



**HAL**  
open science

# Dynamique des protéines et dynamique de l'eau d'hydratation

Martin Weik

► **To cite this version:**

Martin Weik. Dynamique des protéines et dynamique de l'eau d'hydratation. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble 1, 2006. tel-03030553

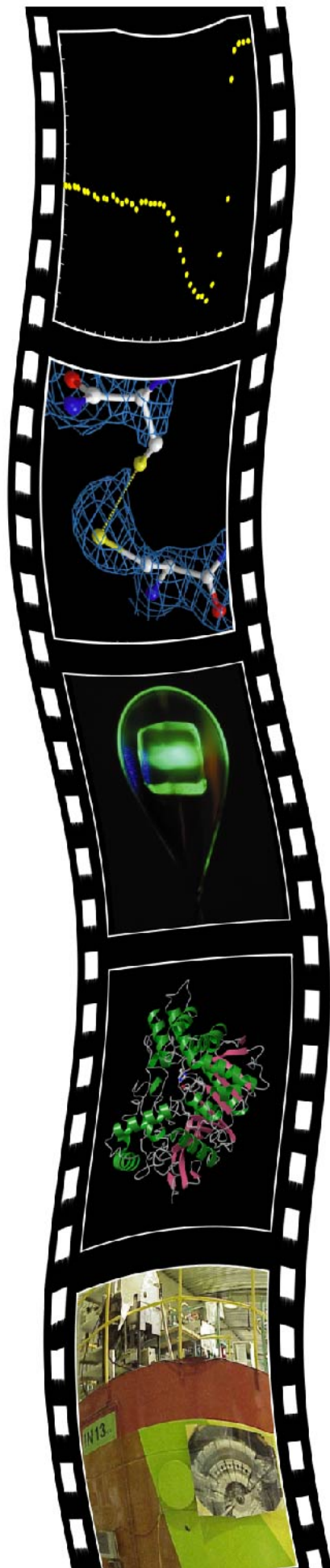
**HAL Id: tel-03030553**

**<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-03030553>**

Submitted on 30 Nov 2020

**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**

**dynamique des protéines et  
dynamique de l'eau d'hydratation**

**martin weik**

**DHDR soutenue le 12 juillet 2006  
devant la commission d'examen composée de:**

**dr. e. garman  
prof. u. nienhaus  
prof. m. lemaire  
dr. g. zaccai  
dr. ch. ebel  
prof. j. vicat**

**rapporteur  
rapporteur  
rapporteur  
examineur  
examineur  
examineur**

# SOMMAIRE

Chapitre 1 :	<i>Introduction</i>	1
Chapitre 2 :	<i>L'eau confinée par des macromolécules biologiques</i>	8
2.1	L'eau confinée par des protéines cristallines	8
2.2	L'eau confinée par des membranes	12
Chapitre 3 :	<i>La dynamique globale de la membrane pourpre et de l'eau d'hydratation étudiée par diffusion neutronique</i>	16
Chapitre 4 :	<i>Les dommages par rayons-X : un outil pour étudier la cinématique structurale de protéines cristallines</i>	20
4.1	Les rayons-X laissent des traces structurales dans les protéines	20
4.2	Effet de la température sur les dommages dans l'acétylcholinestérase	27
4.3	Effet de la température sur les dommages dans la trypsine	31
Chapitre 5 :	<i>La cryo-cristallographie cinétique se base sur la dynamique des protéines et de l'eau</i>	36
5.1	Structure et fonction de l'acétylcholinestérase	37
5.2	La cryo-cristallographie cinétique appliquée à l'acétylcholinestérase	38
5.3	Composés en cage et cryo-photolyse	40
5.4	Un nouvel outil spectroscopique pour la cristallographie cinétique	42
5.5	Avancement des travaux	43
Chapitre 6 :	<i>Conclusions</i>	45
Chapitre 7 :	<i>Projets de recherche</i>	
7.1	Effets des rayonnements ionisants sur la structure et l'activité de protéines issues de différents organismes extrémophiles	46
7.2	Etude de la relation entre la structure, la dynamique et la fonction dans les protéines photosensibles par cryo-cristallographie cinétique	47
7.3	Projets liés à l'étude de l'eau en biologie	49
Références		51

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### **Une structure protéique est dynamique**

Les protéines remplissent des fonctions diverses et variées dans le monde du vivant. La catalyse enzymatique, la transduction de signaux ou le transport de molécules n'en représentent que quelques exemples. Afin de remplir son rôle biologique, une protéine doit généralement être dotée d'une architecture tridimensionnelle adaptée et spécifique. Depuis la résolution de la première structure protéique, celle de la myoglobine en 1958, l'information structurale ne cesse d'augmenter et la PDB (*Protein Data Bank*) contient aujourd'hui plus de 30000 structures, regroupées dans 500 types de repliement (*protein fold*) différents. Ces structures donnent une image statique des protéines, alors qu'en réalité elles sont animées par des mouvements, sans lesquels les protéines ne pourraient pas remplir leur rôle biologique. Les mouvements dans les protéines ont lieu dans une large gamme de temps : fs pour les vibrations de liaisons, ps-ns pour les mouvements thermiques au niveau atomique, ns- $\mu$ s pour les mouvements d'acides aminés et de domaines,  $\mu$ s-ms pour un cycle complet d'une catalyse enzymatique, ms-s pour le repliement d'une protéine. La *dynamique* des protéines se réfère aux mouvements et aux forces qui les induisent. La *cinématique* ou la *cinétique* décrit des mouvements sans faire appel aux forces. Un vaste répertoire de techniques biophysiques permet d'étudier la dynamique et la cinématique des protéines, y compris la diffusion de neutrons (revue par Gabel *et al.*, 2002), la résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution (revue par Palmer, 2004) et dans l'état solide (revue par McDermott, 2004), la simulation par dynamique moléculaire (revue par Karplus & McCammon, 2002), la spectroscopie Mössbauer (revue par Parak, 2003), la cristallographie cinétique (Bourgeois & Royant, 2005) et la cristallographie résolue dans le temps (numéro spécial *J. Struct. Biol.* 147, 209 – 246 (2004)). Ces techniques sont sensibles à des mouvements sur des échelles de temps et de longueurs différentes.

Chaque protéine n'est stable et active que dans une gamme très restreinte de température qui se trouve généralement au dessus de 0°C. Néanmoins, l'étude des protéines à des températures cryogéniques s'est révélée fructueuse pour l'exploration des bases physiques



qui régissent la dynamique macromoléculaire à des températures physiologiques. A basse température, certains types de mouvements sont ralentis, d'autres sont abolis, ce qui permet de décortiquer les différentes composantes de la dynamique macromoléculaire. Par analogie, nous pourrions imaginer l'étude du fonctionnement d'un moteur, qui serait plus facile si le moteur tourne au ralenti que s'il fonctionne à toute vitesse. Ainsi, l'étude de la liaison du CO dans la myoglobine après photolyse par laser entre 40 et 350 K (Austin *et al.*, 1975) a inspiré Hans Frauenfelder et ses collaborateurs qui ont proposé leur concept du paysage énergétique (*energy landscape*) des structures protéiques (Frauenfelder *et al.*, 1991). Dans ce concept, chaque protéine d'une conformation donnée peut adopter différents sous-états conformationnels (*conformational substates* (CS)) qui sont quasi-isoénergétiques (figure 1).

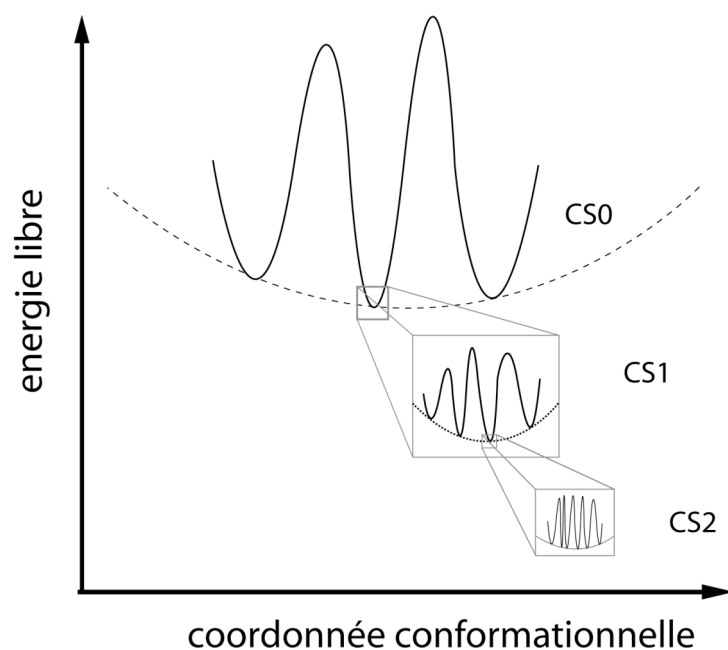


Figure 1 : Sous-états conformationnels à trois niveaux différents dans le paysage énergétique d'une protéine (d'après Frauenfelder *et al.* 1991). On représente la projection du paysage énergétique sur une seule coordonnée conformationnelle ; en réalité il est d'une dimensionnalité très élevée.

La transition d'un CS vers un autre nécessite des mouvements intra-moléculaires particuliers. Selon Frauenfelder, le paysage énergétique est organisé en niveaux hiérarchiques, avec des barrières d'énergie de hauteurs différentes. Le 'niveau 0' ne comporte que quelques CS qui sont séparés par des barrières d'énergie élevées (e.g. les CS  $A_0$ ,  $A_1$  et  $A_3$  dans la myoglobine). Les transitions entre ces CS correspondent à des changements conformationnels lents ( $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ ), comme par exemple ceux impliqués dans la catalyse enzymatique (Mulder *et al.*, 2001 ; Eisenmesser *et al.*, 2002, 2005). Chaque CS du niveau 0 comporte lui-même différents CS (ceux du niveau 1) qui sont séparés par des barrières d'énergie plus petites. Les CS au niveau le plus bas (niveau 2) sont très nombreux et les transitions entre eux correspondent à des mouvements thermiques sur l'échelle de temps de la ps à une centaine de

ns. Ces mouvements atomiques rapides ont été proposés comme le lubrifiant des mouvements collectifs plus lents qui impliquent plusieurs acides aminés (Brooks *et al.*, 1988).

Etudiés en fonction de la (cryo-)température, les mouvements thermiques montrent une transition dynamique, mise en évidence d'abord pour les mouvements locaux du fer dans la myoglobine par spectroscopie Mössbauer (Parak *et al.*, 1982). Ensuite, la diffusion neutronique a pu montrer que la transition dynamique concerne les mouvements thermiques d'une protéine sur son échelle globale (Doster *et al.*, 1989, Ferrand *et al.*, 1993). La transition dynamique dans les protéines et dans les membranes biologiques a lieu à une température entre 150 et 250 K (Doster *et al.*, 1989; Ferrand *et al.*, 1993; Réat *et al.*, 1997; Lehnert *et al.*, 1998; Fitter, 1999; Tsai *et al.*, 2000) et marque le changement d'un régime harmonique de petites amplitudes vers un régime anharmonique de plus grandes amplitudes. Dans certaines protéines, la flexibilité accrue au niveau atomique au dessus de la transition dynamique s'est montrée nécessaire pour leur activité biologique (Rasmussen *et al.*, 1992 ; Lichtenegger *et al.*, 1999 ; Ostermann *et al.*, 2000). Cependant, certaines enzymes sont soit actives au-dessous de leur transition dynamique (Daniel *et al.*, 1998 ; Bragger *et al.*, 2000), soit elles parcourent une partie de leur cycle catalytique (Heyes *et al.*, 2002). L'importance de la transition dynamique pour l'activité biologique est donc discutée de façon controversée. Plus généralement, il n'est pas encore clairement établi quels types de mouvements (*i.e.* quels niveaux dans le paysage énergétique) dans une protéine sont nécessaires à la fonction biologique et quels sont ceux qui ne le sont pas. L'étude de la dynamique et de l'activité biologique des protéines en fonction de leur hydratation permet d'aborder cette question autrement. La plupart des études décrites dans ce mémoire abordent la relation entre la dynamique et la cinétique d'une protéine et celle de son environnement direct, à savoir l'eau d'hydratation à proximité de sa surface.

### **L'eau d'hydratation des protéines est différente de l'eau massive**

Les cellules biologiques contiennent environ 75% d'eau (en masse ou en volume). Etant donné que la distance moyenne entre deux macromolécules biologiques dans une cellule est d'environ 12 Å (Clegg & Drost-Hansen, 1991) la plus grande partie de l'eau 'biologique' est donc confinée et diffère de l'eau massive (*bulk water*). L'eau interagit avec la surface d'une macromolécule biologique, ce qui modifie des propriétés telles que sa densité ou sa mobilité (Rupley & Careri, 1991). La perturbation de l'eau par la présence de la surface hydrophile induit une organisation en couches avec une périodicité de 2.5 Å (Israelachvili & Pashley, 1983 ; Antognozzi *et al.*, 2001) qui peut s'étendre jusqu'à une distance de 8 Å de la surface (Jiang & Brünger, 1994). Les molécules d'eau dans la première couche d'hydratation

(*first hydration layer*) font partie intégrale d'une protéine et occupent souvent des places bien déterminées (Bon *et al.*, 1999). Cependant, elles ne doivent pas être considérées comme étant liées à la surface car leur coefficient de diffusion n'est réduit que d'un facteur 5 par rapport à l'eau massive (Bon *et al.*, 2002). La présence de la première couche d'hydratation qui couvre toute la surface, ou du moins d'un réseau continu de molécules d'eau qui couvre une partie de la surface, est nécessaire pour qu'une protéine puisse être fonctionnelle (Rupley & Careri, 1991 ; Oleinikova *et al.*, 2005). En ce qui concerne le comportement de l'eau en biologie à des températures en dessous de 0°C, elle se comprend mieux après avoir résumé le comportement de l'eau massive.

L'eau massive forme généralement de la glace cristalline (à maille hexagonale,  $I_h$ , à pression atmosphérique) en dessous de 0°C. Cependant, dans certaines conditions, elle peut être maintenue dans un état dit 'surfondu' si le nombre de germes de nucléation est petit. C'est le cas, par exemple, pour l'eau très pure ou pour l'eau dans un petit volume. En revanche, elle se transforme inévitablement en glace cristalline si l'on s'approche de la température de nucléation homogène (235 K à pression atmosphérique ; Kanno *et al.*, 1975). Plusieurs formes cristallines différentes peuvent être formées à des pressions élevées (Figure 2a). La formation de glace cristalline peut être contournée si la température de l'eau liquide est abaissée de façon brusque (trempe rapide). Dans ce cas, le liquide se fige et forme une glace dite 'vitreuse' (*hyper-quenched glassy water* (HQGW)). La condensation de vapeur sur un substrat à très basse température est une autre façon de former de la glace vitreuse (amorphous solid water (ASW), revue par Mayer, 1991 ; Mishima & Stanley, 1998). Enfin, une forme de glace vitreuse de haute densité (high-density amorphous ice (HDA)) peut être obtenue en soumettant  $I_h$  à 77 K à une pression de 10 kbar. En chauffant, HDA se transforme en une forme de densité inférieure (low-density amorphous ice (LDA)) en dessus de 117 K à pression atmosphérique (Mishima *et al.*, 1984). La transformation de HDA (densité de 1.17 g/cm<sup>3</sup> à pression atmosphérique) en LDA (0.94 g/cm<sup>3</sup>) est accompagnée d'un changement de volume d'environ 20% (Mishima *et al.*, 1985). LDA, ASW et HQGW ont des structures et des densités similaires (Mishima & Stanley, 1998). Il est largement accepté que ces trois formes subissent une transition vitreuse en chauffant (à 136 K dans le cas de HQGW et de ASW, et à 129 K dans le cas de LDA, McMillan & Los, 1965 ; Johari *et al.*, 1987 ; Mayer, 1991). A la transition vitreuse, la viscosité chute brusquement et on a fait l'hypothèse que la glace amorphe se transforme en un liquide ultra-visqueux (Mishima & Stanley, 1998) à partir duquel de la glace cubique ( $I_c$ ) se forme à 150 K (Mayer, 1991). La glace cubique se transforme en glace hexagonale aux alentours de 186 K (McMillan & Los, 1965). Les

différents états de l'eau trempée rapidement à basse température et à pression atmosphérique sont représentées schématiquement dans la figure 2b. Autour de la transition vitreuse, les molécules d'eau gagnent une liberté rotationnelle (Fisher *et al.*, 1995) et de la diffusion traditionnelle a été observée à 150 K (Smith & Kay, 1999). Cependant, l'existence d'une eau ultra-visqueuse dans la fenêtre de température entre 136 et 150 K reste très controversée (Yue & Angell, 2004 ; Cerveny *et al.*, 2004) et on a supposé que la glace amorphe se transforme directement en glace cristalline à 150 – 160 K (Velikov *et al.*, 2001). Dans tous les cas de figure, l'eau massive est expérimentalement inaccessible à cause de sa cristallisation dans la gamme de température entre 150 et 235 K ; une gamme qui est appelée par conséquent « no man's land ». Comme nous verrons par la suite, l'étude de l'eau confinée par des macromolécules biologiques permet l'accès à ce « no man's land ». De plus, elle apporte un témoignage unique quant à l'existence d'une eau ultra-visqueuse.

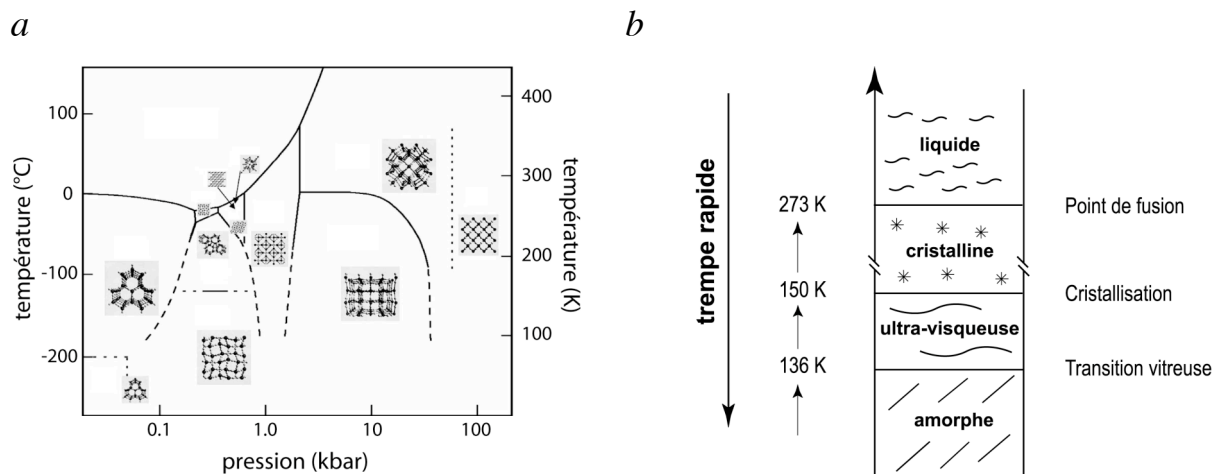


Figure 2 : (a) Diagramme de phase de la glace cristalline (Finney, 2004). (b) Les différents états de l'eau trempée rapidement à basse température et à pression atmosphérique (d'après Mishima & Stanley, 1998).

L'eau au voisinage d'une surface protéique se comporte de façon différente à basse température. Si elle fait partie de la première couche d'hydratation, elle est non-cristallisable (Bellissent-Funel, 2001), ce qui est dû au fait qu'une large partie des liaisons hydrogènes s'établit avec la surface protéique (Dore, 2000), rendant la formation de la structure tétraédrique de la glace cristalline impossible. Une couche d'hydratation correspond à environ 0.4 g d'H<sub>2</sub>O par g de protéine (dénotée par h). Des expériences de calorimétrie et de spectroscopie infrarouge ont suggéré que l'eau non-cristallisable subit une transition vitreuse à une température qui dépend du taux d'hydratation entre 180 et 260 K (Doster *et al.*, 1986). Au delà d'une hydratation de 0.4 h, l'eau peut cristalliser en dessous de 0°C (Sartor *et al.*, 1995). L'eau dans la deuxième couche d'hydratation (0.4 < h < 0.8) peut être vitrifiée par

trempe rapide, subit une transition vitreuse à 164 – 174 K et forme de la glace cristalline à 210 – 220 K (Sartor *et al.*, 1995). La température de la transition vitreuse de l'eau dans la deuxième couche d'hydratation est différente de celle de l'eau massive (136 K). Cela indique qu'elle est structurellement et dynamiquement modifiée par la présence de la surface protéique avec laquelle elle interagit à travers les molécules d'eau dans la première couche d'hydratation. L'étude du comportement de l'eau biologique à basse température n'est pas seulement significative pour la relation avec la dynamique d'une protéine, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, mais elle est aussi cruciale en ce qui concerne les animaux adaptés au froid (revue par Block, 2003). En effet, leurs cellules éclateraient par la formation de glace cristalline en dessous de 0°C si des mécanismes de cryo-protection, telle que la production de sucre, n'avaient pas évolué pour maintenir l'eau dans son état surfondu.

### **La dynamique de l'eau influence la dynamique des protéines**

Des fluctuations dans le solvant et la viscosité du solvant influent sur la dynamique des protéines (Beece *et al.*, 1980 ; Lichtenegger *et al.*, 1999 ; Walser & van Gunsteren, 2001). Les mouvements dans les protéines ont été appelés 'solvent-slaved' (Iben *et al.*, 1989) si leur dépendance en température suit celle des fluctuations diélectriques du solvant, et 'hydration-shell coupled' si elle suit celle des fluctuations dans la première couche d'hydratation (Fenimore *et al.*, 2004). Les mouvements sont 'non-slaved' s'ils sont caractérisés par une dépendance intrinsèque en température qui est indépendante de celle du solvant (Fenimore *et al.*, 2002). Les mouvements du fer de l'hème de la myoglobine, par exemple, dépendent de la température de la même manière que ceux de l'eau d'hydratation (Parak, 1986). Des simulations par dynamique moléculaire ont suggéré que les fluctuations dans le solvant gouvernent les mouvements dans les protéines au dessus de la transition dynamique et que des mouvements intrinsèques dominant en dessous (Vitkup *et al.*, 2000). Les mouvements dans la xylanase à l'échelle de la picoseconde ont été étudiés dans différents cryosolvants par diffusion élastique incohérente de neutrons (Réat *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent que la transition dynamique d'une protéine a lieu à une température déterminée par la température de transition la plus haute entre celle du solvant et celle de la protéine. Même si l'importance des fluctuations dans le solvant pour la dynamique des protéines est généralement acceptée, une vue d'ensemble n'est pas encore dégagée et il pourrait se révéler que le couplage est différent d'une protéine à l'autre.

Ce document me permet de montrer le fil rouge de mes travaux à travers une synthèse originale des études qui abordent la relation entre la structure, la dynamique, la cinématique et l'activité des macromolécules biologiques dans leur environnement. Le comportement de l'eau confinée par des macromolécules biologiques sera présenté dans le chapitre 2. En particulier, des expériences seront présentées qui démontrent qu'une eau ultra-visqueuse existe en dessus de la température de la transition vitreuse dans les canaux des cristaux des protéines et dans l'empilement des membranes pourpres. L'influence de la transition vitreuse de l'eau sur la dynamique de la membrane pourpre et sur la flexibilité des protéines cristallines est explorée dans les chapitre 3 et 4, respectivement. La flexibilité des protéines cristallines est suivie à l'aide des dommages spécifiques créés par l'irradiation avec des rayons X d'une source intense d'un synchrotron. Nos résultats originaux et les détails de ces dommages sont également décrits dans le chapitre 4. Dans le chapitre 5, enfin, on propose une approche de cryo-cristallographie cinétique qui vise à piéger et à explorer structurellement des états intermédiaires dans l'acétylcholinestérase, une enzyme essentielle dans le système nerveux central. Cette approche se base sur les connaissances acquises dans les chapitres 2 à 4. Le document se termine avec une conclusion et par la description de quelques projets pour le futur.

# CHAPITRE 2

## L'EAU CONFINÉE PAR DES MACROMOLÉCULES BIOLOGIQUES

### 2.1 L'eau confinée par des protéines cristallines

Les cristaux de protéines contiennent une large proportion de solvant, typiquement entre 20 et 80% (en poids). En conséquence, les molécules de protéines se serrent peu, leurs zones de contacts mutuels sont limitées et elles gardent leur flexibilité conformationnelle. Ce dernier point fait que la majorité des protéines garde leur activité à l'état cristallin (revue par Mozzarelli & Rossi, 1996). L'empilement des protéines dans un cristal délimite soit des cavités, soit des canaux qui peuvent atteindre un diamètre de 100 Å dans des cas extrêmes (voire Fig. 3a-d pour quelques exemples). En fait, les pourcentages en poids sec des protéines dans un cristal et dans une cellule biologique sont très similaires ; ainsi, une cellule de muscle contient 23% (en poids) de protéines, celle du sang 35% et une cellule en croissance contient entre 17 et 26% (Fulton, 1982). En termes d'encombrement moléculaire, une cellule biologique est par conséquent bien représentée par un cristal de protéines. Pour cette raison, et étant donnée l'importance du solvant pour l'activité et la dynamique des protéines, l'étude du solvant au sein d'un cristal de protéine est biologiquement pertinent.

Un cristal est l'ingrédient primordial dans une expérience de radio-cristallographie qui vise à élucider le repliement tridimensionnel d'une protéine. Aujourd'hui, la radio-cristallographie des protéines se sert largement des faisceaux très intenses des synchrotrons. Par conséquent, la température du cristal doit être abaissée à 100 K pour minimiser la diffusion et les effets néfastes des radicaux libres (revue par Garman, 2003). Afin d'éviter la formation de glace cristalline qui détruirait l'ordre cristallin, la température doit être abaissée par trempe rapide, ce qui rend le solvant du cristal amorphe. Le solvant dans un cristal de protéines diffère de l'eau massive car il est confiné et contient des solutés tels que des précipitants, des tampons ou des cryo-protecteurs. En conséquence, la viscosité du solvant dans un cristal est plus grande que celle de l'eau massive, ce qui permet de le rendre vitreux avec des vitesses de refroidissement accessibles par des flux d'azote gazeux (50 – 500 Ks<sup>-1</sup>, Teng & Moffat, 1998), alors que des vitesses beaucoup plus élevées sont nécessaires pour rendre l'eau massive vitreuse (10<sup>5</sup> Ks<sup>-1</sup>).

Que se passe-t-il lorsqu'un cristal de protéines est réchauffé à partir de 100 K ? Nous nous sommes posés cette question en 1998 quand nous développons une approche de cryo-cristallographie cinétique en fonction de la température, visant à piéger et à étudier structurellement des états intermédiaires dans une enzyme ultra-rapide, l'acétylcholinestérase (AChE, voir chapitre 5). L'analogie avec le comportement de l'eau massive à des températures cryogéniques (figure 2b) prédisait la transformation de la partie aqueuse du solvant amorphe en glace cristalline et l'existence d'une phase ultra-visqueuse. En effet, quand la température d'un cristal trigonal de l'AChE de *Torpedo californica* (*TcAChE*) est augmentée de 100 à 180 K, l'apparition d'anneaux de glace cristalline est observée à 155 K dans les clichés de diffraction de rayons-X (Fig. 3A ; Weik *et al.*, 2001a). A la même température, le volume de la maille élémentaire du cristal augmente d'une façon abrupte. Admettons que la glace amorphe formée pendant la trempe rapide s'étende quand elle forme de la glace cristalline. L'extension abrupte de la maille à 155 K témoigne alors de la formation de glace cristalline à l'intérieur des canaux de solvant du cristal. Les températures auxquelles se forme la glace cristalline dans les cristaux trigonaux de *TcAChE* et dans l'eau massive sont très proches (155 et 150 K, respectivement), ce qui suggère qu'une partie de l'eau dans les canaux larges (65 Å de diamètre ; Fig. 3a) ressemble à de l'eau massive. La formation de glace cristalline est une preuve indirecte que le solvant a subi une transition vitreuse à ou en dessous de 155 K. Nous verrons dans la section suivante sur l'eau confinée dans des empilements de membranes, que les températures de transition vitreuse et de formation de glace semblent être identiques. La *TcAChE* peut former, dans les mêmes conditions de cristallisation que celles des cristaux trigonaux, des cristaux orthorhombiques avec des canaux beaucoup plus étroits (environ 10 Å de diamètre ; Fig. 3b). Le volume de la maille augmente linéairement entre 100 et 180 K (Fig. 3B) sans l'augmentation abrupte observée pour les cristaux trigonaux de *TcAChE* à 155 K (Fig. 3A). Ainsi, le solvant reste sous sa forme amorphe et les canaux moins larges suppriment la formation de glace cristalline. L'observation d'anneaux de glace en dessus de 155 K dans la figure 3B est attribuée à la formation de glace cristalline à la surface des cristaux orthorhombiques de *TcAChE*. La formation de glace cristalline à 155 K dans les canaux des cristaux trigonaux de *TcAChE* suggère, par analogie avec le comportement proposé pour l'eau massive (Fig. 2b), que le solvant est dans une phase ultra-visqueuse à et légèrement en dessous de 155 K. En effet, les expériences sur des cristaux de la trypsine montrent explicitement que le solvant dans un cristal de protéine trempé est ultra-visqueux au moment de la formation de glace cristalline lors du réchauffement (Weik *et al.*, 2005a).



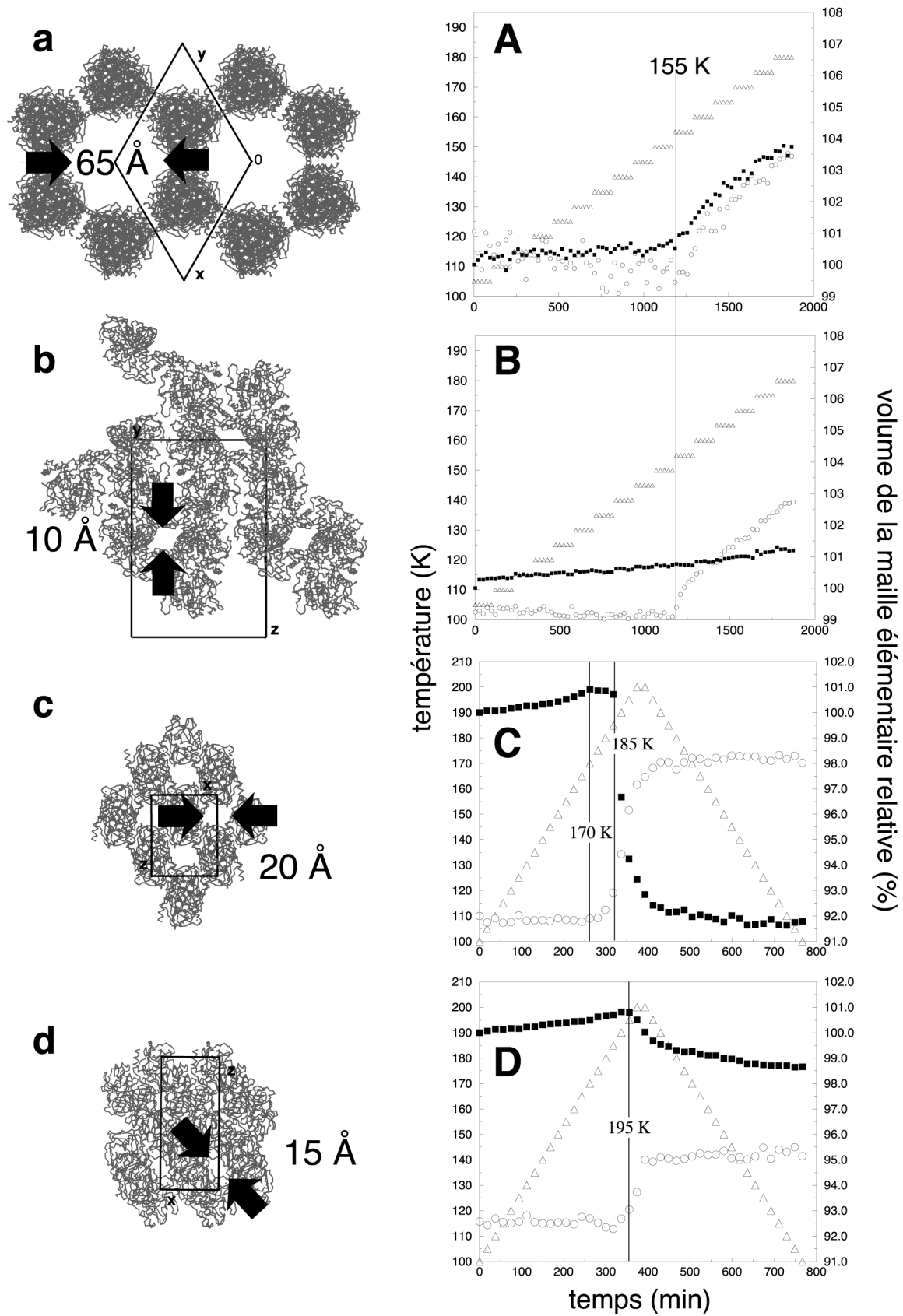


Figure 3 : Empilement cristallin dans des cristaux de *TcAChE* trigonaux (a) et orthorhombiques (b) et de trypsin orthorhombiques (c) et trigonaux (d). Figures (a)-(d) sont à la même échelle. La maille élémentaire, ainsi que la taille des canaux de solvant sont indiquées. Le volume relatif de la maille élémentaire (carrés), l'intensité des anneaux de glace (cercles) et la température (triangles) sont

montrés en fonction du temps dans l'expérience pour des cristaux de *TcAChE* trigonaux (A), orthorhombiques (B), de trypsine orthorhombiques (C) et trigonaux (D). La température a été augmentée de 100 à 180 K en (A) et (B) et de 100 à 200 K puis diminuée ensuite à 100 K en (C) et (D). Le volume a été normalisé par rapport à ceux à 105 K en (A) et (B) et à 100 K en (C) et (D). L'intensité des anneaux de glace a été obtenue par une intégration radiale dans la gamme de résolution entre 4.23 et 3.19 Å en (A) et (B) et entre 2.3 et 2.19 Å en (C) et (D). L'intensité des anneaux de glace ne se réfère à aucun des axes  $y$  et est nulle au début des expériences. Cinq jeux de données (24 min. chacun) et un jeu de données (19 min.) ont été enregistrés à chaque palier de température en (A) et (B) et en (C) et (D), respectivement (Weik et al., 2001a ; 2005a)

Comme l'AChE, la trypsine donne naissance à deux formes cristallines différentes dans les mêmes conditions de cristallisation. Ces deux formes, une orthorhombique (Fig. 3c) et une trigonale (Fig. 3d), possèdent des canaux de taille légèrement différente (20 et 15 Å, respectivement). Pendant le réchauffement de 100 à 200 K, le volume de la maille diminue abruptement à 185 (Fig. 3C) et 195 K (Fig. 3D) dans les cristaux orthorhombiques et trigonaux, respectivement, et la formation de glace cristalline est observée aux mêmes températures. Le confinement du solvant dans des canaux étroits des cristaux de la trypsine empêche la formation de la glace cristalline et l'eau du solvant quitte alors le cristal de protéine et forme de la glace à sa surface, ce qui explique la diminution du volume de la maille quand les anneaux de glace cristalline se forment. La diminution de la taille des canaux de 20 (Fig. 3c) à 15 Å (Fig. 3d) augmente la température de la transition vitreuse, et en conséquence celle de la formation de glace cristalline (Fig. 3C et D). En résumé, le comportement du solvant lors du réchauffement d'un cristal trempé d'une protéine à partir de 100 K dépend de plusieurs paramètres, y compris de la composition du solvant et de son degré de confinement dans des canaux plus ou moins larges. Dans des canaux larges, il forme de la glace cristalline, tandis qu'il demeure dans les canaux étroits ou les quitte. L'observation du solvant qui 'coule' à des cryo-températures confirme l'existence controversée d'une phase ultra-visqueuse de l'eau autour de sa température de cristallisation.

L'observation d'un solvant quasi-liquide à des températures cryogéniques ouvre la voie à des expériences de cryo-cristallographie cinétique des protéines. Si nous admettons que la dynamique et la cinématique d'une protéine sont d'une certaine façon influencées par la dynamique du solvant qui l'entoure, nous pouvons émettre l'hypothèse que la flexibilité d'une protéine augmente au moment où le solvant amorphe fond. Puisque le solvant forme aussitôt de la glace cristalline, ce qui le rigidifie de nouveau, il n'existe qu'une petite fenêtre en température et dans le temps dans laquelle nous pouvons espérer voir la flexibilité d'une protéine cristalline augmenter. L'approche de cryo-cristallographie cinétique décrite dans le chapitre 5 explore la possibilité d'utiliser cette fenêtre pour faire avancer la catalyse

enzymatique des cholinestérases, déclenchée à une température inférieure, et de piéger des états intermédiaires structuraux. L'étude des dommages structuraux causés dans des protéines cristallines par les rayons-X représente un autre type de cristallographie cinétique qui fait intervenir les changements d'états du solvant. Comme ce sera détaillé dans le chapitre 4, les dommages spécifiques dans les protéines s'accroissent avec la chute de la viscosité du solvant à sa transition vitreuse, ce qui fait des dommages un marqueur pour la dynamique des protéines. Sur un plan plus fondamental, la transition vitreuse du solvant permet d'aborder la relation entre flexibilité structurale d'une protéine et dynamique du solvant.

## 2.2 L'eau confinée par des membranes

L'empilement de membranes est un autre moyen de confiner l'eau par des macromolécules biologiques. Contrairement au confinement 2D dans les canaux des cristaux de protéines, l'eau dans des empilements de membranes n'est confinée qu'à une dimension. La membrane pourpre (PM) est une membrane biologique, étudiée au Laboratoire de Biophysique Moléculaire depuis plus de 10 ans par diffusion et diffraction neutroniques. Une connaissance détaillée de sa dynamique et de son hydratation en a découlé, ce qui rend la PM propice à une comparaison entre sa dynamique et celle de l'eau d'hydratation, décrite dans cette section et dans le chapitre suivant.

La PM forme des plaques rigides de  $\sim 0.5 \mu\text{m}$  de diamètre dans la membrane cellulaire de l'archéobactérie *Halobacterium salinarium*. Elle n'est composée que d'un type de protéine transmembranaire, la bacteriorhodopsine (BR), et de différentes espèces lipidiques. Le séchage d'une suspension de PM sur un support produit un empilement alternatif de membranes et d'eau dont l'espacement lamellaire est déterminé par l'humidité relative de l'atmosphère. L'épaisseur d'une PM sèche étant de  $49 \text{ \AA}$ , un espacement lamellaire de  $62 \text{ \AA}$  témoigne alors d'une épaisseur de  $13 \text{ \AA}$  d'eau (Fig. 4a). Un tel empilement peut être préparé dans un porte-échantillon rectangulaire en aluminium (transparent aux neutrons) qui se ferme à l'aide d'un couvercle étanche. Cet échantillon peut ensuite être utilisé à la fois pour des expériences de diffraction neutronique pour déterminer l'espacement lamellaire (vu dans cette section) et pour des expériences de diffusion incohérente de neutrons qui visent à déterminer la dynamique de la PM (chapitre 3). Si l'échantillon est refroidi d'une façon lente, l'espacement lamellaire diminue à partir de  $260 \text{ K}$  et atteint une valeur constante d'environ  $54 \text{ \AA}$  à  $250 \text{ K}$  (Lechner *et al.*, 1998 et Fig. 4d). Dans cette même gamme de température apparaissent des pics de diffraction d'une glace cristalline. L'eau quitte alors l'espace intra-

membranaire pour cristalliser à l'extérieur de l'empilement dans des cavités. La diminution de l'espacement lamellaire en témoigne. Seule une épaisseur de 5 Å d'eau (= 54 - 49 Å) reste entre deux fragments de membranes adjacentes (Fig. 4c). Puisqu'une couche monomoléculaire de molécules d'eau à la surface d'une membrane possède une épaisseur de 2.5 Å (Israelachvili & Pashley, 1983), cela correspond à deux couches d'eau, chacune associée à une surface membranaire et constituant les premières couches d'hydratation. Si le porte-échantillon est plongé dans l'azote liquide, puis inséré dans un cryostat à 100 K, l'espacement lamellaire est de 58 Å (Fig. 4b et Weik *et al.*, 2005b). Par rapport à l'espacement après un refroidissement lent (54 Å), une épaisseur de 4 Å d'eau supplémentaire reste dans l'espace intra-membranaire. Cette eau supplémentaire a été piégée dans un état amorphe pendant la trempe rapide. La différence de 4 Å entre l'espacement lamellaire avant (62 Å) et après (58 Å) la trempe rapide montre qu'une partie de l'eau est trop mobile pour être piégée à la vitesse de refroidissement de l'expérience et quitte l'espace inter-membranaire au cours de la trempe.

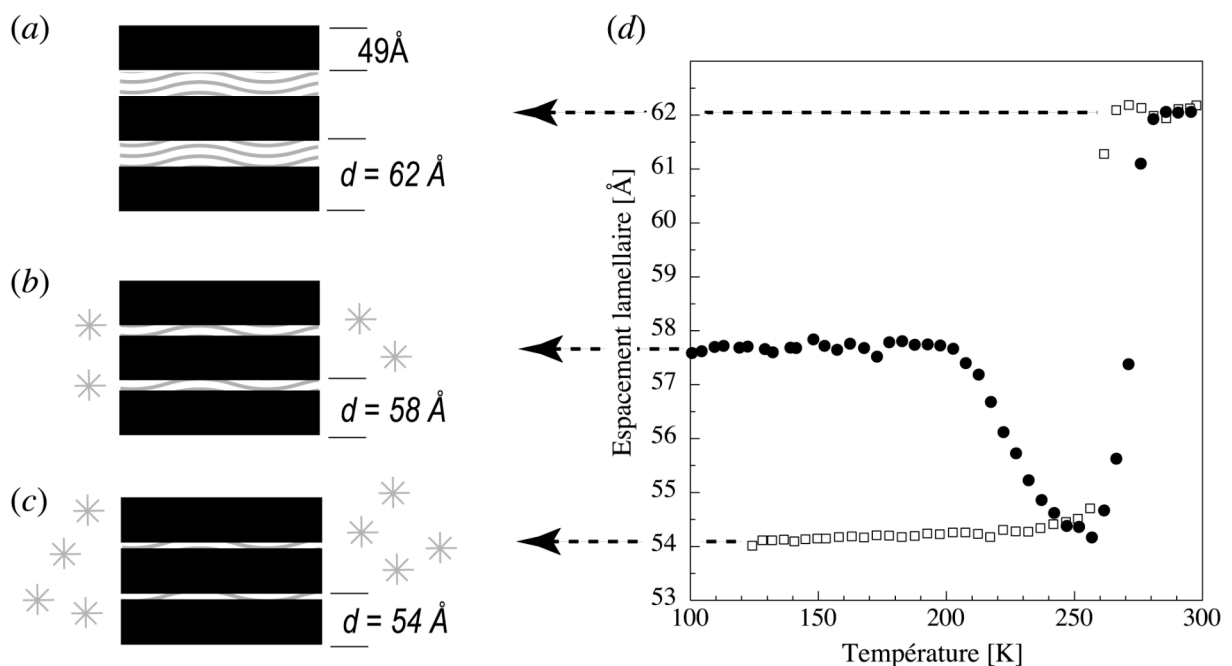


Figure 4 : Représentation schématique d'un empilement de fragments de membrane pourpre et d'eau inter-membranaire à température ambiante (a), après trempe rapide à 100 K (b) et après refroidissement lent à 120 K (c). L'espacement lamellaire  $d$  correspond à la somme de l'épaisseur de la membrane sèche (49 Å) et de celle de l'eau inter-membranaire. L'espacement lamellaire en fonction de la température, déterminé par diffraction neutronique sur le diffractomètre D16 à l'ILL, est montré en (d). Les cercles représentent son évolution après trempe rapide et réchauffement de 100 à 300 Å; les carrés l'évolution pendant le refroidissement subséquent de 300 à 120 K. Chaque point expérimental correspond à un temps écoulé de 28 min (Weik *et al.*, 2005b).

Au cours du réchauffement après la trempe rapide, l'espacement lamellaire reste constant jusqu'à 200 K et diminue au dessus jusqu'à atteindre le minimum de 54 Å à 260 Å. L'eau amorphe piégée pendant la trempe s'est alors 'liquidifiée' à ou en dessous de 200 K et quitte l'espace inter-membranaire afin de former de la glace cristalline. L'eau au-delà des premières couches d'hydratation a donc subit un changement de viscosité, ce qui témoigne d'une transition vitreuse, à ou en-dessous de 200 K. Au-delà de 260 K, l'espacement croit de nouveau et atteint la valeur initiale d'avant la trempe rapide et les pics de diffraction de la glace cristalline disparaissent. La glace cristalline fond et retourne dans l'espace intra-membranaire. L'observation d'une diffusion translationnelle de l'eau confinée entre 200 et 260 K, tout comme celle, faite dans le cas des cristaux de la trypsine (Fig. 3C et D), confirme l'existence d'une eau ultra-visqueuse à des températures cryogéniques.

Quelle est la force motrice derrière le déplacement de l'eau au moment de la cristallisation ? Des études sur des empilements de bicouches lipidiques ont suggéré que le potentiel de l'eau inter-membranaire dépend de l'espacement lamellaire (Gleeson *et al.*, 1994). En outre, la dépendance en température de ce potentiel chimique est différente de celle de la glace cristalline qui se forme en dehors de l'empilement. Suite à un changement de la température, l'espacement lamellaire s'ajuste alors jusqu'à ce que le potentiel chimique de l'eau inter-membranaire et celui de la glace cristalline soient identiques. Cette argumentation suggère que la décroissance de l'espacement lamellaire à 200 K témoigne d'un changement de mobilité de l'eau qui n'a lieu qu'à 200 K et pas au dessous. Si l'eau se 'liquidifiait' en dessous de 200 K, nous nous attendrions à ce que le l'espacement lamellaire commence à baisser à la même température afin d'égaliser les potentiels chimiques. Que le changement de mobilité ait lieu exactement à 200 K est en outre confirmé par des expériences de calorimétrie (Berntsen *et al.*, 2005). Dans ces expériences, un échantillon de PM avec un taux d'hydratation de  $h=0.4$  (correspondant à un espacement lamellaire  $d$  d'environ 60 Å à 300 K) a été examiné après trempe rapide pendant le réchauffement de 120 à 270 K (Fig. 5). Un pic endothermique a été observé à 200 K, témoignant d'un changement de l'eau inter-membranaire d'un état amorphe vers un état ultra-visqueux.

En résumé, l'eau confinée dans un empilement de PM peut être piégée dans un état amorphe par refroidissement rapide. En se réchauffant, elle se transforme en eau ultra-visqueuse à 200 K et s'échappe de l'espace inter-membranaire. Cependant, ces caractéristiques ne peuvent être attribuées avec certitude à l'eau qu'au delà de la première couche d'hydratation car cette dernière reste associée à la membrane à toute température et pour tous les protocoles expérimentaux utilisés. Dans le chapitre suivant, nous essaierons de

savoir si ce changement de mobilité affecte l'eau dans la première couche d'hydratation et s'il déclenche une transition dynamique dans la PM.

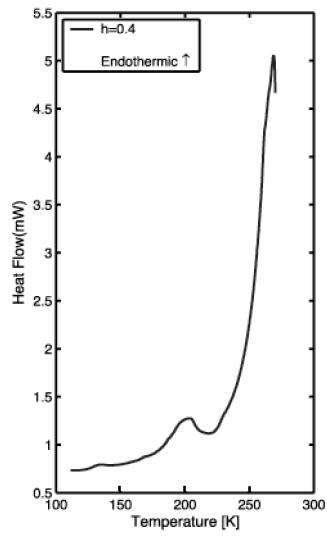


Figure 5 : Scan DSC d'un empilement de PM à une hydratation de  $h=0.4$ . Le signal endothermique à 200 K est attribué au changement de l'eau inter-membranaire d'un état amorphe vers un état ultra-visqueux (Berntsen *et al.*, 2005).

# CHAPITRE 3

## LA DYNAMIQUE GLOBALE DE LA MEMBRANE POURPRE ET DE L'EAU D'HYDRATATION ÉTUDIÉE PAR DIFFUSION NEUTRONIQUE

La diffusion neutronique permet de mesurer la dynamique thermique d'une protéine à l'échelle atomique. En effet, la longueur d'onde (quelques Å) et l'énergie (quelques meV) des neutrons froids ou thermiques correspond aux distances inter-atomiques et aux mouvements thermiques (sur des échelles de temps de la nano- à la picoseconde), respectivement. Les neutrons sont diffusés par les noyaux des atomes et sont sensibles à des effets isotopiques. Le signal de diffusion incohérente d'un atome d'hydrogène est de deux ordres de grandeur plus grand que ceux des autres atomes présents dans les macromolécules biologiques et que celui des atomes de deutérium. En conséquence, et puisque les atomes d'hydrogène sont distribués d'une façon homogène dans les macromolécules biologiques, la diffusion incohérente des neutrons échantillonne la dynamique globale d'une molécule. Le remplacement d'atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium permet de rendre 'invisible' cette partie d'un échantillon biologique. Ainsi, l'étude d'une PM hydrogénée dans du D<sub>2</sub>O explore exclusivement la dynamique de la PM, tandis que l'eau est étudiée spécifiquement dans une PM entièrement deutérée dans du H<sub>2</sub>O. L'échelle de temps des mouvements étudiés dépend de la résolution en énergie du spectromètre à neutrons utilisé. Dans des expériences de diffusion élastique incohérente de neutrons (EINS) sur l'instrument IN16 (résolution en énergie de 1 µeV) à l'Institut Laue-Langenvin, par exemple, tous les mouvements plus rapides qu'environ 1 ns sont étudiés. Une expérience de EINS permet de déterminer le déplacement carré moyen des mouvements thermiques des atomes d'hydrogène. A l'échelle de la nano- à la picoseconde, ces mouvements reflètent la dynamique des groupements chimiques plus larges dont ils font partie, tels que, par exemple, les acides aminés, et donnent un idée de la flexibilité globale d'une macromolécule biologique.

L'évolution du déplacement carré moyen de la PM en fonction de la température est montrée dans la figure 6. Une transition dynamique (voir introduction) peut être observée autour de 260 K au delà de laquelle le déplacement carré moyen des mouvements thermiques augmente avec un taux beaucoup plus important. Pour revenir à la question de savoir si le changement abrupt de la viscosité de l'eau à 200 K influe sur la dynamique de la PM, il

convient de comparer les comportements d'un échantillon refroidi lentement et refroidi par trempe rapide (Figure 6). Aucune différence significative ne peut être observée dans l'évolution du déplacement carré moyen. Autrement dit, la transition vers un état ultra-visqueux de l'eau au delà de la première couche d'hydratation à 200 K (Figure 4) n'induit pas une transition dynamique des mouvements à l'échelle des ns-ps de la PM à la même température (Figure 6). Se pose maintenant la question du comportement de l'eau d'hydratation dans la première couche. Se comporte-t'elle dynamiquement comme la PM ou comme l'eau à côté d'elle?

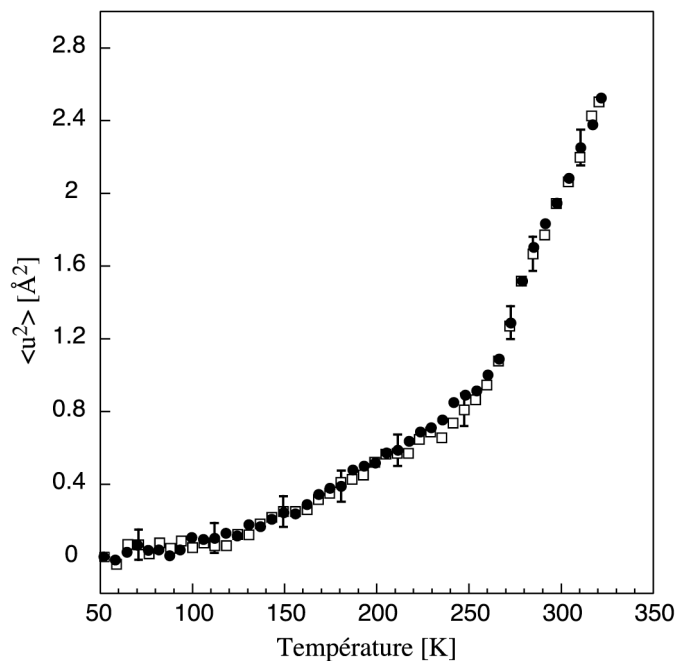


Figure 6 : Déplacement carré moyen ( $\langle u^2 \rangle$ ) de la PM hydrogénée dans du D<sub>2</sub>O pendant le réchauffement de 50 à 320 K après trempe rapide (cercles) et après refroidissement lent (carrés). Les expériences ont été effectuées sur l'instrument IN16 à l'ILL (Weik *et al.*, 2005b). Chaque point expérimental correspond à un temps écoulé de 26 min. Le même échantillon a été utilisé pour les expériences de diffraction (Figure 4) et de diffusion incohérente (Figure 6).

La dynamique de l'eau inter-membranaire peut être étudiée si on utilise la PM deutérée dont le signal de diffusion incohérente est négligeable devant celui de l'H<sub>2</sub>O inter-membranaire. Une telle PM complètement deutérée a été préparée dans le laboratoire du Prof. D. Oesterhelt au *Max-Planck Institut für Biochemie* à Martinsried en Allemagne (Patzelt *et al.*, 1997) avec lequel le Laboratoire de Biophysique Moléculaire à l'IBS entretient une collaboration de longue date. La préparation d'un empilement de PM deutérée à partir d'une suspension d'H<sub>2</sub>O et équilibrage dans une atmosphère d'H<sub>2</sub>O a mené à un échantillon d'un espacement lamellaire de 62 Å à 300 K (Fig. 4a). Pendant le réchauffement après refroidissement lent, l'espacement lamellaire évolue d'une façon identique que les carrés dans la figure 4 pour le cas d'une PM hydrogénée dans du D<sub>2</sub>O (résultat non présenté), *i.e.* une valeur constante de 54 Å jusqu'à 260 K et croissant après. Le déplacement carré moyen de la



PM deutérée dans du H<sub>2</sub>O est montré dans la figure 7. Une première transition dynamique est observée à 200 K. Puisque l'espacement lamellaire est constant jusqu'à 260 K (*i.e.* 54 Å), et comme la glace cristalline formée en dehors de l'empilement pendant le refroidissement lent (Fig. 4c) n'est caractérisée que par des mouvements harmoniques de petite amplitude (Koza *et al.*, 2005), la transition à 200 K est due à l'eau dans les deux premières couches d'hydratation (5 Å = 54 – 49 Å). Le contrôle d'une PM hydrogénée dans du D<sub>2</sub>O ne montre pas de transition dynamique à 200 K (Figures 6 et 7). En revanche, l'eau d'hydratation et la PM montrent une transition dynamique à 260 K quand la glace cristalline fond et retourne dans l'espace inter-membranaire (Fig. 7).

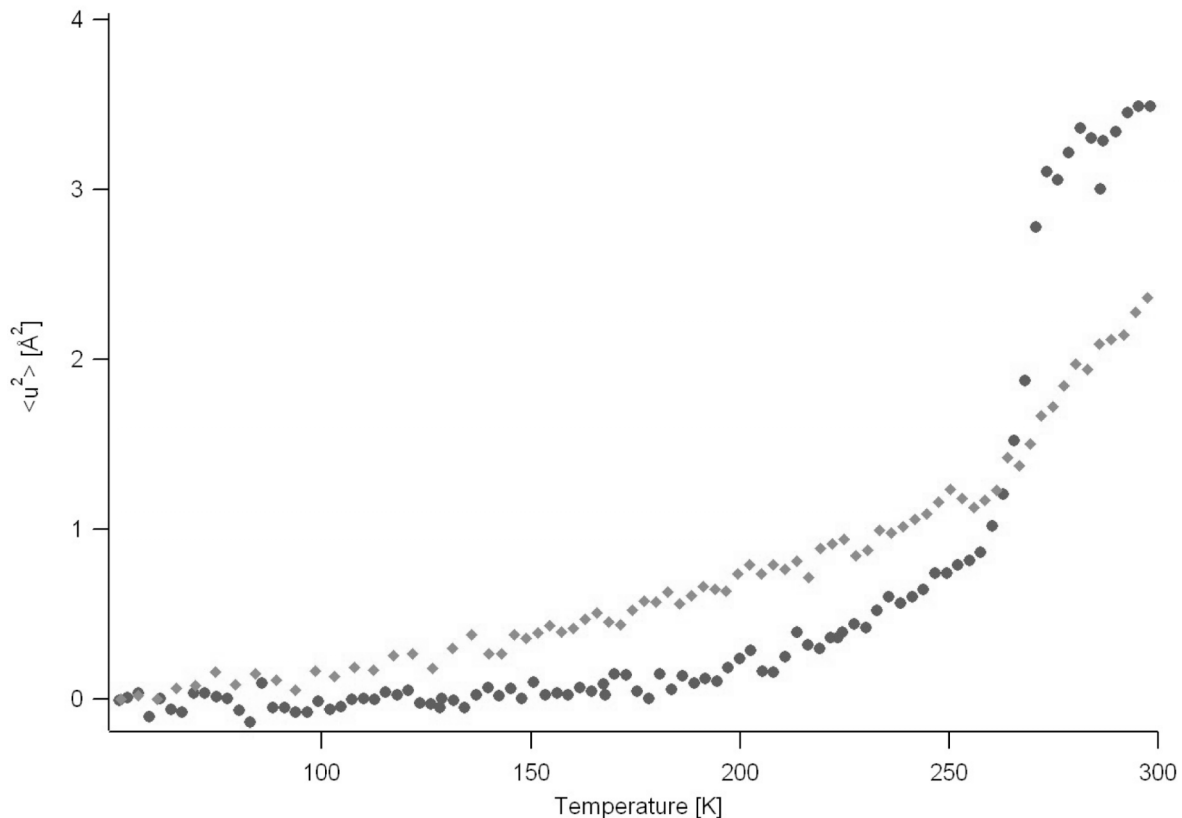


Figure 7 : Déplacement carré moyen ( $\langle u^2 \rangle$ ) de la PM deutérée dans H<sub>2</sub>O (cercles) et PM hydrogénée dans D<sub>2</sub>O (carrés) pendant le réchauffement de 50 à 300 K après refroidissement lent. Les expériences ont été effectuées sur l'instrument IN16 à l'ILL (Wood, Plazanet, Gabel, Kessler, Oesterheld, Zaccai, Weik, en préparation). L'espacement lamellaire des deux échantillons est de 62 Å à 300 K et évolue en fonction de la température pendant le réchauffement comme montré par les carrés dans la figure 4.

En résumé, l'eau au-delà de la première couche d'hydratation subit une transition vitreuse à 200 K et quitte l'espace intra-membranaire. A la même température, les molécules d'eau dans la première couche d'hydratation gagnent en mobilité et leurs mouvements à l'échelle de la nanoseconde subissent une transition dynamique. La transition dynamique de

l'eau dans la première couche d'hydratation et l'apparition d'une diffusion translationnelle de l'eau au-delà n'induisent toutefois pas une transition dynamique des mouvements à l'échelle de la nanoseconde dans la PM. Ceci est en contradiction apparente avec des simulations par dynamique moléculaire qui ont suggéré que l'apparition d'une diffusion translationnelle de l'eau est nécessaire et suffisante pour déclencher la transition dynamique dans une protéine (Tarek & Tobias, 2002). Cependant, une seule couche d'hydratation a été incluse dans les simulations et nos études par diffraction et diffusion de neutrons ne permettent pas de conclure si les molécules de la première couche d'hydratation montrent comme l'eau au-delà (Fig. 4) une diffusion translationnelle à 200 K qui pourrait être à l'origine de sa transition dynamique observée (Fig. 7). Dans tous les cas, la dynamique de l'eau d'hydratation et la dynamique globale de la PM ne semblent pas être couplées en ce qui concerne les mouvements à l'échelle de la nanoseconde. Dans le chapitre suivant, nous aborderons la question de savoir si l'apparition d'une diffusion translationnelle de l'eau peut induire des changements de flexibilité locale dans les protéines. Pour cela, nous nous tournerons vers la radio-cristallographie des protéines et nous verrons que le dommage spécifique induit par le rayonnement intense d'un synchrotron peut servir de marqueur pour la dynamique structurale des protéines.

# CHAPITRE 4

## LES DOMMAGES PAR RAYONS-X : UN OUTIL POUR ÉTUDIER LA CINÉMATIQUE STRUCTURALE DE PROTÉINES CRISTALLINES

### 4.1 Les rayons-X laissent des traces structurales dans les protéines

Aujourd'hui, la radio-cristallographie de protéines se base majoritairement sur la collecte de données utilisant le rayonnement synchrotron. Celui-ci présente un certain nombre d'avantages. Son faisceau intense, brillant et focalisé permet d'étudier, entre autres, des cristaux qui diffractent faiblement (p.ex. ceux des protéines membranaires, des virus ou des ribosomes) ou qui sont de petite taille. Si le temps d'une collecte de données sur une source de rayons-X au laboratoire peut atteindre plusieurs jours, il se réduit à une dizaine de minutes sur une ligne d'insertion d'un synchrotron de troisième génération tel que l'ESRF à Grenoble. La possibilité d'ajuster la longueur d'onde du faisceau est à l'origine du succès de méthodes de phasage telles que le MAD (Multiple Wavelength Anomalous Dispersion) ou le MIR (Multiple Isomorphous Replacement). De plus, la structure temporelle du rayonnement synchrotron permet de collecter des données avec une résolution de l'ordre de la nano- à la picoseconde, ce qui peut être utilisé pour suivre des changements structuraux dans des protéines en temps réel (voir p.ex. Brunori *et al.*, 2004 ; Schotte *et al.*, 2004). Sans doute, le rayonnement intense d'un synchrotron est un outil puissant, en revanche, son utilisation a un prix, celui de l'endommagement des cristaux étudiés.

La cryo-cristallographie permet de réduire l'endommagement des cristaux par l'irradiation, par un abaissement de la température à typiquement 100 K (Garman & Schneider, 1997). Malgré la persistance d'un endommagement (Gonzalez & Nave, 1994), un cristal de protéine à 100 K peut subir 70 fois la dose d'un cristal à température ambiante avant qu'il ne montre le même niveau d'endommagement (Nave & Garman, 2005). En se basant sur des observations en cryo-microscopie électronique, Henderson (Henderson, 1990) a calculé qu'un cristal de protéine à 77 K perd la moitié de son pouvoir de diffraction après une dose (dose = énergie déposée par unité de masse) de  $2 \times 10^7$  Gray (Gy ;  $\text{Gy} = \text{J kg}^{-1}$ ). Récemment, une valeur similaire a été déterminée expérimentalement (*i.e.*  $4.3 \times 10^7$  Gy, Owen *et al.*, 2006). Ces mêmes auteurs suggèrent, en revanche, que l'information biologique, contenue dans une structure cristallographique d'une protéine, commence à être compromis à partir de  $3 \times 10^7$  Gy

(‘limite Garman’). Cette limite est atteinte après irradiation pendant 2.5 ans avec une source de rayons-X au laboratoire, pendant une journée avec un faisceau de rayons-X d’un synchrotron de 2<sup>ème</sup> génération ou pendant quelques minutes sur une ligne d’insertion d’un synchrotron de 3<sup>ème</sup> génération (Garman, 2003).

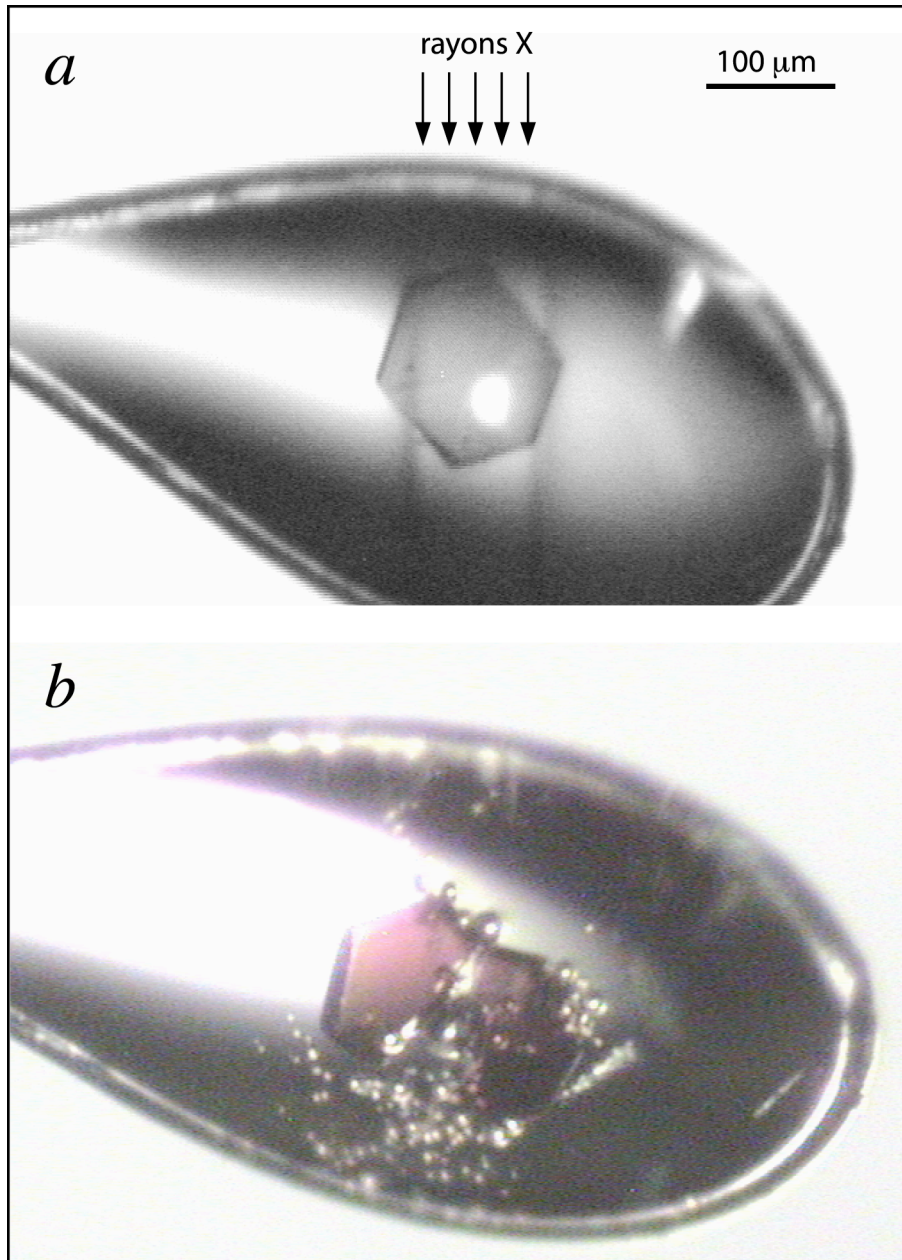


Figure 8 : Un cristal ( $P2_1$ ) de myoglobine de cachalot (sperm whale) après collecte d’un jeu de données à 100 K sur ID14-EH4 à l’ESRF (a). On note le tracé créé par le faisceau de rayons-X d’une extension de 100 μm dans le solvant autour du cristal. Le spot lumineux d’une extension de 25 μm provient de la lumière de mesure d’un microspectrophotomètre, installé sur la ligne de lumière, qui sera présenté brièvement dans la section 4.3. Le même cristal à 100 K après une hausse transitoire de deux secondes de la température à 300 K (b). Le cristal s’est cassé en deux; vraisemblablement à cause de la formation de bulles de gaz lors de la mobilisation à 300 K des radicaux créés à 100 K. L’origine possible du gaz sera discutée plus loin (Ostermann, Weik, Parak, photos non-publiées).

Quel pourcentage des photons incidents interagissent-ils avec un cristal de protéines et par quel mécanisme ? Murray et collaborateurs (Murray *et al.*, 2005) ont fait le calcul suivant pour un cristal de protéine (de 100  $\mu\text{m}$ ) et une énergie des photons incidents de 12.7 keV (correspondant à  $\lambda = 0.98 \text{ \AA}$ ) : 98% des photons n'interagissent pas. Parmi les 2% qui interagissent, 84% sont absorbés par l'effet photoélectrique, 8% subissent une diffusion Compton. Seulement 8% sont diffusés d'une façon élastique (diffusion Thomson), ce qui ne représente que 0.2% des photons incidents qui donnent lieu au phénomène de diffraction. A l'énergie typiquement utilisée dans une expérience de cristallographie au synchrotron, le dommage primaire prépondérant est donc l'effet photoélectrique. Un photoélectron de haute énergie en résulte, il perd alors son énergie sur un trajet de quelques  $\mu\text{m}$  par plusieurs centaines d'interactions inélastiques successives (O'Neill *et al.*, 2002 ; Nave & Hill, 2005). Ces dernières créent toutes sortes de radicaux secondaires qui peuvent être à l'origine de dommages dit secondaires. Seuls les électrons sont mobiles à 100 K et peuvent créer des dommages secondaires. D'autres radicaux plus volumineux, comme par exemple le radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$ , restent piégés dans la matrice amorphe du solvant, ce qui explique l'effet bénéfique du cryo-refroidissement. Une hausse transitoire de la température à 300 K d'un cristal irradié résulte en une mobilisation de tous les radicaux créés à 100 K. L'effet néfaste qui s'en suit est illustré dans la figure 8.

Le dommage créé par l'irradiation résulte en une diminution progressive de la qualité de la diffraction qui se traduit par une détérioration de la limite de diffraction, une augmentation de la mosaïcité, du facteur B de Wilson (Gonzalez & Nave, 1994) et du volume de la maille élémentaire (Ravelli *et al.*, 2002). Ces dommages ont été supposés être aléatoires et non-spécifiques. Ce n'est que récemment qu'il a été découvert que les dommages peuvent être hautement spécifiques (Weik *et al.*, 2000 ; Ravelli & McSweeney, 2000 ; Burmeister, 2000 ; Schroder Leiros *et al.*, 2001). Lors d'expériences préliminaires concernant l'étude de l'acétylcholinestérase par cristallographie cinétique (voir chapitre 5), neuf jeux de données consécutifs ont été collectés sur un cristal à 100 K sur la ligne d'insertion ID14-EH4 à l'ESRF (Weik *et al.*, 2000 ; Ravelli & McSweeney, 2000). La série de structures résultante (A – I) révèle des changements structuraux en fonction de la dose de rayons-X absorbée par le cristal (Figure 9).

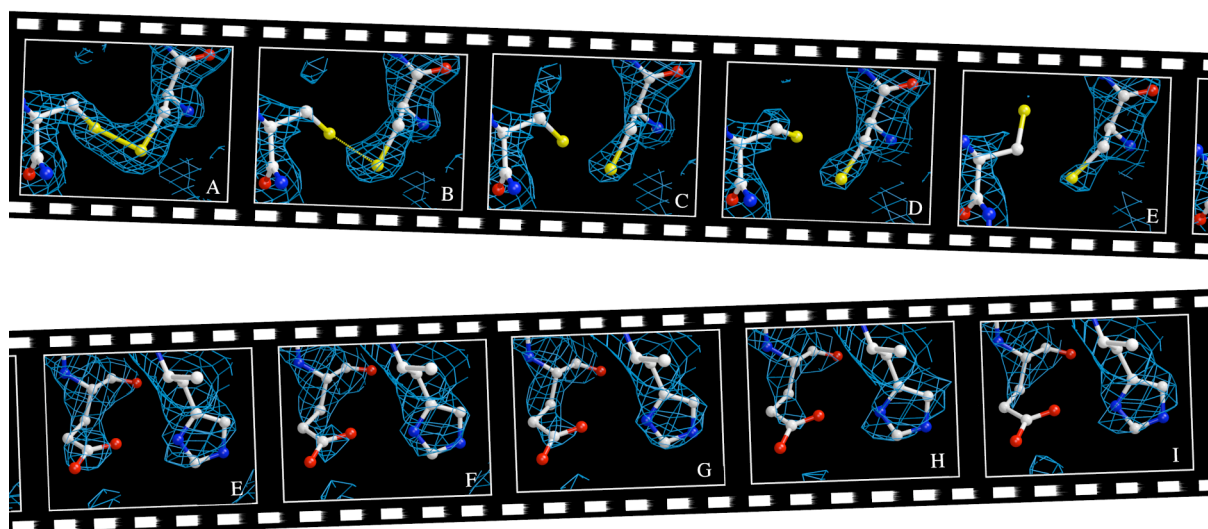


Figure 9 : Dommages spécifiques dans l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) en fonction de la dose de rayons-X reçue à 100 K (Weik *et al.*, 2000). Les modèles, ainsi que les cartes de densité électronique  $3F_o - 2F_c$  (en bleu, avec des contours à  $1.5\sigma$ ;  $\sigma$  étant l'erreur statistique de la carte de densité électronique) sont montrés. Le tableau supérieur montre la cassure du pont disulphure entre la Cys254 et la Cys265 dans les cinq premiers jeux de données (A – E) d'une série de neuf. Une conformation alternée pour un des deux atomes de soufre après la cassure est clairement visible dans la deuxième (B) et troisième (C) structure. Le tableau inférieur met en évidence la perte de définition du groupement carboxyle du Glu327 dans les cinq derniers jeux de données (E – I) de la série de neuf. Glu327 fait partie de la triade catalytique du site actif de l'AChE. L'histidine catalytique en position 440 n'est pas affectée à 100 K.

L'effet le plus marquant est la rupture de ponts disulphures. En effet, dès le deuxième jeu de données, la densité électronique entre les deux atomes de soufre n'est plus continue. L'observation d'un pont disulphure encore bien défini dans le premier jeu de données explique en partie pourquoi les dommages spécifiques n'ont pas été découverts plus tôt. En effet, une expérience de cristallographie 'classique' s'achève après l'équivalent de la première structure (A). Un autre effet marquant est la perte de définition du groupement carboxyle des acides aminés acides (acides aspartique et glutamique ; Asp et Glu). Il est probable, mais pas encore prouvé, que cette perte de définition soit due à une décarboxylation, un effet bien documenté dans le domaine de la radiobiologie (Alexander & Lett, 1967) qui produit du  $\text{CO}_2$  suite au piégeage d'un trou d'électron. Les bulles de gaz visibles dans la figure 8b, pourraient être composées de  $\text{CO}_2$  qui aurait été libéré pendant le réchauffement transitoire du cristal à 300 K. D'autres effets moins prononcés, mais néanmoins spécifiques, concernent des pertes de définition occasionnels du groupement  $-\text{OH}$  des tyrosines, du groupement  $-\text{SCH}_3$  des méthionines (Burmeister *et al.*, 2000), ou encore de l'atome d'azote de la chaîne latérale des lysines (Banumathi *et al.*, 2004 ; Ravelli *et al.*, 2005). Des changements structuraux ont également été observés dans les sites actifs de certaines métallo-enzymes (Berglund *et al.*,

2002 ; Adam *et al.*, 2004), de protéines à hème (Baxter *et al.*, 2004) ou de thiorédoxines (Alphey *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2005) dus à un changement d'état rédox induit par les électrons créés par l'irradiation. Des atomes de brome liés à des macromolécules biologiques semblent aussi être affectés (Ennifar *et al.*, 2002 ; Ravelli *et al.*, 2003). Ces dommages spécifiques, sont-ils dus à l'interaction avec un photon incident (dommage primaire) ou le résultat de dommages secondaires ?

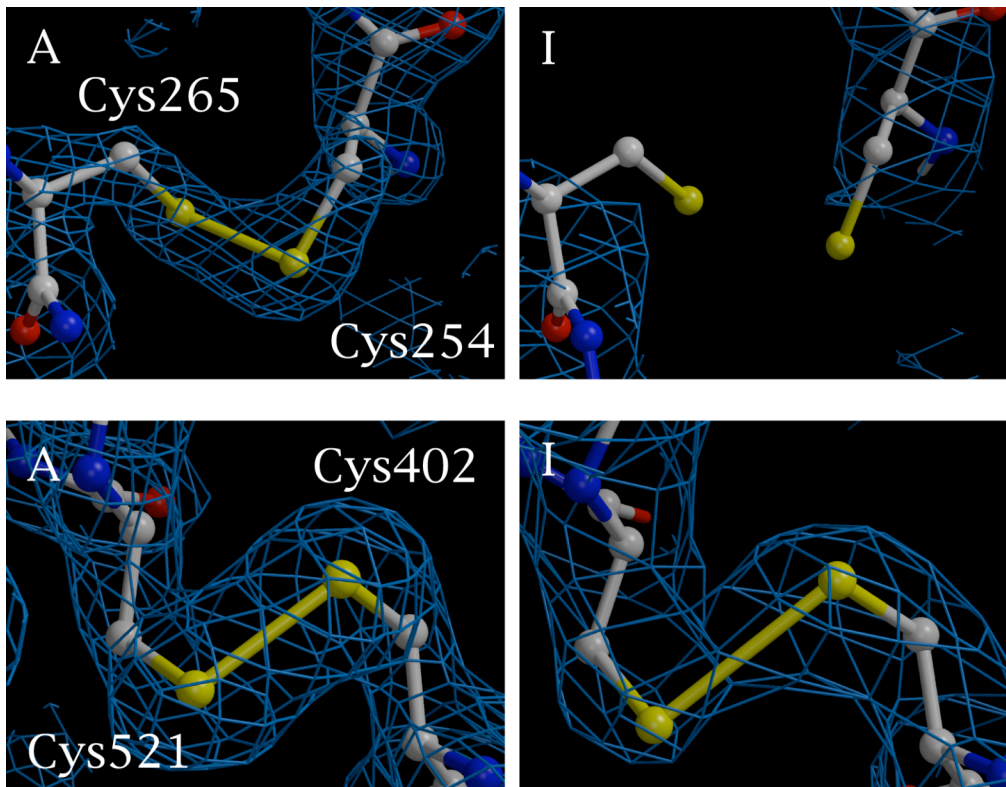


Figure 10 : Sensibilité différentielle de deux des trois ponts disulfures de l'AChE, *i.e.* celui entre Cys254-Cys265 (tableau supérieur) et entre Cys521-Cys402 (tableau inférieur), pour le premier (A) et le dernier (I) jeu de données d'une série de neuf (Weik *et al.*, 2002). Il s'agit de la même série de jeux de données que celle montrée dans la figure 9. Les modèles, ainsi que les cartes de densité électronique  $3F_o - 2F_c$  (en bleu, avec des contours à  $1.5\sigma$ ) sont montrés. Le pont disulfure Cys254-Cys265 se rompt, comme il a déjà été montré dans la figure 9. Le pont disulfure Cys521-Cys402 ne se rompt pas. Cependant, la distance entre les deux atomes de soufre augmente de  $0.7 \text{ \AA}$  entre le premier et le dernier jeu de données.

L'origine des dommages spécifiques doit être en majorité d'une nature secondaire. Cette hypothèse s'appuie sur trois observations qui seront détaillées par la suite: 1) des groupements chimiques identiques (ponts disulfures, carboxylates ...) n'ont pas la même radiosensibilité, 2) le nombre de photons absorbés par une protéine dans le cristal est petit et 3) les dommages spécifiques dépendent de la température. Prenons l'exemple des ponts disulfures dans l'AChE à 100 K. Celui entre Cys254 et Cys265 se rompt lors d'une collecte

de neuf jeux de données (Figs. 8 et 9). Un autre, celui entre Cys402 et Cys521, ne se rompt pas (Fig. 9). Cependant, la longueur de liaison entre les deux soufres augmente de 0.7 Å entre le premier et le dernier jeu de données (Weik *et al.*, 2002). Cette observation, très probablement due au piégeage d'un électron, sera discutée dans le prochain paragraphe. Une radiosensibilité différentielle des ponts disulphures a aussi été observée dans toutes les autres protéines examinées (Burmeister, 2000 ; Ravelli & McSweeney, 2000 ; Schroder Leiros *et al.*, 2001 ; Banumathi *et al.*, 2004 ; Wang & Ealick, 2004 ; Schulze-Briese *et al.*, 2005 ; Weiss *et al.*, 2005). Il en est de même pour les groupements carboxyles ; leur sensibilité varie au sein d'une protéine d'un endroit à l'autre. Si les dommages spécifiques étaient dus à l'absorption d'un photon (dommage primaire), les groupements chimiques identiques devraient montrer la même radiosensibilité au sein d'une protéine. En outre, le nombre absolu de photons absorbés lors d'un jeu de données et par unité de maille asymétrique est petit. Ainsi, pendant un jeu de données collecté avec une dose de  $10^6$  Gy sur un cristal de AChE, seulement un photon est absorbé par protéine (Ravelli & McSweeney, 2000). Les atomes de soufre (21 par molécule d'AChE, faisant partie de 7 Cys et de 14 Met) contribuent à 6% de la section efficace d'absorption. Seulement 0.003 photons sont donc absorbés par atome de soufre et par jeu de données, ce qui est trop peu pour donner lieu à un dommage spécifique pouvant être détecté par cristallographie, tel que la rupture du pont disulphure Cys254-Cys265 (Figs. 8 et 9). Le dernier argument en faveur d'une nature secondaire des dommages spécifiques est leur dépendance en température. En effet, comme nous verrons dans 4.2 et 4.3, l'ampleur des dommages spécifiques dépend beaucoup de la température, ce qui n'est pas le cas pour les dommages primaires (Teng & Moffat, 2002). En conclusion, les dommages spécifiques des protéines vues par radio-cristallographie sont la conséquence d'action de radicaux secondaires (dommage secondaire). Parmi les mécanismes d'endommagement structural à 100 K, les seules espèces radicalaires qui semblent intervenir sont les électrons et les trous d'électrons. Sinon, nous aurions dû observer des dommages dus à l'action par exemple de radicaux  $\text{OH}^\bullet$ , tels que l'oxydation de groupement  $-\text{SH}$  ou de Tyr. Ceci n'est pas le cas, puisque les radicaux plus volumineux sont effectivement immobiles à 100 K.

La rupture d'un pont disulphure passe par des espèces radicalaires. Tout d'abord, la localisation d'un électron supplémentaire dans la liaison S-S donne naissance à un radical disulphure anionique (*disulfide radical anion*),  $\text{RSSR}^{\bullet-}$ . Par la présence de cet électron, la liaison S-S est déstabilisée (ce qui a été montré par une approche de chimie quantique) ; elle est rallongée de 0.7 Å pour atteindre une longueur de 2.8 Å (Bergés *et al.*, 2000). La liaison S-



S d'un radical disulphure anionique peut se rompre d'une façon réversible ou piéger un proton pour former le radical disulphure  $\text{RSSRH}^\bullet$  (Favaudon *et al.*, 1990). Ce dernier est caractérisé par une liaison S-S encore plus longue, *i.e.* d'une longueur de 3.5 Å (Bergés *et al.*, 2000) et se rompt pour former un thiol, RSH, et un radical thiyl,  $\text{RS}^\bullet$ . La longueur de la liaison S-S du pont disulphure Cys402-Cys521 dans l'AChE augmente de 0.7 Å au cours de la série de jeux de données collectés (Figure 11a). Puisque cette valeur expérimentale correspond à la valeur calculée pour le rallongement lors de la formation d'un radical disulphure anionique, il est très probable que le pont disulphure Cys402-Cys521 ait été piégé sous cette forme radicalaire lors des expériences de radiocristallographie à 100 K.

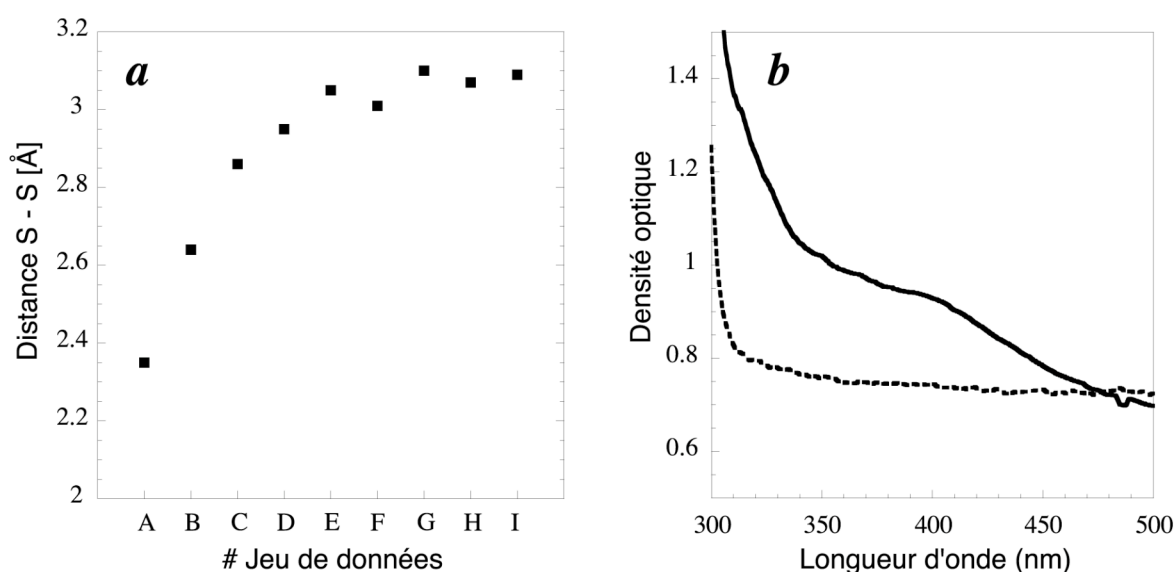


Figure 11 : Mise en évidence structurale (a) et spectroscopique (b) de la formation d'un radical disulphure (Weik *et al.*, 2002). La distance entre les deux atomes de soufre du pont disulphure Cys521-Cys402 de l'AChE augmente de 0.7 Å au cours de la collecte de neuf jeux de données (a). Spectre d'absorption d'un cristal d'AChE non irradié (en pointillés) et irradié (en trait plein) à 100 K avec une dose de  $6 \times 10^6$  Gy, une dose similaire à celle utilisée pour collecter un des neuf jeux de données (b). Le spectre a été enregistré à 100 K sur un microspectrophotomètre dans le laboratoire cryo-bench (Bourgeois *et al.*, 2002) 90 min. après irradiation sans augmentation transitoire de la température.

Cette hypothèse semble être confirmée par un pic d'absorption à 400 nm dans le spectre d'absorption d'un cristal d'AChE irradié (Figure 11b). En effet, les radicaux disulphures absorbent à une longueur d'onde d'environ 400 nm (Favaudon *et al.*, 1990). La combinaison de données structurales et de spectres d'absorption pour l'identification d'espèces radicalaires et de leur temps de vie sera discutée dans la section 4.3.

La flexibilité des atomes formant le pont disulphure et de leur environnement influe sur la stabilité des radicaux disulphures (Favaudon *et al.*, 1990). Ainsi, les radiosensibilités différentes des deux ponts disulphures (Figure 10) reflètent probablement une rigidité différente de leurs environnements respectifs. En effet, le pont disulphure Cys402-Cys521 est plus enfoui et moins sensible que celui entre Cys254 et Cys265 qui se trouve à la surface de la protéine. Ce dernier peut être rompu, même à 100 K, alors que le premier forme un radical qui reste piégé car la rupture ne peut pas se faire. Le troisième pont disulphure de l'AChE, celui entre Cys67 et Cys94, est le plus enfoui des trois et quasi insensible à l'irradiation à 100 K. Un autre facteur qui pourrait influencer sur la radiosensibilité des sites susceptibles est leur accessibilité au solvant. Des radicaux créés dans le solvant autour d'une protéine pourraient plus facilement atteindre des sites accessibles. Cependant, les dommages spécifiques étudiés par cristallographie et discutés dans la littérature depuis 2000 ne semblent pas établir une relation ferme entre accessibilité au solvant et radiosensibilité. En revanche, il ne faut pas oublier que ces études sont entreprises à 100 K, une température à laquelle les radicaux volumineux sont immobiles. Les électrons, quant à eux, sont mobiles à 100 K et peuvent 'se déplacer' par effet tunnel sur des distances de 20 à 30 Å. Par conséquent, les dommages créés par des électrons (S-S) ou des trous d'électrons (décarboxylation) ne dépendent probablement pas de leur accessibilité au solvant et une différence de leur radiosensibilité semble être due à des différences dans la flexibilité de leur environnement – ce qui fait des dommages spécifiques un marqueur de la flexibilité locale d'une structure protéique. Dans les deux sections suivantes, l'étude de cette flexibilité en fonction de la température sera présentée pour deux exemples, ceux de l'AChE et de la trypsine. Nous poserons plus particulièrement la question de savoir si les changements abrupts de la viscosité du solvant présentés dans 2.1 induisent un changement dans la flexibilité locale, autrement dit, nous nous intéresserons au couplage entre dynamique du solvant et dynamique et cinématique de la protéine.

#### **4.2 Effet de la température sur les dommages dans l'acétylcholinestérase**

Rappelons-nous que le solvant dans un cristal trigonal de l'AChE forme de la glace cristalline s'il est chauffé à 155 K après la trempe rapide (cf. 2.1, fig. 3A). Amorphe à 100 K, le solvant est alors dans une phase ultra-visqueuse à 155 K. Quelle est l'influence de la phase du solvant sur la flexibilité protéique échantillonnée par des dommages spécifiques aux rayons-X ? Nous avons abordé cette question en collectant deux séries de cinq jeux de données sur deux cristaux trigonaux de l'AChE ; une à 100 et une à 155 K (Weik *et al.*, 2001b).

La radiosensibilité du pont disulfure Cys402-Cys521 montre une dépendance en température ; il reste intact à 100, et se rompt à 155 K (Fig. 12). A 100 K, comme nous avons vu plus haut, il forme un radical disulfure anionique en piégeant un électron. Comment expliquer que ce pont se rompt à 155 K et non à 100 K ? Ou, autrement dit, laquelle des étapes impliquées dans la rupture d'un pont disulfure, détaillées dans 4.1, dépend de la température ?

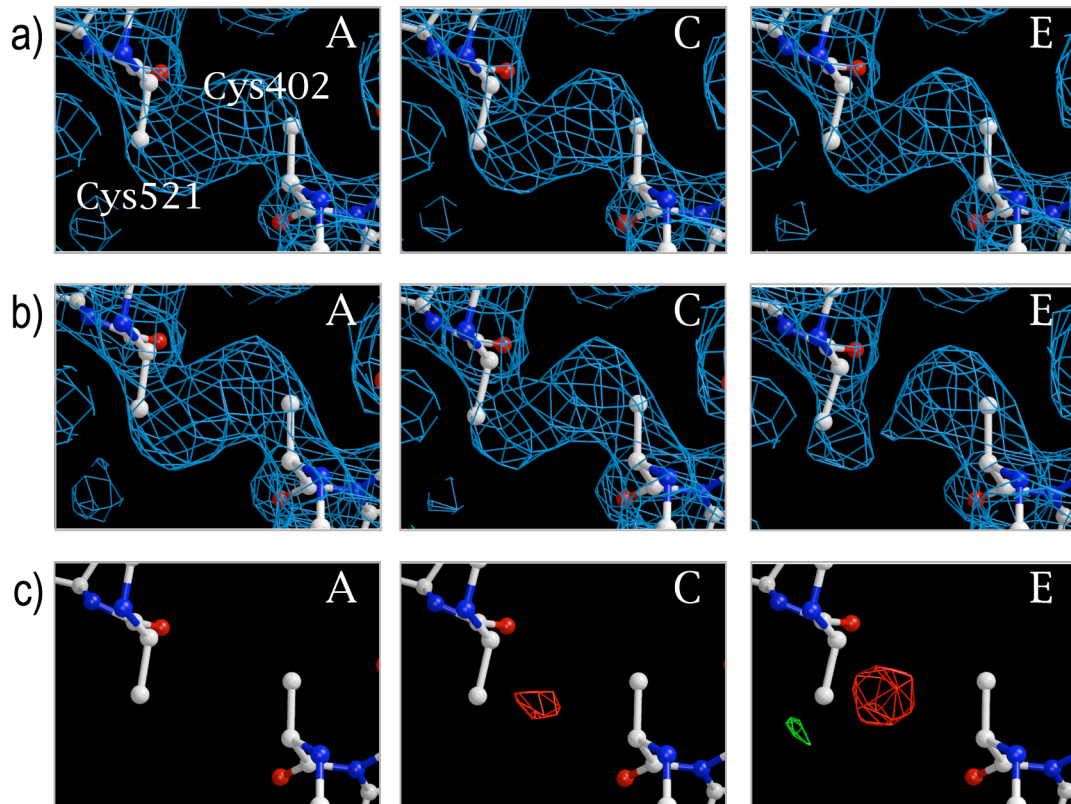


Figure 12 : Effet de la température sur la radiosensibilité du pont disulfure Cys402-Cys521 dans la AChE. (Weik *et al.*, 2001*b*). Respectivement cinq jeux de données (A – E) ont été collectés avec un cristal trigonal à 100 (a) et à 155 K (b) sur la ligne de lumière ID14-EH4 avec une dose de  $4 \times 10^6$  Gy par jeu de données. La densité électronique  $3F_o - 2F_c$  est montrée en bleu avec des contours à  $1.5 \sigma$ . Des cartes de différence Fourier  $F_o^{155K} - F_o^{100K}$  sont montrées en c) avec des contours à  $+5 \sigma$  (vert) et  $-5 \sigma$  (rouge). Contrairement à la figure 10, les atomes de soufre ont été omis ici du modèle lors de l'affinement et n'apparaissent pas dans la figure.

Le déplacement d'un électron dans une protéine n'est pas dépendant de la température s'il se fait par effet tunnel. Cependant, le déplacement d'un proton est dépendant de la température. Dans la glace amorphe, par exemple, les protons deviennent mobiles à 115 K (Fisher & Devlin, 1995). Nous avons vu plus haut que la rupture d'un pont disulfure est favorisée si un radical disulfure anionique ( $RSSR^{\bullet-}$ ) est protoné pour former le radical disulfure  $RSSRH^{\bullet}$ . En conséquence, la rupture à 155 K, et son absence à 100 K, pourrait indiquer que les protons

puissent atteindre ce pont à 155 et non à 100 K. Le transport d'un proton à travers une protéine demande une flexibilité des composants (acides aminés, eau) sur sa trajectoire (Chen et al., 2000). Un autre facteur qui favorise la rupture est la flexibilité des deux cystéines et de leur environnement proche, qui dépend certainement de la température. La dépendance en température de la rupture du pont Cys402-Cys521 peut donc être expliquée par la dépendance en température soit du transport d'un proton, soit de la flexibilité des deux cystéines. Puisque tous les deux sont influencés par la dynamique d'une protéine, l'observation de la rupture à 155 K indique que la protéine a atteint une flexibilité accrue à 155 par rapport à 100 K.

Si l'effet de la température sur la stabilité du pont Cys402-Cys521 est déjà remarquable, il est encore plus important sur les dommages structuraux dans le site actif. En fait, c'est le site actif de l'AChE qui subit à 155 K les dommages les plus importants parmi tous les résidus de l'enzyme. La figure 13 montre la triade catalytique de l'AChE (Ser200, His440, Glu327) qui constitue la partie la plus importante du site actif, car c'est elle qui hydrolyse le substrat, à savoir le neurotransmetteur acétylcholine. A 100 K, une densité négative au niveau de Glu199 indique l'endommagement de son groupement carboxyle. A 155 K, les dommages sont plus importants. En plus d'un endommagement plus important de Glu199, indiquant sa décarboxylation, une paire de densité positive et négative est associée à l'histidine catalytique. Cette dernière subit un changement structural (de la densité négative vers la densité positive).

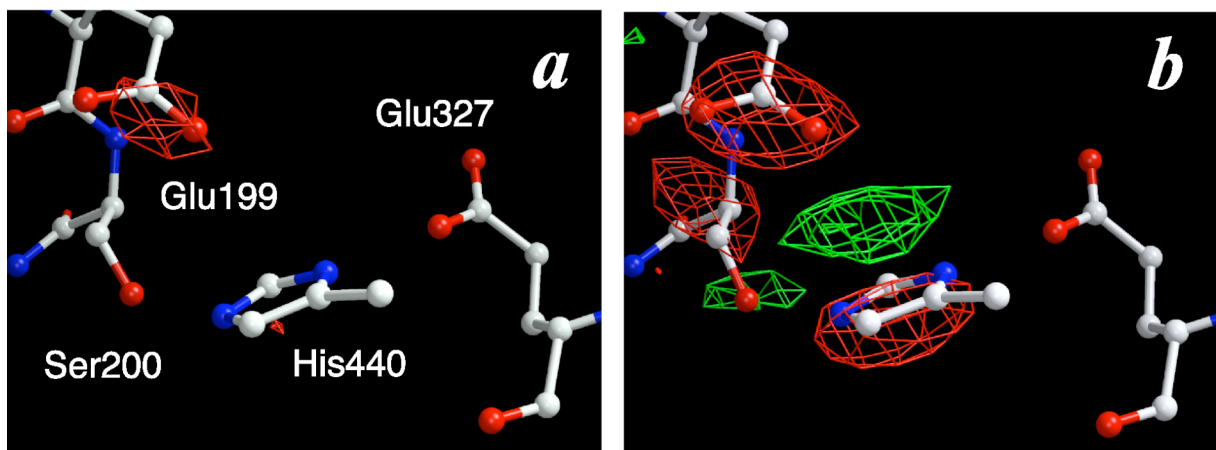


Figure 13 : Endommagement du site actif de l'AChE par irradiation avec des rayons-X à 100 K (a) et à 155 K (b). Les membres de la triade catalytique de l'AChE (Ser200, His440, Glu327) sont connectés par des liaisons hydrogène. Les cartes de différence Fourier ont été calculées entre le premier (A) et le dernier (E) jeu de données de la même série que celle présentée dans la figure 12, *i.e.* en utilisant  $F_o^E - F_o^A$ . La densité rouge sur Glu199 indique une décarboxylation, les densités rouge et vert près de His440 un changement conformationnel.

Le mouvement de l'histidine catalytique est illustré dans la figure 14 et correspond à une distance de 1.6 Å. En conséquence du mouvement de l'histidine, la serine catalytique s'éloigne de sa position native et les membres de la triade catalytique ne sont plus liés par des liaisons hydrogène. Les événements montrés dans la figure 14 représentent l'inactivation par irradiation d'une enzyme au niveau atomique.

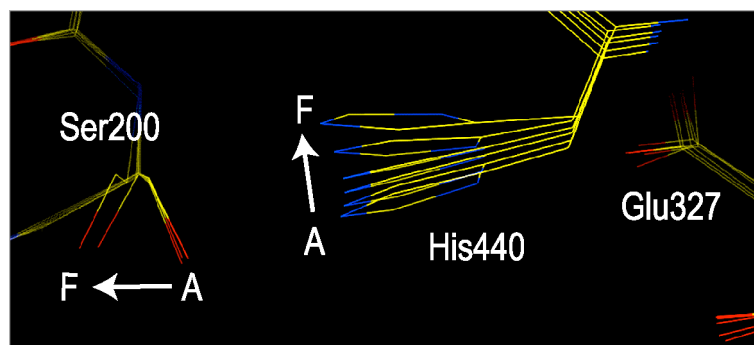


Figure 14 : Changements conformationnels dans la triade catalytique de l'AChE suite à l'irradiation à 155 K. Une série de 6 jeux de données (A – F) a été collectée sur la ligne de lumière ID14-EH4 avec une dose par jeu de données plus importante que celle utilisée dans la série présentée dans la figure 13.

Le mouvement de l'histidine n'est possible que par la création d'un 'trou' que laisse la disparition du groupement carboxyle de Glu199. Cependant, ce mouvement n'a pas lieu à 100 K. Il n'y a qu'à 155 K, que l'histidine catalytique est suffisamment mobile pour s'adapter au changement dans le paysage énergétique créé par l'irradiation c'est-à-dire dans ce cas la décarboxylation. Comme dans le cas du pont disulfure mentionné plus haut, l'enzyme a localement gagné en flexibilité à 155 K par rapport à 100 K. Nous suggérons que la diminution de la viscosité du solvant au début de sa cristallisation à 155 K a induit, du moins localement, une transition dynamique dans l'enzyme. L'observation de mouvements d'une chaîne latérale à 155 K montre que certaines parties d'une protéine sont mobiles même en dessous de la transition dynamique globale autour de 220 K que nous avons mis en évidence dans les cholinestérases (Gabel et al., 2004, 2005).

Le site actif de la AChE est particulièrement sensible à l'irradiation, ce qui a été observé aussi dans le cas d'autres enzymes. En effet, il a été récemment montré que le site actif d'une phosphosérine aminotransférase subit des radio-dommages importants, et cela même à 100 K (Dubnovitsky et al., 2005). Les changements qui en résultent correspondent à un relâchement d'une tension conformationnelle présente dans le site actif de l'enzyme intacte. C'est cette tension qui pourrait être à l'origine de la radio-sensibilité accrue des sites actifs (Weik *et al.*, 2000).



### 4.3 Effet de la température sur les dommages dans la trypsine

L'irradiation de cristaux de protéines avec des rayons-X induit des changements dans leur spectre d'absorption UV-visible (Fig. 11b). Ceci est dû à la formation de radicaux qui absorbent entre 260 et 800 nm. Les premières expériences mettant en évidence des changements spectraux suite à l'irradiation (Weik *et al.*, 2002 ; Murray *et al.*, 2002) ont été faites sur le microspectromètre du laboratoire cryo-bench à l'ESRF (Bourgeois *et al.*, 2002). Ils ont motivé la construction d'un microspectrophotomètre sur la ligne de lumière ID14-EH4 à l'ESRF qui permet d'enregistrer simultanément des données spectrales et structurales sur des cristaux de protéines (Fig. 15 ; Ravelli, Murray, Weik, Garman, résultats non-publiés).

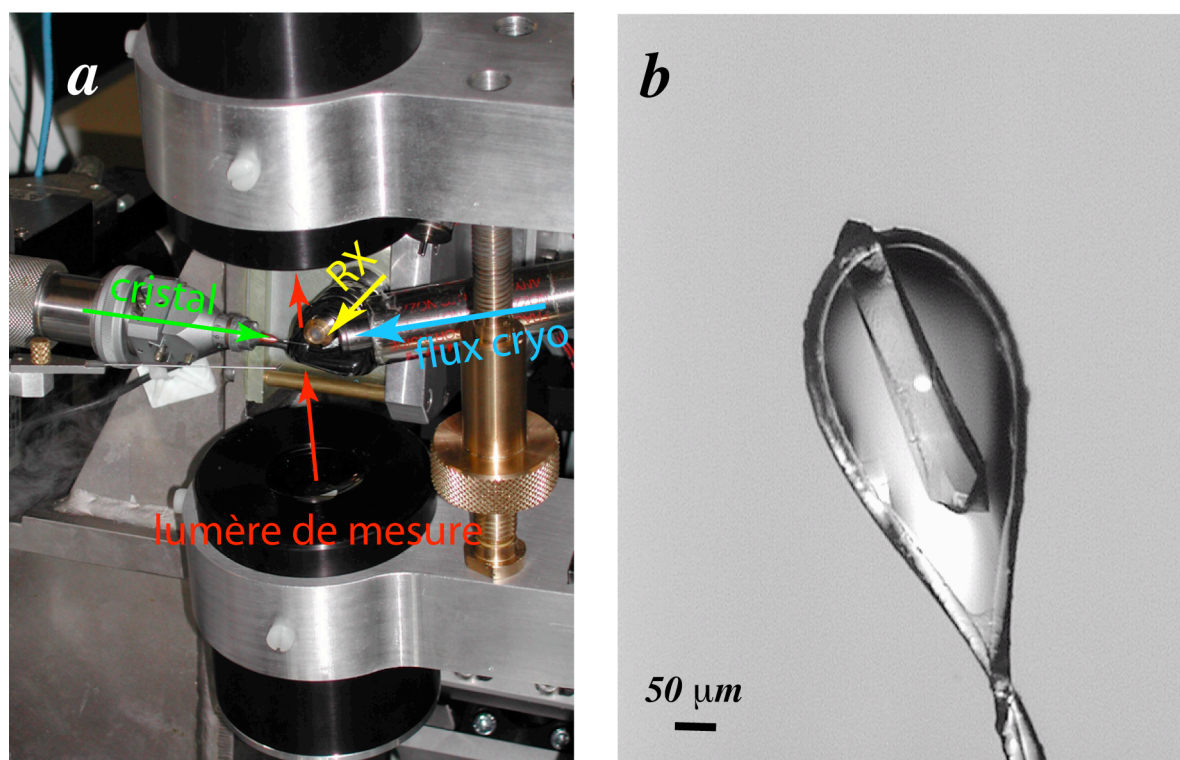


Figure 15 : (a) Photo du microspectrophotomètre installé sur la ligne de lumière ID14-EH4 à l'ESRF (Ravelli, Murray, McGeehan, Owen, Cipriani, Theveneau Weik, Garman, manuscrit en préparation). Il permet d'enregistrer des spectres d'absorption optique sur un cristal de protéine pendant une collecte de données aux rayons-X. La carte CCD du spectromètre permet d'enregistrer un spectre complet entre 200 et 850 nm toutes les 150 ms. Actuellement, une nouvelle version d'un microspectrophotomètre adapté au minidiffractomètres des lignes MX à l'ESRF est en construction (R. Ravelli, communication personnelle). (b) Tache d'éclairage (diamètre 25  $\mu\text{m}$ ) sur un cristal de trypsine dans une boucle cryo entourée de liqueur mère amorphe à 100 K (crédit photo R. Ravelli).

L'utilisation récente de microspectrophotomètres 'online' a d'ores et déjà montré que les rayons-X d'une ligne de lumière d'un synchrotron de troisième génération (ESRF, SPring-8 et APS) induisent des changements spectraux des cristaux de protéines dès les premières secondes d'irradiation (Fig. 16). Ces changements spectraux peuvent soit être accompagnés

de changements structuraux dans la protéine (Adam *et al.*, 2004, Dubnovitsky *et al.*, 2005), soit rester sans conséquence structurale, du moins à 100 K (Matsui *et al.*, 2002). L'acquisition simultanée de données structurales et spectroscopiques offrira certainement de nouvelles possibilités d'études excitantes en cristallographie macromoléculaire (Pearson *et al.*, 2004).

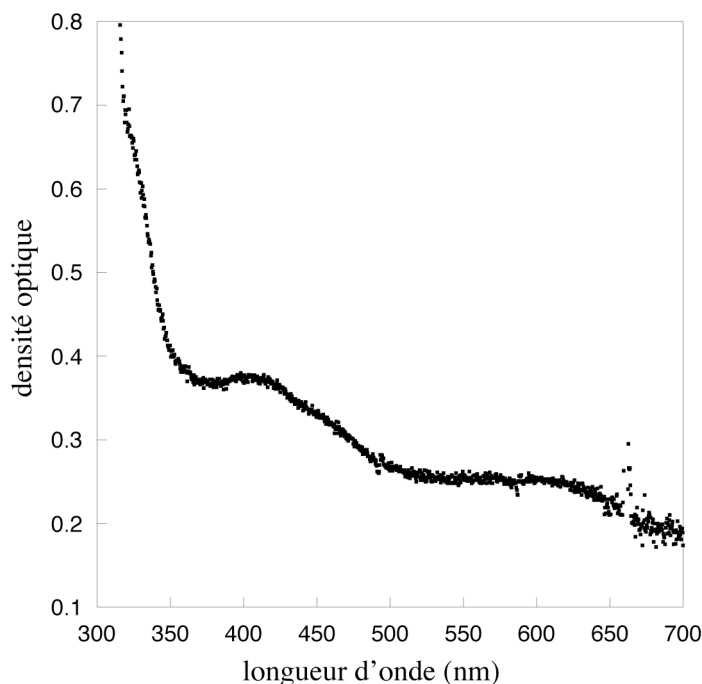


Figure 16 : Spectre d'absorption optique d'un cristal orthorhombique ( $P2_12_12_1$ ) de trypsine après 1 s d'irradiation sur ID14-EH4 à 130 K. Des rayons-X d'une énergie de 13,20 keV du faisceau non-atténué ont été utilisés. Les pics d'absorption optique à 400 nm et à 600 nm proviennent très probablement des radicaux disulphures (Weik *et al.*, 2002) et des électrons solvatés (E. Garman, communication personnelle), respectivement, et apparaissent dès les tous premiers instants d'irradiation.

L'utilisation du microspectrophotomètre 'online' peut être illustrée à l'aide de l'étude des changements spectraux d'un cristal de trypsine lors de l'irradiation en fonction de la température. La figure 17 montre la densité optique à 400 nm en fonction du temps expérimental écoulé durant une irradiation pulsée à quatre températures. Pendant les pulses de rayons-X d'une durée de 1 s, le signal à 400 nm monte brusquement, en accord avec la formation de radicaux disulphures (cf. figures 11 et 16). Pendant les 5 s qui suivent une impulsion, le signal à 400 nm décroît. Cette relaxation peut être soit due au rétablissement d'un pont disulphure non-radicalaire (*i.e.* la perte de l'électron non-apparié) soit à la cassure définitive du pont. La signature temporelle de la densité optique à 750 nm sert de témoin et montre que la structure caractéristique à 400 nm n'est pas due à un décalage de tout le spectre. Ce qui nous intéresse ici c'est la dépendance de cette relaxation en fonction de la température. Elle est similaire à 100, 130 et 160 K et a augmenté considérablement à 190 K. La stabilité du radical disulphure est considérablement réduite à cette dernière température, ce qui est très probablement le résultat d'une flexibilité accrue de son environnement proche. Rappelons-nous que 190 K est juste au dessus de la température (185 K, Fig. 3C) à laquelle le solvant

dans les cristaux orthorhombiques de trypsine est devenu quasi-liquide (ou ultra-visqueux). Une fois de plus, nous voyons ici qu'un changement dynamique dans le solvant affecte directement la flexibilité locale d'une protéine. Et structurellement, que se passe-t'il au niveau des radicaux disulphures quand le solvant devient liquide ?

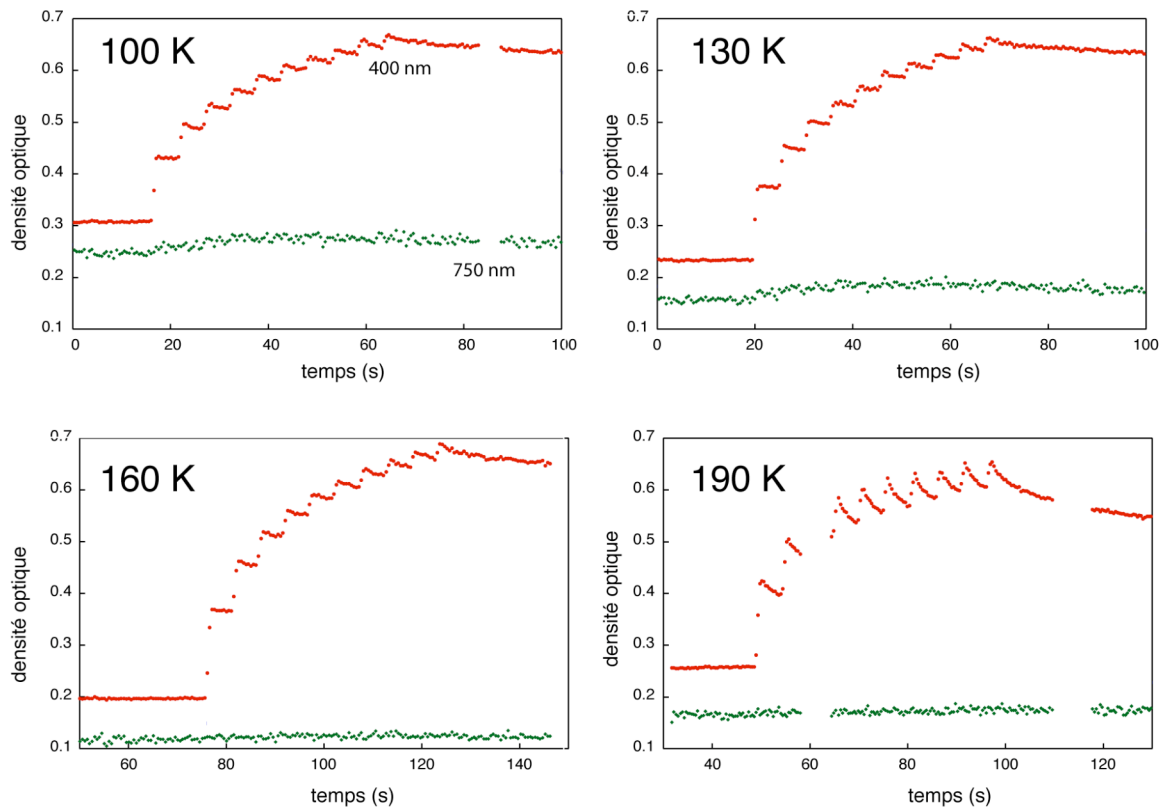


Figure 17 : Absorption optique à deux longueurs d'onde d'un cristal orthorhombique ( $P2_12_12_1$ ) de trypsine en fonction du temps expérimental à 4 températures différentes pendant une irradiation pulsée sur ID14-EH4 (Weik, Leiros, Ravelli, résultats non-publiés). Dix impulsions de rayons-X, d'une durée de 1 s et espacés de 5 s, ont été réalisées. Des rayons-X d'énergie 13,2 keV du faisceau non-atténué ont été utilisés. L'absorption optique à 400 nm provient très probablement des radicaux disulphures, celle à 750 nm est donnée comme témoin et montre que la structure caractéristique à 400 nm n'est pas due à un décalage de tout le spectre. La relaxation du signal à 400 nm entre deux impulsions de rayons-X consécutifs est accélérée en dessus de la température à laquelle le solvant devient quasi-liquide (*i.e.* en dessus de 185 K, Fig. 3C).

Afin d'étudier la radio-sensibilité structurale de la trypsine en fonction de la température, nous avons collecté un jeu de données avant (A) et après (B) un long pulse intense de rayons X ('burn') à 100, 130, 160 et 200 K. L'inspection des cartes de densité électronique révèle les changements conformationnels les plus drastiques au niveau du pont disulphure Cys220-Cys191 à 200 K après le long pulse intense de rayons X (Figure 18). La chaîne principale de Cys220 et de Ala1221 a perdu en très grande partie sa définition. Ce changement n'est pas observé à 100, 130 et 160 K.



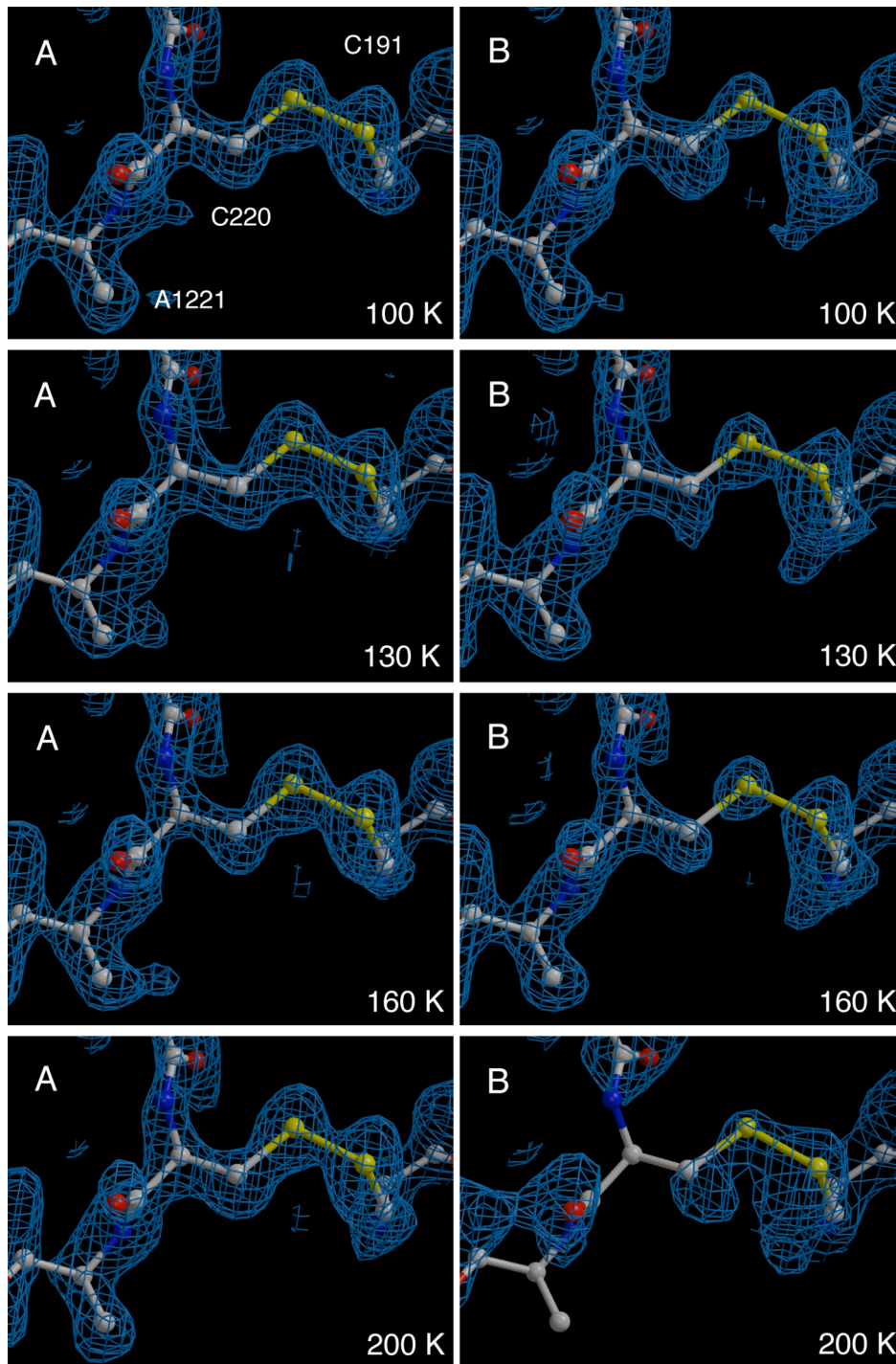


Figure 18 : Radiosensibilité du pont disulphure entre Cys191 et Cys220 d'un cristal trigonal ( $P3_121$ ) de trypsine à quatre températures. Un jeu de données a été collecté avant (A) et après (B) un long pulse intense de rayons-X sur la ligne ID14-EH4. Pendant chaque changement de température, le cristal a été traduit de manière à échantillonner des zones non-exposées à chaque palier de température. Une dose de  $10^7$  Gy et de  $3 \times 10^5$  Gy a été utilisée pour le long pulse intense de rayons-X et un jeu de données, respectivement. La résolution est de 1.5 Å à 100 K (A et B), de 1.6 Å à 130 K (A et B), de 1.5 Å à 160 K et de 1.5 Å (A) et de 1.9 Å (B) à 200 K. Notez la perte de définition de la chaîne principale de C220 et A1221 à 200 K après le long pulse. Cette température est juste au-dessus de la température à laquelle le solvant devient quasi-liquide dans les cristaux trigonaux ( $P3_121$ ) de trypsine (*i.e.* en dessus de 195 K, Fig. 3D). Il pourrait s'agir d'une rupture de la chaîne principale, qui témoignerait d'une flexibilité accrue de cette zone dans la protéine à 200 K (Weik, Leiros, Ravelli, résultats non-publiés).

Une fois de plus, la flexibilité conformationnelle locale augmente brusquement dans une protéine en dessus de la température de transition vitreuse du solvant (*i.e.* en dessus de 195 K dans les cristaux trigonaux de trypsine). Aucun changement d'une ampleur semblable est observé ailleurs dans la trypsine à 200 K. Quel pourrait être l'origine chimique des changements observés au niveau de la chaîne principale ? Une possibilité plausible est qu'il s'agit d'une rupture de la chaîne principale. En effet, Bergès et collaborateurs ont décrit par des méthodes non-structurales la rupture de la chaîne polypeptidique près d'un pont disulphure dans le lysozyme suite à l'irradiation (Bergès *et al.*, 1997). Elle serait initiée par l'électron supplémentaire du radical disulphure anionique ( $\text{RSSR}^{\bullet-}$ ). La construction, l'affinement et l'inspection de modèles qui rendent compte de l'observation expérimentale à 200 K après le long pulse intense de rayons X confirmera ou infirmera l'hypothèse que nous aurions visualisé pour la première fois une rupture de la chaîne principale suite à l'irradiation. Ce travail est en cours de réalisation.

Dans ce chapitre, nous avons vu que les dommages spécifiques créés dans les protéines par l'irradiation peuvent servir de marqueur pour la flexibilité locale. Étudiés en fonction de la cryo-température, elles renseignent sur l'impact des changements dynamiques dans le solvant, tels qu'une transition vitreuse, qui entoure les protéines. Aussi bien dans des cristaux d'acétylcholinestérase que de trypsine, l'ampleur des dommages spécifiques augmente à la transition vitreuse où le solvant entre dans une phase ultra-visqueuse. Ceci indique un couplage entre la dynamique du solvant et la flexibilité de sites spécifiques d'une protéine. Ce couplage est exploité dans le concept de la cryo-cristallographie cinétique, discuté dans le chapitre suivant.

# CHAPITRE 5

## LA CRYO-CRISTALLOGRAPHIE CINÉTIQUE SE BASE SUR LA DYNAMIQUE DES PROTÉINES ET DE L'EAU

La cristallographie des protéines fournit un aperçu statique de leurs structures. Celles-ci représentent une moyenne temporelle sur les conformations accessibles par l'ensemble des molécules dans le cristal. Des conformations peuplées avec une faible probabilité ne peuvent généralement pas être visualisées. Pourtant, ce sont elles et les transitions conformationelles vers, et entre elles, qui sont souvent essentielles pour qu'une macromolécule puisse accomplir son rôle biologique. La cristallographie cinétique vise à décrire structurellement les changements conformationnels des protéines 'en action'. Dans ce contexte, il est important de noter que la majorité des protéines sont biologiquement actives dans le cristal (revue par Mozzarelli & Rossi, 1996) et que la diversité conformationnelle observée en solution est qualitativement similaire à celle à l'état cristallin (Nienhaus *et al.*, 1998). Différentes approches techniques et conceptuelles existent en cristallographie cinétique (revue par Bourgeois & Royant, 2005). Cependant, seule la stratégie dite 'freeze-trigger', ou 'cryo-cristallographie cinétique', sera décrite ici. Elle est appliquée à une enzyme fascinante et mystérieuse, l'acétylcholinestérase (AChE).

Historiquement, le projet d'étudier la AChE par cryo-cristallographie cinétique est à l'origine de cette HDR. Il a démarré en 1998 lors du début de mon stage postdoctoral. A l'époque, j'ai rejoint le laboratoire de Prof. Jan Kroon à Utrecht, qui collaborait dans le cadre d'un projet européen avec les Profs. Israel Silman et Joel Sussman au Weizmann Institute à Rehovot et le Prof. Maurice Goeldner à Strasbourg dans le but d'étudier le trafic des substrats et des produits dans la AChE par diffraction Laue. La diffraction Laue est une des techniques de la cristallographie cinétique et vise à 'filmer' en temps réel les étapes conformationnelles d'une activité biologique à température ambiante au niveau moléculaire. Il s'est avéré que l'AChE cristalline, pour diverses raisons, ne se prêtait pas à ce genre d'approche. Me basant sur l'énorme travail déjà réalisé par ce groupe de chercheurs et sur ma sensibilité concernant les changements dynamiques d'une protéine à des températures cryogéniques, acquise pendant mon doctorat de thèse dans le laboratoire du Dr. Giuseppe Zaccai, j'ai proposé d'étudier le trafic des substrats et des produits dans la AChE par une approche alternative ; la

cryo-cristallographie cinétique. Les travaux décrits dans les chapitres 2 et 4 sont directement issus d'expériences préparatoires en vue des expériences de cryo-cristallographie cinétique. Dans ce chapitre, je décrirai l'approche développée et la nécessité d'utiliser des composés dit 'en cage' dans le cas de l'AChE. De plus, je présenterai brièvement une nouvelle méthode spectroscopique, la TDFM, qui permet d'obtenir des informations dynamiques précieuses dont profite la cryo-cristallographie cinétique. Mais d'abord, commençons par un bref regard sur l'objet biologique d'étude, l'AChE.

### 5.1 Structure et fonction de l'acétylcholinestérase (revue par Silman & Sussman, 2005)

Le rôle principal de l'AChE est la terminaison de la transmission d'une impulsion nerveuse dans les synapses cholinergiques par l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) en acide acétique et choline. L'AChE est une des enzymes les plus rapides de la Nature, avec un 'turnover' de 500 à 10000 molécules de substrat par seconde, selon l'espèce. Etant donné son rôle biologique crucial, l'AChE est la cible d'un vaste répertoire de médicaments et de poisons, naturels et synthétiques, y compris des agents neurotoxiques à base d'organophosphates (OP), insecticides à base d'OP et de carbamate, et de la première génération de médicaments anti-Alzheimer (Greenblatt *et al.*, 2003). La première structure tridimensionnelle d'une AChE, celle de *Torpedo californica* (TcAChE, Sussman *et al.*, 1991), a révélé que le site actif est enfoui au bout d'une gorge profonde (20 Å) et étroite ce qui est surprenant vu le pouvoir catalytique de cette enzyme (Fig. 19a).

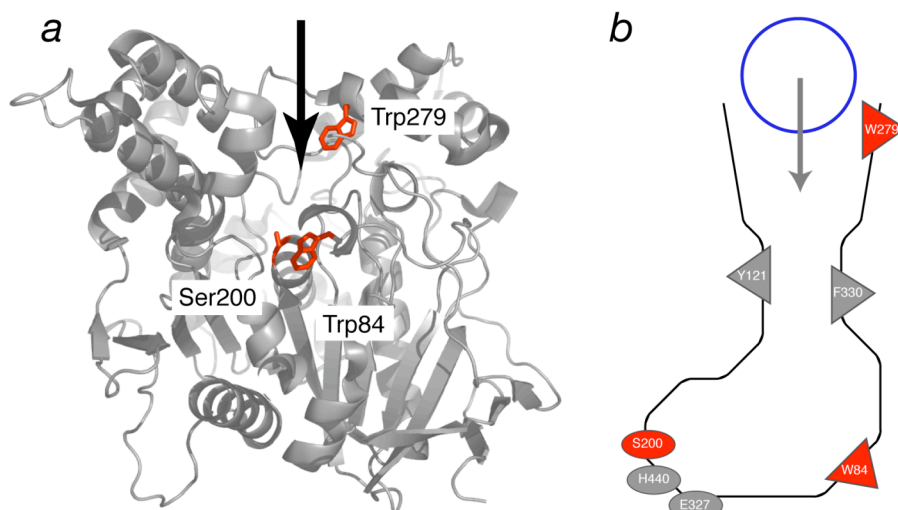


Figure 19 : (a) Structure 3D de la TcAChE (Sussman *et al.*, 1991). La flèche indique l'entrée de la gorge qui mène au site actif. La sérine de la triade catalytique et le tryptophane (W84) dans le site actif sont montrés, ainsi que le tryptophane (W279) du site périphérique. (b) Schéma de la gorge et du site actif. A mi-hauteur de la gorge, deux résidus (Y121 et F330) forment un rétrécissement qui doit être animé par des mouvements de 'respiration' pour que le substrat (cercle bleu) puisse atteindre le site actif. Une porte de sortie pour les produits pourrait s'ouvrir transitoirement au niveau de W84.

Le site actif de la *TcAChE* est formé par une triade catalytique, caractéristique pour les hydrolases à sérine, composée par une sérine, une histidine et un acide glutamique. Un tryptophane (W84) interagit avec la portion choline du substrat dans le site actif. Un autre (W279) constitue un site périphérique de fixation pour le substrat à l'entrée de la gorge.

Nous avons pu montrer pour la première fois structurellement comment se lient substrats et produits à l'intérieur de la gorge (Colletier, Fournier, Greenblatt, Sussman, Zaccai, Silman & Weik; manuscrit sous révision dans *EMBO J*; résultats non détaillés dans cette HDR). L'inspection de la structure statique de la AChE montre qu'elle doit être animée par des fluctuations conformationnelles pour que la catalyse enzymatique puisse avoir lieu. En effet, si la structure était statique, le substrat ne pourrait pas passer le rétrécissement à mi-hauteur de la gorge (Fig. 19b). Un aperçu expérimental de la flexibilité structurale est donné par des changements conformationnels au niveau du site périphérique quand un ligand bifonctionnel se lie dans la gorge (Colletier, Sanson, Nachon, Gabellieri, Fattorusso, Campiani & Weik (2006). *J. Am. Chem. Soc.* sous presse ; résultats non détaillés dans cette HDR). Etant donné le caractère enfoui du site actif, l'existence d'une porte de sortie annexe pour les produits enzymatiques a été proposée. Invisible dans la structure statique de l'enzyme, elle s'ouvrirait d'une façon transitoire près de W84 et permettrait l'évacuation rapide des produits après la catalyse. Cependant, la porte de sortie annexe reste un sujet controversé car des preuves expérimentales et théoriques contradictoires existent. Notre approche de cryo-cristallographie cinétique vise à trancher structurellement ce débat.

## 5.2 La cryo-cristallographie cinétique appliquée à l'acétylcholinestérase

Cette approche consiste à déclencher l'activité biologique d'une protéine à une température cryogénique et d'augmenter transitoirement la température au dessus d'un seuil critique, ce qui permet l'avancement de la réaction et l'accumulation d'un état intermédiaire. Le déclenchement est simple si la protéine par elle même est photosensible, c'est à dire qu'elle contient un chromophore endogène qui déclenche la réaction suite à l'absorption d'un photon. C'est le cas par exemple de la myoglobine, de la bactériorhodopsine, de la *photoactive yellow protein* ou de la protochlorophyllide oxydo-réductase. En revanche, une astuce expérimentale doit être utilisée si la protéine en question n'est pas photosensible, comme c'est le cas de l'AChE. L'astuce est l'utilisation de précurseurs photosensibles de produits ou de substrats enzymatiques, appelés 'composés en cage'. Dans le cas de l'AChE, ce sont des inhibiteurs réversibles qui se lient dans le site actif. La photolyse par flash laser sépare la cage chimique du produit ou du substrat. Le composé libéré se trouve alors prêt à

être hydrolysé, s'il s'agit d'un substrat, ou de quitter le site actif, s'il s'agit d'un produit. Si la photolyse est faite à température cryogénique (cryo-photolyse), nous supposons que l'enzyme est trop rigide, *i.e.* dépourvue de mouvements moléculaires de grande amplitude, et que la hausse transitoire de la température puisse en libérer certains. Ces derniers permettraient l'avancement de la réaction et le piégeage d'un état intermédiaire. La stratégie détaillée comporte quatre étapes (Figure 20) : 1) complexation du composé en cage dans le site actif enzymatique à température ambiante, suivie d'une trempe rapide du cristal à 100 K, 2) cryo-photolyse par flash laser, 3) hausse transitoire de la température et 4) collecte de données cristallographiques à 100 K.

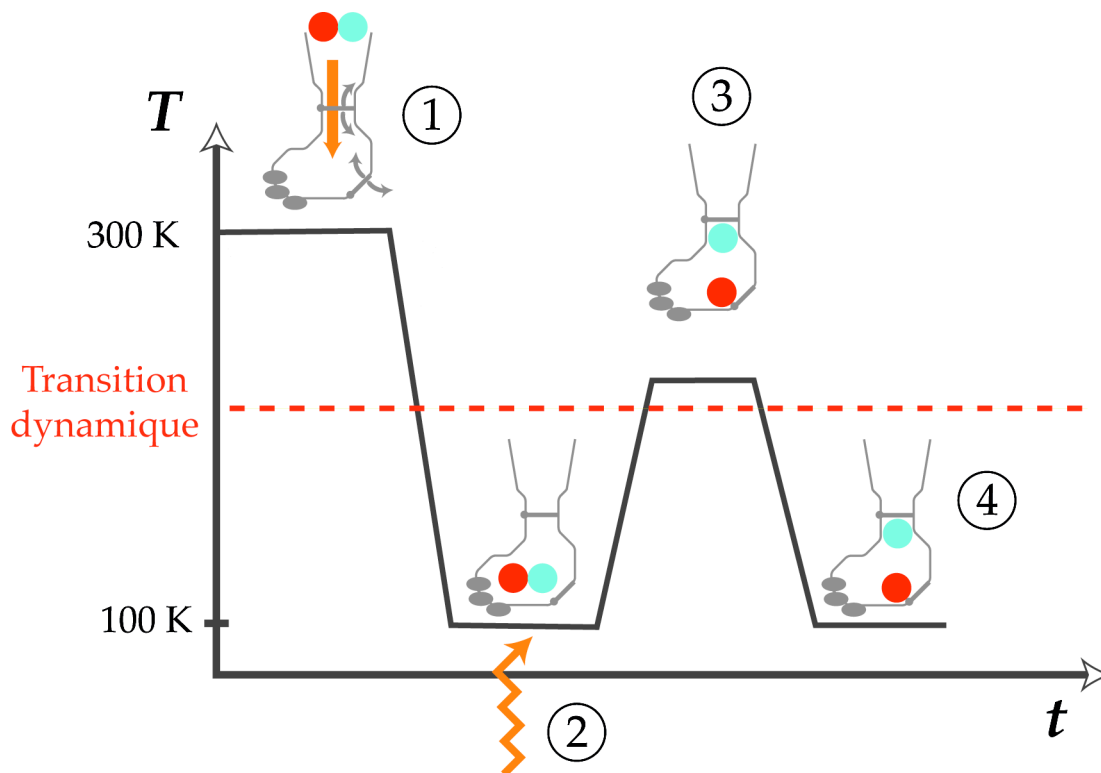


Figure 20 : Protocole de cryo-cristallographie cinétique en vue du piégeage d'états intermédiaires du cycle catalytique de l'AChE. Les ronds colorés représentent un composé en cage, qui consiste en un produit ou un substrat de la réaction enzymatique lié à une 'cage' chimique. Le protocole comporte quatre étapes : 1) complexation du composé en cage avec l'enzyme à température ambiante, 2) cryo-photolyse du composé en cage après trempe rapide du cristal d'enzyme à 100 K, 3) excursion en température pour accumuler un état intermédiaire et 4) collecte de données de rayons X à 100 K.

Cette méthodologie se base sur l'existence d'une température 'critique' au delà de laquelle la flexibilité protéique augmente de façon abrupte. D'après ce que nous avons vu dans les chapitres précédents, il est plausible de postuler qu'une telle température existe et que c'est celle de la transition dynamique de la protéine. Mais laquelle est pertinente dans le cas présent; la transition dynamique globale (*i.e.* moyennée sur toute la protéine) mesurée par diffusion neutronique, ou une transition dynamique locale ? Il est intuitif que la flexibilité

locale, en particulier celle du site actif, détermine si le composé libéré de sa cage peut diffuser ou non. En conséquence, nous postulons que dans les expériences de cryo-cristallographie cinétique de l'AChE, la température doit être élevée au-dessus de la transition dynamique du site actif. Dans 4.2, nous avons vu qu'elle a lieu à, ou en dessous de, 155 K et qu'elle semble être directement induite par la transition vitreuse du solvant dans le cristal. Dans la section 5.4 nous présenterons brièvement une nouvelle méthode spectroscopique qui peut nous renseigner sur les transitions dynamiques locales dans les protéines. Mais avant, nous regarderons les composés en cage d'un peu plus près.

### 5.3 Composés en cage et cryo-photolyse

Les composés en cage sont des précurseurs photolabiles de molécules d'intérêt biologique qui peuvent être convertis par la lumière d'une forme inactive en une forme active. Ils ont été développés et utilisés avec succès dans le cadre de la diffraction Laue où le photoclivage se fait à température ambiante et l'avancement de la réaction biologique est suivi structuralement en temps réel. Un composé en cage idéal doit remplir deux conditions : 1) il doit pouvoir être photoclivé rapidement avec un bon rendement, et 2) il doit avoir une affinité suffisante pour l'enzyme sans pourtant se faire hydrolyser. Dans notre approche de cryo-cristallographie cinétique, la première condition perd son importance car la vitesse du photoclivage à 100 K n'est pas importante, vu que l'activité biologique est bloquée à cette basse température. De plus, la nécessité d'un déclenchement synchrone de toutes les molécules dans le cristal pour une expérience de diffraction Laue n'est pas requise en cryo-cristallographie cinétique.

Dans le cas de l'acétylcholinestérase, des précurseurs photolabiles d'un de ses produits enzymatiques, à savoir la choline, ont été utilisés. Ceux-ci ont été synthétisés et caractérisés par un travail de plusieurs années dans le laboratoire du Prof. Maurice Goeldner (revue par Peng & Goeldner, 1998). Il s'agit d'une molécule de choline liée à une cage NPE (2-nitrophenyl ethyl) avec un groupement R variable (figure 21a). L'atome d'azote quaternaire a été remplacé par un atome d'arsénium (Peng *et al.*, 1998), et cela pour deux raisons cristallographiques : 1) Etant un atome lourd, l'arsénium possède plus d'électrons (il en possède 33) qu'un atome d'azote (7) et peut être plus facilement détecté dans des cartes de densité électronique, et 2) aux énergies typiquement utilisées dans une expérience de diffraction au synchrotron (environ 13 keV), l'atome d'arsénium est un fort diffuseur anomal (seuil d'absorption K à 11.8 keV). Ce dernier point permet la localisation de l'arsénium dans une carte de diffusion anormale, facilitant ainsi le suivi structural de l'arsénocholine si elle se

déplace après le photoclivage. La NPE-arsénocholine se lie dans le site actif de la AChE de torpille (*Torpedo californica* (*TcAChE*), Fig. 21b) et inhibe l'enzyme comme prévu (Peng & Goeldner, 1998) avec une constante d'inhibition de l'ordre du micromolaire (Peng *et al.*, 1998). Le composé en cage non-clivé et la cage libre absorbent à 260 et à 310 nm, respectivement. Cela permet de suivre spectroscopiquement le photoclivage, du moins à température ambiante (lire plus bas). Ce dernier s'effectue par irradiation laser (266 ou 355 nm) à travers un objectif d'un microspectrophotomètre focalisé sur l'échantillon (cristal ou solution), soit 'offline' au laboratoire 'cryobench' de l'ESRF (Bourgois *et al.*, 2002), soit directement 'online' sur une ligne de lumière (Fig. 15a).

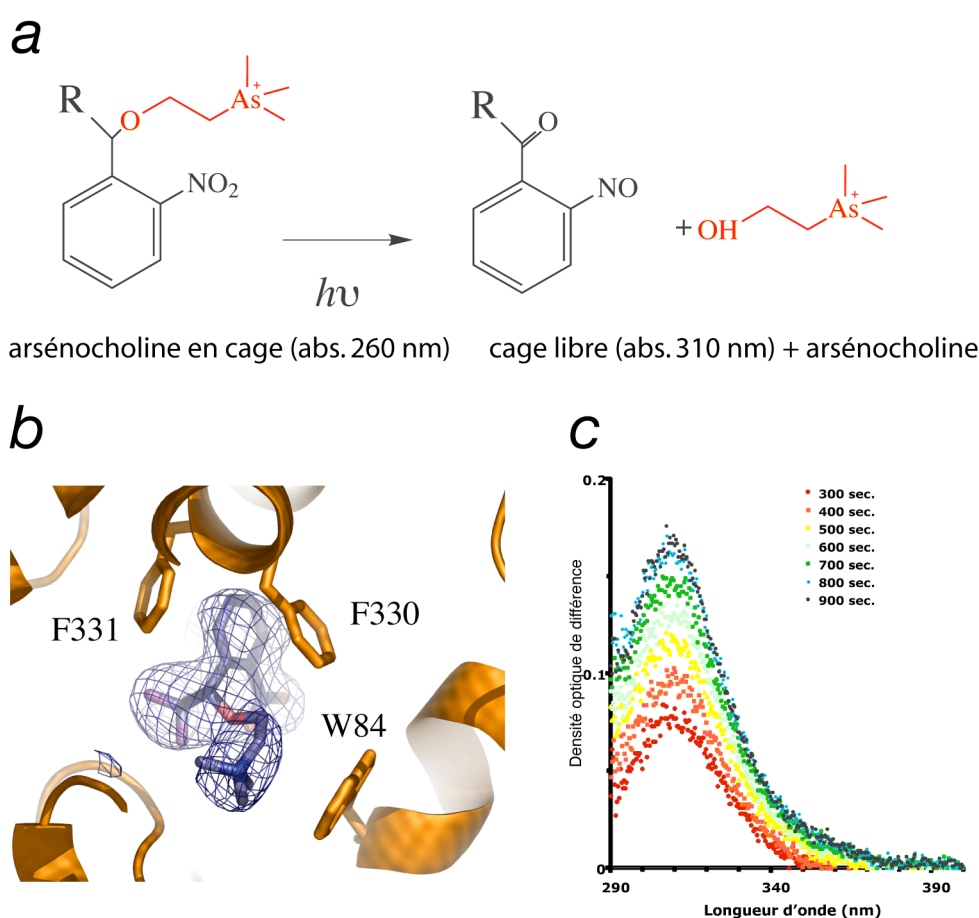


Figure 21 : (a) Photoclivage schématique d'une molécule d'arsénocholine en cage (Peng *et al.*, 1998). (b) Arséno-choline en cage ( $R=CF_3$ ) dans le site actif de la *TcAChE* cristalline. L'arsénium quaternaire est en contact avec W84 par une interaction cation -  $\pi$ . La partie aromatique de la cage est engagée dans une interaction hydrophobe avec F331 et F330. (c) Changements dans un spectre d'absorption de différence suite à l'irradiation avec un laser (longueur d'onde 266 nm) d'une durée progressive à 100 K d'un complexe cristallin de la *TcAChE* avec de la choline en cage non-arséniée (J.-Ph. Colletier, thèse de doctorat, en préparation).

La possibilité de photoclivage le composé cagé à température cryogénique (100 K), *i.e.* la cryo-photolyse, est une condition primordiale dans l'approche de cryo-cristallographie



cinétique (Fig. 20). Nous l'avons abordée d'abord à l'aide de solutions contenant de la choline cagée (Specht *et al.*, 2001). La photoconversion à 100 K est de 100% d'après le changement spectral (*i.e.* le pic d'absorption à 260 nm disparaît complètement et un pic à 310 nm apparaît), mais seulement de 50% selon des expériences de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) qui permettent d'analyser les produits de la réaction à température ambiante. La formation d'une espèce non-fragmentée et sans signature spectrale pourrait expliquer ce désaccord. La formation d'un pic d'absorption à 310 nm est aussi observée si un complexe cristallin de *TcAChE* et de la choline en cage est illuminé à 100 K (Fig. 21c). Cependant, nous ne pouvons pas prouver que l'apparition de ce pic est due à la formation de la cage clivée, car une publication récente décrit un état intermédiaire non-fragmenté de la photoconversion (état hémiacétal), dont le spectre d'absorption serait très similaire à celui de la cage libre (Corrie *et al.*, 2003). Cet état hémiacétal pourrait s'accumuler sous l'illumination à 100 K et ne donner naissance à une cage libre et de la choline qu'après passage à des températures plus élevées (Bourgeois & Weik, 2005). En conclusion, et malgré certaines données spectroscopiques, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude à l'heure actuelle que la cryo-photolyse complète d'un composé en cage est possible.

#### **5.4 Un nouvel outil spectroscopique pour la cristallographie cinétique**

La cryo-cristallographie cinétique exploite des transitions dynamiques des protéines (Fig. 20). En particulier des transitions dynamiques locales dans les sites actifs nous intéressent si nous voulons suivre les changements structuraux lors d'une catalyse enzymatique. Une nouvelle méthode spectroscopique peut fournir cette information ; il s'agit de la TDFM (Temperature Derivative Fluorescence Microspectrophotometry ; Weik *et al.*, 2004). Elle est basée sur le décalage en température du spectre de fluorescence d'un fluorophore tel que la fluorescéine (Fig. 22a et b). Ce décalage provient des changements de flexibilité dans l'environnement du fluorophore. Plus la température est élevée, plus les mouvements à l'origine de cette flexibilité sont importants, et plus le spectre de fluorescence est décalé vers les longueurs d'onde plus grandes (*red-shift*). Des changements marqués de flexibilité abrupts dans l'environnement d'un fluorophore se traduisent par un changement dans le taux du décalage du spectre de fluorescence. Ainsi, des transitions dynamiques locales dans des sites actifs peuvent être détectées si le fluorophore y réside. Ceci est illustré par la butyrylcholinestérase humaine (HuBChE, Nicolet *et al.*, 2003), une enzyme de structure similaire à celle de l'AChE. Une molécule de fluorescéine peut être fixée dans le site actif de la HuBChE cristalline (A. Royant, communication personnelle). Suivi en fonction de la

température, le décalage du spectre de fluorescence montre un changement brusque à 175 K (Fig. 22d), ce qui témoigne d'une transition dynamique locale du site actif de la HuBChE. Comme dans le cas de la AChE, elle a lieu en dessous de la transition dynamique globale mesurée par diffusion neutronique (220 K ; Gabel *et al.*, 2004, 2005). Dans une expérience de cryo-cristallographie cinétique étudiant cette enzyme, la température doit alors être augmentée d'une façon transitoire au dessus de 175 K afin d'augmenter la flexibilité du site actif.

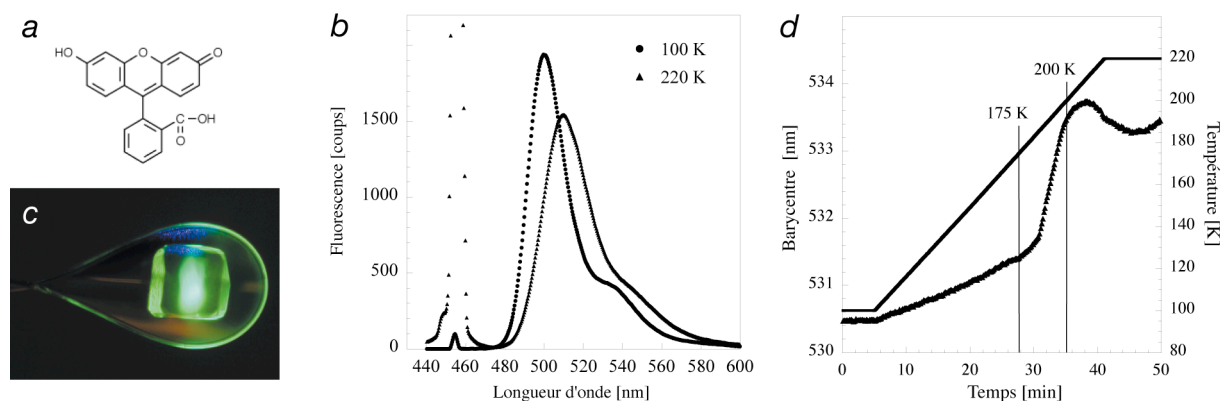


Figure 22 : (a) Structure de la fluorescéine neutre. (b) Spectres de fluorescence de la fluorescéine dans 40% (v/v) glycérol après trempe rapide à 100 K et à 220 K. Le maximum du pic à 500 et à 510 nm est dû à la fluorescence de la forme dianionique et l'épaule à la fluorescence de la forme monoanionique de la fluorescéine. L'origine du pic à 455 nm est la diffusion du laser utilisé pour la stimulation. (c) Photo d'un cristal de lysozyme complexé avec de la fluorescéine dans une boucle à 100 K. Le cristal fluoresce dans le vert suite à l'irradiation avec de la lumière bleue d'une longueur d'onde de 455 nm. (d) Barycentre (triangles) du pic dianionique de la fluorescéine liée dans le site actif de la HuBChE cristalline en fonction du temps expérimental. Après la trempe rapide à 100 K, la température (ligne pleine) a été augmentée de 100 à 220 K. Une transition dynamique locale dans le site actif de la HuBChE est observée à 175 K. De la glace cristalline commence à être formée à 200 K dans les canaux de solvant du cristal de protéine (Weik *et al.*, 2004).

La TDFM peut sonder d'autres changements dynamiques : 1) ceux dans le solvant d'un cristal de protéine (transition vitreuse, formation de la glace cristalline) si le fluorophore ne pénètre pas dans les protéines, 2) ceux dans l'environnement proche des fluorophores endogènes dans les protéines fluorescentes et 3) ceux dans l'environnement des fluorophores fixés à des endroits spécifiques dans une protéine à l'aide de mutants cystéine.

## 5.5 Avancement des travaux

Un très grand nombre (environ 150) d'expériences de cryo-cristallographie cinétique (Fig. 20) ont été effectués sur la TcAChE et la HuBChE durant ces dernières années dans les cadres de mon stage post-doctoral et de la thèse de doctorat de Jacques-Philippe Colletier et en étroite collaboration avec le Dr. Antoine Royant et le Dr. Dominique Bourgeois

(IBS/LCCP). Les paramètres explorés ont été: 1) la température d'excursion (allant de 150 à 190 K, cf. étape 3 dans la figure 20) ; 2) le temps passé à cette température (allant de quelques minutes jusqu'à plusieurs heures) ; 3) la longueur d'onde de photolyse (266 ou 355 nm) ; 4) le temps de photolyse (allant de quelques secondes à quelques minutes) ; 5) la température de cryo-photolyse (allant de 100 à 160 K) ; 6) la forme cristalline dans le cas de la *TcAChE* (groupe d'espace  $P3_121$  ou  $P2_12_12_1$ ) ; 7) le type de choline en cage (arséniée ou non ; différents groupements 'R' (cf. fig. 21a et b)) et 8) différentes lignes de lumières à l'ESRF, plus ou moins intenses. A ce jour, aucun état intermédiaire n'a pu être piégé ; *i.e.* la sortie de la choline n'a pu être mise en évidence. L'explication la plus probable est l'absence de photoclivage à basse température, évoquée dans la section 5.3. En revanche, une diminution significative de l'occupation du composé en cage a été observée suite au cryo-photoclivage suivi par une hausse transitoire (quelques secondes) de la température de 100 K à la température ambiante. La diminution de l'occupation est accompagnée d'un désordre dans le site actif et dans la région de la porte de sortie putative (près de W84 dans la *TcAChE*). Cela suggère que le cryo-photoclivage s'achève à température ambiante et que la choline libérée a pu quitter le site actif, peut être le long d'un trajet impliquant l'ouverture d'une porte de sortie. Ces résultats sont actuellement en cours d'analyse par Jacques-Philippe Colletier.

# CHAPITRE 6

## CONCLUSIONS

Les structures tridimensionnelles des macromolécules biologiques sont animées par des mouvements sur une large gamme spatiale et temporelle. Ils fournissent la flexibilité conformationnelle pour que chaque molécule puisse remplir son rôle biologique spécifique. Si nous voulons comprendre une activité biologique au niveau moléculaire, nous devons nous intéresser aussi bien aux aspects dynamiques que structuraux ; les uns ne peuvent pas être considérés sans les autres. L'étude de la relation entre structure, dynamique, cinématique et activité est essentielle pour une compréhension profonde du fonctionnement d'une macromolécule biologique. Il faut souligner que cette relation est influencée, modulée et parfois déterminée par l'environnement d'une macromolécule biologique. L'environnement le plus proche est l'eau, mais aussi les ions, les sucres, ou les lipides dans le cas des protéines membranaires. Les travaux présentés dans cette HDR sont reliés par un fil rouge qui est la motivation d'approfondir la connaissance de la relation entre structure, dynamique et fonction des macromolécules biologiques dans leur environnement. Plusieurs approches expérimentales et théoriques peuvent être imaginées pour contribuer à ce but. Ici, ce sont des études en fonction de la cryo-température qui examinent la relation entre la dynamique d'une protéine et celle de l'eau d'hydratation. Bien qu'elles soient effectuées à des températures non physiologiques, ces études éclairent des principes fondamentaux qui lient la structure, la dynamique et la fonction d'une macromolécule biologique dans son environnement physiologique. Comme exemple citons les différents radio-dommages des protéines qui ont pu être résolus à travers la variation de la cryo-température. La relation entre la dynamique de la membrane pourpre et celle de son eau d'hydratation en est un autre. L'étude des transitions dynamiques, locales et globales, des protéines et la relation avec les changements dynamiques dans leur environnement a, très probablement, plus qu'un intérêt académique ; elle peut aussi fournir des outils pratiques pour acquérir des connaissances biologiques qui sont à la base, par exemple, de la conception de nouveaux médicaments. De toute manière, une approche pluridisciplinaire et variée expérimentalement et théoriquement est nécessaire pour explorer avec succès les mystères du monde du vivant au niveau moléculaire. La variété des études exposées, ainsi que celle des projets pour l'avenir, reflète mon désir de m'intéresser au monde des macromolécules biologiques le plus largement possible.

# CHAPITRE 7

## PROJETS DE RECHERCHE

### **7.1 Effets des rayonnements ionisants sur la structure et l'activité de protéines issues de différents organismes extrêmophiles**

Ce projet a été retenu dans le cadre d'un appel d'offres 'Jeunes Chercheurs' de l'Agence Nationale de la Recherche. Il est financé à partir de l'année 2006 pour trois ans avec une somme totale de 150 k€. Le projet se base sur l'observation que les rayonnements ionisants ont des effets sur les structures, l'activité et la stabilité des macromolécules biologiques. Nous proposons d'étudier l'effet des rayonnements ionisants sur des protéines issues de différents organismes extrêmophiles (thermophiles, psychrophiles, radiorésistants et halophiles). Nous utiliserons des enzymes homologues, notamment les malate/lactate déshydrogénases extrêmophiles, qui seront étudiées dans leur état cristallin et en solution. Ce projet vise à répondre à trois questions :

- 1) En général, existe-il un lien entre l'adaptation moléculaire aux conditions physico-chimiques extrêmes et la résistance des protéines extrêmophiles aux rayonnements ionisants ?
- 2) En particulier dans le cas des protéines issues d'organismes radiorésistants - ont-elles une radiorésistance accrue ? Il a été suggéré que les mécanismes de résistance mis en place chez *Deinococcus radiodurans* par exemple visent à protéger et réparer efficacement son ADN chromosomique. En revanche, on ne sait pas si l'adaptation d'un organisme radiorésistant comporte une composante protéique au niveau structural et/ou dynamique.
- 3) Comment la dynamique d'une protéine affecte-elle la sensibilité aux rayonnements ionisants d'une part et la radiorésistance d'autre part ?

L'étude des protéines sous forme cristalline se fera par cristallographie aux rayons X. Dans ce contexte, nous avons découvert que le rayonnement intense d'un synchrotron produit des dommages spécifiques qui sont visibles par cristallographie. Parmi les effets les plus remarquables figurent la désorganisation des sites actifs enzymatiques, la rupture des ponts disulfures et la décarboxylation des acides aminés. Ce nouveau champ d'investigation qu'est la radiobiologie structurale offre de nouvelles possibilités pour mieux comprendre l'impact des rayonnements ionisants sur les protéines en général.

Des études d'irradiation en solution compléteront les études cristallographiques. La perte de la fonction enzymatique et les altérations de la stabilité seront étudiées en fonction de la dose radiative reçue. Ainsi, la relation entre adaptation aux milieux extrêmes et réponse au stress radiatif pourra être explorée au niveau fonctionnel.

L'étude de la relation entre la radiosensibilité d'une protéine et sa dynamique dans un environnement particulier fera intervenir différentes techniques biophysiques complémentaires (cristallographie cinétique, diffusion de neutrons et microspectrophotométrie). Ce projet interdisciplinaire est novateur dans sa thématique biologique et dans le choix des méthodes d'investigation et profitera amplement de l'expérience des membres du LBM/IBS concernant la biochimie et la biologie moléculaire et structurale des malate/lactate déshydrogénases. Le projet sera conduit en collaboration avec la Prof. C. Houée-Levin (Université Paris-Sud) et le Dr. R. Ravelli (EMBL, Grenoble).

## **7.2 Etude de la relation entre la structure, la dynamique et la fonction dans les protéines photosensibles par cryo-cristallographie cinétique**

Les protéines avec une photosensibilité endogène présentent l'avantage qu'elles ne doivent pas être 'dopées' de composés en cage photoactivables si l'on veut étudier la relation entre leur structure, leur dynamique et leur fonction. La détermination de leur structure avec une bonne résolution est un prérequis pour pouvoir aborder rapidement des études biophysiques. Deux protéines photosensibles, parmi d'autres, remplissent cette condition, la protéine fluorescente **EosFP** (Wiedenmann *et al.*, 2004) et l'**ADN photolyase** (revue par Essen, 2006).

EosFP est une protéine fluorescent dans le vert avec un maximum à 516 nm. Suite à l'illumination à température ambiante avec de la lumière UV (390 nm), son spectre de fluorescence se décale vers le rouge (581 nm ; Wiedenmann *et al.*, 2004). Cette photoconversion fait intervenir une rupture de la chaîne peptidique entre Phe61 et His62, dont les bases structurales ont été résolues par cristallographie aux rayons-X (Nienhaus *et al.*, 2005). Cette protéine est donc idéale pour étudier en fonction de la cryo-température comment sont liés la photoconversion spectrale, les changements structuraux de la protéine qui en résultent (rupture) et les changements dynamiques du solvant du cristal (transition vitreuse). Les questions qui seront abordées sont : 1) La cryo-photoconversion est-elle possible à 100 K? Si oui, 2) entraîne-t-elle la rupture de la chaîne peptidique à la même température? Si non, à quelle température la rupture se fait-elle ? 3) Cette température, est-elle liée à une transition dynamique, globale ou locale, de la protéine ? 4) La transition

dynamique, est-elle induite par une transition vitreuse du solvant ? Une autre question concerne l'effet de l'irradiation avec des rayons X. Lors de la photoconversion, on suppose qu'un acide glutamique (Glu212) arrache un proton au résidu His62, ce qui induirait la rupture de la chaîne peptidique (Nienhaus *et al.*, 2005). L'irradiation par rayons-X, qui pourrait décarboxyler Glu212, induit t-elle, ou, au contraire, empêche t-elle la photoconversion ? En d'autres termes, les dommages spécifiques, perturbent-t-ils le bon déroulement de l'action biologique des protéines fluorescentes ? L'utilisation d'un microspectrophotomètre 'online' sur une ligne de lumière de l'ESRF sera décisive dans ce contexte. Ce projet a déjà été initié et fait intervenir le laboratoire du Prof. Ulrich Nienhaus, et Virgile Adam et le Dr. Dominique Bourgeois du LCCP/IBS.

L'ADN photolyase est une enzyme qui répare des dommages de type CPD (*cyclobutane pyrimidine dimers*) qui sont induits par irradiation UV dans l'ADN. Ce dommage génotoxique consiste en une dimerisation de deux thymines adjacentes, empêchant la transcription et la réplication de l'ADN. La photoactivation de l'ADN photolyase par la lumière ( $\lambda=320-500$  nm) peut être suivie photospectroscopiquement (Aubert *et al.*, 2000). L'absorption d'un photon par une antenne pigmentée de l'enzyme résulte, par transfert d'énergie, en la transition vers un état excité du cofacteur FAD (*flavin adenine dinucleotide*). Ce dernier transfère un électron vers le dommage CPD de l'ADN complexé, ce qui le répare. La structure du complexe de l'ADN photolyase avec un bout d'ADN qui contient un dommage CPD a été déterminée par cristallographie avec une résolution de 1.8 Å (Mees *et al.*, 2004). Cette étude a révélé que les électrons produits par le rayonnement synchrotron dans le cristal ont induit des changements structuraux dans le cofacteur. Concernant l'activité enzymatique de l'ADN photolyase, il a été montré qu'elle cesse en dessous d'une température de 200 K (Langenbacher *et al.*, 1997). Un projet intéressant pourrait être lancé dans le futur proche qui vise à étudier les changements structuraux dans les cristaux du complexe ADN photolyase/CPD-ADN en fonction de la cryo-température. Les questions abordées seraient : 1) Quelles sont les changements spectraux de l'ADN photolyase cristalline en fonction de la cryo-température ? 2) Peut-on éviter les changements structuraux radio-induits du FAD en minimisant la dose de rayons-X par la collecte de données composites (Berglund *et al.*, 2002, Adam *et al.*, 2004)? Si oui, 3) peut-on induire la réparation du dommage CPD par l'illumination du complexe cristallin ADN photolyase/CPD-ADN et le caractériser structurellement ? Ce projet ferait intervenir le Dr. Klaus Brettel du CEA Saclay et le Prof. Lars-Oliver Essen de l'Universität Marburg.

### 7.3 Projets liés à l'étude de l'eau en biologie

Plusieurs projets ont pour but de mieux comprendre le comportement de l'eau en biologie aux niveaux moléculaire et cellulaire. Un projet concerne l'étude de la **membrane pourpre** (PM) complètement deutérée par diffusion quasi-élastique de neutrons (QENS) ; un autre propose de s'intéresser au comportement de l'eau confinée dans des empilements de **membranes lipidiques** par diffraction neutronique et calorimétrie. Un troisième, enfin, concerne l'étude de **l'eau dans des cellules**.

Nous avons vu dans le chapitre 3 que l'eau d'hydratation de la PM subit un changement dynamique à 200 K sans affecter la dynamique de la membrane. Quels mouvements sont induits dans l'eau à cette température? Nous espérons pouvoir répondre à cette question à l'aide d'expériences de QENS sur la membrane pourpre complètement deutérée. L'analyse de l'élargissement quasi-élastique en fonction de la température permettra de distinguer entre des processus de diffusion translationnelle et rotationnelle et de déterminer le coefficient de diffusion associé. Ce projet sera conduit en collaboration avec Katy Wood et le Dr. G. Zaccai de l'Institut Laue Langevin et le Prof. Dieter Oesterhelt du Max-Planck Institut für Biochemie à Martinsried.

Des premières expériences ont déjà été effectuées pour étudier le comportement de l'eau confinée dans des empilements de membranes lipidiques par diffraction neutronique (Fragneto, Meinecke, Weik ; résultats pas encore publiés). L'évolution de l'espacement lamellaire d'un empilement de DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine), hydraté avec du D<sub>2</sub>O, montre le même comportement qualitatif en fonction de la température que celui décrit pour l'eau dans la PM dans la figure 4 (Weik *et al.*, 2005b). En revanche, les températures de changements caractéristiques ne sont pas les mêmes. Cela suggère que l'eau à la surface d'une membrane lipidique se comporte différemment de celle à la surface de la PM. Afin d'étudier les propriétés des lipides qui influent sur le comportement de l'eau d'hydratation, nous effectuerons des expériences de diffraction neutronique sur des échantillons de différents lipides : de longueurs de queues hydrophobes différentes et de charges des têtes lipidiques différentes. Ces expériences seront effectuées en collaboration avec la Dr. Giovanna Fragneto de l'Institut Laue Langevin. Des expériences de calorimétrie (DSC) et de spectroscopie diélectrique (Berntsen *et al.*, 2005) compléteront l'analyse biophysique de l'eau confinée par des membranes lipidiques. Elles seront conduites en collaboration avec le laboratoire du Prof. Jan Swenson à l'Université Chalmers de Göteborg.



*Haloquadratum walsbyi* (i.e. 'carré de sel de Walsby') est une archéobactérie carrée et très plate (Walsby, 1980), qui peut être cultivée facilement depuis peu (Bolhuis *et al.*, 2004). Sa morphologie plate, et le fait qu'elle vit dans d'énormes concentrations en sel (5M NaCl et 2 MgCl<sub>2</sub>), a certainement un effet marqué sur l'activité de l'eau cellulaire. En effet, une population d'eau 'lente' a été découverte récemment dans des cellules halophiles de *Haloarcula marismortui* par QENS sur le spectromètre IN16 (Tehei, Franzetti, Wood, Gabel, Oesterhelt, Zaccai, Ginzburg, Ginzburg ; manuscrit soumis). Cette population est caractérisée par une constante de diffusion translationnelle 300 fois plus petite que celle de l'eau massive. Afin d'évaluer la mobilité de l'eau cellulaire dans *Haloquadratum walsbyi*, nous étudierons des cellules complètement deutérées, hydratées dans du H<sub>2</sub>O, par QENS sur les spectromètres IN16 et IN6 de l'ILL. Ce projet a été initié par le Prof. Oesterhelt et le Dr. G. Zaccai et sera conduit en collaboration avec eux.

## RÉFÉRENCES

Adam, V., Royant, A., Niviere, V., Molina-Heredia, F.P. and Bourgeois, D. (2004) Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure*, **12**, 1729-1740.

Alexander, P. and Lett, J.T. (1967) Effects of ionizing radiations on biological macromolecules. In *Comprehensive Biochemistry* Vol. 27, pp. 267–356, eds. Florkin & Stotz (Elsevier, Amsterdam).

Alphey, M. S., Gabrielsen, M., Micossi, E., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Ravelli, R. B., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., Bond, C. S. & Hunter, W. N. (2003) Tryparedoxins from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: photoreduction of the redox disulfide using synchrotron radiation and evidence for a conformational switch implicated in function. *J Biol Chem.*, **278**, 25919-25925.

Antognozzi, M., Humphris, A.D.L. and Miles, M.J. (2001) Observation of molecular layering in a confined water film and study of the layers viscoelastic properties. *Appl. Phys. Lett.*, **78**, 300-302.

Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature.*, **405**, 586-590.

Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. (1975) Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, **14**, 5355-5373.

Banumathi, S., Zwart, P.H., Ramagopal, U.A., Dauter, M. and Dauter, Z. (2004) Structural effects of radiation damage and its potential for phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **60**, 1085-1093.

Baxter, R. H., Seagle, B. L., Ponomarenko, N. & Norris, J. R. (2004) Specific radiation damage illustrates light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center. *J Am Chem Soc.*, **126**, 16728-16729.

Beece D., Eisenstein L., Frauenfelder H., Good D., Marden M.C., Reinisch L., Reynolds A.H., Sorensen L.B. and Yue K.T. (1980) Solvent viscosity and protein dynamics. *Biochemistry*, **19**, 5147-5157.

Bellissent-Funel, M.-C. (2001) Structure of confined water. *J. Phys.: Condens. Matter*, **13**, 9165-9177.

Bergès, J., Kassab, E., Conte, D., Adjadj, E. & Houée-Levin, C. (1997) Ab-initio calculations on arginine-disulfide complexes modeling the one-electron reduction of lysozyme. Comparison to an experimental reinvestigation. *J. Phys. Chem. A*, **101**, 7809-7817.

Bergès, J., Fuster, F., Jacquot J.-P., Silvi, B. and Houée-Levin, C. (2000) Influence of protonation on the stability of disulfide radicals. *Nukleonika*, **45**, 23-29.

Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A. and Hajdu, J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417**, 463-468.

Bergman, R. and Swenson, J. (2000) Dynamics of supercooled water in confined geometry. *Nature*, **403**, 283-286.

Berntsen, P., Bergman, R., Jansson, H., Weik, M. & Swenson, J. (2005) Dielectric and calorimetric studies of hydrated purple membrane. *Biophys J.*, **89**, 3120-3128.

Block, W. (2003) Water or ice? - the challenge for invertebrate cold survival. *Science Progress*, **86**, 77-101.

Bolhuis, H., Poele, E.M. and Rodríguez-Valera, F. (2004) Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ. Microbiol.* **6**, 1287-1291.

Bon, C., Lehmann, M.S. and Wilkinson, C. (1999) Quasi-Laue neutron-diffraction study of the water arrangement in crystals of triclinic hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 978-987.

Bon, C., Dianoux, A.J., Ferrand, M. and Lehmann, M.S. (2002) A model for water motion in crystals of lysozyme based on an incoherent quasielastic neutron-scattering study. *Biophys J*, **83**, 1578-1588.

Bourgeois, D., Vernede, X., Adam, V., Fioravanti, E. & Ursby, T. (2002) A microspectrophotometer for UV-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals. *J. Appl. Cryst.*, **35**, 319-326.

Bourgeois, D. & Royant, A. (2005) Advances in kinetic protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 538-547.

Bourgeois, D. & Weik, M. (2005). New perspectives in kinetic crystallography using caged compounds. In *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Eds. M. Goeldner, R. Givens), Wiley-vch, Germany, pp 410-434.

Bragger, J.M., Dunn, R.V. and Daniel, R.M. (2000) Enzyme activity down to  $-100^{\circ}\text{C}$ . *Biochim. Biophys. Acta*, **1480**, 278-282.

Brooks, C.L., Karplus, M. and Pettitt, B.M. (1988) Proteins. A theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics. *Adv. Chem. Phys.* **71** (Eds. I. Prigogine and S. Rice) Wiley.

Brunori, M., Bourgeois, D. and Vallone, B. (2004) The structural dynamics of myoglobin. *J Struct Biol*, **147**, 223-234.

Burmeister, W.P. (2000) Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 328-341.

Cervený, S., Schwartz, G.A., Bergman, R. and Swenson, J. (2004) Glass transition and relaxation processes in supercooled water. *Phys Rev Lett*, **93**, 245702.

Chen, K., Hirst, J., Camba, R., Bonagura, C. A., Stout, C. D., Burgess, B. K. & Armstrong, F. A. (2000) Atomically defined mechanism for proton transfer to a buried redox centre in a protein.

*Nature*, **405**, 814-817.

Clegg, J.S. and Drost-Hansen, W. (1991) On the biochemistry and cell physiology of water. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 1, pp 1-23. Elsevier Science Publishers B.V.

Daniel, R.M., Smith, J.C., Ferrand, M., Hery, S., Dunn, R. and Finney, J.L. (1998) Enzyme activity below the dynamical transition at 220 K. *Biophys J*, **75**, 2504-2507.

Dore, J. (2000) Structural studies of water in confined geometry by neutron diffraction. *Chem. Phys.*, **258**, 327-347.

Doster W., Bachleitner A., Dunau R., Hiebl M. and Lüscher E. (1986) Thermal properties of water in myoglobin crystals and solutions at subzero temperatures. *Biophys. J.*, **50**, 213-219.

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

Dubnovitsky, A.P., Ravelli, R.B., Popov, A.N. and Papageorgiou, A.C. (2005) Strain relief at the active site of phosphoserine aminotransferase induced by radiation damage. *Protein Sci*, **14**, 1498-1507.

Eisenmesser, E.Z., Bosco, D.A., Akke, M. & Kern, D. (2002) Enzyme dynamics during catalysis. *Science*, **295**, 1520-1523.

Eisenmesser, E. Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D. A., Skalicky, J. J., Kay, L. E. & Kern, D. (2005) Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, **438**, 117-121.

Ennifar, E., Carpentier, P., Ferrer, J.L., Walter, P. and Dumas, P. (2002) X-ray-induced debromination of nucleic acids at the Br K absorption edge and implications for MAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1262-1268.

Essen, L. O. (2006) Photolyases and cryptochromes: common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 1-9.

Favaudon, V., Tourbez, H., Houee-Levin, C. and Lhoste, J.M. (1990) CO<sub>2</sub>- radical induced cleavage of disulfide bonds in proteins. A gamma- ray and pulse radiolysis mechanistic investigation. *Biochemistry*, **29**, 10978-10989.

Ferrand, M., Dianoux, A.J., Petry, W. and Zaccai, G. (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9668-9672.

Finney, J. L. (2004) Water? What's so special about it? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **359**, 1145-1163; discussion 1163-1145, 1323-1148.

Fisher, M. and Devlin, J.P. (1995) Defect activity in amorphous ice from isotopic exchange data: Insight into the glass transition. *J. Phys. Chem.*, **99**, 11584-11590.

- Fitter, J. (1999) The temperature dependence of internal molecular motions in hydrated and dry alpha-amylase: the role of hydration water in the dynamical transition of proteins. *Biophys J*, **76**, 1034-1042.
- Frauenfelder H., Sligar S.G. and Wolynes P.G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**, 1598-1603.
- Fulton, A.B. (1982) How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347.
- Gabel, F., Bicout, D., Lehnert, U., Tehei, M., Weik, M. and Zaccai G. (2002) Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q. Rev. Biophys.*, **35**, 327-367.
- Gabel, F., Weik, M., Doctor, B.P., Saxena, A., Fournier, D., Brochier, L., Renault, F., Masson, P., Silman, I. and Zaccai, G. (2004) The influence of solvent composition on global dynamics of human butyrylcholinesterase powders: a neutron-scattering study. *Biophys J*, **86**, 3152-3165.
- Gabel, F., Weik, M., Masson, P., Renault, F., Fournier, D., Brochier, L., Doctor, B. P., Saxena, A., Silman, I. & Zaccai, G. (2005) Effects of soman inhibition and of structural differences on cholinesterase molecular dynamics: a neutron scattering study. *Biophys J.*, **89**, 3303-3311.
- Garman, E.F. and Schneider, T.R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 211-237.
- Garman, E. (2003) 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 545-551.
- Gleeson, J.T., Erramilli, S. and Gruner, S.M. (1994) Freezing and melting water in lamellar structures. *Biophys J*, **67**, 706-712.
- Gonzalez, A. and Nave, C. (1994) Radiation damage in protein crystals at low temperature. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 874-877.
- Greenblatt, H. M., Dvir, H., Silman, I. & Sussman, J. L. (2003) Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **20**, 369-383.
- Henderson, R. (1990) Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction. *Proc. R. Soc. Lond.* **B241**, 6-8.
- Heyes, D.J., Ruban, A.V., Wilks, H.M. and Hunter, C.N. (2002) Enzymology below 200 K: The kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11145-11150.
- Israelachvili, J.N. and Pashley, R.M. (1983) Molecular layering of water at surfaces and origin of repulsive hydration forces. *Nature*, **306**, 249-250.
- Jiang, J.-S. and Brünger, A.T. (1994) Protein hydration observed by X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, **243**, 100-115.

- Johari, G.P., Hallbrucker, A. and Mayer, E. (1987) The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, **330**, 552-553.
- Kanno, H., Speedy, R.J. and Angell, C.A. (1975) Supercooling of water to -92°C under pressure. *Science*, **189**, 880-881.
- Karplus, M. and McCammon, J.A. (2002) Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol*, **9**, 646-652.
- Koza, M.M., Geil, B., Schober, H. and Natali, F. (2005) Absence of molecular mobility on nano-second time scales in amorphous ice phases. *PhysChemChemPhys*, **7**, 1423-1431.
- Langenbacher, T., Zhao, X., Bieser, G., Heelis, P. F., Sancar, A. & Michel-Beyerle, M. E. (1997) Substrate and temperature dependence of DNA photolyase repair activity examined with ultrafast spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10532-10536.
- Lechner, R.E., Fitter, J., Dencher, N.A. and Hauss, T. (1998) Dehydration of biological membranes by cooling: an investigation on the purple membrane. *J Mol Biol*, **277**, 593-603.
- Lehnert, U., Reat, V., Weik, M., Zaccai, G. and Pfister, C. (1998) Thermal motions in bacteriorhodopsin at different hydration levels studied by neutron scattering: correlation with kinetics and light- induced conformational changes. *Biophys J*, **75**, 1945-1952.
- Lichtenegger, H., Doster, W., Kleinert, T., Birk, A., Sepiol, B. and Vogl, G. (1999) Heme-solvent coupling: a Mossbauer study of myoglobin in sucrose. *Biophys J*, **76**, 414-422.
- Mayer, E. (1991) Calorimetric glass transition in the amorphous forms of water : a comparison. *J. Mol. Struct.*, **250**, 403-411.
- McDermott, A.E. (2004) Structural and dynamic studies of proteins by solid-state NMR spectroscopy: rapid movement forward. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 554-561.
- McMillan, J.A. and Los, S.C. (1965) Vitreous ice: Irreversible transformations during warm-up. *Nature*, **206**, 806-807.
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T. & Essen, L. O. (2004) Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science.*, **306**, 1789-1793.
- Mishima, O., Calvert, L.D. and Whalley, E. (1984) 'Melting ice' I at 77 K and 10 kbar: a new method of making amorphous solids. *Nature*, **310**, 393-395.
- Mishima, O., Calvert, L.D. and Whalley, E. (1985) An apparently first-order transition between two amorphous phases of ice induced by pressure. *Nature*, **314**, 76-78.
- Mishima A. and Stanley H.E. (1998) The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature*, **396**, 329-335.
- Mozzarelli, A. and Rossi, G.L. (1996) Protein function in the crystal. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **25**, 343-365.

- Mulder, F.A., Mittermaier, A., Hon, B., Dahlquist, F.W. and Kay, L.E. (2001) Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol*, **8**, 932-935.
- Murray, J. & Garman, E. (2002) Investigation of possible free-radical scavengers and metrics for radiation damage in protein cryocrystallography. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 347-354.
- Nave, C. and Garman, E.F. (2005) Towards an understanding of radiation damage in cryocooled macromolecular crystals. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 257-260.
- Nave, C. and Hill, M.A. (2005) Will reduced radiation damage occur with very small crystals? *J Synchrotron Radiat*, **12**, 299-303.
- Nienhaus, G. U., Chu, K. & Jesse, K. (1998) Structural heterogeneity and ligand binding in carbonmonoxy myoglobin crystals at cryogenic temperatures. *Biochemistry*, **37**, 6819-6823.
- Nienhaus, K., Nienhaus, G. U., Wiedenmann, J. & Nar, H. (2005) Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9156-9159.
- Oleinikova, A., Smolin, N., Brovchenko, I., Geiger, A. and Winter, R. (2005) Formation of spanning water networks on protein surfaces via 2D percolation transition. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1988-1998.
- O'Neill, P., Stevens, D.L. and Garman, E.F. (2002) Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: a radiation chemical perspective. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 329-332.
- Ostermann, A., Waschipky, R., Parak, F. G. & Nienhaus, G. U. (2000) Ligand binding and conformational motions in myoglobin. *Nature*, **404**, 205-208.
- Owen, R. L., Rudino-Pinera, E. & Garman, E. F. (2006) Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**, 4912-4917.
- Palmer, A.G., 3rd. (2004) NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem Rev*, **104**, 3623-3640.
- Patzelt, H., Ulrich, A.S., Egbringhoff, H., Dux, P., Ashurst, J., Simon, B., Oschkinat, H. and Oesterhelt, D. (1997) Towards structural investigations on isotope labelled native bacteriorhodopsin in detergent micelles by solution-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **10**, 95-106.
- Parak, F., Knapp, E.W. and Kucheida, D. (1982) Protein dynamics. Mossbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals. *J Mol Biol*, **161**, 177-194.
- Parak, F. (1986) Correlation of protein dynamics with water mobility: Mossbauer spectroscopy and microwave absorption methods. *Methods Enzymol*, **127**, 196-206.
- Parak, F. (2003) Physical aspects of protein dynamics. *Rep. Prog. Phys.*, **66**, 103-129.

- Pearson, A. R., Mozzarelli, A. & Rossi, G. L. (2004) Microspectrophotometry for structural enzymology. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 656-662.
- Peng, L. & Goeldner M. (1998) Photoregulation of Cholinesterase Activities with Caged Cholinergic Ligands. *Methods in Enzymol.*, **291**, 265-278.
- Peng L., Nachon F., Wirz J. & Goeldner M. (1998) 2-Nitrobenzylarsonium compounds that photorelease heavy-atom cholinergic ligands for time-resolved crystallographic studies on cholinesterases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 2691-2693.
- Rasmussen B.F., Stock A.M., Ringe D. and Petsko G.A. (1992) Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature*, **357**, 423-424.
- Ravelli, R.B. and McSweeney, S.M. (2000) The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures. *Structure Fold Des*, **8**, 315-328.
- Ravelli, R.B., Theveneau, P., McSweeney, S. and Caffrey, M. (2002) Unit-cell volume change as a metric of radiation damage in crystals of macromolecules. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 355-360.
- Ravelli, R.B., Leiros, H.K., Pan, B., Caffrey, M. and McSweeney, S. (2003) Specific radiation damage can be used to solve macromolecular crystal structures. *Structure*, **11**, 217-224.
- Ravelli, R.B., Nanao, M.H., Lovering, A., White, S. and McSweeney, S. (2005) Phasing in the presence of radiation damage. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 276-284.
- Réat, V., G. Zaccai, M. Ferrand, and C. Pfister. (1997) Functional dynamics in purple membrane. In *Biological Macromolecular Dynamics*, pp. 117-122. Adenine, Guilderland, NY.
- Roberts, B. R., Wood, Z. A., Jonsson, T. J., Poole, L. B. & Karplus, P. A. (2005) Oxidized and synchrotron cleaved structures of the disulfide redox center in the N-terminal domain of *Salmonella typhimurium* AhpF. *Protein Sci*, **14**, 2414-2420.
- Rupley J.A. and Careri G. (1991) Protein Hydration and Function. In *Advances in Protein Chemistry*, edited by C. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards and D.S. Eisenberg, Vol. 41 (Academic Press, New York) pp. 37-172.
- Sartor, G., Hallbrucker, A. and Mayer, E. (1995) Characterizing the secondary hydration shell on hydrated myoglobin, hemoglobin, and lysozyme powders by its vitrification behavior on cooling and its calorimetric glass-->liquid transition and crystallization behavior on reheating. *Biophys J*, **69**, 2679-2694.
- Schotte, F., Soman, J., Olson, J.S., Wulff, M. and Anfinrud, P.A. (2004) Picosecond time-resolved X-ray crystallography: probing protein function in real time. *J Struct Biol*, **147**, 235-246.
- Schroder Leiros, H.K., McSweeney, S.M. and Smalas, A.O. (2001) Atomic resolution structures of trypsin provide insight into structural radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 488-497.



Schulze-Briese, C., Wagner, A., Tomizaki, T. and Oetiker, M. (2005) Beam-size effects in radiation damage in insulin and thaumatin crystals. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 261-267.

Silman, I. & Sussman, J. L. (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, **5**, 293-302.

Smith, R.S. and Kay, B.D. (1999) The existence of supercooled liquid water at 150 K. *Nature*, **398**, 788-791.

Specht, A., Ursby, T., Weik, M., Peng, L., Kroon, J., Bourgeois, D. & Goeldner, M. (2001) Cryophotolysis of ortho-nitrobenzyl derivatives of enzyme ligands for the potential kinetic crystallography of macromolecules. *Chembiochem*, **2**, 845-848.

Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. & Silman I. (1991) Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science*, **253**, 872-879.

Tarek, M. and Tobias, D.J. (2002) Role of protein-water hydrogen bond dynamics in the protein dynamical transition. *Phys Rev Lett*, **88**, 138101.

Teng, T.-Y. and Moffat, K. (1998) Cooling rates during flash cooling. *J. Appl. Cryst.*, **31**, 252-257.

Teng, T.Y. and Moffat, K. (2002) Radiation damage of protein crystals at cryogenic temperatures between 40 K and 150 K. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 198-201.

Tsai, A.M., Neumann, D.A. and Bell, L.N. (2000) Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: a neutron scattering study. *Biophys J*, **79**, 2728-2732.

Ursby, T., Weik, M., Fioravanti, E., Delarue, M., Goeldner, M. & Bourgeois, D. (2002) Cryophotolysis of caged compounds: a technique for trapping intermediate states in protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 607-614.

Velikov, V., Borick, S. and Angell, C.A. (2001) The glass transition of water, based on hyperquenching experiments. *Science*, **294**, 2335-2338.

Vitkup, D., Ringe, D., Petsko, G.A. and Karplus, M. (2000) Solvent mobility and the protein 'glass' transition. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 34-38.

Walsby, A.E. (1980) A square bacterium. *Nature*, **283**, 69-71.

Walser, R. and van Gunsteren, W.F. (2001) Viscosity dependence of protein dynamics. *Proteins*, **42**, 414-421.

Wang, J. and Ealick, S.E. (2004) Observation of time-resolved structural changes by linear interpolation of highly redundant X-ray diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 1579-1585.

Weik, M., Ravelli, R.B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M.L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J. and Sussman, J.L. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 623-628.

Weik, M., Kryger, G., Schreurs, A.M., Bouma, B., Silman, I., Sussman, J.L., Gros, P. and Kroon, J. (2001a) Solvent behaviour in flash-cooled protein crystals at cryogenic temperatures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 566-573.

Weik, M., Ravelli, R.B., Silman, I., Sussman, J.L., Gros, P. and Kroon, J. (2001b) Specific protein dynamics near the solvent glass transition assayed by radiation-induced structural changes. *Protein Sci*, **10**, 1953-1961.

Weik, M., Berges, J., Raves, M.L., Gros, P., McSweeney, S., Silman, I., Sussman, J.L., Houee-Levin, C. and Ravelli, R.B. (2002) Evidence for the formation of disulfide radicals in protein crystals upon X-ray irradiation. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 342-346.

Weik, M., Vernede, X., Royant, A. & Bourgeois, D. (2004) Temperature derivative fluorescence spectroscopy as a tool to study dynamical changes in protein crystals. *Biophys J*, **86**, 3176-3185.

Weik, M., Schreurs, A.M., Leiros, H.K., Zaccai, G., Ravelli, R.B. and Gros, P. (2005a) Supercooled liquid-like solvent in trypsin crystals: implications for crystal annealing and temperature-controlled X-ray radiation damage studies. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 310-317.

Weik, M., Lehnert, U. & Zaccai, G. (2005b) Liquid-like water confined in stacks of biological membranes at 200 k and its relation to protein dynamics. *Biophys J*, **89**, 3639-3646.

Weiss, M.S., Panjekar, S., Mueller-Dieckmann, C. and Tucker, P.A. (2005) On the influence of the incident photon energy on the radiation damage in crystalline biological samples. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 304-309.

Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Rocker, C., Salih, A., Spindler, K. D. & Nienhaus, G. U. (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15905-15910.