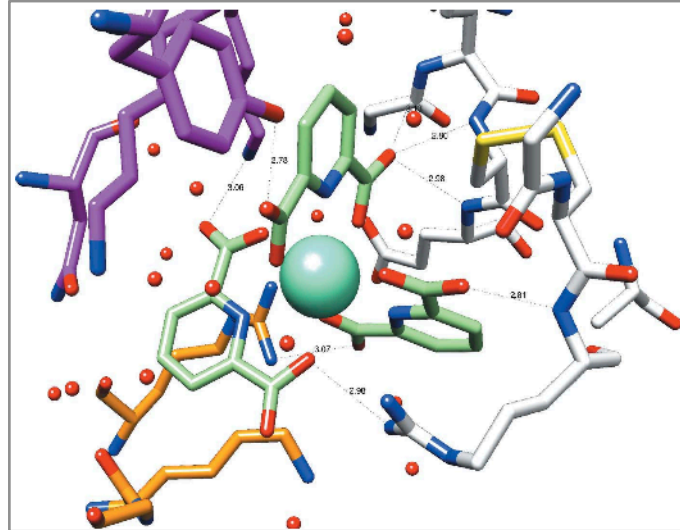


Figure 1.8 : Un sites de fixation du $\text{Eu}(\text{DPA})_3^{3-}$ observé dans les cristaux de lysozyme (Pompidor et al., 2010).

Dans certains cas, ce complexe induit un effet supramoléculaire qui conduit à un empilement cristallin différent de celui observé pour la protéine native. Dans le cas du lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL), des cristaux de forme monoclinique ont été obtenus à la place de la forme quadratique habituelle. Ces cristaux diffractent à plus haute résolution, de l'ordre de 0,8 Å au lieu de 1,4 Å. L'analyse de l'empilement cristallin (Figure 1.9) montre que le complexe $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ pontre plusieurs molécules de lysozyme, ce qui induit ce changement de groupe d'espace.

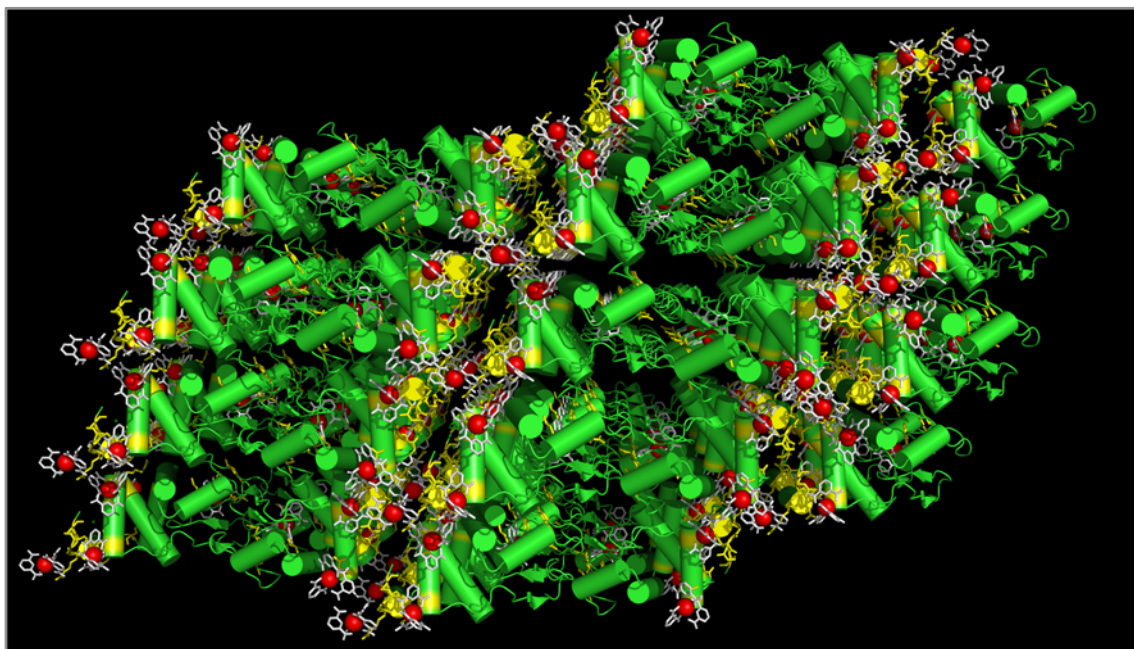


Figure 1.9 : Représentation de l'empilement cristallin observé dans les cristaux de lysozyme de blanc d'œuf de poule de forme monoclinique obtenus en présence de $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$. Les molécules de trisdipicolinate (en blanc) créent une interaction supramoléculaire avec les résidus arginine (en jaune) de la protéine (en vert).

Comme pour les complexes d'IRM, si le mode de fixation du $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ est en grande partie comprise et l'interaction avec les arginines et les lysines reproduite à l'aide de petites molécules (voir paragraphe I.9), il n'en reste pas moins des situations où le complexe ne se fixe pas. A titre d'exemple, le complexe $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ ne se fixe pas sur le lysozyme de blanc d'œuf de dinde (TEWL) alors que les conditions de cristallisation sont identiques pour le HEWL et le TEWL et que seules 7 mutations différencient les deux protéines. De plus ces mutations ne sont pas positionnées au niveau des sites de fixation observés pour le HEWL et, de fait, se pose la question de ce qui empêche la fixation et l'effet supramoléculaire observé pour le HEWL.

Afin d'approfondir notre connaissance des modes de fixation des différents composés étudiés, nous avons mis en place une approche s'appuyant sur une famille de protéines appelées les malate déshydrogénases (MalDH). Nous utilisons ces protéines comme échantillon de fonctions chimiques. En effet, cette famille d'enzymes est étudiée au sein de l'équipe pour comprendre les déterminants moléculaires de différentes adaptations extrêmophiles. Ces enzymes tétramériques (300-330 acides aminés pour le monomère) sont présentes dans de nombreux organismes adaptés à différentes conditions physico-chimique extrêmes telles que le sel (halophilie), la température (thermophilie), le pH, etc. Elles possèdent la même structure

quaternaire (un tétramère) et des identités de séquence de l'ordre de 70 % mais présentent des propriétés de surface différentes en lien avec les conditions physico-chimiques auxquelles le cytoplasme de l'organisme dont elles sont issues doit faire face (Figure 1.10).

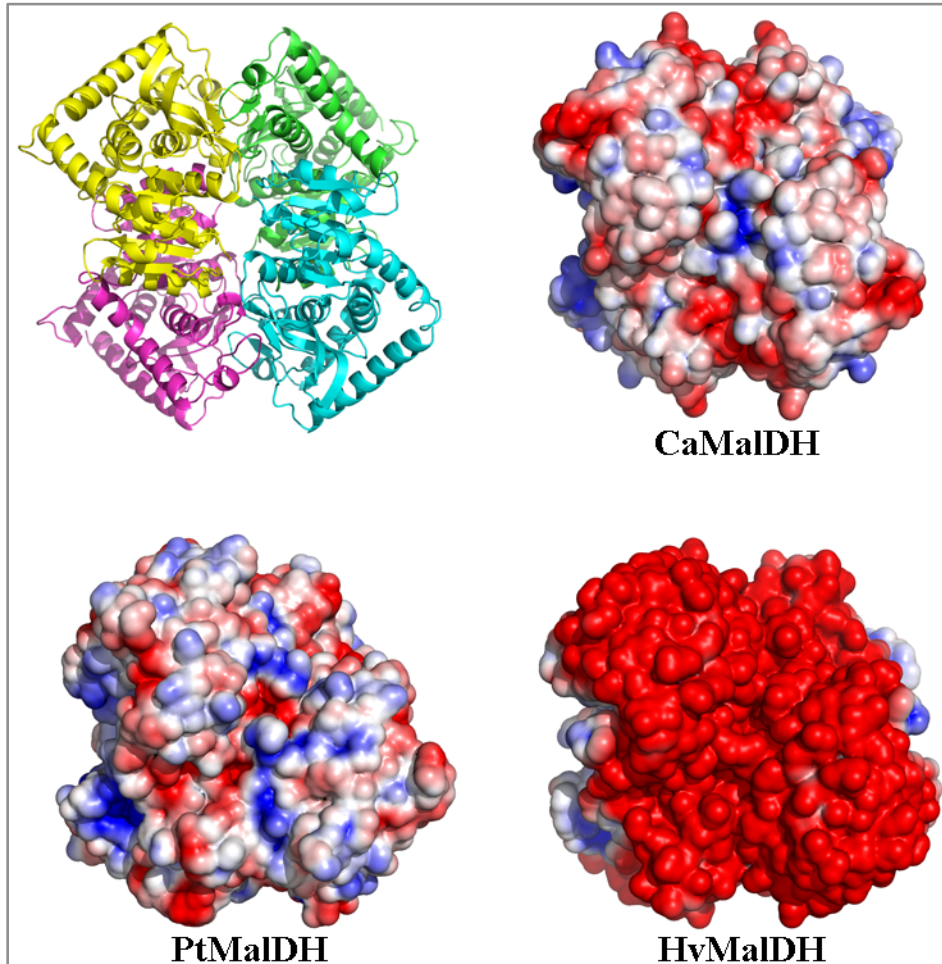


Figure 1.10 : Surfaces électrostatiques (calculées à l'aide du programme APBS) des trois malate déshydrogénases tétramériques issues de *Chloroflexus aurantiacus*, *Picrophilus torridus* et de *Haloferax volcanii* utilisées pour la compréhension fine des modes d'interaction des composés IRM. Les surfaces sont représentées du plus électronégatif (rouge ; $-3kT/e$) au plus électropositif (bleu ; $+3kT/e$).

En fonction des mutations d'acides aminés liées à l'adaptation ainsi que des positions conservées, on dispose d'un ensemble de conditions physico-chimique permettant d'étudier finement les interactions entre la protéine et les complexes. Ceci est renforcé par le fait que les MalDH cristallisent dans au moins deux conditions différentes. Le tableau 1 résume actuellement l'état de nos tests sur une série de malate déshydrogénases pour trois complexes issus de l'IRM.

Nom de l'organisme dont est issue la MalDH	Caractère de l'organisme	Conditions de cristallisation	Ln-HPDO3A	Ln-DO3A	Ln-DTPABMA
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Bactérie Thermophile	100 mM acétate de Na pH 4,6 40 mM acétate de Cd 4 - 12 % PEG 400	+++	+++	-
<i>Picrophilus torridus</i>	Archée Thermo-acidophile	100 mM acide citrique pH 3.5 1,5 M sulfate ammonium	+++	+	-
<i>Haloferax volcanii</i>	Archée Halophile	100 mM Tris HCl pH 8.0 100 mM chlorure de Mg 34-36 % PEG 400	-	-	+++
<i>Haloarcula marismortui</i>	Archée Halophile	Recherche en cours	En cours	En cours	En cours
<i>Natrialba magadii</i>	Archée Halophile	Recherche en cours	En cours	En cours	En cours
<i>Thermoanaerobacter marianensis</i>	Bactérie Piézo-thermophile	Recherche en cours	En cours	En cours	En cours

Tableau 1 : Résumé des résultats préliminaires de l'étude de l'interaction de trois complexes IRM sur les malate déshydrogénases. Légende : - = Pas de fixation ; + = fixation faible, site détecté par synthèse de Fourier anormale ; +++ = fixation forte, phasage *ab initio* par la méthode SAD possible

I.7. Protéines de structures inconnues déterminées à l'aide des complexes.

Lors de nos tests, nous évaluons le pouvoir phasant des complexes en déterminant la structure des protéines modèles comme s'il s'agissait de structures inconnues en utilisant l'information anormale obtenue sur la base de données de diffraction enregistrées aussi bien au laboratoire qu'au synchrotron. On peut ainsi citer le lysozyme de blanc d'œuf de poule (129 acides aminés dans l'unité asymétrique), la thaumatine de *Thaumatococcus danielli* (207 acides aminés), la glucose isomérase de *Streptomyces rubiginosus* (388 acides aminés), la catalase de *Proteus mirabilis* (4 x 484 acides aminés), l'urate oxydase de *Aspergillus flavus* (4 x 301 acides aminés), etc.

Le tableau suivant indique un certain nombre de protéines dont la structure a été déterminée à l'aide nos composés.

Nom de la protéine	Complexe utilisé	Code pdb	Référence
Ketopantoate Hydroxymethyltransferase <i>M. tuberculosis</i>	Gd-HPDO3A	1oy0	(Chaudhuri et al., 2003)
Protéine chimérique 1b11	Gd-DO3A	2bh8	(de Bono et al., 2005)
Phosphorylcholine esterase Pce	Gd-HPDO3A	2bib	(Hermoso et al., 2005)
Protéine YeaZ de <i>Escherichia coli</i>	Gd-DOTMA	1okj	(Jeudy et al., 2005)
Full-length Enzyme I of the Phosphoenolpyruvate-dependent Sugar Phosphotransférase System	Gd DTPA-BMA	2hro	(Márquez et al., 2006)
PAB0955 : a GTPase from <i>Pyrococcus abyssi</i>	Gd-DTPA-BMA	1yr6	(Gras et al., 2007)
CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from <i>S. pneumoniae</i>	Gd-HPDO3A	2v04	(Molina et al., 2009a; Molina et al. 2007; Molina et al., 2009b)
Lipocalin domain of Violaxanthin deepoxidase (VDE)	Gd-HPDO3A	3cqn	(Arnoux et al., 2009)
Modular killing factor LytC from <i>S. pneumoniae</i>	Gd-HPDO3A	2ww5	(Pérez-Dorado et al., 2010a; Pérez Dorado et al., 2010b)
UDP-N- acetyl-mannosamine Dehydrogenase Cap5O from <i>S. aureus</i>	Na ₃ [Eu(DPA) ₃ ³⁻]	3ojl	(Gruszczyk et al., 2011)

Tableau 2 : Structures inconnues déterminées à l'aide des composés de lanthanides.

Je n'ai pas fait apparaître dans ce tableau les structures de malate déshydrogénases dont nous avons déterminé la structure et qui depuis lors nous servent depuis de modèles (Paragraphe I.6), en particulier la structure de la MalDH de *Chloroflexus aurantiacus*, celle de *Picrophilus torridus* et celle de *Haloferax volcanii*.

Je n'ai pas non plus indiqué les structures de grands assemblages protéiques afin de les décrire ici. Comme indiqué dans le paragraphe I.1, l'avantage majeur des lanthanides réside dans le fait que leur pouvoir phasant est très élevé, ce qui permet d'envisager de déterminer la structure de molécules de très grande taille. En utilisant les complexes décrits, nous avons déterminé la structure de trois assemblages protéiques (Figure 1.11) de masse moléculaire supérieure à 400 kDa : une protéine dodécamérique chimérique l'Ornythile Transcarbamoyle 3630 (Girard et al., 2003), la protéase octamérique Pab87 de *Pyrococcus abyssi* (Delfosse et al., 2009) et la protéase géante dodécamérique TET1 de *Pyrococcus horikoshii* (Talon et al., 2011).

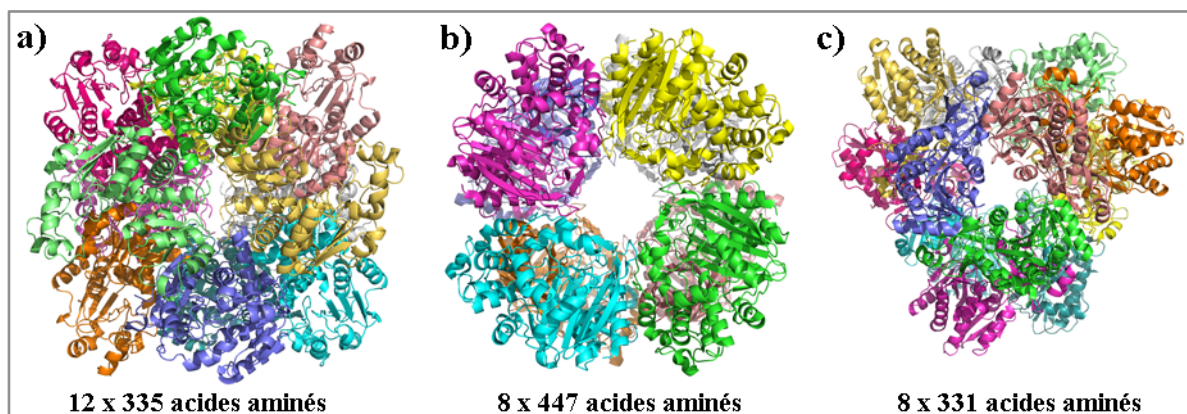


Figure 1.11 : Structures des assemblages protéiques de grande taille déterminées à l'aide des complexes de lanthanide (le complexe utilisé est indiqué entre parenthèse).

- a) OTCase3630 (Gd-HPDO3A), b) Pab87 de *P. abyssi* (Lu-HPDO3A)
 et c) TET1 de *P. horikoshii* (Eu-(DPA)₃³⁻)

A travers les exemples de Pab87 et TET1, je voudrais à nouveau mettre l'accent sur le potentiel considérable des complexes de lanthanide. Pab87 est une protéine auto-compartmentée appartenant à une nouvelle famille de protéases qui forme des octamères en forme de cube (CubicO). Pour déterminer la structure de cette protéine, des dérivés lourds classiques ont été testés sans succès (sels de platine, d'iridium, d'osmium et d'holmium, et protéine sélénée avec 13 méthionines par monomère). La structure de Pab87 a été résolue à l'aide du HPDO3A dans sa forme lutétium (Delfosse et al., 2009). Les cristaux dérivés ont été obtenus par co-cristallisation avec 200 mM de Lu-HPDO3A. L'introduction du complexe induit une forme triclinique différente des cristaux natifs (groupe d'espace C2). Ainsi, il a fallu déterminer la structure de l'octamère entier. Des données SAD à 2,2 Å de résolution ont été enregistrées au seuil L_{III} du lutétium. Les positions de 17 atomes de lutétium ont été déterminées ce qui a permis de résoudre la structure de l'octamère entier sans recours à la symétrie non-cristallographique.

TET1 illustre les capacités supra-moléculaire du Ln-(DPA)₃³⁻ et le pouvoir phasant des lanthanides sur des données à basse résolution. TET1 est aussi une protéase auto-compartmentée qui forme des particules à 12 sous-unités et cristallise sous deux formes. La première forme, de groupe d'espace F4₁32, a permis la résolution initiale de la structure à 3,1 Å de résolution (Porciero et al., 2005; Schoehn et al., 2006). Les cristaux obtenus appartiennent au groupe d'espace F4₁32. Plus récemment, une nouvelle forme monoclinique (groupe d'espace P2₁) a été cristallisée. Ces nouveaux cristaux diffractent à 2,1 Å de

résolution (Durá et al, en préparation). Sur la base des conditions de cristallisation conduisant à cette forme monoclinique, nous avons introduit du tris-dipicolinate d'euporium par co-cristallisation. Les données de diffraction ont été enregistrées sur la ligne de lumière FIP-BM30A à l'ESRF. En s'appuyant sur un spectre d'absorption, la longueur d'onde a été choisie dans le seuil d'absorption L_{III} de l'euporium et fixée à 1,766 Å ce qui correspond à la valeur maximale de f'' . De manière inattendue, l'intégration des données indiquait que l'on avait le groupe d'espace $F4_132$. Malheureusement, les cristaux ne diffractaient qu'à 4 Å de résolution. Toutefois, une fixation potentielle du complexe $Eu(DPA)_3^{3-}$ était visible dans les indicateurs anomaux ($R_{ano} = 6,8\%$ (7,8% dans la tranche à haute résolution) pour un $R_{merge} = 8,6\%$ (22,3%)). Nous avons donc décidé de tenter de déterminer cette structure sur la base des données SAD disponibles. Un site de fixation par monomère a été trouvé et le phasage à 4 Å de résolution a conduit à une carte de densité électronique expérimentale parfaitement interprétable. En effet, comme le montre la figure 1.12, la forme globale de la particule est facilement reconnaissable avec l'entrée du grand tunnel sur un côté de la particule, supposé être la porte d'entrée des peptides à dégrader, et de l'autre côté de la particule, le petit tunnel que l'on suppose être la sortie des acides aminés.

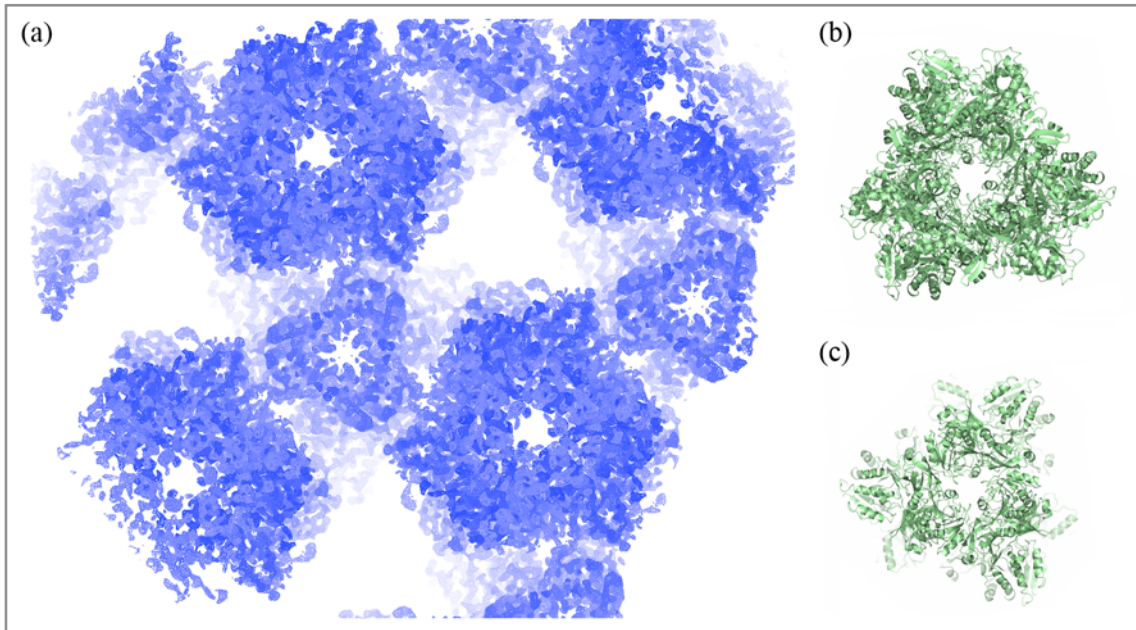


Figure 1.12 : a) Carte de densité électronique SAD à 4 Å de résolution (contour : 1,5 σ) montrant b) un des pores larges situés sur chaque face de la particule de PhTET1 qui permettent l'accès à l'intérieur de la particule et c) un des petits orifices situés sur chacun des 4 sommets.

Sur la Figure 1.13, on constate que la qualité de la carte expérimentale permet de tracer facilement la chaîne polypeptidique. En utilisant les données native à 3,1 Å de résolution qui ont permis de déterminer la structure initiale par remplacement moléculaire (Schoehn et al., 2006), nous avons aussi effectué un phasage par SIRAS qui conduit à une carte expérimentale de très bonne qualité et qui indique que l'introduction du $\text{Eu}(\text{DPA})_3^{3-}$ n'introduit pas un défaut d'isomorphisme.

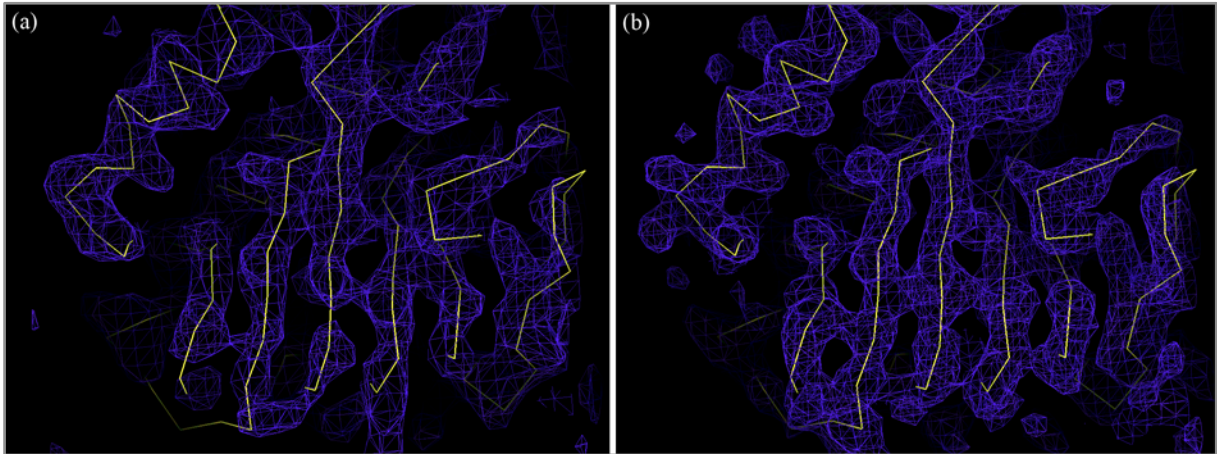


Figure 1.13 : Cartes de densité électronique (contour 1 sigma) expérimentales (a) obtenue par phasage SAD à 4 Å de résolution et (b) obtenue par phasage SIRAS à 3,1 Å.

Les exemples Pab87 et TET1 illustrent le fort pouvoir phasant des lanthanides comme indiqué dans le paragraphe I.1. Notons aussi que plus la protéine est grande, plus la probabilité d'obtenir des sites de fixation adéquats est forte. Cette méthode possède donc un potentiel considérable pour résoudre la structure de systèmes complexes.

I.8. La diffusion anormale dans un projet biologique

Depuis mon arrivée à l'IBS en 2007, je collabore avec l'équipe de Jacques Covès (Groupe Métalloprotéines). Son équipe s'intéresse à un complexe de trois protéines, CnrYXH, impliqué dans la transduction du signal transmembranaire chez la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 pour la mise en place de sa résistance aux métaux de transition, en particulier le cobalt et le nickel. Dans le modèle maintenant admis (Figure 1.14), CnrX est une protéine ancrée à la membrane qui possède le domaine senseur pour les métaux du côté périplasmique, CnrXs. Elle interagit avec la protéine bi topique CnrY qui séquestre CnrH du côté cytoplasmique (Grass et al., 2000; Tibazarwa et al., 2000). On suppose que la fixation du métal sur CnrX dans le périplasmie induit un signal qui est propagé à CnrY et qui conduit à la libération de CnrH dans le cytoplasme. CnrH interagit alors avec l'ARN polymérase déclenchant ainsi la réponse au stress ressenti. CnrH appartient à la famille des facteurs sigma de type ECF, pour ExtraCytoplasmic Function. La mise en jeu de ce type de facteur sigma est l'un des mécanismes majeurs chez les bactéries pour transmettre au niveau du cytoplasme l'information liée à un stimulus extra-cytoplasmique. Par extension, CnrY est un facteur anti-

sigma. Le but du projet est donc de comprendre les mécanismes moléculaires liés au transfert de l'information.

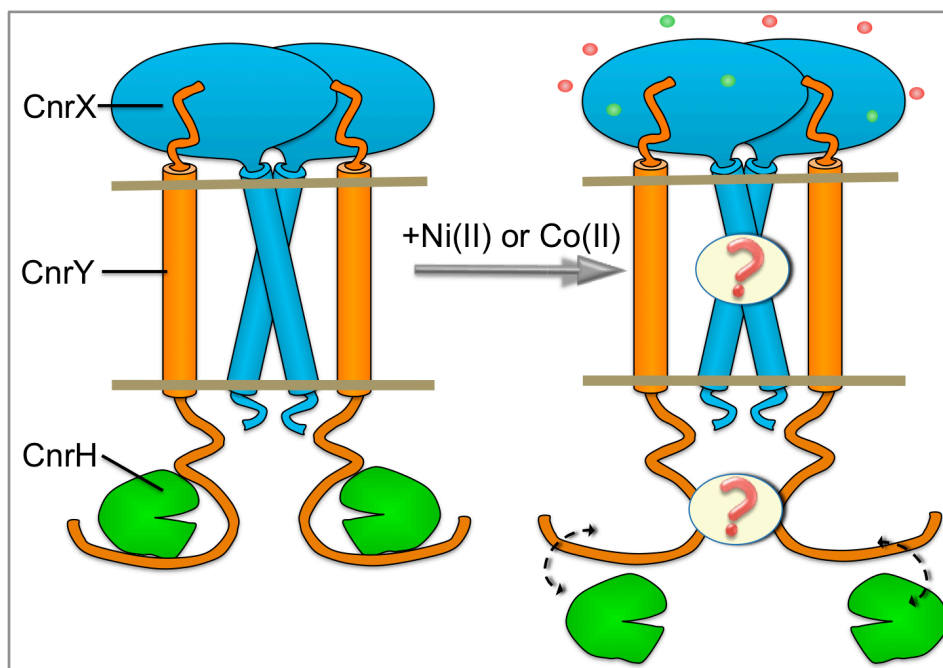


Figure 1.14 : Représentation schématique du complexe CnrYXH.

La première protéine étudiée est la partie soluble de CnrX, CnrXs, qui est supposée être le senseur de métal. Dans ce cas, nous avons étudié différentes formes métallées de CnrXs pour tenter de comprendre la spécificité de reconnaissance de cette protéine. En effet, la réponse aux métaux de *C. metallidurans* CH34 a été étudiée par des études transcriptomiques et *in vivo* sur la base d'un test reportant une activité β -galactosidase. Ces études montrent que les ions nickel sont de meilleurs inducteurs de la réponse au stress métallique que le cobalt et que les ions zinc sont de très mauvais inducteurs (Grass et al., 2000; Monchy et al., 2007; Tibazarwa et al., 2000). J'ai ainsi déterminé la structure de CnrXs en présence de Ni^{2+} , Co^{2+} et de Zn^{2+} ainsi qu'un mutant du site de fixation du métal, E63Q, afin de tenter de comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent une telle reconnaissance. Pour l'ensemble des structures, l'information anormale provenant des métaux intrinsèques a été utilisée soit pour résoudre *ab initio* la structure (formes métallées de CnrXs), soit pour détecter la présence de contamination par un métal (forme apo de CnrXs) ce qui nous a conduit à étudier le mutant E63Q, représentant une forme apo, et à proposer que la forme au repos de la protéine est une forme contenant du zinc. La comparaison des différentes structures (Trepreau et al., 2011) a permis de mettre en avant :

- le rôle majeur de la méthionine 123 dans la détection des ions métalliques inducteurs (Ni et Co).

- l'importance de l'assemblage dimérique

- le rôle d'une poche hydrophobe à l'interface entre les deux protomères.

La seconde protéine est le complexe, CnrH-Yc, entre le facteur sigma CnrH et la partie cytoplasmique soluble de CnrY (Figure 1.14). J'ai déterminé la structure de ce complexe par la méthode SAD et en utilisant un des complexes IRM, le Gd-DO3A. L'analyse de cette structure est en cours (Maillard *et al.*, en préparation).

Enfin, nous disposons de données de diffraction à 3,8 Å de résolution d'un homologue de la protéine CnrX, avec le segment transmembranaire. Malheureusement, les tentatives de remplacement moléculaire en utilisant les structures de la partie soluble restent pour l'instant infructueuses.

I.9. Résultats non escomptés : Episode I

Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, je profite de ce paragraphe pour illustrer le fait que la recherche fondamentale peut conduire à des résultats non escomptés au départ de l'étude et qui peuvent même avoir des débouchés industriels. Pour commencer je voudrais rappeler cette citation de H. Poincaré : *"Et alors, cela est bien clair. Le savant ne doit pas s'attarder à réaliser des fins pratiques ; il les obtiendra sans doute, mais il faut qu'il les obtienne par surcroît. Il ne doit jamais oublier que l'objet spécial qu'il étudie n'est qu'une partie d'un grand tout qui le déborde infiniment, et c'est l'amour et la curiosité de ce grand tout qui doit être l'unique ressort de son activité. La science a eu de merveilleuses applications, mais la science qui n'aurait en vue que les applications ne serait plus la science, elle ne serait plus que la cuisine. Il n'y a pas d'autre science que la science désintéressée."* (1911) Les Sciences et les Humanités. Arthème Fayard ed. Paris.

Le premier résultat concerne la modélisation du solvant. L'étude de la fixation des complexes sur la malate déhydrogénase de *Chloroflexus aurantiacus* nous a permis de modéliser un très grand nombre de molécules d'eau à partir du phasage expérimental SIRAS effectué avec le Gd-HPDO3A (Résolution des données 1,9 Å et 1,7 Å respectivement pour le cristal dérivé et pour le cristal natif). Le tétramère est composé de 1236 résidus, et, au cours de l'affinement, Romain Talon a pu modéliser 1937 molécules d'eau. Cela correspond donc à 1,57 molécules d'eau par résidu. De plus, nous avons mis en évidence des interactions particulières de ces

molécules qui forment des pentagones et certains de ces pentagones sont interconnectés formant des réseaux de plusieurs pentagones (Figure 1.15).

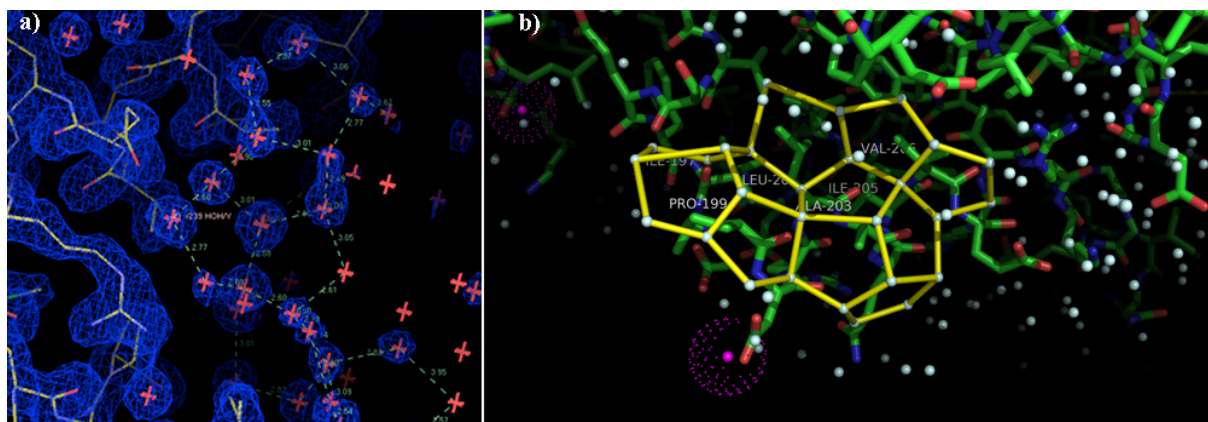


Figure 1.15 : a) Carte de densité électronique 2Fo-Fc (Contour 1 sigma) montrant l'organisation du solvant en pentagone observé chez la MalDH de *Chloroflexus aurantiacus* et b) Important réseau de pentagones interconnectés formant une « couverture » à la surface d'une zone hydrophobe de la protéine.

Cette structuration en polygone a été étudiée en particulier par le Professeur Nakasako (Nakasako, 1999; Nakasako, 2004) qui a récemment développé un programme permettant de prédire la structure du réseau d'hydratation autour des surfaces hydrophiles des protéines (Matsuoka and Nakasako, 2009; Matsuoka and Nakasako, 2010). L'observation de ces structurations en pentagone dans différentes structures de MalDH issues de différents organismes halophiles pourrait nous permettre d'apporter un nouvel éclairage sur le rôle du solvant dans cette adaptation, notamment dans les modèles d'exclusion des ions (Bonneté et al., 1994; Madern et al., 2000). D'un point de vue plus méthodologique, ces résultats posent la question de la précision de la modélisation du solvant ou de ligand lorsque la structure est obtenue par remplacement moléculaire par comparaison à une structure résolue *ab initio*. Nous avons débuté une série d'essais pour tenter de répondre à cette question. De manière préliminaire, il semble que le positionnement des chaînes latérales des acides aminés dans le modèle de départ à affiner ait un rôle important.

Le second résultat est lié aux effets supramoléculaires observés avec le tris-dipicolinate. Suite aux travaux de thèse de Guillaume Pompidor et à l'analyse du mode d'interaction impliquant les résidus arginine (Paragraphe I.6), l'équipe d'Olivier Maury (ENS Lyon) a tenté de reproduire et d'étudier l'interaction observée (mode d'interaction, mesure de constante d'affinité...). Son équipe a testé différentes molécules modèles pouvant mimer l'interaction

du DPA avec les arginines, mais aussi les lysines et les histidines afin de mieux comprendre l'affinité pour les arginines (Figure 1.16)

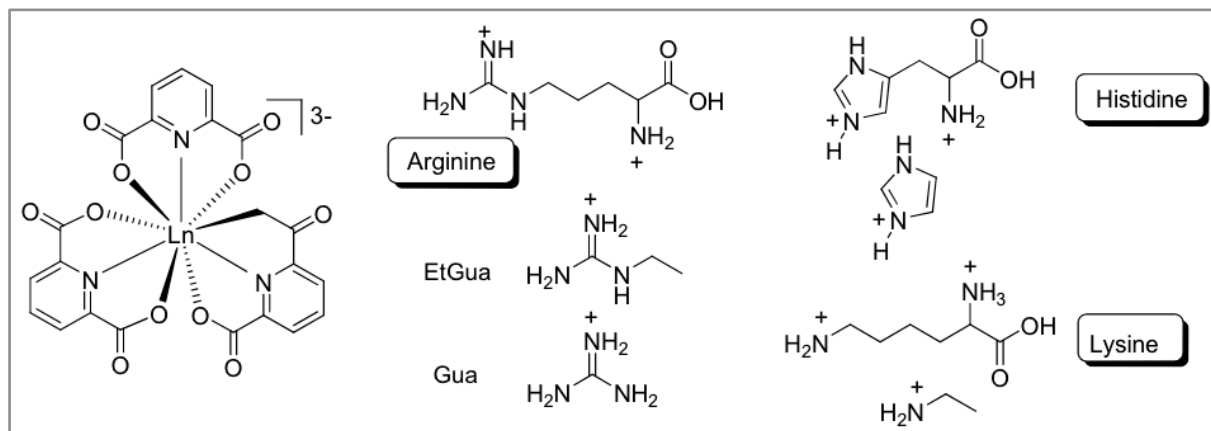


Figure 1.16 : Modélisation de l'interaction entre le tris-dipicolinate de lanthanide et des molécules modèles mimant les groupements principaux des acides aminés Arg, Lys et His.

En particulier, l'étude de l'interaction avec l'ion guanidinium (D'Aléo et al., 2007) a conduit à la formation de cristaux de plusieurs millimètres pour l'étude structurale (Figure 1.17). De tels cristaux pourraient avoir un fort potentiel pour l'éclairage grand public en remplacement des tubes au néon. L'équipe d'Olivier Maury évalue actuellement ce potentiel pour une application industrielle.

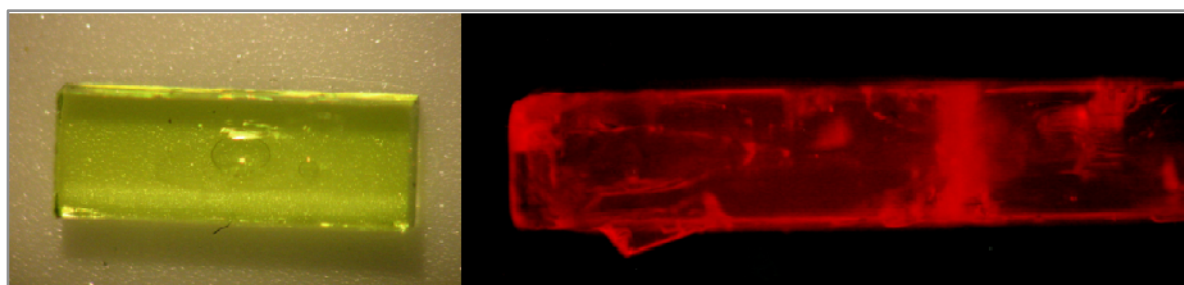


Figure 1.17 : Cristaux de $[Gua]_3[Pr(DPA)_3].0.25H_2O$ et de $[Gua]_3[Eu(DPA)_3].3H_2O$ sous illumination UV (254 nm).

Cet exemple illustre le propos de mon introduction. D'une étude fondamentale sur l'utilisation de complexes luminescents de lanthanide pour déterminer la structure des macromolécules et de la compréhension du mode d'interaction de ces complexes, une application industrielle potentielle apparaît.

I.10. Le futur

Dès lors que de bons complexes ont été trouvés, il faut étudier comment les mettre à la disposition de la communauté des bio-cristallographes. Depuis deux ans, une partie de ces molécules est vendue sous forme d'un kit par la société NatX-ray avec laquelle un transfert de savoir-faire a été signé. Ce kit est composé de quatre ligands IRM (HPDO3A, DO3A, DOTA et DTPA-BMA) et du tris-dipicolinate. Chaque ligand chélate soit un atome d'Yb pour les expériences synchrotron au seuil d'absorption L_{III} de ce lanthanide, soit un atome de Eu pour la détection de la fixation par luminescence et pour les expériences sur générateur de laboratoire. Ceci constitue donc une valorisation directe de nos travaux.

Le prolongement logique de ces travaux est bien entendu de continuer la quête du complexe idéal. Sur la base des connaissances actuelles, il faudrait mettre au point un complexe possédant la stabilité des complexes IRM combinée à la luminescence du tris-dipicolinate. Il reste à déterminer quel mode d'interaction serait le plus versatile et l'étude comparative lancée sur les malate déhydrogénases devrait nous permettre de comprendre en détail les interactions et de faire le choix des fonctions chimiques nécessaires à une forte fixation.

Une seconde voie à creuser est la recherche d'un agent d'aide à la cristallisation des protéines. L'idée est de mettre à profit les propriétés supramoléculaires du tris-dipicolinate. Pour cela, il est nécessaire de bien comprendre le mode d'interaction de ce complexe, en particulier le rôle de l'agencement entre les résidus chargés (positivement) lysine et arginine et les résidus de la chaîne polypeptidique qui vont interagir (glycine). On imagine une étiquette, de type His-tag, comportant une séquence minimale d'interaction avec le DPA qui servirait d'agent pontant entre plusieurs molécules de protéine et ainsi induirait un point de nucléation pour l'obtention d'un cristal.

Enfin, à moyen terme, il serait intéressant de reprendre la problématique du phasage à basse résolution. Deux voies sont envisageables. La première est l'utilisation des complexes comme illustré à travers le projet TET (Paragraphe I.7), c'est à dire utiliser la fixation des complexes « de manière classique », leur fort pouvoir phasant permettant de compenser la faible résolution des données. Il faudra évaluer la contribution anormale qui persiste dans les facteurs de structure et ainsi déterminer les limites de détection des sites d'atomes lourds sur des données à très basse résolution (environ 5-6 Å) et la qualité des phasages. La seconde voie serait de reprendre le développement de la méthode MASC. D'un point de vue expérimental, notre connaissance des modes de fixation des complexes de lanthanides, même si elle doit être affinée, devrait permettre de fabriquer un complexe *ne se fixant pas* sur la protéine, donc

de réaliser, avec le diffuseur anomal diffusé aléatoirement dans la solution, une véritable expérience MASC. Ceci permettrait d'obtenir les modules des facteurs de structure de l'enveloppe. D'un point de vue théorique, il reste à pouvoir déduire l'enveloppe de la protéine à partir de ces facteurs de structure. Une équipe néo-zélandaise a montré qu'il était possible de déduire une enveloppe précise à partir d'un nombre limité d'amplitudes pour la transformée de Fourier (Lo et al., 2009; Lo and Millane, 2008). Ainsi, il semble que les linéaments pour obtenir la structure *ab initio* d'une protéine à basse résolution soient disponibles. Nous envisageons d'utiliser les protéases TET pour réaliser des tests dans cette direction et obtenir des données expérimentales. Une collaboration avec l'équipe néo-zélandaise sera alors à considérer afin d'appliquer leur algorithme sur ces données. Les domaines d'application de cette méthode incluront les grands complexes protéiques, les complexes multi-protéiques et les protéines membranaires. De manière pragmatique, on peut se poser la question de l'intérêt d'un tel développement comparé aux techniques en plein essor que sont la diffusion des rayons X aux petits angles, la microscopie électronique et plus récemment la tomographie. L'avantage de la méthode MASC pourrait résider dans la possibilité d'obtenir de l'information de phase à résolution plus élevée. De plus, on peut envisager d'obtenir de l'information de phase expérimentale à très basse résolution (disons 7-8 Å) par la méthode MASC puis d'effectuer une extension de phase sur des données natives obtenues à plus haute résolution.

Chapitre II

Biophysique sous hautes pressions

Chapitre II : Biophysique sous hautes pressions

Introduction :

La pression est le rapport d'une force sur une surface. L'unité internationale est le Pascal. Ainsi 0,1 MPa correspond à 1 bar et donc 100 MPa = 1 kbar. Une colonne d'eau de 1000 m produit donc une pression de 10 MPa (100 bar).

Notre planète est recouverte à 70 % par l'eau. La profondeur moyenne des océans est de l'ordre de 3800 m soit une pression moyenne de 38 MPa. La pression peut atteindre plus de 100 MPa dans les fosses sous-marines les plus profondes comme la fosse des Mariannes. Il est à noter que le fond des océans est un milieu froid (3°C) à l'exception des sources hydrothermales profondes où la température peut excéder 100°C. Au niveau du manteau terrestre, si l'on considère que la température limite pour la vie est de l'ordre de 120°C (*Methanopyrus kandlerii* (Takai et al., 2008), on peut donner une limite de l'ordre de 5000 m de profondeur. Si l'on considère que la pression limite est actuellement de 150 MPa (*Pyrococcus yayanosii*, voir paragraphe suivant), la limite est alors au environ de 4000 m de profondeur dans la croûte terrestre. La température et la pression limitent *a priori* le domaine possible pour la vie. Toutefois, ces biotopes sous pression, compte tenu de leur large proportion, contribuent de manière significative à la production et au recyclage du carbone sur Terre (Whitman et al., 1998) et représentent plus de 60 % de la biosphère. Il se pose ainsi la question de l'adaptation des organismes aux hautes pressions.

II.1. Piézophilie

Les organismes isolés des grands fonds marins sont identifiés en nombre croissant. A titre d'exemple, on peut citer l'observation (Jamieson et al., 2009) d'un groupe de poissons à 7000 m de profondeur (un enregistrement vidéo est disponible à l'adresse <http://www.nerc.ac.uk/press/releases/2008/54-deepfish.asp> et Figure 2.1).



Figure 2.1 : Poissons de la famille des liparidés (*N. kermadecensis*) observés à 6900 m de profondeur (Jamieson et al., 2009).

On peut aussi citer la découverte récente du premier organisme piézophile et hyperthermophile qui a été nommé *Pyrococcus yayanosii* CHI (Birrien et al., 2011; Xu et al., 2011; Zeng et al., 2009). Cette nouvelle archée est capable de croître sur une gamme de température allant de 85 à 105°C et sur une gamme de pression de 15 à 150 MPa avec une croissance optimale à 98°C et 52 MPa. *P. yayanosii* n'est pas capable de croître en dessous de 15 MPa.

Au cours des 5 dernières années, de nombreuses revues ont abordées la question de la piézophilie sous différents éclairages (Abe, 2007; Lauro and Bartlett, 2008; Oger and Jebbar, 2010; Simonato et al., 2006). La figure 2.2 ci-dessous résume les effets de la pression sur un système biologique (Oger and Jebbar, 2010).

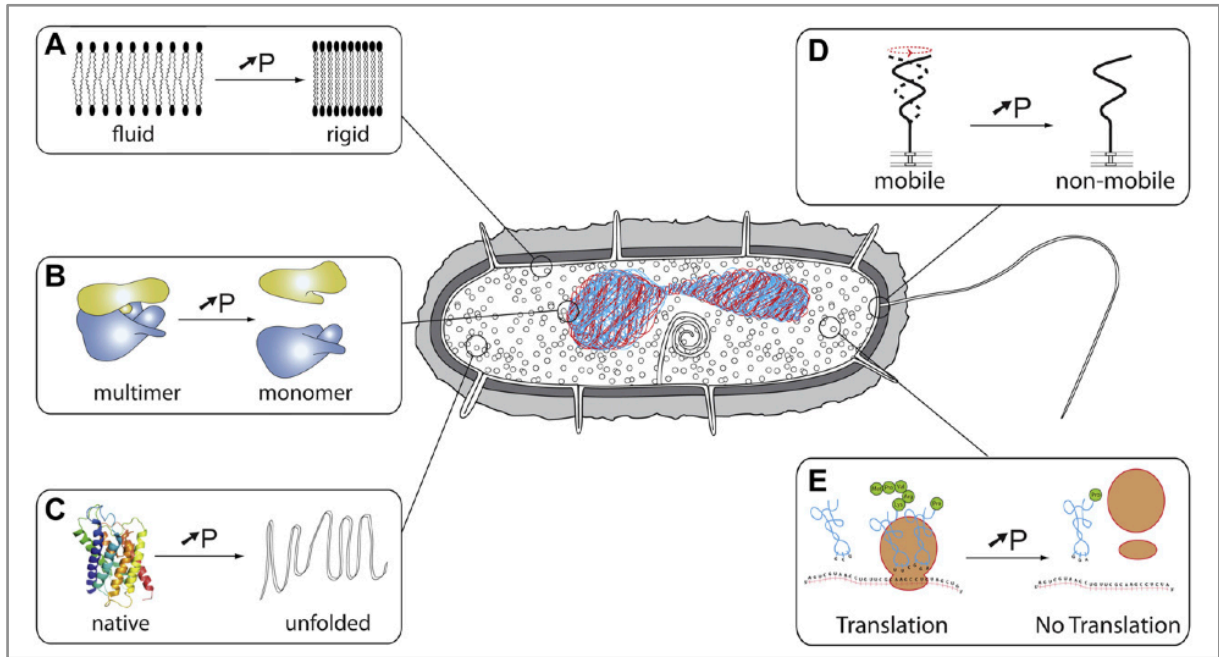


Figure 2.2: Exemples des effets de la haute pression hydrostatique sur les cellules et sur ses composants.

La pression a tendance à stabiliser l'ADN (Voir paragraphe I.9). Au niveau des membranes, la bicouche lipidique perd sa fluidité et devient imperméable au passage des molécules car les lipides modifient leur conformation et leur empilement sous pression. Les protéines sont, elles aussi, affectées par des déstabilisations/modifications de leurs états oligomériques, et par des perturbations de leur activité catalytique. Ainsi, une cellule doit faire face à un certain nombre de déficiences au niveau des fonctions cellulaires telles que les activités de transport à travers la membrane, la motilité, la synthèse des protéines... Trois mécanismes principaux ont été proposés pour expliquer la capacité de certains organismes à croître sous pression : 1) une régulation fine de l'expression du génome afin de compenser les pertes d'activités biologiques (Campanaro et al., 2005) ; 2) la présence et l'expression de gènes spécifiques d'adaptation à la pression (Kato and Qureshi, 1999); 3) la présence d'adaptations au niveau des biomolécules (protéines ; osmolytes spécifiques ou « piézolytes »)(Chilukuri and Bartlett, 1997). De nombreuses observations contradictoires militent en faveur de l'un ou l'autre des mécanismes. La difficulté est que l'on ne dispose que d'un petit nombre de génomes séquencés d'organismes piézophiles et que les études extensives effectuées jusqu'à présent concernent des organismes piezo-sensibles, comme *E. coli* ou *S. cerevisiae*, ou des organismes piézophiles modérés, comme *Photobacterium profundum SS9* ($P_{opt} = 28$ MPa) ou *Pyrococcus Abyssii GE5* ($P_{opt}=20$ MPa). Il est probable que les effets de la pression seront plus

marqués sur des organismes piézophiles stricts tels *Pyrococcus yayanosii* CH1 et que leur étude apportera un nouvel éclairage à la piézophilie.

A mes yeux, une autre difficulté est que la majorité des organismes piézophiles sont aussi soit des thermophiles, soit des psychrophiles, ce qui témoigne d'un lien étroit entre la pression et la température. A titre d'exemple de ce lien étroit, lorsqu'on expose *E. coli* à la pression, la bactérie exprime à la fois des protéines de chocs thermiques froid et chaud (cold- and heat-shock proteins) (Simonato et al., 2006). La pression est ainsi le seul stress qui peut induire l'expression des deux types de protéines (Bartlett, 2002).

On peut supposer que l'adaptation piézophile, si elle existe, fait intervenir un savant mélange des mécanismes décrits ci-dessus. Une autre possibilité est que la pression, qui par certains aspects agit comme la haute température et par d'autres aspects comme la basse température, serait un régulateur fin des effets de la température.

II.2. Capture et étude d'états conformationnels

Les protéines présentent, outre l'état natif, de multiples conformations, en lien avec la fonction de la protéine, le repliement ou le dépliement de la protéine. Ces différents états possèdent des enthalpies libres (Gibbs free energy) légèrement différentes et présentent des volumes partiels qui leur sont propres et qui incluent la contribution de la couche d'hydratation. Selon le principe de Le Chatelier-Braun, si un système chimique à l'équilibre fait face à un changement d'un paramètre physico-chimique (concentration, température, pression...), l'équilibre est déplacé vers l'état qui contrebalance tout ou partie du changement. Ainsi la pression déplace l'équilibre vers l'état le plus compact. Ce déplacement peut-être réalisé de 2 manières.

La première manière est une compression, dite élastique, des conformères (appartenant à un même sous-ensemble) présents en solution (Figure 2.3). Comme le volume d'une macromolécule peut être décomposé en $V = V_{\text{atomes}} + V_{\text{cavités}} + V_{\text{hydratation}}$, et que V_{atomes} est invariant dans la gamme de pression considérée, les changements de volume, et donc de distances, induits par la pression sont dus à des modifications des interactions entre les acides aminés ou entre les acides aminés et le solvant.

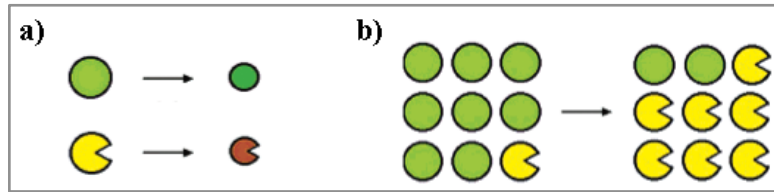


Figure 2.3 : Représentation schématique des effets de la pression sur une protéine en solution. a) Compression élastique à l'intérieur d'un sous-ensemble de conformères. b) Déplacement de l'équilibre conformationnel entre deux sous-ensembles. (Adapté de Akasaka, 2006).

La seconde manière est de déplacer l'équilibre vers un sous-ensemble de conformères de volume partiel plus faible (Figure 2.3). Si l'on considère deux sous-ensembles, un sous-ensemble natif N et un autre sous-ensemble I, la constante d'équilibre K du système peut changer avec la pression selon :

$K = [I]/[N] = \exp(-\Delta G/RT)$ où la variation d'enthalpie libre ΔG peut être représentée par le développement au second ordre :

$$\Delta G = G_I - G_N = \Delta G_0 + \Delta V_0(p - p_0) - (1/2)\Delta\beta V_0(p - p_0)^2$$

où l'indice 0 se réfère aux valeurs à P et T ambiants, R est la constante des gaz parfaits, $\Delta\beta$ est la variation, entre les deux états, de la compressibilité isotherme $\beta = -(1/V)(\partial V/\partial P)_T$, $\Delta V = V_I - V_N$ est la différence de volume molaire partiel.

Illustrons cela par un exemple. Considérons un système à 293 K où $\Delta G_0 = 2 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta V_0 = 50 \text{ mL mole}^{-1}$. A pression ambiante, l'état N sera peuplé à 97 % alors qu'à une pression de 400 MPa, ce sera l'état I qui sera peuplé à 83 %. La pression permet donc d'amplifier la proportion des conformères d'un sous-ensemble normalement non-observable dans les conditions normales de pression.

Il convient aussi de noter que dans le cas où l'on effectue une expérience en faisant varier la pression (à T constante), l'énergie que récupère la protéine n'est que de quelques kilocalories par mole et ce gain énergétique se produit de manière mécanique (à travers la variation de volume). Par comparaison, une expérience où l'on fait varier la température (à P constante), l'énergie que récupère la protéine est de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines, de kilocalories par mole et ce gain affecte autant l'énergie interne que l'entropie. La pression est donc un moyen « doux » d'explorer l'espace conformationnel d'une protéine que l'on peut résumer par la figure suivante :

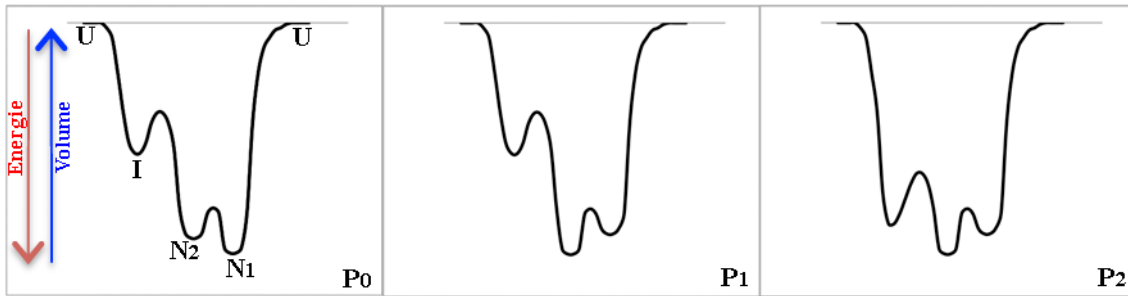


Figure 2.4 : Illustration de l'exploration par la pression du paysage conformationnel d'une protéine possédant à pression ambiante P_0 deux conformations (N_1 et N_2) dans l'état natif, un état intermédiaire I et un état déplié U.

II.3. Biotechnologie

Je ne ferai pas ici une description détaillée des applications de la haute pression qui sont actuellement utilisées en biotechnologie. Elles sont reliées aux deux thématiques décrites précédemment. Un article de revue récent par Rivalain et al. (2010) décrit en détail ces applications.

Parmi elles, on peut citer des applications dans l'industrie agroalimentaire :

- pour la stérilisation des aliments, mais avec l'avantage majeur de préserver les qualités nutritionnelles (préservation des vitamines) et le goût des aliments contrairement (en général) aux traitements par la température,
- pour diminuer l'allergénicité des aliments ou augmenter leur digérabilité.

On peut citer aussi des applications dans l'industrie pharmaceutique et le monde médical :

- désinfection des bio-matériaux (prothèses),
- inactivation de virus et pathogènes – application pour la production de vaccins,
- préparation de vecteurs viraux.

Et enfin, des applications pour les activités de laboratoire :

- Transformation de cellules compétentes,
- Extraction cellulaire,
- Renaturation.

Enfin, les protéines issues d'organismes piézophiles trouveront certainement des applications dans les différents domaines mentionnés ci-dessus.

II.4. Biocristallographie sous haute pression : instrumentation.

Une manière d'appréhender les effets de la haute pression hydrostatique est de comprendre son influence au niveau moléculaire. Pour cela, un grand nombre de techniques biophysiques utilisées à pression ambiante ont été adaptées aux études sous pression. Cela comprend la fluorescence, la spectroscopie infrarouge, la diffusion de lumière et la diffusion X aux petits angles, la résonance magnétique nucléaire et la cristallographie. Toutefois, d'un point de vue structural, seule une vingtaine de structures sous pression a été déposée à la PDB, incluant les structures obtenues par RMN et par cristallographie des rayons X. La RMN sous haute pression est la spécialité d'un petit nombre de laboratoires: autour de K. Akasaka au Japon (à l'origine de ce développement), de H.R. Kalbitzer en Allemagne, de M.P. Williamson en Grande-Bretagne et très récemment de C. Royer en France.

En ce qui concerne la cristallographie sous haute pression (HPMX pour High-Pressure Macromolecular Crystallography), la première expérience réalisée en 1986 par Kundrot et Richards (Kundrot and Richards, 1986) utilisait une cellule en béryllium pour laquelle la pression est limitée à environ 200 MPa et l'observation optique de l'échantillon n'est pas possible. Cette cellule présente par contre une ouverture angulaire maximum. Ce système a été modifié par le groupe de Sol Gruner à CHESS (Collins et al., 2010; Urayama et al., 2002) et, plus récemment, ce même groupe a développé un système dans lequel le cristal est comprimé dans de l'hélium jusqu'à une pression maximum de 500 MPa, puis rapidement congelé à 100K avant que la pression soit relâchée (Barstow et al., 2009; Chen et al., 2009; Kim et al., 2009; Kim et al., 2005). L'enregistrement des données de diffraction est alors réalisé de manière classique à 100K et à pression ambiante, mais dans un état thermodynamique mal défini.

L'utilisation d'une cellule à enclumes de diamant (CED) en biocristallographie a été proposée par Katrusiak et Dauter (Katrusiak and Dauter, 1996) qui ont effectué des mesures de compressibilité de la maille cristalline de cristaux de lysozyme sans toutefois enregistrer des jeux de données complets.

Une cellule à enclumes de diamant est un système versatile composé de deux diamants qui enserré un joint métallique dans lequel a été percé un trou (Figure 2.5). C'est ce système que nous avons adopté pour nos études.

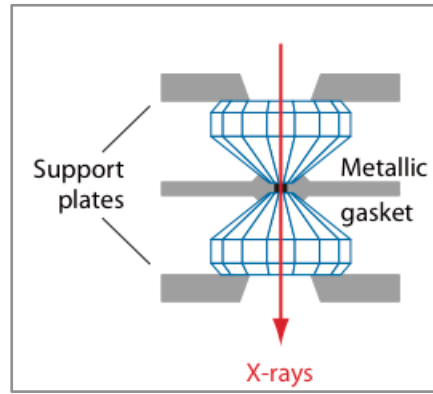


Figure 2.5 : Schéma de principe d'une cellule à enclumes de diamant.

La cavité contenant l'échantillon est formée par les parois du trou percé dans le joint et les surfaces des deux diamants et est ainsi hermétiquement close. Nous avons graduellement amélioré les CED en vue des expériences de bio-cristallographie. Les premières expériences sur le lysozyme de blanc d'œuf de poule et sur le virus de la mosaïque du niébé (Cowpea Mosaic Virus, CpMV) se sont déroulées à l'aide d'une cellule présentant une ouverture utile de l'ordre de 42° , ce qui signifie qu'une rotation de la CED sur la tête goniométrique de 42° peut être réalisée sans que les clichés de diffraction soient masqués en tout ou en partie. L'utilisation de cette cellule à ouverture limitée, utilisée pour des expériences à très haute pression, était envisageable pour des cristaux possédant une haute symétrie, comme la forme quadratique du lysozyme ou la forme cubique du CpMV. Au cours de ces dernières années, nos développements techniques ont consisté à augmenter cette ouverture utile et à diminuer les inconvénients de l'ouverture relativement réduite de la cellule dans l'enregistrement des intensités diffractées. Nous avons d'abord utilisé une cellule avec une ouverture utile de 62° , que nous avons combinée à des outils permettant de modifier l'orientation des cristaux dans la cavité. En effet, les cristaux, compte tenu de leur morphologie, se placent généralement sensiblement de la même manière sur les culots des diamants, ce qui limite le domaine d'espace réciproque accessible et donc la complétude des données enregistrées. Pour désorienter les cristaux, nous avons utilisé des microsoutports en nitrure de bore taillés en biseau, ainsi que des éclats de diamants issus d'une enclume cassée. Seuls ces derniers permettent une utilisation aisée et nous avons montré que leur utilisation permettait d'obtenir un jeu de données complet sur des cristaux de symétrie orthorhombique. Nous avons ensuite franchi un pas supplémentaire avec une CED équipée de diamants à embase conique (Boehler and De Hantsetters, 2004) qui combinent une bonne résistance mécanique et une grande ouverture utile (ici plus de 82° utiles) (Figure 2.6).

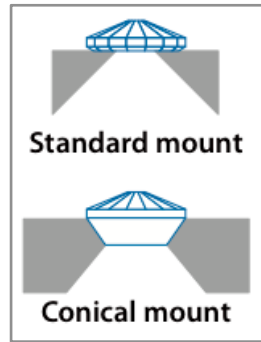


Figure 2.6 : Principe du montage de type Boehler (diamants coniques) comparé au montage classique des diamants.

Les cellules décrites précédemment utilisent un transfert de la force sur le piston par une membrane métallique qui est gonflée à l'aide d'hélium, telle une chambre à air. Plus récemment, une cellule, dite pneumatique (Figure 2.7), a été revisitée sur la base d'un modèle initialement développé par Roger Fourme (Fourme, 1968). Dans cette cellule, le piston est poussé par un piston annulaire muni de deux joints toriques, ce qui permet d'avoir une poussée rigoureusement axiale et plus linéaire.. Cette CED est également équipée de diamants coniques de type Boehler avec une ouverture utile de 82° . La surface des culots de diamant a été ajustée pour un domaine de pression utile jusqu'à 2 GPa au moins avec une cavité de compression de 400 microns de diamètre et de 200 microns d'épaisseur. Ceci permet de comprimer soit un cristal assez volumineux (par rapport aux expériences usuelles de cristallographie) soit plusieurs petits cristaux. Enfin, la cellule est équipée d'un système de chauffage ($20-125^\circ\text{C}$).



Figure 2.7 : CED pneumatique

L'ensemble de ces développements sont décrits dans les publication suivantes : (Fourme et al., 2003; Girard et al., 2007; Girard et al., 2010a).

La technique proposée par l'équipe de Sol Gruner (pressurisation suivie d'une congélation rapide à 100 K), a l'avantage de permettre des enregistrements en condition cryogénique dans les conditions classiques de la biocristallographie à pression ambiante. En revanche, le domaine de pression accessible est limité à environ 0.5 GPa, et surtout l'état de l'échantillon n'est pas bien déterminé, l'expérience montrant que le cristal trempé ne garde qu'une mémoire partielle, et par ailleurs peu reproductible d'une expérience à l'autre, des modifications provoquées par la compression initiale. Dans notre cas, le cristal est en équilibre thermodynamique, la reproductibilité est *a priori* excellente et la pression couvre un domaine beaucoup plus étendu (au moins 2 GPa). La pression effective de l'échantillon dans la cellule est déterminée par le déplacement d'une raie de fluorescence d'une microsphère de rubis illuminée par un faisceau laser (Système PRL de la société Betsa) et peut être modulée finement.

Il n'existe aucune ligne synchrotron de cristallographie dédiée à la biocristallographie haute pression, et celles qui sont capables d'atteindre les énergies de photons souhaitées (au moins 30 keV) sont peu nombreuses. La quasi-totalité de nos expériences a donc été effectuée sur la ligne généraliste de diffraction sous pression ID27 de l'ESRF, qui a été graduellement équipée pour les besoins de la cristallographie biologique. Afin de pallier les temps de faisceau très limités dont nous disposons sur cette ligne, nous utilisons aussi une ligne de cristallographie sur aimant de courbure, qui a l'inconvénient d'avoir une énergie de photons limitée à moins de 20 keV, mais aussi l'avantage de disposer d'un robot passeur d'échantillon CATS (Jacquamet et al., 2004; Jacquamet et al., 2009). Ce robot, développé par l'équipe de la ligne de lumière FIP-BM30A de l'ESRF, permet de placer sur la tête goniométrique les cristaux stockés dans un dewar. En outre, ce robot permet de tester les cristaux directement dans les plaques de cristallisation, et d'effectuer des enregistrements de données. Nous avons développé une plaque support mimant une plaque de cristallisation dans laquelle on peut placer la CED et qui peut être saisie par la même pince. Le centrage du cristal s'effectue de manière classique à l'aide du système optique de vision dans l'axe du faisceau (OAV pour On-Axis Viewer). L'enregistrement des données est réalisé avec une rotation horizontale de l'axe du robot et le détecteur ADSC Q315r de la ligne. Nous avons montré que dans ces conditions, il est possible d'enregistrer des données de bonne qualité. Ces développements sont décrits en détails dans la publication Girard, Fourme et al. (2010).

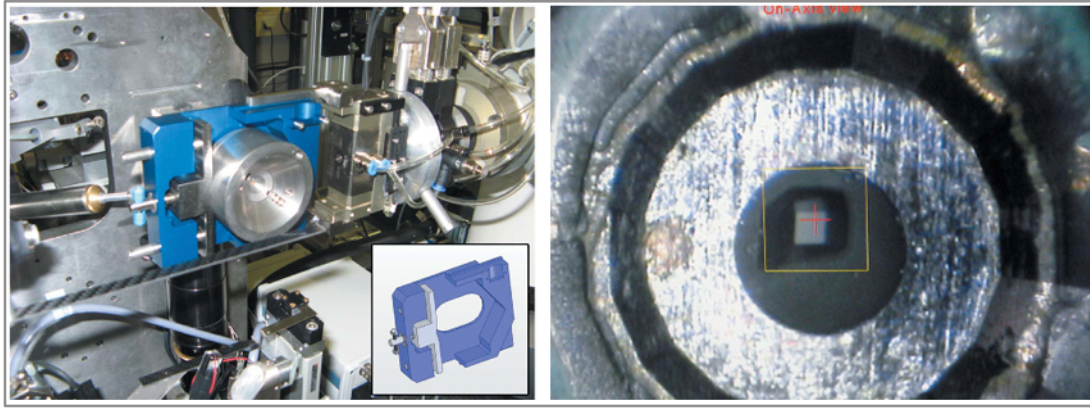


Figure 2.8 : CED pneumatique portée par le bras du robot CATS de la ligne de lumière BM30A-FIP de l'ESRF (à gauche). L'insert représente la plaque support dans laquelle est placée la cellule. A droite : cristal de lysozyme dans la chambre de compression observé avec le système OAV.

Depuis une année, nous essayons d'implémenter le même dispositif sur la ligne PXII-X10SA au centre suisse de rayonnement synchrotron (Swiss Light Source) qui dispose du robot CATS. L'avantage de cette ligne de lumière, en plus d'être une ligne sur élément d'insertion, est de posséder un détecteur pixel de type PILATUS. Ce détecteur de grande taille (2463 x 2527 pixels) présente en particulier un temps de lecture très rapide (40 ms) ce qui permet d'effectuer des enregistrements en rotation continue sans obturateur échantillon physique (Rajendran et al., 2011). Dans le cas d'une utilisation combinée du robot CATS et du détecteur PILATUS, la qualité des données est ainsi améliorée en limitant les erreurs de mouvement du goniomètre, ici, ceux du robot. Les essais préliminaires effectués en juin 2011, montrent qu'il est possible d'enregistrer des données de bonne qualité à haute résolution sur un domaine angulaire de 60°. Il reste à améliorer la procédure de centrage optique et les procédures d'enregistrement.

Nous avons également commencé à utiliser la ligne de cristallographie généraliste CRISTAL à SOLEIL, qui est équipée d'un gros diffractomètre multi-axes sur lequel prend place la CED pneumatique. Cette ligne est équipée d'un onduleur qui permet des enregistrements à 30 keV.

II.5. Biocristallographie sous haute pression : conditions expérimentales.

Je décris ici les conditions expérimentales que nous utilisons lors des expériences sur la ligne de lumière ID27 de l'ESRF dédiée à la haute pression.

En ce qui concerne la cavité qui accueille l'échantillon, nous utilisons des joints métalliques en Inconel X750 qui permet une réponse adéquate sur la gamme fournie par la cellule à

enclumes de diamant (après des essais avec de l'Inox, du cuivre de différentes duretés et du nickel). Les dimensions de la cavité sont de 200 μm d'épaisseur pour 400 μm de diamètre. La cavité est remplie avec la liqueur mère de cristallisation avant d'y placer le cristal à l'aide d'une boucle classique de cryo-congélation. La pression exercée sur le cristal est par conséquent totalement hydrostatique et isotrope au niveau de l'échantillon.

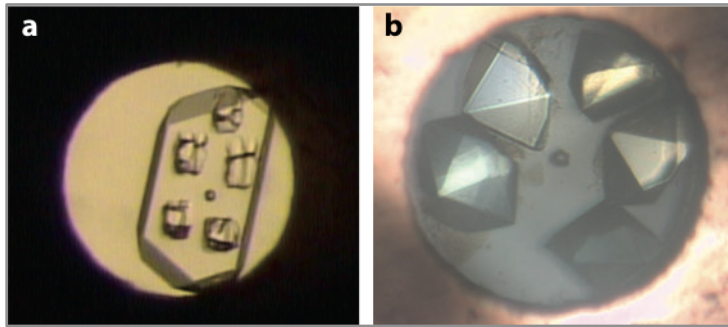


Figure 2.9 : Exemples de cristaux à l'intérieur de la cavité. (a) Cristal d'urate oxydase après exposition au faisceau. Les marques sur le cristal correspondent aux zones irradiées après plusieurs translations du cristal (cf. ci-dessous). (b) Cristaux de dihydrofolate réductase. Sur les deux photos, la sphère sombre correspond au rubis.

La ligne ID27 est une ligne sur éléments d'insertion. Elle est équipée de deux onduleurs sous vide produisant un faisceau de rayons X intense dans le domaine des hautes énergies (18 à 50 keV). De manière classique, nous travaillons au seuil d'absorption K du baryum, à 37 keV (0,331 Å), ou au seuil K de l'iode à 33 keV (0,374 Å). L'intérêt de travailler à ces énergies réside dans le fait que les diamants présentent, dans ces conditions, une transmission supérieure à 90 %. En outre, à de telles énergies, le cône de diffraction est peu ouvert puisque, par exemple, à 37 keV l'angle d'ouverture totale de ce cône, $4\theta_{\text{max}}$, est de seulement 25° pour obtenir des données à 1,5 Å de résolution. Par conséquent, l'ouverture limitée de la CED restreint le domaine de rotation durant l'enregistrement mais non la résolution des données de diffraction. Comme indiqué précédemment, l'enregistrement des données s'effectue à température ambiante (le système de chauffage n'a pas encore été mis à profit). Afin d'exploiter au mieux les cristaux, nous utilisons un faisceau de 50 μm x 50 μm et nous translatons le cristal devant ce faisceau plusieurs fois au cours de l'enregistrement (Figure 2.9). Enfin, les données de diffraction sont enregistrées sur un détecteur CCD RAYONIX de 165 mm. Ce détecteur, optimisé pour des photons de 12-13 keV, est le point faible du montage expérimental compte tenu de sa basse efficacité de 30 à 40 keV (moins de 20%) qui amène à une surexposition des cristaux sous faisceau.

En ce qui concerne l'acquisition et le traitement des données, nous enregistrons systématiquement un jeu de données de référence, enregistré à pression ambiante dans les mêmes conditions que les données sous haute pression, afin de limiter les biais expérimentaux lors de la comparaison des structures. Toujours dans l'idée de réduire les biais lors de la comparaison des structures, nous utilisons les mêmes programmes d'intégration, de mise à l'échelle, de remplacement moléculaire et d'affinement avec les mêmes paramètres et les mêmes critères. Ceci permet de disposer de structures dont les différences peuvent être attribuées aux effets de la pression. Compte tenu des différences fines observées et afin de compléter les données structurales, il est nécessaire, si le projet s'y prête, d'utiliser des techniques complémentaires sous haute pression

II.6. Plateforme sous haute pression de l'IBS.

Depuis maintenant deux ans, je suis co-responsable de la plateforme haute pression de l'institut. Le matériel appartenait initialement au service des santés de l'armée, CRSSA, de Grenoble. Comme pour l'ensemble des plateformes de l'IBS, nous venons d'obtenir la certification ISO9001. Outre la CED, la plateforme est composée d'un spectrophotomètre (Figure 2.10) et d'un fluorimètre équipés d'une bombe haute pression permettant des mesures jusqu'à 350 MPa et jusqu'à 80°C. Nous disposons aussi d'une bombe aveugle permettant l'incubation de solution jusqu'à 800 MPa.

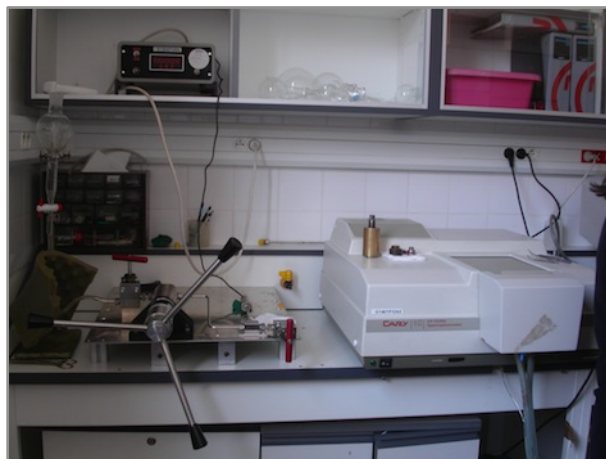


Figure 2.10 : Spectrophotomètre haute pression de la plateforme IBS

A ces techniques, il convient d'ajouter (comme illustré dans le cas de l'urate oxydase) la diffusion des rayons X aux petits angles et la spectroscopie infrarouge. Les expériences SAXS

peuvent être effectuées sur la ligne ID02 à l'ESRF qui possède une cellule pouvant travailler à différentes températures jusqu'à 300 MPa, et sur la ligne SWING à SOLEIL où une cellule pouvant travailler à 500 MPa est en cours de fabrication. Les expériences IR utilisent des cellules à enclumes de diamants équivalentes à celles des expériences de diffraction et peuvent être effectuées aussi bien sur des spectromètres commerciaux que dans les centres de rayonnement synchrotron (Ligne de lumière SMIS à SOLEIL, qui dispose d'une cellule CED à membrane qui prend place sur la platine d'un microscope classique ; notons aussi que SMIS est maintenant équipée d'un microscope à optique Cassegrain compatible avec des environnements très volumineux).

II.7. Expériences réalisées à l'aide de la cellule à enclumes diamant.

La figure ci-dessous résume l'ensemble des macromolécules que nous avons étudié par cristallographie sous haute pression. L'ensemble de ces projets, auxquels j'ai participé, se sont fait en collaboration avec :

- Thierry Prangé (Paris V) et Marc Lecouvey (Paris XIII) pour l'ADN-A
- Nushin Aghajari (IBCP, Lyon) pour la cellulase
- Philippe Oger (ENS, Lyon) pour la eGFP
- Nathalie Colloc'h et Thierry Prangé (CYCERON, Caen) pour l'urate oxydase
- Eva Rosenbaum et Bruno Franzetti (IBS , Grenoble) pour la protéase TET
- Tianwei Lin et Jack Johnson (SCRIPPS, La Jolla) pour la CpMV.

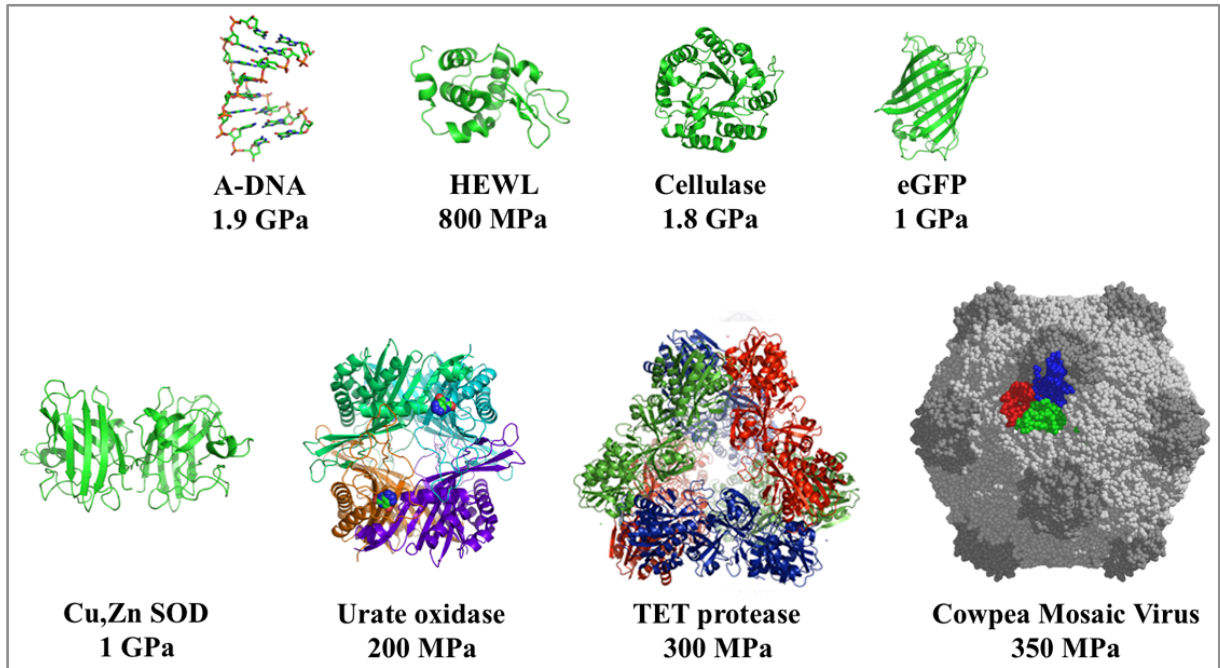


Figure 2.11 : Ensemble des protéines que nous avons étudiées par cristallographie sous haute pression.

Comme on peut le constater, nous avons d'ores et déjà exploité la gamme de pressions offertes par nos CED. Comme en cristallographie des protéines conventionnelle, on peut constater que nous ne sommes pas limités par la taille de la macromolécule à étudier. Le tableau ci-dessous résume l'état des différents projets et donne une vue d'ensemble de la qualité des données obtenues, en terme de résolution, de facteurs résiduels R_{merge} , de complétude et de facteurs résiduels d'affinement, montrant que les structures obtenues sont de bonne qualité, malgré les conditions expérimentales.

N = number of crystals. Res = resolution. Compl = completeness. Red = redundancy. PDB = Protein Data Bank. IP = imaging plate.

System	Space group	Cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	λ (Å)/ detector	<i>P</i> (GPa)	<i>N</i>	Res	R_{merge} (%)	<i>I</i> / σ	Compl (%)	Red	R_{work} (%)	R_{free} (%)	Reference	PDB ID
HEWL	$P4_32_12$	77.54, 77.54, 38.05	0.331/IP	0.30	1	1.98	4.8	19.1	79.5	4.2	18.8	22.0	Fourme <i>et al.</i> (2001)‡	
	$P4_32_12$	76.77, 76.77, 37.80	0.331/IP	0.58	1	1.99	5.2	20.7	84.3	4.8	20.8	24.5	Fourme <i>et al.</i> (2001)‡	
	$P4_32_12$	76.58, 76.58, 37.55	0.331/IP	0.69	2	1.81	7.6	21.4	70.6	3.9	22.8	26.1	Fourme <i>et al.</i> (2001)‡	
UOX	$P2_12_12_1$	79.70, 95.87, 104.99	0.374/CCD	0.15	1	1.8	5.2	7.4	96.4	2.7	17.8	21.8	Girard <i>et al.</i> (2010b)	3f2m
SOD	$P2_12_12_1$	46.85, 50.51, 146.38	0.331/IP	0.57	2	2.0	11.1	11.5	91.0	5.8	17.2	21.8	Ascone <i>et al.</i> (2010b)	3hw7
CpMV	$I23$	313.38, 313.38, 313.38	0.331/IP	0.33	8	2.8	14.9	4.9	91.2	3.4	16.3	17.1	Girard <i>et al.</i> (2005)	
Cellulase	$P2_12_12_1$	44.66, 78.87, 136.10	0.331/IP	1.75	2	1.80	–	–	–	–	–	–	Refinement in progress	
A-DNA	$P6_1$	43.71, 43.71, 40.70	0.374/CCD	0.55	1	1.65	4.3	10.2	94.1	3.2	16.9	20.1	Girard <i>et al.</i> (2007b)	2pl4
	$P6_1$	43.17, 43.17, 40.38	0.374/CCD	1.04	1	1.60	5.8	6.6	89.4	3.2	18.9	22.1	Girard <i>et al.</i> (2007b)	2pl8
	$P6_1$	42.83, 42.83, 40.30	0.374/CCD	1.39	1	1.60	4.7	11.4	98.5	3.1	18.7	22.2	Girard <i>et al.</i> (2007b)	2plb
B-DNA	$P2_12_12_1$	25.23, 40.66, 65.20	0.374/CCD	0.35	2	2.55	11.5	8.1	78.5	3.2	20.5	27.1	Refinement in progress	
Z-DNA	$P2_12_12_1$	17.77, 30.86, 43.45	0.8/CCD	0.72	3	1.55	–	–	–	–	–	–	Data collected	
eGFP	$C222_1$	37.72, 130.37, 110.60	0.374/CCD	7.85	2	1.9	–	–	–	–	–	–	Data at four pressures, refinement in progress	

‡ Structure refinements by T. Prangé (private communication).

Tableau 3 : Résumé des statistiques des données de diffraction et d'affinement.

Les trois paragraphes suivants correspondent à des études que je pourrais relier aux effets physico-chimiques de la pression dans le cas du CpMV, à l'adaptation piézophile pour l'étude sur l'ADN A et enfin la capture d'états conformationnels d'intérêt dans le cas de l'urate oxydase.

Le premier résultat de nos études est que les cristaux de macromolécules biologiques sont parfaitement adaptés aux études sous haute pression (du moins, évidemment, jusqu'à la pression de dénaturation de la macromolécule qui survient inéluctablement si la pression est trop élevée). La décroissance du volume de la maille cristalline est de l'ordre de 1 % par 100 MPa, et les cristaux, comme indiqué sur la figure 2.11, peuvent supporter des pressions au delà du GPa. Ce comportement est probablement lié à une propriété fondamentale des cristaux de protéines : ils sont composés de 30 à 80 % de solvant et ce solvant communique avec l'extérieur du cristal par des canaux qui parcourent l'empilement cristallin. Le cristal de protéine est donc un système bi-phasique avec une phase solide et une phase liquide. Afin d'expliquer la compressibilité souvent anormale des cristaux, nous avons proposé un mécanisme fondé sur l'admission ou l'expulsion (suivant la protéine) de solvant à l'intérieur des cristaux (Ascone et al., 2010). La caractéristique bi-phasique et le comportement particulier des cristaux de protéines sous haute pression conduisent à penser que les effets

observés dans les cristaux sont similaires à ceux observés en solution, comme le montre l'exemple de l'urate oxydase (Paragraphe II.10).

II.8. Etude sous haute pression de la capsid du CpMV

Le CpMV est un virus membre d'un groupe de virus de plante icosaédrique. La capsid du CpMV est formée de 60 copies d'un protomère composé de deux protéines : une petite de 169 acides aminés (en bleu sur la Figure 2.12) et une grande de 369 acides aminés composée de deux domaines (en vert et rouge sur la Figure 2.12). Ces deux protéines forment ainsi trois domaines de structure similaire. La structure à haute pression a été déterminée à 330 MPa (à température ambiante) et affinée à 2,8 Å de résolution (## ref ##).

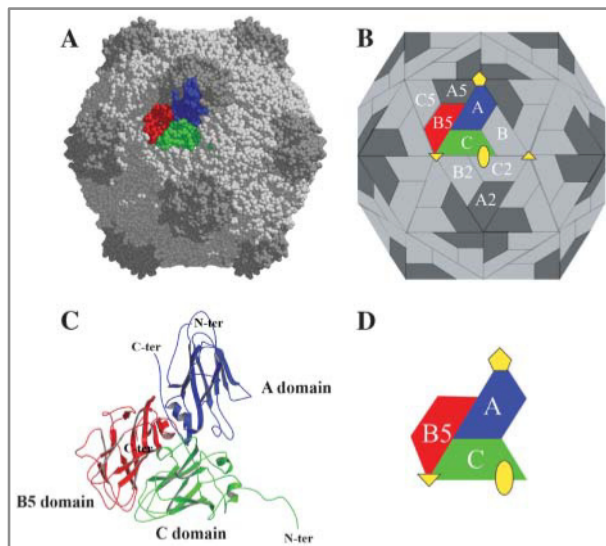


Figure 2.12 : Organisation globale de la capsid du CpMV et définition des différents domaines.

La comparaison de la structure sous haute pression (HP) avec celle à pression ambiante (AP) nous a permis d'observer une plus grande stabilité de la structure HP à travers une diminution du facteur d'agitation thermique moyen de 9 \AA^2 et une hydratation plus importante (puisque 195 molécules ont été modélisées dans la structure HP et seulement 99 dans la structure AP), une réduction d'environ 4 % du volume de la capsid (en accord avec le réduction du volume de la maille cristalline) sans variation significative du volume moyen de chacun des trois domaines et des surfaces enfouies aux interfaces. En revanche, nous avons pu observer une réduction de la longueur des liaisons hydrogène de l'ordre de $0,04 \text{ \AA}$ (Figure 2.13), contraction significative compte tenu du grand nombre de mesures de longueurs de liaisons

hydrogène (428 entre acides aminés et 169 entre acides aminés et molécules d'eau). Ce résultat en accord avec les résultats obtenus par simulations numériques (Marchi and Akasaka, 2000; Paci, 2002; Paci and Marchi, 1996) et ceux de RMN sous haute pression (Li et al., 1998; Refaee et al., 2003).

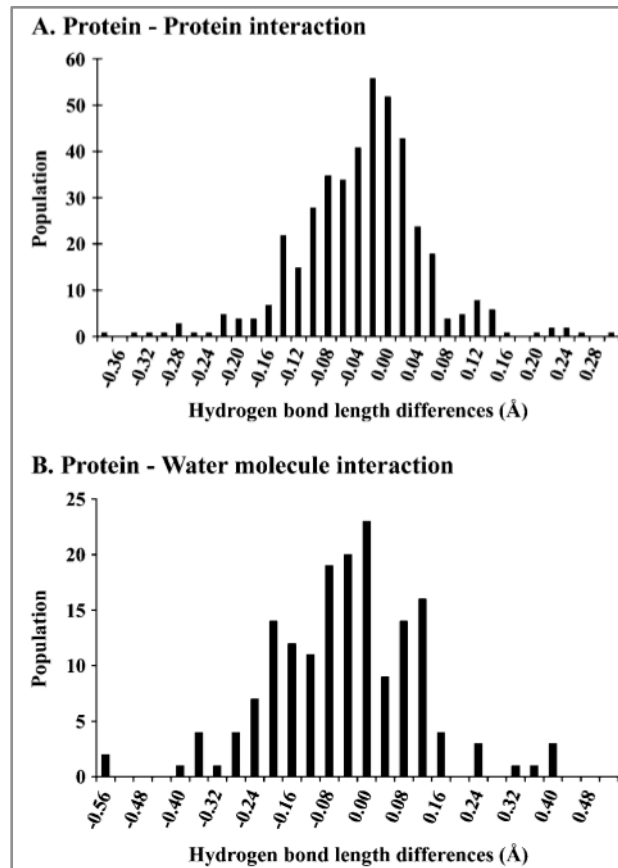


Figure 2.13 : Histogramme des différences de longueurs de liaisons hydrogène entre la structure AP et HP pour les interactions impliquant les acides aminés (428 mesures) et pour les interactions entre les acides aminés et le solvant (169 mesures).

Enfin, un autre résultat majeur de l'étude concerne l'évolution des cavités internes. A 330 MPa, le nombre des cavités internes ainsi que leur volume total diminuent (Figure 2.14).

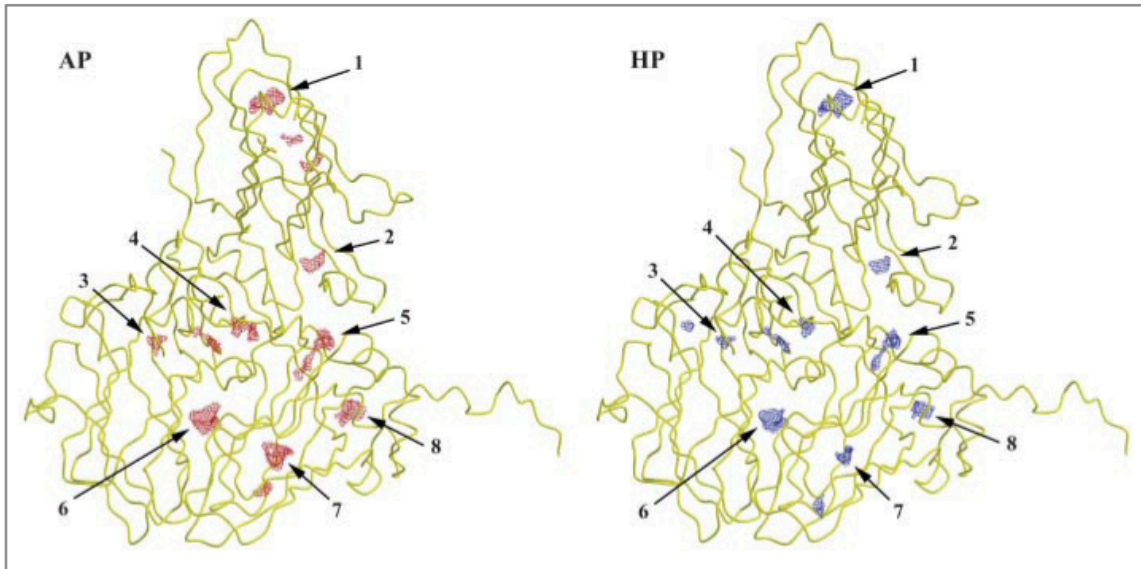


Figure 2.14: Modifications des cavités du CpMV induites par la pression.

Le volume total des cavités diminue de 40 %, ce qui correspond à une diminution de l'ordre de 10 % tous les 100 MPa. Cette valeur moyenne ne reflète pas l'évolution individuelle des cavités puisque certaines voient leur volume diminuer de plus de 40 % alors que d'autres voient leur volume peu affecté (Figure 2.15).

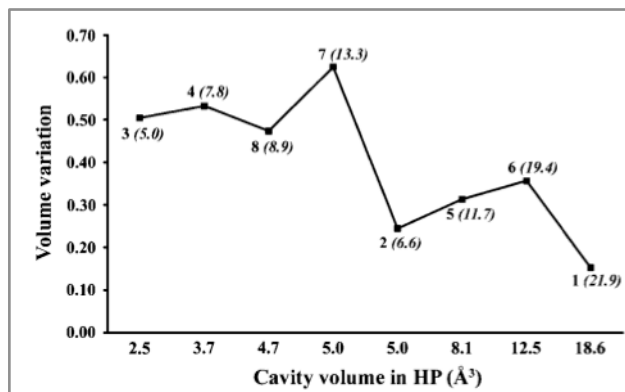


Figure 2.15 : Variation du volume des cavités entre les structures AP et HP du CpMV en fonction du volume moyen de la cavité dans la structure HP.

Les nombres indiquent le numéro de la cavité représentée sur la Figure 2.14 et le nombre entre parenthèse indique le volume moyen de la cavité dans la structure AP.

II.9. Etude sous haute pression de la forme A de l'ADN

L'étude a porté sur l'octanucléotide (GGTATACC)₂. Cet octanucléotide présente une forme A de très grande stabilité cristalline, un empilement compact des paires de base (2,9 Å

d'espacement entre les paires de base comparé au 3,3 Å de la forme B de l'ADN) et un réseau de liaisons hydrogène parfaitement caractérisé (Kennard et al., 1986). Enfin, cette construction conduit à une forme cristalline avec une propriété d'empilement singulière. En effet, l'empilement des molécules de forme A forme une super-hélice dans laquelle il a été montré que des duplex (GGTATACC)₂ de forme B sont piégés (Doucet and Benoit, 1987). Ces molécules piégées et orientées conduisent, en particulier, à la présence à deux fortes réflexions méridiennes (Figure 2.15) similaires au diagramme de fibres observé par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953). Le système étudié a donc permis de suivre simultanément l'évolution de la forme A et B de l'ADN.

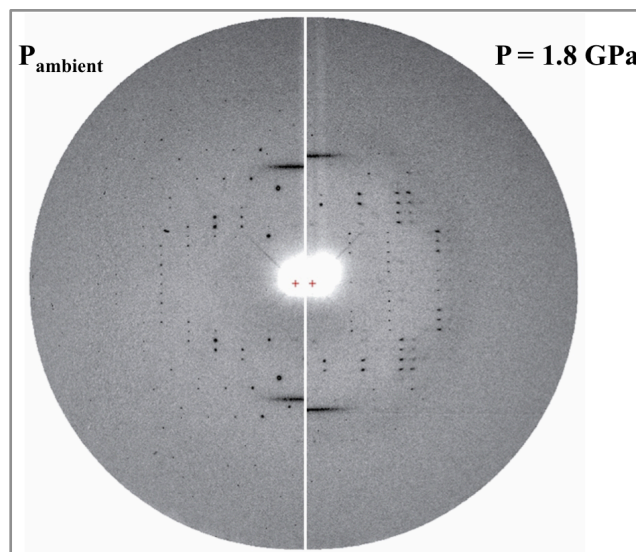


Figure 2.15 : Clichés de diffraction obtenus sur un cristal unique de la forme A de l'ADN à pression ambiante et à 1,8 GPa. On remarque la présence du diagramme de fibre correspondant à la forme B superposé aux taches de Bragg de la forme A.

Nous avons déterminé la structure de la forme A à 4 pressions : à pression ambiante (la structure de référence) et à 0,55 GPa, 1,04 GPa et 1,39 GPa respectivement. L'analyse des structures a montré une réduction de l'espacement des paires de base pour la forme A. De l'analyse du diagramme de fibre effectuée à 12 pressions différentes, nous avons pu déduire le même résultat pour la forme B. La pression conduit donc à une compression axiale du duplex (Figure 2.16).

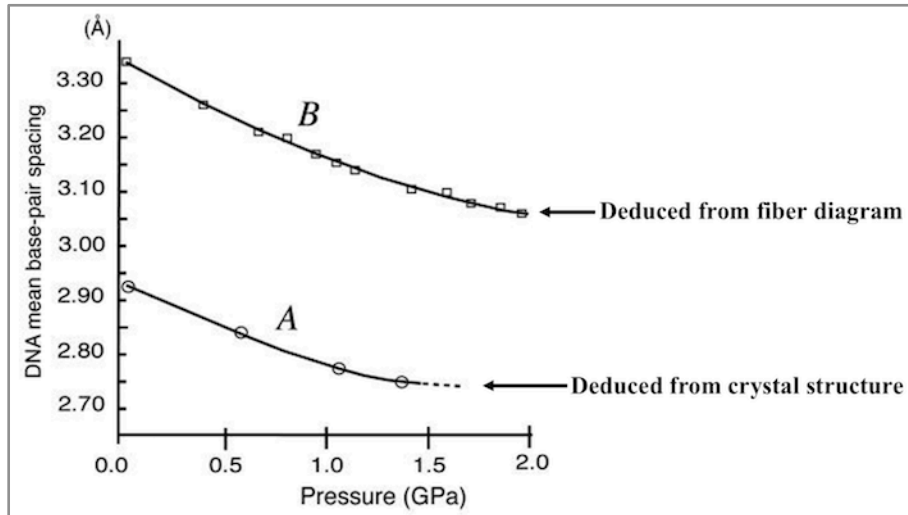


Figure 2.16 : Evolution en fonction de la pression de l'espace moyen entre paires de bases dans la forme A et la forme B de l'oligonucléotide (GGTATACC)₂.

En revanche, de manière surprenante, nous n'avons observé aucune modification des appariements de Watson-Crick (Figure 2.17). En conclusion, le duplex agit comme un ressort moléculaire se comprimant axialement de l'ordre de 10 % à 1,39 GPa mais tout en conservant intacte la géométrie des appariements de Watson-Crick et donc l'intégrité de l'information génétique.

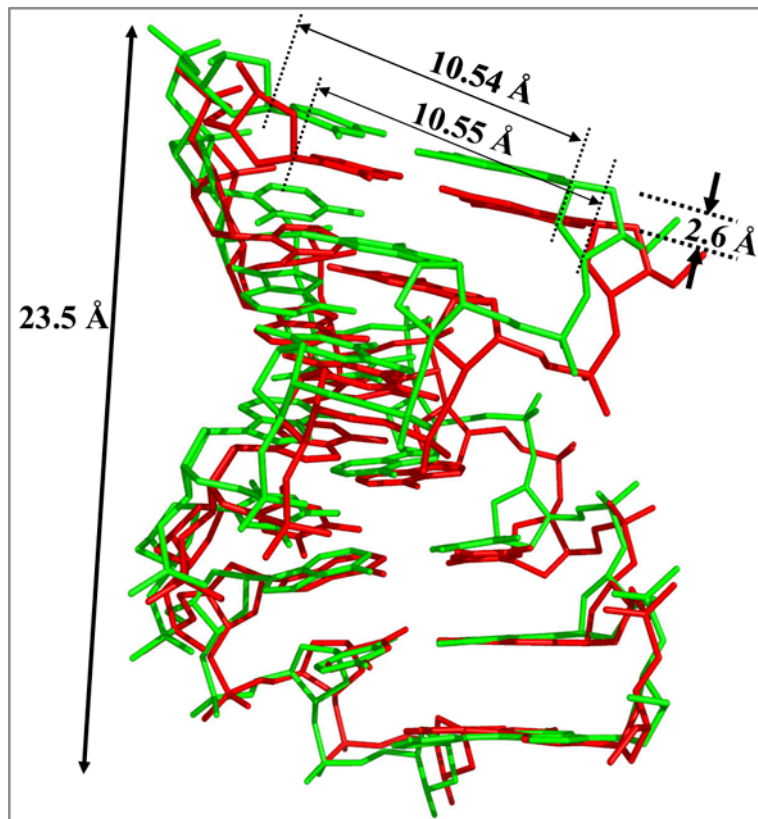


Figure 2.17 : Superposition de la structure de la forme A de l'ADN à pression ambiante (en vert) et de la structure à 1,39 GPa (en rouge).

Du point de vue de la piézophilie, la pression induit des changements de l'activité de réplication, de transcription ou de traduction. La grande stabilité de l'ADN sous pression peut donc perturber ces activités puisque la transition double/simple brin va être plus difficile.

Du point de vue de l'origine de la vie, on peut relier la remarquable stabilité de cet oligonucléotide due à sa topologie en double hélice associée par des appariements de bases. A l'époque prébiotique, cette architecture singulière pourrait avoir été décisive pour l'émergence de molécules possédant des propriétés catalytiques et la capacité de véhiculer l'information génétique, tels les ribozymes, en adéquation avec l'hypothèse du monde à ARN.

II.10. Etude sous haute pression de l'urate oxydase

A mes yeux, cette étude est celle qui représente la manière optimale de mener les études biologiques sous haute pression (et lorsque la protéine le permet). En effet, comme indiqué ci-dessous, cette étude sous haute pression a permis de caractériser un état conformationnel en

lien direct avec la fonction biologique de cette enzyme. De plus, la réussite de cette étude réside dans la combinaison de plusieurs techniques sous haute pression.

L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* est une enzyme impliquée dans la voie de dégradation de la purine. Elle catalyse l'oxydation de l'acide urique en présence d'oxygène en 5-hydroxyisourate. Il s'agit d'une enzyme homotétramérique (Figure 2.18) dans laquelle le site actif est situé à l'interface entre deux monomères (association de deux brins β qui forment le tonneau β).

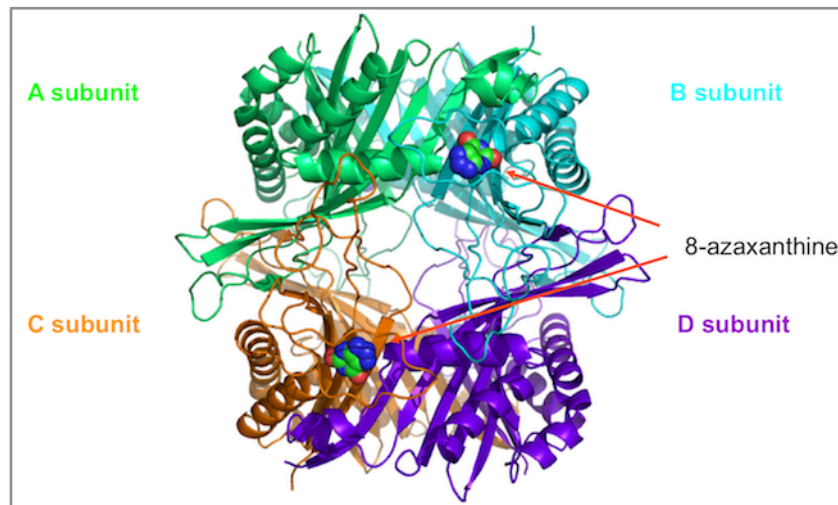


Figure 2.18 : Structure du tétramère de l'urate oxydase. Les sites actifs sont situés aux interfaces entre dimères et sont indiqués par la présence d'inhibiteur, le 8-azaxanthine.

Nous avons caractérisé le comportement sous haute pression de cette enzyme par la fluorescence intrinsèque des tryptophanes, par des mesures d'activités, par diffusion des rayons X aux petits angles et par cristallographie. Deux résultats majeurs ont été obtenus (Girard et al., 2010b). Le premier concerne le comportement sous haute pression du tétramère que je ne détaillerai pas ici mais qui nous a permis de proposer le mécanisme de dissociation indiqué sur la Figure 2.19.

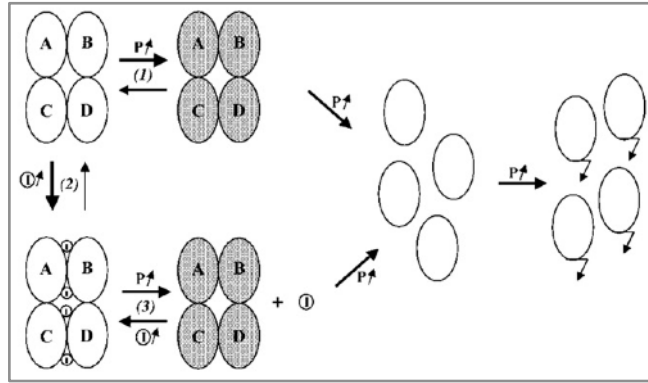


Figure 2.19 : Mécanisme de la dissociation induite par la pression du tétramère de l'urate oxydase. En blanc sont représentés les tétramères natifs et en gris les tétramères présentant une activité enzymatique réduite. I représente le substrat ou des analogues.

L'enzyme présente ainsi deux comportements, comme indiqué par l'évolution des spectres SAXS (Figure 2.20). Au delà de 175 MPa, le tétramère se dissocie en états oligomériques de plus petite taille qui tendent à s'agréger. En dessous de 150 MPa-175 MPa, le tétramère reste majoritairement présent. Il est à noter que la diffraction est totalement perdue à 200-220 MPa.

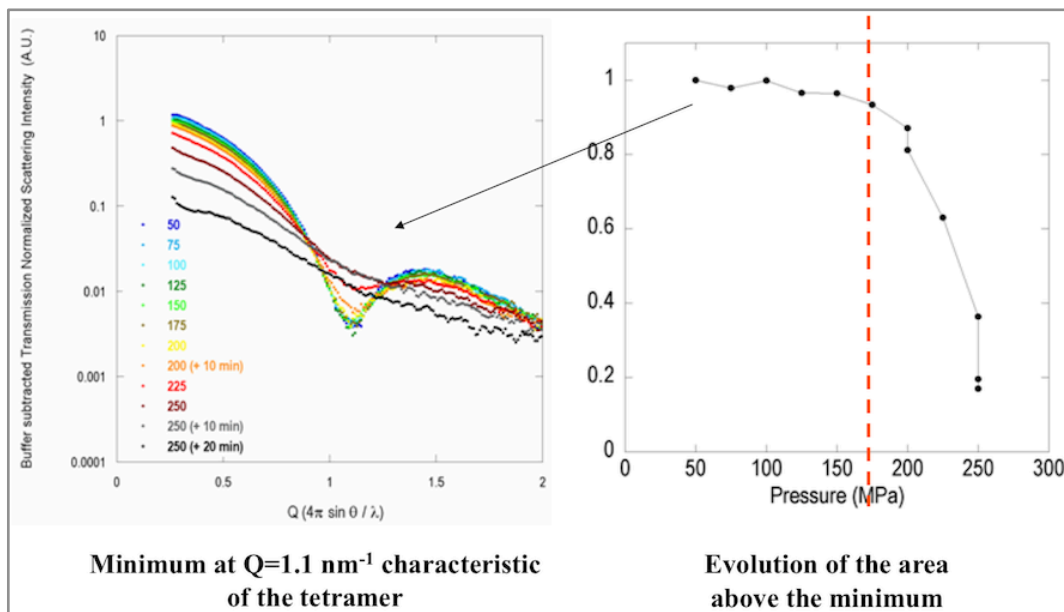


Figure 2.20 : Courbes SAXS montrant l'évolution sous pression du tétramère de l'urate oxydase.

Le second résultat est la caractérisation de cet état tétramérique. Les mesures d'activité enzymatique (Figure 2.21), effectuées directement après décompression de la solution d'urate oxydase incubée pendant 20 h à une pression donnée, montrent une perte progressive de

l'activité sous pression. Cette tendance a été confirmée par des mesures d'activité effectuées directement sous pression.

Une analyse fine de ces mesures montre que l'activité enzymatique est perdue avant la perte de l'état tétramérique. De plus, l'évolution des paramètres catalytiques, K_M et k_{cat} , indique que l'enzyme a conservé son efficacité catalytique mais que l'affinité pour son substrat est réduite (Figure 2.21). Ainsi, la pression a donc conduit à un état conformationnel moins actif du tétramère avant sa dissociation.

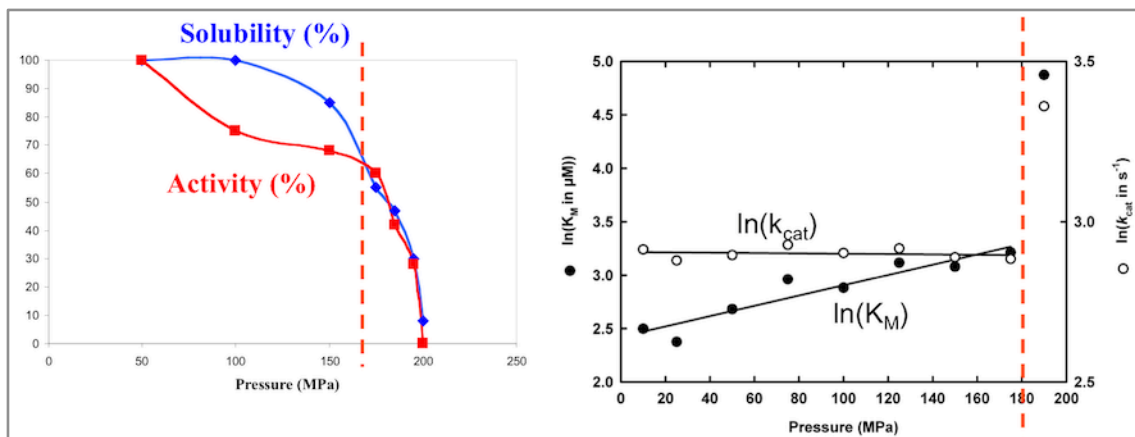


Figure 2.21 : Evolution de l'activité enzymatique (à gauche) et des paramètres catalytiques (à droite) de l'urate oxydase en fonction de la pression.

La structure déterminée à 150 MPa devait donc représenter cet état conformationnel. La comparaison de cette structure avec celle obtenue dans les mêmes conditions à pression ambiante nous a permis de mettre en lumière le rôle de plusieurs boucles mais surtout le rôle d'une cavité hydrophobe. Une comparaison des facteurs d'agitations thermique B (facteurs de Debye-Waller) entre les deux structures montre que trois boucles sont particulièrement sensibles à la pression. La pression permet de révéler la flexibilité de certaines zones des protéines (Collins et al., 2010; Collins et al., 2007), ici de ces boucles. Il convient de remarquer (Figure 2.22) que ces 3 boucles se situent toutes sur la même face du tétramère (les autres faces ne présentant pas de zones accrues de flexibilité) et qu'elles bordent le tunnel d'accès au site actif. Une possibilité serait donc que la pression augmente la flexibilité de ces boucles modulant ainsi l'accès du substrat au site actif, ce qui expliquerait l'inactivation partielle de l'enzyme.

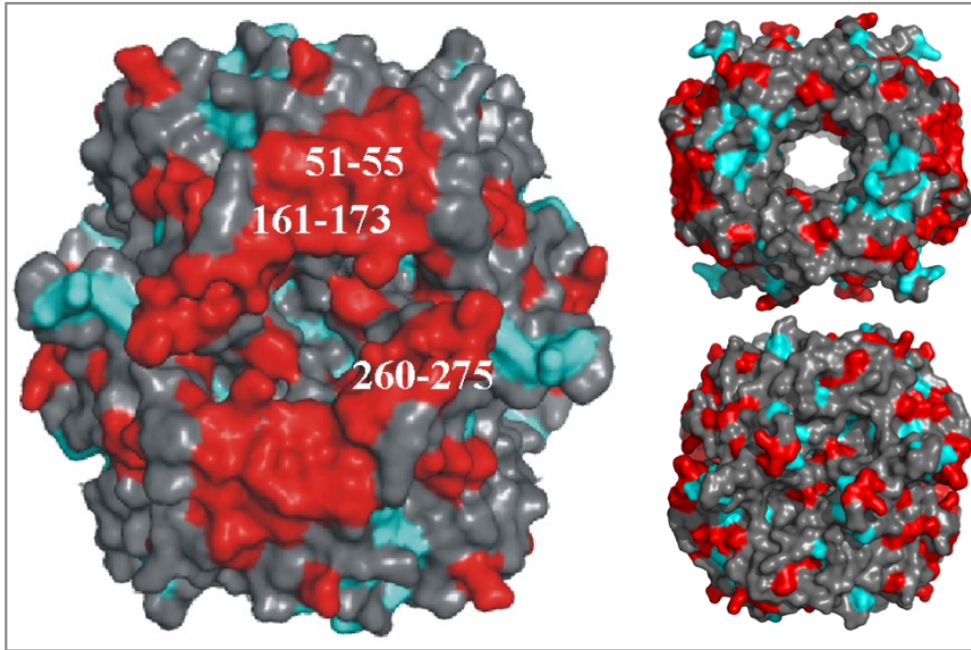


Figure 2.22 : Vue de la surface du tétramère de l'urate oxydase selon trois orientations. En rouge sont indiqués les zones présentant des différences de facteurs d'agitation thermique B élevées entre la structure à 150 MPa et la structure à P_{amb} . Les trois boucles délimitant l'entrée du tunnel conduisant au site actif sont indiquées.

Le résultat le plus important concerne une cavité hydrophobe qui jouxte la poche catalytique, séparée de cette dernière par un résidu valine. Il s'agit d'une cavité de volume assez important ($\sim 190 \text{ \AA}^3$) dans laquelle aucune molécule, en particulier d'eau, n'a pu être observée. A 150 MPa, le volume de la cavité hydrophobe diminue de 16 % alors que celui de la poche catalytique, en présence d'un inhibiteur le 8-azaxanthine, augmente de 11 % (Figure 2.23). L'analyse comparative des deux structures (à pression ambiante et à 150 MPa) montre un mouvement corrélé des résidus bordant la cavité hydrophobe et de ceux de la poche catalytique. Enfin, les distances dans la poche catalytique (à l'interface entre deux monomères) augmentent entre les résidus appartenant à deux sous-unités différentes, ainsi qu'entre l'inhibiteur et la Thr57. En revanche les liaisons hydrogène se raccourcissent lorsque les interactions impliquent un seul monomère (Figure 2.23). Ces résultats montrent une relation directe entre la poche catalytique et la cavité hydrophobe qui la jouxte.

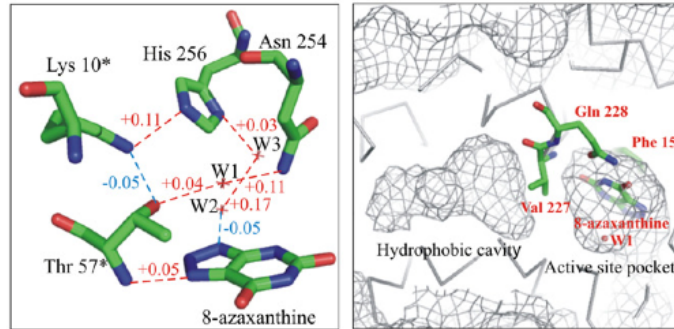


Figure 2.23 : Evolution à 150 MPa des liaisons hydrogène à l'intérieur de la poche catalytique (à gauche) et représentation de la poche hydrophobe qui jouxte la poche catalytique (à droite).

L'ensemble des informations obtenues en faisant varier la pression nous a permis de proposer un mécanisme sur le rôle de la cavité hydrophobe dans le processus catalytique de l'urate oxydase. Au cours du processus catalytique (Figure 2.24), le site actif de l'urate oxydase doit être capable de s'adapter à différentes molécules de forme et de charge multiples, en particulier un substrat plan mono anionique, un produit non plan et probablement un intermédiaire déhydrurate.

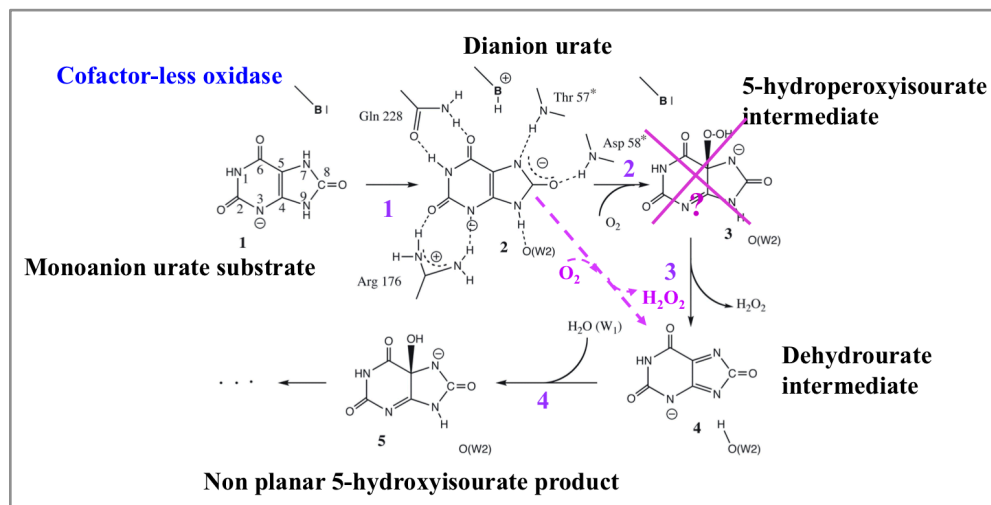


Figure 2.24 : Mécanisme supposé de l'urate oxydase

La poche catalytique doit donc pouvoir adapter sa forme sans que l'interface entre les dimères, et donc le tétramère, ne soit déstabilisée. Ainsi, le rôle de la cavité hydrophobe serait de fournir la flexibilité nécessaire à la poche catalytique en réduisant/augmentant son propre volume lorsque la poche catalytique augmente/réduit le sien.

Récemment, l'équipe de Nathalie Colloc'h a validé l'hypothèse proposée grâce à la pression. Sous pression de xénon, un atome de xénon se fixe dans la cavité hydrophobe (Colloc'h et al., 1997) et conduit à une augmentation du volume de la cavité et à une activité réduite de l'enzyme (Marassio et al., 2011).

Pour conclure, l'étude sur l'urate oxydase illustre les possibilités offertes par la pression pour piéger des états conformationnels en lien avec la fonction biologique.

II.11. Résultats non escomptés : Episode II

Comme pour les complexes de lanthanides, la thématique haute pression a conduit à des résultats qui peuvent être d'intérêt pour l'ensemble de la communauté des biocristallographes. Le premier résultat provient des expériences utilisant le robot CATS. Comme indiqué dans le paragraphe II.4, le centrage de l'échantillon s'effectue de manière optique à l'aide du système On-Axis Viewer. Ce centrage optique n'assure malheureusement pas que l'échantillon est sur l'axe de rotation physique de l'expérience de diffraction. En effet, l'indice de réfraction du diamant est très élevé (de l'ordre de 2,4). L'image du cristal observée est donc décalée et il est nécessaire d'appliquer une correction pour ramener le cristal sur l'axe de rotation. Dans le cas d'un diamant d'épaisseur 1,5 mm, cette correction est de l'ordre de 800 μm . Quelle peut être l'utilité de cette correction ? Dans le cas des enregistrements effectués directement sur plaque de cristallisation, le même type de correction, qui correspond à un décalage moins important, permet d'améliorer le centrage et d'augmenter la plage angulaire disponible pour l'enregistrement de données de diffraction. Actuellement, cette gamme angulaire est de l'ordre de -25° à $+25^\circ$ sur la ligne FIP-BM30A et permet des enregistrements complets, si la symétrie du cristal le permet, sur des cristaux dans leur plaque de cristallisation. Cette correction est maintenant incluse dans la version commerciale du robot.

Le second résultat provient des conditions expérimentales utilisées pour les enregistrements en particulier l'utilisation des hautes énergies. Lors des expériences sur le CpMV, nous avons défini un critère, l'efficacité d'enregistrement de données (Data Collection Efficiency : DCE), afin d'analyser plus en détail les données de diffraction obtenues sous haute pression (Fourme et al., 2003). Le DCE est la quantité de données à une résolution définie qui peut être enregistrée par unité de volume de cristal. Dans le cas du CpMV, où les données avaient été enregistrées à température ambiante et sous haute pression, nous avons mesuré près de 30 fois plus de données d'un échantillon que dans des conditions classiques (Fourme et al., 2003). A l'époque, nous n'avons pu déterminer si cette observation était liée à l'ensemble des

conditions expérimentales utilisées pour les expériences HP (optimisées pour augmenter le rapport signal sur bruit) ou si elle était liée uniquement à l'utilisation d'un faisceau incident de haute énergie. Afin de répondre à cette question, nous avons comparé expérimentalement la quantité de données que l'on peut obtenir à deux énergies, 18 et 33 keV, avec des cristaux de lysozyme cryo-congelés (Fourme et al., 2011). Pour chacune des deux énergies, sur un cristal, nous avons ainsi enregistré l'équivalent de 124 jeux de données de 90° à 18 keV et de 7 jeux de données à 33 keV compte tenu des temps d'exposition plus longs et du temps de faisceau disponible pour l'expérience. Le détecteur utilisé pour l'expérience était un détecteur CCD RAYONIX de 165 mm. Les temps de pose ont été choisis afin d'avoir une résolution des données de l'ordre de 1,5 Å avec un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à 2 à haute résolution. La figure 2.25 montre l'évolution du facteur B moyen (B Wilson) en fonction du nombre de jeux de données enregistrés à 18 keV.

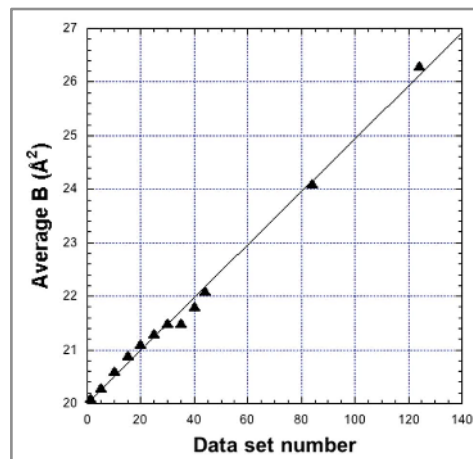


Figure 2.25 : Evolution du facteur B moyen en fonction du nombre de jeux de données enregistrés à 18 keV indiquant une dégradation progressive du cristal.

L'évolution à 33 keV est similaire à l'exception du fait que le détecteur est quatre fois moins efficace à cette énergie (la DQE, Detective Quantum Efficiency, est divisée par 4 à 33 keV comparée à 18 keV). L'idée proposée par Roger Fourme a été de déterminer la réponse intrinsèque du cristal en corrigeant les résultats de l'efficacité du détecteur (on suppose ainsi une DQE =1 quelle que soit l'énergie). Nous avons donc multiplié la variation relative du facteur B par la valeur de la DQE à l'énergie considérée (Figure 2.26).

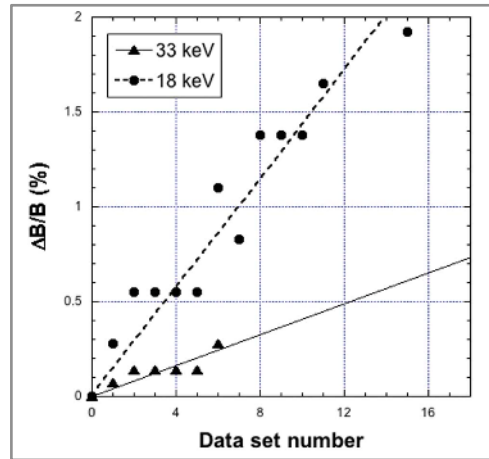


Figure 2.26 : Variation relative du facteur B corrigée de la réponse du détecteur à 18 keV et à 33 keV indiquant une dégradation moins rapide à 33 keV.

On constate alors que le nombre de jeux de données que l'on pourrait enregistrer sur un même cristal de lysozyme est multiplié par 3,5 à 33 keV comparé à 18 keV. En 2007, Shimizu et al. ont effectué des enregistrements de 180° répétés (12 à 15 jeux de données par énergie) sur des cristaux de lysozyme à neuf énergies de 6,5 keV à 33 keV. En appliquant la même analyse que pour nos jeux de données, on obtient la courbe de la Figure 2.27 qui confirme nos résultats et les étend à un plus grand domaine d'énergie de photons.

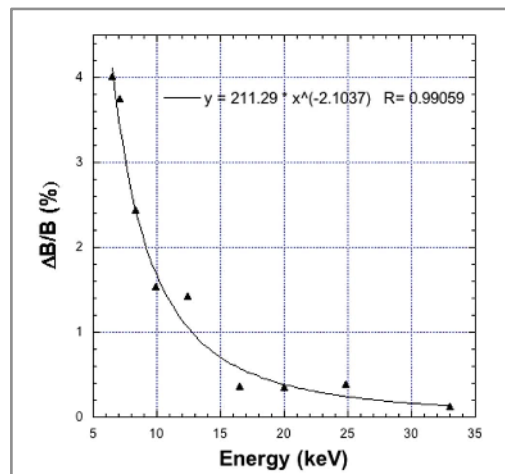


Figure 2.27 : Variation relative du facteur B corrigée de l'efficacité du détecteur et calculée pour les données obtenues par Shimizu et al. 2007).

L'utilisation de photons de haute énergie est ainsi, après la congélation et en complément de cette dernière, la méthode la plus efficace de tirer davantage de données, plus précises de surcroît, d'un cristal donné. C'est un enjeu considérable, pensons nous, pour toute la

biocristallographie. Nous travaillons maintenant à donner une explication théorique complète à ces observations. Il nous faudra aussi effectuer ce type de mesure sur des cristaux non congelés. Nous préconisons la construction d'une ligne de lumière pour la biocristallographie travaillant à haute énergie, moyennant la possibilité de disposer d'un détecteur dont l'efficacité sera optimum pour ce type de faisceau.

II.12. Le futur

Globalement, il s'agit tout simplement de poursuivre l'exploration des effets moléculaires de la haute pression en continuant à accumuler de l'information structurale qui puisse être corrélée à d'autres informations biophysiques. A ce titre, le futur à court terme s'inscrit dans les projets en cours.

Par exemple, nous disposons de données de diffraction sur le lysozyme de blanc d'œuf de poule qui pourraient nous permettre de détecter les toutes premières étapes de la dénaturation induite par la pression. En effet, comme le montre la Figure 2.28, une étude par spectroscopie infrarouge (Smeller et al., 2006) a montré que le lysozyme se dénature au environ de 700 MPa. Sachant que la diffraction est perdue à partir de 700 MPa, nous avons enregistré des données de diffraction à quatre pressions indiquées par les flèches rouge.

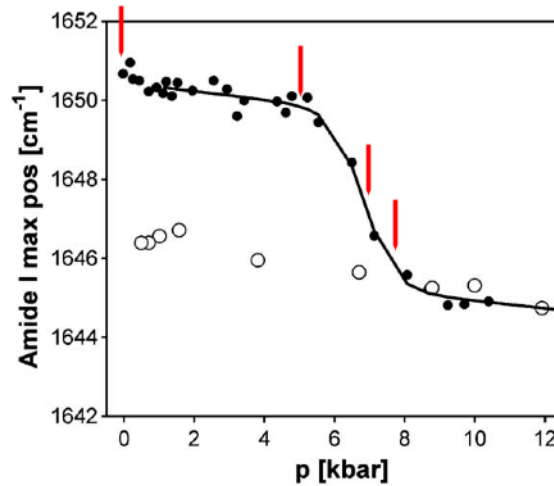


Figure 2.28 : Position de la bande I des amides, pour le lysozyme de blanc d’œuf de poule, mesurée par spectroscopie infrarouge en fonction de la pression, à la compression (Ronds pleins) et à la décompression (Ronds ouverts). La dénaturation de la protéine se produit au environ de 700 MPa.

Le second projet en cours, en collaboration avec Philippe Oger (ENS Lyon), concerne le comportement de la eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) sous pression. Nous avons caractérisé la fluorescence de la protéine en fonction de la pression (Figure 2.29). Différents régimes apparaissent avec, en particulier, une augmentation de la fluorescence à 180 MPa et un long plateau de stabilité, de 500 à 850 MPa, correspondant certainement à une conformation très stable de la protéine et de son chromophore. Nous avons enregistré des données de diffraction aux pressions correspondant aux différents régimes et l’affinement des structures est en cours.

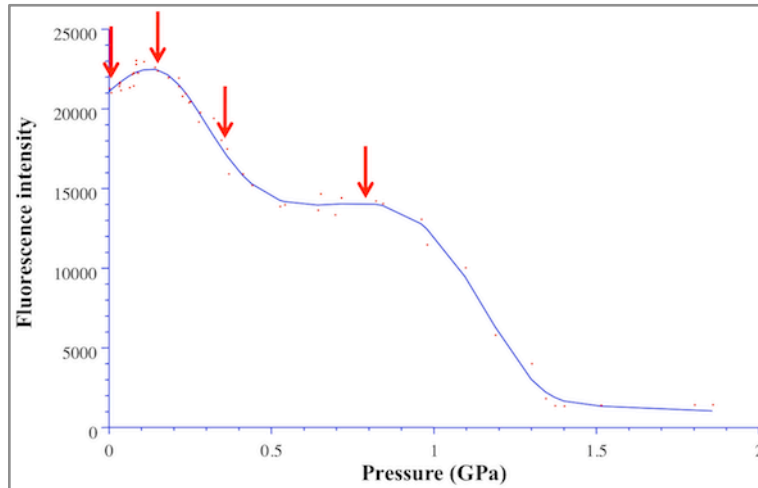


Figure 2.29 : Evolution de la fluorescence de la eGFP en fonction de la pression. Les flèches rouge indiquent les pressions auxquelles des données de diffraction ont été enregistrées.

Nous avons aussi débuté une collaboration avec l'équipe de Anne Houdusse (Institut Curie, Paris) sur les effets des hautes pressions sur les myosines. L'idée est d'utiliser la pression pour capturer des états conformationnels des myosines. Ce projet reste un défi et se trouve à l'origine des développements effectués à SLS. Nous avons aussi initié des collaborations avec l'équipe de Hans-Robert Kalbitzer (Université de Regensburg, Allemagne) sur l'étude de la protéine RAS (Kalbitzer et al., 2009).

Si les projets ci-dessus concernent la capture d'états conformationnels, nous avons entrepris au sein de l'équipe ELMA, à travers notre participation à l'ANR blanche « Living Deep » (Coordinateur Mohamed Jebbar), une étude de l'adaptation moléculaire des protéines aux hautes pressions. L'ANR Living Deep s'appuie sur l'archée *Pyrococcus yayanosii* CH1. En attendant l'identification de nouvelles cibles issues des analyses protéomiques, nous utilisons les lactate/malate déshydrogénases et les protéases TET dont la biochimie est parfaitement maîtrisée au sein du groupe. L'idée est de comparer les effets de la pression sur ces enzymes issues d'organismes isolés à différentes profondeurs. Ainsi, les protéases TET sont présentes dans l'ensemble de la lignée *Pyrococcus* et nous disposons d'ores et déjà des protéases TET de *P. furiosus* (organisme de surface) et de *P. horikoshii* (isolé à 1400m de profondeur). Un gros avantage de la lignée *Pyrococcus* est que la température optimale de croissance est identique (au environ de 95°C) si bien que la température n'est pas une variable dans la comparaison. Pour ce type d'étude, il pourra être nécessaire de travailler à la fois avec des pressions et des températures adaptées afin d'être le plus proche des conditions physiologique

et donc de développer l'instrumentation nécessaire (ce qui est déjà le cas des bombes équipant le spectrophotomètre et le fluorimètre). Le projet autour des malate déhydrogénases et des protéases TET nous permettra aussi d'étudier les effets de la pression sur les molécules associées à l'activité enzymatique (cofacteurs, substrats...).

Conclusion

Conclusion

A travers ce manuscrit, mon objectif était de montrer l'intérêt des deux thématiques qui me sont chères : l'utilisation de complexes de lanthanides et la diffusion anormale d'une part et la biophysique sous haute pression d'autre part. Si, avec la soutenance de thèse de Romain Talon dans les prochains mois, la première thématique va s'orienter plus particulièrement vers les applications aux grands assemblages, la seconde devrait prendre une nouvelle dimension avec l'arrivée d'une étudiante, Louise Lassalle, au sein de l'équipe. Les champs ouverts par la biophysique sous hautes pressions hydrostatiques étant nombreux et vastes, Louise devrait être la première d'une longue lignée d'étudiants sur cette thématique. En ce qui me concerne, il me faudra probablement dans un avenir proche, déterminer si je poursuis le projet haute pression sur une base méthodologique avec de nombreuses collaborations, comme actuellement, ou si je dois me concentrer sur une thématique biologique propre. Quoi qu'il en soit, le réseau mis en place, qui inclut la plateforme IBS, l'ESRF, SOLEIL et SLS, fournira un socle technique solide pour les futures études des effets des hautes pressions en biologie.

Concernant les complexes de lanthanides, la poursuite de ce travail dépendra probablement des premières tentatives d'expériences MASC et de l'impact des valorisations « industrielles » possibles.

Pour finir, je souhaite mettre l'accent sur le caractère interdisciplinaire de mon travail qui est le moteur de mon intérêt pour la science, à l'interface de la physique, de la chimie et bien sûr de la biologie.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- Abe, F., 2007. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2347-57.
- Akasaka, K., 2006. Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem Rev* 106, 1814-35.
- Allen, K.N., B. Imperiali, 2010. Lanthanide-tagged proteins--an illuminating partnership. *Current Opinion in Chemical Biology* 14, 247-54.
- Arnoux, P., T. Morosinotto, G. Saga, R. Bassi, D. Pignol, 2009. A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 2036-44.
- Ascone, I., R. Kahn, E. Girard, T. Prange, A.-C. Dhaussy, M. Mezouar, N. Ponikwicki, R. Fourme, 2010. Isothermal compressibility of macromolecular crystals and macromolecules derived from high-pressure X-ray crystallography. *Journal of Applied Crystallography* 43, 407-416.
- Barstow, B., N. Ando, C. Kim, S. Gruner, 2009. Coupling of Pressure-Induced Structural Shifts to Spectral Changes in a Yellow Fluorescent Protein. *Biophys J* 97, 1719-1727.
- Bartlett, D.H., 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim Biophys Acta* 1595, 367-81.
- Birrien, J.-L., X. Zeng, M. Jebbar, M.-A. Cambon-Bonavita, J. Quérellou, P. Oger, N. Bienvenu, X. Xiao, D. Prieur, 2011. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., the first obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*.
- Boehler, R., K. De Hantsetters, 2004. New anvil designs in diamond-cells. *High Pressure Research* 24, 391-396.
- Boggon, T.J., L. Shapiro, 2000. Screening for phasing atoms in protein crystallography. *Structure* 8, R143-9.
- Bonneté, F., D. Madern, G. Zaccari, 1994. Stability against Denaturation Mechanisms in Halophilic Malate Dehydrogenase "Adapt" to Solvent Conditions. *Journal of Molecular Biology* 244, 436-447.
- Brown, M., R.E. Peierls, E.A. Stern, 1977. White lines in x-ray absorption. *Physical Review B* 15, 738.
- Campanaro, S., A. Vezzi, N. Vitulo, F.M. Lauro, M. D'Angelo, F. Simonato, A. Cestaro, G. Malacrida, G. Bertoloni, G. Valle, D.H. Bartlett, 2005. Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC Genomics* 6, 122.
- Chaudhuri, B.N., M.R. Sawaya, C.Y. Kim, G.S. Waldo, M.S. Park, T.C. Terwilliger, T.O. Yeates, 2003. The crystal structure of the first enzyme in the pantothenate biosynthetic pathway, ketopantoate hydroxymethyltransferase, from *M. tuberculosis*. *Structure* 11, 753-64.
- Chen, Y., M. Tate, S. Gruner, 2009. Facilitating protein crystal cryoprotection in thick-walled plastic capillaries by high-pressure cryocooling. *Journal of Applied Crystallography* 42.
- Chilukuri, L.N., D.H. Bartlett, 1997. Isolation and characterization of the gene encoding single-stranded-DNA-binding protein (SSB) from four marine *Shewanella* strains that differ in their temperature and pressure optima for growth. *Microbiology (Reading, Engl)* 143 (Pt 4), 1163-74.
- Collins, M.D., C.U. Kim, S.M. Gruner, 2010. High-Pressure Protein Crystallography and NMR to Explore Protein Conformations. *Annual review of biophysics*.
- Collins, M.D., M.L. Quillin, G. Hummer, B.W. Matthews, S.M. Gruner, 2007. Structural rigidity of a large cavity-containing protein revealed by high-pressure crystallography. *Journal of Molecular Biology* 367, 752-63.
- Colloc'h, N., M. El Hajji, B. Bachet, G. L'Hermite, M. Schiltz, T. Prangé, B. Castro, J. Mornon, 1997. Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 4, 947-952.
- Contreras-Martel, C., P. Carpentier, R. Morales, F. Renault, M.L. Chesne-Seck, D. Rochu, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, E. Chabrière, 2006. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human phosphate-binding protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 67-9.
- Coster, D., 1924. Über die Absorptionsspektren im Röntgengebiet. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 25, 83-98.
- D'Aléo, A., G. Pompidor, B. Elena, J. Vicat, P.L. Baldeck, L. Toupet, R. Kahn, C. Andraud, O. Maury, 2007. Two-photon microscopy and spectroscopy of lanthanide bioprobes. *Chemphyschem* 8, 2125-32.
- Dauter, Z., M. Dauter, K.R. Rajashankar, 2000. Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 232-7.

- de Bono, S., L. Riechmann, E. Girard, R.L. Williams, G. Winter, 2005. A segment of cold shock protein directs the folding of a combinatorial protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1396-401.
- Delfosse, V., E. Girard, C. Birck, M. Delmarcelle, M. Delarue, O. Poch, P. Schultz, C. Mayer, 2009. Structure of the archaeal pab87 peptidase reveals a novel self-compartmentalizing protease family. *PLoS ONE* 4, e4712.
- Doublet, S., 1997. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods in enzymology* 276, 523.
- Doucet, J., J.P. Benoit, 1987. *Nature* 325, 643-646.
- Fourme, R., 1968. Appareillage pour études radiocristallographiques sous pression et à température variable. *Journal of Applied Crystallography* 1, 23-30.
- Fourme, R., W. Shepard, R. Kahn, G. L'hermite, I. Li de La Sierra, 1995. The Multiwavelength Anomalous Solvent Contrast (MASC) Method in Macromolecular Crystallography. *Journal of synchrotron radiation* 2, 36-48.
- Fourme, R., E. Girard, R. Kahn, I. Ascone, M. Mezouar, A.C. Dhaussy, T. Lin, J.E. Johnson, 2003. Using a quasi-parallel X-ray beam of ultrashort wavelength for high-pressure virus crystallography: implications for standard macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1767-72.
- Fourme, R., E. Girard, A.-C. Dhaussy, K. Medjoubi, T. Prangé, I. Ascone, M. Mezouar, R. Kahn, 2011. A new paradigm for macromolecular crystallography beamlines derived from high-pressure methodology and results. *Journal of synchrotron radiation* 18, 31-36.
- Girard, E., L. Chantalat, J. Vicat, R. Kahn, 2002. Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1-9.
- Girard, E., M. Stelter, J. Vicat, R. Kahn, 2003. A new class of lanthanide complexes to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1914-22.
- Girard, E., A.-C. Dhaussy, B. Couzinet, J.-C. Chervin, M. Mezouar, R. Kahn, I. Ascone, R. Fourme, 2007. Toward fully fledged high-pressure macromolecular crystallography. *Journal of Applied Crystallography* 40, 912-918.
- Girard, E., R. Fourme, R. Cieurko, J. Joly, F. Bouis, P. Legrand, J. Jacobs, A.-C. Dhaussy, J.-L. Ferrer, M. Mezouar, R. Kahn, 2010a. Macromolecular crystallography at high pressure with pneumatic diamond anvil cells handled by a six-axis robotic arm. *Journal of Applied Crystallography* 43, 762-768.
- Girard, E., S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, M. Giffard, F. Dulin, F. Bonneté, R. Lange, J.H. Abraini, M. Mezouar, N. Colloc'h, 2010b. Structure-Function Perturbation and Dissociation of Tetrameric Urate Oxidase by High Hydrostatic Pressure. *Biophys J* 98, 2365-2373.
- Gras, S., V. Chaumont, B. Fernandez, P. Carpentier, F. Charrier-Savournin, S. Schmitt, C. Pineau, D. Flament, A. Hecker, P. Forterre, J. Armengaud, D. Housset, 2007. Structural insights into a new homodimeric self-activated GTPase family. *EMBO reports* 8, 569-75.
- Grass, G., C. Grosse, D.H. Nies, 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *Journal of Bacteriology* 182, 1390-8.
- Gruszczyk, J., A. Fleurie, V. Olivares-Illana, E. Béchet, I. Zanella-Cleon, S. Moréra, P. Meyer, G. Pompidor, R. Kahn, C. Grangeasse, S. Nessler, 2011. Structure analysis of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase Cap50 involved in capsular polysaccharide biosynthesis. *J Biol Chem* 286, 17112-21.
- Hendrickson, W.A., J.R. Horton, D.M. Lemaster, 1990. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J* 9, 1665-72.
- Hermoso, J.A., L. Lagartera, A. González, M. Stelter, P. García, M. Martínez-Ripoll, J.L. García, M. Menéndez, 2005. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 533-8.
- Jacquamet, L., J. Ohana, J. Joly, P. Legrand, R. Kahn, F. Borel, M. Pirocchi, P. Charrault, P. Carpentier, J.L. Ferrer, 2004. A new highly integrated sample environment for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 888-94.
- Jacquamet, L., J. Joly, A. Bertoni, P. Charrault, M. Pirocchi, X. Vernede, F. Bouis, F. Borel, J.P. Périn, T. Denis, J.L. Rechatin, J.L. Ferrer, 2009. Upgrade of the CATS sample changer on FIP-BM30A at the ESRF: towards a commercialized standard. *Journal of synchrotron radiation* 16, 14-21.
- Jamieson, A.J., T. Fujii, M. Solan, A.K. Matsumoto, P.M. Bagley, I.G. Priede, 2009. Liparid and macrourid fishes of the hadal zone: in situ observations of activity and feeding behaviour. *Proc Biol Sci* 276, 1037-45.

- Jeudy, S., M. Stelter, B. Coutard, R. Kahn, C. Abergel, 2005. Preliminary crystallographic analysis of the Escherichia coli YeaZ protein using the anomalous signal of a gadolinium derivative. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61, 848-51.
- Kahn, R., R. Fourme, R. Bosshard, M. Chiadmi, J. Risler, O. Dideberg, J. Wery, 1985. Crystal structure study of Opsanus tau parvalbumin by multiwavelength anomalous diffraction. *FEBS letters* 179, 133-137.
- Kalbitzer, H.R., M. Spoerner, P. Ganser, C. Hozsa, W. Kremer, 2009. Fundamental link between folding states and functional states of proteins. *Journal of the American Chemical Society* 131, 16714-9.
- Kato, C., M.H. Qureshi, 1999. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1, 87-92.
- Katrusiak, A., Z. Dauter, 1996. Compressibility of lysozyme protein crystals by X-ray diffraction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 607-8.
- Kennard, O., W.B. Cruse, J. Nachman, T. Prange, Z. Shakked, D. Rabinovich, 1986. Ordered water structure in an A-DNA octamer at 1.7 Å resolution. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 3, 623-47.
- Kim, C., B. Barstow, M. Tate, S. Gruner, 2009. Evidence for liquid water during the high-density to low-density amorphous ice transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 4596.
- Kim, C.U., R. Kapfer, S.M. Gruner, 2005. High-pressure cooling of protein crystals without cryoprotectants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 881-90.
- Kolb, H.C., K.B. Sharpless, 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* 8, 1128-37.
- Kolb, H.C., M.G. Finn, K.B. Sharpless, 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 2004-2021.
- Kundrot, C., F. Richards, 1986. Collection and processing of X-ray diffraction data from protein crystals at high pressure. *Journal of Applied Crystallography* 19, 208-213.
- Lauro, F.M., D.H. Bartlett, 2008. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. *Extremophiles* 12, 15-25.
- Lewis, W.G., L.G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, K.B. Sharpless, 2002. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1053-7.
- Li, H., H. Yamada, K. Akasaka, 1998. Effect of pressure on individual hydrogen bonds in proteins. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 37, 1167-73.
- Lo, V., R. Kingston, R. Millane, 2009. Determination of molecular envelopes from solvent contrast variation data. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* 65, 312-318.
- Lo, V.L., R.P. Millane, 2008. Reconstruction of compact binary images from limited Fourier amplitude data. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 25, 2600-7.
- Lott, J.S., M.J. Banfield, J. Sigrell, E.N. Baker, 2003. Making the most of two crystals: structural analysis of a conserved hypothetical protein using native gel screening and SAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 2242-6.
- Madern, D., C. Ebel, G. Zaccai, 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-8.
- Marassio, G., T. Prangé, H.N. David, J. Sopkova-de Oliveira Santos, L. Gabison, N. Delcroix, J.H. Abraini, N. Colloc'h, 2011. Pressure-response analysis of anesthetic gases xenon and nitrous oxide on urate oxidase: a crystallographic study. *The FASEB Journal* 25, 2266-75.
- Marchi, M., K. Akasaka, 2000. Simulation of Hydrated BPTI at High Pressure: Changes in Hydrogen Bonding and Its Relation with NMR Experiments. *The Journal of Physical Chemistry B* 105, 711-714.
- Márquez, J., S. Reinelt, B. Koch, R. Engelmann, W. Hengstenberg, K. Scheffzek, 2006. Structure of the full-length enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* 281, 32508-15.
- Matsuoka, D., M. Nakasako, 2009. Probability distributions of hydration water molecules around polar protein atoms obtained by a database analysis. *The journal of physical chemistry B* 113, 11274-92.
- Matsuoka, D., M. Nakasako, 2010. Prediction of hydration structures around hydrophilic surfaces of proteins by using the empirical hydration distribution functions from a database analysis. *The journal of physical chemistry B* 114, 4652-63.
- Molina, R., M. Stelter, R. Kahn, J. Hermoso, 2009a. Characterization of gadolinium complexes for SAD phasing in macromolecular crystallography: application to CbpF. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 65, 823-831.
- Molina, R., A. González, M. Moscoso, P. García, M. Stelter, R. Kahn, J.A. Hermoso, 2007. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of choline-binding protein F from Streptococcus pneumoniae. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 63, 742-745.
- Molina, R., A. González, M. Stelter, I. Pérez-Dorado, R. Kahn, M. Morales, M. Moscoso, S. Campuzano, N.E. Campillo, S. Mobashery, J.L. García, P. García, J.A. Hermoso, 2009b. Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from Streptococcus pneumoniae. *EMBO reports* 10, 246-51.

- Monchy, S., M.A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie, M. Mergeay, 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 189, 7417-25.
- Morales, R., A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, M.-L. Chesne-Seck, F. Bernier, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorselaer, J.C. Fontecilla-Camps, P. Masson, D. Rochu, E. Chabriere, 2006. Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. *Structure* 14, 601-9.
- Nagem, R.A., Z. Dauter, I. Polikarpov, 2001. Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 996-1002.
- Nakasako, M., 1999. Large-scale networks of hydration water molecules around bovine beta-trypsin revealed by cryogenic X-ray crystal structure analysis. *Journal of Molecular Biology* 289, 547-64.
- Nakasako, M., 2004. Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 359, 1191-204; discussion 1204-6.
- Oger, P.M., M. Jebbar, 2010. The many ways of coping with pressure. *Res Microbiol* 161, 799-809.
- Paci, E., 2002. High pressure simulations of biomolecules. *Biochim Biophys Acta* 1595, 185-200.
- Paci, E., M. Marchi, 1996. Intrinsic compressibility and volume compression in solvated proteins by molecular dynamics simulation at high pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11609-14.
- Pérez-Dorado, I., R. Sanles, A. González, P. García, J.L. García, M. Martínez-Ripoll, J.A. Hermoso, 2010a. Crystallization of the pneumococcal autolysin LytC: in-house phasing using novel lanthanide complexes. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 448-51.
- Pérez-Dorado, I., A. González, M. Morales, R. Sanles, W. Striker, W. Vollmer, S. Mobashery, J.L. García, M. Martínez-Ripoll, P. García, J.A. Hermoso, 2010b. Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 576-81.
- Pompidor, G., O. Maury, J. Vicat, R. Kahn, 2010. A diphosphate lanthanide complex for solving protein structures using anomalous diffraction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 762-769.
- Pompidor, G., A. D'Aléo, J. Vicat, L. Toupet, N. Giraud, R. Kahn, O. Maury, 2008. Protein crystallography through supramolecular interactions between a lanthanide complex and arginine. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 3388-91.
- Porciero, S., V. Receveur-Brechot, K. Mori, B. Franzetti, A. Roussel, 2005. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a deblocking aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 61, 239-242.
- Purdy, M.D., P. Ge, J. Chen, P.R. Selvin, M.C. Wiener, 2002. Thiol-reactive lanthanide chelates for phasing protein X-ray diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1111-7.
- Rajendran, C., F.S.N. Dworkowski, M. Wang, C. Schulze-Briese, 2011. Radiation damage in room-temperature data acquisition with the PILATUS 6M pixel detector. *Journal of synchrotron radiation* 18, 0-0.
- Ramin, M., W. Shepard, R. Fourme, R. Kahn, 1999. Multiwavelength anomalous solvent contrast (MASC): derivation of envelope structure-factor amplitudes and comparison with model values. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 157-67.
- Refaee, M., T. Tezuka, K. Akasaka, M.P. Williamson, 2003. Pressure-dependent changes in the solution structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology* 327, 857-65.
- Rivalain, N., J. Roquain, G. Demazeau, 2010. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances* 28, 659-72.
- Salgado, P.S., J.D. Taylor, E. Cota, S.J. Matthews, 2011. Extending the usability of the phasing power of diselenide bonds: SeCys SAD phasing of CsgC using a non-auxotrophic strain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 8-13.
- Sanchez, J.-F., F. Hoh, M.-P. Strub, A. Aumelas, C. Dumas, 2002. Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein. *Structure* 10, 1363-70.
- Schoehn, G., F.M.D. Vellieux, M. Asunción Durá, V. Receveur-Brechot, C.M.S. Fabry, R.W.H. Ruigrok, C. Ebel, A. Roussel, B. Franzetti, 2006. An archaeal peptidase assembles into two different quaternary structures: A tetrahedron and a giant octahedron. *J Biol Chem* 281, 36327-37.
- Shepard, W., R. Kahn, M. Ramin, R. Fourme, 2000. Low-resolution phase information in multiple-wavelength anomalous solvent contrast variation experiments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 1288-303.
- Shimizu, N., K. Hirata, K. Hasegawa, G. Ueno, M. Yamamoto, 2007. Dose dependence of radiation damage for protein crystals studied at various X-ray energies. *Journal of synchrotron radiation* 14, 4-10.

- Silvaggi, N.R., L.J. Martin, H. Schwalbe, B. Imperiali, K.N. Allen, 2007. Double-lanthanide-binding tags for macromolecular crystallographic structure determination. *Journal of the American Chemical Society* 129, 7114-20.
- Simonato, F., S. Campanaro, F.M. Lauro, A. Vezzi, M. D'Angelo, N. Vitulo, G. Valle, D.H. Bartlett, 2006. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J Biotechnol* 126, 11-25.
- Smeller, L., F. Meersman, K. Heremans, 2006. Refolding studies using pressure: the folding landscape of lysozyme in the pressure-temperature plane. *Biochim Biophys Acta* 1764, 497-505.
- Strub, M.P., F. Hoh, J.F. Sanchez, J.M. Strub, A. Böck, A. Aumelas, C. Dumas, 2003. Selenomethionine and selenocysteine double labeling strategy for crystallographic phasing. *Structure* 11, 1359-67.
- Takai, K., K. Nakamura, T. Toki, U. Tsunogai, M. Miyazaki, J. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura, K. Horikoshi, 2008. Cell proliferation at 122 degrees C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10949-54.
- Talon, R., R. Kahn, M.A. Durá, O. Maury, F.M.D. Vellieux, B. Franzetti, E. Girard, 2011. Using lanthanoid complexes to phase large macromolecular assemblies. *Journal of synchrotron radiation* 18, 74-78.
- Tibazarwa, C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns, D. van Der Lelie, 2000. Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *Journal of Bacteriology* 182, 1399-409.
- Trepreau, J., E. Girard, A.P. Maillard, E. de Rosny, I. Petit-Haertlein, R. Kahn, J. Covès, 2011. Structural Basis for Metal Sensing by CnrX. *Journal of Molecular Biology* 408, 766-79.
- Urayama, P., G.N. Phillips, S.M. Gruner, 2002. Probing substates in sperm whale myoglobin using high-pressure crystallography. *Structure* 10, 51-60.
- Ursby, T., M. Weik, E. Fioravanti, M. Delarue, M. Goeldner, D. Bourgeois, 2002. Cryophotolysis of caged compounds: a technique for trapping intermediate states in protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 607-14.
- Vuillard, L., C. Braun-Breton, T. Rabilloud, 1995. Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification. *Biochem J* 305 (Pt 1), 337-43.
- Walden, H., 2010. Selenium incorporation using recombinant techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 352-7.
- Watson, J.D., F.H.C. Crick, 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weis, W.I., R. Kahn, R. Fourme, K. Drickamer, W.A. Hendrickson, 1991. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254, 1608-15.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, W.J. Wiebe, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6578-83.
- Xu, J., L. Liu, M. Xu, P. Oger, F. Wang, M. Jebbar, X. Xiao, 2011. Genome Announcement : Complete genome sequence of the first obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *Journal of Bacteriology*.
- Zeng, X., J.-L. Birrien, Y. Fouquet, G. Cherkashov, M. Jebbar, J. Querellou, P. Oger, M.-A. Cambon-Bonavita, X. Xiao, D. Prieur, 2009. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME J* 3, 873-6.